

一贯煎治疗肝炎药理机制的研究

刘玉兰^{*}, 油红捷, 张红月, 高连印, 穆阳, 车念聪, 杨铮, 王欢, 任晓萌
(首都医科大学中医药学院, 北京 100069)

[摘要] 目的: 观察中药一贯煎对肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 致肝炎小鼠模型的干预作用。方法: 24 只雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 4 组: 正常组、模型组每日每只小鼠 ig 2 mL 生理盐水; 中药组给予一贯煎汤药 ig 12.6 g·kg⁻¹, 1 次/d, 连续 1 周; 阳性对照组给予联苯双酯滴丸 ig 7.5 × 10⁻³ g·kg⁻¹, 1 次/d, 连续 1 周。实验第 8 天晚 10 时给予模型组、中药组、阳性对照组每只小鼠 0.1 μ g TNF/12 mg GalN ip, 进行肝损伤造模, 观察小鼠状态, 于次日上午 9 时处死所有小鼠, 测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST); HE 染色观察肝组织病理变化; Western Blot 方法对肝组织 cIAP1 蛋白检测。结果: 一贯煎组小鼠血清 ALT、AST 较模型组显著降低, 小鼠肝组织病理改变较模型组显著减轻, cIAP1 蛋白表达较模型组显著增高, 说明一贯煎能够促进肝组织 cIAP1 蛋白的表达。结论: 一贯煎可能通过调节 TNF- α 信号通路 cIAP1 蛋白的表达, 从而有效减轻炎症反应, 达到保肝、降酶的目的。

[关键词] 一贯煎; 肝功能; 凋亡抑制; 蛋白 1

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)05-0192-03

前期临床研究提示, 慢性肝炎具有增高的血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平, 该细胞因子的增高是导致细胞死亡、继发炎症和肿瘤的原因之一。一贯煎是临床上治疗慢性肝炎肝肾阴虚证经常使用的方剂之一, 并且显示了良好的治疗效果。本研究建立 TNF- α 致肝炎小鼠模型, 研究一贯煎对该模型小鼠 TNF- α 信号通路的干预作用。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 6 周的 C57BL/6 小鼠 24 只, 体重 18 ~ 22 g, 购自首都医科大学实验动物中心, 动

物许可证编号: SCXK(京)2007-0001, 按清洁级标准饲养, 普通颗粒饲料喂养。

1.2 药物和试剂 一贯煎: 生地 10 g, 沙参 15 g, 当归 9 g, 枸杞子 10 g, 麦冬 9 g, 川楝子 9 g, 每剂 62 g, 水煎并浓缩至含生药 1 g·mL⁻¹ 的浓缩液; 联苯双酯滴丸, 北京协和药厂; 重组小鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 德国 AppliChem 公司, 批号 CYT-252; D-氨基半乳糖, 美国 Cali-Bio 公司, 批号 CB500154; Anti-cIAP1, 德国 AppliChem 公司, 批号 ab25939; 山羊抗兔 IgG 荧光二抗 (Rockland); RIPA 裂解液、蛋白酶 K (Sigma 公司)。

1.3 仪器 TD 型电子天平 (余姚市金诺天平有限公司); 荧光显微镜 (nikoneclipse 80i) 由首都医科大

等神经受体含量、抗焦虑及抗抑郁、雌激素样等作用, 体现了现代医学治疗 AD 的多种手段。

乙酰胆碱神经元及其递质与痴呆的发病机制关系密切。乙酰胆碱神经递质在乙酰胆碱转移酶的作用下合成, 在乙酰胆碱酯酶的作用下降解失活。所以, 一般把乙酰胆碱转移酶 (ChAT) 和乙酰胆碱酯酶 (AChE) 的活性作为老年性痴呆相关实验的检测指标。

本实验表明, 逍遥散低、中、高剂量组均可提高 AD 小鼠学习记忆能力, 降低其潜伏时间, 能较好的改善 AD 模型小鼠行为学指标, 但以高剂量组最为明显; 逍遥散低、中、高剂量组能显著升高小鼠脑组

织 ChAT 活性、降低 AChE 活性, 亦以高剂量组最为明显。可见, 逍遥散能较好的对抗 D-gal 所致 AD 小鼠模型且有一定的量效关系, 其可能与调节中枢胆碱神经递质数量和活性有关, 具体机理有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 龚国清, 徐黻本. 小鼠衰老模型[J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(2): 10.
- [2] 陈勤. 抗衰老研究实验方法学[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1996: 94.

学临床检验中心提供; Western 免疫印迹 (Western Blot) 专用电泳装置和转膜装置 (BIO. RAD); 低温高速离心机 (型号: 30-TY7107, Heraeus 公司); 全自动生物化学仪 (Beck2man CX7, 美国)。

2 方法

2.1 动物分组、给药与造模 将动物随机分成 4 组: 正常组、模型组、中药组、阳性对照组, 每组 6 只。正常组、模型组 ig 等量生理盐水, 中药组给予一贯煎汤药 ig $12.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 阳性对照组给予联苯双酯滴丸 ig $7.5 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 均 1 次/d, 连续 1 周。实验第 8 日晚 22 点给予模型组、中药组、阳性对照组每只小鼠 $0.1 \mu\text{g TNF}/12\text{mgGalN}$ ip 造模, 次日 9 时处死所有小鼠。

2.2 取材 麻醉后, 脱颈椎处死小鼠, 摘眼球取血 3 mL, 4 静置 2 h, $4\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心 10 min, 分离血清, 进行丙氨酸氨基转移酶 (ALT), 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 检测。取肝脏左叶相同部分, 1 份放于 10% 福尔马林中, 1 份液氮冷冻。

2.3 指标检测

2.3.1 血清 ALT、AST 含量检测。

2.3.2 肝组织病理观察 肝组织常规制片, HE 染色, 光学显微镜下观察。肝组织病变的严重程度由以下指标比较: 水肿, 炎症反应, 坏死 (点状、条状、带状)。

2.3.3 Western Blot 方法检测 cIAP1 蛋白 总蛋白的提取采用一步法, 从液氮中迅速取出约 0.1 g 肝组织加入约 1 mL 组织蛋白裂解液, 冰上充分匀浆, $4\ 12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 取上清液, 用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度; 按总蛋白 $80 \mu\text{g}$ 计算上样体积, 4 1 的比例加入上样缓冲液煮沸变性 5 min; 12% SDS-PAGE75 v 垂直电泳, 当样品到达分离胶后上调电压至 125 v, 溴酚蓝到达分离胶底部后电泳结束。

电泳完毕, 经硝酸纤维素膜进行印迹转移和 10% 脱脂奶粉封闭过夜。用羊抗 Anti-cIAP1 (1 100) 一抗, 4 孵育膜 1 h, TBST 洗 5 min, 共 3 次; 然后用相应二抗 37 孵育膜 1 h (山羊抗兔 IgG 荧光二抗 (1 3 000)), TBST 洗 5 min, 共 3 次。加发光液作用 5 min, 暗室曝光。用 Odyssey 红外荧光扫描成像系统对膜进行扫描。Imageproplus 4. 01 版本的专业图像分析软件进行图像分析。

2.4 统计学分析 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 11.5 统计软件进行处理, 各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

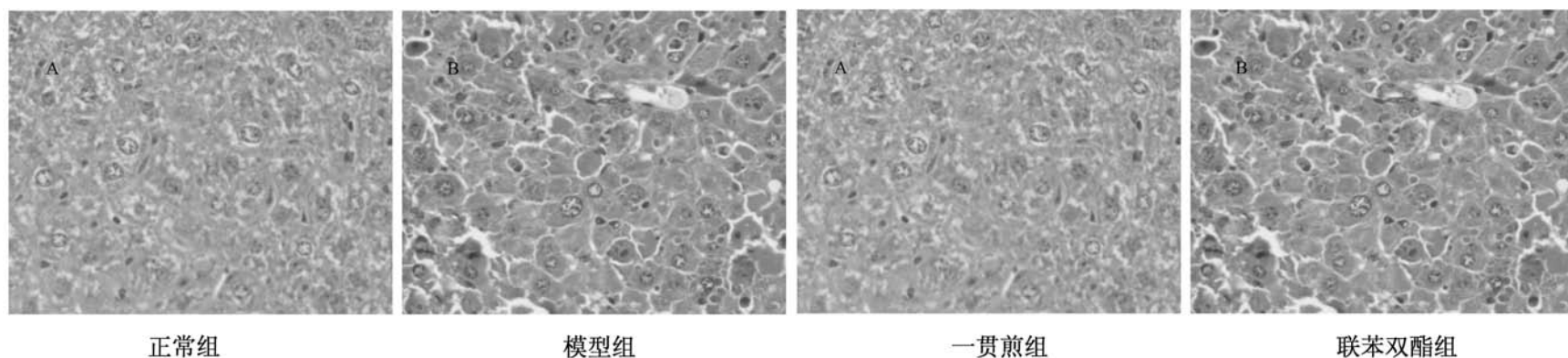
3.1 各组小鼠肝功能的比较 见表 1。结果显示, 肝炎模型组小鼠血清 ALT, AST 较正常组显著增高 ($P < 0.01$), 表明肝损伤显著, 造模成功。中药组和西药组小鼠肝功能较模型组显著降低, $P < 0.01$ 。说明一贯煎能显著改善肝损伤小鼠的肝功能。

表 1 各组小鼠肝功能的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	ALT / $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	AST / $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	—	$46.29 \pm 10.23^{1)}$	118.00 ± 18.11
模型	—	110.8 ± 10.75	420.60 ± 11.11
一贯煎	12.6	$60.12 \pm 11.74^{1)}$	$184.00 \pm 8.54^{1)}$
联苯双酯	7.5×10^{-3}	$50.13 \pm 12.59^{2)}$	$120.25 \pm 22.28^{2)}$

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$

3.2 各组小鼠肝组织病变的比较 正常对照组小鼠肝组织结构清晰。模型组小鼠肝细胞明显肿胀变性, 肝细胞坏死融合成条带状, 可见较多的凋亡细胞, 小叶中可见点状细胞坏死, 细胞界限不清, 有气球样变细胞, 并出现大量炎症细胞浸润。治疗组小鼠肝细胞变性、坏死、炎症反应明显减轻, 肝细胞排列较规则。见图 1。



正常组

模型组

一贯煎组

联苯双酯组

图 1 小鼠肝组织病理的比较 (HE, $\times 200$)

3.3 各组干预 TNF- α 信号通路 cIAP1 蛋白表达的比较 结果提示,模型组 cIAP1 蛋白表达较正常对照组显著增高($P < 0.01$)。一贯煎组 cIAP1 蛋白表达较模型组显著增高($P < 0.05$),而阳性对照组与模型组差异不显著。见图 2。

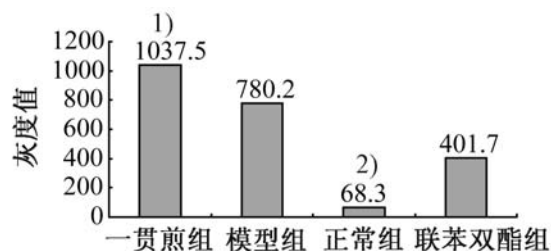


图 2 各组 cIAP1 蛋白表达的比较

注:与模型组比较, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

4 讨论

后基因组学的研究表明,细胞信号传导途径的失调是导致炎症、肿瘤等疾病的关键病理环节。研究表明乙型肝炎病毒诱导的肝坏死与增高的 TNF 水平相关^[1]。实验证明乙型肝炎病毒能通过抑制 TNF 受体及其配体的相互作用、阻断激活 caspase 等途径干预 TNF- α 信号传导途径^[2],从而导致炎症和肿瘤。在 TNF- α 信号传导途径中,凋亡抑制蛋白 IAP 不仅在上游抑制 TNF 引起的细胞凋亡,又能在下游直接抑制 caspase 的酶活性,从而起到抑制细胞凋亡的作用^[3],cIAP1 的表达较 cIAP2 更为广泛。

一贯煎是临床治疗肝肾阴虚型慢性乙型肝炎常用方剂之一,具有很好的治疗效果,具有改善肝功能、抑制病毒复制和减轻临床症状等作用^[4~5],本研究建立 TNF- α 致肝炎小鼠模型,研究一贯煎对该模

型小鼠 TNF- α 信号通路的干预作用。研究结果提示,一贯煎能有效改善模型小鼠肝功能,并能减轻肝细胞炎症反应、抑制肝细胞的凋亡、坏死;WesternBlot 检测结果提示,一贯煎能显著促进 cIAP1 蛋白的表达,因此,可以推理,一贯煎可能通过促进 cIAP1 蛋白的表达,进而抑制细胞凋亡,从而起到减轻炎症反应的目的。

本研究提示,一贯煎治疗肝炎的药理机制之一在于调节 TNF- α 信号通路相关蛋白的表达,从而有效减轻炎症反应,达到保肝、降酶的目的。

[参考文献]

- [1] Wim V. M, Joke V. B., Peter B, *et al.* Tumor necrosis factor-induced lethal hepatitis: pharmacological intervention with verapamil, tannic acid, picotamide and K76COOH[J]. FEBS Letters, 2000, 467: 201.
- [2] 孙超超,蔡挺.病毒感染中 TNF 信号传导途径[J].国外医学病毒学分册,2005,12(3):80.
- [3] Uren AG, Pakusch M. Cloning and expression of apoptosis inhibitor protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor receptor associate factors[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996,93: 4974.
- [4] 伊书红,宋菊梅,张辉.一贯煎加味治疗肝肾阴虚型慢性乙型肝炎 100 例[J].北京中医药大学学报(中医临床版),2004,11(2):17.
- [5] 余运龙.加味一贯煎治疗慢性乙型肝炎 40 例观察[J].亚太传统医药,2008,4(7):53.