

保肝宁对急性肝细胞损伤过程中核转录因子- κ B 的影响

赵进军¹ 吕志平¹ 张绪富¹ 刘建强²

摘要 目的:研究中药复方保肝宁对急性肝细胞损伤过程中核转录因子(NF- κ B)的影响,以探讨其抗急性肝损伤作用机理。方法:采用原位灌注酶消化法分离大鼠肝细胞,用药物血清培养 1 天后,更换培养液,并加入过氧化氢(H_2O_2)培养 30min,对大鼠肝细胞进行急性损伤。收集肝细胞,提取细胞核蛋白。用凝胶电泳迁移率改变分析法(EMSA)检测各组中 NF- κ B 蛋白量。结果: H_2O_2 损伤能导致肝细胞核中 NF- κ B 蛋白量的增加,保肝宁各剂量组作用于肝细胞后,能降低 NF- κ B 蛋白量。结论:保肝宁可能通过降低肝细胞核内 NF- κ B 蛋白的产生,而对肝细胞损伤起保护作用。

主题词 肝炎,中毒性/中医药疗法 转录因子/药物作用 @ 保肝宁

保肝宁是第一军医大学中医系治疗病毒性肝炎的临床经验用方。经动物实验证实它具有较好的抗肝纤维化和抗肝炎作用^[1]。本文采用过氧化氢(H_2O_2)导致的大鼠肝细胞急性损伤模型,观察中药保肝宁对核转录因子 κ B(NF- κ B)的影响,以进一步探讨其抗急性肝细胞损伤的机制。

1 材料

1.1 动物:雄性 Wistar 大鼠,制备药物血清所用大鼠体重为 210 ± 10 g,8~10 周龄,而取原代肝细胞所用大鼠体重为 120g,1 月龄,均由第一军医大学实验动物中心提供。

1.2 药物与试剂:Klenow 片断(Promega 公司),NF- κ B 寡核苷酸(由上海生工生物工程公司合成),5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3';3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5', $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (北京亚辉生物医学工程公司),丙烯酰胺,TEMED,DTT,PMSF,HEPES,过硫酸铵,EDTA,Tris 等(国产分析纯试剂)。保肝宁复方中所含中药:黄芪、黄芩、白背叶根、鳖甲、丹参和桃仁,均购于第一军医大学南方医院中药房。

1.3 主要仪器:Bio-Rad 垂直电泳仪,Bio-Rad MODEL 583 GEL DRYER 干胶仪,Curix HT-330U (AGFA 产品)胶片自动冲洗仪。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271627),广东省自然科学基金资助项目(020037)

1 第一军医大学中医系,广东省广州市同和(510515)

2 河南省洛阳市 63880 部队医院

收稿日期:2003-03-04;修回日期:2003-06-02

2 方法

2.1 保肝宁药物组成及制备:保肝宁由丹参 15g、桃仁 15g、白背叶根 30g、黄芪 30g、鳖甲 20g、黄芩 12g 组成。丹参、桃仁和白背叶根采用醇提取法,即加 8 倍量的 70%乙醇,第 1 次提取 2h,后两次提取 1.5h,共 3 次,所得为醇提取液,经减压回收乙醇,得到浓缩液;黄芪、鳖甲和黄芩采用水提取法,即常规水煮 3 次,所得水煎液经蒸发浓缩,得到浓缩液。以上两种浓缩液合并成总提取液,继续浓缩成高、中、低 3 种剂量,分别含生药 3.6g/ml、1.8g/ml 和 0.9g/ml,相当于临床用药按体表面积等效剂量的 4、2、1 倍。

2.2 药物血清的制备^[2]:选择雄性 Wistar 大鼠 12 只,体重为 210 ± 10 g,随机平均分为 3 组,即中药高、中、低剂量组。每日灌药 1 次,每次 10ml/kg,连续 7 日。最后一次灌药 1h 后,3%戊巴比妥钠腹腔麻醉,腹主动脉采血,3 000r/min 离心 20min 分离血清,56℃,30min 水浴灭活,0.45 μ m 微孔滤膜过滤,-70℃低温保存备用。

2.3 肝细胞分离与药物处理:采用 Seglen 的改良原位二步胶原酶灌注法^[3],获得原代肝细胞悬液,调节细胞数为 5×10^5 /ml。将细胞悬液加入 24 孔板中,每孔 1ml。实验分 5 组:正常组、模型组、中药低、中、高剂量组,每组设 3 个复孔。置入 CO_2 细胞培养箱中培养 36h 后,更换为含 10%药物血清的 DMEM 培养 24h,换液后加入终浓度为 2mmol/L 的 H_2O_2 ,正常组加等量的生理盐水。继续孵育 30 分钟后,2 000r/min 收集细胞,用冰冷的 TBS 冲洗细胞 3 次。

2.4 凝胶电泳迁移率改变分析法(electrophoretic mobility shift assay,EMSA)实验方法^[4,5]

探针的标记和纯化:用 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 标记探针,标记后用 Sphodex G-25 DNA 柱过滤纯化。取 1 μ l 样品加入含 1ml 闪烁液的闪烁瓶中,测定放射性。其余的样品-20℃保存。

核蛋白提取:向收集的细胞中加入 400 μ l 的溶液 A [0.6%NP-40, 150 mmol/L NaCl, 10 mmol/L HEPES (pH7.9), 1mmol/L EDTA, 0.5mmol/L PMSF]置冰上 15 min,加入 25 μ l 10%NP-40,置匀浆器上匀浆 30s,重置冰上 3min。用低温离心机 12 000r/min 离心 20min,弃上清,用 100 μ l 溶液 B [25%

Glycerol, 420mmol/L NaCl, 20 mmol/L HEPES (pH 7.9), 12 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L DTT, 0.5 mmol/L PMSF, 5mg/L Pepstain, 5mg/L Leupetin, 5mg/L Aprotinin]悬浮沉淀, 4℃搅拌45min, 再用低温离心机 12 000r/min 离心 5min, 收集上清即为核提取物, 测定蛋白含量, $-70^{\circ}C$ 保存。

蛋白浓度标准曲线的绘制及样品蛋白浓度检测: 用标准品蛋白绘制出标准曲线。取 10 μ l 核提取液检测蛋白浓度, 每个样品取 5 μ g 用于凝胶电泳。

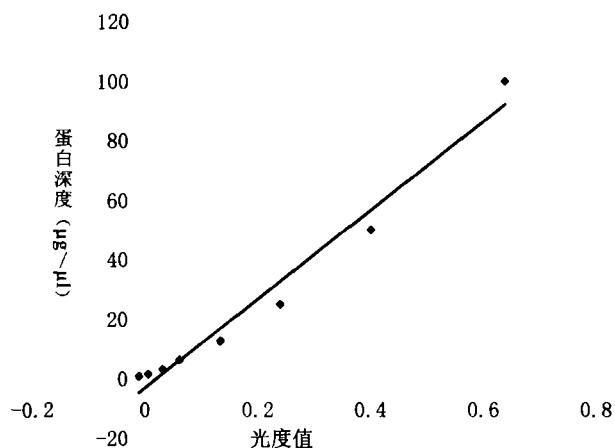
聚丙烯酰胺凝胶电泳: 实验前制备凝胶, 并预跑 1h。每个样品取 5 μ g 蛋白, 加水补足 11.5 μ l, 再加 Mix 7.5 μ l (含 0.2mol/L Tris, 1 mol/L NaCl, 10mmol/L EDTA, 10mmol/L DTT, 20 mmol/L $MgCl_2$ 各 1 μ l; 50%甘油 1.5 μ l) 和热探针 1 μ l; 冷探针组再加入冷探针 1 μ l。向各反应管中加入 1.5 μ l 上样缓冲液, 混匀上样, 28mA 电泳 2h。

干胶和放射自显影: 在干胶仪上 $80^{\circ}C$ 干胶 40min, 置入暗盒后在 $-70^{\circ}C$ 冰箱放射自显影 1d, 冲洗胶片。

3 结果

3.1 细胞活率: 采用这种酶原位灌注法, 120g 大鼠所得到的总肝细胞数目约为 1×10^8 个, 肝细胞纯度约为 95%。所得细胞经台盼蓝染色后计数, 活细胞数 > 95%。肝细胞在经 H_2O_2 处理后, 用相差显微镜观察可见到部分细胞脱落, 细胞脱落比率在 H_2O_2 损伤组中最高, 约为 15%, 保肝宁各组内细胞脱落率约为 5%~10%, 正常组内未见细胞脱落现象。

3.2 蛋白浓度标准曲线: 用于首次检测的标准蛋白浓度为 100 μ g/ μ l, 经 7 次倍比稀释后, 最后的蛋白浓度为 0.78 μ g/ μ l, 在分光光度计上共检测出 8 个光度值, 绘制出线性蛋白浓度标准曲线, 并求出其方程为: $y = 149.4x - 2.9797$, $R^2 = 0.9723$ 。见附图。



附图 蛋白浓度标准曲线

3.3 保肝宁对 NF- κ B 的影响: 聚丙烯酰胺凝胶电泳

图上仅出现一条明显的蛋白条带, 根据条带的宽度和灰度以判断各组内 NF- κ B 的量。在冷探针组中几乎见不到带形, 这说明使用的探针具有较好的特异性。正常组的蛋白条带细, 灰度较低; H_2O_2 损伤组内的蛋白条带宽, 灰度高; 保肝宁低剂量组蛋白条带宽度和灰度与损伤组差别不明显, 但中、高剂量组内的蛋白宽度较低剂量组明显变窄, 灰度减小, 且出现剂量依赖关系; 但高剂量组内蛋白条带的宽度和灰度仍高于正常组。

4 讨论

核转录因子(NF)是一族正常情况下存在于细胞浆内的复合蛋白, 是细胞信号传递中一个重要组成部分。NF- κ B 是普遍存在于细胞浆中的一种快反应转录因子, 由 Rel 蛋白家族的两个成员组成, 最常见形式是由 p55 和 p65 两种蛋白组成, 在胞浆内它与一抑制性蛋白 I- κ B 结合而为非活性状态^[6]。它可以被许多刺激剂激活, 例如细胞因子、蛋白激酶 C 激活剂、氧化剂、病毒、免疫刺激剂以及脂多糖、紫外线等。被激活的 NF- κ B 与 I- κ B 解离, 转入核内与靶基因的 κ B 基序结合, 增强其表达。众多的研究表明, NF- κ B 参与炎症和免疫反应、某些疾病的病理产生、急性期反应、细胞周期控制与分化以及对病毒感染的反应等^[7]。

通过动物实验和体外实验已多次证实保肝宁可以较好地治疗慢性肝炎。为进一步研究其作用机理, 我们对肝细胞的核转录因子 NF- κ B 进行研究, 实验结果显示, 保肝宁可以降低 NF- κ B 蛋白的产生。这可能是保肝宁治疗慢性肝炎的一个机理。但有学者认为, NF- κ B 在抑制 TGF- β_1 介导的肝细胞凋亡过程中也可能起作用, 认为有促进肝细胞再生的功能^[8]。

参考文献

- 赵进军, 吕志平, 张绪富. 白背叶根在肝纤维化动物模型中抗氧化作用的实验研究. 中药材, 2002, 25(3): 187-188.
- 刘成海, 刘平, 刘成, 等. 抗肝纤维化中药复方血清药理学方法探讨. 中国实验方剂学杂志, 1998, 4(2): 16-19.
- Seglen PO. Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol. 1976, 13(1): 29-83.
- Vincent KJ, Jones E, Arthur MJ, et al. Regulation of E-box DNA binding during in vivo and in vitro activation of rat and human hepatic stellate cells. Gut, 2001, 49(5): 713-719.
- 梁国栋. 最新分子生物学实验技术. 北京: 科学出版社, 2001: 1-24.
- Hellerbrand C, Jobin C, Imuro Y, et al. Inhibition of NF kappa B in activated rat hepatic stellate cells by proteasome inhibitors and an I kappa B super-repressor. Hepatology, 1998, 27(5): 1285-1295.
- Tsoufas G, Geller DA. NF-kappa B in transplantation: friend or foe? Transpl Infect Dis. 2001, 3(4): 212-219.
- Tomer A. A sensitive and specific functional flow cytometric assay for the diagnosis of heparin-induced thrombocytopenia. Br J Haematol. 1997, 98(3): 648-656.