

促肝细胞生长素对 CCl₄ 肝损伤小鼠的保护作用和机制研究

陈男¹, 康桦², 邓祖跃², 王丹², 张劲松², 朱社敏², 匡荣^{1,2*} (1.浙江工业大学药学院, 杭州 310014; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要: 目的 研究促肝细胞生长素(PHGF)对 CCl₄ 肝损伤小鼠的保护作用和机制, 为其临床应用提供理论依据。方法 小鼠灌胃 CCl₄ 的植物油溶液 80 mg·kg⁻¹ 建立肝损伤模型, 连续尾静脉注射 3 个剂量的 PHGF(12.5, 25, 50 mg·kg⁻¹) 7 d 后, 取血清测定各组小鼠 ALT 和 AST, T-SOD 和 MDA 的值; 取肝脏进行病理组织学检查; 用 Western blot 法检测肝组织中 Bcl-2 与 Bax 蛋白的表达。结果 PHGF 各给药组 ALT 与 AST 的值要明显低于模型组($P<0.05$), T-SOD 和 MDA 值与肝损伤模型组比较差异不具有统计学意义; 病理切片观察显示, 各给药组的肝组织细胞坏死情况明显好于模型组; Western blot 结果表明, PHGF 各给药组的 Bcl-2 与 Bax 表达量的比值均明显高于模型组($P<0.01$), 且具有一定的剂量依赖性。结论 PHGF 对 CCl₄ 所致的小鼠肝损伤具有一定的保护作用, 其作用机制可能与抗氧化作用无关, 与其上调 Bcl-2 蛋白的表达并下调 Bax 蛋白的表达有关。

关键词: 促肝细胞生长素; 肝损伤; Bcl-2; Bax

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)12-1292-04

Study on Protective Effect and Mechanism of Hepatocyte Growth-promoting Factor on CCl₄-induced Liver Injury in Mice

CHEN Nan¹, KANG Hua², DENG Zuyue², WANG Dan², ZHANG Jinsong², ZHU Shemin², KUANG Rong^{1,2*} (1.College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the protective effect and mechanism of hepatocyte growth-promoting factor(PHGF) on CCl₄-induced liver injury in mice and provide some theoretical basis for its clinical use. **METHODS** Liver injury model in mice was established by ig CCl₄(80 mg·kg⁻¹) and 3 doses of PHGF(12.5, 25, 50 mg·kg⁻¹) were administrated intravenously for 7 days. The ALT, AST, T-SOD and MDA levels of serum were detected and the liver tissues were observed histologically. The Bcl-2 and Bax protein expressions in liver tissue were detected using Western blot method. **RESULTS** The ALT and AST levels of each dose group of PHGF were significantly higher than those of the model group($P<0.05$), but no significant differences of T-SOD and MDA levels could be found between model group and other groups. Through the pathological observation, each dose group of liver cell necrosis situation were obviously better than the model group. The administrated group, according high to low, the ratio of Bcl-2 and Bax increased significantly higher than the model group($P<0.01$). **CONCLUSION** PHGF can protect the CCl₄-induced liver injury in mice and the mechanism of action may have nothing to do with antioxidant effect but upregulation the expression of Bcl-2 protein and down expression of Bax protein.

KEY WORDS: hepatocyte growth-promoting factor; liver injury; Bcl-2; Bax

肝脏是机体重要代谢器官, 其解毒和吞噬功能对机体有重要保护作用。我国肝脏疾病发病率高, 影响面广, 对人民健康和国家经济危害严重。急性化学性肝损伤是多种肝脏疾病的发生、发展及最终走向肝功能衰竭的始动环节和共同途径。深入研究和探讨急性化学性肝损伤的发病机制以及有效治疗措施, 对慢性肝病防治具有重要意义。

自 1975 年 LaBrecque 从初断乳大鼠和肝部分切除后的再生肝中提取出一种能刺激肝细胞有丝分裂, 促进肝再生的肝细胞刺激因子(hepatic stimulator substance, HSS)以来^[1], 国内外许多学

者从兔、狗、猪等动物再生肝中提取出 HSS, 并证实这种特异性肝刺激因子具有器官特异性, 而无种属特异性。本实验使用的是肝源性肝细胞生长因子, 即促肝细胞生长因子(hepatocyte growth-promoting factor, PHGF), 属于 HSS。其临床使用已有十余年, 对肝细胞的再生和治疗慢性肝炎具有很好的疗效, 但其对肝组织的具体作用机制一直没有很明确的阐明。本实验通过建立小鼠化学性肝损伤模型探究 PHGF 对肝组织的保护作用, 从而希望对促肝细胞生长素以及对肝组织的作用机制的探究提供帮助和参考。

作者简介: 陈男, 男, 硕士生 Tel: 18767192141 E-mail: 173176190@qq.com
13989899796 E-mail: kuangrong@zjy.org.cn

*通信作者: 匡荣, 男, 博士, 主任药师 Tel:

1 材料与仪器

1.1 动物

ICR 小鼠,购自杭州师范大学,体质量 18~22 g, SPF 级,生产许可证号: SCXK(浙)2011-0048,使用许可证号: SYXK(浙)2008-0117。

1.2 药品及试剂

PHGF(海南通用同盟药业,规格: 20 mg,批号: 20101104);永宁牌肝保胶囊(浙江永宁药业,批号: 080901);CCl₄(海凌峰化学试剂有限公司);ALT、AST 测定试剂盒[德赛诊断系统(上海)有限公司];T-SOD、MDA 测试盒(南京建成生物工程研究所);Bcl-2 抗体(批号: BS1511)、Bax 抗体(批号: BS2538)、 β -actin 抗体(批号: AP0060)、羊兔抗 IgG-HRP(批号: BS13278)均来源于 Bioworld;其他试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器

AllegraX-22R 冷冻离心机(贝克曼公司);倒置显微镜(日本尼康公司);7020 型全自动生化分析仪(日本日立公司);病理切片机(LEICA);电泳系统(Mini-Proten Tetra System, Bio-RAD 公司);凝胶成像仪(ChemiDoc XRS+System, Bio-RAD 公司)。

2 方法

2.1 小鼠分组给药以及 ALT, AST, T-SOD 和 MDA 的检测

取 ICR 小鼠 72 只,♀ ♂ 各半,按体质量随机分为 6 组,12 只·组⁻¹,即空白对照组、模型对照组、PHGF 的 3 个剂量组(12.5, 25.0, 50.0 mg·kg⁻¹)和永宁肝保胶囊组(14.0 mg·kg⁻¹),3 个剂量的受试样品组每日尾静脉注射生理盐水稀释的样品液 0.25 mL·(10 g)⁻¹,阳性对照组灌胃永宁肝保胶囊内容物混悬液 0.4 mL·(10 g)⁻¹,空白对照组和模型对照组尾静脉注射等体积的生理盐水,1 次·d⁻¹,共 7 d。于第 6 天下午禁食但不禁水 16 h 后,空白对照组灌胃给予植物油 0.2 mL·(10 g)⁻¹,其他 5 组均灌胃给予 CCl₄ 的植物油溶液(80.0 mg·kg⁻¹),并在 4 h 和 23 h 后再给予药品 2 次,末次给药品后 1 h,摘除小鼠眼球取血,3 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 取血清,按试剂盒的说明测定 ALT, AST, T-SOD 和 MDA 的值。

2.2 病理组织学检查

取部分小鼠肝脏,10%甲醛固定。组织经脱水、浸蜡、包埋、切片等步骤制成石蜡切片,进行 HE 染色,光镜下观察形态学改变。

2.3 Western blot法检测小鼠肝组织Bcl-2与Bax蛋白的表达

称取肝左叶适量,制成匀浆,加每 1 mL 含 10 μ L PMSF(100 mmol·L⁻¹)的裂解液适量,裂解 30 min 后,于 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,将离心后的上清液用考马氏亮蓝法测定蛋白浓度,并进行 Western blot 试验。

2.4 统计学分析

所有数据均表示为 $\bar{x} \pm s$,采用 Excel 软件对各组数据进行处理。组间差异的比较采用 *t* 检验。

3 结果

3.1 PHGF 对 CCl₄ 所致肝损伤小鼠血清 ALT 和 AST, T-SOD 和 MDA 水平的影响

试验结果表明,肝损伤模型组血清中的 ALT 与 AST 的值显著高于空白对照组,PHGF 各剂量组血清中 ALT 与 AST 的值均显著低于肝损伤模型组,除 PHGF 12.5 mg·kg⁻¹ 剂量组的 AST 值之外,差异均具有统计学意义(*P*<0.05),但 PHGF 各剂量组 T-SOD 和 MDA 值与肝损伤模型组比较差异不具有统计学意义。结果见表 1 和表 2。

表 1 PHGF 对 CCl₄ 所致肝损伤小鼠血清 ALT, AST 水平的影响(*n*=12, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Effects of PHGF on ALT, AST level in mice of liver injury induced by CCl₄(*n*=12, $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ mg·kg ⁻¹	ALT/IU·L ⁻¹	AST/IU·L ⁻¹
空白对照组	—	53.1±16.2	115.9±40.6
肝损伤模型组	—	856.8±272.2 ¹⁾	650.0±346.5 ¹⁾
PHGF 组	12.5	623.0±279.0 ²⁾	479.6±308.4
	25	578.2±191.5 ²⁾	403.6±175.4 ²⁾
	50	403.5±249.9 ²⁾	229.8±119.0 ²⁾
永宁肝保胶囊组	14	384.7±245.64 ²⁾	278.3±222.2 ²⁾

注:与空白对照组相比,¹⁾*P*<0.01;与模型组相比,²⁾*P*<0.05

Note: Compared with normal group, ¹⁾*P*<0.01; compared with model group, ²⁾*P*<0.05

表 2 PHGF 对 CCl₄ 所致肝损伤小鼠血清 T-SOD, MDA 水平的影响(*n*=12, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Effects of PHGF on T-SOD, MDA level in mice of liver injury induced by CCl₄(*n*=12, $\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量/ mg·kg ⁻¹	T-SOD/U·L ⁻¹	MDA/nmol·mL ⁻¹
空白对照组	—	34.6±30.1	5.2±1.9
肝损伤模型组	—	68.2±22.3 ¹⁾	10.6±10.8 ¹⁾
PHGF 组	12.5	90.8±41.7	8.5±1.9
	25	63.6±33.1	5.8±1.1
	50	88.7±56.9	11.2±10.6
永宁肝保胶囊组	14	85.3±43.4	8.1±4.7

注:与空白对照相比,¹⁾*P*<0.05;与模型组相比,²⁾*P*<0.05

Note: Compared with normal group, ¹⁾*P*<0.01; compared with model group, ²⁾*P*<0.05

3.2 肝损伤小鼠肝组织 HE 染色病理切片观察

显微镜下观察不同组别中的肝组织切片,可见空白对照组的肝组织细胞排列整齐紧密,外形饱满,生长良好;肝损伤模型组肝组织细胞坏死明显;永宁肝保胶囊组肝组织细胞坏死情况明显好于肝损伤模型组;PHGF 的 50.0 mg·kg⁻¹ 剂量组

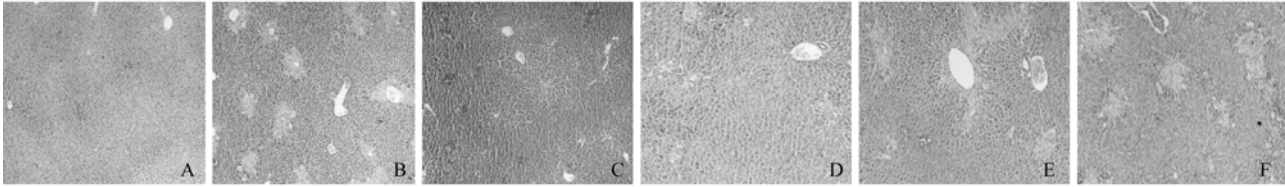


图1 小鼠肝组织病理学改变(200×)

A-空白对照组; B-肝损伤模型组; C-永宁肝保胶囊组; D-PHGF(50.0 mg·kg⁻¹); E-PHGF(25.0 mg·kg⁻¹); F-PHGF(12.5 mg·kg⁻¹)

Fig 1 Histopathological changes in mice livers(200×)

A-blank group; B-model group; C-Yongning capsule group; D-PHGF(50.0 mg·kg⁻¹); E-PHGF(25.0 mg·kg⁻¹); F-PHGF(12.5 mg·kg⁻¹)

表3 PHGF 对 CCl₄ 所致肝损伤小鼠肝病理组织学检查评分结果(n=8, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3 The pathological observation score of liver injury induced by CCl₄(n=8, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	平均分/视野
空白对照组	-	0.29±0.69
肝损伤模型组	-	2.00±1.17 ¹⁾
	12.5	2.03±0.44
PHGF 组	25.0	2.11±0.53
	50.0	0.78±0.06 ²⁾
永宁肝保胶囊组	14.0	0.93±0.70

注:与空白对照组相比, ¹⁾P<0.01;与模型组相比, ²⁾P<0.05

Note: Compared with nomal group, ¹⁾P<0.01; compared with model group, ²⁾P<0.05

3.3 PHGF对CCl₄肝损伤小鼠肝组织Bcl-2与Bax蛋白表达的影响

由结果可见,随着剂量的增加,Bcl-2与Bax的比值随之增加,和模型组比较,差异具有统计学意义(P<0.01),提示PHGF可能通过提高Bcl-2蛋白表达的同时降低Bax蛋白的表达来抑制损伤肝细胞的凋亡。结果见表4,图2。

表4 Bcl-2与Bax之间比值(n=3, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4 The ratio of Bcl-2 to Bax(n=3, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Bcl-2/β-actin	Bax/β-actin	Bcl-2/Bax
肝损伤模型组	-	0.210±0.009	0.319±0.019	0.672
	12.5	0.296±0.028 ¹⁾	0.257±0.025 ²⁾	1.129 ¹⁾
PHGF 组	25.0	0.328±0.008 ¹⁾	0.179±0.002 ¹⁾	1.693 ¹⁾
	50.0	0.491±0.023 ¹⁾	0.178±0.010 ¹⁾	2.897 ¹⁾

注:与模型组相比, ¹⁾P<0.01;与模型组相比, ²⁾P<0.05

Note: Compared with model group, ¹⁾P<0.01; compared with model group, ²⁾P<0.05

的肝组织细胞坏死情况要好于肝损伤模型组,效果接近于永宁肝保胶囊组;PHGF的25.0 mg·kg⁻¹剂量组肝组织细胞坏死情况要好于肝损伤模型组,但低于50.0 mg·kg⁻¹剂量组;PHGF的12.5 mg·kg⁻¹剂量组的肝组织细胞坏死情况接近于肝损伤模型组。结果见图1和表3。

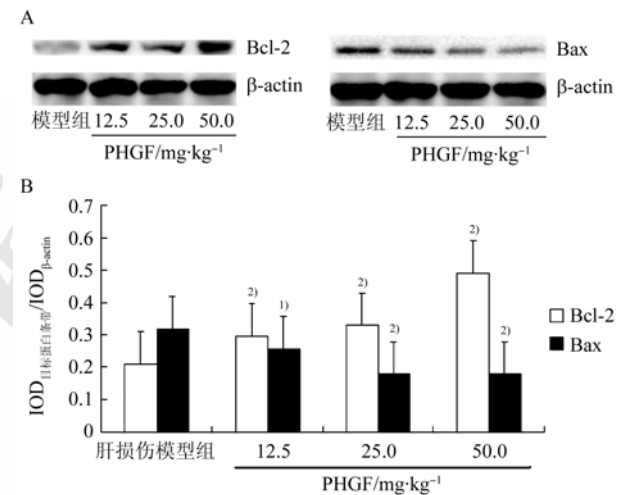


图2 PHGF对CCl₄肝损伤小鼠肝组织Bcl-2与Bax蛋白表达的影响(n=3, $\bar{x} \pm s$)

A-蛋白条带; B-蛋白相对表达量;与模型组相比, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

Fig 2 The effects of PHGF on Bcl-2 and Bax protein expression in tissue of injured liver induced by CCl₄ in mice (n=3, $\bar{x} \pm s$)

A-Western blot protein bands; B-statistical analysis of the relative protein level (IOD_{aim band}/IOD_{β-actin}); compared with model group, ¹⁾P<0.05, ²⁾P<0.01

4 讨论

从猪、牛和羊等哺乳动物的胚胎肝、新生肝或再生肝组织中提取到的PHGF是一类平均分子量为10 685 Da的多肽或蛋白,具有特异地促进肝细胞增生的生物学活性^[2]。与血源性肝细胞生长因子相比,其热稳定性和蛋白稳定性强并且能够明显刺激新生肝细胞的DNA合成,促进损伤的肝细胞线粒体、粗面内质网恢复,加快肝细胞组织的修复,改善肝脏枯否细胞的吞噬功能,防止来

自肠道的毒素对肝细胞的进一步损害,抑制TNF活性,从而促进肝坏死后修复。目前主要用于重症肝炎、慢性病毒性肝炎、肝硬化等的辅助治疗^[3]。

CCl₄ 是经典的化学性肝损伤动物模型的肝毒物,其进入体内后,受到肝微粒体酶活化成为三氯甲烷自由基(CCl₃·)。CCl₃·能迅速与 O₂ 结合,转化为过氧化三氯甲烷自由基(CCl₃O₂·),导致脂质过氧化,从而引起肝细胞膜的变性损伤,至使胞浆内可溶性酶如 ALT、AST 等渗漏以及各种类型的细胞病变,甚至坏死^[4]。肝细胞凋亡是肝损伤的一个基本特征,有资料显示,活性氧自由基作为肝细胞损伤的起始和调节因素可能通过直接或间接免疫机制导致肝细胞坏死或凋亡^[5]。已有相关研究发现 CCl₄ 可引起体外培养的肝细胞凋亡率增高^[6]。通过试验发现,PHGF 干预的各剂量组血清中 ALT 与 AST 的量要明显低于 PHGF 未干预的肝损伤模型组,但 T-SOD 和 MDA 的值与肝损伤模型组比较却没有显著性差异,其中,模型组的 T-SOD 值偏高,可能是由于肝细胞受到 CCl₄ 急性刺激后的应激反应所致,同时结果提示 PHGF 对 CCl₄ 所致的肝损伤小鼠肝脏有一定的保护作用,但不是直接的抗氧化作用。同时通过观察病理切片,可以看到,PHGF 干预的 50 mg·kg⁻¹ 与 25 mg·kg⁻¹ 剂量组的肝脏细胞坏死情况要明显好于 PHGF 未干预的肝损伤模型组。进一步通过 Western blot 实验,发现随着剂量的增加,各 PHGF 给药组 Bcl-2 与 Bax 的比值呈递增趋势,且显著高于肝损伤模型组的比值。提示 PHGF 在提高肝细胞 Bcl-2 表达的同一

时,降低 Bax 的表达。由此可得 PHGF 对化学性肝损伤的保护作用的机制可能是通过增加 Bcl-2 蛋白表达的同时,抑制 Bax 蛋白的表达,进而阻断细胞凋亡的线粒体途径,从而保护肝细胞不受损伤。

综上所述,PHGF 对化学性肝损伤小鼠肝脏具有一定的保护作用。其机制可能主要不是通过直接的抗氧化作用实现的,而是通过上调 Bcl-2 蛋白的表达,同时下调 Bax 蛋白的表达来阻止肝细胞在氧自由基影响下的细胞凋亡来实现的。

REFERENCES

- [1] LABRECQUE D R. Hepatic stimulator substance: discover, characteristics and mechanism of action [J]. Dig Dis Sci, 1991, 36(5): 669-673.
- [2] LI N, ZHAO X F, YU B B, et al. Controlled experiment on the effect of hepatocyte growth-promoting factors enteric-coated capsules or its injection on the liver regeneration in rats after hepatectomy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2008, 25(6): 495-498.
- [3] ZHENG L, CHEN Y G, YU Y S, et al. Effect of hepatocyte growth-promotion factors enteric-coated capsules on treatment of 72 cases with chronic viral hepatitis B [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2006, 23(1): 68-71.
- [4] WEI H, LÜ J H, ZHANG R, et al. Protective effect of matriner microemulsion and Kushenin capsule on acute hepatic injury in mice [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(12): 1057-1060.
- [5] ZHU H R, DOU Z H, LUO L, et al. Studies on anti-oxidation and anti-apoptosis effects on hepatocytes by the medicated serum of Compound Wurenchun Capsule [J]. Med J Commun (交通医学), 2008, 22(4): 335-337.
- [6] ZHOU T, YAN X C, YANG K, et al. Comparison of hepatocyte apoptosis induced by CCl₄ and LPS in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin(中国实验动物学报), 2007, 15(5): 348-350.

收稿日期: 2013-02-22

丹参素的大鼠在体肠吸收动力学研究

张怡¹, 屈勇^{2*} (1.武钢总医院药械中心, 武汉 430080; 2.湖北中医药大学, 武汉 430065)

摘要: 目的 研究丹参提取物中丹参素在小肠的吸收动力学特征。方法 采用大鼠在体肠回流实验, HPLC 测定药物浓度, 紫外分光光度法测定酚红浓度。结果 不同肠液 pH 值对丹参素的吸收无影响; 丹参素浓度在 2~16 μg·mL⁻¹ 内其吸收速率常数和最大吸收率均无明显差异; 不同小肠部位丹参素的吸收速率大小为: 十二指肠>空肠>结肠>回肠。结论 丹参素在肠道吸收呈一级动力学过程, 吸收机制为被动扩散, 丹参素在结肠、回肠吸收较好。

关键词: 丹参素; 吸收动力学; 高效液相色谱法

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)12-1295-05

作者简介: 张怡, 女, 硕士, 主管药师 Tel: 13995689736

E-mail: 331523309@qq.com

***通信作者:** 屈勇, 男, 硕士, 助理研究员

Tel: 13476290610 E-mail: 446711671@qq.com