

凉血化瘀方对肝衰竭大鼠细胞凋亡相关基因表达的调控作用

毕 蕾, 陈卫平*, 李卫娜, 赵凤鸣, 袁冬平, 曾 莉
(南京中医药大学, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的: 应用功能分类基因芯片分析凉血化瘀方对急性肝衰竭大鼠细胞凋亡相关基因表达的影响, 探讨其抗肝衰作用的分子机制。方法: 腹腔注射 GalN(500 mg·kg⁻¹) + LPS(4.8 μg·kg⁻¹), 造成大鼠急性肝功能衰竭, 应用美国 Super Array 公司大鼠细胞凋亡 Oligo 基因芯片检测模型组和治疗组基因的差异表达。结果: 模型组与正常组比较表达下调的基因有 37 条, 表达上调的基因有 10 条; 治疗组与模型组比较表达下调的基因有 16 条, 其中诱导细胞凋亡基因有 13 条, 表达上调的基因有 12 条, 其中抗细胞凋亡基因 7 条。结论: 凉血化瘀方能够调节细胞凋亡相关基因从而抑制肝细胞凋亡, 主要是通过下调凋亡诱导相关基因的表达, 同时也少量上调凋亡抑制基因的表达。

[关键词] 细胞凋亡; 基因芯片; 凉血化瘀方; 基因表达

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)02-0032-03

The Effect of the Cooling Blood to Remove Blood Stasis Formula on Regulation of the Cell Apoptosis Gene Expression of FHF Rats

Bi Lei, CHEN Wei-ping*, Li Wei-na, ZHAO Feng-ming, YUAN Dong-ping, ZENG Li
(Nanjing University of TCM, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of the cooling blood to remove blood stasis formula on gene expression profiles of cell apoptosis in FHF rats by gene chip technology, and discuss the molecular mechanism of the formula in counteracting FHF (fulminant hepatic failure). **Method:** Reproduce FHF rats models by D-GalN 500 mL·kg⁻¹ and LPS 4.8 μg·kg⁻¹ through intraperitoneal injection. Detect the differential expression between model group and drug treatment group by apoptosis gene chip (Oligo Apoptosis Microarray, Super Array Company). **Result:** There were 37 down-regulated genes and 10 up-regulated genes in the model group compared with the normal group; there were 16 down-regulated genes, among which there are 13 apoptosis-induced genes, and 12 up-regulated genes in the medicine group compared with the model group. **Conclusion:** The formula can inhibit hepatocyte apoptosis by regulating apoptosis-related genes through down-regulating apoptosis-induced gene and slightly up-regulating apoptosis-inhibited genes.

[Key words] apoptosis; gene chip; Cooling blood to remove blood stasis formula; gene expression

凉血化瘀方是在叶天士温病“凉血散血”基本治

法的基础上, 结合多年临床治疗经验和重型肝炎瘀热相搏的病理特点而确立的方药, 具有清热养阴, 凉血化瘀, 泻火解毒作用。方药通过正交设计优选最终由生地、大黄、赤芍组成。前期实验表明凉血化瘀方能够抑制急性肝衰竭肝细胞凋亡, 减轻肝损伤, 防治肝衰竭^[1-2], 本实验旨在通过基因芯片检测凉血化瘀方对凋亡基因表达调控的影响, 探讨凉血化瘀

[收稿日期] 2008-09-10

[基金项目] 国家中医药管理局中医药科技专项课题资助(04-05JP27)

[通讯作者] * 陈卫平, Tel: (025) 85811923; E-mail: wp2002123@163.com

方抗肝衰的分子机制。

1 实验材料

1.1 药物 凉血化瘀方由赤芍、生地、制大黄组成，配方比例为 1.5: 1.5: 1。药材经南京中医药大学中药鉴定教研室王春根教授鉴定，根据工艺要求进行醇提和水煎浓缩，实验前用蒸馏水配制成浓度为 0.333 g·mL⁻¹ 的稀释液。

1.2 动物 SD 健康大鼠 9 只，雄性，体重 150~ 170 g，由南京中医药大学实验动物中心提供，实验动物使用许可证号: SYXK(苏) 2002-0053。

1.3 试剂 D-氨基半乳糖 (GalN)、内毒素脂多糖 (LPS B5)，sigma 公司; TRIZOL[®] 试剂、TrueLabeling-AMP[™] 线性 RNA 扩增试剂盒、ArrayGrade cRNA 纯化试剂盒、大鼠 Oligo GEArray[®] 芯片 (Oligo Apoptosis Microarray Catalog No. ORN-012. 2)、GEAhyb 杂交液、化学发光检测试剂盒 (Catalog Number D-01)，美国 Super Array 公司; Biotin-16-dUTP (No. 1-093-070)，Roche 公司。

2 实验方法

2.1 动物造模和处理 将 SD 大鼠 9 只，随机分为正常组、模型组和治疗组 3 组，每组 3 只。模型组给予等量的蒸馏水，治疗组按 10 mL·kg⁻¹ (生药 3.33 g·kg⁻¹) 灌胃给药连续 7 d，每日 1 次，末次给药后 1 h，除正常组外，每组按 0.1 mL·10 g⁻¹ 腹腔注射 GalN (500 mg·kg⁻¹) + LPS (4.8 μg·kg⁻¹)，造成大鼠急性肝功能衰竭。于 6 h 后迅速留取大鼠相同部位右叶肝组织。

2.2 基因芯片检测

2.2.1 RNA 抽提与质量检测 每组 3 只大鼠分别取右叶肝组织共 100 mg，以组为单位将肝组织合并，然后采用 Trizol 试剂一步法提取总 RNA; 紫外吸收测定法检测 RNA 纯度，使用变性琼脂糖凝胶电泳检测其纯度及完整性。

2.2.2 cRNA 探针合成与纯化 将样品 RNA 进行逆转录反应合成 cDNA，在逆转录反应液中加入 RNA 扩增缓冲液，生物素标记的 UTP 和扩增酶类混合液，合成生物素标记的 cRNA 探针，然后使用 ArrayGrade cRNA 纯化试剂盒纯化 cRNA 探针。

2.2.3 芯片杂交 将纯化的 cRNA 探针在 GEAhyb 杂交液条件下与 Oligo Apoptosis Microarray 芯片杂交。

2.2.4 化学发光检测 探针与芯片杂交后，加链亲和素偶联的碱性磷酸酶 (AP) 及化学发光底物反应，

X 射线胶片曝光在胶片上显示检测结果。

2.2.5 图像采集和数据分析 X-射线胶片曝光后，将胶片上的图象用扫描仪扫描并转换为灰度 TIFF 格式的图片文件保存。运行 Scanalyze 软件，将灰度 TIFF 格式图片的点阵转化为数字型数据，将此原始数据储存为 Microsoft Excel 文件。使用芯片配套软件 GEArray Analyzer 对原始数据进行完整的芯片数据分析。

3 结果

3.1 总 RNA 抽提结果 抽提的 RNA 用分光光度计检测 A₂₆₀/A₂₈₀ 的比值范围均在 1.8 到 2.1; 凝胶电泳结果显示 28S 和 18S 核糖体 RNA 的条带清晰，说明 RNA 纯度已达到要求。见表 1。

表 1 RNA 质量检测

Table 1 Quality detection of RNA

样品	OD260	OD280	OD260/OD280	RNA 浓度 (μg·ul ⁻¹)
正常组	0.996	0.492	2.03	3.986
治疗组	0.849	0.412	2.06	3.395
模型组	0.776	0.373	2.08	3.106

3.2 基因芯片检测结果 在 112 条被检测的细胞凋亡关键基因中，模型组与正常组比较有 37 条基因表达下调至 50% 以下，有 10 条基因表达上调 2 倍以上; 治疗组与模型组比较有 12 条基因表达上调 2 倍以上，其中抑制细胞凋亡基因 7 条，16 条基因表达下调至 50% 以下，其中诱导细胞凋亡基因 13 条。见图 1 和表 2~ 3。

表 2 治疗组与模型组比较上调 2 倍基因

Table 2 2 times up-regulated genes in the rats of the treatment group than in the model group

GeneBank	Symbol	模型组标准值	治疗组标准值	治疗组标/模型组标
BQ202444	Bag1	5.9996E-4	2.0247E-3	3.3747E+0
NM_016993	Bcl2	2.0624E-4	3.1392E-3	1.5222E+1
NM_031535	Bcl2l1	4.1247E-4	2.5820E-3	6.2597E+0
XM_226742	Birc1b	2.2498E-4	3.3807E-3	1.5026E+1
NM_022231	Birc4	1.4249E-3	4.0494E-3	2.8419E+0
XM_344419	Blk	6.3746E-4	3.1764E-3	4.9829E+0
XM_217191	Bnip2	1.8749E-3	5.8326E-3	3.1110E+0
NM_022260	Casp7	1.3124E-4	3.2692E-3	2.4910E+1
NM_053401	Ngfrap1	1.4512E-1	3.3391E-1	2.3010E+0
NM_017141	Polb	4.4828E-2	1.6474E-1	3.6750E+0
XM_342992	Tp73	2.4373E-4	9.2691E-3	3.8030E+1
NM_181084	Trp53inp1	5.9246E-3	1.3987E-2	2.3609E+0

表 3 治疗组与模型组比较下调至 50% 以下基因

Table 3 2 times down-regulated genes in the rats of the treatment group than in the model group

GeneBank	Symbol	模型组标准值	治疗组标准值	治疗组标/模型组标
NM_023979	Apaf1	3.4441E-2	1.0829E-2	3.1443E-1
NM_021752	Api2	1.4287E-2	3.3807E-3	2.3664E-1
NM_057130	Bid3	8.0057E-3	3.9565E-3	4.9421E-1
NM_023987	Birc3	4.0160E-2	1.3783E-2	3.4320E-1
XM_226804	Card6	2.8067E-2	4.3280E-3	1.5420E-1
NM_130422	Casp12	5.5702E-2	1.5752E-2	2.8279E-1
XM_225138	Dapk1	2.2498E-3	4.4581E-4	1.9815E-1
NM_145788	Tank	2.7692E-2	8.4332E-3	3.0454E-1
NM_181086	Tnfrsf12a	1.9311E-3	3.5293E-4	1.8276E-1
NM_139194	Tnfrsf6	5.2684E-3	2.0990E-3	3.9842E-1
XM_236794	Tnfrsf14	3.8435E-3	1.1517E-3	2.9964E-1
XM_231032	Traf2	6.3933E-3	2.5634E-3	4.0095E-1
XM_343113	Traf3	6.8620E-3	2.3776E-3	3.4649E-1
XM_220640	Traf4	1.4568E-2	1.7275E-3	1.1858E-1
XM_345981	Traip	5.3246E-3	1.3374E-3	2.5118E-1
XM_223012	Trp53bp2	4.4622E-3	1.9690E-3	4.4126E-1

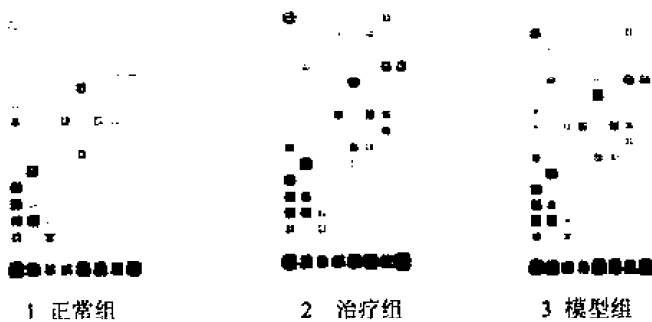


图 1 Oligo Apoptosis Microarray 扫描图

4 讨论

肝细胞凋亡与肝炎尤其是暴发性肝衰竭(FIF)关系十分密切,是其主要的病理改变,与疾病的发生、发展和预后密切相关^[3-5],抑制细胞凋亡可能成为防治急性肝衰竭的一条重要途径。D-氨基半乳糖/内毒素所致大鼠急性肝衰竭是国内外学者普遍认可和使用的实验动物模型,与临床急性肝功能衰竭发生机制相似,其微循环障碍的病理变化符合中医的血瘀证辩证,同时以细胞凋亡为重要病理改变也是研究急性肝衰竭肝细胞凋亡机制与治疗的较理想模型^[6-7]。细胞凋亡涉及一系列基因的激活、表达以及调控等作用。细胞凋亡的机制复杂,涉及的基因繁多,目前主要分为促细胞凋亡基因、抑制细胞凋亡基因和在细胞凋亡过程中协助的基因。

美国 SuperArray 公司细胞凋亡基因芯片可用于研究细胞凋亡过程 112 个关键基因的特异表达。这些基因可以根据结构和功能特点划分为 12 个类别,包括:TNF 配体家族、TNF 受体家族、bcl-2 家族、

Caspase 家族、JAP 家族、TRAF 家族、CARD 家族、死亡结构域基因家族成员、致死效应结构域基因家族成员、CIDE 结构域家族成员,以及 P53 和 ATM 通路的基因。我们通过检测发现:治疗组与模型组比较表达下调至 50% 以下的诱导细胞凋亡的基因有 13 条;表达上调的基因有 12 条中具有抑制细胞凋亡的基因有 7 条,其中 Bcl2、Bcl2l1、Birc1b、Birc4、Bnip2、Polb 6 条凋亡抑制基因在模型组与正常组比较表达下调至 50% 以下,而治疗组比模型组上调 2 倍。表明凉血化瘀方可通过下调凋亡诱导相关基因和上调凋亡抑制基因的表达进行调控,起到抑制细胞凋亡的作用。提示凉血化瘀方能够通过多种途径调节细胞凋亡基因,从而抑制肝细胞过度凋亡,防治肝细胞大量死亡导致的肝衰竭。

肝细胞凋亡是一个多基因调控的复杂过程,各基因在调节细胞凋亡的过程中通过不同的信号传导通路相互影响,共同调节凋亡的实施。模型组与正常组比较有大量凋亡抑制基因下调,同时也有少量凋亡诱导基因上调,可能与启动了自身免疫机制有关。而治疗组与模型组比较,表达下调基因中有 3 条凋亡抑制基因,而表达上调的基因中有 5 条凋亡诱导相关基因。由于细胞凋亡基因调控机制的复杂性,以及中药复方多成分多靶点的作用特点,目前对其调控机制只是初步认识,有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 陈卫平,汪悦,丁斐,等.凉血化瘀方抗肝细胞凋亡效应及对半胱天冬酶-3 mRNA 表达的影响[J].中国中医药信息杂志,2004,11(4):300-302.
- [2] 陈卫平,王陆军,丁斐,等.凉血化瘀方对内毒素所致肝细胞凋亡的干预作用[J].中国中西医结合消化杂志,2003,11(5):284-286.
- [3] Jaeschke H, Gujral JS, Bajt ML. Apoptosis and necrosis in liver disease[J]. Liver Int, 2004, 24: 85-89.
- [4] Patel T, Gregory JG. Apoptosis and hepatobiliary disease[J]. Hepatology, 1995, 21(6):1725-1741.
- [5] 王融冰,周桂琴,江宇泳,等.799 例重型肝炎患者的临床病原学与实验室分析[J].中华肝病杂志,2006,14(9):655-657.
- [6] 车德才,李水仙.D-氨基半乳糖/内毒素所致急性肝衰竭模型研究进展[J].长治医学院学报,2006,20(3):235-237.
- [7] 刘克辛.肝疾患基础及其实验动物模型[M].北京:中国医药科技出版社,2003:41.