

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.29.007
文章编号: 1005-8982 (2018) 29-0036-07

肝龙胶囊联合水飞蓟素体外 抗肝纤维化的实验研究*

邵明园¹, 焦素月¹, 李燕¹, 赖泳²

(1. 大理大学 药学与化学学院, 云南 大理 671003; 2. 大理大学 云南省昆虫
生物医药研发重点实验室, 云南 大理 671003)

摘要: 目的 观察肝龙胶囊联合水飞蓟素对人肝星状细胞系 (LX-2) 转化生长因子- β_1 (TGF- β_1)、肝纤维化指标表达的影响, 以及体外抗肝纤维化作用。**方法** 体外培养 LX-2 细胞, 将对数期细胞分为水飞蓟素用药组、肝龙胶囊联合水飞蓟素用药组、阴性组。采用酶联免疫吸附法检测 TGF- β_1 、I 型胶原 (Col-I)、III 型前胶原 (PC III)、IV 型胶原 (IV-C)、层粘连蛋白 (LN)、透明质酸 (HA) 水平的变化; 逆转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 Col-I、基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP-1) mRNA 的表达。**结果** 与水飞蓟素用药组相比, 肝龙胶囊联合水飞蓟素用药组 TGF- β_1 水平降低 ($P < 0.05$); 24 和 48 h 时, LX-2 细胞 LN、HA、Col-I 水平降低 ($P < 0.05$); 24 h 时, PC III、IV-C 水平降低 ($P < 0.05$)。与阴性组比较, 肝龙胶囊联合水飞蓟素用药组在高浓度联合时可降低 LN、HA、Col-I、IV-C 的含量 ($P < 0.05$), 在低浓度时则增加 LN、HA、Col-I、IV-C 的含量 ($P < 0.05$), 对 PC III、TGF- β_1 的水平无影响 ($P > 0.05$)。与水飞蓟素用药组相比, 肝龙胶囊联合水飞蓟素用药组降低 TIMP-1 mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 在高浓度联合并在 72 h 时降低 Col-I mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 在低浓度联合时则增加 Col-I mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。**结论** 肝龙胶囊联合水飞蓟素可通过减少细胞外基质的生成, 增强水飞蓟素体外抗肝纤维化作用。

关键词: 肝龙胶囊; 水飞蓟素; 肝纤维化; 人肝星状细胞

中图分类号: R575.2

文献标识码: A

Experimental study of anti-liver fibrosis of Ganlong capsules combined with silymarin *in vitro**

Ming-yuan Shao¹, Su-yue Jiao¹, Yan Li¹, Yong Lai²

(1. College of Chemistry and Pharmacy, Dali University, Dali, Yunnan 671003, China; 2. Yunnan
Provincial Key Laboratory of Entomological Biopharmaceutical Research and Development,
Dali University, Dali, Yunnan 671003, China)

Abstract: Objective To observe the influence of Ganlong capsules combined with silymarin on expression of transforming growth factor beta 1 (TGF- β_1) in human hepatic stellate cells, hepatic fibrosis indexes and the anti-fibrosis effect *in vitro*. **Methods** Human hepatic stellate cell line (LX-2) was cultured *in vitro*. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to detect the levels of TGF- β_1 , hepatic fibrosis indexes type I collagen (Col-I), type III procollagen (PCIII), type IV collagen (IV-C), laminin (LN) and hyaluronic acid (HA). RT-PCR was used to detect the expressions of Col-I and TIMP-1 mRNAs. **Results** Compared with the compound silymarin treatment group, the content of TGF- β_1 significantly decreased ($P < 0.05$), the content of LN, HA and Col-I in the LX-2 cells decreased at the 24th and 48th h ($P < 0.05$), and the content of PCIII and IV-C decreased significantly at the 24th h ($P < 0.05$)

收稿日期: 2018-02-28

* 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金重大专项 (No: ZD2014013)

[通信作者] 赖泳, E-mail: laiyong8879@163.com; Tel: 0872-2257412

in the Ganlong capsules combined with silymarin treatment group. Compared with the negative group, Ganlong capsules combined with silymarin treatment in high concentration could reduce the content of LN, HA, Col-I and IV-C ($P < 0.05$), and increased the content of LN, HA, Col-I and IV-C with low concentration ($P < 0.05$), did not have effect on the content of PCIII or TGF- β_1 ($P > 0.05$). Compared with the silymarin treatment group, Ganlong capsules combined with silymarin treatment significantly decreased the expression of TIMP-1 mRNA ($P < 0.05$), and in high combined concentration significantly decreased the expression of Col-I mRNA at the 72th h ($P < 0.05$), at low combined concentration increased the expression of Col-I mRNA ($P < 0.05$). **Conclusions** Ganlong capsules can enhance the anti-fibrosis effect of silymarin by reducing the generation of extracellular matrix *in vitro*.

Keywords: Ganlong capsule; silymarin; hepatic fibrosis; human hepatic stellate cell

肝纤维化是诸如病毒性肝炎、脂肪肝、酒精肝等慢性肝病发展为肝硬化或肝癌的中间环节, 特征为细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 大量积累及降解失调。多种因素导致肝星状细胞活化, 并分泌促纤维化细胞因子, 使胶原合成增加是肝纤维化的主要病理过程。目前, 常用的抗肝纤维化药物有秋水仙碱、复方甘草酸苷、还原型谷胱甘肽等, 但无理想的治疗肝纤维化药物。水飞蓟素是治疗肝损伤的传统药物。研究发现, 水飞蓟素能改善实验性肝纤维化的程度, 具有肝保护作用^[1-3]。肝龙胶囊是抗肝炎的新药, 其药用成分主要为美洲大蠊提取物。美洲大蠊提取物能抑制大鼠肝星状细胞的增殖并减少 ECM 的产生^[4-5]。许多研究表明, 美洲大蠊提取物具有抗肝纤维化的作用^[6-7]。前期研究发现, 水飞蓟素单独使用时效果不明显, 会有腹泻、消化不良等不良反应。肝龙胶囊单独使用时抗肝纤维化作用不明显。因此, 本研究选取肝龙胶囊联合水飞蓟素进行体外实验, 以期为肝龙胶囊增强水飞蓟素抗肝纤维化作用, 提供药理学理论依据。

1 材料与方 法

1.1 实验细胞株

人正常肝细胞 (human hepatic stellate cell line, L-02) 购自中国科学院上海细胞库 (HTCC01), 人肝星状细胞系 (human hepatic stellate cell line, LX-2) 购自中南大学细胞库 (HTCC-4)。

1.2 药品及试剂

肝龙胶囊 (昆明赛诺制药有限公司, 批号 13032402), 水飞蓟素胶囊 (天津天士力圣特制药有限公司, 批号 15041601), III 型前胶原 (procollagen III, PC III)、IV 型胶原 (IV-collagen, IV-C)、层粘连蛋白 (laminin, LN)、透明质酸 (hyaluronic acid, HA)、I 型胶原 (collagen type I, Col-I) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 转化生长因子- β_1 (transforming

growth factor- β_1 , TGF- β_1) 酶联免疫检测试剂盒 (欣博盛生物科技有限公司), 胎牛血清 (美国 Gibco 公司, 批号 1618862), DMEM 高糖培养基粉末 (美国 Gibco 公司, 批号 1710802), Trizol (上海起发实验试剂有限公司, 批号 SL24223904), $2 \times$ Taq PCR MasterMix (上海 Thermo Scientific 公司, 批号 002222377), DNA Marker D2000 (北京天根生化科技有限公司, 批号 H7104), Biowest 琼脂糖 (北京基因科技有限公司, 批号 111760), 焦碳酸二乙酯 (diethylpyrocarbonate, DEPC) (北京索莱宝科技有限公司, 批号 729b028)。

1.3 主要仪器与设备

Synergy HT 多功能酶标仪 (美国 Bio Tek 公司), Thermo Scientific Series 型二氧化碳 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo Scientific 公司), 2720 型 PCR 扩增仪 (美国 ABI 公司), G:Box 凝胶成像系统 (英国 Syngene 公司), DYY-6C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂), 核酸蛋白测定仪 (美国 BIO-RAD 公司)。

1.4 方 法

1.4.1 细胞培养 将 LX-2 细胞从 -80°C 超低温冰箱中取出复苏, 用含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素抗生素的 DMEM 完全培养基进行培养, 细胞长至 80% ~ 90% 时用 0.2% 胰蛋白酶消化传代, 置于 37°C 、5% CO₂ 培养箱中培养, 选取对数期生长良好细胞用于实验。

1.4.2 细胞给药浓度筛选 选取对数期生长的 L-02、LX-2 细胞以 1×10^5 个/ml 的密度种板, 按 1×10^4 个/孔接种于 96 孔板, 置于 37°C 、5% CO₂ 培养箱中培养 12 h, 使其完全贴壁。将肝龙胶囊 (A) 和水飞蓟素 (C) 分别以 7.5 和 3.5 mg/ml 的浓度以二倍比向下稀释 5 个浓度进行交叉给药。采用 MTT 法测细胞的存活率, 选取药物对 L-02 细胞无明显抑制作用时的浓度作为联用药的最佳浓度。存活率 = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (阴性组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$ 。

以该最佳浓度的二倍比浮动 2 个浓度进行后续实验 (见表 1)。

表 1 肝龙胶囊和水飞蓟素进行交叉给药的浓度

药物	编号
肝龙胶囊	
0.938 mg/ml	A4
0.469 mg/ml	A5
0.235 mg/ml	A6
水飞蓟素	
0.876 mg/ml	C3
0.438 mg/ml	C4
0.219 mg/ml	C5

1.4.3 酶联免疫吸附法 细胞给药处理结束后, 取上清, 2 000 r/min 离心 20 min。将上清液转移至无菌的 96 孔板内, 按照试剂盒说明书检测 Col- I、PC III、IV -C、LN、HA、TGF- β_1 水平的变化。

1.4.4 逆转录聚合酶链反应 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 采用 RT-PCR 检测细胞内 Col-1 和 TIMP-1 mRNA 的表达。① LX-2 细胞内总 RNA 的提取、鉴定和浓度测定。采用 Trizol

试剂提取细胞中总 RNA, 取 2 μ l 总 RNA, 用 0.1% DEPC 稀释 20 倍, 用核酸蛋白测定仪检测纯度和浓度, 总 RNA 纯度以 A260/A280 在 1.80~2.00 为合格, 合格后将总 RNA 置于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。②总 RNA 逆转录。按照逆转录酶说明书进行操作, 取 1 μ g 模板 RNA 和 1 μ l Oligo (dt) 18 引物、10 μ l DEPC 灭菌水置于 EP 管中离心混匀, 65 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 冰浴 2 min 后离心, 置于冰上。依次加入 4 μ l 5 \times Reaction Buffer、1 μ l RibolockTM Ribonuclease Inhibitor、2 μ l 10 mmol/L dNTP mix 和 1 μ l RevertAidTM M-MuLV 逆转录酶。轻弹管壁使其混匀, 瞬时离心 3 s, 将反应体系置于 42 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 70 $^{\circ}$ C 终止反应 5 min, 冰上冷却; 将合成好的 cDNA 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。③ PCR 扩增 Col- I、TIMP-1 基因和内参 β -actin 基因。以逆转录合成的 cDNA 为模板, 25 μ l 反应体系内加入 8.5 μ l 灭菌超纯水, 12.5 μ l 2 \times Taq PCR Master Mix, 正向引物和反向引物各 1 μ l, 2 μ l PCR 产物进行扩增。引物序列和反应条件见表 2。④琼脂糖凝胶电泳。取 5 μ l PCR 扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果用 Gel-pro 4.0 软件对条带进行灰度、面积扫描, 以 β -actin 为内参行半定量分析, 其比值用于统计学分析。

表 2 PCR 引物序列、反应条件及产物大小

基因	引物序列	反应条件	长度 /bp
Col-1	正向: 5'-CCCGGGTTTCAGAGACAACCTTC-3'	95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 5 min	183
	反向: 5'-TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC-3'		
TIMP-1	正向: 5'-GCGCCCTTTGCATCTCTGTG-3'	94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 7 min	420
	反向: 5'-GCCAGGAACCCAGGAAGCTG-3'		
β -actin	正向: 5'-TGACTGACTACCTCATGAAGAT-3'	94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 5 min	296
	反向: 5'-CATGATGGAGTTGAAGGTAGTT-3'		

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组比较用单因素方差分析, 两两比较用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 水飞蓟素单用与联合肝龙胶囊对 L-02 细胞存活率的影响

2.1.1 水飞蓟素单用 MTT 结果显示, C3、C4、C5 组的 L-02 细胞存活率分别为 (0.48 \pm 0.05) %、(0.52 \pm 0.11) % 和 (0.70 \pm 0.12) %, 经单因素方差

分析, 差异有统计学意义 ($F = 9.023$, $P = 0.000$), L-02 细胞存活率随着水飞蓟素浓度的降低而逐渐升高。见图 1。

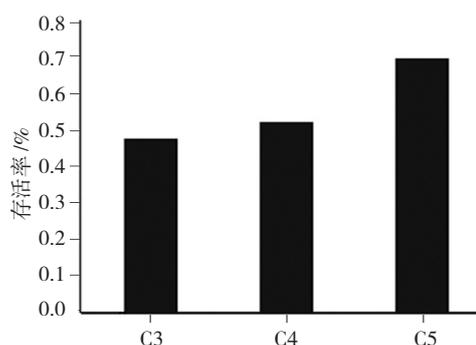


图 1 水飞蓟素单用对 L-02 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

2.1.2 水飞蓟素联合肝龙胶囊 A4C3、A4C4、A4C5、A5C3、A5C4、A5C5、A6C3、A6C4、A6C5 组的 L-02 细胞存活率分别为 (0.54 ± 0.12) %、(0.67 ± 0.13) %、(0.73 ± 0.20) %、(0.67 ± 0.09) %、(0.76 ± 0.13) %、(0.79 ± 0.15) %、(0.74 ± 0.02) %、(0.82 ± 0.10) % 和 (0.89 ± 0.32) %，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ($F = 54.369, P = 0.024$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验，当肝龙胶囊浓度为 0.469 和 0.938 mg/ml 时，与不同浓度水飞蓟素联用均可使 L-02 细胞存活率升高；当肝龙胶囊浓度 <0.938 mg/ml 时，与不同浓度水飞蓟素联用均可使 L-02 细胞存活率先升高再降低，之后又升高。见图 2。

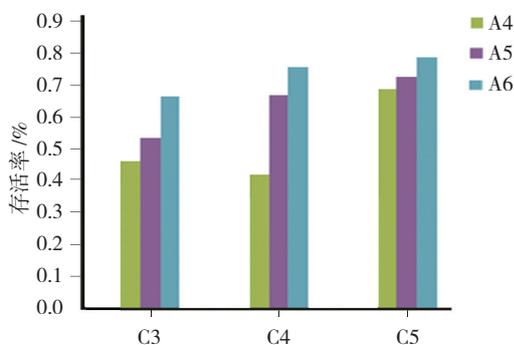


图 2 水飞蓟素联合肝龙胶囊对 L-02 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

2.1.3 水飞蓟素单用与联合肝龙胶囊 C3、C4、C5、A4C3、A4C4、A4C5、A5C3、A5C4、A5C5、A6C3、A6C4、A6C5 组的 L-02 细胞存活率比较，经单因素方差分析，差异有统计学意义 ($F = 3.575, P = 0.015$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验，与单独用药相比，0.469 mg/ml 肝龙胶囊联合 0.438 mg/ml 水飞蓟素对 L-02 细胞无明显抑制作用。见图 1、2。

2.2 肝龙胶囊联合水飞蓟素对 LX-2 细胞中 Col- I、PC III、IV -C、LN、HA、TGF-β₁ 水平的影响

24、48 和 72 h 时，各组 LX-2 细胞中 LN、HA、PC III、IV -C、Col- I 水平比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；24 和 48 h 时，各组 LX-2 细胞中 TGF-β₁ 水平比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；72 h 时，各组 LX-2 细胞中 TGF-β₁ 水平比较，经方差分析，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验，肝龙胶囊联合水飞蓟素可使 LX-2 细胞中 TGF-β₁、LN、HA、Col- I 水平降低，而对 PC III 存在双向调节的作用，高浓度时抑制，低浓度时促进；肝龙胶囊联合水飞蓟素致 LX-2 细胞中 LN、HA、Col- I、TGF-β₁ 水平降低的作用优于水飞蓟素单用 ($P < 0.05$)；肝龙胶囊联合水飞蓟素与水飞蓟素单用的 PC III、IV -C 水平比较，差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3、4。

表 3 水飞蓟素单用与联用肝龙胶囊对 LX-2 细胞 LN、HA、PC III、IV -C 含量的影响 ($n = 6, \text{ng/ml}, \bar{x} \pm s$)

组别	LN			HA			PC III			IV -C		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A4C3	19.3 ± 1.3 ¹⁾²⁾	30.9 ± 2.3 ¹⁾²⁾	16.1 ± 0.6 ¹⁾²⁾	0.56 ± 0.1 ¹⁾²⁾	3.26 ± 0.9 ¹⁾²⁾	3.79 ± 0.5 ¹⁾	22.4 ± 2.9	11.1 ± 1.2 ¹⁾	4.8 ± 0.6 ¹⁾	5.1 ± 0.9 ¹⁾	16.0 ± 0.8 ¹⁾	18.6 ± 1.9
A4C4	19.6 ± 3.1 ¹⁾²⁾	34.8 ± 5.3	35.1 ± 5.1	1.25 ± 0.2 ¹⁾²⁾	5.52 ± 1.3	5.82 ± 1.5 ²⁾	28.4 ± 6.5	16.6 ± 3.6 ¹⁾	22.8 ± 5.2	12.3 ± 2.4 ¹⁾	17.9 ± 1.6	19.1 ± 1.9
A4C5	23.3 ± 2.4 ²⁾	40.8 ± 4.5	31.2 ± 3.2 ¹⁾²⁾	2.94 ± 0.6 ²⁾	6.76 ± 0.8 ²⁾	5.96 ± 0.9 ²⁾	28.4 ± 2.6	30.6 ± 3.8	18.1 ± 0.6	14.6 ± 1.3 ¹⁾	19.9 ± 1.7	19.8 ± 1.6
A5C3	20.4 ± 2.0 ²⁾	24.8 ± 1.5 ²⁾	35.8 ± 1.6	1.04 ± 0.2 ¹⁾²⁾	3.97 ± 0.5 ²⁾	3.52 ± 0.4 ²⁾	17.0 ± 1.9	19.9 ± 1.6	22.0 ± 2.1	3.35 ± 0.3 ¹⁾	16.8 ± 1.4 ¹⁾	15.8 ± 1.5
A5C4	26.1 ± 2.1	32.3 ± 3.1	33.6 ± 1.8	1.97 ± 0.3 ²⁾	4.36 ± 0.2	4.29 ± 0.4 ²⁾	19.9 ± 0.4	24.9 ± 1.5	21.1 ± 1.4	8.36 ± 0.9 ¹⁾	18.5 ± 0.6	19.5 ± 0.7
A5C5	31.1 ± 3.8	38.1 ± 3.4	39.6 ± 4.6	2.66 ± 0.3 ²⁾	5.52 ± 0.6 ²⁾	4.7 ± 0.4 ²⁾	20.7 ± 0.6	12.5 ± 0.7	12.5 ± 0.9	16.8 ± 0.8 ¹⁾	17.3 ± 0.8	17.9 ± 1.2
A6C3	20.5 ± 2.0 ²⁾	33.2 ± 3.2	38.1 ± 1.8	1.79 ± 1.7 ²⁾	4.36 ± 0.6 ²⁾	7.02 ± 1.3	7.3 ± 0.6 ¹⁾	17.4 ± 0.2	21.6 ± 2.3	7.32 ± 0.5 ¹⁾	17.7 ± 1.6	15.2 ± 0.4
A6C4	25.3 ± 2.8	34.3 ± 5.2	39.2 ± 4.8	2.49 ± 0.6	4.66 ± 0.9	5.52 ± 1.1	7.9 ± 0.3 ¹⁾	21.6 ± 3.5	20.3 ± 3.4	17.4 ± 0.9	21.5 ± 2.0	16.5 ± 3.0
A6C5	36.5 ± 3.2	36.5 ± 3.6	47.7 ± 4.5	3.67 ± 3.4	7.61 ± 0.9	8.11 ± 0.7	9.9 ± 0.9 ¹⁾	23.2 ± 2.4	27.1 ± 2.1	17.9 ± 0.7	14.5 ± 1.5 ¹⁾	22.1 ± 2.6
C3	23.7 ± 3.1	36.4 ± 4.2	36.4 ± 4.6 ¹⁾	4.99 ± 0.6	7.56 ± 0.9	7.9 ± 0.8	6.5 ± 0.7 ¹⁾	16.6 ± 1.8	20.8 ± 2.3	8.7 ± 1.8 ¹⁾	16.9 ± 0.9 ¹⁾	16.9 ± 1.9 ¹⁾
C4	27.5 ± 2.5	36.5 ± 6.1	41.4 ± 8.6	4.69 ± 0.9	6.86 ± 2.0	9.22 ± 2.3	7.2 ± 0.8 ¹⁾	20.9 ± 2.8	19.6 ± 3.5	18.5 ± 2.9	17.2 ± 2.7 ¹⁾	16.7 ± 4.0
C5	37.9 ± 3.9	40.9 ± 3.4	49.1 ± 8.9	5.07 ± 1.4	9.01 ± 2.0	9.51 ± 1.8	10.5 ± 2.1 ¹⁾	23.8 ± 1.8	27.7 ± 2.6	19.0 ± 3.5	19.8 ± 2.7	20.6 ± 2.5
阴性组	25.1 ± 3.1	35.3 ± 5.3	43.8 ± 1.8	2.51 ± 0.6	5.01 ± 0.9	7.76 ± 1.1	18.7 ± 0.9	17.9 ± 1.3	19.9 ± 3.1	21.32 ± 2.1	20.27 ± 2.0	19.8 ± 1.5
F 值	5.096	4.786	13.079	28.808	85.139	74.044	47.510	23.134	9.272	40.401	4.129	3.204
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.006

注: 1) 与阴性组比较, $P < 0.05$; 2) 与 C3、C4、C5 组比较, $P < 0.05$

表 4 水飞蓟素单用与联合肝龙胶囊对 LX-2 细胞 Col- I、TGF- β 1 含量的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Col- I / (ng/ml)			TGF- β 1 / (pg/ml)		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A4C3	14.68 \pm 1.6 ⁽¹⁾²⁾	13.7 \pm 2.3 ⁽¹⁾²⁾	14.6 \pm 2.4 ⁽¹⁾²⁾	960.2 \pm 23.1 ²⁾	1023.6 \pm 9.8	1 833.7 \pm 13 ²⁾
A4C4	16.7 \pm 2.4 ⁽¹⁾²⁾	12.2 \pm 3.1 ⁽¹⁾²⁾	14.9 \pm 3.6 ⁽¹⁾²⁾	981.9 \pm 24	965.2 \pm 15 ¹⁾	1 863.6 \pm 35 ²⁾
A4C5	19.1 \pm 1.3 ⁽¹⁾²⁾	17.0 \pm 1.2 ²⁾	17.7 \pm 2 ¹⁾	867.1 \pm 42 ⁽¹⁾²⁾	941.9 \pm 63 ¹⁾	1 789.0 \pm 20 ²⁾
A5C3	17.0 \pm 2.5 ⁽¹⁾²⁾	14.4 \pm 2.1 ⁽¹⁾²⁾	17.8 \pm 2.6 ¹⁾	991.9 \pm 33	883.7 \pm 32 ¹⁾	1 965.2 \pm 24 ²⁾
A5C4	20.39 \pm 0.9	15.7 \pm 0.8 ⁽¹⁾²⁾	19.4 \pm 0.6 ¹⁾	930.3 \pm 51 ²⁾	950.2 \pm 36 ¹⁾	2 000.2 \pm 45 ²⁾
A5C5	23.2 \pm 0.9	15.9 \pm 0.8 ⁽¹⁾²⁾	18.9 \pm 1.3 ¹⁾	978.5 \pm 51 ¹⁾	1 008.5 \pm 38	2 028.5 \pm 49 ²⁾
A6C3	21.7 \pm 1.3	17.1 \pm 0.6 ¹⁾	19.4 \pm 0.8 ¹⁾	1 046.8 \pm 46	991.9 \pm 34	2 106.7 \pm 43 ²⁾
A6C4	23.5 \pm 0.2	20.3 \pm 0.1 ¹⁾	21.5 \pm 1.1 ¹⁾	995.2 \pm 32	888.7 \pm 24 ¹⁾	2 193.2 \pm 43
A6C5	27.5 \pm 1.6	20.7 \pm 2.0 ¹⁾	20.9 \pm 1.4 ¹⁾	1 088.4 \pm 34	1 349.7 \pm 46	2 576.2 \pm 52
C3	24.9 \pm 3.4	20.3 \pm 2.9	22.6 \pm 3.4 ¹⁾	1 058.8 \pm 35	1 003.9 \pm 42 ¹⁾	2 118.7 \pm 48
C4	25.7 \pm 6.2	22.5 \pm 4.3	23.7 \pm 3.8 ¹⁾	1 022.2 \pm 61	1 045.5 \pm 33	2 220.2 \pm 39
C5	28.9 \pm 6.2	22.1 \pm 5.3	22.3 \pm 4.0 ¹⁾	1 092.1 \pm 36	1 383.7 \pm 26	2 610.2 \pm 41
阴性组	23.9 \pm 2.5	37.2 \pm 3.4	46.3 \pm 1.6	951.9 \pm 41	1 288.1 \pm 26	1 835.7 \pm 58
F 值	12.169	103.908	71.549	174.676	2415.158	1.355
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.249

注: 1) 与阴性组比较, $P < 0.05$; 2) 与 C3、C4、C5 组比较, $P < 0.05$

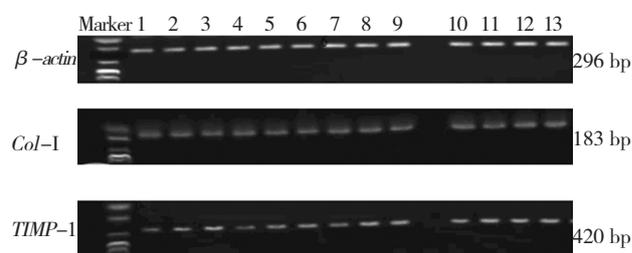
2.3 Col- I、TIMP-1、 β -actin 基因扩增的 PCR 产物

对 Col-I、TIMP-1、 β -actin 基因进行扩增, 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果见图 3。

2.4 水飞蓟素单用与联用肝龙胶囊对 LX-2 细胞中 Col- I 和 TIMP-1 mRNA 表达的影响

24、48 和 72 h 时, 各组 LX-2 细胞中 Col- I 和 TIMP-1 mRNA 相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较经 LSD- t 检验, 水飞蓟素在单独用药情况下随着浓度的升高, 对 Col- I mRNA 表达的抑制作用逐渐增强。水飞蓟素对 TIMP-1 mRNA 的影响存在浓度依赖性和时间依赖性。水飞蓟素与 A5 组联合作用 24 h 时的 Col- I mRNA 表达水平与阴性组比较无抑制作用, 但在 72 h 效果较好。水飞蓟素与肝龙胶囊联合使用时, 在较高浓度的情况下对 Col- I mRNA 的抑制作

用也是远期效果较好, 且优于单药使用; 较低浓度的联合对 Col- I mRNA 无抑制作用; 当肝龙胶囊浓度不变时, 只有与低浓度的水飞蓟素联合对 TIMP-1 mRNA 的影响在 24 h 时不如单独用药, 其他浓度组合均优于单独用药, 且以远期效果最佳 ($P < 0.05$)。见表 5。



1: A4C3; 2: A4C4; 3: A4C5; 4: A5C3; 5: A5C4; 6: A5C5; 7: A6C3; 8: A6C4; 9: A6C5; 10: C3; 11: C4; 12: C5; 13: 阴性组

图 3 Col- I、TIMP-1 基因 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图

表 5 水飞蓟素单用与联用肝龙胶囊对 LX-2 细胞 Col- I 和 TIMP-1 mRNA 表达的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	Col- I mRNA			TIMP-1 mRNA		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
A4C3	0.54 ± 0.12	0.42 ± 0.11 ¹⁾	0.26 ± 0.05 ¹⁾	0.23 ± 0.02 ¹⁾²⁾	0.22 ± 0.03 ¹⁾	0.18 ± 0.05 ¹⁾
A4C4	0.61 ± 0.21	0.39 ± 0.14 ¹⁾²⁾	0.26 ± 0.07 ¹⁾²⁾	0.29 ± 0.06 ¹⁾²⁾	0.27 ± 0.04 ¹⁾	0.19 ± 0.04 ¹⁾
A4C5	0.55 ± 0.16	0.35 ± 0.07 ¹⁾²⁾	0.29 ± 0.02 ¹⁾²⁾	0.44 ± 0.11	0.23 ± 0.02 ¹⁾	0.17 ± 0.02 ¹⁾²⁾
A5C3	0.87 ± 0.25	0.67 ± 0.17	0.24 ± 0.05 ¹⁾²⁾	0.25 ± 0.03 ¹⁾²⁾	0.13 ± 0.02 ¹⁾²⁾	0.19 ± 0.05 ¹⁾
A5C4	0.84 ± 0.22	0.70 ± 0.18	0.24 ± 0.03 ¹⁾²⁾	0.39 ± 0.07	0.37 ± 0.09	0.21 ± 0.05 ¹⁾
A5C5	0.83 ± 0.17	0.49 ± 0.16	0.40 ± 0.08 ²⁾	0.36 ± 0.04	0.30 ± 0.03 ¹⁾	0.17 ± 0.03 ¹⁾
A6C3	0.55 ± 0.06	0.57 ± 0.09	0.56 ± 0.10	0.27 ± 0.02 ¹⁾²⁾	0.27 ± 0.06 ¹⁾	0.15 ± 0.05 ¹⁾
A6C4	0.66 ± 0.11	0.76 ± 0.21	1.19 ± 0.32	0.39 ± 0.1	0.21 ± 0.07 ¹⁾²⁾	0.28 ± 0.07 ¹⁾
A6C5	0.63 ± 0.14	0.66 ± 0.13	0.64 ± 0.18	0.60 ± 0.17	0.35 ± 0.08	0.38 ± 0.09
C3	0.64 ± 0.14	0.54 ± 0.1	0.39 ± 0.02 ¹⁾	0.29 ± 0.08 ¹⁾	0.23 ± 0.05	0.17 ± 0.07 ¹⁾
C4	0.74 ± 0.13	0.57 ± 0.1	0.42 ± 0.08 ¹⁾	0.39 ± 0.09	0.34 ± 0.06	0.28 ± 0.07
C5	0.72 ± 0.08	0.76 ± 0.05	0.80 ± 0.29	0.33 ± 0.04	0.29 ± 0.08	0.29 ± 0.02
阴性组	0.71 ± 0.20	0.73 ± 0.15	0.69 ± 0.09	0.51 ± 0.13	0.54 ± 0.12	0.52 ± 0.08
F 值	135.564	286.062	1281.955	434.306	480.806	869.578
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与阴性组比较, $P < 0.05$; 2) 与 C3、C4、C5 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

慢性肝病严重威胁着人们的生活健康, 全世界 > 10 000 万人是乙型肝炎病毒的感染者。慢性肝病将发展为肝纤维化, 肝纤维化是肝脏持续受损后的一种愈合反应, 表现为 ECM 合成与降解失衡, 减少 ECM 的产生可以阻止肝纤维化的发展^[8]。肝纤维化时, ECM 大量合成, 其中 Col- I 是最主要的胶原成分, 而 TIMP-1 是抑制 Col- I 降解的主要酶。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 与 TIMPs 调节 ECM 的合成和降解, TIMPs 可抑制 MMPs 的表达, 使 ECM 降解减少^[9]。目前, 诊断肝纤维化程度的金标准为肝组织活检, 但该标准存在许多缺陷, 因此 PC III、IV -C、LN、HA 4 项指标在临床上具有重要的意义^[10]。TGF- β_1 在肝纤维化过程中起最关键的作用。这 6 项指标在肝纤维化过程中大量生成, 因此监测药物对肝脏纤维化 4 项指标和 Col- I、TGF- β_1 水平的影响, 即可大致对肝纤维化做出疗效观察或预后判断。

水飞蓟素和肝龙胶囊都是抗肝纤维化的药物。水飞蓟素是一种天然多酚类黄酮化合物, 是从药用植物水飞蓟或奶蓟果实中提取的有效成分, 由水飞蓟宾、

水飞蓟宁、水飞蓟丁组成, 是重要的保肝药。水飞蓟素具有强大的抗氧化、抗肝细胞凋亡、抗炎^[11]、抗肿瘤^[12]、肝细胞保护作用^[2]。研究发现, 水飞蓟素还具有抗肝纤维化作用, 能降低慢性乙肝患者血清中 LN、HA、IV -C 的含量, 具有较好的抗肝纤维化疗效^[13]。肝龙胶囊是治疗慢性乙型肝炎的中药, 对大鼠酒精性肝损伤具有防治作用^[14]。夏超等^[15]研究表明, 肝龙胶囊主要的药用成分美洲大蠊提取物能降低血清 LN、HA、PC III、IV -C 的水平, 下调肝组织中肌动蛋白和 TGF- β_1 蛋白的表达, 同时能减轻肝脏损伤程度。

本研究结果发现, 肝龙胶囊联合水飞蓟素可使 LX-2 细胞中 LN、HA、Col- I 水平降低, 从而减少蛋白聚糖多聚体、胶原蛋白、基底膜等生成。但肝龙胶囊联合水飞蓟素对 PC III、IV -C、TGF- β_1 在高浓度联合条件下抑制效果较好, 且在 24 h 时有抑制作用, 随着时间的延长, 又呈现增长的趋势, 这可能是由于随着时间的延长, 使已分泌的 TGF- β_1 、IV -C 等因子进一步活化 LX-2 细胞, 令其活化扩大化, 而生成更多的 TGF- β_1 、IV -C 等因子。

另外, 在较高浓度情况下, 肝龙胶囊联合水飞蓟素对 Col- I mRNA 抑制作用的远期效果优于单药使

用,但较低浓度的联合作用不佳;对 TIMP-1 mRNA 的影响均优于单独用药;两者联合作用于 TIMP-1 mRNA 时效果优于单独用药,且呈现时间依赖性。肝龙胶囊联合水飞蓟素可以有效地提高 MMPs 的活性,下调 TIMP-1 的表达,加速 ECM 的降解,从而逆转肝纤维化。TGF- β_1 是肝星状细胞激活的主要因子,可通过抑制 MMPs 产生和促进 TIMPs 合成,使 ECM 增加。在本实验中,肝龙胶囊联合水飞蓟素较水飞蓟素单用减少 TGF- β_1 的产生,抑制 TIMP-1 mRNA 的表达,使 ECM 降解。因此,肝龙胶囊联合水飞蓟素抗肝纤维化的作用优于水飞蓟素单独使用,肝龙胶囊起到协同增效的作用。

本实验尚存在许多不足,所用细胞为人源细胞,与原代细胞存在较大差异,体内外影响因素较大,因此下一步研究可以从体内实验、原代细胞实验方面进行。肝龙胶囊联合水飞蓟素抗肝纤维化作用的机制也不明确,需要进一步研究。

参 考 文 献:

- [1] BEKTUR N E, SAHIN E, BAYCU C, et al. Protective effects of silymarin against acetaminophen-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in mice[J]. *Toxicol Ind Health*, 2016, 22(4): 589-600.
- [2] VARGAS-MENDOZA N, MADRIGAL-SANTILLAN E, MORALES-GONZALE A, et al. Hepatoprotective effects of silymarin[J]. *World J Hepatol*, 2014, 6(3): 144-149.
- [3] CLICHICI S, OLTEANU D, FILIP A, et al. Beneficial effects of silymarin after the discontinuation of CCl₄-induced liver fibrosis[J]. *J Med Food*, 2016, 19(8): 789-797.
- [4] 沈敏. 美洲大蠊提取物对肝星状细胞凋亡及 PI3K/AKT/p70-(S6k) 信号通路影响的实验研究 [D]. 昆明: 昆明医科大学, 2015.
- [5] 刘丽辉, 李武, 马得宏, 等. 美洲大蠊提取物对肝纤维化大鼠 NF- κ B 和 α -SMA 表达的影响 [J]. *重庆医学*, 2014, 43(17): 2152-2154.
- [6] 王艳荣, 王利娜, 张秋瓚, 等. 美洲大蠊提取物对实验性肝纤维化大鼠的保护作用 [J]. *天津医药*, 2013, 41(12): 1195-1198.
- [7] 李春艳, 陈衍杰, 李树楠, 等. 美洲大蠊提取物含药血清体外抗肝纤维化的实验研究 [J]. *中药材*, 2013, 36(5): 707-711.
- [8] 孔德松, 张自力, 张峰, 等. 川芎嗪联合丹皮酚对 CCl₄ 致大鼠肝纤维化的抑制作用及其机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(12): 1741-1745.
- [9] ROBERT S, GICQUEL T, BODIN A, et al. Characterization of the MMP/TIMP imbalance and collagen production induced by IL-1beta or TNF-alpha release from human hepatic stellate cells[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): 1-14.
- [10] ZHU C, QI X, LI H, et al. Correlation of serum liver fibrosis markers with severity of liver dysfunction in liver cirrhosis: a retrospective cross-sectional study[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(4): 5989-5998.
- [11] SHERIF I O, ALGAYYARI M M. Antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of silymarin on hepatic dysfunction induced by sodium nitrite[J]. *Eur cytokine netw*, 2013, 24(3): 114-121.
- [12] MASTRON J K, SIVEEN K S, SETHI G, et al. Silymarin and hepatocellular carcinoma: a systematic, comprehensive, and critical review[J]. *Anticancer Drugs*, 2015, 26(5): 475-486.
- [13] 刘再伏. 水飞蓟宾对肝纤维化指标的影响 [J]. *今日健康*, 2016, 15(4): 354-354.
- [14] 张旭强, 吴红兵, 彭丽, 等. 肝龙胶囊对大鼠慢性酒精性肝损伤的防治作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(13): 2197-2201.
- [15] 夏超, 王佳佳, 李芳群, 等. 美洲大蠊水提取物对免疫性肝纤维化大鼠的保护作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(2): 199-204.

(童颖丹 编辑)