

机体局部炎症反应,防止 DR 的发生;③脂联素可有效抑制 VEGF 诱导的血管内皮细胞的迁徙以及视网膜病理性新生血管的形成^[8]。

T-钙黏蛋白是 2004 年 Hug 发现的脂联素六聚体和高分子量多聚体的受体,脂联素可能通过 T-cad 发挥保护 RPE 细胞及抗氧化、抑制细胞黏附分子表达的作用。它虽是黏附分子家族中的一员,但其作用更多地表现在作为信号受体参与对外界识别及调节细胞运动和增生方面^[9]。研究发现,在多种细胞类型中,T-cad 的高度表达会促进细胞周期,刺激细胞生长;还可通过激活 PI3k 信号途径及抑制 P38MAPK 信号途径来对抗氧化应激导致的细胞凋亡,并提高细胞在氧化应激状态下的生存能力。另外,抑制 P38MAPK 途径也可减少 ROS 通过 P38MAPK 激活 NF- κ B,减少炎症反应,从而保护 RPE 细胞免于高糖所致的氧化损伤,维护视网膜功能,故 T-cad 表达增高可阻止 DR 的发生发展。本实验结果显示,脂联素组各时间点 T-cad 的表达水平均较高糖组升高,并且随脂联素作用时间的延长而呈上升趋势,提示脂联素通过上调 hRPE 细胞 T-cad 的表达发挥保护视网膜的作用。Bora^[10]等的研究也发现激光诱导形成脉络膜新生血管的小鼠模型,经过脂联素预处理后,其脉络膜组织中 T-cad 的表达逐渐增加,抑制新生血管的形成。

综上所述,脂联素可使处于高糖环境下的 hRPE 细胞 T-cad 的表达水平上升,抑制 DR 的发生发展,为临床早期应用脂联素治疗 DR 提供更有力的理论依据。

参考文献

- 1 张合珍,李兴.肿瘤坏死因子 α 、脂联素与糖尿病视网膜病变的关系.中华眼底病杂志,2007,23(4):293-294
- 2 Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature,2001,414:813-820
- 3 NaggarH,Ola MS,MooreP, *et al.* Down regulation of reduced-folate transporter by glucose in cultured RPE cells and in RPE of diabetic mice. Invest Ophthalmol Vis Sci,2002,43(2):556-559
- 4 Gotoh Y,Cooper JA. Reactive oxygen species - and dimerization - induced activation of apoptosis signal - regulating kinase1 intumor necrosis factor - alpha signal transduction. Biol Chem,1998,273:17477-17482
- 5 Geleilete TJ, Melo GC, Costa RS, *et al.* Role of myofibro - blasts, macrophages, transforming growth factor - beta endothelin, angiotensin - II, and fibronectin in the progression of tubulointerstitial nephritis induced by gentamicin. Nephrol,2002,15(6):633-642
- 6 张剑,王艳秋,李焕美.糖尿病视网膜病变患者血清脂联素水平变化及与氧化应激的关系.中国现代医学杂志,2009,16:2496-2499
- 7 Kobashi C,UrakazeM, Kishida M, *et al.* Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin - 8. Circ Res,2005,97(12):1245-1252
- 8 Mahadev K, Wu X, Donnelly S, *et al.* Adiponectin inhibits vascular endothelial growth factor - induced migration of human coronary artery endothelial cells[J]. Cardiovasc Res,2008,78(2):376-384
- 9 Philippova M,Joshi MB,Pfaff D, *et al.* A guide and guard:The many faces of T-cadherin. Cellular Signalling,2009,21:1035-1044
- 10 Bora PS, Kaliappan S,LyzogubovVV, *et al.* Expression of adiponectin in choroidal tissue and inhibition of laser induced choroidal neovascularization by adiponectin. FEBS Lett, 2007, 581(10): 1977-1982

(收稿:2010-01-08)

紫七软肝片含药血清调控人肝细胞凋亡相关基因的研究

陈 云 蒋凤荣

摘 要 **目的** 研究紫七软肝片含药血清对乙醇造模的人肝细胞(LO2)抑制的影响及凋亡相关基因的调控,探讨其对 LO2 保护作用的分子机制。**方法** 以紫七软肝片灌胃,制备免含药血清,用乙醇建立 LO2 凋亡模型,采用 MTT 法测定含药血清对乙醇致 LO2 细胞抑制的影响,Hoechst3325 荧光检测细胞凋亡形态学变化;Real-time RT-PCR 和 Western-Blot 检测凋亡促进基因 casepase3、NF- κ B 表达。**结果** 紫七软肝片含药血清可调控 casepase3、NF- κ B 的表达,减少乙醇造模的 LO2 的凋亡。**结论** 紫七软肝片可以通过调控凋亡促进基因 casepase3、NF- κ B 的表达,起到保护 LO2 的作用。

基金项目:南京中医药大学中医内科开放课题(zynk009)

作者单位:210046 南京中医药大学第一临床医学院中医内科教研室(陈云);南京中医药大学基础医学院(蒋凤荣)

关键词 紫七软肝片 人肝细胞株 血清药理学 细胞凋亡 基因

Effect of Serum containing Ziqi Ruangan Pill on Apoptosis Related Genes in LO2. *Chen Yun, Jiang Fengrong. Chinese Medicine, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu 210046, China*

Abstract Objective To study the influence of serum containing Ziqi Ruangan Pill on inhibitory effect of alcohol LO2 and to investigate the regulation on apoptosis related genes and the protective mechanism for LO2. **Methods** Rabbit sera saline containing Ziqi Ruangan Pill was prepared. The apoptotic LO2 model was established by being cultured with alcohol. The effect of serum on the model was detected by MTT method. Identification of apoptosis was carried out using flow cytometry and Hoechst3325 fluorescent staining. The expression of apoptotic inducing gene, caspase3 and NF- κ B was detected by Real-time RT-PCR and Western-Blot. **Results** The serum containing Ziqi Ruangan Pill could regulate the expression of the caspase3, NF- κ B and reduce the apoptosis. **Conclusion** Ziqi Ruangan Pill can protect the LO2 by regulating the expression of apoptosis stimulative gene caspase3 and NF- κ B.

Key words Ziqi Ruangan Pill; LO2; Serum pharmacology; Cell apoptosis; Gene

肝纤维化是机体对于慢性肝损伤的一种修复性应答,也是各种慢性肝病向肝硬化及肝癌发展的前期必经病理阶段。目前认为,各种损伤因素引起肝细胞炎症反应及坏死,相关细胞分泌多种细胞因子激活肝星状细胞,引起细胞外基质的合成与降解失衡,过度沉积是肝纤维化发生的机制^[1-3]。本研究通过观察紫七软肝片兔含药血清对乙醇造模的人肝细胞(LO2)抑制的影响及凋亡相关基因的调控,探讨其对LO2保护作用的分子机制。

材料与方法

1. 材料:中药饮片(江苏省医药公司);DMEM培养基(GIBCO, USA);胎牛血清(北京元亨圣马生物研究所);胰蛋白酶(MERCK, USA);二甲基亚砜(DMSO)(Merck, Germany);TRIZOL试剂盒(GIBCO, USA);SYBR®GreenER试剂盒(GIBCO, USA);人肝细胞株(LO2)(上海细胞库);普通级家兔(上海实业科华生物技术有限公司);6孔细胞培养板(Costar, Denmark);细胞培养箱(NAPCO, USA);倒置相差显微镜(Olympus, Japan)荧光定量PCR仪(Bio-rad, USA)。PCR引物由南京生物工程有限公司合成。

2. 方法:药物制备:紫七软肝片主要由紫草、赤芍、生三七、虎杖、黄芪等构成。饮片打粗粉,于不锈钢锅中加蒸馏水10倍,浸泡30min,强火煮沸,改文火,保持微沸45min,搅拌,乘热滤过,药渣再加蒸馏水同法煎煮,沸后30min,滤过。合并滤液,恒温70℃,0.1MPa减压浓缩至400ml。(2)兔含药血清制备:药物血清组按7.5g/(kg·d),每天2次,连续灌胃3天,最后一次灌胃前禁食8h,灌胃后2h颈动脉放血。空白组同时放血。兔血37℃恒温箱静置,待出现明显血块收缩后3000r/min离心10min,收集上层血清,56℃灭活45min,-24℃冷藏待用。(3)细胞培养与传代:LO2细胞在含10%胎牛血清的DMEM完全培养基,5%CO₂、湿度95%、37℃条件下培养。细胞达面积分数80%融合后用D-Hanks液洗涤1次,加入0.25%的胰酶适度消化,再加入含10%胎牛血清培养基终止消化,吹打成细胞悬液。1000r/min离心3min,弃上清,按1:4

比例传代。(4)乙醇致LO2细胞病变模型的建立:用2.5g/L胰蛋白酶消化已长成单层的LO2细胞,用含10%胎牛血清的高糖DMEM培养基配成细胞悬液,以每瓶约10⁵个细胞接入10ml小培养瓶内,每瓶1ml。在5%CO₂、湿度95%、37℃条件下培养48h。细胞长至瓶底大约60%~70%。确定50mmol/L乙醇与LO2细胞共培养6h为最佳的病变模型。(5)分组处理:按低剂量组、中剂量组、高剂量组分别加入含10%各组兔血清的完全培养液,继续培养24h。另留模型组不经药物血清作用。各组继用150mmol/L乙醇培养6h。(6)MTT检测细胞活力:将培养至第3代的各组肝细胞用0.25%胰酶消化后,吹打制成单个细胞悬液(调整细胞密度为1.0×10⁴),分别接种到96孔板中。每块96孔板1~2列为不含细胞的血清,以消除血清物质对光吸收值的影响;3~4列为空白组细胞悬液;5~6列为对照组细胞悬液;7~8列为低剂量组细胞悬液;9~10列为中剂量组细胞悬液;11~12列为高剂量组细胞悬液,放置于37℃、5%CO₂的培养箱;24h后每孔加入MTT溶液20μl,继续孵育4h后终止培养。小心吸弃孔内上清液,每孔加入DMSO 200μl,振荡10min,溶解结晶物,在酶标仪上测定各孔的吸光值。(7)形态学观察:通过荧光检测,应用Hoechst3325染色观察细胞凋亡。将上述各组细胞多聚甲醛固定后,适当洗涤去除固定剂;Hoechst 33258染色10min;吸除Hoechst 33258染色液,用TBST洗涤2~3次,每次3~5min;在荧光显微镜下观察。细胞发生凋亡时,会看到凋亡细胞的细胞核呈致密浓染或呈碎块状致密浓染。(8)Real-time PCR检测caspase3, NF- κ B:内参beta-actin、凋亡基因caspase3、NF- κ B引物经Primer 5.0设计。beta-actin上游引物5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3',下游引物5'-CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3';NF- κ B上游引物5'-GGGCACGATTGTCAAAGAT-3',下游引物5'-GGGGAC-TACGACCTGAATG-3';caspase3上游引物5'-ATG-GAAGCGAAGCAATGGAGGTG-3',下游引物5'-CTGTAC-CAGACCGAGATGTCA-3'。采用TRIZOL试剂盒提取总RNA,紫外线扫描定量。在微离心管内依次加入灭菌重蒸水20μl、反应缓冲液4μl、dNTP混合物1μl、Oligo(DT)1μl、总

RNAX μ l、Taq DNA 聚合酶 1 μ l,反应体系 20 μ l,PCR 仪制备 cDNA。在八联中依次加入灭菌重蒸水 9 μ l、SYBR® Green 15 μ l、引物 1 μ l、cDNA5 μ l。以 92.5℃ 预变性 45s;50℃ 变性 45s;72.5℃ 退火、延生 90s;在 PCR 仪上进行 40 次循环。扩增过程及荧光信号检查、数据的储存和分析均由仪器及自带的软件自动完成。(9) Western - Blot 检测 pro - casepase3、NF - κ B 蛋白变化量:采用蛋白标准提取试剂盒提取总蛋白,紫外线扫描定量。在 SDS - PAGE 凝胶中加入测试物,通过湿转,封闭,分别加入对应的一抗和二抗,ECL 化学底物发光显色。

3. 统计学处理:实验数据用均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS 8 统计软件处理, $P < 0.05$ 时,有显著性差异; $P < 0.01$ 时,有极显著差异。

结 果

1. MTT 法测定细胞活力:实验结果显示:经乙醇作用后 LO2 的 MTT 值降低($P < 0.01$),提示乙醇明显引起细胞生长抑制;紫七软肝片组 MTT 值逐渐升高,以中、高剂量组最为明显($P < 0.01$),提示而紫七软肝片有逆转这种不良影响的作用,其中中剂量及高剂量组效果明显(表 1)。

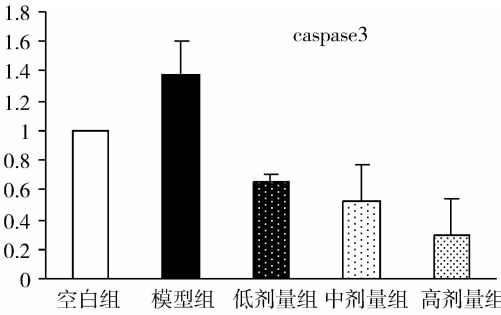


表 1 紫七软肝片对乙醇致 LO2 细胞抑制的影响		
组别	标本数	OD 值(均数 $\pm$ 标准差)
正常组	8	0.9983 $\pm$ 0.0927
模型组	8	0.4554 $\pm$ 0.0742 *
低剂量组	8	0.5321 $\pm$ 0.0783
中剂量组	8	0.6908 $\pm$ 0.0524 Δ
高剂量组	8	0.8789 $\pm$ 0.0506 Δ

* $P < 0.01$,与空白组比较; $\Delta P < 0.01$,与对照组比较

2. 紫七软肝片对乙醇致 LO2 细胞凋亡的形态学的改变:Hoechst3325 荧光结果显示,乙醇作用 LO2 后,细胞核的出现核碎裂、核固缩。药物血清作用后,中剂量组及高剂量组核碎裂、核固缩明显减轻,提示紫七软肝片药物血清抗细胞凋亡的作用(封三彩图 8)。

3. Real - time RT PCR 检测 casepase3、NF - κ B:实验结果显示:经乙醇作用后 casepase3、NF - κ B 的表达明显增加($P < 0.01$),紫七软肝片各剂量组作用后 casepase3、NF - κ B 的表达明显减少($P < 0.01$)(图 1)。

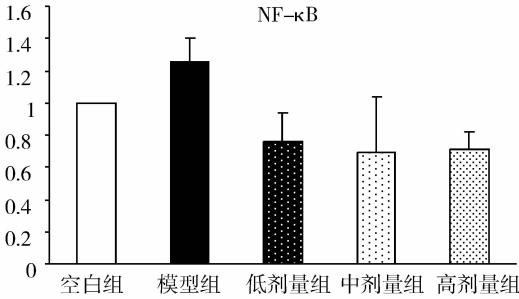


图 1 casepase3、NF - κ B 的表达

4. Western - Blot 检测 pro - casepase3、NF - κ B 蛋白变化量:实验结果显示:经乙醇作用后 pro - casepase3 表达明显降低($P < 0.01$)、NF - κ B 的表达明显增加($P < 0.01$),紫七软肝片各剂量组作用后 pro - casepase3 表达明显增加($P < 0.05$)、NF - κ B 的表达明显增加($P < 0.05$)(图 2)。

讨 论

临床研究发现,肝纤维化(尤其是炎症活动性阶段)的许多患者,每多伴有口苦口干、胁肋、脘腹胀痛或刺痛、疲劳乏力、低热、衄血、舌苔黄腻质黯红、脉弦数等症,常易出现黄疸、肝脾大、肝掌、蜘蛛痣、面色晦暗等体征。中医理论认为,应把这些临床特点归属于肝病“湿热瘀毒证”范围^[4,5]。由于湿热瘀毒的持续存在,使得正气愈发亏耗,导致脾气虚弱、肝肾阴亏,

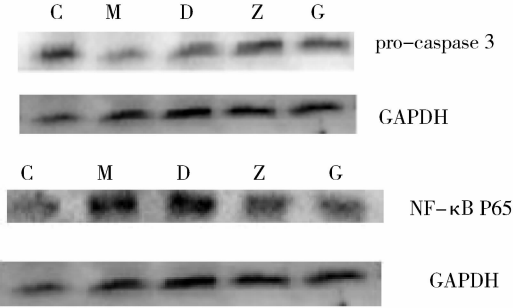


图 2 pro - casepase3、NF - κ B 表达

C. 正常组;M. 模型组;D. 低剂量组;Z. 中剂量组;G. 高剂量组

继之脾肾阳虚,形成积聚、鼓胀等难治之证,即是慢性肝病由“湿热 - 血瘀 - 瘀热 - 湿热瘀毒 - 气阴亏耗”的病机演变过程是肝纤维化形成和加重的重要环节。因此,确立清热化湿化瘀、凉血解毒、调养肝脾为基本

治疗大法,组建“紫七软肝片”,其中紫草凉血解毒、三七养血活血为君药,一通一补,凉血而不留瘀,活血而不伤血;赤芍、虎杖配合紫草,凉血化瘀,清热利湿为佐药,黄芪健脾利湿,土旺湿自除;益气养血,与三七配伍,起到养肝肾,调脾气的作用为使药,诸药相合,共同起到清化瘀毒,滋养肝肾的作用,从而减少肝纤维化。

肝细胞损伤的常见原因有 ROS、TNF- α 、高血脂、高糖等,其中,ROS 对肝细胞的损伤最常见、最重要。乙醇作用肝细胞后,通过作用肝细胞线粒体、细胞色素 P4502E1 (CYP2E1)、过氧化物酶体(peroxisome)从而产生内源性的 ROS,ROS 激活 IKK 的 IKK β 亚单位被磷酸化,继而引起 I κ B α 的 Ser32 和 Ser36 位点被磷酸化,被释放的 p50/p65 则进行核易位,与基因上的 κ B 位点发生特异性结合,从而发挥调节细胞功能的作用,同时引起线粒体膜的通透性的增加,使各种凋亡因子从线粒体释放到细胞质中,从而激活 caspase 体系,引起 DNA 链的断裂、核苷酸的剔除和核苷酸碱基的各种修饰,致使细胞发生凋亡^[6]。

整体实验中对肝纤维化模型大鼠结果显示紫七软肝片能减少胶原沉积,减轻肝纤维化的症状^[7,8]。实验结果显示,乙醇作用肝细胞后,细胞活力降低,形态学上细胞核出现核分裂;mRNA 和蛋白水平 caspase3、NF- κ B 表达明显增高,紫七软肝片免含药血清干预后,细胞形态学得到一定的恢复,caspase3、

NF- κ B 表达也接近正常水平,药物血清能清除 ROS,减少细胞 NF- κ B 表达,抑制炎症因子的释放和反应,从而减轻细胞的凋亡,这是紫七软肝片防治肝纤维化的可能机制之一。

参考文献

- Hiroshi Kubota, Hsin-lei Yao, Lola M. Reid. Identification and Characterization of Vitamin A - Storing Cells in Fetal Liver: Implications for Functional Importance of Hepatic Stellate Cells in Liver Development and Hematopoiesis. *Stem Cells*, 2007, 25(9): 2339 - 2349
- Novo E, Cannito S, Zamara E, *et al.* Proangiogenic Cytokines as Hypoxia - Dependent Factors Stimulating Migration of Human Hepatic Stellate Cells. *Am J Pathol*, 2007, 170(6): 1942 - 1953
- Dodig M, Ogunwale B, Dasarathy S, *et al.* Differences in regulation of type I collagen synthesis in primary and passaged hepatic stellate cell cultures: the role of $\alpha_5\beta_1$ - integrin. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293(1): G154 - G164
- 薛博瑜, 胡荣昕, 孙丽霞. 中医药治疗肝纤维化临床研究思路探讨. *中华中医药杂志*, 2007, 8(22): 540 - 542
- 叶放, 薛博瑜, 吴勉华, 等. 重视对慢性肝炎肝纤维化进程中湿热瘀毒证治研究. *中华中医药学刊*, 2007, 12(25): 2477 - 2479
- Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000; 407(6805): 770
- 周玲玲, 方泰惠, 徐立, 等. 紫七软肝片对二甲基亚硝胺所致大鼠慢性肝损伤的保护作用. *中药新药与临床药理*, 2004, 6(15): 392 - 395
- 杨舜民, 张良, 周玲玲, 等. 紫七软肝片对四氯化碳所致慢性肝纤维化大鼠的保肝作用. *抗感染药学*, 2003, 3(13): 17 - 19

(收稿: 2009 - 12 - 25)

(修回: 2010 - 03 - 14)

家兔非酒精性脂肪肝病血生化指标研究

李明霞 任伯绪 王昌富

摘要 目的 建立不同程度家兔非酒精性脂肪肝模型,观察非酒精性脂肪肝程度与血生化指标的关系。**方法** 选用 32 只新西兰家兔,随机分为对照组($n=8$)和模型组 3 组(每组 $n=8$),采用高脂高糖饲料建立不同程度脂肪肝模型,分别于 4、6、8 周检测家兔血清 TG、TC、AST、ALT,并进行病理学检查。**结果** 高脂高糖饲料喂养 4 周后可形成轻度的脂肪肝并出现血脂的升高,随着脂肪肝病程度的发展,血清 TG 水平持续升高。**结论** 血生化指标对脂肪肝有一定的诊断价值。

关键词 非酒精性脂肪肝 动物模型 血生化指标 家兔

Study on Blood Biochemical Indexes of NAFLD in Rabbits. Li Mingxia, Ren Boxu, Wang Changfu. The Medical School of Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434023, China

作者单位: 434023 荆州, 长江大学医学院(李明霞、任伯绪); 长江大学荆州临床医学院 荆州市中心医院(王昌富)

通讯作者: 任伯绪, 电子信箱: boxuren@yahoo.com.cn