

# 清热解毒、凉血化瘀中药联合干细胞移植对急性肝衰竭大鼠肝脏细胞凋亡的影响

刘芳<sup>1,2</sup>, 徐山凌<sup>1</sup>, 赵丹<sup>1</sup>, 刘鹏<sup>1\*</sup>

(1. 西南医科大学附属中医医院, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学附属中医医院  
中西医结合研究中心, 中西医结合防治器官纤维化实验室, 四川 泸州 646000)

**[摘要]** 目的:探讨清热解毒、凉血化瘀中药联合大鼠骨髓间充质干细胞(BMSCs)移植对急性肝衰竭大鼠(ALF)肝脏细胞凋亡的影响。方法:40只清洁级雄性SD大鼠,随机分为空白组5只,造模组35只,造模组采用D-氨基半乳糖(D-GalN, 1.2 g·kg<sup>-1</sup>)联合脂多糖(LPS, 5 μg·kg<sup>-1</sup>)建立急性肝衰竭大鼠模型,造模后12 h取存活大鼠随机分为模型组、复方甘草酸苷组、茵陈四苓颗粒组、干细胞移植组及茵陈四苓颗粒联合干细胞移植组(联合组),联合组给予干细胞门静脉移植及茵陈四苓颗粒灌胃(每次1.5 g·kg<sup>-1</sup>),干细胞组给予单纯干细胞门静脉移植(1.0 × 10<sup>6</sup> 个/mL),余各组给予等体积生理盐水门静脉注射,茵陈四苓颗粒组给予茵陈四苓颗粒灌胃,复方甘草酸苷组给予复方甘草酸苷灌胃(每次7.5 mg·kg<sup>-1</sup>),余各组给予等体积生理盐水灌胃,干预后120 h处死大鼠。检测各组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆红素(TIBL)变化,苏木-伊红(HE)染色观察肝组织病理改变,计算肝脏炎症活动度,原位末端转移酶标记技术(TUNEL)检测肝脏细胞凋亡指数(AI),蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肝组织半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达,实时荧光定量PCR(Real-time PCR)测定肝组织中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax)mRNA的表达。结果:急性肝衰竭大鼠造模后肝功能异常,联合组与模型组、复方甘草酸苷组、茵陈四苓颗粒组及干细胞移植组比较,大鼠血清AST,ALT, TBIL降低,肝炎活动度及凋亡指数明显降低(P < 0.05);联合组大鼠肝组织内Caspase-3蛋白的表达明显降低,Bax mRNA的表达降低,Bcl-2 mRNA表达明显升高,与模型组及各干预组比较差异有统计学意义(P < 0.05)。结论:清热解毒凉血化瘀中药联合干细胞移植能够改善肝功能,通过下调Caspase-3蛋白表达,上调Bcl-2 mRNA,下调Bax mRNA的表达来抑制肝脏细胞凋亡,效果优于单纯干预,两者对肝细胞凋亡的抑制具有协同作用。

**[关键词]** 急性肝衰竭; 清热解毒、凉血化瘀中药; 干细胞; 凋亡

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)19-0160-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017190160

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170711.1120.006.html>

**[网络出版时间]** 2017-07-11 11:20

## Effect of Traditional Chinese Medicine of 'Cleaning Heat, Cooling Blood, Disintoxication and Removing Blood Stasis' and BMSCs Transplantation on Hepatocytes Apoptosis in Acute Liver Failure Rats

LIU Fang<sup>1,2</sup>, XU Shan-ling<sup>1</sup>, ZHAO Dan<sup>1</sup>, LIU Peng<sup>1\*</sup>

(1. Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Southwest Medical University, Luzhou 646000, China;  
2. Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Organ Fibrosis Prevention and Treatment, Research Center of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Affiliated to Traditional Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, China)

**[收稿日期]** 20170428(002)

**[基金项目]** 四川省科技厅2014年四川省应用基础研究计划项目(14JC0079);泸州市科技局2013泸州市科技计划项目[2013-S-49(7/15)]

**[第一作者]** 刘芳,在读硕士,从事中西医结合肝胆疾病的防治, Tel:13198866990, E-mail:381872143@qq.com

**[通讯作者]** \*刘鹏,硕士,教授,从事中西医结合肝胆疾病的防治, Tel:18909080658, E-mail:531858298@qq.com

**[ Abstract ] Objective:** To study the effect of Chinese traditional medicine (TCM) of ‘cleaning heat, cooling blood, disintoxication and removing blood stasis’ combined with stem cell transplantation in treating the rats of acute liver failure, in order to to explore the effect on apoptosis of hepatocytes. **Method:** A total of 40 clean SD rats were randomly divided into the blank group (5 rats) and the model group (35 rats). The acute liver failure was induced by *D*-GalN ( $1.2 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and LPS ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) through intraperitoneal injection. At 12 hours after modelling, the living rats were randomly divided into the model group, the Compound Glycyrrhizin Tablet group, the Yinchen Siling granule group, the stem cell transplantation group and the combined treatment group (stem cell transplantation combined with TCM). The rats in the combined treatment group and the stem cell group were injected with BMSCs through portal vein, and the rats in the other groups were injected with physiological saline. The combined treatment group and the Yinchen Siling granule group were given by gavage twice a day with tradition Chinese drugs named Yinchen Siling granule ( $1.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), the compound glycyrrhizin tablet group was given compound glycyrrhizin tablet ( $7.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) twice a day, and the rats in the other groups were provided with the equal volume of physiological saline until the rats were killed. Rat blood samples and liver tissues were collected in 120 hours, and alanine aminotransferase (ALT), aspartic aminotransferase (AST), total bilirubin (TIBL) were determined to see whether liver function in each group was improved and the extent. The liver tissue pathological changes were observed by HE staining, the apoptosis index was detected by TUNEL staining, protein expressions of cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3) was determined by Western blot, and mRNA expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2 associated X protein (Bax) were detected by Real-time PCR. **Result:** Liver function abnormality occurred in rats with acute hepatic failure. Compared with the model group, the positive control group, the Chinese medicine group and the stem cell transplantation group, the combined treatment group was statistically better, with decreases in AST, ALT and TBIL, hepatic inflammatory activity and apoptosis index ( $P < 0.05$ ). Caspase-3 in each group, except for the blank group, was significantly increased, and the combined treatment group was statistically superior to all of the other groups ( $P < 0.05$ ). mRNA expression of Bax in each group was gradually decreased, while Bcl-2 mRNA increased, whereas Bax mRNA expression of the combined group was statistically lower all the other groups, and Bcl-2 mRNA was higher than the other groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The combined treatment of TCM of ‘cleaning heat, cooling blood, disintoxication and removing blood stasis’ and BMSCs transplantation alleviates liver dysfunction, protects liver tissues and inhibits the hepatic apoptosis, and the mechanism may be related to down-regulation of the expression of Caspase-3 protein, and up-regulation of the expression of Bcl-2 mRNA and down-regulation of the expression of Bax mRNA, with a better effect than using either of them alone; and both are synergistic to the suppression of hepatic apoptosis.

**[ Key words ]** acute liver failure (ALF); Chinese traditional medicine of cleaning heat, disintoxication, cooling blood and removing blood stasis; bone marrow mesenchymal stem cells (BMSCs); apoptosis

急性肝衰竭 (acute liver failure, ALF) 是由各种原因引起肝脏细胞严重损害, 临床以发展迅速严重的肝功能障碍、肝性脑病等为主要表现的一组综合征, 目前主要的治疗方法以肝脏移植及人工肝等全身支持治疗为主<sup>[1-3]</sup>。急性肝衰竭主要病理变化是短时间内大量肝细胞死亡。急性肝衰竭近年来研究表明, 肝脏细胞的凋亡与 ALF 的发生和预后密切相关, 因此, 抑制肝细胞凋亡是 ALF 防治的重要途径之一<sup>[4-7]</sup>。干细胞移植是继原位肝脏植后又一治疗 ALF 的新方法, 随着对骨髓间充质干细胞 (bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs) 研究的不断

深入, 越来越多研究表明 BMSCs 能够通过旁分泌作用抑制肝细胞凋亡、促进肝细胞增殖, 其分泌细胞因子能够保护肝细胞免受损伤<sup>[8-10]</sup>, 研究发现干细胞移植能够明显改善爆发性肝衰竭的生存率<sup>[11]</sup>。研究表明中药在干细胞移植治疗各种疾病中起到协同作用, 有研究证明左归丸能提高骨髓间充质细胞向肝细胞的转化率<sup>[12]</sup>; 有学者通过动物实验证明黄芪注射液能促进脐血干细胞向肝细胞分化, 增强移植干细胞治疗大鼠肝衰竭的效果<sup>[13]</sup>。清热解毒、凉血化瘀法是 ALF 的主要中医治法, 以四川省名老中医孙同郊经验方拟定, 西南医科大学附属中医医院自

制茵陈四苓颗粒(原肝毒清颗粒)为代表,临床应用于急慢性活动性肝炎、亚急性肝衰竭以及肝硬化并发内毒素血症等疾病。本课题前期研究发现肝毒清颗粒能够减轻内毒素血症、抑制炎症反应、保护肝细胞,促进肝细胞再生,并对大鼠肝纤维化具有明显的防治作用<sup>[14-16]</sup>。本实验构建 ALF 大鼠模型,给予茵陈四苓颗粒灌胃联合 BMSCs 移植进行治疗,通过观察联合治疗与单纯干预对肝细胞抗凋亡的影响与机制,探索分析中药在干细胞移植应用中发挥辅助及协同作用,为中药联合干细胞移植治疗 ALF 提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康雄性清洁级大鼠 40 只,5 周龄体重 200 ~ 220 g,健康雄性 SPF 级大鼠 5 只,3 周龄以下体重 100 ~ 120 g,购自西南医科大学动物实验中心,合格证号 SCXK(川)2013-0017。动物实验符合西南医科大学动物伦理委员会标准,编号 DWLL20151022109。

**1.2 药物及试剂** 胎牛血清(美国 Gemini 公司,批号 A37F00H);L-DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司,批号 AB10179384);脂多糖(LPS),D-氨基半乳糖(D-GalN)(美国 Sigma 公司,批号分别为 SLBK4615V,SLBM3382V);茵陈四苓颗粒(西南医科大学附属中医医院制剂室制备并鉴定,主要由茵陈、栀子、大黄、赤芍、白头翁、猪苓、茯苓等中药组成,川药制字 Z20070525,批号 201508,20160412);复方甘草酸苷片(日本米诺发源制药株式会社,国药准字 J20130077,批号 16027);TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(德国 Roche 公司,批号 11684817910);一抗半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)抗体(美国 Abcam 公司,批号 GR247787-6);二抗羊抗兔 HRP 抗体, $\beta$  肌动蛋白( $\beta$ -actin)(中国 Bioass 公司,批号分别为 AD103357,AG01133028);BCA 蛋白浓度定量试剂盒,DNA Marker(中国 Solarbio 公司,批号分别为 20160214,20160118);总 RNA 抽提试剂盒(中国 Tiangen 公司,批号 N3021);SYBR Green Realtime PCR Master Mix(日本 Toyobo 公司,批号 441900)。

**1.3 仪器** Thermo991 型超低温冰箱(美国热电公司);SW-CJ 型超净工作台(新加坡艺思高科技有限公司);TS100 型光学倒置显微镜(日本 Nikon 公司);Gel Doc XR 型凝胶扫描成像系统,156-8003 型垂直电泳槽(美国 Bio-Bod 公司);Realplex2 型 PCR 扩增仪(美国 Eppendorf 公司);ND-1000 型紫外分

光光度计(美国 NanoDrop 公司);AU680 型全自动生化分析仪(美国 Beckman 公司)。

## 2 方法

**2.1 大鼠 BMSCs 的分离、纯化与体外培养** 采用全骨髓贴壁法<sup>[17]</sup>分离 SD 大鼠 BMSCs,贴壁法纯化大鼠 BMSCs,每次均于细胞接近 80% 铺满瓶底时传代,传至 P3 代于细胞生长对数期调整细胞密度为  $1.0 \times 10^6$  个/mL 备用移植。

**2.2 动物分组及处理** 取 40 只清洁级雄性 SD 大鼠,随机分为 6 组,即空白组(5 只)及造模组(35 只),25 °C 环境下饲养,造模前 12 h 禁食不禁水,模型组大鼠采用 D-GalN  $1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,LPS  $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,依次相隔 12 h 经腹腔注射,制备大鼠 ALF 模型<sup>[17]</sup>,空白组予以等体积生理盐水腹腔注射,造模后给予 5% GS 饮水,3 h 后进食。造模后 120 h,取造模组存活大鼠,再次随机分为模型组、复方甘草酸苷组、茵陈四苓颗粒组、干细胞移植组、茵陈四苓颗粒联合干细胞移植组(后称联合组)。联合组按照细胞数量  $5 \times 10^6$  个/kg 体重剂量经门静脉注射 BMSCs 悬液(体积约 1.2 mL)1 次,同时给予茵陈四苓颗粒每次  $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃,2 次/d;干细胞移植组予以 BMSCs 悬液门静脉注射 1 次;茵陈四苓颗粒组给予茵陈四苓颗粒每次  $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃,2 次/d;复方甘草酸苷组给予复方甘草酸苷片溶液  $7.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃,2 次/d,药物剂量参考魏伟主编《药理实验方法学》<sup>[18]</sup>及李万平等前期研究中方法剂量,根据人和动物体表面积折算等效剂量比值计算<sup>[19]</sup>。空白组、茵陈四苓颗粒组、复方甘草酸苷组给予等体积生理盐水门静脉注射,同时空白组、干细胞移植组给予等量生理盐水灌胃,直至 120 h 后处死大鼠。

**2.3 标本的获取和处理** 干预后 120 h,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠( $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )麻醉,剖腹暴露腹腔并分离腹主动脉,收集血液,脱颈处死大鼠,立即摘取肝组织标本,取肝右叶同部位组织用 4% 的多聚甲醛固定标本,行苏木-伊红(HE)染色进行病理组织学观察,并进行 TUNEL 染色以评估凋亡情况,同时取部分新鲜肝组织放置冻存管中, -80 °C 冰箱保存。

**2.4 检测指标** 血液离心,采用全自动生化分析仪测定大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST),总胆红素(total bilirubin, TIBL)变化。

肝组织石蜡包埋后切取 3 张切片行 HE 染色,每张切片分别随机择 3 个低倍视野( $\times 400$ ),光学

显微镜下观察肝组织病理变化,根据公式计算肝炎炎症活动度,具体公式参照以 Knodell 的炎症活动度指数计分方案修改方案<sup>[20-21]</sup>。

用细胞凋亡检测试剂盒检测肝脏细胞凋亡,光学显微镜下观察肝细胞凋亡的阳性细胞表现为:细胞核染色成棕黄色颗粒。400 倍镜下选取 3 个视野,分别计数 100 个肝细胞核每个视野,以凋亡细胞总数/细胞总数 × 100% 来计算凋亡细胞百分比的均值,即凋亡指数(Apoptosis index, AI)。

采用 Western blot 法检测 Caspase-3 蛋白的表达, BAC 法提取测定蛋白,上样后分离蛋白,转膜后室温封闭 1 h,加入一抗 Caspase-3 (1:1 000), 4 °C 过夜,次日洗膜,二抗孵育(1:5 000),洗后显色,免疫反应在酶的作用底物下显影。用 Quantity One 分析软件进行图像分析,与 β-actin 的测定结果比较,计算其比值。

采用荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测肝脏组织 Bcl-2 mRNA, Bax mRNA 相对表达水平,按照 RNA 抽提试剂盒说明书方法提取总 RNA,按 ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix 说明书进行逆转录,合成 cDNA。取 cDNA 产物 2 μL,反应体系为 20 μL,扩增条件为:95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 55 °C [B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)], 56 °C [Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)] 退火 10 s, 72 °C 延伸 15 s, 40 个循环,以 GAPDH 作为内参作数据分析。引物的设计

是根据 GenBank 上公布的基因序列,设计合成均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。见表 1。

表 1 Bcl-2, Bax, GAPDH 的引物序列

Table 1 Primers of Bcl-2, Bax, GAPDH

引物	序列	片段长度/bp
Bcl-2	上游 AGGATTGTGGCCTTCTTTGA	120
	下游 CAGATGCCGGTTCAGGTA	
Bax	上游 CAGGATCGAGCAGAGAGGAT	120
	下游 GTCCAGTTCATGCCAATTC	
GAPDH	上游 CCCCCTAATGATCCGTTGTG	118
	下游 TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT	

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行上述数据处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,计量资料服从正态分布进行单因素方差分析,不服从正态分布进行对数转换后采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

3.1 对各组大鼠血清 AST, ALT, TBIL 水平的影响 与空白组比较,干预后 120 h 的模型组及各干预组大鼠血清 AST, ALT, TBIL 均升高 ( $P < 0.05$ ),各干预组血清 AST, ALT, TBIL 较低,与模型组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。与其他干预组比较,联合治疗组血清 AST, ALT, TBIL 水平最低,差异显著 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各干预组对 ALF 大鼠血清 AST, ALT, TBIL 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 Effect of each intervention on serum AST, ALT, TBIL in ALF rats ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	ALT/U·L <sup>-1</sup>	TBIL/μmol·L <sup>-1</sup>
空白	-	51.52 ± 21.63	53.60 ± 16.20	16.44 ± 12.20
模型	-	387.60 ± 43.67 <sup>1)</sup>	190.00 ± 29.87 <sup>1)</sup>	89.40 ± 20.95 <sup>1)</sup>
复方甘草酸苷	7.5	233.54 ± 30.39 <sup>2)</sup>	114.80 ± 17.03 <sup>2)</sup>	58.66 ± 19.89 <sup>2)</sup>
茵陈四苓颗粒	3 × 10 <sup>3</sup>	182.56 ± 34.38 <sup>2)</sup>	109.48 ± 24.35 <sup>2)</sup>	56.62 ± 16.30 <sup>2)</sup>
干细胞移植	-	213.48 ± 36.05 <sup>2)</sup>	121.92 ± 23.76 <sup>2)</sup>	62.48 ± 19.16 <sup>2)</sup>
联合	3 × 10 <sup>3</sup>	128.18 ± 27.22 <sup>2,3)</sup>	78.40 ± 22.28 <sup>2,3)</sup>	27.84 ± 17.73 <sup>2,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与复方甘草酸苷、茵陈四苓颗粒干细胞移植比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 ~ 6 同)。

3.2 干预后各组肝脏病理组织观察及肝脏炎症活动度比较 干预后 120 h, HE 染色可观察到空白组大鼠肝小叶结构完整,模型组大鼠肝组织可见片状坏死、弥漫的炎症细胞浸润,肝索结构紊乱,肝小叶结构明显破坏,肝小叶结构模糊不清,肝细胞排列紊乱,可见桥接样坏死、门管区可见纤维增生及肝细胞增生结节,沿汇管区可见炎性细胞浸润。部分细胞内空泡样变性,可见凋亡细胞,表明成功建立急性肝

衰竭模型。茵陈四苓颗粒组、干细胞移植组及联合组肝小叶结构均有所恢复,可见增生肝细胞,炎性浸润明显减轻,计算肝脏炎症活动度表明,与模型组比较,各干预组及联合组炎症明显减轻 ( $P < 0.05$ )。见表 3, 图 1。

3.3 干预后各组大鼠肝组织凋亡指数比较 TUNEL 染色可观察到模型组大量肝脏凋亡细胞,由于肝组织严重破坏,细胞核形态不易辨认,染成棕黄

表 3 各干预组对 ALF 大鼠肝脏炎症活动度指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Table 3 Effect of each intervention on activity of hepatitis in ALF rats ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	肝炎活动度指数
空白	-	1.28 ± 0.84
模型	-	22.80 ± 0.86 <sup>1)</sup>
复方甘草酸苷	7.5	20.50 ± 1.19 <sup>2)</sup>
茵陈四苓颗粒	3 × 10 <sup>3</sup>	17.88 ± 1.54 <sup>2,3)</sup>
干细胞移植	-	19.60 ± 2.34 <sup>2)</sup>
联合	3 × 10 <sup>3</sup>	16.52 ± 1.50 <sup>2,3)</sup>

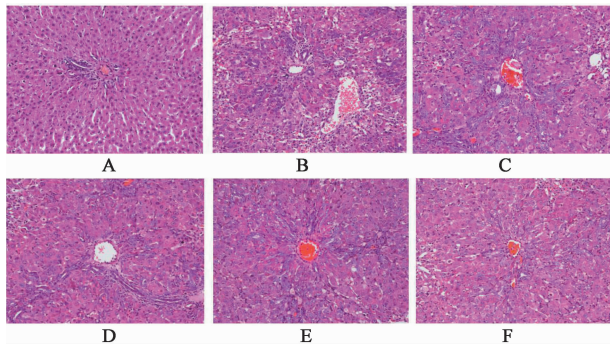


图 1 各干预组对 ALF 大鼠肝脏病理改变的影响 (HE, ×200)  
Fig. 1 Effect of each intervention on liver of pathological changes in ALF rats (HE, ×200)

图 1 各干预组对 ALF 大鼠肝脏病理改变的影响 (HE, ×200)  
Fig. 1 Effect of each intervention on liver of pathological changes in ALF rats (HE, ×200)

褐色颗粒即认定凋亡,各干预组肝脏细胞凋亡较模型组不同程度减轻。干预 120 h 后,与空白组比较,模型组凋亡指数明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,复方甘草酸苷组、茵陈四苓颗粒组、干细胞移植组及联合组凋亡指数明显降低,其中联合组凋亡指数最低 ( $P < 0.05$ )。见图 2,表 4。

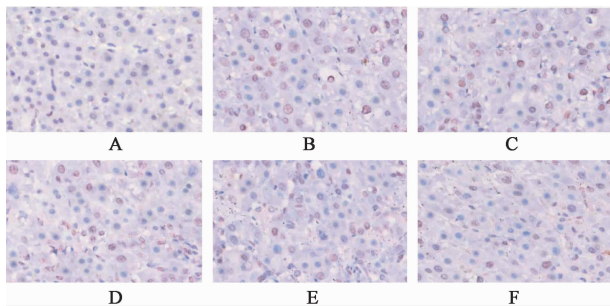


图 2 各干预组对 ALF 大鼠肝细胞凋亡的影响 (TUNEL, ×400)  
Fig. 2 Effect of each intervention on hepatic apoptosis of liver tissue in ALF rats (TUNEL, ×400)

3.4 各干预组对大鼠肝组织 Caspase-3 蛋白表达水平的影响 在干预 120 h 后,与空白组比较,模型组及各干预组大鼠肝组织 Caspase-3 表达均增高,其中模型组增高最显著 ( $P < 0.05$ );复方甘草酸苷组、茵

表 4 各干预组对 ALF 大鼠肝脏细胞凋亡指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Table 4 Effect of each intervention on AI of liver in ALF rats ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	AI/%
空白	-	0.28 ± 0.13
模型	-	57.20 ± 13.39 <sup>1)</sup>
复方甘草酸苷	7.5	41.20 ± 11.07 <sup>2)</sup>
茵陈四苓颗粒	3 × 10 <sup>3</sup>	32.40 ± 8.57 <sup>2)</sup>
干细胞移植	-	36.40 ± 7.26 <sup>2)</sup>
联合	3 × 10 <sup>3</sup>	22.00 ± 12.52 <sup>2,3)</sup>

陈四苓颗粒组、干细胞移植组之间 Caspase-3 蛋白表达水平无显著差异,而联合组 Caspase-3 蛋白表达最低 ( $P < 0.05$ )。见图 3,表 5。

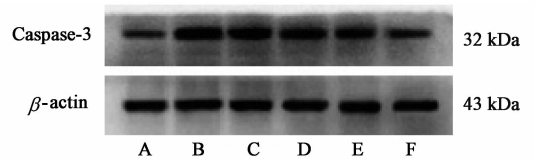


图 3 各干预组对 ALF 大鼠肝组织 Caspase-3 蛋白表达电泳  
Fig. 3 Each intervention on protein expressions of Caspase-3 in ALF rats

表 5 各干预组对 ALF 大鼠肝组织干预后 120 h Caspase-3 蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )  
Table 5 Effect of each intervention on protein expressions of Caspase-3 in ALF rats ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	Caspase-3/ $\beta$ -actin
空白	-	0.54 ± 0.04
模型	-	1.23 ± 0.12 <sup>1)</sup>
复方甘草酸苷	7.5	0.97 ± 0.08 <sup>2)</sup>
茵陈四苓颗粒	3 × 10 <sup>3</sup>	0.93 ± 0.10 <sup>2)</sup>
干细胞移植	-	0.90 ± 0.02 <sup>2)</sup>
联合	3 × 10 <sup>3</sup>	0.69 ± 0.04 <sup>2,3)</sup>

3.5 各干预组对大鼠肝组织 Bcl-2, Bax mRNA 表达的影响 干预后 120 h,各组大鼠肝组织 Bcl-2, Bax mRNA 表达水平较空白组均增高 ( $P < 0.05$ ),与模型组比较,复方甘草酸苷组、茵陈四苓颗粒组、干细胞移植组及联合组 Bcl-2 mRNA 表达增高明显, Bax mRNA 表达明显降低 ( $P < 0.05$ ),其中联合组效果最显著,与其他干预组比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 6。

#### 4 讨论

肝细胞凋亡广泛存在于各种原因导致肝损伤的病程中,作为临床上的急危重症,ALF 主要病理过程为大量肝脏细胞短时间内死亡,并超过肝脏自我修

表 6 各干预组对 ALF 大鼠肝组织 Bcl-2 mRNA, Bax mRNA 表达的影响 ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 6 Effect of each intervention on expressions Bcl-2 and Bax mRNA in ALF rats ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	Bcl-2	Bax
空白	-	1.01 ± 0.14	1.01 ± 0.21
模型	-	1.54 ± 0.05 <sup>1)</sup>	7.03 ± 1.08 <sup>1)</sup>
复方甘草酸苷	1.5	2.31 ± 0.23 <sup>2)</sup>	5.22 ± 0.55 <sup>2)</sup>
茵陈四苓颗粒	300	3.58 ± 0.19 <sup>2)</sup>	3.73 ± 0.55 <sup>2)</sup>
干细胞移植	-	3.56 ± 0.15 <sup>2)</sup>	5.02 ± 0.36 <sup>2)</sup>
联合	300	4.97 ± 0.20 <sup>2,3)</sup>	1.81 ± 0.52 <sup>2,3)</sup>

复和功能承载的能力,导致肝功能短期内迅速恶化而引发一系列严重的综合征,其中大量肝细胞凋亡被认为是 ALF 的关键环节之一<sup>[5,22-23]</sup>。

肝细胞凋亡目前认为有两种主要途径,一种以死亡受体介导的细胞外源性途径,一种以线粒体介导为主要机制的细胞内途径,无论是以哪一种途径诱发,都会通过 Caspase 家族蛋白酶特异性裂解一套底物而导致细胞凋亡。其中 Caspase-3 蛋白激活后能够引起 DNA 损伤修复酶降解,并激活核酸内切酶,进而诱导细胞凋亡,是多种凋亡刺激信号传递的汇聚点,也是凋亡的最终主要执行者<sup>[6,24]</sup>。Bcl-2 基因家族是调控细胞存亡最重要的基因之一,其中 Bcl-2 能抑制细胞凋亡,Bax 能够促进细胞凋亡,他们通过形成同源或者异源二聚体而调控凋亡,是一对相关凋亡调控的关键基因<sup>[25]</sup>。

ALF 中医分型上多属实证,可归属“急黄”、“阳黄”的范畴,其整个病程的主要病因病机特点为湿热疫毒所致瘀血阻络,热瘀互搏,导致肝功能和肝实质损害,甚至引起全身脏腑功能失调<sup>[26]</sup>,根据此病机特点结合长期的临床经验积累,清热解毒、凉血化瘀法在中医治法上占有重要地位,因而确定由我院自主研发的院内制剂茵陈四苓颗粒(原肝毒清颗粒)为本治法代表方剂,组方以茵陈、栀子为君药治以清热解毒,大黄、赤芍、白头翁为臣治以凉血化瘀,佐以茯苓、泽泻等健脾化湿。全方合用可发挥清热解毒、凉血化瘀、健脾化湿等功用。前期动物研究表明,肝毒清颗粒可以通过改善急性肝损伤的内毒素血症,减轻肝细胞变性、坏死,促进肝细胞再生,调节免疫系统以保护肝脏<sup>[15,26]</sup>。

本实验通过药物建立大鼠肝衰竭模型,发现肝功能明显异常,肝细胞大量凋亡,通过复方甘草酸苷

片、茵陈四苓颗粒、干细胞移植及茵陈四苓颗粒联合干细胞移植等方法对其干预治疗,联合治疗效果优于单纯中药及单纯干细胞移植治疗,表明在干细胞移植治疗 ALF 的过程中,清热解毒,凉血化瘀中药能够减轻肝脏组织炎症,对改善肝功能、抑制肝脏细胞凋亡,起到了一定协同作用。为探求相关机制,本实验测定肝组织内凋亡调控蛋白 Caspase-3 及调控基因 Bcl-2, Bax mRNA 的表达水平,证明茵陈四苓颗粒联合干细胞移植治疗肝衰竭过程中,单用中药、干细胞移植干预、联合治疗均能促进 Bcl-2 mRNA 表达,抑制 Bax mRNA 表达,并下调 Caspase-3 蛋白,从而抑制肝细胞凋亡,而联合治疗组效果优于单纯干预,表明茵陈四苓颗粒可能通过改善内环境,协同移植干细胞上调 Bcl-2 mRNA,下调 Bax mRNA 表达,并对下调肝组织 Caspase-3 蛋白的表达具有增强作用,从而协同干细胞调控肝脏细胞凋亡。由此可推测清热解毒、凉血化瘀中药可能通过清除内环境中毒素、免疫复合物及炎性物质等作用,改善移植干细胞的定植、生长的病理微环境,利于干细胞分化及发挥作用,增强移植干细胞对肝细胞凋亡的抑制作用。清热解毒凉血化瘀中药可以作为干细胞移植对 ALF 的治疗提供一种有效的辅助方法,这种联合方法亦能成为 ALF 的治疗思路,并提供新的理论依据。

由于干细胞移植到体内定植、分化到发挥作用需要一定的时间,本实验不足之处则需要进一步时间分层来观察凋亡、治疗效果与时间的依赖关系,可以进一步探索抗凋亡机制,对细胞内途径中线粒体功能调控及靶点通路的进一步深入,并完善体外实验以进一步明确其发生机制。

[参考文献]

[1] McPhail M J, Kriese S, Heneghan M A. Current management of acute liver failure [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2015, 31 (3): 209-214.

[2] Stravitz R T, Kramer D J. Management of acute liver failure [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2009, 6(9): 542-553.

[3] Singanayagam A, Bernal W. Update on acute liver failure [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2015, 21 (2): 134-141.

[4] Rutherford A, Chung R T. Acute liver failure: mechanisms of hepatocyte injury and regeneration [J]. *Semin Liver Di*, 2008, 28(2): 167-174.

[5] Kasahara I, Saitoh K, Nakamura K. Apoptosis in acute hepatic failure: histopathological study of human liver

- tissue using the tunel method and immunohistochemistry [J]. *J Med Dent Sci*, 2000, 47(3):167-175.
- [6] Morikawa A, Sugiyama T, Kato Y, et al. Apoptotic cell death in the response of *D*-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide as an experimental endotoxic shock model [J]. *Infect Immun*, 1996, 64(3):734-738.
- [7] Lazic M, Eguchi A, Berk M P, et al. Differential regulation of inflammation and apoptosis in Fas-resistant hepatocyte-specific Bid-deficient mice [J]. *J Hepatol*, 2014, 61(1):107-115.
- [8] LIU Z, MENG F, LI C, et al. Human umbilical cord mesenchymal stromal cells rescue mice from acetaminophen-induced acute liver failure [J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(9):1207-1219.
- [9] van Poll D, Parekkadan B, Cho C H, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration *in vitro* and *in vivo* [J]. *Hepatology*, 2008, 47(5):1634-1643.
- [10] KUO T K, HUNG S P, CHUANG C H, et al. Stem cell Therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(7):2111-2121.
- [11] Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, et al. Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure [J]. *PLoS One*, 2007, 2(9):e941.
- [12] 李瀚旻, 晏雪生, 罗建君, 等. 左归丸药物血清对骨髓间质细胞转化为肝细胞的作用 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 284(28):5465-5468.
- [13] 张永红, 曾研, 唐晓鹏, 等. 黄芪注射液促进脐血干细胞向干细胞分化具有增强移植干细胞治疗大鼠肝衰竭的效果 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 415(1):103-107.
- [14] 李万平, 魏媚, 李华, 等. 肝毒清颗粒对大鼠实验性肝纤维化的防治作用 [J]. *四川生理科学杂志*, 2003, 25(2):71-72.
- [15] 武斌, 魏媚. 肝毒清颗粒治疗慢性重型肝炎合并内毒素血症的临床疗效评价 [J]. *广东医学*, 2010, 31(18):2451-2453.
- [16] 文海花, 刘鹏. 清热解毒凉血化瘀法干预内毒素肝损伤的机制研究进展 [J]. *国医论坛*, 2009, 24(1):50-52.
- [17] 袁淑芳, 胡兰英, 姜涛, 等. 骨髓间充质干细胞移植肝衰竭大鼠 CD163 和白细胞介素 10 的表达 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(6):919-925.
- [18] 魏伟. *药理实验方法学*. 第 3 卷 [M]. 4 版. 北京:人民卫生出版社, 2002:234-240.
- [19] 李万平, 肖顺汉, 陈美娟, 等. 肝毒清颗粒对大鼠急性肝损伤保护作用研究 [J]. *中成药*, 2005, 27(7):806-808.
- [20] Amer M E, El-Sayed S Z, El-Kheir W A, et al. Clinical and laboratory evaluation of patients with end-stage liver cell failure injected with bone marrow-derived hepatocyte-like cells [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2011, 23(10):936-941.
- [21] 王泰龄, 刘霞, 周元平, 等. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案 [J]. *中华肝脏病杂志*, 1998, 6(4):5-7.
- [22] Rust C, Gores G J. Apoptosis and liver disease [J]. *Am J Med*, 2000, 108(7):567-574.
- [23] Kaplowitz N. Mechanisms of liver cell injury [J]. *J Hepatol*, 2000, 32(1):39-47.
- [24] Bantel H, Schulze-Osthoff K. Mechanisms of cell death in acute liver failure [J]. *Front Physiol*, 2012, 3(79):1-7.
- [25] Odinkova I V, Sung K F, Mareninova O A, et al. Mechanisms regulating cytochrome C release in pancreatic mitochondria [J]. *Gut*, 2009, 58(3):431-442.
- [26] 陈卫平, 刘涛, 王灿晖, 等. 热瘀相搏是重型肝炎病理变化的关键探析 [J]. *中医医学刊*, 2003, 21(8):1240-1241.

[责任编辑 邹晓翠]