

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2017.09.016

三黄茵赤汤对 D-氨基半乳糖诱导人胚胎肝细胞系 LO2 坏死的影响

李海叶, 刁建新, 代欢, 黄伟, 杨运高*

(南方医科大学中医药学院, 广东省广州市白云区广州大道北路 1838 号, 510515)

摘要 目的 探讨三黄茵赤汤治疗急性肝损伤的可能作用机制。方法 将人胚胎肝细胞系 LO2 分为正常组、模型组、对照组及三黄茵赤汤高、中、低剂量组, 通过 D-氨基半乳糖 (D-GalN) 诱导 LO2 细胞坏死, 三黄茵赤汤高、中、低剂量组分别给予三黄茵赤汤 3、2、1 mg/ml, 对照组给予受体相互作用蛋白 1 抑制剂 (Nec-1) 60 mmol/L, 采用 MTT 法测定各组细胞存活率, Hoechst、PI 染色分析细胞是否发生凋亡、坏死, 流式细胞仪检测细胞凋亡率及细胞内活性氧 (ROS) 水平, Western blot 法检测各组细胞 Caspase-3、受体相互作用蛋白 1 (RIP1)、受体相互作用蛋白 3 (RIP3) 表达情况。结果 与模型组比较, 三黄茵赤汤中、低剂量组均能提高细胞生存率和 ROS 的清除率, 三黄茵赤汤中剂量组能降低 Hoechst、PI 染色荧光强度, 三黄茵赤汤高剂量组亦能提高 ROS 的清除率 ($P < 0.05$)。三黄茵赤汤中剂量组降低细胞晚期凋亡率、提高生存率的效果最好。三黄茵赤汤各剂量组均能减少 RIP1 及 RIP3 表达 ($P < 0.05$); 与三黄茵赤汤各剂量组相比, 对照组效果更加明显 ($P < 0.01$)。结论 三黄茵赤汤通过抑制 RIP1 及 RIP3 的表达而对 D-GalN 诱导 LO2 细胞坏死产生保护作用。

关键词 急性肝损伤; 三黄茵赤汤; D-氨基半乳糖; 细胞坏死; 受体相互作用蛋白 1; 受体相互作用蛋白 3

急性肝损伤是目前临床常见病, 其病情发展迅速、凶险, 临床典型表现为肝功能衰竭, 大量肝细胞凋亡和坏死^[1]。因此, 逆转肝细胞的坏死是治疗急性肝损伤的关键。研究发现, 细胞坏死是可以被调控的, 是 Caspase 非依赖性的新型细胞死亡方式, 可以被小分子 necrostatin-1 (Nec-1) 特异性阻断, 且需要受体相互作用蛋白 1 (RIP1)、受体相互作用蛋白 3 (RIP3) 和活性氧 (ROS) 等物质的参与调控^[2]。

三黄茵赤汤由《伤寒论》中茵陈蒿汤减栀子加赤芍、姜黄、黄芪组成, 具有泻热解毒、活血化瘀、补中益气的作用。前期研究^[3]证明用三黄茵赤汤治疗重型肝炎有效。本实验通过 D-氨基半乳糖 (D-GalN) 诱导 LO2 肝细胞损伤, 制作急性肝损伤模型, 利用受体相互作用蛋白 1 抑制剂 (Nec-1) 作为对照, 研究三黄茵赤汤治疗急性肝损伤的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

人胚胎肝细胞系 LO2 引自中山大学实验中心。

1.2 药品及主要试剂

三黄茵赤汤组成: 大黄 15 g、姜黄 15 g、黄芪 30 g、茵陈 30 g、赤芍 30 g, 均购自南方医院 (批号: 12010307); 将中药加水 960 ml 浸泡 30 min, 武火煮沸, 文火再煎煮 40 min, 连续两次, 去渣合并, 低温浓缩成含生药 2 g/ml 的浓缩液, 给药时先将浓缩液再次用冷冻干燥仪冻干, 使用前配置成 30 mg/ml 的母液, 离心取上清, 0.22 μ m 微孔滤膜过滤除菌, 然后用含 10% FBS 的 DMEM 稀释成高、中、低剂量备用。前期细胞毒性试验结果显示, 当三黄茵赤汤方质量浓度高于 3 mg/ml 时, LO2 细胞活性显著下降, 而浓度在 1 ~ 3 mg/ml 时对细胞活力无明显影响, 故设 3、2、1 mg/ml 分别为高、中、低剂量。

高糖 DMEM (批号: 11995065)、胎牛血清 (批号: 10082147)、胰蛋白酶 (批号: 25200-056)、青霉素/链霉素双抗溶液 (批号:

基金项目: 国家自然科学基金 (81673820, 81603606)

* 通讯作者: yangyungao@263.net, (020) 61647096

15140122) 均购自 Gibco 公司。D-GalN (批号: G0500)、二氯二氢荧光素-乙酰乙酸酯 (DCFH-DA, 批号: D6883)、Hoechst (批号: 94403)、MTT 溶液 (批号: M2128)、二甲基亚砜 (批号: D2650) 购自 Sigma 公司。Actin 鼠多克隆抗体 (批号: TA-09)、抗兔抗体 (批号: ZB-2301)、抗鼠抗体 (批号: ZB-2305) 购于中杉金桥生物试剂有限公司。RIP1 抗体 (批号: D94C12) 购于美国 Cell signaling 公司。Caspase-3 抗体 (批号: ab2302)、RIP3 抗体 (批号: ab152130) 购于美国 Abcam 公司。AnnexinVPE/7-AAD 凋亡试剂盒 (批号: 559763) 购于 BD 公司。总蛋白提取及定量试剂盒 (碧云天试剂有限公司, 批号: P0012)。化学发光试剂 (ECL, 美国 GMS 公司, 批号: NCI4106)。碘化丙啶 (PI, 批号: KGA108) 购于凯基生物科技发展有限公司。

1.3 主要仪器

CKX41/U-RFLT50 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); BB15 二氧化碳培养箱 (德国 Heraeus 公司); SW-CJ-4FDA 细胞超净台 (上海茸研有限公司); FACS Calibur 酶标仪 (Perkin Elmer 公司); A101439 电泳系统 (伯乐太平洋公司); FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司); JY-SPCT 水平电泳槽 (上海汗诺仪器有限公司)。

1.4 LO2 细胞培养

LO2 细胞按常规方法复苏后, 置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱里, 用含 10% FBS 和 1% 双抗的高糖 DMEM 培养液培养。当细胞长至瓶底 80% 左右时, 用含 EDTA 的 0.25% 胰蛋白酶消化, 800r/min 离心 5 min, 弃上清, 用培养液将细胞沉淀调为细胞密度 1×10^6 个/ml, 再接种至培养皿中继续培养待用。

1.5 D-GalN 浓度筛选

取处于对数生长期的 LO2 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化制成细胞悬液, 调整密度为 2×10^5 个/ml, 加入 96 孔板, 置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱过夜后, 弃旧液。用含 10% FBS 的 DMEM 稀释成不同浓度的 D-GalN 工作液 (180、120、100、90、80、70、60 mmol/L) 为实验组, 另设不含 D-GalN 的工作液为对照组, 每组设 5 个复孔。D-GalN 工作液分别作用细胞 9 h 后, 用 DMEM 洗 2 次, 然后每孔加 MTT 溶液 10 μ l, 继续孵育 4 h, 终止培养, 小心吸弃孔内培养上清液, 每孔加入 100 μ l DMSO, 震荡 10 min 后, 选择 490nm 波长在酶标仪上测定各孔吸光值, 计算细胞生存率, 细胞生存率 = (实验组吸光值/对照组吸光值) $\times$ 100%, 以筛选出

D-GalN 最适合浓度用于造模。

1.6 分组及给药

取对数生长期的 LO2 细胞, 用 0.25% 胰蛋白酶消化制成细胞悬液, 调整细胞密度为 2×10^5 个/ml, 接种于 6 孔板, 分为: 正常组、模型组、对照组 (Nec-1 60 mmol/L 预处理 1 h 后再加入 D-GalN 作用 9 h 造模) 及三黄茵赤汤高、中、低剂量组 (三黄茵赤汤高、中、低剂量预处理 24 h 后再加入 D-GalN 作用 9 h 造模)。模型组加入 D-GalN 作用 9 h 造模。

1.7 观察指标及方法

1.7.1 MTT 法检测 LO2 细胞存活率 各组分处理后, 每孔加 MTT 溶液 10 μ l, 继续孵育 4 h, 检测各孔吸光值, 计算细胞生存率。

1.7.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 除正常组外, 余各组加入 D-GalN 9 h 后, 用不含 EDTA 的胰酶消化, 收集细胞至 15 ml 离心管中, 用冰的 PBS 洗 3 次, 1000r/min 离心 5 min, 收集 $1 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个细胞, 加入 500 μ l 的 $1 \times$ Binding Buffer 悬浮细胞, 按 AnnexinVPE/7-AAD 凋亡试剂盒说明书操作, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, 实验重复 3 次。

1.7.3 Hoechst、PI 染色观察细胞形态 取对数生长期的单细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^5 个/ml, 将细胞接种于 96 孔板, 24 h 后换液, 分组给药方法同前, 用 PBS 洗 3 次, 加入 Hoechst 35 μ l/孔, 避光, 37℃、20 min 后加入碘化丙啶 (PI) 10 μ l/孔, 5 min 后, 于倒置荧光显微镜下观察、拍照, 用 Image J 1.48 软件计算染色荧光强度, 用平均光密度值表示。

1.7.4 Western blot 检测 RIP1 及 RIP3 蛋白表达 各组给药后消化、离心收集细胞, 加入 80 μ l 细胞裂解液置于冰上裂解后收集蛋白, BCA 法蛋白定量, 10% SDS 凝胶电泳, 然后转印至 PVDF 膜上。5% 的脱脂牛奶封闭, 一抗 Caspase-3 (1 : 500 稀释), RIP1 (1 : 1000 稀释), RIP3 (1 : 1000 稀释), Actin (1 : 500 稀释) 在 4℃ 孵育过夜。相应二抗 (1 : 5000) 室温孵育 60 min。用 ECL 显影, 柯达 2000MM 图像工作站分析蛋白表达情况。以 Actin 为内参, 应用图像分析系统测定条带灰度值。实验重复 3 次。

1.7.5 ROS 清除能力测定 细胞以 2×10^5 个/ml 接种于 6 孔板中, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱里过夜后, 分组及给药同前, 然后弃细胞培养液, PBS 清洗 2 次, 每孔加入无血清培养基稀释的 DCFH-DA

1 ml (浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$, 正常组不加 DCFH-DA), 孵育 25 min 后, 直接吹打收集细胞离心, 弃上清, 用 DMEM 悬浮细胞于流式管中, 立即用流式细胞仪检测。实验重复 3 次。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 19.0 软件, 数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本均数比较采用 One-Way ANOVA 方差分析, 组间多重比较若符合方差齐性检验时用 LSD 法, 若方差不齐则用 Tamhane T2 法。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 诱导 LO2 细胞坏死所需 D-GalN 浓度筛选结果

表 1 示, 当 D-GalN 浓度为 80 mmol/L 时, 细胞生存率为 $(49.073 \pm 2.52)\%$, 明显低于对照组 ($P < 0.05$)。后续试验以此浓度为造模浓度。

表 1 不同浓度 D-GalN 诱导 LO2 细胞生存率比较 ($\%, \bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (mmol/L)	样本量	细胞生存率
实验组	180	5	$9.355 \pm 0.47^*$
	120	5	$11.223 \pm 1.45^*$
	100	5	$14.892 \pm 2.84^*$
	90	5	$22.121 \pm 3.27^*$
	80	5	$49.073 \pm 2.52^*$
	70	5	62.922 ± 3.98
	60	5	71.308 ± 4.43
对照组		5	100

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

2.2 各组 LO2 细胞生存率比较

表 2 示, 模型组细胞生存率较正常组明显下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 对照组和三黄茵赤汤中、低剂量组细胞生存率明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组比较, 三黄茵赤汤高、中、低剂量组细胞生存率均明显降低 ($P < 0.05$)。三黄茵赤汤中、低剂量组细胞生存率均明显高于三黄茵赤汤高剂量组 ($P < 0.05$), 且三黄茵赤汤中、

低剂量组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 各组 LO2 细胞早期凋亡率、晚期凋亡率比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组早期凋亡率、晚期凋亡率均明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与模型组比较, 三黄茵赤汤各剂量组早期凋亡率均明显降低 ($P < 0.05$), 对照组和三黄茵赤汤中剂量组晚期凋亡率明显降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 三黄茵赤汤各剂量组早期凋亡率均明显下降, 晚期凋亡率均明显升高 ($P < 0.05$)。三黄茵赤汤中、低剂量组早期凋亡率及中剂量组晚期凋亡率明显低于高剂量组 ($P < 0.05$)。

2.4 各组 LO2 细胞 Hoechst、PI 染色荧光强度比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组 Hoechst、PI 染色荧光强度均明显增强 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 三黄茵赤汤高、中剂量组 Hoechst 染色荧光强度及 PI 染色荧光强度明显降低 ($P < 0.05$), 对照组的 PI 染色荧光强度明显降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, 三黄茵赤汤高、中剂量组 Hoechst 染色荧光强度更低, 而 PI 染色三黄茵赤汤高、低剂量组荧光强度明显增高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。三黄茵赤汤高、中、低剂量组 Hoechst、PI 染色荧光强度组间两两比较, 差异亦均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.5 各组 LO2 细胞中 Caspase-3、RIP1、RIP3 蛋白表达比较

表 3、图 1 示, 与正常组比较, 模型组 RIP1 和 RIP3 均明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 对照组和三黄茵赤汤各剂量组均能降低 RIP1 和 RIP3 表达 ($P < 0.05$), 对照组中 Caspase-3 表达升高 ($P < 0.05$)。三黄茵赤汤各剂量组 RIP1、RIP3 蛋白较对照组升高, 而 Caspase-3 蛋白较对照组降低 ($P < 0.01$)。三黄茵赤汤中、低剂量组较高剂量组 RIP1 及 RIP3 表达降低, 而 Caspase-3 表达三黄茵赤汤高剂量组最低 ($P < 0.05$)。

表 2 各组 LO2 细胞生存率、早期凋亡率、晚期凋亡率及 Hoechst、PI 染色荧光强度比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本量	细胞生存率 (%)	早期凋亡率 (%)	晚期凋亡率 (%)	Hoechst 染色荧光强度 (平均光密度值)	PI 染色荧光强度 (平均光密度值)
正常组	3	100**	$0.99 \pm 0.20^*$	$1.18 \pm 0.21^{**}$	$48.71 \pm 1.19^*$	$6.42 \pm 0.78^*$
模型组	3	38.679 ± 6.12	4.33 ± 0.21	72.36 ± 1.20	95.54 ± 3.85	23.94 ± 2.57
对照组	3	$69.304 \pm 11.22^{**}$	4.91 ± 0.31	$45.31 \pm 0.82^*$	87.14 ± 6.71	$7.48 \pm 0.56^*$
三黄茵赤汤高剂量组	3	$35.800 \pm 2.01^\Delta$	$2.95 \pm 0.24^{*\Delta}$	$62.11 \pm 1.70^\Delta$	$77.40 \pm 2.28^{*\Delta}$	$12.63 \pm 1.17^{*\Delta}$
三黄茵赤汤中剂量组	3	$54.557 \pm 3.77^{**\Delta\Delta}$	$2.11 \pm 0.14^{*\Delta\Delta}$	$53.83 \pm 1.1^{*\Delta\Delta}$	$68.41 \pm 3.91^{*\Delta\Delta\Delta}$	$8.19 \pm 0.91^{*\Delta}$
三黄茵赤汤低剂量组	3	$47.075 \pm 1.44^{*\Delta\Delta}$	$2.08 \pm 0.99^{*\Delta\Delta}$	$59.77 \pm 2.3^\Delta$	$86.55 \pm 4.01^{\Delta\Delta}$	$18.33 \pm 1.25^{\Delta\Delta\Delta}$

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与对照组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与三黄茵赤汤高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与三黄茵赤汤中剂量组比较, $\Delta\Delta P < 0.05$

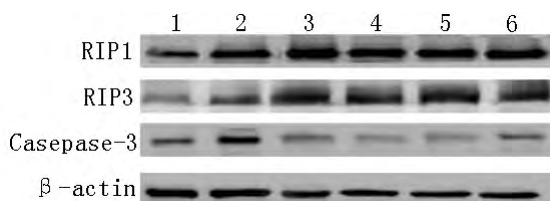
表 3 各组 LO2 细胞中 Caspase-3、RIP1、RIP3 蛋白及 ROS 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本	RIP1/ β -actin	RIP3/ β -actin	Caspase-3/ β -actin	ROS (平均光密度值)
正常组	3	0.5436 $\pm$ 0.0018*	0.1771 $\pm$ 0.0043*	0.1176 $\pm$ 0.0041	119.23 $\pm$ 9.6*
模型组	3	2.3609 $\pm$ 0.0036	1.5067 $\pm$ 0.0026	0.3462 $\pm$ 0.0021	528.92 $\pm$ 7.5
对照组	3	1.1570 $\pm$ 0.0047*	0.3204 $\pm$ 0.0038*	0.6428 $\pm$ 0.0065*	212.9 $\pm$ 15.1*
三黄茵赤汤高剂量组	3	1.9812 $\pm$ 0.0132* Δ	1.2716 $\pm$ 0.0117* Δ	0.1217 $\pm$ 0.0099 Δ	282.89 $\pm$ 9.8* Δ
三黄茵赤汤中剂量组	3	1.8501 $\pm$ 0.0051* $\Delta\Delta$	1.0646 $\pm$ 0.0091* $\Delta\Delta$	0.1497 $\pm$ 0.0032 $\Delta\Delta$	357.42 $\pm$ 7.8* $\Delta\Delta$
三黄茵赤汤低剂量组	3	1.8933 $\pm$ 0.0081* $\Delta\Delta\blacktriangledown$	0.9305 $\pm$ 0.0025* $\Delta\Delta\blacktriangledown$	0.2343 $\pm$ 0.0043 $\Delta\Delta\blacktriangledown$	170.51 $\pm$ 8.1* $\Delta\Delta\blacktriangledown$

注: RIP1, 受体相互作用蛋白 1; RIP3, 受体相互作用蛋白 3; ROS, 活性氧; 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, $\Delta P < 0.01$; 与三黄茵赤汤高剂量组比较, $\Delta P < 0.05$; 与三黄茵赤汤中剂量组比较, $\blacktriangledown P < 0.05$

2.6 各组 LO2 细胞中 ROS 水平比较

表 3 示, 模型组 ROS 水平明显高于正常组 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 对照组及三黄茵赤汤各剂量组 ROS 水平均明显降低 ($P < 0.05$)。三黄茵赤汤低剂量组及对照组 ROS 明显低于三黄茵赤汤高、中剂量组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 且三黄茵赤汤低剂量组与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。



注: RIP1, 受体相互作用蛋白 1; RIP3, 受体相互作用蛋白 3; 1, 正常组; 2, 对照组; 3, 模型组; 4, 三黄茵赤汤高剂量组; 5, 三黄茵赤汤中剂量组; 6, 三黄茵赤汤低剂量组

图 1 各组 LO2 细胞中 Caspase-3、RIP1、RIP3 蛋白电泳图

4 讨论

三黄茵赤汤具有泻热解毒、活血化瘀、补中益气的作用。现代药理学研究发现该方可以促进肝细胞再生, 改善肝功能, 对抗肝脏氧化损伤等^[4]。

研究表明, 细胞坏死可以由特定的因子调控, 并按特定的通路和程序发生, 这种死亡方式称为程序性坏死^[5]。RIP1 和 RIP3 是程序性坏死通路中极为重要的调节蛋白。RIP1 在去泛素化酶头帕肿瘤综合征蛋白的作用下去泛素化, 进而与死亡结构域蛋白、Caspase-8、RIP3 结合, 诱导细胞凋亡^[6]。当凋亡通路被抑制时, RIP1 与 RIP3 通过磷酸化的形式, 形成 RIP1-RIP3 复合物, 启动程序性坏死^[7]。Nec-1 能通过抑制复合物的形成, 特异性抑制 RIP1 介导的程序性坏死^[8]。Sakon 等^[9-10]研究发现程序性坏死需要 ROS 的参与, 而 RIP1 与 NADPH 氧化酶 1 形成复合物导致线粒体功能障碍

产生 ROS, RIP3 能激活糖原磷酸化酶、谷氨酸脱氢酶 1 和谷氨酸氨基连接酶产生大量 ROS, 从而损坏线粒体和溶酶体导致细胞坏死。

D-GalN 是常用的肝毒性药物, 可快速结合并消耗大量的尿苷酸, 影响肝细胞蛋白质、酶等的生成, 从而对肝细胞组织造成损伤^[11-12]。本实验结果发现, D-GalN 干预 LO2 细胞后, 细胞晚期凋亡率升高, PI 染色荧光增强, RIP1 及 RIP3 的表达量增加。对比模型组, Nec-1 能增加细胞活力, 明显降低晚期凋亡率, 减少 RIP1、RIP3、ROS 表达, 可能由于 Nec-1 能够抑制 RIP1 的表达, 从而影响了 RIP1 和 RIP3 相互磷酸化, 进一步抑制复合物的形成, 阻断程序性坏死。由此我们推测 D-GalN 诱导 LO2 肝细胞损伤可能是程序性坏死。三黄茵赤汤也可以降低细胞晚期凋亡率提高细胞生存率, 减少 RIP1 及 RIP3 的表达, 但效果不如 Nec-1, 其中三黄茵赤汤中剂量组比高、低剂量组更能降低晚期凋亡率, 提高生存率, 降低 PI 染色荧光强度。Caspase-3 是细胞凋亡早期阶段激活的关键蛋白酶, 在细胞凋亡过程中起中心环节作用^[13-14]。与模型组相比, 三黄茵赤汤中、低剂量组均能增加细胞活力, 降低晚期凋亡率, 减弱 ROS、RIP1、RIP3、Caspase-3 表达, 说明三黄茵赤汤既能减少程序性坏死的发生, 也能降低凋亡, 而对照组不能降低 Caspase-3 的表达。

综上所述, 三黄茵赤汤能够提高 LO2 细胞生存率, 抑制 RIP1、RIP3、Caspase-3 表达, 有效清除 ROS, 最终减少肝细胞坏死, 减轻肝细胞损伤, 说明三黄茵赤汤对急性肝损伤有一定的保护作用。

参考文献

- [1] KAPLOWITZ N. Mechanisms of liver cell injury [J]. J Hepatol, 2000, 32(1 Suppl): 39-47.
- [2] DEGRETEV A, HUANG Z, BOYCE M, et al. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury [J]. Nat Chem Biol, 2005, 1

- (2): 112-119.
- [9] 杨运高, 华何与, 刘定立. 三黄茵赤汤治疗重症肝炎 32 例 [J]. 湖南中医杂志, 2010, 26(5): 63-64.
- [10] 马文校, 杨运高, 刁建新, 等. 三黄茵赤汤防治大鼠急性肝衰竭的机制 [J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(4): 482-486.
- [11] GIZYCKA A, CHOROSTOWSKA-WYNIMKO J. Programmed necrosis and necroptosis-molecular mechanisms [J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2015, 69: 1353-1363.
- [12] WANG L, DU F, WANG X. TNF- α induces two distinct caspase-8 activation pathways [J]. Cell, 2008, 133(4): 693-703.
- [13] LANDRUM MJ, LEE JM, RILEY GR, et al. ClinVar: public archive of relationships among sequence variation and human phenotype [J]. Nucleic Acids Res, 2014, 42(Database issue): D980-D985.
- [14] LAMBROPOULOU DA, HERNANDO MD, KONSTANTINOU IK, et al. Identification of photocatalytic degradation products of bezafibrate in TiO₂ aqueous suspensions by liquid and gas chromatography [J]. J Chromatogr A, 2008, 1183(1/2): 38-48.
- [15] RITCHIE GR, DUNHAM I, ZEGGINI E, et al. Functional annotation of noncoding sequence variants [J]. Nat Methods, 2014, 11(3): 294-296.
- [16] HANLEY JA, MCNEIL BJ. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve [J]. Radiology, 1982, 143(1): 29-36.
- [17] CHASTRE A, BELANGER M, BEAUCHESNE E, et al. Inflammatory cascades driven by tumor necrosis factor- α play a major role in the progression of acute liver failure and its neurological complications [J]. PLoS One, 2012, 7(11): e49670.
- [18] LIU D, LI C, CHEN Y, et al. Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide [J]. Biol Chem, 2004, 279(46): 48434-48442.
- [19] LIU X, ZOU H, SLAUGHTER C, et al. DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis [J]. Cell, 1997, 89(2): 175-184.
- [20] SMITH GS, VOYER-GRANT JA, HARAUIZ G. Monitoring cleaved caspase-3 activity and apoptosis of immortalized oligodendroglial cells using live-cell imaging and cleavable fluorogenic-dye substrates following potassium-induced membrane depolarization [J]. J Vis Exp, 2012, 13(59): e3422.

Impact of *Sanhuang Yinchu Decoction* (三黄茵赤汤) on Human Embryonic Liver Cell Line LO2 Necrosis Induced by D-galactosamine

LI Haiye, DIAO Jianxin, DAI Huan, HUANG Wei, YANG Yungao

(Chinese Medicine School, Southern Medical University, Guangzhou, 510515)

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Sanhuang Yinchu Decoction* (三黄茵赤汤) in treating acute liver injury. **Methods** Human embryonic liver cell line LO2 were divided into normal group, model group, control group and high, medium, and low dose *Sanhuang Yinchu Decoction* groups. D-galactosamine (D-GalN) was used to induce LO2 cells necrosis. The high, medium, and low dose *Sanhuang Yinchu Decoction* groups were given *Sanhuang Yinchu Decoction* 3, 2, 1 mg/ml respectively. The control group was given receptor interacting protein 1 inhibitor (Nec-1) 60 mmol/L. The survival rate of cells in each group was determined by MTT method. Apoptosis and necrosis were analyzed by Hoechst and propidium iodide (PI) staining. The apoptosis rate and the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) were detected by flow cytometry. The expressions of Caspase-3, receptor interacting protein1 (RIP1) and receptor interacting protein3 (RIP3) were detected by Western blot method. **Results** Compared with the model group, the survival rate of cells and ROS clearance in the medium and low dose *Sanhuang Yinchu Decoction* groups increased. The fluorescence intensity of Hoechst and PI staining in the medium-dose *Sanhuang Yinchu Decoction* group decreased. The ROS clearance in the high-dose *Sanhuang Yinchu Decoction* group increased ($P < 0.05$). The effect of decreasing the late cell apoptosis rate and increasing the survival rate in the medium-dose *Sanhuang Yinchu Decoction* group was the best. The expressions of RIP1 and RIP3 in all dose *Sanhuang Yinchu Decoction* groups decreased ($P < 0.05$). Compared with all dose *Sanhuang Yinchu Decoction* groups, the effect in the control group was more obvious ($P < 0.01$). **Conclusion** *Sanhuang Yinchu Decoction* might have protection on LO2 cells necrosis induced by D-GalN by inhibiting the expressions of RIP1 and RIP3.

Keywords acute liver injury; *Sanhuang Yinchu Decoction*; D-galactosamine; cell necrosis; receptor interacting protein1; receptor interacting protein3

(收稿日期: 2016-10-06; 修回日期: 2017-01-16)

编辑: 王利芬