

清热祛湿益气方对肝损伤细胞凋亡相关蛋白表达的影响

庆 慧 黄 霞 刘惠霞 孙 为

(河南省中医药研究院, 郑州市城北路7号, 450004)

[摘 要] **目的** 观察清热祛湿益气方对刀豆蛋白 A (ConA) 诱导的急性肝损伤模型小鼠肝细胞凋亡相关蛋白表达的影响。**方法** Balb/c 雄性小鼠50只, 随机分为空白组, 模型组, 清热祛湿益气方低、中、高剂量组, 每组10只, 连续灌胃7天。采用 Con A 诱导复制小鼠急性肝损伤病理模型, 观察不同剂量清热祛湿益气方 (7.5g/kg、10.0g/kg、12.5g/kg) 对肝细胞 Bax、Bcl-2 以及 Caspase-3 mRNA 表达的影响。**结果** 与模型组比较, 清热祛湿益气方不同剂量可下调模型小鼠肝组织 Bax、Caspase-3 mRNA 的表达, 并可上调 Bcl-2 的表达 ($P < 0.05$), 随剂量增大, Bcl-2 阳性率分别为 17.56%、18.28%、26.36%。**结论** 清热祛湿益气方可抑制肝细胞凋亡, 对 Con A 诱导的急性肝损伤具有治疗作用。

[关键词] 清热祛湿益气方; 刀豆蛋白 A; 急性肝损伤; 小鼠肝细胞细胞凋亡

Effects of Qingre Qushi Yiqi Formula on the Expressions of the Injured Hepatocyte Apoptosis Related Proteins in Mice

QING Hui, HUANG Xia, LIU Huixia, et al.

(Henan Academy of TCM, Zhengzhou 450004)

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects of Qingre Qushi Yiqi Formula (QQYF) on the expressions of the hepatocyte apoptosis proteins in acute hepatic injury of mice induced by concanavalin A (Con A). **Methods** The pathologic model of acute hepatic injury induced by Con A was used for evaluating the therapeutic effects of QQYF in mice. The Balb/c mice were randomized into 5 groups: blank group, model group, the 7.5g/kg QQYF group, the 10.0g/kg QQYF group and the 12.5g/kg QQYF group. All preparations were administrated by intra-gastric infusion. After 7 days, the expression of the apoptosis proteins including bax, bcl-2 and caspase-3 mRNA were measured. **Results** Bax and Caspase-3 mRNA expression decreased and Bcl-2 expression increased ($P < 0.05$) after treatment by QQYF. With the dose of QQYF increased, Bcl-2 positive rates were 17.56, 18.28, 26.36. **Conclusion** QQYF could inhibit hepatocyte apoptosis, and has a protective effect on acute hepatic injury in mice induced by Con A.

Key Word Qingre Qushi Yiqi Prescription; Concanavalin A; Acute hepatic injury; Mice; Hepatocyte apoptosis

临床常见的病毒性肝炎等肝病的发病机制与 T 淋巴细胞功能紊乱密切相关。1992 年 Tiegs 等利用刀豆蛋白 A (ConA) 成功诱发了小鼠 T 淋巴细胞介导的肝损伤, 为肝病的深入研究以及药物筛选提供了理想的动物模型。清热祛湿益气方 (简称 QQYF) 是我们临床治疗肝病的经验方, 在临床运用中取得了很好的疗效。我们采用 ConA 复制急性肝损伤模型, 对 QQYF 治疗肝病的作用机理进行了实验研究, 现报道如下。

1 材料与方法

1.1 药物

QQYF 由虎杖 20g、连翘 12g、板蓝根 12g、黄芪 15g、西洋参 10g、山药 15g、五味子 10g、甘草 6g 组成, 经提取浓缩为药物浸膏液, 每毫升含原生药 2g, 河南省中药研究院中药分析室提供, 批号 20060506。

1.2 动物

Balb/c 雄性小鼠 50 只, 体重 20~25g, 河南省实验动物中心提供, 合格证号: SCXK (豫) 2005-001。随机

分为 5 组, 空白组、模型组给予双蒸水, QQYF 低、中、高剂量组分别给予 QQYF 药液 7.5g/kg、10.0g/kg、12.5g/kg, 灌胃给药连续 7 天。于动物处理前禁食 14h, 每鼠尾静脉注射 ConA 溶液 20mg/kg, 于注射后 6h, 取出肝脏 4% 多聚甲醛固定, 常规脱水、包埋, 切片, 按说明书进行免疫组化染色; 按下述方法提取总 RNA, 进行 RT-PCR 检测。

1.3 试剂

ConA, 美国 Sigma 公司产品, 批号 C2010。小鼠 Bcl-2、Bax 免疫组化试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司生产, 批号 060809, 060803。总 RNA 提取试剂盒, 北京天为时代科技有限公司提供, 批号 060112。AMV 第一链 cDNA 合成试剂盒, 上海生物工程技术服务有限公司提供, 批号 2029150702。TaqDNA 聚合酶, 上海基星生物科技有限公司产品 (批号 ED0401)。

1.4 RNA 提取与 PCR

总 RNA 提取分别取模型组和 QQYF 低、中、高剂量组小鼠左叶肝组织 70~80mg, 放入加有 0.5ml 裂解液的匀浆器中在冰浴中进行研磨, 将匀浆液倒入处理

好的 EP 管中,再加入 0.5ml 裂解液冲洗匀浆器,合并两次裂解液按说明书进行总 RNA 的提取,每个样品均经琼脂糖凝胶电泳检测其 RNA 的完整性。

引物合成:按小鼠半胱天冬酶-3(Caspase-3) mRNA 基因序列,由上海生物工程公司提供寡核苷酸链引物,引物的序列为:引物 1:5'-GCA TTG AGA CAG ACA GTG GGA-3';引物 2:5'-TCT TTG CGT GGA AAG TGG AGT-3'。预期扩增产物长度 266bp。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(G3PDH)作为反应内参引物,G3PDH 的序列为:引物 1:5'-GTG TAG CCC AAG ATG CCC TTC AG-3',引物 2:5'-CAC CAA CTG CTT AGC CCC CCT G-3'。预期扩增产物长度 371bp。

RT-PCR 扩增反应:逆转录产物先用 G3PDH cDNA 引物扩增以鉴定逆转录过程及 PCR 反应试剂,再用 Caspase-3 cDNA 引物和 G3PDH cDNA 引物在同一反应体系扩增,扩增的反应体积为 20 μl,其中含模板 cDNA 1 μl,引物 1 μl,10 × Buffer 2 μl,Taq 酶 0.5 μl,dNTP 2 μl。循环参数:95℃预变性 3min,94℃变性 30s,50℃退火 40s,72℃延伸 30s,循环 30 次,72℃延伸 3min。4℃保存。取 PCR 产物 8 μl,在 1%的琼脂糖凝胶上电泳,紫外投射仪中观察结果,凝胶图像分析系统拍照,用 Leica Qwin 图象分析软件对 RT-PCR 扩增产物电泳条带进行分析,分别测量基因、内参的灰度值,以 G3PDHcDNA 为内参照进行半定量分析,结果用相对单位=Caspase-3/G3PDH(%)表示。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计分析软件处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,当方差齐时采用单因素方差分析 S-N-K 检验,当方差不齐时采用 Dunnett's T³检验。

2 结果

2.1 QQYF 对肝细胞 Bcl-2、Bax 表达的影响

肝细胞 Bcl-2、Bax 蛋白免疫组化染色判断标准:肝细胞质染色呈棕黄色为阳性细胞,无染色为阴性细胞。Leica Qwin 进行图像分析,每张玻片观察 5 个视野,以阳性细胞灰度面积总和占参考面积%作为 Bcl-2、Bax 阳性细胞率(%)。表 1 示,模型组 Bcl-2 阳性细胞率低于空白组($P < 0.05$),Bax 阳性细胞率高于空白组,提示 ConA 性肝损伤与细胞凋亡蛋白表达失调密切相关;与模型组比较,QQYF 各剂量组均不同程度提高 Bcl-2 阳性表达,其中高剂量组的改善具有统计学意义($P < 0.05$),QQYF 各组均不同程度降低 Bax 阳性表达,中、高剂量组具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 QQYF 对肝组织 Caspase-3 mRNA 表达的影响

表 2 示,模型组肝组织中 Caspase-3 mRNA 的相对

单位值最高为 114.69%,模型组动物肝组织 Caspase-3 mRNA 有明显表达;QQYF 低、中、高剂量组动物 Caspase-3 mRNA 的相对单位值均低于模型组,分别为 101.17%、95.55%、81.69%,提示 QQYF 低、中、高剂量组动物随药量的增大,肝组织 Caspase-3 mRNA 表达逐渐减弱。

表1 各组大鼠肝组织 Bcl-2、Bax 蛋白阳性细胞表达比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	视野	Bcl-2 阳性细胞率	Bax 阳性细胞率
空白组	25	24.99 ± 3.38 *	20.28 ± 4.53 *
模型组	25	14.01 ± 4.03	27.43 ± 3.77
QQYF 低剂量组	25	17.56 ± 9.02	22.12 ± 2.91
QQYF 中剂量组	25	18.28 ± 6.42	17.18 ± 2.89
QQYF 高剂量组	25	26.36 ± 5.37 *	18.24 ± 2.62 *

注:与模型组比较,* $P < 0.05$

表2 各组大鼠肝组织 Caspase-3 mRNA 表达比较

组别	鼠数	基因灰度值	内参灰度值	Caspase-3 /G3PDH(%)
模型组	5	149.86	130.66	114.69
QQYF 低剂量组	5	132.14	130.61	101.17
QQYF 中剂量组	5	123.91	129.73	95.55
QQYF 高剂量组	5	105.20	128.78	81.69

3 讨论

细胞凋亡又称程序化细胞死亡(Programmed cell death,PCD),机体通过凋亡将那些衰老及畸变细胞从体内清除掉,它与细胞增殖的动态平衡是维系生长发育、内环境稳定和免疫调节的最基本过程^[1]。近年来研究发现,肝细胞异常凋亡与各种肝脏疾病的发生发展密切相关,在各种急慢性肝损伤中可观察到异常的肝细胞凋亡现象^[2]。病毒感染、药物毒性物质、酒精和辐射等均可诱发肝细胞凋亡。研究表明^[3],ConA 在体内引起肝细胞死亡的机制与细胞凋亡密切相关。我们采用 ConA 复制小鼠肝损伤模型观察了 QQYF 对凋亡蛋白 Bcl-2、Bax 以及 Caspase-3 mRNA 表达的影响。与对照组比较,模型组动物肝组织 Bax 以及 Caspase-3 mRNA 表达上调,而 Bcl-2 表达下调,均具有统计学差异。提示模型组动物出现肝细胞损伤与凋亡蛋白的异常表达密切相关。肝细胞凋亡的发生受多个基因的调控,其中 Bcl-2 家族是常见的细胞凋亡调控基因之一^[4]。Bcl-2 可抑制细胞凋亡,其通过抑制 Caspase 激活所需的适配体(adaptor)活性而使细胞生存,而 Bax 具有促进细胞凋亡的作用。通常情况下,细胞内抑制和促进细胞凋亡两种蛋白的表达量处于相对的稳态,一旦细胞受到诸如 DNA 损伤、细胞因子等凋亡信号的刺激,促凋亡蛋白表达量增加,促凋亡与促生存蛋白之间

的平衡被打破,细胞就会走向凋亡。Caspase 在正常状态下以无活性的酶原形式存在,凋亡信号刺激其特异性 Asp 残基处被剪切后激活。一些上游的 Caspase 能次序的激活下游的 Caspase,形成 Caspase 级联反应,Caspase-3则是这个过程的核心^[5]。Caspase 的超表达和激活均引起细胞凋亡。本研究结果显示,QQYF 各剂量组均可下调模型动物 Bax 的高表达,上调 Bcl-2 的表达,并随剂量增加该作用增强,高剂量组并有下调或延迟肝细胞 Caspase-3 mRNA 表达的作用。其机理可能是通过影响蛋白酶级联切割过程,维护抑制和促进细胞凋亡两种蛋白表达量的相对平衡,从而抑制小鼠肝细胞凋亡,对肝损伤起到积极的治疗作用。

参考文献

- [1]朱传龙,高人焄,李宜.凋亡及其调控基因 Bcl-2家族在肝脏损伤中的作用[J].实用肝脏病杂志,2008,11(3):206-209.
- [2]Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease[J]. Liver Int, 2006, 26(8):904-911.
- [3]李小刚,王天才,武忠弼,等.刀豆蛋白 A 诱导急性肝损伤的病理学观察[J].临床与实验病理学杂志,1998,14(5):492-493.
- [4]赵锦燕.细胞凋亡和增殖与肝损伤的关系综述[J].福建中医学院学报,2008,18(1):67-69.
- [5]李小明,孙志贤.细胞凋亡中的关键蛋白酶 caspase-3[J].国外医学分子生物学分册,1999,4(1):8-11.

(收稿日期:2009-04-02;修回日期:2009-07-02)

[编辑:行之]

当飞利肝宁胶囊治疗慢性乙型肝炎肝纤维化患者50例

马 欢 杰

(诸暨市人民医院,浙江省诸暨市浣纱南路,311800)

为探索治疗慢性乙型肝炎肝纤维化的有效药物,我院自2007年以来应用当飞利肝宁胶囊治疗慢性乙肝患者,对肝纤维化标志物4项指标变化进行了临床对照研究。现报告如下。

1 临床资料

选择我院2007年2月~2008年6月住院及门诊的慢性乙型肝炎患者,共96例,其中住院患者41例,门诊患者55例。随机分为两组,治疗组50例,对照组46例。男67例,女29例;年龄27~63岁,平均44.7岁;病程3~15年,平均7.5年。按临床症状及实验室检查病情轻重分为轻度23例,中度57例,重度16例,其中经肝穿病理活检31例,S分级为2~4级,11例伴纤维化早期肝硬化。所有病例排除合并其它肝炎病毒感染、自体免疫肝病、酒精肝、脂肪肝、慢性心功能衰竭等疾病,临床诊断均符合2000年9月西安会议第十次全国病毒性肝炎及肝炎学术会议制定的《病毒性肝炎防治方案》诊断标准^[1]。

2 治疗方法

两组根据病情常规应用甘利欣、门冬氨酸钾镁注射液。治疗组每次口服当飞利肝宁胶囊(四川美大康药业股份有限公司生产)1g,每日3次。对照组加服复方益肝灵、护肝片、复方丹参片。两组均治疗6个月,观察治疗前后临床症状、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)、血清总胆红素(TBil)、血清白蛋白(Alb)、血清球蛋白(Glo)、血清透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)、Ⅳ型胶原(ⅣC)变化。

3 疗效观察

两组治疗前后临床症状有效率比较:治疗后治疗组疲乏、纳差、腹胀、肝区不适症状有效率分别为93.5%(43/46)、89.6%(43/48)、90.7%(39/43)、90.0%(45/50);对照组分别为65.9%(27/41)、69.8%(30/43)、65.8%(25/38)、76.1%(35/46)。两组比

较差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。两组治疗前后肝功能指标及肝纤维化指标变化比较、治疗后治疗组与对照组检测指标变化差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

4 讨论

当飞利肝宁胶囊是由当药提取液和水飞蓟提取液最佳配伍合理组成的天然纯中药制剂,它的主要成分是为当药,民间俗称“肝炎草”,自然生长于川藏高原等地,当药提取物有4种抗肝炎活性物质:①裂环烯醚萜类:具有减轻肝细胞的损伤及细胞间质的炎症反应,有效抑制炎症介质的形成,促进肝细胞的修复;②三萜类:具有减轻肝细胞的变性坏死,抑制细胞间质的炎性反应和纤维化,恢复受损肝细胞中肿大的线粒体和扩张的粗面内质网;③黄酮类;④酮类:协同三萜类物质抗肝细胞炎性反应,并有一定的免疫调节作用。另一成分水飞蓟提取物水飞蓟素类衍生物,是国际药理学公认的肝细胞膜的保护剂,具有较强的抗肝细胞损伤及减轻肝脂肪变性作用,并能抑制其血清中ALT、AST、山梨糖醇脱氢酶的升高,有修复肝细胞线粒体及内质网损伤的功能^[2]。研究表明,治疗组和对照组在治疗后临床症状、肝功能、血清肝纤维化标志物均较治疗前明显改善和下降,差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),说明当飞利肝宁胶囊不但能有效地促进慢性乙型肝炎患者临床症状的改善,并能有效地提高肝组织胶原酶活性和血清蛋白的含量,降低血清ALT、AST活性及肝组织胶原含量。

参考文献

- [1]中华医学会传染病与寄生虫病学分会.病毒性肝炎的诊断标准[J].中西医结合肝病杂志,2001,11(1):56-60.
- [2]王德敏.水飞蓟丸治疗病毒性肝炎的临床分析[J].黑龙江医药,1979,(2):35.

(收稿日期:2009-06-03)

[编辑:黄健]