

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.08.015

小陷胸汤化裁方对非酒精性脂肪肝病大鼠肝脏组织 Caspase-12 蛋白表达的影响

李睿萍¹, 杨成志^{*}, 狄灵¹, 胡卫涛²

(1. 西安交通大学第二附属医院, 陕西省西安市西五路 157 号, 710004; 2. 陕西省中医医院)

摘要 目的 探讨小陷胸汤化裁方治疗非酒精性脂肪肝病的可能作用机制。方法 将 60 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、西药组和中药高、中、低剂量组, 每组 10 只。除空白组外, 其余大鼠采用高脂饮食 12 周建立非酒精性脂肪肝模型, 造模后中药高、中、低剂量组分别给予小陷胸汤化裁方 1.5、1.0、0.5 ml/(100 g·d) 灌胃, 西药组给予多烯磷脂酰胆碱胶囊溶液 3 ml/d 灌胃, 空白组及模型组分别给予等量生理盐水灌胃。给药 5 周后取肝脏组织进行 HE 染色, 并采用免疫组化法和 Western-Blot 法检测 Caspase-12 蛋白表达。结果 肝脏病理结果显示, 与空白组比较, 模型组大鼠肝细胞存在明显脂肪变性和炎症活动; 中药各剂量组肝细胞脂肪变性程度和炎症活动度较模型组明显减轻, 且其脂肪变性和炎症活动度也比西药组轻。中药各剂量组与西药组肝脏组织 Caspase-12 蛋白表达均明显低于模型组 ($P < 0.05$), 且中药高剂量组 Caspase-12 蛋白表达低于西药组及中药中、低剂量组 ($P < 0.05$)。结论 小陷胸汤化裁方能够明显延缓非酒精性脂肪肝病大鼠肝脏损害, 可能与下调肝脏组织 Caspase-12 蛋白表达有关。

关键词 非酒精性脂肪肝病; 小陷胸汤; 内质网应激; Caspase-12 蛋白

非酒精性脂肪肝病 (nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的、以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征, 包括单纯性脂肪肝以及由其演变的脂肪性肝炎和肝硬化。其发病机制至今尚未完全明确, 对于该病目前主流理论上认为氧化应激和脂质过氧化、炎症性细胞因子的释放、线粒体功能异常等因素形成二次打击, 诱导了肝脏炎症反应, 肝细胞变性坏死和肝纤维化、硬化的发生^[1]。目前在 NAFLD 研究中, 内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 逐渐被认为是主要致病机理之一^[2]。小陷胸汤化裁方治疗脂肪肝病, 可以减轻 NAFLD 临床症状, 降低转氨酶和血脂, 改善肝功能^[3]。本研究从内质网应激方面探讨小陷胸汤化裁方防治 NAFLD 的可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 68 只, 10 ~ 12 周龄, 体重 (200 ± 20) g, 购自西安交通大学医学院动物实

验中心, 实验动物合格证号: SCXK(陕) 2014-003。

1.2 药物

小陷胸汤化裁方由黄连、清半夏、瓜蒌、太白、枳实、片姜黄组成, 按 3 : 4 : 3 : 4 : 5 比例配伍, 冷水浸泡 30 min, 先用大火煎至沸腾后改至小火 (保持微沸状态), 共煎 1 h, 减压、过滤、浓缩至浓度为 1.55 g/ml, 置 4℃ 密封保存备用。多烯磷脂酰胆碱胶囊 [商品名: 易善复, 批号: H20059010, 赛诺菲 (北京) 制药有限公司], 228 mg 溶于 10 ml 生理盐水制成溶液备用。

1.3 主要试剂及仪器

β-肌动蛋白 (β-Actin, 美国 SANTA CRUZ 公司, 批号 sc-47778); Caspase-12 抗体 (美国 Gene Tex 公司, 批号 GTX132298); Caspase-12 蛋白提取试剂盒 (批号 P0033)、化学发光试剂盒 (批号 ST033)、PVDF 膜 (批号 FFP24)、HE 染色试剂盒 (批号: C0105), 均购于上海碧云天生物技术有限公司; 山羊抗小鼠 (1 : 5000) (美国 Gene Tex 公司, 批号 HRP-412-Fc)。Q550CW 型稳压稳流电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; AH-2 型显微镜, 日本 Olympus 株式会社; DYY-40 型稳压稳流电泳仪, 北

* 通讯作者: 419209216@qq.com, 13772147926

京市六一仪器厂; Q550CW 型凝胶成像分析仪, 美国 Bio-Rad 公司; DM6000M 型全自动图像分析系统, 德国 Leica 公司。

1.4 动物分组与模型制备

68 只大鼠预饲养 2 周后按随机数字表法选出 12 只作为空白组。剩余 56 只大鼠参照文献 [4] 采用高脂饮食的方法建立非酒精性脂肪肝大鼠模型。高脂饲料: 每公斤普通饲料 82.5 g、胆固醇 20 g、猪油 100 g、胆酸钠 5 g、蛋黄粉 50 g。空白组饲以基础饲料。12 周后从造模大鼠中按随机数字表法抽取 6 只, 空白组抽取 2 只, 腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.4 ml/100 g) 麻醉, 取大鼠肝脏病理切片, 进行光镜观察, 空白组大鼠肝脏小叶结构清晰, 肝细胞以中央静脉为中心向周围呈放射状分布, 造模大鼠肝脏均可见中度脂肪变性, 提示造模成功 [5]。将造模组剩余的 50 只大鼠按随机数字表法分为模型组、西药组和中药高、中、低剂量组, 每组 10 只。中药高、中、低剂量组分别给予小陷胸汤化裁方 1.5、1.0、0.5 ml/ (100 g · d) 灌胃, 西药组给予多烯磷脂酰胆碱胶囊溶液 3 ml/d 灌胃, 空白组及模型组分别给予等量的生理盐水灌胃, 共 5 周。

1.5 观察指标及方法

1.5.1 一般情况 给药结束后观察大鼠的精神状态、体重、皮毛、进食量、大便及活动情况等。

1.5.2 肝脏病理形态学观察 于给药结束后次日处死大鼠, 取一部分肝脏组织以 4% 多聚甲醛固定, 经梯度酒精脱水, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 进行光镜观察。

1.5.3 免疫组化法检测肝脏组织 Caspase-12 蛋白表达 给药结束后次日腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.4 ml/100 g) 将大鼠麻醉, 固定后迅速解剖, 取大鼠肝脏 4% 多聚甲醛固定, 石蜡切片。乙醇梯度脱蜡, HE 染色, 抗原修复, 常规脱水, 透明, 封片。Caspase-12 抗体适量滴加到样本上 (1 : 100 稀释), 覆盖完全, 4℃, 湿盒中孵育过夜。滴加山羊抗小鼠 (1 : 5000) 室温孵育 1 h。DAB 显色, 苏木素复染, 常规脱水, 透明, 封片。光镜下观察, 显微镜拍照。

1.5.4 Western-Blot 法检测肝脏组织 Caspase-12 蛋白表达 取 100 mg 肝脏组织放入研磨管中, 把组织剪切成细小的碎片, 加入裂解液 (按照每 20 mg 组织加入 100 ~ 200 μ l 裂解液的比例) 混匀; 充分裂解后, 转移到离心管, 10 000 ~ 14 000 r/min

离心 3 ~ 5 min, 测定蛋白浓度, -80℃ 保存。Western-Blot 步骤: 制胶, 电泳, 转膜, 封闭, 倾去封闭液, 加入一抗 (1 : 200), 4℃ 过夜, 将 PVDF 膜用 TBS 洗 3 次, 每次 10 min, 加入二抗 (二抗为山羊抗小鼠, 1 : 5000), 摇床上孵育 2 h 后, 回收二抗, 再将 PVDF 膜用 TBS 洗 3 次, 每次 10 min。计算机扫描记录结果, 采用 Image J 1.48U 定量分析软件系统对图像进行积分吸光度测定, 得到各组蛋白条带相对值, 并做统计学处理。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 18.0 处理数据, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验法。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况比较

空白组大鼠精神状态、皮毛、饮食及活动情况等良好。与空白组比较, 模型组大鼠不喜动, 皮毛蓬乱无光泽, 大便稀软次数少; 中药大、中剂量组大鼠精神状态、皮毛、饮食及活动情况等与正常大鼠肉眼观察无明显差别, 中药小剂量组大鼠活动正常, 皮毛蓬乱。表 1 示, 与空白组比较, 模型组大鼠体重明显增加 (P < 0.05); 与模型组比较, 各治疗组体重明显减轻 (P < 0.05)。

表 1 各组大鼠给药后体重比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重
空白组	10	431.52 $\pm$ 48.12
模型组	10	505.10 $\pm$ 56.67*
中药高剂量组	10	444.25 $\pm$ 31.48 Δ
中药中剂量组	10	451.75 $\pm$ 30.48 Δ
中药低剂量组	10	456.38 $\pm$ 22.33 Δ
西药组	10	470.64 $\pm$ 16.53 Δ

注: 与空白组比较, * P < 0.05; 与模型组比较, Δ P < 0.05

2.2 各组大鼠肝脏病理形态情况比较

图 1 示, 空白组大鼠肝小叶结构完整, 肝细胞呈多边形围绕中央静脉呈放射状分布, 大小一致。模型组大鼠肝细胞体积增大, 有大量的空泡状细胞, 肝细胞脂肪变性明显, 细胞核被挤向一边, 部分出现气球样变。中药高剂量组肝细胞脂肪变性几乎完全消失, 细胞排列稍显不整齐。中药中剂量组肝细胞变性明显减轻, 细胞排列不整齐。中药低剂量组肝细胞脂肪变性有所减轻, 细胞排列稍显紊乱, 其中散在少数炎细胞。西药组肝细胞脂肪变性有所减轻。中药各剂量组肝细胞变性较模型组及空

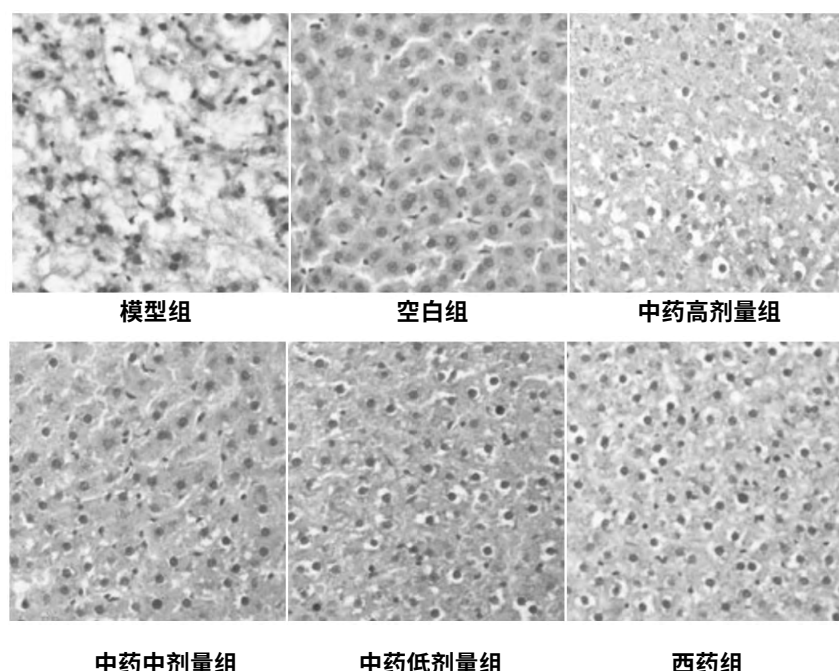


图 1 各组大鼠肝脏病理形态 (HE 染色, 20 ×)

白组明显, 部分出现气球样变。中药各剂量组大鼠肝细胞病理改变较西药组不明显。

2.3 各组大鼠免疫组化法观察肝脏组织 Caspase-12 蛋白表达情况

组织切片中胞质染为淡黄色至棕褐色者为阳性细胞标志。空白组大鼠无阳性染色; 模型组大鼠阳性染色显著; 中药各剂量组和西药组阳性染色有不同程度的减少, 其中中药高剂量组阳性染色最少。

2.4 各组大鼠 Western Blot 法检测肝脏组织 Caspase-12 蛋白表达比较

表 2 示, 模型组肝脏组织 Caspase-12 蛋白表达较空白组明显升高 ($P < 0.05$)。中药各剂量组与西药组 Caspase-12 蛋白表达均低于模型组 ($P < 0.05$), 且中药高剂量组 Caspase-12 蛋白的表达低于西药组及中药中、低剂量组 ($P < 0.05$)。各组大鼠肝脏组织 Caspase-12 蛋白电泳图见图 2。

表 2 各组大鼠肝脏组织 Caspase-12 蛋白表达比较

组别	鼠数	Caspase-12 蛋白 (DPI)
空白组	10	0.24 ± 0.04
模型组	10	$0.54 \pm 0.07^*$
中药高剂量组	10	$0.33 \pm 0.03^{*\Delta}$
中药中剂量组	10	$0.37 \pm 0.05^{*\Delta\blacktriangle}$
中药低剂量组	10	$0.39 \pm 0.03^{*\Delta\blacktriangle}$
西药组	10	$0.35 \pm 0.05^{*\Delta\blacktriangle}$

注: 与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\Delta P < 0.05$; 与中药高剂量组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

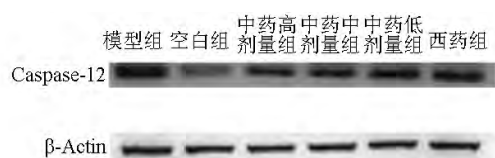


图 2 各组大鼠肝脏组织 Caspase-12 蛋白电泳图

3 讨论

内质网是蛋白质合成与翻译后修饰, 多肽链正确折叠与装配的重要场所, 也是细胞的 Ca^{2+} 贮存器。多种因素如缺血再灌注、低氧、缺乏生长因子、钙失衡、氧化应激、代谢障碍、突变基因表达的结构异常蛋白在内质网堆积等导致内质网功能紊乱, 都会引起折叠或错误折叠的蛋白质在内质网腔内集聚, 从而诱发未折叠蛋白反应, 产生内质网应激^[8]。过度的内质网应激将使未折叠蛋白反应无法代偿, 大量未折叠或错误折叠的蛋白质在内质网腔中堆积, 内质网稳态被进一步破坏, 最终导致细胞功能障碍或死亡^[9]。研究发现, 由内质网应激诱导的细胞凋亡参与了多种肝脏疾病, 如病毒性肝炎、肝脏缺血再灌注损伤、酒精性肝病等, 可能与细胞凋亡引起肝脏损伤相关^[8-10]。内质网应激介导的凋亡途径中, Caspase-12 起着至关重要的作用^[11]。Nakagawa 等^[12]研究发现, Caspase-12 位于膜胞质一侧, 在全身很多器官组织的细胞中都能表达, 是内质网应激致凋亡的特异性介质, 能够独立

诱导细胞凋亡,而不依赖于其他通路^[13-14]。肝细胞接受凋亡诱导刺激后,激活 Caspase-12 蛋白酶原,从而引起肝细胞凋亡^[15]。因此, Caspase-12 是内质网应激介导凋亡途径的关键蛋白酶^[15],可以把 Caspase-12 作为疾病治疗的靶蛋白。

我们认为,非酒精性脂肪肝病因为长期过食肥甘厚味致痰湿内生,痰湿蕴久化热形成痰浊,痰浊阻滞经脉导致气滞,故最终形成气滞、痰浊为主要环节的临床证候。以清热祛痰疏肝为治法,采用小陷胸汤化裁方治疗 NAFLD,临床上取得良好的治疗效果^[9]。该方以黄连治郁热在中、烦躁恶心、心下痞满,用半夏消心腹胸膈痰热结满,选瓜蒌涤痰结,利大肠,故该方实为泄热豁痰之剂。在此基础上加入行气疏肝、活血止痛药物的片姜黄,药理研究证实其降脂活性成份为姜黄色素,可明显抑制肝中甘油三酯和总胆固醇,亦可显著促进胆汁的排泄^[16]。加入陕西省特有药材太白樗木,味微甘、苦、辛,归肝、脾、肾经,有健脾除湿利水之功^[17],可健脾以除生痰之源。小陷胸汤经此化裁由原来的泄热豁痰之剂变为清热祛痰疏肝之剂,前期研究显示,其能减轻肝纤维化程度、抑制肝组织转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 蛋白表达以阻止 NAFLD 的进一步发展,改善患者的预后^[18-19]。多烯磷脂酰胆碱胶囊具有保护肝脏的作用,被广泛应用于治疗非酒精性脂肪性肝炎。它可以抑制脂肪变性、加速膜的再生和稳定、抑制脂质过氧化及胶原合成等。因此我们选择它作为中药治疗的阳性对照药物。

本研究结果显示,中药各剂量组和西药组的肝脏病理有不同程度的改善,其脂滴与模型组基本相似,炎症细胞浸润程度明显减轻。中药各剂量组与西药组肝脏组织 Caspase-12 蛋白表达均降低,且中药高剂量组低于西药组,表明小陷胸汤化裁方能够明显延缓肝脏损害的进展,其作用机制可能与下调肝脏组织 Caspase-12 蛋白的表达有关。

参考文献

- [1] DAY CP, JAMES OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? [J]. Gastroenterology, 1998, 114(4): 842-845.
- [2] 艾正琳, 陈东风. SREBP-1c 在大鼠非酒精性脂肪性肝病中的表达及意义 [J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10): 1063.
- [3] 聂丹丽, 杨成志, 崔大江, 等. 小陷胸汤化裁治疗非酒精性脂肪肝临床研究 [J]. 中国中医急症, 2005, 14(2): 116-119.
- [4] 张青峰, 刘咏煌. 大鼠非酒精性脂肪肝模型的建立 [J]. 四川畜牧兽医, 2012, 39(12): 21-23.
- [5] 黄慧, 陆付耳, 高志强, 等. 大黄素治疗高脂饮食诱发的大鼠非酒精性脂肪肝的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(6): 64-67.
- [6] LAI E, TEODORO T, VOLCHUK A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response [J]. Physiology (Bethesda), 2007, 22: 193-201.
- [7] RUTKOWSKI DT, KAUFMAN RJ. A trip to the ER: coping with stress [J]. Trends Cell Biol, 2004, 14(1): 20-28.
- [8] ASSELAH T, BIECHE I, MANSOURI A, et al. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C [J]. J Pathol, 2010, 221(3): 264-274.
- [9] LI B, GAO B, YE L, et al. Hepatitis B virus X protein (HBx) activates ATF6 and IRE1-XBP1 pathways of unfolded protein response [J]. Virus Res, 2007, 124(1/2): 44-49.
- [10] VILATOBA M, ECKSTEIN C, BILBAO G, et al. Sodium 4-phenylbutyrate protects against liver ischemia reperfusion injury by inhibition of endoplasmic reticulum-stress mediated apoptosis [J]. Surgery, 2005, 138(2): 342-351.
- [11] DISANO F, FERRARO E, TUFI R, et al. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis by an apoptosome-dependent but caspase 12-independent mechanism [J]. J Biol Chem, 2006, 281(5): 2693-2700.
- [12] NAKAGAWA T, YUAN J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis [J]. J Cell Biol, 2000, 150(4): 887-894.
- [13] SZEGEZDI E, FITZGERALD U, SAMALI A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far [J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 1010: 186-194.
- [14] RAO RV, CASTRO-OBREGON S, FRANKOWSKI H, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway [J]. J Biol Chem, 2002, 277(24): 21836-21842.
- [15] MOUW G, ZECHEL JL, GAMBOA J, et al. Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum resident caspase, after permanent focal ischemia in rat [J]. Neuroreport, 2003, 14(2): 183-186.
- [16] 杨成志, 狄灵, 于燕, 等. 姜黄素对单纯性肥胖大鼠胰岛胰岛素抵抗的影响 [J]. 中国全科医学, 2008, 12(7B): 1293-1295.
- [17] 李世全. 秦岭巴山天然药物志 [M]. 西安: 陕西科技出版社, 1987: 343.
- [18] 崔大江, 鄧敏, 聂丹丽. 飞天蜈蚣七对实验性肝纤维化大鼠胰岛 β 细胞功能的影响 [J]. 河北中医学报, 2004, 19(1): 21-22.
- [19] 崔大江, 聂丹丽, 鄧敏, 等. 飞天蜈蚣七对肝纤维化大鼠肝组织转化生长因子 $\beta 1$ 蛋白表达的影响 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2003, 11(3): 136-137.

Effect of Modified *Xiaoxianxiong Tang* (小陷胸汤) on Liver Caspase-12 Expression in Rats with Nonalcoholic Fatty Liver Disease

LI Ruiping¹, YANG Chengzhi¹, DI Ling¹, HU Weitao²

(1. Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an, 710004; 2. Chinese Medical Hospital of Shaanxi Province)

ABSTRACT Objective To discuss the potential mechanism of modified *Xiaoxianxiong Tang* (小陷胸汤) in treating nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Sixty Sprague Dawley rats were randomized into blank group, model group, Western medicine group and high, medium, low dose Chinese medicine groups, with 10 rats in each group. The rats were given high fat diet for 12 weeks to build NAFLD model except those in the blank group. After model building, the high, medium and low dose Chinese medicine groups were respectively given 1.5, 1.0 and 0.5 ml/(100 g · d) of modified *Xiaoxianxiong Tang* by gavage, the Western medicine group was administered 3 ml/d of Polyene Phosphatidylcholine (PPC) Capsule solution by gavage, and the blank group and the model group were respectively given normal saline of the same volume by gavage. After 5-week drug administration, the liver tissue was taken out to be stained by HE staining, while the expression of Caspase-12 protein was detected by immunohistochemistry and Western-Blot. **Results** The hepatocytes in the model group showed obvious steatosis and inflammation compared with those in the blank group, while the degree of steatosis and inflammation in each Chinese medicine group was significantly less than that in the model group and the Western medicine group. The expressions of Caspase-12 protein in each Chinese medicine group and Western medicine group were significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$), while the Caspase-12 expression in the high dose Chinese medicine group was significantly lower than that in Western medicine group and medium and low dose Chinese medicine groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Modified *Xiaoxianxiong Tang* could obviously delay the liver damage in NAFLD rats, and it may concern the expression of Caspase-12 protein in liver tissue.

Keywords nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD); *Xiaoxianxiong Tang* (小陷胸汤); endoplasmic reticulum stress (ERS); Caspase-12 protein

(收稿日期: 2016-07-16; 修回日期: 2016-12-29)

编辑: 王利芬

全国第二届百名杰出青年中医学术成果论坛 暨全国青年中医科技工作者成果论坛会议通知

由中华中医药学会主办, 广东省中医院、《世界中西医结合杂志》社承办, 中华中医药学会继续教育与科学普及部协办的全国第二届百名杰出青年中医学术成果论坛暨全国青年中医科技工作者成果论坛将于 2017 年 06 月 16—18 日在广东迎宾馆(广州市解放北路 603 号)举行。会议主要内容为百名杰出青年中医及青年中医科技工作者学术成果发布及成果交流。

1. 征文内容及要求

1) 成果汇集: 个人简介、个人感言、成果展示三部分, 要求 word 文档, 宋体, 小四号字, 2000 字左右(附近期生活、工作照)。2) 成果交流论文: 要求为未公开发表的论文, 体裁不限, 5000 字左右, 摘要 ≤ 400 字, 关键词 3~5 个, 个人简介: 100 字左右。注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编、电话、电子信箱。3) 论文及会议回执于 2017 年 5 月 15 日前发送至 sjzxyjh@126.com (注明会议征稿)。

2. 会议费用

会务费 1000 元/人, 食宿由大会统一安排, 交通费、住宿费自理。

3. 会务联系人

陈志霞: 13570206868, 020-81887233 转 30917; 乔利梅: 13811106829, 010-82275911; 杨露露: 13522879627, 010-82275991。