

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.16.005

文章编号: 1005-8982(2017)16-0024-06

肝龙胶囊联合水飞蓟宾胶囊在体外对大鼠 肝星状细胞增殖活性的影响研究*

杨强丽, 李辉, 赖泳

(大理大学药学与化学学院 药理学教研室, 云南 大理 671000)

摘要:目的 研究临床常用抗肝纤维化药物水飞蓟宾胶囊单用及联合肝龙胶囊对大鼠肝星状细胞(HSC)增殖活性的影响, 评价肝龙胶囊在体外对水飞蓟宾抗肝纤维化作用的影响。**方法** 采用 2 因素 5 水平完全实验, 单独或联合使用不同剂量水飞蓟宾胶囊和肝龙胶囊在不同时间作用于 HSC, 并用 MTT 比色法测定 HSC 增殖影响。**结果** 水飞蓟宾胶囊与肝龙胶囊合用增强水飞蓟宾胶囊对 HSC 的抑制作用, 尤其是 0.063、0.125 和 0.250 mg/ml 浓度的水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊合用后, 水飞蓟宾胶囊的作用明显增加, 与单用水飞蓟宾胶囊组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。水飞蓟宾胶囊联合不同浓度肝龙胶囊的 IC₅₀ 值与单用水飞蓟宾胶囊的 IC₅₀ 值相比较, 在 24、48 和 72 h 时均有降低, 且水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合后, 其合用指数 CI < 1.0, 呈现出协同作用, 增强了水飞蓟宾胶囊对 HSC 细胞的抑制作用。**结论** 肝龙胶囊在体外能增强水飞蓟宾胶囊的抗肝纤维化作用。

关键词: 肝星状细胞; 水飞蓟宾胶囊; 肝龙胶囊; 细胞活性

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Effect of Ganlong Capsules combined with Silibinin Capsules on *in vitro* proliferative activity of rat hepatic stellate cells*

Qiang-li Yang, Hui Li, Yong Lai

(Department of Pharmacology, College of Pharmacy and Chemistry,
Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of anti-liver fibrosis agent Silibinin Capsules alone or combined with Ganlong Capsules on proliferative activity of rat hepatic stellate cells (HSC), and to evaluate the effect of Ganlong Capsules on the *in vitro* anti-liver fibrosis activity of Silibinin. **Methods** Two-factors and five-levels full experiment was applied for single use or combined use of Silibinin Capsules with different dosages of Ganlong Capsules in HSC at different time points. Tetrazolium salt colorimetric assay (MTT) was utilized to determine the effect of Ganlong Capsules on HSC proliferation. **Results** Combination of Silibinin Capsules and Ganlong Capsules enhanced the suppression effect of Silibinin Capsules on HSC proliferation. The effect of Silibinin Capsules was obviously increased especially at a dosage of 0.063 mg/ml, 0.125 mg/ml or 0.250 mg/ml and in combination with Ganlong Capsules, and the differences were significant when compared with the Silibinin Capsule single drug groups ($P < 0.05$). Compared with the IC₅₀ value of Silibinin Capsules alone, the IC₅₀ values of Silibinin Capsules combined with Ganlong Capsules at different dosages decreased at 24, 48 and 72 h. Moreover, the combination indexes (CI) of the combined drug therapies were all less than 1.0, which illustrated synergistic effect and enhanced the suppression effect of Silibinin Capsules on HSC. **Conclusions** Ganlong Capsules can enhance the *in vitro* anti-liver fibrosis effect of Silibinin Capsules.

Keywords: hepatic stellate cell (HSC); Silibinin capsule; Ganlong capsule; cell activity

收稿日期: 2017-01-15

* 基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目 (No: 2016YJS120); 云南省教育厅科学研究基金重大专项项目 (No: ZD2014013)

[通信作者] 赖泳, E-mail: lai Yong8879@163.com

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)是一种慢性损伤的反应,促进细胞外基质蛋白的积累,最终可导致肝硬化和肝癌,严重威胁着肝慢性疾病患者的健康和生活,但目前没有有效的药物或治疗方法。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)是正常肝脏引起肝纤维化的中心环节, HSC 被激活后可转化成肌纤维母细胞,诱发促纤维化细胞因子的分泌,胶原合成增加^[1-2]。肝纤维化与肝硬化不同的是,肝纤维化为可逆性病变,因此,抑制肝纤维化的发生和发展,对预防和治疗慢性肝病和肝硬化具有重要意义。

水飞蓟素是从菊科草本植物水飞蓟果实提取的活性成分,主要治疗肝胆系统疾病。水飞蓟素包括水飞蓟宁、异水飞蓟宾及水飞蓟宾等,其中,水飞蓟宾的保肝活性最强,量也最高。水飞蓟宾胶囊应用广泛,疗效确切,临床上主要用于治疗急慢性肝炎和肝纤维化。根据以往的研究,水飞蓟宾胶囊具有抗纤维化、抗炎、免疫调节促进蛋白合成、抗氧化、调节细胞周期、细胞再生及诱导细胞凋亡等作用。在胆管结扎的肝纤维化模型中发现,水飞蓟宾胶囊可降低 35% 的总胶原蛋白量,抑制肝脏 TIMP1、TGF- β_1 及 I 型胶原的 mRNA 表达水平^[3-4]。水飞蓟宾胶囊能改善大鼠酒精性肝组织损伤^[5],减轻肝纤维化。美洲大蠊(*periplaneta mericana*),为昆虫纲有翅亚纲蜚蠊目蜚蠊科大蠊属昆虫。在民间,人们用蟑螂来治疗肝炎或肝硬化等疾病者^[6]。药理作用主要包括抗病毒作用、组织修复作用、消炎等。肝龙胶囊作为肝细胞膜稳定剂,主要用于抗肝炎的中药新药^[7],具有疗效较好、给药方便、无不良反应等优点。肝龙胶囊对大鼠慢性酒精性肝损伤也有显著的防治作用^[8]。肝龙胶囊可保护 CCl₄ 所致的小鼠肝损伤,此外肝龙胶囊有显著的抗乙型肝炎作用并对各种刺激因素导致的肝损伤具有修复作用^[9]。有研究表明^[10],美洲大蠊提取物对大鼠 HSC 有抑制作用。但肝龙胶囊单独用药治疗肝纤维化的临床效果不理想,联合用药可能会有较好的治疗效果,且肝龙胶囊与水飞蓟宾胶囊联合使用作用于 HSC 进行体外抗肝纤维化的研究并未见报道。因此,本研究选用大鼠 HSC,给予肝龙胶囊和水飞蓟宾胶囊联合处理,观察药物对细胞增殖抑制作用,来探讨肝龙胶囊在体外对水飞蓟宾胶囊抗肝纤维化的影响。本文采用 MTT 法检测肝龙胶囊与水飞蓟宾胶囊联合对大鼠 HSC 细胞的体外增殖抑制作用,为寻找治疗肝纤维化的药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

细胞株:大鼠肝星状细胞(HSCT6)购自中国科学院昆明细胞库(No:KCB200703YJ)。试剂:DMEM 培养基粉末(美国 Gibco 公司 Lot:1710802),Hepes(北京索莱宝公司),碳酸氢钠(分析纯,天津市风船化学试剂科技有限公司),胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司 Lot:1618862),噻唑蓝(MTT,北京索莱宝公司 Lot:1028D056)。药品:水飞蓟宾胶囊(天津天士力圣特制药有限公司,批号:16041601);肝龙胶囊(昆明赛诺制药有限公司,批号:550706087)。

1.2 仪器与设备

Thermo Scientific Series 二氧化碳恒温培养箱(美国 Thermo 公司),CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),Synergy HT 多功能酶标仪(美国 BIO Tek 公司),80-2 型台式点的离心机(江苏省金坛市科析仪器有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 MTT 的配制 (5 mg/ml) 精密称取 500 mg MTT 粉,将其溶于 100 ml 灭菌水中,超声 30 min,待 MTT 粉完全溶解后,避光, -20℃ 冰箱内保存。DMEM 培养基的配制[1%青链霉素抗生素(10 000 IU/ml 的青霉素, 10 000 μ g/ml 的链霉素)+10%胎牛血清]:先将 DMEM 溶于 1L 灭菌水中搅拌 15 min, 溶解完毕加入 4.766 g Hepes 并搅拌 15 min 后加入碳酸氢钠 2.0 g, 同样继续搅拌 15 min。在超净台内用 0.22 μ m 滤膜进行过滤, 4℃ 冰箱内保存备用。使用前,在超净台内分别加入 10% 的胎牛血清和 1% 青链霉素抗生素, 4℃ 冰箱保存。

1.3.2 细胞培养 将细胞从 -80℃ 超低温冰箱取出,在 37℃ 内摇晃至融化,将细胞冻存液吸入装有 10 ml 培养基的 15 ml 离心管内, 2 000 r/min; 遗弃上清液,加入 7~8 ml 的 DMEM 培养基对细胞吹打均匀,再吸入装有新鲜培养基的培养瓶内吹打均匀。并放 37℃、5%CO₂ 培养箱内培养;当细胞长到 80% 左右时,就对其进行传代。

1.3.3 药物浓度筛选 种板:将 HSC 细胞经过消化离心后,用新的培养基吹打均匀,其种板密度为 6 \times 10⁴ 个/ml,并设空白对照组和阴性组对照。并置于 37℃、5%CO₂ 培养箱内培养细胞 12 h,使其完成贴壁。分组:吸弃培养基上清液,加入培养基和药物溶液:肝龙胶囊(A)3.750、1.880、0.938、0.469 和 0.235 mg/ml,水飞蓟宾胶囊(B)以 1.000、0.500、0.250

和 0.125 和 0.063 mg/ml 浓度进行 2 因素 5 水平完全实验设计,并设立单独用药组。并置 37℃、5%CO₂ 培养箱内分别培养 24、48 和 72 h。遗弃培养基,用 PBS 清洗 2 次,每孔加入 MTT 溶液 20 μl,继续孵育 4 h 后,加入 150 μl DMSO,使用酶标仪 490 nm 处检测光密度(OD)值。

1.4 统计学方法

数据处理用 SPSS 17.0 软件。所得数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。抑制率(fa) = (实验组 OD 值 - 空白组 OD 值) / (阴性组 OD 值 - 空白组 OD 值) × 100%; IC₅₀ 值根据细胞生长抑制率 - 药物浓度绘制生长曲线。联合指数 $CI = AB$ (联合组 OD 值 / 阴性 OD 值) / A (单用 A 药组 OD 值 / 阴性 OD 值) × B (单用 B 药组 OD 值 / 阴性 OD 值)。

2 结果

2.1 HSC 细胞的形态

HSC 被不同浓度处理不同时间后,倒置显微镜下放大 4 倍观察细胞的形态特征,阴性对照组细胞状态良好,紧贴板底,细胞呈纤维样。用 0.469 mg/ml 肝龙胶囊处理 24 h 后 HSC 细胞状态良好,细胞形态未出现太多改变。而单用 0.125 mg/ml 水飞蓟宾胶囊处理 24 h 后 HSC 细胞状态与阴性对照组的 HSC 细胞相比,细胞数有一定程度的减少,且细胞形态缩短或呈球状。而 0.469 mg/ml 肝龙胶囊联合 0.125 mg/ml 水飞蓟宾胶囊处理 24 h 后 HSC 细胞数明显减少,细胞形态基本上呈球状。见图 1 ~ 6。

2.2 HSC 细胞的生长抑制情况

2.2.1 水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合 24 h 后对 HSC 细胞的生长抑制作用 水飞蓟宾胶囊浓度为 0.063、0.125、0.250、0.500 和 1.000 mg/ml 时对 HSC 细胞的抑制率分别为 26.1%、27.3%、44.8%、47.3% 和 80.7%。0.063 mg/ml 水飞蓟宾胶囊分别与 3.750、1.875、0.938、0.469 和 0.235 mg/ml 浓度的肝龙胶囊联合后,其中与 3.750 mg/ml 肝龙胶囊联合后的抑制率与单用水飞蓟宾胶囊相比,差异有统计学意义($t = -29.475, P = 0.001$),联合后的抑制率增大。0.125 mg/ml 水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合后,其中与 0.938 mg/ml 肝龙胶囊联合后的抑制率与单用水飞蓟宾胶囊相比,差异有统计学意义($t = -16.667, P = 0.000$),联合后抑制率增大。0.250 mg/ml 水飞蓟宾与不同浓度的肝龙胶囊联合,其中与

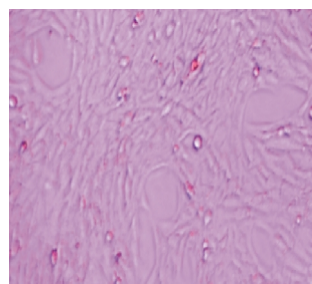


图 1 阴性对照组 24 h (倒置显微镜 × 4)

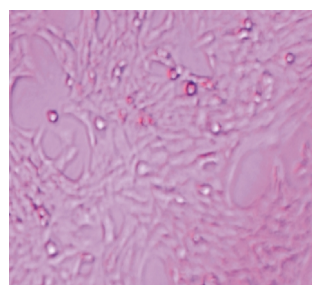


图 2 单用 0.469 mg/ml 肝龙胶囊 24 h (倒置显微镜 × 4)

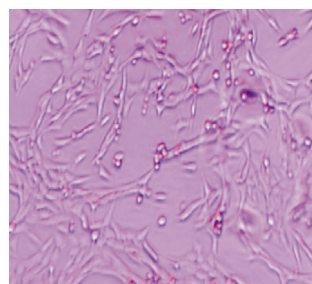


图 3 单用 0.125 mg/ml 水飞蓟宾胶囊 24 h (倒置显微镜 × 4)

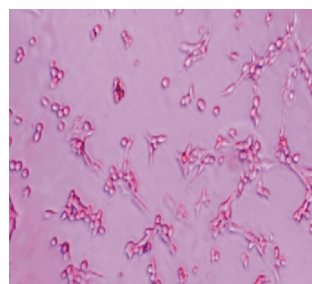


图 4 0.125 mg/ml 水飞蓟宾胶囊 + 0.469 mg/ml 肝龙胶囊 24 h (倒置显微镜 × 4)

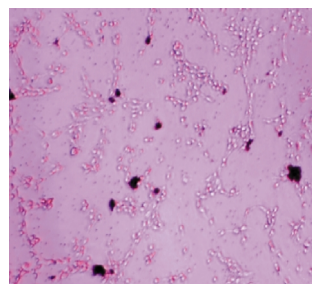


图 5 单用 1.000 mg/ml 水飞蓟宾胶囊 24 h (倒置显微镜 × 4)

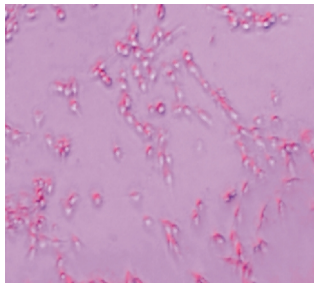


图 6 1.000 mg/ml水飞蓟宾胶囊 +0.469 mg/ml 肝龙胶囊 24 h (倒置显微镜×4)

1.875、0.938、0.469、0.235 mg/ml 肝龙胶囊联合后的抑制率与单用水飞蓟宾胶囊相比,差异具有统计学意义($t=-3.198$ 、 -6.672 、 -8.751 和 -12.421 , $P=0.033$ 、 0.011 、 0.005 和 0.000),联合后抑制率增大。见表 1。

2.2.2 水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合 48 h 后对 HSC 细胞的生长抑制作用 水飞蓟宾胶囊浓度为 0.063、0.125、0.250、0.500 和 1.000 mg/ml 时对 HSC 细胞的抑制率分别为 36.4%、52.3%、88.7%、87.3%和 77.1%。0.063 及 0.125 mg/ml 浓度水飞蓟宾胶囊分别与 3.750、1.875、0.938、0.469 和 0.235 mg/ml 肝龙胶囊联合后的抑制率与单用水飞蓟宾胶囊相比,差异有统计学意义($t=-4.434$ 、 -3.423 、 -4.434 、 -4.596 和 -5.192 , $P=0.020$ 、 0.039 、 0.020 、 0.017 和 0.011),联合后的抑制率增大。1.000 mg/ml 浓度水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合后,其中与 3.750 和

0.938 mg/ml 肝龙胶囊联合后的抑制率与单用水飞蓟宾胶囊相比,差异有统计学意义($t=-5.365$ 和 -2.863 , $P=0.006$ 和 0.046),联合后抑制率增大。见表 2。

2.2.3 水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合 72 h 后对 HSC 细胞的生长抑制作用 水飞蓟宾胶囊浓度为 0.063、0.125、0.250、0.500 和 1.000 mg/ml 时对 HSC 细胞的抑制率分别为 63.2%、95.0%、98.6%、96.7%和 89.3%。0.063 mg/ml 水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合后,其中与 3.750 和 1.875 mg/ml 浓度肝龙胶囊联合后的抑制率与单用水飞蓟宾胶囊相比均增大,差异有统计学意义($t=-2.907$ 和 -2.774 , $P=0.044$ 和 0.050)。见表 3。

2.3 HSC 细胞 IC50 值的影响

2.3.1 水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合 24 h 后对 HSC 细胞 IC50 值的影响 0.063、0.125、0.250、0.500 和 1.000 mg/ml 水飞蓟宾胶囊与 3.750、1.875、0.938、0.469 和 0.235 mg/ml 肝龙胶囊合用 24 h 均可使 IC₅₀ 值降低,与单用水飞蓟宾胶囊的 IC₅₀ 值 0.585 mg/ml 比较,分别降低到 0.440、0.429、0.478、0.582 和 0.581 mg/ml。其下降幅度分别为 24.79%、26.67%、18.29%、0.50%和 0.68%。见表 4。

2.3.2 水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合 48 h 后对 HSC 细胞 IC50 值的影响 0.063、0.125、

表 1 水飞蓟宾胶囊单用及合用肝龙胶囊 24 h 对 HSC 增殖的影响 (%、 $\bar{x} \pm s$)

水飞蓟宾胶囊	抑制率						F 值	P 值
	肝龙胶囊 3.750 mg/ml	肝龙胶囊 1.875 mg/ml	肝龙胶囊 0.938 mg/ml	肝龙胶囊 0.469 mg/ml	肝龙胶囊 0.235 mg/ml	肝龙胶囊 0.000 mg/ml		
0.063 mg/ml	0.556 ± 0.048 [†]	-0.071 ± 0.161	-0.413 ± 0.018	-0.739 ± 0.058 [†]	-0.265 ± 0.120	-0.261 ± 0.001	71.208	0.000
0.125 mg/ml	0.337 ± 0.104 [†]	0.397 ± 0.029	0.464 ± 0.015	0.299 ± 0.024	0.359 ± 0.037	0.273 ± 0.013	5.479	0.007
0.250 mg/ml	0.521 ± 0.045	0.699 ± 0.028 [†]	0.722 ± 0.050 [†]	0.682 ± 0.057 [†]	0.713 ± 0.142 [†]	0.448 ± 0.021	8.688	0.001
0.500 mg/ml	0.532 ± 0.002	0.611 ± 0.086	0.730 ± 0.005	0.581 ± 0.074	0.694 ± 0.001	0.473 ± 0.086	6.090	0.005
1.000 mg/ml	0.835 ± 0.074	0.874 ± 0.018	0.793 ± 0.148	0.803 ± 0.120	0.874 ± 0.018	0.807 ± 0.033	0.539	0.743

注:† 与单独用药比较, $P < 0.05$

表 2 水飞蓟宾胶囊单用及合用肝龙胶囊 48 h 对 HSC 增殖的影响 (%、 $\bar{x} \pm s$)

水飞蓟宾胶囊	抑制率						F 值	P 值
	肝龙胶囊 3.750 mg/ml	肝龙胶囊 1.875 mg/ml	肝龙胶囊 0.938 mg/ml	肝龙胶囊 0.469 mg/ml	肝龙胶囊 0.235 mg/ml	肝龙胶囊 0.000 mg/ml		
0.063 mg/ml	0.875 ± 0.088 [†]	0.811 ± 0.084 [†]	0.789 ± 0.079 [†]	0.694 ± 0.081 [†]	0.754 ± 0.066 [†]	0.364 ± 0.146	11.181	0.000
0.125 mg/ml	0.913 ± 0.000 [†]	0.903 ± 0.015 [†]	0.862 ± 0.013 [†]	0.824 ± 0.037 [†]	0.811 ± 0.016 [†]	0.523 ± 0.153	3.572	0.033
0.250 mg/ml	0.970 ± 0.059 [†]	0.956 ± 0.059	0.919 ± 0.043	0.905 ± 0.025	0.857 ± 0.009	0.887 ± 0.007	3.359	0.040
0.500 mg/ml	0.967 ± 0.079	0.984 ± 0.025	0.984 ± 0.025	0.931 ± 0.108	0.764 ± 0.134	0.873 ± 0.013	3.575	0.033
1.000 mg/ml	0.976 ± 0.105 [†]	0.966 ± 0.125 [†]	0.980 ± 0.014 [†]	0.846 ± 0.103	0.889 ± 0.002	0.771 ± 0.066	3.106	0.050

注:† 与单独用药比较, $P < 0.05$

0.250、0.500和 1.000 mg/ml 水飞蓟宾胶囊与 1.875、0.938、0.469 和 0.235 mg/ml 肝龙胶囊合用 48 h 后可使 IC₅₀ 值降低, 其中与单用水飞蓟宾胶囊的 IC₅₀ 值 0.808 mg/ml 比较, 分别降低到 0.752、0.709、0.015 和 0.496 mg/ml。其下降幅度分别为 6.93%、12.25%、98.14% 和 38.61%。见表 4。

2.3.3 水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合 72 h 后对 HSC 细胞 IC₅₀ 值的影响 0.063、0.125、0.250、0.500 和 1.000 mg/ml 水飞蓟宾胶囊与 3.750、

1.875、0.938 和 0.469 mg/ml 肝龙胶囊合用 72 h 后可使 IC₅₀ 值降低, 其中与单用水飞蓟宾胶囊的 IC₅₀ 值 1.017 mg/ml 比较, 分别降低到 0.988、0.971、0.810 和 0.387 mg/ml。其下降幅度分别为 2.85%、4.52%、20.35% 和 61.90%。见表 4。

2.4 水飞蓟宾胶囊联合不同肝龙胶囊浓度时的联合指数

水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合后, 其联合指数 CI < 1.0, 呈现出协同作用, 见表 5。

表 3 水飞蓟宾胶囊单用及合用肝龙胶囊 72 h 对 HSC 增殖的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

水飞蓟宾胶囊	抑制率						F 值	P 值
	肝龙胶囊 3.750 mg/ml	肝龙胶囊 1.875 mg/ml	肝龙胶囊 0.938 mg/ml	肝龙胶囊 0.469 mg/ml	肝龙胶囊 0.235 mg/ml	肝龙胶囊 0.000 mg/ml		
0.063 mg/ml	0.987 ± 0.088 [†]	0.922 ± 0.084 [†]	0.790 ± 0.078 [†]	0.648 ± 0.016	0.508 ± 0.016	0.632 ± 0.151	10.286	0.000
0.125 mg/ml	0.931 ± 0.050	0.931 ± 0.015	0.967 ± 0.013	0.976 ± 0.037	0.991 ± 0.083	0.950 ± 0.109	0.640	0.670
0.250 mg/ml	0.967 ± 0.013	0.961 ± 0.020	0.936 ± 0.043	1.009 ± 0.052	1.006 ± 0.116	0.986 ± 0.025	0.823	0.556
0.500 mg/ml	0.979 ± 0.007	0.997 ± 0.001	0.976 ± 0.059	0.989 ± 0.108	0.936 ± 0.102	0.967 ± 0.051	0.291	0.909
1.000 mg/ml	0.977 ± 0.090	0.959 ± 0.030	0.758 ± 0.100	0.763 ± 0.150	0.831 ± 0.111	0.893 ± 0.102	2.531	0.087

注: [†] 与单独用药比较, P < 0.05

表 4 单用水飞蓟宾胶囊及合用肝龙胶囊 HSC 的 IC₅₀ 值变化

时间 /h	IC ₅₀ 值					
	肝龙胶囊 3.750 mg/ml	肝龙胶囊 1.875 mg/ml	肝龙胶囊 0.938 mg/ml	肝龙胶囊 0.469 mg/ml	肝龙胶囊 0.235 mg/ml	肝龙胶囊 0.000 mg/ml
24	0.440	0.429	0.478	0.582	0.581	0.585
48	0.808	0.752	0.709	0.015	0.496	0.808
72	0.988	0.971	0.810	0.387	1.147	1.017

表 5 水飞蓟宾胶囊联合不同肝龙胶囊浓度时的联合指数 (CI)

水飞蓟宾胶囊	联合指数				
	肝龙胶囊 3.750 mg/ml	肝龙胶囊 1.875 mg/ml	肝龙胶囊 0.938 mg/ml	肝龙胶囊 0.469 mg/ml	肝龙胶囊 0.235 mg/ml
0.063 mg/ml	0.695	0.790	0.764	0.849	0.839
0.125 mg/ml	0.671	0.761	0.758	0.671	0.828
0.250 mg/ml	0.970	0.588	0.876	0.796	0.790
0.500 mg/ml	0.969	0.862	0.706	0.733	0.836
1.000 mg/ml	0.577	0.565	0.527	0.577	0.614

注: CI < 1 协同作用; CI = 1 相加作用; CI > 1 拮抗作用

3 讨论

肝纤维化是指由各种致病因子所致肝内结缔组织异常增生, 导致肝内弥漫性细胞外基质过度沉淀的病理过程。其肝纤维化的药物治疗没有实质性的进展, 虽然目前有许多药物被应用于肝纤维化的治疗, 但临床上的应用效果却不乐观或者具有较大的毒副作用。其中, 水飞蓟宾胶囊作为治疗肝慢性疾

病的传统药物, 在临床上被广泛应用。据估计, 约 33% 的丙型肝炎患者和肝硬化患者正在使用或曾经使用过水飞蓟宾胶囊相关产品^[1]; 在德国, 水飞蓟宾胶囊相关药物的年治疗费用就达到 1.8 亿美元^[2]; 在我国, 水飞蓟宾胶囊的临床应用也在逐年增加。因此本研究以联合用药的角度出发, 旨在探索肝龙胶囊与水飞蓟宾胶囊联合对 HSC 增殖的影响, 从而为临

床抗肝纤维化应用肝龙胶囊与水飞蓟宾胶囊提供新的思路。

本实验研究结果表明,不同浓度水飞蓟宾胶囊对大鼠 HSC 细胞有不同程度的抑制作用。水飞蓟宾胶囊联合肝龙胶囊对 HSC 细胞的抑制作用与单用水飞蓟宾胶囊组比较,作用更强,尤其 48 h 时 0.063、0.125 及 0.250 mg/ml 水飞蓟宾胶囊与其不同浓度肝龙胶囊联合后,与单用水飞蓟宾胶囊组比较差异具有统计学意义。水飞蓟宾胶囊联合不同浓度肝龙胶囊的 IC50 值与单用水飞蓟宾胶囊的 IC50 值相比较,在 24、48、72 h 时均有下降,因此,水飞蓟宾胶囊与肝龙胶囊合用可在一定程度上降低水飞蓟宾胶囊的毒性,而且水飞蓟宾胶囊与不同浓度肝龙胶囊联合后,其联合指数 $CI < 1.0$,呈现出协同作用,增强了水飞蓟宾胶囊对 HSC 细胞的抑制作用。本实验发现同一个浓度没有时间依赖性,用高浓度水飞蓟宾胶囊处理 HSC 后,其会产生黑色物质,从而影响其吸光度值,但与肝龙胶囊联合后这种黑色物质会消失。因此,可以用较低剂量的水飞蓟宾胶囊与肝龙胶囊联合达到和高剂量水飞蓟宾胶囊相同或更好的疗效。该结果将为肝纤维化药物的研发提供一定的理论依据。综上所述,水飞蓟宾胶囊与肝龙胶囊合用在体外抗肝纤维化具有协同作用,此作用是通过抑制 HSC 细胞达到的,其作用机制尚需进一步研究。但目前观察结果仅为体外实验,体内实验是否有相同结果尚需更多研究加以证实,下一步将继续进行体内实验的研究,为临床提供更多的依据。

参 考 文 献:

- [1] ATZORI L, POLI G, PERRA A. Hepatic stellate cell: a star cell in the liver[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(8/9): 1639-1642.
- [2] NOVO E, DI BONZO L V, CANNITO S, et al. Hepatic myofibroblasts: a heterogeneous population of multifunctional cells in liver fibrogenesis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41(11): 2089-2093.
- [3] LOGUERCIO C, FESTI D. Silybin and the liver: from basic research to clinical practice[J]. *World J Gastroenterol*, 2011, 17(18): 2288-2301.
- [4] JAVED S, KOHLI K, ALI M. Reassessing bioavailability of silymarin[J]. *Altern Med Rev*, 2011, 16(3): 239-249.
- [5] 黄静, 龙子江, 李丽. 水飞蓟宾胶囊对酒精性肝纤维化大鼠的保护作用[J]. *中成药*, 2016, 38(2): 229-233.
- [6] 梁镇然, 蔡锐燕, 蒋林, 等. 高速逆流色谱与硅胶柱层析联用分离岩黄连中的 2 种原小檗碱型季胺生物碱[J]. *分析实验室*, 2012, 32(1): 98-101.
- [7] 罗万玲. 美洲大蠊和岩陀的化学成分研究 [D]. 昆明: 昆明理工大学, 2007.
- [8] 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.
- [9] 杜一民, 陈鸿珊, 李树楠, 等. 治疗乙型肝炎新药肝龙胶囊的药效学初步研究[J]. *时珍国医国药*, 2006, 17(8): 1369.
- [10] 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.
- [11] 宋文新, 王宏伟, 申保生, 等. 复方甘草酸苷对慢性乙型肝炎患者肝纤维化指标及细胞因子的影响[J]. *中国药房*, 2006, 17(2): 128-129.
- [12] FREEDMAN N D, CURTO T M, MORISHIMA C, et al. Silymarin use and liver disease progression in the hepatitis c antiviral long-term treatment against cirrhosis trial [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 33(1): 127-137.

(张蕾 编辑)