

实验研究

脂肝泰胶囊对高脂血症性脂肪肝大鼠肝细胞凋亡及相关基因蛋白表达的影响

张一昕* 杨牧祥*

摘要 目的:探讨脂肝泰胶囊治疗高脂血症性脂肪肝的作用机制。方法:采用高脂饮食喂饲大鼠复制脂肪肝模型,以东宝肝泰为对照药,观察各组大鼠肝脏病理形态学变化,并运用流式细胞仪观察各组大鼠肝细胞凋亡及相关基因蛋白 bcl-2 和 bax 表达的变化。结果:HE 染色镜下可见模型组大鼠肝脏中度以上脂肪变性,并有少量的肝细胞坏死;流式细胞术分析可见其细胞凋亡率为 13.3%,bcl-2 表达量降低,bax 表达量增高。与模型组比较,各用药组肝脂变程度显著改善,肝细胞的凋亡率明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),bcl-2 基因表达量增高($P<0.05$),bax 基因表达量降低($P<0.05$)。结论:脂肝泰胶囊能使 bcl-2 蛋白表达上调、bax 蛋白表达下降,抑制细胞凋亡趋势,以达到抗脂肪肝作用。

主题词 脂肪肝/中医药疗法 基因表达/药物作用 @ 脂肝泰胶囊

脂肝泰胶囊为笔者在临床上治疗高脂血症性脂肪肝的效方,既往药效学实验已证实脂肝泰胶囊具有显著的调节血脂和抗脂肪肝作用^[1,2],但其治疗作用机制尚不十分清楚。研究表明,细胞凋亡与肝胆疾病的发生、发展有着密切的关系^[3]。但是少见到有关中药对脂肪肝肝细胞凋亡影响的实验研究报道。本研究旨在通过观察脂肝泰胶囊对高脂血症性脂肪肝大鼠肝细胞凋亡及相关基因 bcl-2 和 bax 蛋白表达的影响,探讨其作用机制,为临床治疗高脂血症性脂肪肝提供有效的方药。

1 材料

1.1 动物:健康雄性 SD 大鼠 60 只,体重 180~200g,由河北省实验动物中心提供。饲养于 18~22℃ 明暗各 12 小时的清洁级动物实验室内。

1.2 药物及试剂:脂肝泰胶囊由河北中医肝病医院制剂室制备,课题组监制,组成:丹参 15g,泽泻 15g,茵陈蒿 10g,郁金 10g,枳实 10g,生大黄 10g,生山楂 15g,生黄芪 15g,炒白术 10g,制何首乌 15g,实验时采用 0.5% 的羧甲基纤维素钠将其配制成所需浓度的混悬液。东宝肝泰片由通化东宝药业股份有限公司出品,批

号为 430110。实验时用 0.5% 的羧甲基纤维素钠配制成所需浓度的混悬液。碘化丙啶、RNA 酶、鼠抗人 bcl-2 蛋白单克隆抗体、鼠抗人 bax 蛋白单克隆抗体、羊抗鼠 FITC-IgG 等均由美国 Sigma 公司提供。

1.3 主要仪器:FACScan-420 型流式细胞仪为美国 Beckton Dickinson 公司产品。

2 方法

2.1 动物造模及分组:实验大鼠正常喂养 1 周后,随机分为 5 组,每组 12 只,分别为正常对照组(简称正常组)、模型对照组(简称模型组)、脂肝泰低剂量组(简称脂低组)、脂肝泰高剂量组(简称脂高组)、东宝肝泰对照组(简称对照组)。正常组喂饲普通饲料,蒸馏水灌胃;其余各组均喂饲高脂饮料^[4],同时,模型组大鼠用 0.5% 的羧甲基纤维素钠混悬液灌胃;脂肝泰低剂量组每天按 1.8g/kg 剂量灌胃;脂肝泰高剂量组每天按 3.6g/kg 剂量灌胃;东宝肝泰组每天按 0.9g/kg 剂量灌胃。每天 1 次,每次用药体积均按 1ml/100g 计算。

2.2 标本制作检测方法:自实验正式开始后 10 周末,于最后 1 次给药禁食 12h 后麻醉状态下,按要求分别取样、检测。

病理组织学样本制备:在肝脏最大叶距边缘 1cm 处取材,浸泡于甲醛中固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察肝组织形态变化。

细胞悬液的制备:另取部分肝组织,剪碎至 1mm×1mm×1mm 大小,然后置于 100 目铜网上轻搓,边搓边以生理盐水冲洗,直至将组织搓完。收集细胞悬液,离心 2 分钟,弃去上清,去除细胞碎片,70%乙醇固定,置于 0~4℃ 冰箱待检。

细胞悬液 DNA 的染色:将细胞悬液的固定剂用 PBS 洗涤 1 次,用碘化丙啶一步插入性 DNA 荧光染色,染液含碘化丙啶 10μg/ml, RNA 酶 20μg/ml,于 Trion-X-100 1.0%,加入染液 1.0ml。每份样品细胞数调整于 10⁶/ml。染色过程在 0~4℃ 冰箱中进行 30min,用 400 目滤网过滤后上机检测。测量的数据输入 Hp300-Consort 30 计算机,应用 Single histogram statistics 软件进行资料处理。采用 Barlogie 的细胞图解

基金项目:河北省科技厅攻关计划项目(02276135)

* 河北医科大学中医学院,石家庄市新石南路 326 号(050091)

收稿日期:2002-08-05;修回日期:2002-09-23

表1 各组大鼠肝细胞凋亡及不同时期增殖时相比率结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	凋亡率(%)	G ₀ /G ₁ (%)	S(%)	G ₂ /M(%)	增殖指数PI(%)
正常组	12	1.70±0.42**	72.83±7.48*	12.76±3.04*	14.41±3.38*	27.17±4.23*
模型组	12	13.30±1.14	77.59±3.24	10.55±1.42	11.86±2.73	22.41±2.21
脂低组	12	4.10±0.62**△	66.28±3.43**△	15.71±2.87**△	18.01±1.58**△	33.72±2.06**△
脂高组	12	3.98±0.65**△	65.14±6.47**△	15.17±2.46**△	19.60±2.82**△	34.77±3.87**△
对照组	12	6.72±0.76**	70.74±7.11*	13.47±1.43*	15.17±6.87*	28.64±3.78*

与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与对照组比较, △ $P < 0.05$, 下表同

表2 各组大鼠肝细胞凋亡相关基因蛋白 bcl-2 和 bax 标记率和荧光表达量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	bcl-2		bax	
		标记率(%)	表达量(道数)	标记率(%)	表达量(道数)
正常组	12	28.45±2.56**	4.38±0.35**	20.68±1.78**	5.23±0.76**
模型组	12	18.18±2.11	2.86±0.18	27.20±2.32	7.91±0.62
脂低组	12	27.22±2.78**△	6.91±0.61**△	20.15±2.17**△	4.34±0.56**△
脂高组	12	26.32±3.01**△	6.35±0.66**△	20.23±2.36**△	4.72±0.73**△
对照组	12	22.12±2.23**	5.38±0.73**	22.12±1.94*	5.67±0.57*

法分析,将处于不同时期的细胞分为3部分,即:G₀/G₁期、S期、G₂/M期,根据DNA含量直方图,由计算机计算出各时相的分布比率,并计算细胞增殖指数(PI)。

bcl-2、bax 基因蛋白免疫荧光样品的制备:将1×10⁶个细胞以PBS洗涤2次,每次2分钟,离心2分钟,弃上清液,加入1:100的鼠抗人bcl-2蛋白单克隆抗体100μl,30℃温育30分钟,用PBS离心洗涤2次,弃上清液,加入1:100的羊抗鼠FITC-IgG100μl,37℃温育30分钟,离心洗涤2次取上清液,除去未结合的多余荧光抗体,上机前加入1.0ml PBS液,经400目滤网过滤即可上机检测。bax 基因蛋白免疫荧光样品制备步骤及剂量同上,一抗为1:100稀释的鼠抗人bax蛋白单克隆抗体,二抗为1:100稀释的羊抗鼠FITC-IgG。

2.3 统计学处理:数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$),采用单因素方差分析和 q 检验。

3 结果

3.1 肝脏病理组织学改变观察:正常组大鼠肝组织结构完整、清晰,肝小叶结构正常,肝细胞排列规则成肝索状,在中央静脉周围呈放射状分布。肝血窦结构清晰,无异常改变。肝细胞呈多边形,胞浆均匀,偏嗜酸性,细胞核形态正常。模型组大鼠肝小叶结构界限不清,肝索排列紊乱,大部分肝窦消失,多数肝细胞出现严重的脂肪变性,以小叶周边部最为严重,肝细胞极度肿胀呈圆形,胞浆内可见大小不等、数量不一的脂滴空泡(脂肪变性),严重者脂滴互相融合,将细胞核挤向细胞一侧,酷似脂肪细胞。其余肝细胞还可见灶性坏死。肝间质无纤维化改变。脂高、脂低组大鼠肝小叶和肝血

窦结构清晰,细胞排列整齐,细胞内脂滴空泡基本消失,细胞核形态、结构正常,可见到再生的肝细胞。东宝肝泰组大鼠肝小叶结构清晰,肝血窦轻度扩张,肝细胞脂肪变性减轻,但仍可见到少量脂滴空泡,细胞核结构较清晰。与模型组相比,各用药组大鼠肝脂变程度均有显著的改善,但脂高组、脂低组优于阳性对照药东宝肝泰组。

3.2 流式细胞术(FCM)分析:与正常组比较,模型组大鼠肝细胞凋亡率明显增高($P < 0.01$),bcl-2 基因蛋白的标记率及荧光表达量明显降低,而 bax 基因蛋白的标记率及荧光表达量明显降低,而 bax 基因蛋白的标记率和荧光表达量则明显增加($P < 0.05$)。治疗后,各用药组肝细胞凋亡率明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),bcl-2 基因蛋白的标记率及荧光表达量明显增加,而 bax 基因蛋白的标记率和荧光表达量则明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明随凋亡率增加,bax 基因表达量也增加,而 bcl-2 基因表达量则随凋亡率增加而减少。各治疗组中脂肝泰高、低剂量组各项指标的变化比对照组明显,而脂肝泰高剂量组的各项指标变化虽比低剂量组明显,但经统计学处理,两组之间差异无显著性($P > 0.05$)。见表1、表2。

4 讨论

现代医学研究证实,细胞凋亡是指细胞在分化和发育过程中,由基因调控而发生的主动的自发的死亡方式。目前细胞凋亡的检测手段包括光镜观察法、电镜观察法、琼脂糖电泳法、末端转移酶标记技术、FCM等。FCM在完整细胞的基础上,通过定量测定细胞DNA的荧光改变及调控基因蛋白表达量的变化而提供凋亡的综合信息^[5]。

脂肪肝在中医学中没有独立的病名,根据病因、病机及临床表现和体征,高脂血症性脂肪肝可归属于中医的“痰证”、“瘀血”等范畴。我们认为,本病多因嗜食肥甘厚味,情志不舒,致脾失健运,湿聚痰生,气机郁滞,血脉瘀阻,痰瘀互结于肝而形成,痰、湿、瘀是本病的主要病理因素。故以疏肝健脾,消痰化痰,利湿化浊为治疗大法,研制成脂肝泰胶囊。方以柴胡、郁金、茵陈蒿、泽泻疏肝利胆,清利湿浊,促使脂肪降解,阻脂质生成;黄芪、白术补气健脾,以助痰瘀的运除,而且也体现了“见肝之病,当先实脾”的治疗法则;丹参活血通络,祛肝经之瘀,增强肝脏血运,消除积聚脂肪;生大黄通腑导滞,降浊祛脂,与泽泻配用,分流通导,使邪有去路;生山楂祛瘀消积,消化脂肪,枳实行气消痞,理脾导滞,且与升散之柴胡相配,一升一降,调畅气机,以利于气血运行;制首乌补肝肾,益精血,使之利湿而不伤阴,活血而不耗血;诸药合用,痰瘀得除,肝脾功能得复,从而达到断本清原消脂的目的。

本实验采用先进、可靠的、精确的定量细胞学技术——流式细胞光度术,分析了脂肝泰胶囊对高脂饮食所致高脂血症性脂肪肝大鼠肝损伤的影响。结果显示,模型组大鼠肝细胞凋亡率较正常组明显增加,可能是由于高脂饮食、肥胖等因素导致游离脂肪酸(FFA)的摄入、产生增多和利用减少,FFA 加强脂质过氧化反应损伤肝细胞,并可改变细胞增殖信号促进细胞凋亡^[6],通过主动死亡来阻止病变的进一步发展。肝脏病理形态学、肝细胞增殖周期中各时相比率及增殖指数表明,模型组大鼠肝细胞出现中度以上的脂肪变性、少量肝细胞坏死,肝细胞的 DNA 合成减慢,静止期细胞居多,增殖期细胞减少,肝组织的再生和修复能力减弱。而治疗后细胞凋亡率下降,肝组织中静止期细胞减少,而增殖期细胞增多,非增殖型细胞向增殖型转化,说明脂肝泰胶囊可使细胞 DNA 合成加快,增殖活跃,分裂能力增强,以恢复细胞的数量和功能。组织学变化也表明,治疗组肝细胞内脂滴空泡基本消失,未见细胞变性坏死现象,而且可见再生的肝细胞,进一步证实用

药后肝组织抗损伤及修复能力增强,从形态学的角度支持了流式细胞检测结果。

bcl-2 基因家族对细胞凋亡具有广泛的调控作用,其中 bcl-2 和 bax 分别是最主要的抑制凋亡和促凋亡基因。曾有报道 bcl-2 过表达可抑制多种因素诱导的多种细胞凋亡;bax 过表达不仅可使许多细胞自发凋亡,而且可促进不同因素诱导的多种细胞凋亡^[6]。本实验结果与报道一致,在凋亡率最高的模型组,bcl-2 基因表达量最低,bax 基因表达量最高;正常对照组 bcl-2 基因表达量最高,bax 基因表达量最低;说明 bcl-2 蛋白表达下降和 bax 蛋白表达上调,使细胞凋亡趋势增强,在高脂血症性脂肪肝的发生中可能有一定意义。经药物治疗后,与模型组相比,各治疗组 bcl-2 基因表达量增加,bax 基因表达量降低,细胞凋亡趋势减弱,尤以脂肝泰高、低剂量组较为明显,说明脂肝泰胶囊可通过抑制肝细胞凋亡,加速肝细胞的 DNA 合成及分裂增殖,以达到减轻高脂血症性脂肪肝大鼠的肝脏脂肪变性、恢复肝脏功能的作用,其效果优于阳性对照药组。而脂肝泰胶囊高、低剂量组间的各项指标变化,经统计学处理则差异无显著性($P>0.05$),不呈量效关系,提示脂肝泰胶囊的治疗效果并不是一味地随用药剂量的增加而提高,推测其原因可能是药物浓度增加后,渗透压也随之升高,影响了药物的吸收,但确切的机理仍有待进一步深入研究和探讨。

参考文献

- 1 杨牧祥,张一昕,王鑫国,等.脂肝泰胶囊药效学研究.河北中医学报,2002,17(3):1-4.
- 2 杨牧祥,张一昕,朱芳,等.脂肝泰胶囊对高脂血症性脂肪肝大鼠肝脏病理改变的影响.疑难病杂志,2002,1(3):131-133.
- 3 郭延军,李静.肝细胞凋亡的研究进展.临床肝胆病杂志,1998,14(3):138-140.
- 4 戴宁,曾民德,李继强,等.非酒精性脂肪肝肝细胞色素 P450 CYP2E1 的表达与氧化抗氧化的关系.中华肝脏病杂志,1999,7(2):7-9.
- 5 姜泊主编.分子生物学常用实验方法.北京:人民军医出版社,1996:26-28.
- 6 杨连君,王文亮,司晓辉.肝细胞癌细胞凋亡相关基因蛋白 bcl-2 和 bax 的表达及意义.中华肝脏病杂志,2001,9(7):36-38.

《中华中医院博览》大型画册征稿

《中医杂志》即将迎来创刊 50 周年,为了回报中医药界多年来对《中医杂志》的大力支持,中医杂志社与北京华夏书苑联合策划、编辑《中华中医院博览》大型画册,面向全国选择具有一定知名度的中医医院,作彩色专版介绍。

宗旨:展示各级中医院的医、教研成果及医疗水平;为国内外中医药机构之间的信息交流与技术沟通提供平台,架设桥梁;为海内外患者提供有效、快捷的求医信息。画册用进口铜版纸全彩色印刷,图文并茂,大 16 开本。每个单位限 4 页,图片配合文字。主要介绍单位领导、医疗骨干、重点学科、专科门诊、特色医疗等内容,并附医院详细介绍。

联系地址:北京市 9345 信箱,邮编:100093,电话:(010)64465966,传真:(010)64465986,联系人:沈小姐、贾小姐。广告招商电话:(010)64465989,13601326684,王先生,E-mail:ZYYBL@163.net