

三黄茵赤汤通过调节 HMGB1 信号通路防治急性小鼠肝损伤

吴家扬, 全景羽, 周燕鑫, 陈伊梦, 刁建新*

(南方医科大学 中医药学院, 广州 510515)

[摘要] **目的:**探究三黄茵赤汤通过调控高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)信号通路对四氯化碳(CCl₄)致小鼠急性肝损伤的防治作用及机制。**方法:**随机将 48 只 KM 小鼠分为正常组,模型组,三黄茵赤汤低、中、高剂量组及促肝细胞生长素组,建立四氯化碳(CCl₄)诱导小鼠急性肝损伤模型。三黄茵赤汤低、中、高剂量组分别以剂量为 16,32,48 g·kg⁻¹·d⁻¹ 的药物灌胃,促肝细胞生长素组给予促肝细胞生长素 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 腹腔注射。小鼠肝组织切片病理学变化用苏木精-伊红(HE)染色观察;相关酶试剂盒测定小鼠血清中肝功能指标-丙氨酸氨基转移酶(AST)和天冬氨酸氨基转移酶(ALT)的活性;酶联免疫吸附测定(ELISA)测定小鼠血清中白细胞介素 6(IL-6)的表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠组织中 HMGB1,天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3),凋亡相关分子 B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2 相关 x 蛋白(Bax)和 Toll 样受体 4(TLR4)的蛋白表达情况。**结果:**与正常组比较,模型组明显升高血清中 AST,ALT($P < 0.05$)和 IL-6 的水平($P < 0.05$)以及增加肝组织中 HMGB1,TLR4 和 Caspase-3 表达($P < 0.05$)并下调 Bcl-2/Bax($P < 0.05$);与模型组比较,三黄茵赤汤各剂量组均能有效减轻小鼠肝脏的病理损害,降低血清中 AST,ALT 水平和降低 IL-6 的表达($P < 0.05$),不同程度降低降低肝组织匀浆中 HMGB1,TLR4 和 Caspase-3 蛋白的表达($P < 0.05$),并提高 Bcl-2/Bax($P < 0.05$),呈剂量依赖性。**结论:**三黄茵赤汤可能通过调控 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路,减轻细胞炎症反应,抑制细胞凋亡达到防治小鼠急性肝损伤的作用, HMGB1 可能成为防治急性肝损伤的新靶点。

[关键词] 急性肝损伤;三黄茵赤汤;高迁移率族蛋白 B1(HMGB1);凋亡;茵陈蒿汤

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)06-0058-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.20190603

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181204.1054.012.html>

[网络出版时间] 2018-12-05 14:30

Effect of Sanhuang Yinchi Decoction in Preventing Acute Liver Injury by HMGB1 Signaling Pathway

WU Jia-yang, QUAN Jing-yu, ZHOU Yan-xin, CHEN Yi-meng, DIAO Jian-xin*

(School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of Sanhuang Yinchi decoction (SHYCD) in preventing carbon tetrachloride (CCl₄)-induced acute liver injury by regulating high mobility group box1 (HMGB1) signaling pathway. **Method:** A total of 48 KM mice were randomly divided into blank control group, model group, low, middle and high-dose SHYCD groups and positive control group. The model of acute liver injury induced by CCl₄ in mice was established. The low, middle and high-dose SHYCD groups were intragastrically administered with drugs (16, 32, 48 g·kg⁻¹·d⁻¹) respectively, and the positive control group was given cell growth stimulating hormone (20 mg·kg⁻¹·d⁻¹) through intraperitoneal injection. Pathological changes of mouse liver tissue sections were observed by hematoxylin-eosin staining (HE); relevant enzyme kits were used to determine liver function indexes in mice serum-alanine aminotransferase (AST) and aspartate aminotransferase (ALT); the expression level of interleukin-6 (IL-6) in mouse serum was determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); Western blot was used to detect the expressions of high mobility group box-1

[收稿日期] 20180822(012)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金项目(81603606);广东省中医药局项目(20171169);2016年广东省大学生创新创业项目

[第一作者] 吴家扬,从事中药制药研究,E-mail:1003940937@qq.com

[通信作者] *刁建新,硕士,实验师,从事中西医结合肝病研究,Tel:020-62789397,E-mail:393685483@qq.com

(HMGB1), cysteine aspartic acid protease (Caspase-3), apoptosis-related molecules B cell lymphoma (Bcl-2), Bcl-2 associated x protein (Bax), and Toll-like receptor 4 (TLR4). **Result:** Compared with the normal group, the model group significantly increased serum AST, ALT ($P < 0.05$) and IL-6 levels ($P < 0.05$) and expressions of HMGB1, TLR4 and Caspase-3 ($P < 0.05$), and down-regulated Bcl-2/Bax ratio ($P < 0.05$) in liver tissue; compared with the model group, SHYCD can effectively alleviate the pathological damage of liver in mice, reduce serum AST and ALT levels and expressions of IL-6, HMGB1, TLR4 and Caspase-3 protein in liver homogenate ($P < 0.05$), and increased the ratio of Bcl-2/Bax ($P < 0.05$) in a dose-dependent manner. **Conclusion:** SHYCD can prevent liver injury by regulating HMGB1/TLR4/NF- κ B signaling pathway, reducing cellular inflammatory response and inhibiting apoptosis, so as to prevent acute liver injury in mice. This indicates that HMGB1 may become a new target to prevent acute liver injury.

[**Key words**] acute liver injury; Sanhuang Yinchi decoction; high mobility group box1 (HMGB1); apoptosis; Yinchenhao Tang

急性肝损伤是肝脏损害程度超过其代偿能力而导致的病变结果,其临床表现为肝组织坏死,胆汁淤积、肝脏纤维化以及功能衰竭,其致病因素众多,主要有中毒、滥用药物、服用食物添加剂、摄入过量乙醇等,致使其已成为临床常见病^[1]。释放至胞外的高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)是一种重要的致炎细胞因子,已被证实多个器官或组织中,包括肝脏、心脏、大脑、胰腺、骨骼、肾脏中诱导炎症的发生^[2], HMGB1 拮抗剂在临床前炎症模型中具有保护作用^[3]。近年来,国内外学者将 HMGB1 视为一种新的抗炎靶标^[4]。HMGB1 能够通过结合细胞膜上的炎症受体-晚期糖基化终产物(RAGE)和 Toll 样受体(TLRs)来介导、启动炎症反应,共同激活核转录因子(NF)- κ B 及下游炎症因子级联反应^[5-6]。

三黄茵赤汤由《伤寒论》中的茵陈蒿汤化裁而来的,是南方医科大学杨运高教授在中医临床治疗肝炎、肝硬化实践中的有效经验方^[7],由茵陈蒿汤减去栀子加上姜黄、黄芪、赤芍 3 味药组成。前期研究已对三黄茵赤汤的临床疗效进行了初步验证,证实三黄茵赤汤可以改善肝功能,对急性肝损伤有一定的防治作用,机制可能与半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)表达,脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶 1(APE1)/氧化还原因子-1(Ref-1)信号通路激活,p53 上调等有关^[8-9]。本文以四氯化碳(CCl_4)建立急性肝损伤模型侧重探讨 HMGB1-TLR4 轴在三黄茵赤汤作用下的肝保护作用,进一步明确三黄茵赤汤预防和治疗急性肝损伤的新机制、新靶点。

1 材料

1.1 动物 48 只雄性 SPF 级 KM 种小鼠,体质量 25 ~ 30 g,由南方医科大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(粤)2016-0041,动物委员会编号

2012-056,所有动物实验研究均符合南方医科大学动物伦理委员会的批准。

1.2 药物及试剂 方剂中的药材于南方医院中药房购买,来源得到保证,按方比例取大黄、姜黄各 15 g,黄芪、茵陈蒿、赤芍各 30 g。所有药材均由南方医科大学鉴定均为正品,三黄茵赤汤各剂量组的制备参考文献[8],为临床制备汤剂传统方法:将各中药材置于中药煲中,加约中药质量 8 倍的水量浸泡 30 min,用武火煮沸,后用文火煎煮 40 min,如此连续 2 次,用纱布过滤去渣,滤液合并,最后 60 $^{\circ}\text{C}$ 加热浓缩配成含中药生药量 0.8 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的低剂量浓度,含中药生药量 1.6 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的中剂量组以及含中药生药量 2.4 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的高剂量组的药液,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。促肝细胞生长素(一品红药业股份有限公司,批号 15030104);丙氨酸氨基转移酶(AST)和天门冬氨酸转移酶(ALT)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20160817, 20160818);Pierce BCA 蛋白定量分析试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 SL260210);TLR4 抗体,Caspase-3 抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 1, 6);HMGB1 抗体(美国 Epitomics 公司,批号 YH081809); β -肌动蛋白(β -actin)鼠多克隆抗体(碧云天生物技术研究所,批号 AA128-1);抗兔免疫球蛋白(Ig)G 抗体和抗鼠 IgG 抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 109525, 120646);黄色氧化汞(广州化学试剂厂,批号 800408);曙红 Y(广东光华化学厂有限公司,批号 20120728);苏木素精和伊红染液(北京索莱宝科技有限公司,批号 20170923);十二水合硫酸铝钾,冰乙酸(广东光华科技股份有限公司,批号分别为 20110521, 20070903); CCl_4 (天津富宇精细化工有限公司)。

1.3 仪器 RM2135 型石蜡切片机(德国莱卡公司), Eclipse Ti-S 型荧光倒置显微镜及分析软件(日本尼康公司), HK08B 型流水式中药粉碎机(广州市旭朗机械设备有限公司), Multiskan GO 型全波段酶标仪(美国 Thermo 公司), Mini Chemi 610 型化学发光成像仪(北京赛智创业科技有限公司), CHB-100 型恒温金属浴(杭州博日科技公司), Mini-Protean Tetra 型电泳仪、转膜仪(美国 Bio-Rad 公司), BG-Power 600 型电泳仪电源(北京百晶生物技术有限公司), Allegra 64R 型离心机(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 造模、分组与给药 将 48 只 KM 小鼠随机分为正常组, 模型组, 三黄茵赤汤高、中、低剂量组和促肝细胞生长素组, 每组 8 只。造模方法参考文献[8], 适应性饲养 3 d 后, 三黄茵赤汤高、中、低剂量组分别按 48, 32, 16 g·kg⁻¹·d⁻¹ 方法灌胃给药(给药剂量参考前期急毒实验^[10]), 促肝细胞生长素组按剂量 20 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 给药干预 1 周, 同时, 模型组、正常组分别给予灌胃同体积的 9% 生理盐水。造模前 12 h 禁食, 可自由饮水。第 8 天, 除正常组腹腔注射同体积的橄榄油外, 其余 5 组小鼠腹腔注射 0.4 mL 体积的 0.15% CCl₄ 橄榄油溶液以建立急性肝损伤模型。

2.2 苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织切片病理学 小鼠经颈椎脱臼处死后剪取肝脏, 肉眼观察小鼠肝脏的色泽、形状等情况。剪取小鼠新鲜肝大叶部分组织, 使用 10% 甲醛溶液固定 24 h, 自来水冲洗干净后, 修剪边缘并做标记。对肝组织进行如下处理, 梯度乙醇脱水(具体步骤为 75%, 85% 乙醇各 3 h, 95% 乙醇过夜处理, 100% 乙醇 1.5 h × 2), 然后二甲苯浸透组织, 在 70 °C 条件下熔蜡渗透肝组织。接着将装好的组织放在石蜡包埋机上进行石蜡包埋, 并于切片机切厚度为 4 μm 的组织切片。切片于温水中伸展, 65 °C 摊片, 并烤片 1 h。肝组织切片放入二甲苯 10 min × 2 进行脱蜡处理。再按 100%, 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 梯度乙醇次序依次脱水 5 min, 然后流水冲洗 5 min。HE 染料染色 5 min, 经纯净水, 1% 盐酸乙醇浸泡各 30 s, 自来水返蓝 10 min。最后用中性树脂封片。每份小鼠肝组织制作 2 张切片用于染色, 在 200 倍显微镜下选取 5 个视野进行观察, 拍照。

2.3 血清中生化指标和细胞因子的测定 严格执行和遵守试剂盒说明书步骤和注意事项, 测定小鼠

血清中 ALT, AST 和 IL-6 水平。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定组织中 HMGB1, Caspase-3, Bcl-2, Bax 和 TLR4 蛋白表达水平 各组组织经液氮粉碎、酶裂解并离心后, BCA 测定组织蛋白含量并计算各组蛋白上样量。采用 12% 的分离胶, 4% 浓缩胶进行电泳, 然后转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 切膜, 各自加入一定倍数稀释后的一抗 HMGB1 (1:100), TLR4 (1:1000), Caspase-3 (1:1000), Bcl-2 (1:100), Bax (1:100), 并放置 4 °C 冰箱摇床孵育过夜。第 2 天回收一抗液, 室温后用 TBST 溶液洗涤膜 3 次, 5 min/次。加入 1:1000 稀释后的兔二抗和 1:800 稀释后的鼠二抗, 于室温孵育 1.5 h, 用 TBST 洗涤膜 3 次, 每次 5 min, 用曝光液显影, 成像系统曝光, 获取图像。应用图像工作站分析各组蛋白的表达。

2.5 统计学方法 实验数据使用 SPSS 19.0 统计分析软件分析处理, 结果以均值 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间数据采用单因素方差分析比较, 以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

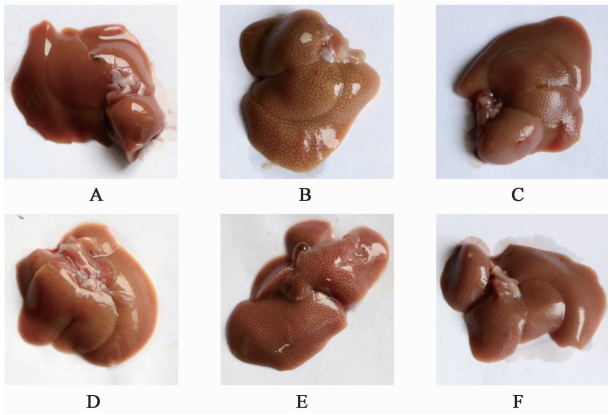
3.1 小鼠的一般状态 适应性饲养期间, 小鼠能正常活动, 正常饮食, 皮毛有光泽。CCl₄ 造模后, 模型组运动量减少、伴随身体蜷缩现象。给药组中促肝细胞生长素组, 三黄茵赤汤高、中、低剂量组活动状态有减少趋势。

3.2 对肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响

3.2.1 肉眼观察肝脏组织变化 正常组小鼠的肝脏色彩显红色, 肝表面光泽发亮, 无明显突起或斑点, 手按压触感柔润有弹性; 模型组小鼠肝脏体积较正常组肿大, 色泽暗红, 隐约可见微黄色, 点状黄褐色斑点较为均匀分布在肝脏表面, 质较脆; 三黄茵赤汤高剂量组和促肝细胞生长素组肝脏色泽与正常组一致, 无黄褐色点状散布, 质地尚柔软; 低剂量组小鼠肝脏色泽暗无光, 质韧。见图 1。

3.2.2 HE 染色观察肝脏组织病理变化 模型组小鼠明显可见肝中央静脉周围细胞普遍空泡样变, 肝索难以分辨, 能见大范围核质浓缩, 细胞排列不规整, 可见炎细胞浸润。与模型组比较, 三黄茵赤汤高、中、低剂量组静脉区结构破坏程度、空泡样变范围有减轻的趋势, 呈剂量依赖性, 以三黄茵赤汤高剂量组效果最佳, 这与肉眼观看组织结果一致。见图 2。

3.3 对肝损伤小鼠血清 AST, ALT 水平的影响 与正常组比较, 模型组小鼠血清中 AST, ALT 水平均显著升高 ($P < 0.05$), 结果表明, 小鼠肝损伤明显, 模



A. 正常组; B. 模型组; C. 三黄茵赤汤高剂量组; D. 三黄茵赤汤中剂量组; E. 三黄茵赤汤低剂量组; F. 促肝细胞生长素组

图 1 三黄茵赤汤对肝损伤小鼠肝脏组织的影响

Fig. 1 Effect of Sanhuang Yinchi decoction (SHYCD) on liver tissue liver injury in mice

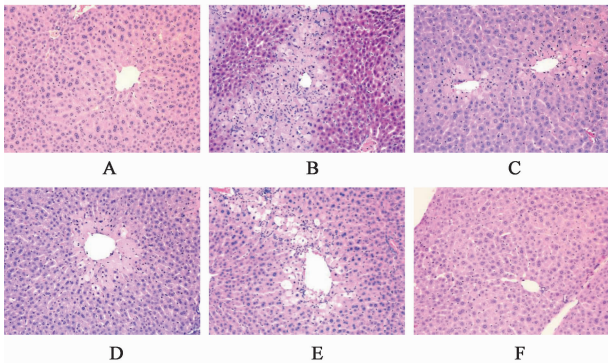


图 2 三黄茵赤汤对肝损伤小鼠肝脏组织病理变化的影响(HE, ×100)

Fig. 2 Effect of SHYCD on liver tissue pathology of liver injury in mice(HE, ×100)

型建立成功,符合病理情况。与模型组比较,三黄茵赤汤低、中、高剂量组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平均下降,呈剂量依赖性,高剂量组作用最好 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 三黄茵赤汤对 CCl₄ 诱导急性肝损伤小鼠血清 ALT, AST 影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of SHYCD on serum ALT and AST in mice with acute liver injury induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s, n = 8$) U·L⁻¹

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	ALT	AST
正常	-	23.22 ± 6.66	11.96 ± 5.58
模型	-	316.50 ± 24.68 ¹⁾	87.38 ± 6.92 ¹⁾
三黄茵赤汤	16	305.50 ± 10.23	76.93 ± 16.34
	32	300.40 ± 15.12	70.78 ± 18.18
	48	287.90 ± 52.83 ²⁾	75.17 ± 12.45 ²⁾
促肝细胞生长素	0.02	246.50 ± 46.54 ²⁾	49.17 ± 20.93 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2, 3 同)。

3.4 对肝损伤小鼠血清 IL-6 表达水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清中 IL-6 水平明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,三黄茵赤汤低、中、高剂量组小鼠血清中 IL-6 水平均有所下降,其中高剂量组与模型组有明显差异 ($P < 0.05$)。效果呈剂量依赖性。见表 2。

表 2 三黄茵赤汤对 CCl₄ 诱导急性肝损伤小鼠血清中 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of SHYCD on serum IL-6 levels in mice with acute liver injury induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹
正常	-	29.18 ± 17.20
模型	-	116.79 ± 18.86 ¹⁾
三黄茵赤汤	16	76.90 ± 25.21
	32	45.26 ± 7.04 ²⁾
	48	37.81 ± 21.15 ²⁾
促肝细胞生长素	0.02	40.19 ± 6.85 ²⁾

3.5 对肝损伤小鼠肝组织 HMGB1, Caspase-3, Bcl-2, Bax 和 TLR4 蛋白表达水平 模型组小鼠肝组织中 HMGB1, Caspase-3 和 TLR4 蛋白的表达水平明显高于正常组, Bcl-2/Bax 值明显低于正常组,具有显著性差异 ($P < 0.05$);与模型组比较,三黄茵赤汤高、中、低剂量组均可不同程度下调 HMGB1, TLR4, Caspase-3 蛋白的表达,且呈现一定的剂量依赖性,以高剂量组效果最好 ($P < 0.05$)。见图 3, 表 3。

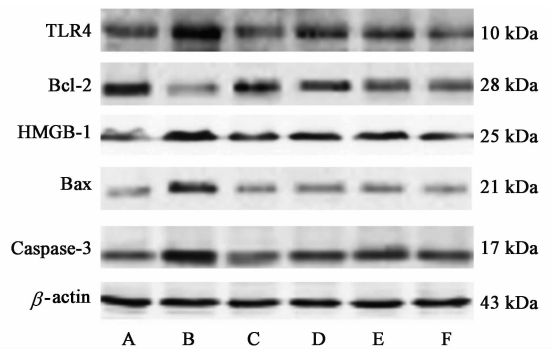


图 3 小鼠肝组织中 HMGB1, Bcl-2, Bax, Caspase-3, TLR4 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of expression of HMGB1, Bcl-2, Bax, Caspase-3 and TLR4 in mice liver tissue

4 讨论

三黄茵赤汤防治急性肝损伤的方剂诠释及初步疗效。三黄茵赤汤方由《伤寒论》中的茵陈蒿汤化裁而来的,是南方医科大学杨运高教授用于治疗临

表 3 三黄茵赤汤对 CCl₄ 诱导急性肝损伤小鼠肝组织中 HMGB1, Bcl-2/Bax, Caspase-3, TLR4 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of SHYCD on expression of HMGB1, Bcl-2/Bax, Caspase-3 and TLR4 in mice with acute liver injury induced by CCl₄ ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Caspase-3/ β -actin	TLR4/ β -actin	HMGB1/ β -actin	Bcl-2/Bax
正常	-	39.45 ± 0.95	62.72 ± 2.12	40.43 ± 0.84	4.25 ± 0.22
模型	-	132.00 ± 3.07 ¹⁾	198.34 ± 1.98 ¹⁾	183.63 ± 3.75 ¹⁾	0.27 ± 0.01 ¹⁾
三黄茵赤汤	16	68.05 ± 2.09 ²⁾	67.03 ± 1.51 ²⁾	79.34 ± 1.00 ²⁾	1.67 ± 0.01 ²⁾
	32	60.72 ± 2.11 ²⁾	70.93 ± 0.62 ²⁾	72.52 ± 1.15 ²⁾	1.73 ± 0.01 ²⁾
	48	50.13 ± 1.28 ²⁾	56.82 ± 1.38 ²⁾	61.26 ± 0.75 ²⁾	2.79 ± 0.09 ²⁾
促肝细胞生长素	0.02	61.19 ± 2.36	54.95 ± 1.23	62.75 ± 0.69	1.66 ± 0.56 ²⁾

床肝损伤的有效经验方,由大黄、赤芍、茵陈、黄芪和姜 5 味中药组成。方中以茵陈蒿为君药,功效清热利湿,利胆退黄,为治疗黄疸之要药^[11];配伍大黄功效利湿退黄、泻热通便、解毒消痈^[12];赤芍味苦性微寒,清热凉血,活血祛瘀,能助茵陈清热退黄之功^[13];黄芪性温味甘,既能补气固表,托毒排脓,又能利尿,引湿热从小便而去^[14];姜黄性温味辛苦,功效活血痛经,行气化瘀止痛^[15]。诸药合用,既能补气固表,又能清热利湿,解毒消痈,共奏泻热逐瘀、补益正气之功。课题组前期已运用色谱法鉴定出按传统方法制备的三黄茵赤汤中的有效成分,其中含有五倍子酸、咖啡鞣酸、芍药苷、毛蕊异黄酮、大黄素、姜黄素、大黄酸^[8]。其中芍药苷能够通过降低组织中丙二醛、活性氧等氧化物的量和增加谷胱甘肽的量而避免肝氧化损伤^[16],其作用机制可能与 HMGB1/TLR4 有关,有研究表明,白芍总苷通过下调 HMGB1/TLR4 信号通路影响炎症的发展^[17];大黄素由于能够抑制与肝纤维密切相关的转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 和结缔组织生长因子 (CTGF) 的活性,可以减轻肝组织纤维化程度,减轻肝脏炎症反应,改善肝功能;大黄酸可以抑制细胞凋亡保护肝脏,可能的机制是上调 Bcl-2 的表达和抑制 Bax 表达,此外,大黄酸还可通过影响 TLR5/核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路而发挥抗炎作用^[18],大黄蒽醌类化合物可通过 MAPK, NF- κ B 和 PI3K 等途径发挥抗炎作用^[19];姜黄素可以抑制细胞肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 干扰素- γ (IFN- γ), IL-4, HMGB1, TLR4 等的分泌和表达来发挥抗炎作用,另外姜黄素还具有清除过量的自由基,减轻肝细胞膜脂质过氧化作用的功效,使肝脏免于受损^[20]。AST, ALT 作为肝功能的评价指标,常用于判断肝细胞的损伤程度,正常情况下,由于膜选择性通透的限制,AST, ALT 在血清中的检测水平很低,膜的通透

性变化或结构发生损伤破坏时,可导致血清中 AST, ALT 的含量的升高^[21]。促肝细胞生长素是小分子多肽类活性物质,临床上常用于治疗急性、慢性重症肝炎的早期或中期,具有促进肝细胞 DNA 合成、线粒体恢复,降低转氨酶的生理功能,对肝细胞损伤有较好的保护作用。实验结果显示,与模型组比较,三黄茵赤汤降低血清中 ALT, AST 的表达水平,且呈剂量依赖性,以高剂量组效果效果最好。

HMGB1 在肝损伤中诱导炎症反应的机制及三黄茵赤汤的干预作用。在细胞中, HMGB1 是一种结构蛋白,可广泛调控多种生命活动;同时,它还作为内源性的危险信号,主要介导炎症反应的发生^[6]。研究表明, HMGB1 单独不足以引发炎症反应,但一旦释放到细胞外环境中, HMGB1 就可以与包括 RAGE, TLR2, TLR4 等细胞表面受体结合,形成免疫刺激复合物,转导细胞内信号并介导细胞反应,包括趋化性细胞运动和促炎细胞因子(如 TNF 和 IL-1) 释放至体外,增强免疫反应的能力,引起发热、上皮屏障功能障碍和体内急性炎症^[3, 22-24]。结果显示,急性肝损伤小鼠肝脏中的 HMGB1 水平显著升高,同时,伴随着 TLR4 也显著升高,因此,急性肝损伤的过程中 HMGB1 被激活,促进炎症因子释放,促进肝损伤。HMGB1 在体内的释放途径主要有 2 个,既可以从免疫细胞中主动释放,也可以被动地从坏死细胞或受损细胞中释放出来,这两种途径都可产生大量的细胞 HMGB1。当 HMGB1 被分泌到胞外时,能够与细胞膜表面受体 RAGE 和 Toll 样受体等蛋白结合,其中 HMGB1/RAGE 复合物通过 JAK/ATAT 通路^[25], HMGB1/TLRs 复合物通过与髓样分化因子-88 (MyD88) 和 TIR 衔接蛋白 (TIRAP, 也称 MAL) 的作用,导致细胞信号转导和各种体内信号级联的激活^[22, 26]。该信号传导的下游作用是 NF- κ B 和丝

裂原活化蛋白激酶 (MAPKs) 被激活, 从而产生大量细胞因子和其他炎症分子, 如肿瘤坏死因子 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 等, 促炎因子又可正反馈活化 NF- κ B, 如此循环反复, 产生级联效应, 使炎症不断被放大, 产生“瀑布效应”^[27]。结果显示, 与模型组对比, 三黄茵赤汤减少 IL-6 的含量, 降低 HMGB1, TLR4 的表达, 且呈剂量依赖性, 以高剂量组效果最好, 因此, 三黄茵赤汤可能是由于抑制了 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号轴、阻断级联反应来发挥抗肝损伤的作用。

抑制小鼠肝细胞的炎症爆发, 降低肝细胞的凋亡。急性肝损伤常常诱发炎症因子爆发, 进一步导致细胞凋亡, 因此, 阻断炎症因子产生“瀑布效应”, 可以减少细胞凋亡。HMGB1 是激活炎症反应的重要介质, 在巨噬细胞和单核细胞的活化中起重要作用, 并能够引发炎症免疫应答反应^[28]。抑制 HMGB1 激活炎症, 可以减少细胞凋亡。凋亡相关因子 Bcl-2 和 Bax 在线粒体凋亡途径中的调控作用举足轻重。细胞色素 C 能从线粒体中释放促进细胞凋亡, 而 Bcl-2 恰能阻止其释放达到抑制凋亡作用; Bax 却可与线粒体上的膜通道结合蛋白结合促进其释放而加速细胞凋亡。从线粒体膜间隙释放出来的细胞色素 C 能够立即与胞浆中凋亡酶活化因子 1 (APAF-1) 及 Caspase-9 前体分子结合形成凋亡激活复合体, 引起 Caspase-9 的激活, 进而激活 Caspase-3^[29-30]。Caspase-3 作为 Caspase 家族成员中控制细胞凋亡的中枢效应器, 是细胞凋亡途径中最下游分子, 并扮演最后的执行者, 能够降解 ADP 核糖多聚合成酶, 阻滞 DNA 的修复和破坏细胞核结构, 致使细胞发生不可逆凋亡^[31]。结果表明, 与模型组比较, 三黄茵赤汤各剂量组均能提高 Bcl-2/Bax 值, 降低小鼠肝组织 Caspase-3 的表达, 且呈剂量依赖性, 以高剂量组效果最好, 三黄茵赤汤可能是由于 HMGB1 水平被下调, 抑制肝细胞炎症的爆发, 从而减少肝细胞凋亡。

总之, 三黄茵赤汤在预防和治疗急性肝损伤方面具有一定作用, 并存在剂量依赖性, 可能是由于抑制了 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号轴、从而阻断炎症级联反应, 减少肝细胞凋亡的原因, 最终发挥防治肝损伤的作用。HMGB1 可能成为预防和治疗急性肝损伤的新靶点, 为开展临床治疗提供重要的实验依据。

[参考文献]

[1] 吕晓梅, 马丽杰. 中药治疗急性肝损伤的研究进展

[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(2): 170-174.

[2] Klune J R, Dhupar R, Cardinal J, et al. HMGB1: endogenous danger signaling[J]. Mol Med, 2008, 14(7/8): 476-484.

[3] YANG H, Tracey K J. Targeting HMGB1 in inflammation [J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1799 (1/2): 149-156.

[4] 张扬. 清肝方对 D-GalN 诱导急性肝衰竭大鼠肝损伤及肝再生的影响及机制研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.

[5] Hreggvidsdottir H S, Lundberg A M, Aveberger A C, et al. High mobility group box protein 1 (HMGB1)-partner molecule complexes enhance cytokine production by signaling through the partner molecule receptor[J]. Mol Med, 2012, 18: 224-230.

[6] Bianchi M E, Agresti A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation [J]. Curr Opin Genet Dev, 2005, 15(5): 496-506.

[7] 杨运高, 华何与, 刘定立. 三黄茵赤汤治疗重症肝炎 32 例[J]. 湖南中医杂志, 2010, 26(5): 63-64.

[8] 刁建新. 三黄茵赤汤通过 APE1/Ref-1 抑制 p53 调控凋亡相关蛋白防治慢加急肝衰竭的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2015.

[9] 李海叶, 刁建新, 代欢, 等. 三黄茵赤汤对 D-氨基半乳糖诱导人胚胎肝细胞系 LO2 坏死的影响[J]. 中医杂志, 2017, 58(9): 782-786.

[10] 刁建新, 马文校, 刘亚伟, 等. 三黄茵赤汤的急性毒性实验研究[J]. 时珍国医国药, 2014, 25(4): 778-779.

[11] 张毫, 徐满卿, 丁舸. 茵陈蒿汤中茵陈、大黄的核作用[J]. 长春中医药大学学报, 2013, 29(6): 1112-1114.

[12] 孙冉. 大黄的药理作用及临床应用分析[J]. 首都食品与医药, 2017, 24(2): 51-52.

[13] 李芳芳. 赤芍降血糖作用研究[D]. 开封: 河南大学, 2015.

[14] 王桂芬. 中药黄芪的药理作用及临床应用效果观察[J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(16): 3115-3116.

[15] 章村田. 姜黄药理作用研究进展[J]. 河南中医, 2015, 35(5): 1188-1190.

[16] 陆小华, 马晓, 王建, 等. 赤芍的化学成分和药理作用研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(4): 595-602.

[17] 杨以琳, 魏毅, 张贵平, 等. 白芍总苷对 NAFLD 大鼠 HMGB1, TLR4 通路的干预作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(14): 146-151.

[18] 罗爽, 罗霞, 刘琦, 等. 大黄酸对 DSS 诱导溃疡性结肠炎小鼠的治疗作用及机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(11): 109-113.

- [19] 王亦君,冯舒涵,程锦堂,等. 大黄蒽醌类化学成分和药理作用研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(13):227-234.
- [20] 孙永,彭明利. 姜黄素及其衍生物在肝脏相关疾病中防治作用的研究进展[J]. 药学报,2014,49(11):1483-1490.
- [21] 陈雪龙,齐艳萍. 四氯化碳急性肝损伤小鼠血清及肝脏组织学变化[J]. 中国兽医杂志,2011,47(1):39-40.
- [22] Bianchi M E. HMGB1 loves company [J]. J Leukoc Biol,2009,86(3):573-576.
- [23] Park J S, Gamboni-Robertson F, HE Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors[J]. Am J Physiol Cell Physiol,2006,290(3):917-924.
- [24] Ibrahim Z A, Armour C L, Phipps S, et al. RAGE and TLRs: relatives, friends or neighbours? [J]. Mol Immunol,2013,56(4):739-744.
- [25] Sims G P, Rowe D C, Rietdijk S T, et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer [J]. Annu Rev Immunol,2010,28:367-388.
- [26] YANG H, Hreggvidsdottir H S, Palmblad K, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2010,107(26):11942-11947.
- [27] 侯文婧. HMGB1 与肝损伤相关研究进展[J]. 中国肝脏病杂志:电子版,2017,9(2):5-9.
- [28] LI L, LING Y, HUANG M, et al. Heparin inhibits the inflammatory response induced by LPS and HMGB1 by blocking the binding of HMGB1 to the surface of macrophages[J]. Cytokine,2015,72(1):36-42.
- [29] Hardwick J M, Soane L. Multiple functions of BCL-2 family proteins [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol,2013,5(2):1-22.
- [30] Mcarthur K, Whitehead L W, Heddleston J M, et al. BAK/BAX macropores facilitate mitochondrial herniation and mtDNA efflux during apoptosis [J]. Science,2018,359(6378):883-897.
- [31] 唐爱存,陈兆霓,卢秋玉,等. 葫芦茶苷对肝损伤大鼠肝组织 Caspase-3 与 Caspase-8 活性的影响及保肝作用研究[J]. 中华中医药学刊,2017,35(3):689-692.

[责任编辑 周冰冰]