

加味茵陈蒿汤对肝损伤大鼠 TLR4 mRNA 及其蛋白表达的影响

周兴华¹, 钟振东², 钟森^{1*}, 陈婧¹

(1. 成都中医药大学附属医院, 成都 610072;

2. 四川省医学科学院·四川省人民医院实验动物研究所, 成都 610212)

[摘要] **目的:**探讨加味茵陈蒿汤对湿热内蕴证大鼠急性肝损伤的治疗作用机制。**方法:**SPF级SD大鼠,雌性,72只,随机分为空白组、模型组、西药组(复方甘草酸苷)组、中药加味茵陈蒿汤低、中、高剂量组。所有大鼠均适应性喂养在室温15~20℃,相对湿度60%~80%的实验室7d。7d后给模型组、西药组、中药组予1次性ip D-氨基半乳糖600 mg·kg⁻¹以造成急性肝损伤模型,造模后除模型组外余各组ig给予药物,每日2次,复方甘草酸苷组剂量为15.75 mg·kg⁻¹,加味茵陈蒿汤低、中、高剂量组剂量分别为14.7, 29.4, 58.8 g·kg⁻¹,空白组予以0.9%的生理盐水ig,灌药体积每次10 mL·kg⁻¹,2次/d,共ig治疗2d。造模48h后断颈处死动物剖取肝脏,RT-PCR和Western blot法检测肝脏细胞Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR-4) mRNA及其蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织TLR-4 mRNA和TLR-4蛋白均有极显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,加味茵陈蒿汤可显著下调TLR-4 mRNA($P < 0.01$)及TLR-4蛋白($P < 0.01$)的表达。**结论:**加味茵陈蒿汤可通过下调肝脏细胞TLR-4 mRNA及TLR-4蛋白表达有效干预肝脏细胞纤维化病变。

[关键词] 加味茵陈蒿汤; 肝损伤; Toll样受体4; 机制

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)15-0239-04

[doi] 10.11653/syjf2013150239

Effect of Modified Yinchenhao Decoction on the Expression of TLR4 mRNA and Protein in Injury Liver of Rats

ZHOU Xing-hua¹, ZHONG Zhen-dong², ZHONG Sen^{1*}, CHEN Jing¹

(1. Medical College of Panzhihua University, Chengdu 610072, China;

2. Sichuan Academy of Medical Sciences · Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610212, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of the modified Yinchenhao decoction (YCHT) in treating acute liver injury. **Method:** Seventy-two female SD rats were randomized into six groups with 12 in each group: blank control group, model group, compound glycyrrhizin tablets group, and low, middle and high dosage group of supplemented Yinchenhao decoction. All the rats were fed with common feed and clean water in the 15-20℃ and humidity level at 60% -80% of laboratory for seven days, seven days later, single intraperitoneal injection of D-GalN at a dosage of 600 mg·kg⁻¹ was administered to the rats except those in the blank control group to induce acute liver injury. Medications were given orally to each treatment group at the same time, the daily dose of compound Glycyrrhizin tablets was 15.75 mg·kg⁻¹, and dosage of the three herbal groups was 14.7, 29.4, 58.8 g·kg⁻¹ respectively. The blank control group was fed with the 0.9% physiological saline. All the medications were given at a volume of 10 mL·kg⁻¹, twice a day for two days. 48 h after modeling, all rats were sacrificed and livers were collected, RT-PCR and western blot were used to detect the expression of TLR-4 mRNA and TLR-4 protein in liver cells. **Result:** Compared with the model group, YCHT could significantly reduce the TLR-4 mRNA

[收稿日期] 20121106(003)

[第一作者] 周兴华, 2010级中西医结合博士, 住院医师, 从事中西医结合防治感染性疾病研究, Tel:028-87766041

[通讯作者] * 钟森, 主任医师, 博士生导师, 从事中医药防治感染性疾病的研究, Tel:028-87766041

($P < 0.01$) and TLR-4 protein expression ($P < 0.01$). **Conclusion:** Through reducing the TLR-4 mRNA and TLR-4 protein expression of rats liver cells, modified YCHT could effectively intervene the liver cells fibrosis.

[**Key words**] Yinchenhao decoction; liver injury; TLR-4; mechanism

肝脏是机体天然免疫系统中一个重要的器官,是机体进行物质交换和代谢的中心,易与外来异物抗原接触,从而激活细胞免疫系统而发生免疫反应。肝纤维化是各种慢性肝脏疾病常见的一种病理过程,是发展至肝硬化、原发性肝癌的必经阶段。国内外研究一致认为,肝纤维化是可以逆转的^[1-2],因此,防止和逆转肝纤维化已成为防治肝硬化、原发性肝癌的重要环节。分子药理学研究表明,在慢性肝损伤过程中,免疫介导的间接损伤起主导作用。Toll 受体(Toll-like receptor)是至今人类认识的第一个能感知病原体并直接作出防御性反应的天然免疫受体,它通过广泛而特异性地识别病原体、偶联信号传导途径、激活免疫细胞而触发一系列的免疫炎症反应^[3]。

茵陈蒿汤始载于《伤寒杂病论》,是治疗黄疸病的一个名方,为临床上治疗阳黄的首选方剂。本方由茵陈蒿、栀子、大黄 3 味药组成,方中用茵陈蒿清热利湿退黄;栀子清解三焦邪热;大黄泄热通便,化瘀破结,3 药共奏清热利湿退黄的功效^[4-5]。

本课题组前期试验表明,茵陈蒿汤原方加以黄连、黄芩、黄芪和赤芍组成的新方可有效预防 *D*-GalN 所致的大鼠急性肝损伤。本研究继以 *D*-氨基半乳糖(*D*-GalN)诱导的大鼠肝纤维化模型为研究对象,进一步探讨加味茵陈蒿汤对大鼠免疫性肝纤维化 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4,TLR4) mRNA 及其蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,SPF 级,雌性,体重 180~220 g。由成都达硕生物科技有限公司提供,实验动物许可证号 SCXK(川)2008-24。饲养于四川省人民医院屏障级实验动物中心。

1.2 受试药物 加味茵陈蒿汤,处方:茵陈 30 g,栀子 30 g,酒大黄 15 g,黄连 15 g,黄芩 20 g,黄芪 30 g,赤芍 30 g,药材购自成都中医药大学附属医院名医堂,经成都中医药大学药教研室鉴定为正品药材,由成都中医药大学药学院药剂教研室制备。复方甘草酸苷(批号 20121014,日本米诺发源制药株式会社秋山片剂株式会社)。

1.3 试剂 RNAiso Plus Kit(批号 BK3303),PrimeScript RT reagent Kit(货号 BK501),SYBR

Premix Ex Taq II Kit(批号 BK402),均购自大连宝生物工程有限公司。BCA 蛋白定量试剂盒(KGPBCA,凯基生物,FBSDS-PAGE 蛋白上样缓冲液(P0015,碧云天生物技术研究),SDS-PAGE 预染蛋白 MAKER(SM0441,美国 Fermentas 公司),TLR-4 兔抗鼠一抗(批号 9103,Cellsignalling 公司),*D*-GalN(纯度 >99%,Sigma 公司,批号 1772-03-9),临用前用生理盐水配置成 10% 的溶液,用 1 mmol·L⁻¹ NaOH 调 pH 至 7.0。

1.4 仪器 BS-600L 电子天平(上海友声衡器有限公司);PIKORed96 RT-PCR 扩增仪(美国 ThermoFisher 仪器有限公司);DY89-I 型匀浆机(宁波新芝生物科技股份有限公司);UK-33 型垂直电泳槽(美国 Bio-RAD 公司);DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂);UV Transilluminator 化学发光凝胶成像仪(美国 Bio-RAD 公司)。

2 方法

2.1 分组及给药 大鼠按体重随机分为 6 组,每组 12 只,分别作为:①模型对照组:等体积无菌生理盐水;②复方甘草酸苷组:15.75 mg·kg⁻¹;③~⑤加味茵陈蒿汤高、中、低剂量组:58.8,29.4,14.7 g·kg⁻¹。⑥另按体重随机称取 12 只正常大鼠作为正常对照组,ig 等体积无菌生理盐水。于实验第 1 天开始 ig 给予药物或无菌生理盐水,灌药体积为每次 10 mL·kg⁻¹,连续 ig 7 d。

2.2 大鼠急性肝损伤模型复制 实验第 7 天,除正常组外,其余各组大鼠分别于 ig 后 0.5 h ip *D*-GalN 600 mg·kg⁻¹以造成急性肝损伤模型。造模后 48 h 股动脉放血处死动物,迅速剖取大鼠肝脏,将其置于冰盘上,于冰冷生理盐水中洗净血迹后,装于 DEPC 水处理过的 EP 管中,放置液氮中快速冷冻,然后转移至 -80 ℃ 超低温冰箱冻存待做 Real-time quantitative RT-PCR;取另部分肝脏放入高压灭菌的空白 EP 管内,置 -80 ℃ 冰箱冻存待做 Western blot。

2.3 指标检测

2.3.1 肝脏组织 TLR-4 mRNA 表达检测 Trizol 法提取大鼠肝脏总 RNA,分光光度法测定 260 nm 与 280 nm 的吸光度(A),用 A_{260}/A_{280} 估计 RNA 纯度,约在 2.0 左右,提示为 RNA 纯品。按试剂盒说明进

行反转录和 RT-PCR 扩增,RT-PCR 数据收集由 7000 System SDS Software 软件完成,通过软件计算所有样品的 C_t 值,以 β -actin 作为内参照基因进行校准,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对 TLR-4 mRNA 表达进行相对定量: $\Delta C_t = C_t(\text{target}) - C_t(\text{ref})$; $\text{Avg. } \Delta C_t(\text{calibrator}) = \text{Avg. } C_t(\text{target, calibrator}) - \text{Avg. } C_t(\text{ref, calibrator})$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t - \text{Avg. } \Delta C_t(\text{calibrator})$; $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示通过参照基因校准的 TLR-4 mRNA 的相对表达水平。TLR-4 mRNA 和 β -actin 引物信息见表 1。

表 1 TLR-4 mRNA 和 β -actin 引物

基因名称	引物	扩增产物 /bp
TLR-4	上游引物 5'-AGT TGA GGGACTTCCAGGC-3'	195
	下游引物 3'-TCA ACTCCCCTGAAAGGTC-5'	
β -actin	上游引物 5'-CTGAGAGGAAATCGTGCCT-3'	208
	下游引物 5'-CCACAGATTCCATACCCAAGA-3'	

2.3.2 肝脏组织 TLR-4 蛋白表达检测 细胞裂解法提取大鼠肝脏总蛋白,Lowry 法蛋白定量,SDS-PAGE 凝胶电泳,Western blot 蛋白质印迹。应用 Tanon-2500R 型全自动数码凝胶成像系统成像,使用 ScionImage 软件对蛋白电泳带进行灰度值分析,以 β -actin 作为内参照蛋白进行校准,采用目标蛋白条带灰度值/ β -actin 条带灰度值来表示目标基因(TLR-4)的相对蛋白表达水平。

2.4 统计方法 用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析,方差齐者组间进行 LSD 检验,方差不齐者进行 Tamhane's T2 检验。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 肝脏细胞 TLR-4 mRNA 表达检测

3.1.1 RT-PCR 溶解曲线分析 各实验组 TLR-4 和 β -actin 溶解曲线中均有单一的主峰,TLR-4 T_m 值均为 86.12°C , β -actin 的 T_m 值均为 85.24°C ,相同扩增条件下重复多次,得到的 TLR-4 和 β -actin 溶解温度上下浮动不超过 1°C ,融解曲线单一峰无非特异性荧光,说明产物特异性强,无引物二聚体,定量准确,见图 1,2。

3.1.2 TLR-4 mRNA 表达 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值及蛋白表达 与正常组比较,模型组大鼠肝脏细胞中 TLR-4 mRNA 的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值极显著增大($P < 0.01$),提示 TLR-4 基因在 D -GalN 型动物肝损伤细胞中呈过表达;与模型组比较,加味茵陈蒿汤高、中剂量组大鼠肝脏细胞中 TLR-4 mRNA 的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值极显著减小

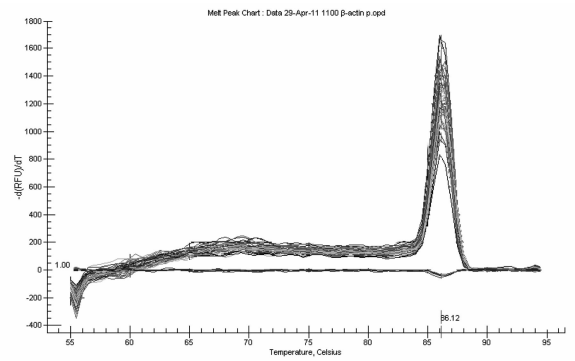


图 1 肝脏细胞中 TLR-4 荧光定量 PCR 溶解曲线

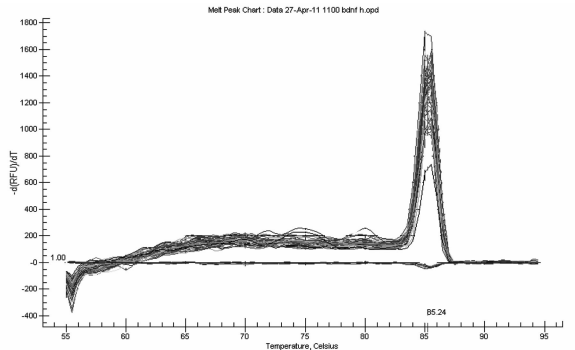


图 2 肝脏细胞中 β -actin 荧光定量 PCR 溶解曲线

($P < 0.01$),低剂量组显著减小($P < 0.05$),提示加味茵陈蒿汤可显著抑制 TLR-4 在 D -GalN 诱导的大鼠肝损伤细胞中的过量表达,进而抑制肝脏炎症反应。见表 2。TLR-4 mRNA 和 β -actin 扩增曲线分别见图 3,4。

表 2 各组大鼠肝脏细胞中 TLR-4 mRNA 的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 及 TLR-4 蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TLR-4 mRNA $2^{-\Delta\Delta C_t}$	TLR-4 灰度值 / β -actin 灰度值
正常对照	-	$0.73 \pm 0.13^{2)}$	$0.69 \pm 0.21^{2)}$
模型对照	-	7.49 ± 1.41	3.50 ± 1.23
复方甘草酸苷	15.75×10^{-3}	$3.02 \pm 1.24^{1)}$	$1.83 \pm 0.86^{1)}$
加味茵陈蒿汤	58.8	$2.67 \pm 1.15^{2)}$	$1.27 \pm 0.97^{2)}$
	29.4	$2.91 \pm 1.54^{2)}$	$1.53 \pm 0.39^{1)}$
	14.7	$3.16 \pm 1.04^{1)}$	$1.98 \pm 0.83^{1)}$

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 肝脏细胞 TLR-4 蛋白表达检测 与正常组比较,模型组大鼠肝脏细胞中 TLR-4 蛋白表达极显著增大($P < 0.01$),与 RT-PCR 结果一致;与模型组比较,加味茵陈蒿汤高剂量组大鼠肝脏细胞中 TLR-4 蛋白表达极显著减小($P < 0.01$),中、低剂量组显著减小($P < 0.05$)。见表 2、图 5。

4 讨论

TLR4 是一种 I 型跨膜受体蛋白,由胞外区、跨

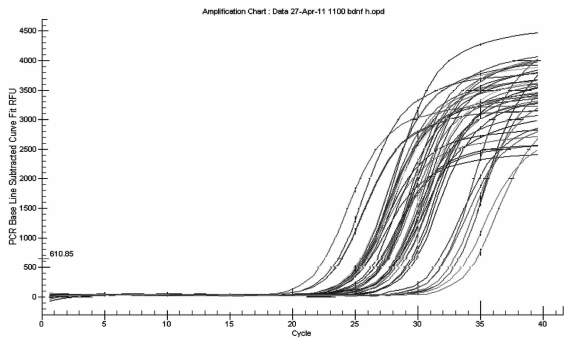


图 3 大鼠肝脏细胞中 TLR-4 mRNA 荧光定量扩增曲线

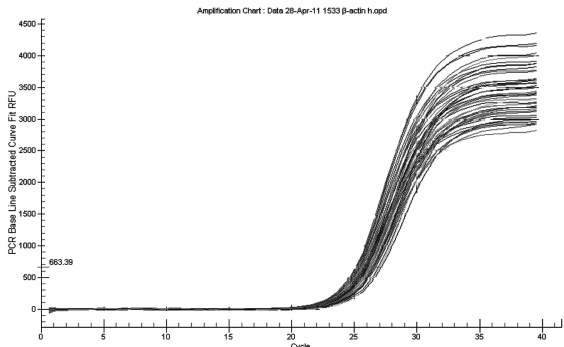
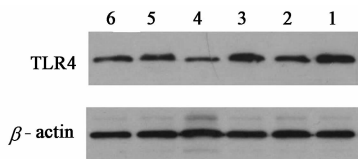


图 4 β -actin 荧光定量扩增曲线



1. 模型组;2. 正常组;3. 复方甘草酸甘 15.75 mg·kg⁻¹组;
4~6. 加味茵陈蒿汤 58.8,29.4,14.7 g·kg⁻¹组

图 5 各实验组大鼠肝脏 TLR-4 和 β -actin 蛋白表达的 Western 印迹条带

膜段和胞内区三部分组成,胞外是富含 24 个亮氨酸的重复序列,主要识别其特异性配体 LPS(内毒素),胞内为与白介素-1 受体信号域同源的尾状域,主要负责 LPS 的信号传导,而 LPS 是导致肝细胞纤维化的重要因素,肝内多种细胞表面可表达 LPS 相关受体,它们是启动 LPS 激活细胞释放炎症细胞因子等产物的始动环节。TLR4 作为 LPS 的主要受体或关键信号传导分子,可表达在肝内库普弗细胞、肝星状细胞(HSC)、肝窦内皮细胞、肝实质细胞表面,介导肝内细胞的炎症性反应过程,如损伤、纤维化、修复、再生与增生等^[6-7],但 TLR4 在肝纤维化中的作用和地位还未完全被人们所了解。

HSC 介导受损肝脏的炎症反应和纤维化,活化

的星状细胞表达纤维胶原和基质蛋白增多,以致形成纤维化。Paik 等^[8]发现 LPS 可直接激活 HSC,在激活的 HSC 中存在着完整的 TLR4 信号通路,LPS 直接激活 HSC 表面的 TLR4 并进而激活 NF- κ B 和 JNK 通路,诱导了炎症细胞因子和黏附分子的表达,从丙型肝炎肝硬化患者分离培养激活的 HSC 可上调表达 LPS 相关信号传导分子 TLR4,CD14 和 MD2,进而刺激 HSC 分泌炎症因子介导肝损伤和纤维化。

本实验研究显示,加味茵陈蒿汤可显著下调大鼠肝细胞中 TLR4 mRNA 及其 TLR4 蛋白表达,提示加味茵陈蒿汤可能通过调节大鼠肝组织中 TLR4 蛋白的信号传导通路,避免其过度激活,进而抑制了 NF- κ B 的活化,最终减少了炎症因子的释放,减轻了肝细胞炎症,起到一定的抗肝纤维化作用。

[参考文献]

- [1] Jiao J, Friedman S L, Aloman C. et al. Hepatic fibrosis [J]. Curr Opin Gastroenterol,2009,25(3):223.
- [2] Bevin Gangadharan, Manisha Bapat. Discovery of novel biomarker candidates for liver fibrosis in hepatitis c patients; a preliminary study [J]. Plos One, 2012, 7(6):1.
- [3] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity [J]. Nat Rev Immunol,2001, 1(2):135.
- [4] Guo J, Loke J, Zheng F, et al. Functional linkage of cirrhosis-predictive single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses[J]. Hepatology, 2009, 49(3):960.
- [5] 慕永平,王磊,刘平,等. 茵陈蒿汤的发展及现代研究 [J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(2):68.
- [6] 刘莹,李军祥. 茵陈蒿汤对高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪性肝炎的药效学观察[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(13):217.
- [7] Kumaravelu Jagavelu, Chittaranjan Routray. Endothelial cell toll-like receptor 4 regulates fibrosis-associated angiogenesis in the liver [J]. Hepatology, 2010,52(2):590.
- [8] Paik Y H, Schwabe R F, Bataller R, et al. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells [J]. Hepatology, 2003,37(5):1043.

[责任编辑 聂淑琴]