

基于肝组织差异蛋白质组解析黄芪汤治疗二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化的效应机制

全欣^{1,2}, 王高强^{1,2}, 王磊^{1,2}, 刘莺², 孙明瑜^{1,2}, 刘平^{1,2*}

(1. 上海中医药大学附属曙光医院·上海市中医药研究院肝病研究所·肝肾疾病病证教育部重点实验室(上海中医药大学), 上海高校中医内科学 E 研究院, 上海 201203; 2. 上海中医药大学, 上海 201203)

[摘要] 目的: 基于肝组织差异蛋白质组表达解析黄芪汤治疗二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)大鼠肝纤维化的效应机制。方法: 4周内给大鼠 ip DMN 12次制备肝纤维化模型, 成模后停止染毒, 随机分为模型对照组与治疗组, 治疗组以黄芪汤 ig 2周; 双向凝胶电泳(2-DE)分离肝组织总蛋白, 用基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱和肽质量指纹图谱分析鉴定部分差异表达蛋白质; 蛋白质免疫印迹法及生化学方法对过氧化还原蛋白 6(Prdx6)、热休克蛋白 70(HSP70)及过氧化氢酶(CAT)活性进行验证。结果: 鉴定的 18个蛋白中 7个与脂质代谢紊乱及过氧化损伤相关, 3个与蛋白合成、加工和降解相关, 2个与生物转化相关, 3个与能量代谢相关。验证的 3个蛋白点(Prdx6, Hsp70, CAT)与双向电泳分析结果基本一致。结论: 过氧化损伤是 DMN 诱导大鼠肝硬化形成的重要病理环节, 提高机体内在的抗氧化能力、抗氧化应激效应是黄芪汤逆转大鼠肝硬化的主要机制之一。

[关键词] 肝纤维化; 蛋白质组学; 氧化应激; 黄芪汤

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0111-06

Changes of Hepatic Proteome in Dimethylnitrosamine-induced Cirrhosis in Rats Treated with Huangqi Tang

TONG Xin^{1,2}, WANG Gao-qiang^{1,2}, WANG Lei^{1,2}, LIU Ying², SUN Ming-yu^{1,2}, LIU Ping^{1,2}

(1. Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai Research Institute of Traditional Chinese Medicine, Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases (Ministry of Education) in Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, E-institute of Traditional Chinese Internal Medicine, Shanghai Municipal Education Commission, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** Proteomics approaches were performed to identify proteins that may be involved in dimethylnitrosamine(DMN)-induced cirrhosis/fibrosis and the effects of Huangqi Tang (HQT) intervention were observed in rats. **Method:** Differential protein spots that exhibited changes in HQT group in DMN-induced cirrhosis were selected by two-dimensional gel electrophoresis and identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight and peptide mass fingerprinting analysis. After that, these protein spots were recognized by bioinformatics information retrieval. Lastly, the results of this proteomic analysis were confirmed by immunoblotting and detection of enzyme activity. **Result:** Eighteen protein spots were found to be differentially expressed, including 7 spots involved in disorder of lipid metabolism and oxidative damage, 3 spots involved in protein metabolism, 2

[收稿日期] 20100324 (007)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(2006CB504801); 国家自然科学基金重大研究计划重点项目(90409020); 上海市重点学科建设项目(Y0302); 上海市教育委员会 E 研究院建设计划项目(E03008); 上海高校创新团队建设项目资助。

[第一作者] 全欣, 在读博士研究生, 研究方向: 中医药抗肝纤维化, Tel:021-2026525, E-mail: angel_tongxin@live.cn

[通讯作者] * 刘平, 医学博士, 教授, 研究方向: 中医药防治肝脏病, Tel:021-51322059, E-mail: liuliver@online.sh.cn

spots involved in biotransformation and 3 spots involved in material synthesis and energy metabolism in liver. Among them, 3 spots for confirmation (Prdx6, Hsp70, CAT) were consistent with the results of two-dimensional gel electrophoresis. **Conclusion:** There are significant oxidative stresses occurred during hepatofibrogenesis of DMN-induced cirrhosis/fibrosis in rats and HQT can significantly improve the antioxidant capacity of liver and protect peroxide damage of cells.

[**Key words**] cirrhosis; proteomics; oxidative stress; Huangqi Tang

二甲基亚硝胺 (dimethylnitrosamine, DMN) 诱导的大鼠肝纤维化/肝硬化模型具有成模周期短、病变较稳定等特点,并且与人类肝硬化早期病理改变相似,是国际上公认的经典方法^[1]。本课题组前期基于现代中医学对肝硬化证候病机的基本共识(湿热内蕴、瘀血阻络、气阴亏虚等),采用不同功效的古典方剂(清热利湿的茵陈蒿汤、活血化瘀的下瘀血汤、益气的黄芪汤、养阴疏肝的一贯煎)对 DMN 诱导的大鼠成型期肝硬化进行治疗,以药效为判断基准,发现黄芪汤是治疗 DMN 大鼠肝硬化的有效方剂^[2-3]。本文拟通过对 DMN 肝纤维化模型大鼠进行动态观察及黄芪汤治疗后的肝组织差异蛋白质组研究,以期部分解析黄芪汤治疗大鼠肝纤维化的效应机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 Wistar 雄性大鼠 55 只(正常组 14 只,模型组 41 只),体重 150 ~ 180 g,购自中国科学院上海实验动物中心[动物合格证号 SCXK(沪)2003-0003],于上海中医药大学实验动物中心清洁区饲养、造模、治疗,自由饮食水。

1.2 药物、试剂与仪器 黄芪汤(黄芪、甘草、大枣的配伍比例为 6:1:1)采用道地药材,经生药学专家鉴定,保存样品备查。由上海中医药大学附属曙光医院国家中医药管理局中药制剂中心(国家中医药管理局三级实验室)一次制备后真空干燥,冷藏保存。DMN 购自日本东京化成株式会社,批号 MAL05。24 cm IPG 胶条(pH 4 ~ 7,非线性)、IPG 缓冲液(pH 4 ~ 7)、丙烯酰胺、*N,N'*-甲叉双丙烯酰胺、十二烷基磺酸钠、三羟甲基氨基甲烷、尿素、甘油、过硫酸铵、二硫苏糖醇、碘乙酰胺等购自 Amersham Biosciences 公司;蛋白质顺序抽提试剂盒购自 BIO-RAD 公司,批号 163-2100;过氧化氢酶(Catalase, CAT)测定试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所,批号 20051025;Odyssey 封阻液(Li-COR),购自 Li-COR 公司。单克隆小鼠抗大鼠热休克蛋白 70 (Heat shock protein, HSP70) 一抗,为 Stressgen Biotechnology 公司产品;单克隆小鼠抗大鼠过氧化

还原蛋白 6 (Peroxiredoxin 6, Prdx6) 一抗,为 Abcam 公司产品;单克隆小鼠抗大鼠甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗,购自康成生物科技公司;近红外染料 (Alexa680) 标记的羊抗兔 IgG 多克隆二抗,近红外染料 (IRD800) 标记的驴抗小鼠 IgG 多克隆二抗,Odyssey 扫描仪及 Odyssey 双色红外激光成像系统,均为 Li-COR 公司产品。等电聚焦仪、垂直电泳槽均系 GE Healthcare 公司产品。

2 方法

2.1 模型制备及分组 参照 Ala-Kokko 方法^[4]造模。用生理盐水将 DMN 稀释为 0.5% 的溶液,模型组大鼠以 2 mL·kg⁻¹剂量于每周前 3 d 连续 ip,共 4 周。正常组大鼠 ip 等量的生理盐水。造模结束后,将模型大鼠随机分为模型对照组(16 只)及黄芪汤组(15 只)。正常对照组 8 只。治疗组于第 5 周起,按 65 kg 体重成人临床用量的 8 倍量,即黄芪汤 0.935 g·kg⁻¹(相当于生药 4.923 g·kg⁻¹,分别用蒸馏水 10 mL 稀释 ig,每日 1 次,共计 2 周。正常组与模型对照组以同体积生理盐水 ig。

2.2 样品采集与处理 于造模 2 周和 4 周后分别处死正常组大鼠 3 只/模型组大鼠 4 只、正常组大鼠 3 只/模型组大鼠 6 只作治疗前动态观察;余各组大鼠均于第 6 周末处死取材。大鼠均先予戊巴比妥钠(50 mg·kg⁻¹)ip 麻醉后打开腹腔,观察肝脏的大体形态,于肝右叶切取 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm 大小肝组织 2 块,4% 中性福尔马林固定,用于病理标本制备;剩余肝组织用 EP 管(1.5 mL)分装 -80 °C 保存。

2.3 观测项目与方法

2.3.1 肝组织病理学观察 肝组织常规脱水、包埋、切片(3 μm 厚),行天狼猩红染色,光镜观察肝组织病理学变化并拍照、扫描。进行胶原纤维增生程度分期,胶原纤维增生程度分期标准如下:0 期 正常肝脏,无明显胶原纤维增生;I 期 胶原纤维增生,中央静脉和门脉区有少量星状胶原纤维束放散,但无间隔形成;II 期 胶原纤维增生,中央静脉

和门脉区结缔组织变厚,由此向四周伸出纤维素,形成不完全间隔;Ⅲ期 胶原纤维大量增生,有个别菲薄的完全间隔形成,或较厚的不完全间隔即将形成假小叶;Ⅳ期 胶原纤维大量增生,完全纤维间隔较厚,假小叶大量形成。

2.3.2 双向凝胶电泳(Two-dimensional electrophoresis, 2-DE) ①肝组织蛋白质的提取:取 250 mg 大鼠肝组织加 0.5 mL 组织蛋白质提取液($40 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-base, pH 8.3 ~ 8.4, 加 PMSF $0.1 \text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$) $6\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 匀浆 30 s, 加 $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ DNA 酶 I, $25 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ RNA 酶 A 各 10 μL , 冰上静置 15 min 后, 振荡混匀 5 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$ $20\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 60 min 后, 再以 $32\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 60 min, 取上清液, 冷冻 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。②一维电泳:干胶条(pH 4 ~ 7, 长 24 cm), 上样量为 150 μg , 加 350 μL 泡胀液($8 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, 4% CHAPS, 0.2% 两性电解质)。电泳条件:重泡胀和聚焦在 $20\text{ }^\circ\text{C}$ 下自动进行, 总电压时间积为 148 000 Vh。③二维电泳:将已聚焦好的胶条分别在 3.5 mL 平衡液 1, 2 中各平衡 15 min(平衡母液: $6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素, 2% 十二烷基硫酸钠, $0.375 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 8.8 Tris-HCl, 20% 甘油。平衡液 1 加 2% 二硫苏糖:平衡液 2 去二硫苏糖, 加 2.5% 碘乙酰胺, 用时配), 上 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用低熔点琼脂糖封口, 电泳直至溴酚蓝到胶的底线, 进行硝酸银染色。④图像分析及数据处理:将凝胶放在 Image Scanner 扫描仪上, 用 ImageMaster 2D Platinum 6.0 软件进行差异表达分析, 选取表达水平相差 1.2 倍以上的蛋白质点进行质谱分析。

2.3.3 蛋白酶解及质谱鉴定 将图像分析中得到 32 个差异点进行斑点切取, 胶内酶解、肽段提取、基质混合及点靶过程。样品用 4700 串联飞行时间质谱仪 [4700 Proteomics Analyzer (TOF/TOFTM) (Applied Biosystems, USA)] 进行质谱分析, 激光源为 355 nm 波长的 Nd:YAG 激光器, 加速电压为 20 kV, 采用正离子模式和自动获取数据模式采集数据。PMF 质量扫描范围为 700 ~ 3 500 Da, 取强度最大的 5 个峰进行串级质谱分析; 谱图用 myoglobin 酶解肽段进行外标校正。所得结果于 GPS (Applied Biosystems, USA)-MASCOT (Matrix Science, London, UK) 数据库检索。搜索参数设置: 数据库为 NCBIInr; 检索种属为: all, 数据检索方式为 combined; 最大允许漏切位点为 1; 酶为胰蛋白酶。质量误差

范围设置: PMF 0.3Da, MS/MS 0.4Da; 在数据库检索时胰酶自降解峰和污染物质的峰都手工剔除。

2.3.4 蛋白质免疫印迹法 (Western blotting) 大鼠肝脏组织样品(每组 3 个样本)于匀浆器匀浆, 分别提取总蛋白; 据蛋白定量获得的蛋白浓度, 于 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 min, 12% SDS-PAGE 电泳, 结束后半干转至 NC 膜。摇床上封阻液室温封闭 1 h, 杂交一抗, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 过夜。PBS + 0.1% Tween-20 洗膜 4 次, 每次 5 min。杂交二抗, 室温摇床上 45 min, PBS + 0.1% Tween-20 洗膜 4 次, 每次 5 min, 用 PBS 冲洗去除 Tween-20。膜用 Odyssey 双色红外激光成像系统扫描分析。同一张 NC 膜曝光后以 PBS 洗涤, 封阻液重新封闭, 加入 GAPDH 抗体稀释液(1:5 000)作为内参照。

2.3.5 CAT 活性检测 参照试剂盒说明书。

2.4 统计学方法 计量资料采用统计分析软件 SPSS12.0 中的 ANOVA 程序进行单因素方差分析, q 检验, 并用 LSD 进行两两比较, 以 $P < 0.01$ 为差异有显著意义。

3 结果

3.1 肝组织病理学变化 正常肝组织仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维。造模 2 周, 胶原纤维广泛增生并自汇管区向小叶内伸展, 形成部分菲薄的不完全间隔; 造模 4 周时增生的胶原纤维分割肝小叶形成较粗大、致密的完全间隔, 正常肝小叶结构消失, 个别形成不完整假小叶。6 周时大鼠纤维组织增生程度减轻, 仍存在部分完全间隔。黄芪汤组大鼠纤维组织增生明显减轻, 纤维间隔变窄、疏松, 多为不完全间隔。见图 1。

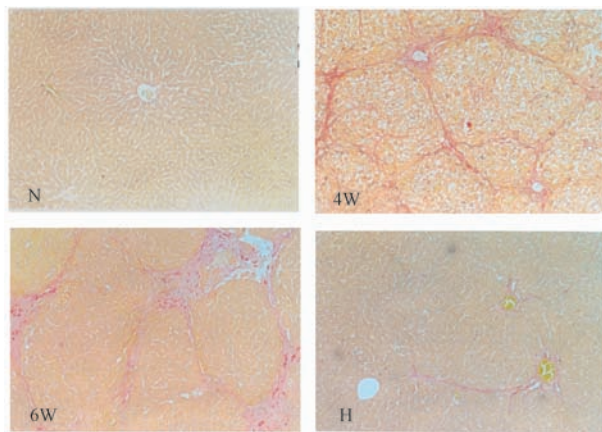


图 1 大鼠肝组织胶原纤维增生观察(天狼猩红染色, $\times 100$)

N. 6 周正常组; 4W. 4 周模型组;
6W. 6 周模型组; H. 6 周黄芪汤组

3.2 2-DE 凝胶图谱分析 每组中选取不同的个体

样品重复 5 次,从每组胶中筛选出分辨率、重复性均较高的肝组织 2-DE 图谱各 3 张。采用图像分析软件进行分析:6 周正常组点数为(1 460 ± 131)个,组内匹配率为 85.27%;6 周模型对照组点数为(928 ±

129)个,组内匹配率为 78.87%;6 周黄芪汤组点数为(1 281 ± 138)个,组内匹配率为 87.56%。6 周正常、模型组和黄芪汤组大鼠肝组织双向凝胶图谱,显示从肝脏组织分离的蛋白质点。见图 2。

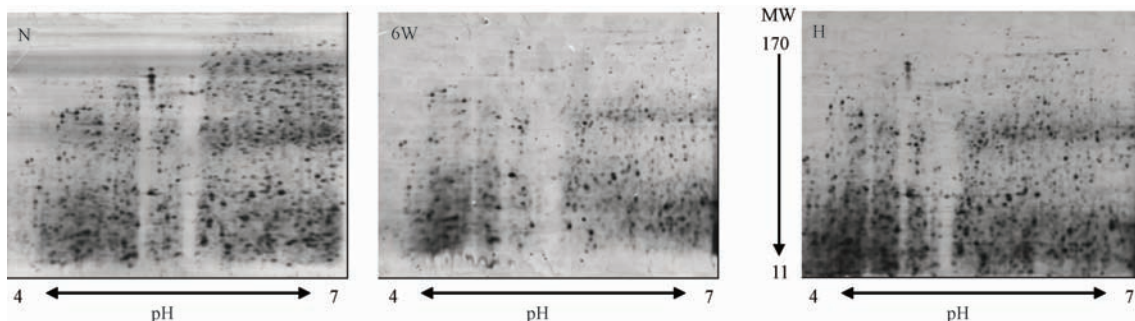


图 2 不同组别大鼠肝组织双向凝胶图谱

(N. 6 周正常组;6W. 6 周模型组;H. 6 周黄芪汤组;MW. 蛋白质相对分子质量;pH. 蛋白质等电点)

3.3 蛋白质质谱鉴定 结果见表 1。根据 2D 凝胶图谱分析软件 Image Master 2D Platinum 6.0 检测分

析得出的匹配蛋白质点平均表达量的比值 (ratio 值)分析差异度,选取 6 周模型组有差异蛋白表达

表 1 蛋白质谱鉴定

Spot ID	Protein identity	NCBI entry No.	pI/MW (Da)	Sequence Coverage/%	Mascot score	6 周
7 个与脂质代谢紊乱及过氧化损伤相关的点						
H (+)						
2769	Peroxiredoxin 6 (Prdx6)	gi 16758348	5.64/24803	73	595	+
2533	heat shock protein 70 (Hsp70)	gi 13242237	5.37/70827.2	20	433	-
2976	Catalase (CAT)	gi 6978607	7.07/59719.5	21	181	-
2964	glutathione S-transferase A5	gi 13928688	8.78/25303.3	8	56	-
2968	L-FABP14	gi 204074	6.74/11410.8	13	86	-
H (-)						
2059	transferrin	gi 61556986	7.14/76345.6	52	60	+
1714	glutathione S-transferase Mu 2	gi 28933457	6.9/25686	64	222	+
3 个与蛋白质代谢相关的点						
1446	regucalcin	gi 13928740	5.27/33368.4	36	290	+
2216	Protein disulfide-isomerase A3 precursor	gi 1352384	5.88/56587.7	49	315	+
621	glucose regulated protein, 58 kDa	gi 56905	6.38/56587.6	23	197	+
2 个与生物转化相关的点						
1373	aldehyde dehydrogenase	gi 16073616	6.06/48239.5	33	4487	+
1300	carbamoyl phosphate synthetase 1	gi 8393186	6.33/164475.5	15	221	+
3 个与物质合成和能量代谢相关的点						
1477	enolase 1, alpha	gi 6978809	6.16/47086.2	15	70	-
2891	aldolase B	gi 27476059	8.66/39593.2	11	136	-
773	aldo-keto reductase family 1, member D1	gi 20302063	6.18/37354.1	23	188	-
其他						
2497	phosphatidylethanolamine binding protein	gi 8393910	5.48/20788.4	40	74	-
2566	alpha-2u globulin precursor	gi 204261	5.43/20169.1	5	475	+
2688	beta 2 globin	gi 8048915	8.57/15851.2	26	59	+

注:Spot ID,代表点的序号,每 1 个号对应 1 个蛋白质;NCBI entry No.,将这个号输入到 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)或者 EXPASY(www.expasy.org),可得到对应蛋白的全序列和一些功能方面的信息;Mascot score,根据检索的软件 Mascot 的算法得到的分值,分值最好达到 56 以上,分值越高说明这个蛋白质鉴定越可靠;6W,6 周模型组;H,黄芪汤组;“+”代表 6 周模型组蛋白表达量上调(与 6 周正常组相比,ratio > 1.2);“-”代表 6 周模型组蛋白表达量下调(与 6 周正常组相比,ratio > 1.2);H(+),代表 6 周黄芪汤组蛋白表达量上调(与 6 周模型组相比,ratio > 1.2);H(-),代表 6 周黄芪汤组蛋白表达量下调(与 6 周模型组相比,ratio > 1.2)。

(与正常组相比, Ratio 值 1.2 倍以上), 且黄芪汤组差异表达的 32 个蛋白点(与 6 周模型组相比, Ratio 值 1.2 倍以上), 进行质谱鉴定。通过生物信息学检索相关蛋白质功能, 分析出 28 个点(28/32)。10 个属于雷同点, 18 个有意义蛋白点(18/28), 其中 7 个与脂质代谢紊乱及过氧化损伤相关, 3 个与蛋白合成、加工和降解相关, 2 个与生物转化相关, 3 个与肝脏物质合成及能量代谢相关。

3.4 相关蛋白表达量的变化

3.4.1 Prdx6 与正常大鼠相比, Prdx6 蛋白在模型 2 周表达显著下调($P < 0.01$), 而在 4 周和 6 周表达显著上调($P < 0.01$); 与 6 周模型对照组相比, 黄芪汤组表达显著上调($P < 0.01$)。见图 3A。

3.4.2 Hsp70 与正常大鼠相比, Hsp70 蛋白在 2 周和 4 周表达显著上调(均 $P < 0.01$); 与 6 周模型组相比, 黄芪汤组表达显著上调($P < 0.01$)。见图 3A。

3.4.3 CAT 活性 与正常大鼠比较, 2 周模型大鼠肝组织 CAT 活性显著降低($P < 0.01$), 4 周模型大鼠肝组织 CAT 活性显著升高($P < 0.01$), 停止造模后, 大鼠肝组织 CAT 活性再次降低; 与 6 周模型对照组相比, 黄芪汤组大鼠肝组织 CAT 活性显著升高($P < 0.01$)。见图 3B。

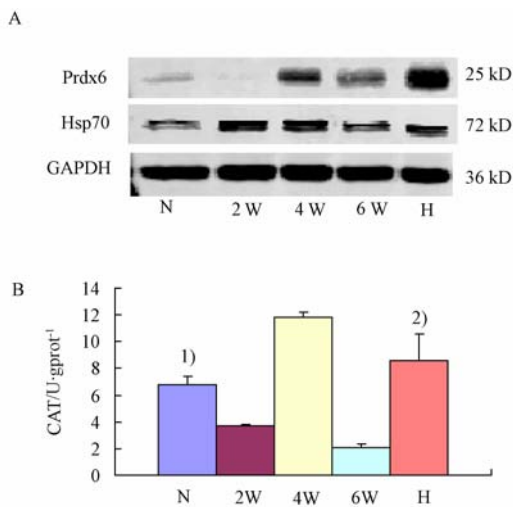


图 3 肝组织中三种蛋白表达量的变化

A. 不同组别大鼠 2 个蛋白点(Prdx6, Hsp70)的蛋白质印迹表达($n = 3$); B. 肝组织 CAT 活性的动态变化及黄芪汤对其影响($n = 3$); N. 6 周正常组; 2 W. 2 周模型组; 4 W. 4 周模型组; 6 W. 6 周模型组; H. 6 周黄芪汤组; 与各时间点模型组相比¹⁾ $P < 0.01$; 与 6 周模型组相比²⁾ $P < 0.01$

4 讨论

本次实验采用蛋白质组学技术, 筛选黄芪汤作

用的 32 个蛋白进行质谱鉴定, 分析黄芪汤调节 DMN 肝硬化大鼠模型的其差异蛋白表达变化及相关作用机制。研究发现, 在黄芪汤治疗组与同期模型对照组大鼠肝组织的 18 个有意义蛋白点中, 7 个与脂质代谢紊乱及过氧化损伤相关, 3 个与蛋白合成、加工和降解相关, 2 个与生物转化相关, 3 个与物质合成及能量代谢相关。提示脂质过氧化应激引起的肝组织损伤为 DMN 诱导大鼠肝纤维化形成的主要病理环节, 且 Prdx6、HSP70 蛋白及过氧化氢酶活性的验证结果基本一致。

Prdx6 是抗氧化蛋白超家族成员之一, 是具有谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和 Ca 非依赖性磷脂酶 A2 双重酶活性的蛋白。体外研究表明, 小鼠表皮细胞过表达 Prdx6 具有抵抗氧化应激损伤的作用^[5]; 肝脏细胞在角质细胞生长因子、肿瘤坏死因子、地塞米松和过氧化氢等刺激下会引发 Prdx6 表达的上调^[6]。本研究发现, Prdx6 在正常大鼠肝脏组织中有一定表达, 染毒 2 周, 其表达显著下调, 染毒 4 周时表达显著增加, 终止造模 2 周则有所下降, 而黄芪汤治疗组大鼠显著增加, 且高于用药前的 4 周模型组。

热应激蛋白(HSPs)是机体在各种应激状态下诱导合成增加的一组进化上高度保守的蛋白质。在生理状态下, 它们是细胞生存所必需, 在应激状态下它们可识别变性蛋白表面的疏水区域, 加速它们的重新折叠, 并防止不可逆的凝聚反应发生, 这种能力说明了热休克蛋白在细胞受到损伤时可有效地保护细胞^[7]。有研究表明, HSP70 的肝细胞保护作用与其提高内源性 SOD 活性, 保持细胞内钙平衡, 稳定细胞内的一些酶类, 减少细胞生物膜损伤有关^[8], 本研究结果显示, HSP70 在 2 周和 4 周表达明显上调, 终止造模 2 周则显著下降, 而黄芪汤治疗组显著高于同期模型对照组。

过氧化氢是一种重要的活性氧, 具有高度的氧化活性, 常常攻击细胞膜和线粒体膜, 与膜中的不饱和脂肪酸反应导致脂质过氧化。CAT 主要位于过氧化物酶体, 在肝脏、肾脏和红细胞中 CAT 的浓度非常高。机体主要是通过 CAT 迅速催化分解过氧化氢, 生成不活跃的氧和水, 从而清除体内多余的过氧化氢。本研究发现, 大鼠染毒后, CAT 活性动态变化趋势与 Prdx6 蛋白表达基本一致, 提示 DMN 大鼠肝纤维化形成过程中, 肝脏过氧化损伤与抗过氧化可能处于激烈相争的病理状态, 黄芪汤可以显著提高

CAT 活性,发挥降解过氧化氢的效应。

课题组前期研究结果表明,黄芪汤能非常显著地提高 DMN 肝纤维化大鼠肝组织总 SOD 活性^[9],本文研究结果进一步证实抗氧化应激效应是黄芪汤逆转大鼠肝硬化的主要机制之一,其益气扶正的效应主要在于提高机体内在的抗氧化能力。

[参考文献]

[1] Georgea J, Raob K R, Stern R, et al. Dimethylnitrosamine-induced liver injury in rats: the early deposition of collagen[J]. *Toxicology*, 2001,156(2/3): 129.

[2] 王磊,刘平,慕永平,等. 二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化中医方证研究[J]. *中医杂志*, 2006,47(12): 929.

[3] 王磊,刘平,慕永平,等. 清热利湿与益气古典方剂逆转二甲基亚硝胺大鼠肝硬化的细胞生物学基础研究[J]. *自然科学进展*, 2007, 17(8): 1026.

[4] Ala-Kokko L, Pihlajaniemi T, Myers J C, et al. Gene expression of type I, III and IV collagens in hepatic fibrosis induced by dimethylnitrosamine in the rats[J].

Biochem J, 1987, 244(1): 75.

[5] Kumin A, Huber C, Rulicke T, et al. Peroxiredoxin 6 is a potent cytoprotective enzyme in the epidermis[J]. *The American Journal of Pathology*, 2006, 169(4): 1194.

[6] Gallagher B M, Phelan S A Phelan. Investigating transcriptional regulation of Prdx6 in mouse liver cells [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2007, 42(8): 1270.

[7] Dzaman-Serafin S, Telatyńska-Mieszek B, Ciechanowski K. Heat shock proteins and their characteristics[J]. *Pol Merkur Lekarski*, 2005, 19(110):215.

[8] Yu SY, Chiu JH, Yang SD, et al. Preconditioned hyperbaric oxygenation protects the liver against ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *J Surgical Research*, 2005, 128(1): 28.

[9] 王磊,刘平,王春树,等. 不同功效古典方剂对肝硬化大鼠肝组织氧化应激反应的影响[J]. *中国中西医结合杂志*, 2008, 28(5): 435.

[责任编辑 聂淑琴]