

加味四逆汤对 Con A 肝损伤小鼠细胞凋亡的保护作用*

陈 梨¹, 杨 辉^{2△}, 张奉学³, 刘 妮³, 李向阳³, 赵 昉³

(1. 广州医科大学, 广东广州 510120; 2. 广州医科大学第一附属医院中医科, 广东广州 510120;

3. 广州中医药大学病毒研究所, 广东广州 510120)

摘要: **目的** 探讨加味四逆汤对刀豆蛋白 A(Con A)诱导肝细胞损伤过程中肝脏组织 Fas 抗原的表达和血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平的干预情况。**方法** 雌雄各半的 NIH 小鼠随机分成 5 组: 正常对照组、模型组、阳性药物组、加味四逆汤大、小剂量组, 采用 Con A($18\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)尾静脉注射制作急性免疫性肝损伤模型。造模给药结束后, 观察血清中 TNF- α 含量变化及肝组织细胞 Fas 抗原表达。**结果** 模型组小鼠肝脏细胞内有大量的 Fas 抗原表达, 且血清中 TNF- α 含量也明显升高, 与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$); 对照组和药物组血清中 TNF- α 水平变化不大, 肝细胞 Fas 抗原表达不明显。**结论** 加味四逆汤能够干预 Con A 小鼠肝脏组织 Fas 抗原和血清 TNF- α 水平的表达, 对急性肝损伤有较好的保护作用。

关键词: 刀豆蛋白 A; 肝损伤; Fas 抗原; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1000-2723(2014)03-0005-03

细胞凋亡是细胞死亡的形式之一, 目前对肝细胞凋亡的研究仍是各国科学家的一个热点。近年来的研究表明, 各型肝炎尤其是病毒性和自身免疫性肝炎不仅存在肝细胞坏死, 也存在肝细胞的异常凋亡^[1-3], 在肝细胞膜表面富含 Fas、TNF-R1、TRAIL-R1 和 TRAIL-R2 受体, 病理情况下, Fas L 和 TNF- α 表达增加, 可通过这些受体介导凋亡, 对肝脏产生毒性。本课题在经典方剂四逆汤中加入了少量的山茱萸组成加味四逆汤, 在前期工作中, 我们对 32 例慢性乙型肝炎患者进行了临床实验研究, 对治疗前后症状体征、肝功能、肝纤维化等指标进行疗效评价, 结果表明, 经加味四逆汤治疗后, 疗效显著^[4], 且无明显毒副作用($P<0.05$)。因此本实验通过检测 Con A 急性免疫性肝损伤小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的水平和 Fas 抗原在肝组织中的表达与分布, 来进一步探讨中药加味四逆汤对肝细胞凋

亡的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 NIH 小鼠 50 只, 雌雄各半, 体质量 18~20g, 4~5 周龄, 购自广东省实验动物中心, 批号 236995, 正常饲养 1d 后待用。

1.2 药物和试剂

加味四逆汤(附子 30g, 干姜 15g, 甘草 15g, 山茱萸 10g)购于广州医科大学第一附属医院, 用水煎煮 2 次, 合并提取液后加热浓缩至 $1\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 储存于 -20°C 备用, 实验时用蒸馏水稀释至所需浓度。联苯双酯滴丸, 购自北京协和药厂, ($1.5\text{mg}/\text{丸}$, 批号 H-11020980)。刀豆蛋白 A 为 Sigma 公司产品(批号 C-8110), 使用时溶于 0.9% 生理盐水注射液, 按 $18\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 尾静脉注射给药。肿瘤坏死因子试剂盒(购自上海京津生物科技有限公司), 兔抗鼠 Fas 多克隆一抗。SP-9001 即用性免疫组化试剂盒, 北京中

* 基金项目: 广东省科技厅项目(2012B061700043; 20098030801356)

收稿日期: 2014-03-21

作者简介: 陈梨(1988-), 女, 湖南邵阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 病毒性疾病。

△通信作者: 杨辉, E-mail: doctoryh@163.com

衫金桥生物技术有限公司。DAB 显色剂,北京中衫金桥生物技术有限公司。

2 方法

2.1 动物分组

健康 NIH 小鼠 50 只,随机分为 5 组:生理盐水(NS)对照组,Con A 模型组,Con A+联苯双酯组($150\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),Con A+中药低($120\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、高($240\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组,每组 10 只。

2.2 动物造模

参照 Tiegs^[5]和李常青^[6]等造模,正常生理盐水组给予生理盐水尾静脉注射,其余于实验首日给予 Con A $18\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 尾静脉注射,阳性对照组每日灌胃给予联苯双酯混悬液 $150\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,中药高、低剂量组每日分别给予 $0.24, 0.12\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 加味四逆汤悬液灌胃,正常对照组和模型对照组每日给同体积生理盐水灌胃,每日灌胃 1 次,连续 3d。

2.3 血清 TNF- α 的检测

末次给药后 4h,再次尾静脉注射 Con A $18\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 造模,8h 后摘取眼球采血,分离血清,酶联免疫法检测各组小鼠血清 TNF- α 的含量。

2.4 肝组织细胞 Fas 抗原表达的检测

取血后拉颈处死动物,打开腹腔摘取肝脏,采用免疫组化技术检测,用 SABC 法,DAB 显色,具体操作按试剂盒说明书进行。光镜下观察,阳性细胞膜或细胞浆呈棕黄色着染。

2.5 统计分析

计量数据用均值 $\pm$ 标准差表示,行方差分析得出 P 值。

2.6 结果判定

Fas 表达根据按染色强度及分布将 Fas 阳性程度分为:-未见阳性细胞;+仅少数阳性肝细胞,阳性细胞占肝小叶全部肝细胞的 $1/3$ 以下;++较多阳性肝细胞,阳性细胞占肝小叶全部肝细胞的 $1/3\sim 2/3$;+++阳性细胞呈弥漫分布,且阳性细胞占肝小叶全部肝细胞的 $2/3$ 以上。

3 结果

3.1 TNF- α 标准曲线的绘制

在 Excel 工作表中,以标准品浓度作横坐标,对应的 OD 值作纵坐标,绘制出标准品线性回归曲线,按曲线方程计算各样本浓度值,见图 1。

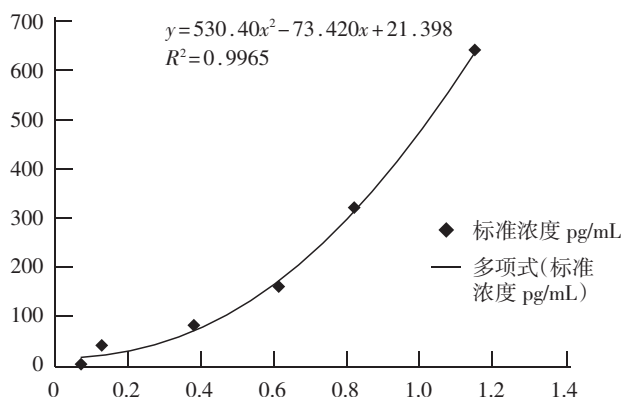


图 1 TNF- α 标准曲线

3.2 加味四逆汤对血清 TNF- α 的分泌和肝细胞 Fas 抗原表达的影响

检测结果显示,模型组肝细胞内有大量 Fas 抗原的表达,尤其是在细胞坏死区域内的肝细胞表达明显增多,且 Fas 抗原阳性的肝细胞周边可见较多的淋巴细胞浸润;而正常组和给药组 Fas 抗原的表达基本为阴性;对模型组血清 TNF- α 水平的检测结果表明,与正常对照组比较,差异具有统计学意义($P<0.01$);而联苯双酯组和不同剂量的加味四逆汤组作用于免疫性肝损伤小鼠后,TNF- α 分泌明显降低($P<0.05$);且给药组之间 TNF- α 的含量无统计学意义($P>0.05$),结果详见表 1。

表 1 各组小鼠 TNF- α 分泌和肝脏 Fas 抗原表达结果

分组	N	剂量 ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	TNF- α ($\text{pg}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Fas 表达 强度
正常组	10	-	275.13 ± 15.7	-
模型组	10	-	$316.07\pm 19.48^*$	+++
LB 组	10	150	$245.76\pm 20.38^\Delta$	+
四逆大组	10	240	$263.13\pm 15.27^\Delta$	+
四逆小组	10	120	$227.3\pm 915.27^\Delta$	+

注:与正常组比较,* $P<0.01$;与模型组比较, $^\Delta P<0.05$;-阴性;+弱阳性;+++强阳性。

4 讨论

对各种疾病发病机制的深入探讨和新治疗药物的成功研究,需要建立和人类相关疾病发病机制相似的实验动物模型^[5]。1992 年 Tiegs 等建立的豆蛋白 A 免疫性肝损伤小鼠模型被认为是研究人类病毒性肝炎、自身免疫性肝病等病理机制的理想模

型,Con A 进入体内后可活化 T 细胞,进而通过死亡配体和受体的结合诱导肝细胞的凋亡;此外还可进一步激活巨噬细胞,导致过量的 IFN- γ 和 TNF- α 等多种炎症细胞因子的释放,继而导致细胞死亡级联反应,介导肝细胞损伤,而 TNF- α 和 Fas L 在这一模型的病理机制中起重要作用。

Fas L、Fas 与其信号途径调控的许多细胞因子共同组成了 Fas 系统,在肝脏疾病中,肝细胞的凋亡主要通过 Fas/Fas L 途径介导所致。当肝细胞膜上的 Fas 与其配体 Fas L 结合后发生三聚体化,诱导含死亡域的接头蛋白 FADD 聚合或相互连接,导致 Fas 死亡区白聚和或交连,活化 Caspase8 (胱冬肽酶-8)蛋白酶原,随后激活下游的 caspase3 等效应因子,导致肝细胞发生凋亡。Fas L 不仅通过与 Fas 的结合直接导致肝细胞凋亡,还可促使表达 Fas 的淋巴细胞的聚集,加重肝脏的炎性损伤^[7]。

目前研究表明,多种细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 等在肝脏内的产生和聚集与肝脏病理性坏死和凋亡密切相关,其中 TNF- α 起到核心作用。TNF- α 主要由巨噬细胞(Me)或单核细胞产生,具有多种生物学功能^[8] TNF- α 也可刺激 CD4⁺T 淋巴细胞大量产生氧自由基,通过氧化应激而触发细胞凋亡;另一方面又发现 TNF- α 可激活作为细胞凋亡执行器的 Caspase 家族诱发肝细胞凋亡。秦波等^[9]认为肝细胞中度以上凋亡者,多数有 TNF- α /TNFR1 和 Fas L/Fas 的共同表达,二者相加有增强肝细胞凋亡的作用。

四逆汤是传统经典方,原方出自《伤寒论》,现代药理研究表明:四逆汤具有较强的清除自由基、抗氧化、免疫调节、阻断细胞凋亡等多种药理作用,本课题在原方基础上加入少量山茱萸具有调和、柔肝作用组成加味四逆汤。本实验中我们采用了刀豆蛋白 A 成功复制了免疫性肝损伤动物模型,并以抗炎保肝效果肯定的联苯双酯(LB)滴丸作为阳性对照药,同步观察了加味四逆汤对免疫性肝损伤小鼠血清中 TNF- α 和肝脏组织 Fas 抗原表达情况来探讨其对肝组织细胞凋亡的影响。结果发现给予加味四逆汤治疗的小鼠血清 TNF- α 水平较模型组明显降低,差异有统计学意义,说明加味四逆汤可以减轻肝脏炎症、凋亡及坏死;而通过免疫组化方法分析肝组织 Fas 抗原的结果显示,正常组 Fas 抗原表

达呈阴性,而 Con A 模型组 Fas 抗原的主要分布在肝细胞浆内,小部分在肝细胞膜上表达,在碎屑样坏死和/或桥样坏死周围淋巴细胞浸润区域的肝细胞表达尤其明显,且 Fas 抗原阳性的肝细胞周边可见较多的淋巴细胞浸润;而在加味四逆汤治疗后,肝细胞Fas 抗原表达呈弱阳性,T 淋巴细胞活化受到明显抑制,因此我们猜测肝细胞的凋亡可能是通过肝内浸润的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)表达 Fas L 与 Fas 抗原相互结合起到作用。

本实验结果说明加味四逆汤可有效的影响肝细胞的坏死和凋亡,其作用机制可能是抑制 Fas、Fas L、TNF- α 的产生有关,但具体作用机制和作用途径有待进一步研究。

参考文献:

- [1] LOCKSHIN R A,ZAKERIZF. Programed Cell Death:New Thoughts and Relevance to Ang I [J]. Gerontol,1990,45(5):135-140.
- [2] 吕鹏,罗和生,余保平. 细胞凋亡与肝脏疾病[J]. 世界华人消化杂,2000,8(10):1157-1159.
- [3] 赵国雄,刘丽娟,龚虹云,等. 乙型肝炎病毒诱导肝细胞癌发病机制的研究进展 [J]. 中国药事,2009(10):1015-1020.
- [4] 杨辉. 加味四逆汤防治病毒性肝炎的临床及实验研究[D]. 广州:广州中医药大学,2013:5.
- [5] TiegsG,Hentschel J,Wendel A. T Cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by Concanavalin A[J]. Clinical Invest,1992,90(1):196-203.
- [6] 李常青,刘丽丽. 中药清肝排毒饮对刀豆蛋白 A 所致小鼠免疫性肝损伤的保护作用 [J]. 世界华人消化杂志. 2005,11(4):1283-1286.
- [7] Li XK,Fu jinoM,Sugioka A,et al. Fulminant hepatitis by Fas positive livers and wild type mice grafted with Fas mutant livers [J]. Transplantation,2001,27(4):503-508.
- [8] Siegmund D,Mauri D,Peters N,et al. Fas associated death domain protein FADD and caspase8 mediate up regulation of F cos by Fas ligand and tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) via FLICE inhibitory protein (FLIP)regulated pathway [J]. Biol Chem,2007,276(35):32585-32590.
- [9] 秦波,张定凤,马英,等. 肿瘤坏死因子受体和 Fas 在乙型肝炎肝细胞凋亡中的意义 [J]. 中华肝脏病杂志,2001,9:337-339.

(编辑:杨阳)

(英文摘要见第 21 页)