

四氯化碳诱导肝损伤的分子机制及中药干预的研究进展

尹连红, 于浩, 彭金咏* (大连医科大学药学院, 辽宁 大连 116044)

摘要: 目前, 肝脏疾病已经成为威胁人类健康的常见疾病之一。四氯化碳(CCl_4)是一种常见的肝毒性化合物, 可诱导急性肝损伤、肝纤维化、肝硬化和肝癌等肝脏疾病的发生。 CCl_4 诱导的肝损伤实验动物模型被广泛应用于保肝药物的筛选, 且药理学研究发现许多中药对该类疾病具有良好的治疗作用。本文综述了近年来 CCl_4 诱导肝损伤的分子机制的研究进展和中药干预情况, 为进一步阐明肝脏疾病发生、发展的内在机制及其预防提供依据。

关键词: 四氯化碳; 肝损伤; 分子机制; 中药干预

中图分类号: R965.1; R285

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)09-1147-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.09.031

Molecular Mechanism and Intervention of Chinese Medicine of Carbon Tetrachloride Induced Liver Injury

YIN Lianhong, YU Hao, PENG Jinyong* (College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

ABSTRACT: Liver disease has become one of the common diseases threatening human health. Carbon tetrachloride (CCl_4) is a common compound for liver toxicity, which can induce liver diseases, such as acute liver injury, liver fibrosis, cirrhosis and liver cancer etc. Currently, the experimental animals with liver injury induced by CCl_4 have been widely used for screening liver protection drugs. Pharmacological researches find that many Chinese medicines have therapeutic effect on the diseases. The research progress of molecular mechanism and intervention of Chinese medicines of liver injury induced by CCl_4 are reviewed in this paper to provide a basis for clarifying the mechanism of liver disease and its prevention and treatment.

KEY WORDS: carbon tetrachloride; liver injury; molecular mechanism; intervention of Chinese medicine

肝脏是人的重要器官, 它是物质合成与代谢、能量产生和转换的重要枢纽。肝脏暴露于有害条件下可引起急性肝损伤, 长期作用可导致不可修复的损伤, 并发生代偿性修复, 即形成肝纤维化, 进一步可发展成肝硬化或肝癌。四氯化碳(CCl_4)是经典的诱导实验性肝损伤动物模型的外源性化合物, 常用于研究药物的药效和分子作用机制^[1-2], CCl_4 诱导的肝损伤与硫代乙酰胺诱导的肝损伤、酒精性肝损伤等相比, 更能准确地反应肝细胞功能、代谢及形态学变化, 重复性好且经济。近年来, 随着各种分子生物学技术的革新和发展, 人们对 CCl_4 诱导肝损伤的分子机制的研究更加广泛和深入。此外, 中药应用于肝脏疾病的预防和治疗已有数千年的历史, 具有提高免疫力, 调节肝脏功能, 改善肝脏血液循环, 有效修复肝

细胞损伤的作用, 对 CCl_4 诱导的肝损伤具有很好的治疗作用^[3]。本文从多方面对四氯化碳诱导急性肝损伤、肝纤维化、肝硬化和肝癌等肝脏疾患的发病机制进行简要叙述, 并简介中药在相应分子机制中的干预作用, 为进一步阐明肝脏疾患发生、发展的内在机制及其预防、治疗提供依据。

1 CCl_4 诱导的肝损伤与体内相关酶关系

肝脏组织含有的多种酶参与了 CCl_4 诱导的肝损伤, 见图 1。

1.1 转氨酶

肝脏是谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)的主要分布场所。当肝细胞受到破坏时, 肝细胞膜通透性升高, 引发 ALT 和 AST 大量外泄, 进而导致血清 ALT 和 AST 水平陡增。肝细胞和血

基金项目: 国家自然科学基金(81274195); 辽宁省教育厅高等学校创新团队(LT2013019)

作者简介: 尹连红, 女, 硕士, 讲师 Tel: (0411)86110417 E-mail: yinlianhong1015@163.com *通信作者: 彭金咏, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (0411)86110411 E-mail: jinyongpeng2005@163.com

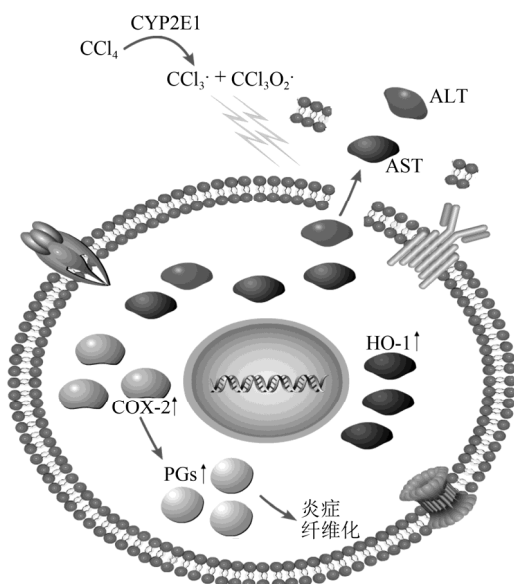


图1 CCl₄诱导的肝损伤与体内相关酶关系

Fig. 1 The relation between enzymes and CCl₄ induced liver injury

液中转氨酶水平相差较大,肝细胞内转氨酶的表达水平大约为血液中的100倍。因此,血清ALT和AST水平是临床检验肝脏损伤程度的常用指标^[4-5]。当机体摄入一定量的CCl₄时,会产生大量的亲电子基、自由基等活性代谢物,直接攻击内质网上的磷脂分子,引起膜脂质过氧化,改变膜的结构和功能,损伤肝细胞,导致细胞质内ALT和AST进入血液,结果机体血清中ALT、AST的含量升高。抗CCl₄所致肝损伤的中药中的绝大部分具有抗氧化和消灭自由基的作用,从而在一定程度上减轻肝细胞的损伤。据报道,板蓝根爬藤中含有各类黄酮,如芦丁、槲皮素和山奈酚等,具有抗炎、抗病毒、抗氧化的作用,其超细颗粒对CCl₄诱导的肝损伤具有显著的保护作用,可以抑制由CCl₄影响而增加的ALT和AST的酶活性^[6]。

1.2 血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)

血红素的分解代谢涉及到一种名为血红素加氧酶的限速酶,现已发现其主要分为3类:HO-1(诱导型)、HO-2(组成型)及尚未深入研究的HO-3。HO-1被确定为热休克蛋白32,它分布广泛并参与许多生理调节过程。HO-1不仅具有显著的细胞保护作用^[7-8],还具有抗炎、抗氧化和抗增殖的活性^[9]。血红素是一种经典的HO-1诱导剂,可诱导HO-1的产生,而且当受到氧化应激水平调节如氧化剂刺激、炎症、外源性物质的接触或电离辐射时,HO-1的表达水平显著升高^[10-11]。HO-1的表达与

CCl₄诱导的急性肝损伤高度相关。在给予CCl₄的大鼠肝脏中,HO-1的表达随内源性的IL-6和细胞色素P450衍生出的血红素的增加而迅速上调,以减少CCl₄诱导的肝损伤^[12-13]。中药可以通过增加HO-1的表达而保肝,如蓝玉簪龙胆的甲醇提取物、异鼠李素-3-O-半乳糖苷、柚皮苷等。

1.3 环氧化物酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)

环氧化物酶(cyclooxygenase, COX)即前列腺素合酶,是体内前列腺素(prostaglandins, PGs)合成的关键酶,参与了多种炎症反应的发生。COX存在2种同工酶,即组成性表达环氧合酶I(COX-1)和诱导性表达环氧合酶II(COX-2)。COX-2是启动炎症反应的关键酶,在正常细胞内仅有极低的活性。而当受到各种生物、物理和化学作用的损伤性刺激时,COX-2的表达被大量诱导,催化PGs合成,进而促进肝损伤后炎症反应发生。文献表明,CCl₄能诱导COX-2大量表达,合成大量的PGs,进而加重肝脏损伤^[14],同时,COX-2增加肝星形细胞的激活和增值,导致肝纤维化^[15]。抑制COX-2的表达则可减少PGs的生成,也就减少了炎症介质的产生,进而减轻了CCl₄诱导的肝损伤。Wei等^[16]发现从茶叶中提取的左旋茶氨酸可以通过抑制COX-2表达,减少胶原的产生,改善肝脏微循环,抵抗CCl₄诱导的肝损伤。

1.4 细胞色素P450(cytochrome P450, CYP450)

CYP450存在于机体内的大多数组织中,并发挥着激素(包括雌激素和睾丸激素)合成和分解、胆固醇的合成以及维生素D的代谢的重要作用。在肝脏中,CYP450也可代谢具有潜在毒性的化合物,包括药物和内源性代谢产物。因此,CYP450是CCl₄在体内进行代谢活化的主要酶^[17]。CYP450含有众多的家族和亚型,不同亚型CYP对于CCl₄的破坏作用有不同的敏感性。在同工酶中,P450II家族为细胞色素酶系的重要家族之一,其中CYP2E1在人和啮齿类动物的肝脏中表达差异较小,近年来受到学者的广泛关注^[18]。众多文献均报道CYP2E1可以代谢氯仿、丙酮、乙醇等小分子有机物,还有研究表明,在肝组织中CYP2E1的表达可能与CCl₄诱导型肝损伤有密切关系^[19]。CYP2E1可将CCl₄转化为毒性的代谢产物,这些毒性产物包括三氯甲基自由基(CCl₃·)和过氧化三氯甲基自由基(CCl₃O₂·)。这2种高毒性、高反应活性的中间体能损伤DNA和生物膜,还能引起脂类

过氧化降解,诱导肝细胞的基因表达状态改变,同时导致胞内外钙离子浓度变化,最终诱发化学性肝损伤,且代谢的毒性物质还可以破坏体内重要的抗氧化酶如谷胱甘肽还原酶等。研究发现^[20-21],中药及中药复方通过调控 CYP2E1 防治 CCl₄ 所致的化学性肝损伤。如老鼠簕在我国民间主要用于治疗急慢性肝炎、胃痛、咳嗽和哮喘等疾病,近

年来研究表明,老鼠簕的生物碱提取物能通过抑制 CYP2E1 的酶活性抑制 CCl₄ 转化为毒性的代谢产物,从而发挥保肝作用^[22]。

2 CCl₄ 诱导的肝损伤与炎症因子的关系

CCl₄ 诱导肝损伤的过程中,肝脏组织细胞分泌大量的炎症因子引起炎症反应,促进肝脏损伤,作用机制见图 2。

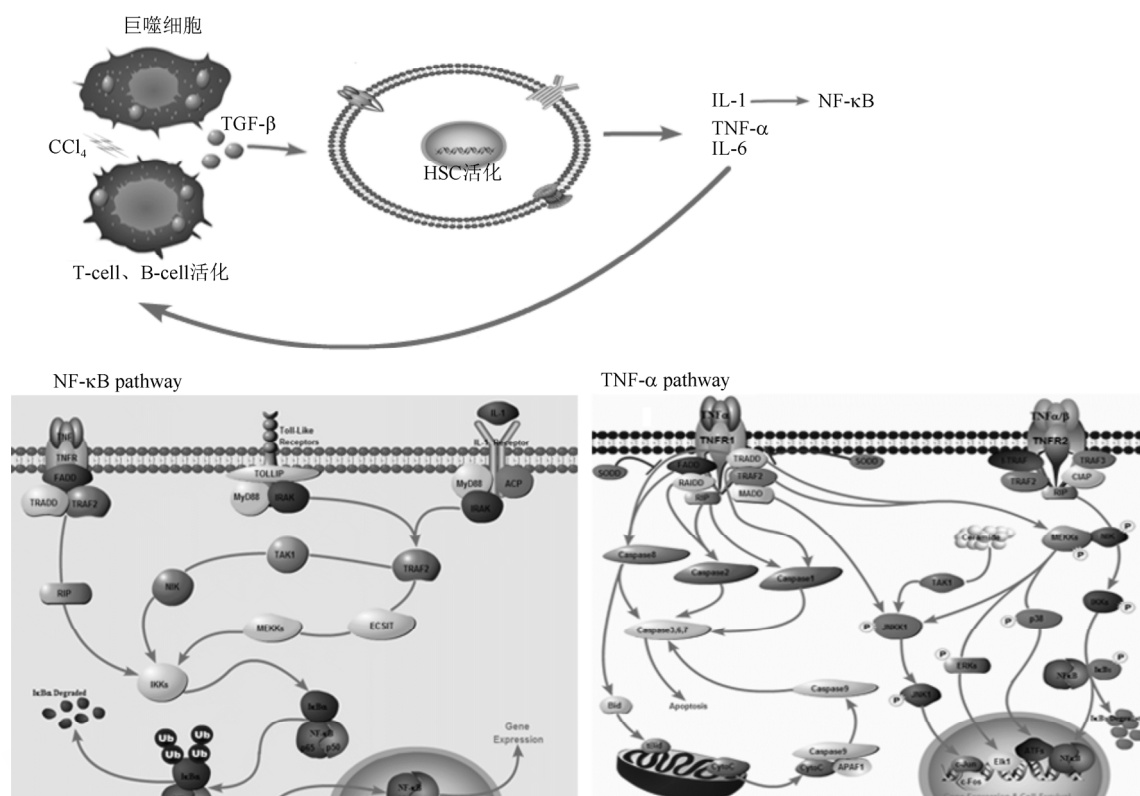


图 2 CCl₄ 诱导的肝损伤与炎症因子的关系

Fig. 2 The relation between inflammatory factors and CCl₄ induced liver injury

2.1 肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)

TNF 是 1 种细胞因子,因其具有杀伤肿瘤的作用,故被命名为肿瘤坏死因子。TNF-α 主要在巨噬细胞中产生,在某些因素刺激下,天然杀伤细胞和 T 细胞也能合成并分泌 TNF-α。有研究表明^[23-24],给予试验动物 CCl₄,可使血清和肝脏组织中 TNF-α 水平显著升高,TNF-α 可以刺激单核细胞等免疫相关细胞产生大量细胞因子,如 IL-1、IL-6、IL-8 等,引起局部炎症反应;TNF-α 通过选择性地与 p55TNF 受体结合,激活 p55 细胞内相关死亡区域的细胞内蛋白^[25];TNF-α 的过表达能激活细胞中的半胱氨酸蛋白酶家族,最终诱导细胞凋亡,导致肝脏的损伤。近年来广泛开展了中药

治疗肝损伤的研究,其中穿山龙具舒筋活血、止咳化痰、祛风止痛等功效。现代研究表明,该药的主要活性成分穿山龙总皂苷可通过抑制肝脏组织中 TNF-α 的表达,对 CCl₄ 诱导的肝损伤具有较好的保护作用^[13];氧化槐定碱是从传统中药——豆科植物苦豆子中提取的生物碱类成分,具有抗氧化、抗炎和中枢镇静的药理作用,对 CCl₄ 所致的小鼠肝损伤具有一定的保护作用,可以显著降低血清中的 TNF-α 的含量,其作用机制可能与抑制炎症因子的表达有关^[26]。

2.2 白介素(interleukin, IL)

白介素作为非常重要的细胞因子家族,既是重要的炎症介质,又是重要的免疫调节因子,对肝脏损伤具有免疫调节作用,从而影响肝脏的纤

维化进程。目前已证明 IL-1、IL-6、IL-8 具有明显的促肝纤维化作用,而 IL-4、IL-10 具有抗肝纤维化作用^[27-28]。IL-1 属于小分子量细胞因子,分为 IL-1 α 和 IL-1 β 2 种亚型。当机体受到内毒素、免疫复合物、物理性损伤等因素的刺激时,可以分泌出大量的 IL-1 细胞因子。文献表明,IL-1 β 与 CCl₄ 诱导的肝损伤高度相关^[29]。IL-1 可诱导核因子 NF- κ B 和 AP-1 的表达,上调 COX-2 的表达,产生大量的 PGE₂,还可以刺激诱导型 PLA₂ 的转录,继而引起花生四烯酸释放,产生大量的炎症因子,对肝脏有损伤作用。IL-6 是一种多功能细胞因子,参与肝免疫调节、急性相蛋白反应、代谢等过程^[30]。在炎症的发生、发展中,IL-6 对于不同的细胞类型发挥不同的作用,它不仅可以促进 B 和 T 淋巴细胞的活化,而且可以诱导内皮细胞产生趋化因子、促进内皮细胞的浸润,最终发挥促炎症作用。据报道,在 CCl₄ 肝损伤模型中,IL-6 的表达明显升高,且现代研究发现,中药在治疗肝脏疾病的过程中,可以有效的减少炎症细胞因子的增生^[31],如洋苏草提取物(200 mg·kg⁻¹)可以有效减少 CCl₄ 诱导的肝损伤大鼠模型 IL-1 42%~74%、IL-6 67%~83%^[32]。

IL-4 和 IL-10 这 2 种细胞因子在抗炎症的过程中发挥了关键作用,它们能抑制 Th1 细胞活化,同时还能增强 Th2 细胞的功能,起到平衡这 2 种细胞的作用^[33]。在炎症发生发展过程中,IL-4 以自分泌的形式促进 γ 干扰素的生成,并诱导 Th2 细胞分化,同时抑制 Th1 细胞的应答和增殖,加速 I 型胶原分泌并促进组织损伤的修复^[34]。而 IL-10 则主要通过调节或抑制 IL-1、IL-6 和 IL-12 等促炎症细胞因子的表达水平而控制炎症发生、发展。文献报道,CCl₄ 诱导的肝损伤与 IL-4、IL-10 有关,但具体的机制尚不明确,需要进一步研究^[35]。

2.3 转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)

TGF- β 是一种重要的免疫调节促纤维化细胞因子,主要由实质细胞产生,具有维持 T 细胞稳态及自身耐受等多种生物作用,它的异常表达能导致多种疾病发生^[36]。在炎症和损伤过程中,淋巴细胞、单核和巨噬细胞等都有 TGF- β 表达,TGF- β 通过调节免疫细胞的增殖、活化及分化抑制炎症反应^[37]。实验证实 CCl₄ 造成的肝损伤模型组的 TGF- β 表达水平较正常组显著升高^[38-39],其

机制可能为 TGF- β 首先活化了肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC),随之 HSC 促进星状细胞增殖,产生大量细胞外基质,进而引发肝纤维化,加重了肝脏的损伤。因此,抑制 TGF- β 的功能或合成可以做为肝损伤治疗的策略。文献报道^[40-41],天然植物提取物紫花前胡素可有效阻断 CCl₄ 诱导的肝损伤,在体外抑制 TGF- β 1 介导的 HSC 的激活,通过阻断 TGF- β 介导的还原型辅酶 II 氧化酶的活化和 Smad 信号而减轻肝纤维化。传统的中草药配方——复方六月青可显著减轻 CCl₄ 诱导的肝损伤,它能够显著减少脂质过氧化反应,强化抗氧化防御系统,通过下调 bcl-2 mRNA 的表达诱导 HSC 凋亡,并有效抑制 TGF- β 1 蛋白的表达。

2.4 NF- κ B

近年来,细胞核因子的研究已成为探讨 CCl₄ 诱导肝损伤的分子机制的新热点。转录因子 NF- κ B 在控制炎症基因表达的过程中发挥了关键的作用,它通过协调多种白细胞黏附分子及可溶性前炎症介质的表达而引发炎症反应。I κ B 激酶(I κ B kinase, IKK)复合物是 NF- κ B 的激活剂,可使 I κ B 磷酸化而易于被蛋白酶体降解。I κ B 的降解使 NF- κ B 作用于 IKK 复合物的激活和接续的 I κ B 的降解,NF- κ B 向细胞核转位,与相关基因启动子的顺式作用元件结合,激活转录。很多炎症相关基因在启动子中都有功能 κ B 位点,能与 NF- κ B 相互作用。很多文献表明^[42-45],在 CCl₄ 引起的急性肝损伤中,NF- κ B 的表达会升高,激活的 NF- κ B 又可产生大量的炎症因子如 TNF- α 、COX-2、IL-6 和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)等。因此,IKK 的抑制剂能通过抑制 NF- κ B 激活,而减少炎症因子的产生。研究表明,中药及其有效成分可通过抑制 NF- κ B 活性而发挥其抗炎作用。丹参的活性化学成分可能是通过抑制枯否细胞中 p38 和 NF- κ B 信号传导实现对 CCl₄ 诱导的肝损伤的保护作用^[46];叶下珠属植物中提取的叶下珠脂素通过下调 TNF- α /NF- κ B 及 TGF- β 1 介导的炎症信号传导抑制 CCl₄ 介导的氧化应激和肝纤维化^[47];乌索酸是一种天然的五环三萜系化合物,可有效地减少有丝分裂原活化蛋白激酶,从而灭活 CCl₄ 诱导的肝损伤小鼠肝脏中的 NF- κ B,即乌索酸通过调节 MAPK/NF- κ B 信号传导通路发挥抗 CCl₄ 诱导的氧化应激和炎症反应^[48]。

3 CCl₄ 诱导的肝损伤与氧化应激的关系

游离基又称为自由基, 其中氧源性自由基及前体自由基称为活性氧(reactive oxygen species, ROS), 体内 ROS 的生成与清除能力基本平衡。细胞或组织的氧化还原处于稳定状态, 称之为氧化还原稳态平衡。一旦平衡遭到破坏, 或是由于 ROS 的生成过多, 或是由于 1 种或多种抗氧化系统的能力降低, 引起氧化还原的信号稳态失去平衡, 导致某些生理功能的改变, 称为氧化应激。如前所述, CCl₄ 经肝细胞微粒体中的细胞色素 P450 酶系代谢, 能产生 Cl[•] 和 CCl₃[•] 而引起肝微粒体脂质的过氧化, 随后攻击位于肝细胞膜的磷脂分子, 引起细胞膜脂质过氧化反应和直接破坏细胞膜完整性, 导致肝细胞变性坏死^[49-50]。脂质在过氧化过程中会产生丙二醛(malondialdehyde, MDA), 它能与膜蛋白酶结合变性, 同时增加膜通透性, 改变细胞膜代谢、功能和结构, 对机体造成进一步损害^[51]。在肝组织中, MDA 的含量不仅反映了肝细胞生物膜脂质过氧化的严重程度, 还反映了肝脏疾病的严重程度。过氧化氢酶(catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等抗氧化酶以及有抗氧化性的小分子有机物如维生素 C、谷胱甘肽(glutathione, GSH)及维生素 E 等能清除或淬灭 ROS, 而减轻 ROS 引起的损伤。SOD 是生物体内极其重要的 ROS 清除剂^[52-53], 与 ROS 的浓度正相关; GSH-Px 能将有毒的过氧化氢还原成 2 分子水, 从而阻止了生物膜结构和功能遭到 ROS 的破坏; 机体清除 ROS 的能力可通过 SOD 和 GSH-Px 活性来反映^[54]。因此, 通过检测肝组织中 MDA、SOD 和 GSH-Px 的含量, 能很好地检测肝细胞的损伤程度。中药及其提取物对 CCl₄ 诱导的肝损伤具有显著的抗氧化和保肝活性, 这可能是由于其抑制脂质过氧化酶和增加抗氧化酶的活性的作用。穿破石为桑科柘属植物构棘或柘树的根, 其水和醇提取物能显著降低肝组织中 MDA 的含量和提高 SOD 的活性, 能够对抗 CCl₄ 所产生的脂质过氧化作用, 从而发挥保肝作用^[55]。

除 ROS 外, 活性氮自由基(reactive nitrogen species, RNS)也是一类重要的自由基。一氧化氮(NO)及其在生物体内的激发产物统称为 RNS。NO 是多功能分子, 它由一氧化氮合酶氧化 L-精氨酸

而生成, 在体内起到生理信使和病理损伤的双重作用^[56]。低浓度的 NO 可以调节肝脏微循环功能, 而高浓度的 NO 可以产生明显的肝细胞毒性, 可以导致缺血再灌注性肝细胞损伤。最近有研究表明^[57], CCl₄ 诱导的肝损伤中, iNOS 表达的增强可引起 NO 含量上升, 可能是 NO 与超氧负离子(O₂⁻)反应, 缩合成过氧亚硝酸根(ONOO⁻), 导致生物膜脂质过氧化, 使细胞功能和结构发生异常, 造成组织发生继发性病理改变, 进而引起肝损伤^[58-59]。CCl₄ 诱导的肝损伤与氧化应激的关系见图 3。研究证实, 从海带中提取的海带多糖具有降血糖、降低血脂等作用, 海带多糖可以显著降低 NO 含量和 iNOS 的活性, 从而降低 CCl₄ 所引起的脂质过氧化的程度, 对 CCl₄ 诱导的小鼠肝损伤有一定的保护作用^[60]。芝麻素是从芝麻提取的主要木酚素之一, 可通过 JNK 信号通路抑制 CCl₄ 诱导的氧化应激而导致的细胞凋亡。

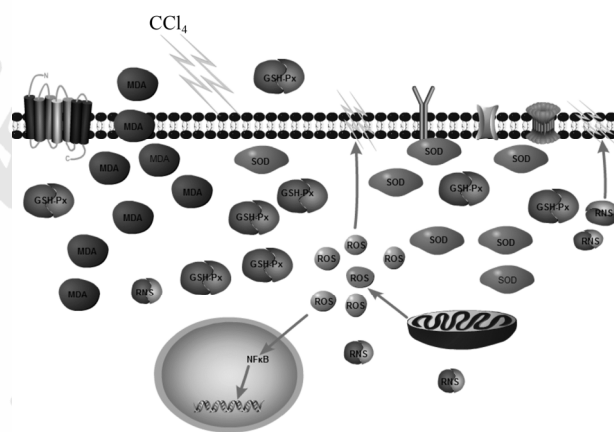


图 3 CCl₄ 诱导的肝损伤与氧化应激的关系

Fig. 3 The relation between oxidative stress and CCl₄ induced liver injury

4 CCl₄ 诱导的肝损伤与细胞凋亡的关系

细胞凋亡是细胞的一种自主性、程序性死亡方式, 其过程涉及到多种基因及蛋白的激活、表达或调控, 有利于维持机体内环境的稳定。肝细胞凋亡即为自身程序性细胞死亡, 是肝损伤发展的一个重要因素, 在其发生过程中会出现胞体变小、胞质变致密、核固缩或消失等现象。了解 CCl₄ 诱导的肝细胞凋亡的作用机制是治疗肝损伤的重要步骤之一。介导细胞凋亡的信号通路有很多种, 包括受体介导的细胞凋亡途径、传统信号介导的细胞凋亡途径、线粒体介导的细胞凋亡途径以及其他介导途径^[61]。

文献指出, CCl_4 诱导的肝细胞凋亡与线粒体通路相关, 见图 4。在线粒体介导的细胞凋亡途径中, 细胞色素 C 的释放是凋亡发生的关键, 也是线粒体参与凋亡的主要方式。当线粒体损伤时, 线粒体膜电位崩溃、线粒体通透性改变等都将促进细胞色素 C 释放到细胞质中, 导致细胞凋亡^[62]。在 dATP 的条件下, 细胞色素 C 作为辅助因子与凋亡相关因子-1 结合, 形成星形多聚体, 随后剪切活化 pro-caspase-9, 而活化的 caspase-9 可以进一步激活其下游的半胱天冬酶, 如 caspase-3 等^[63-64]。caspase-3 又可以剪切 PARP 蛋白而使之失活, 形成 cleaved-PARP 碎片。因此, 对 PARP 碎片的分析成为了检测细胞凋亡程度的手段之一^[65]。

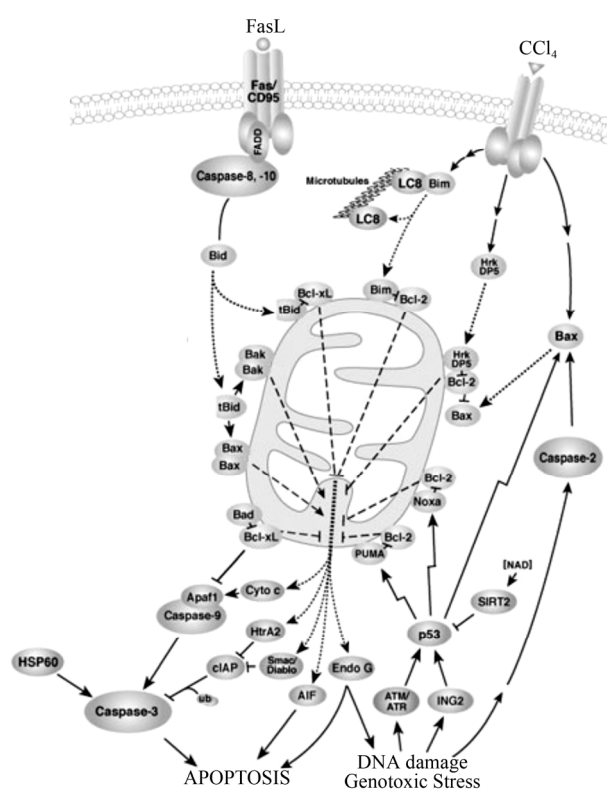


图 4 CCl_4 诱导的肝细胞凋亡与线粒体通路的关系

Fig. 4 The relation between mitochondrial pathway and apoptosis of hepatic cells induced by CCl_4

此外, Bcl-2 家族在 CCl_4 诱发的线粒体凋亡途径中也起到了关键作用, Bax、Bak 和 PARP 的表达水平显著提高, 而 Bcl-2 的表达水平显著下降^[66-67]。Bcl-2 家族包含众多成员, 如 Mcl-1、Bcl-x、Bcl-2、Bcl-w、Bcl-xl、Bax、Bak、Bad 和 Bim 等。目前, 人们对 Bcl-2 和 Bcl-xl 这 2 种抗凋亡蛋白的研究较多。其中, Bcl-2 主要分布于线粒体外膜、内质网以及核膜上, 它通常与腺嘌呤核苷酸移位酶等线

粒体蛋白相互作用以维持线粒体膜的完整性, 从而阻止细胞色素 C 从线粒体释放进入胞浆而发挥抗凋亡作用^[68]。此外, 细胞核内 GSH 的累积可能与 Bcl-2 过表达有关, 胞核内的 GSH 能显著降低 caspase 的活性, 从而抑制细胞凋亡。Bcl-2 家族各成员之间通过形成同源或异源二聚体而实现功能的调节。Bax 是 Bcl-2 家族中的另一重要成员, 它也参与凋亡发生的过程。在细胞凋亡的早期, Bax 可从胞浆逐渐向线粒体膜及核膜转移并嵌入磷脂双分子层, 并与自身形成同源二聚体。Bcl-2 与 Bax 的含量比值也是说明细胞凋亡状况的重要参数之一^[69]。而 Bak 或 tBid 之间形成异源二聚体发挥作用, 可以破坏线粒体的双层膜结构, 增加通透性, 促进细胞色素 C 的释放^[70]。只具有 BH3 结构的蛋白, 具有诱导细胞发生凋亡的作用, 例如 Bid。当细胞受到外源性凋亡信号的刺激后, caspase-8 被激活, 进而将 Bid 剪切成 tBid 片段, 而 tBid 通过改变线粒体膜的通透性, 进而促进细胞色素 C 的释放, 相关凋亡信号激活并放大, 最终引起细胞凋亡^[71]。研究证实^[72-73], 中药及其有效成分可通过不同的信号通路抑制 CCl_4 所致动物肝细胞凋亡而发挥保肝作用。

5 CCl_4 诱导的肝损伤与自噬作用的关系

在真核细胞中, 自噬是一种广泛存在并且高效的物质降解途径, 通过将细胞自身的胞浆蛋白或细胞器包被入囊泡, 并与溶酶体融合形成自噬溶酶体, 消化清除自身多余和受损的细胞器或蛋白, 以维持细胞内环境的稳态及细胞内物质的再循环进程。基础功能的自噬存在于所有细胞中, 并调节许多生理过程, 如清除胞质内代谢产物、维持细胞正常代谢和保持细胞内环境稳态等。自噬体的形成代表自噬, 如 LC3 在自噬体膜上特异性表达, 是用于检测自噬的标志^[74]。此外, 自噬基因 Beclin 1 是促进自噬的另一个重要因素。自噬是一种常规代谢途径, 并可通过多条信号通路进行调节, 如 MAPK、AMPK 以及 PI3K/AKT 信号通路等。近期文献表明^[75-76], 肝脏疾病与细胞自噬作用高度相关, 特别是在酒精、D-氨基半乳糖与脂多糖联用、对乙酰氨基酚(acetyl aminophenol, APAP)、刀豆球蛋白 A(concanavalin, Con A)等诱导的急性肝损伤方面, 但作用和机制并不完全一致。自噬在酒精和 APAP 诱导的急性肝损伤中主要通过清除受损的线粒体而发挥保护性作用^[77],

而在 Con A 诱导的急性肝损伤中, 自噬具有促进细胞死亡的作用^[78]。文献报道^[79], 自噬通过脂滴降解为肝星形细胞提供能量而加剧肝纤维化, 且在 CCl₄ 诱导的肝纤维化组织中, 自噬水平上调。随着新药研发进程的加快, 以及细胞自噬与肝脏疾病相关性研究的深入, 采用中药及其有效成分调节自噬作用以治疗 CCl₄ 等化学物质诱发的肝损伤将会成为可能。研究表明, 虾青素可以有效降低 LC3 和 Beclin1 基因的表达, 减少自噬体数目, 使肝星形细胞中自噬水平下调, 从而抑制肝星形细胞的活化。

综上所述, CCl₄ 诱导肝损伤涉及体内重要酶的活化、炎症介质释放、氧化应激、细胞凋亡和自噬等多种分子机制, 并且各种机制之间还存在相互影响。随着科技的发展, 对 CCl₄ 肝损伤机制的认识会逐渐加深, 为深入了解人类肝脏疾病发病机制奠定基础。CCl₄ 诱导肝损伤将会在治疗肝病的药物研发过程中扮演极其重要角色, 为寻找有效的保肝药物提供模型。在此过程中, 了解中药、中药有效成分和中药复方制剂对 CCl₄ 诱导肝损伤的治疗作用及机制, 有助于推动肝病中药治疗的现代化进程。

REFERENCES

- [1] YANG X, DONG C, REN G. Effect of soya saponins-rich extract from soybean on acute alcohol-induced hepatotoxicity in mice [J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(4): 1138-1144.
- [2] XU J Y, SU Y Y, CHENG J S, et al. Protective effects of fullerene on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats [J]. Carbon, 2010, 48(5): 1388-1396.
- [3] HAZEM S H, SHAKER M E, ASHAMALLAH S A, et al. The novel Janus kinase inhibitor ruxolitinib confers protection against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity via multiple mechanisms [J]. Chem Biol Interact, 2014, 220: 116-127.
- [4] HUANG G J, DENG J S, HUANG S S, et al. Hepatoprotective effects of eburicoic acid and dehydroeburicoic acid from *Antrodia camphorata* in a mouse model of acute hepatic injury [J]. Food Chem, 2013, 141(3): 3020-3027.
- [5] YUE S, HU B, WANG Z, et al. *Salvia miltiorrhiza* compounds protect the liver from acute injury by regulation of p38 and NF- κ B signaling in Kupffer cells [J]. Pharm Biol, 2014, 52(10): 1278-1285.
- [6] CAO G, LI Q, CHEN X, et al. Hepatoprotective effect of superfine particles of herbal medicine against CCl₄-induced acute liver damage in rats [J]. Biomed Res Int, 2014, 934732. Doi: 10.1155/2014/934732.
- [7] KAPITULNIK J. Bilirubin: an endogenous product of heme degradation with both cytotoxic and cytoprotective properties [J]. Mol Pharmacol, 2004, 66(4): 773-779.
- [8] SEO K, YANG J H, KIM S C, et al. The antioxidant effects of isorhamnetin contribute to inhibit COX-2 expression in response to inflammation: a potential role of HO-1 [J]. Inflammation, 2014, 37(3): 712-722.
- [9] KIM Y S, ZERIN T, SONG H Y. Antioxidant action of ellagic acid ameliorates paraquat-induced A549 cytotoxicity [J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36 (4): 609-615.
- [10] LEE I C, KIM S H, BAEK H S, et al. The involvement of Nrf2 in the protective effects of diallyl disulfide on carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative damage and inflammatory response in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2014, 63: 174-185.
- [11] WANG Y P, CHENG M L, ZHANG B F, et al. Effects of blueberry on the expression patterns of heme oxygenase-1 in rats with hepatic fibrosis [J]. Chin J Hepat (中华肝脏病杂志), 2010, 18(9): 656-660.
- [12] KIM D W, CHO H I, KIM K M, et al. Isorhamnetin-3-O-galactoside protects against CCl₄-induced hepatic injury in mice [J]. Biomol Ther (Seoul), 2012, 20(4): 406-412.
- [13] YU H, ZHENG L, YIN L, et al. Protective effects of the total saponins from *Dioscorea nipponica* Makino against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 19(2): 233-244.
- [14] DONG D S, ZHANG S, YIN L, et al. Protective effects of the total saponins from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. Food Chem Toxicol, 2013, 62: 120-130.
- [15] HUANG G J, DENG J S, HUANG S S, et al. Hepatoprotective effects of eburicoic acid and dehydroeburicoic acid from *Antrodia camphorata* in a mouse model of acute hepatic injury [J]. Food Chem, 2013, 141(3): 3020-3027.
- [16] JIANG W, GAO M, SUN S, et al. Protective effect of L-theanine on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 422(2): 344-350.
- [17] GEETHA S, JAYAMURTHY P, PAL K, et al. Hepatoprotective effects of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) against carbon tetrachloride induced liver injury in rats [J]. J Sci Food Agric, 2008, 88(9): 1592-1597.
- [18] CEMEK M, AYMELEK F, BÜYÜKOKUROĞLU M E, et al. Protective potential of *Royal Jelly* against carbon tetrachloride induced-toxicity and changes in the serum sialic acid levels [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(10): 2827-2832.
- [19] ZHANG C, WEI Q, JIANG T, et al. Liver cancer-related gene CYP2E1 expression in HBV transgenic mice with acute liver injury [J]. Tumour Biol, 2014, 35(4): 3671-3677.
- [20] JIA R, CAO L P, DU J L, et al. Effects of carbon tetrachloride on oxidative stress, inflammatory response and hepatocyte apoptosis in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Aquat Toxicol, 2014, 152: 11-19.
- [21] DAI N, ZOU Y, ZHU L, et al. Antioxidant properties of proanthocyanidins attenuate carbon tetrachloride (CCl₄)-induced steatosis and liver injury in rats via CYP2E1 regulation [J]. J Med Food, 2014, 17(6): 663-669.
- [22] LIN J, ZHAO J, LI T, et al. Hepatoprotection in a rat model of acute liver damage through inhibition of CYP2E1 activity by total alkaloids extracted from *Rubus alceifolius* Poir [J]. Int J Toxicol, 2011, 30(2): 237-243.
- [23] LIN X, HUANG R, ZHANG S, et al. Methyl helicterate protects against CCl₄-induced liver injury in rats by inhibiting oxidative stress, NF- κ B activation, Fas/FasL pathway and cytochrome P4502E1 level [J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50 (10): 3413-3420.
- [24] DOMITROVIĆ R, JAKOVAC H, BLAGOJEVIĆ G. Hepatoprotective activity of berberine is mediated by inhibition of TNF- α , COX-2 and iNOS expression in

- CCl₄-intoxicated mice [J]. Toxicology, 2011, 280(1/2): 33-43.
- [25] SHIBATA H, YOSHIOKA Y, OHKAWA A, et al. The therapeutic effect of TNFR1-selective antagonistic mutant TNF- α in murine hepatitis models [J]. Cytokine, 2008, 44(2): 229-233.
- [26] 马琳, 张玉玲, 刘红梅, 等. 氧化槐定碱对四氯化碳致极性肝损伤小鼠 TNF- α 和 COX-2 表达的干预作用[J]. 宁夏医科大学学报, 2011, 33(7): 622-624, 702.
- [27] JIANG H, WANG Y Z, LIU X C, et al. Effect of *Panax notoginseng* saponins on cytokines in liver fibrosis rats [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2013, 36(7): 1123-1127.
- [28] DONG W, LV B, WEI F, et al. Recombinant bovine pancreatic trypsin inhibitor protects the liver from carbon tetrachloride-induced chronic injury in rats [J]. Pharm Biol, 2013, 51(10): 1298-1303.
- [29] WANG Y H, XU X J, LI H L. Hepatoprotective effects of Mimic of Manganese superoxide dismutase against carbon tetrachloride-induced hepatic injury [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 22(1): 126-132.
- [30] LU B, XU Y, XU L, et al. Mechanism investigation of dioscin against CCl₄-induced acute liver damage in mice [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2012, 34(2): 127-135.
- [31] PRASHANT D, PRASAD P, KAKASAHEB R, et al. 'Ashvagandharishita' prepared using yeast consortium from *Woodfordia fruticosa* flowers exhibit hepatoprotective effect on CCl₄ induced liver damage in Wistar rats [J]. J Ethnopharm, 2014, 151(1): 183-190.
- [32] YUE S, HU B, WANG Z, et al. *Salvia miltiorrhiza* compounds protect the liver from acute injury by regulation of p38 and NF κ B signaling in Kupffer cells [J]. Pharm Biol, 2014, 52(10): 1278-1285.
- [33] OBREMSKI K. Changes in Th1 and Th2 cytokine concentrations in ileal Peyer's patches in gilts exposed to zearalenone [J]. Pol J Vet Sci, 2014, 17(1): 53-59.
- [34] RONCAROLO M G, GREGORI S, BACCHETTA R, et al. Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2014, 380: 39-68.
- [35] QIU H, YAN Y, XING J, et al. Adenovirus-mediated dual gene expression of human interleukin-10 and hepatic growth factor exerts protective effect against CCl₄-induced hepatocyte injury in rats [J]. Dig Dis Sci, 2012, 57(7): 1857-1865.
- [36] HE H, XU H P, HUA H Y. Effects of curcumin on expression of TGF- β 1 and Caspase-3 in hepatic fibrotic rats induced by carbon tetrachloride [J]. J Fourth Mil Med Univ(第四军医大学学报), 2009, 30(2): 100-103.
- [37] FAN X, ZHANG Q, LI S, et al. Attenuation of CCl₄-induced hepatic fibrosis in mice by vaccinating against TGF- β 1 [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e82190. Doi: 10.1371/journal.pone.0082190.
- [38] LI J, LI X, XU W, et al. Antifibrotic effects of luteolin on hepatic stellate cells and liver fibrosis by targeting AKT/mTOR/p70S6K and TGF β /Smad signalling pathways [J]. Liver Int, 2015, 35(4): 1222-1233.
- [39] TU X, ZHENG X, LI H, et al. MicroRNA-30 protects against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis by attenuating transforming growth factor beta signaling in hepatic stellate cells [J]. Toxicol Sci, 2015, 146(1): 157-169.
- [40] CHOI Y J, KIM D H, KIM S J, et al. Decursin attenuates hepatic fibrogenesis through interrupting TGF- β -mediated NAD(P)H oxidase activation and Smad signaling *in vivo* and *in vitro* [J]. Life Sci, 2014, 108(2): 94-103.
- [41] LIN X, ZHANG S, HUANG Q, et al. Protective effect of Fufang-Liu-Yue-Qing, a traditional Chinese herbal formula, on CCl₄ induced liver fibrosis in rats [J]. J Ethnopharm, 2012, 142(2): 548-556.
- [42] SHAN W, NICOL C J, ITO S, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta protects against chemically induced liver toxicity in mice [J]. Hepatology, 2008, 47(1): 225-235.
- [43] SUN B, KARIN M. NF- κ B signaling, liver disease and hepatoprotective agents [J]. Oncogene, 2008, 27 (48): 6228-6244.
- [44] LIN P Y, SHEN H C, CHEN C J, et al. The inhibition in tumor necrosis factor- α -induced attenuation in endothelial thrombomodulin expression by carvedilol is mediated by nuclear factor- κ B and reactive oxygen species [J]. J Thromb Thrombolysis, 2010, 29(1): 52-59.
- [45] LUEDDE T, SCHWABE R F. NF- κ B in the liver-linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8(2): 108-118.
- [46] YANG C, YANG Z, ZHANG M, et al. Hydrogen sulfide protects against chemical hypoxia-induced cytotoxicity and inflammation in HaCaT cells through inhibition of ROS/NF- κ B/COX-2 pathway [J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21971. Doi: 10.1371/journal.pone.0021971.
- [47] KRITHIKA R, JYOTHILAKSHMI V, VERMA R J. Phyllanthin inhibits CCl₄-mediated oxidative stress and hepatic fibrosis by down-regulating TNF- α /NF- κ B and pro-fibrotic factor TGF- β 1 mediated inflammatory signaling [J/OL]. Toxicol Ind Health, 2014[2014-12-01]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24817434>.
- [48] MA J Q, DING J, ZHANG L, et al. Ursolic acid protects mouse liver against CCl₄-induced oxidative stress and inflammation by the MAPK/NF- κ B pathway [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2014, 37(3): 975-983.
- [49] ROSILLO M A, SANCHEZ-HIDALGO M, CÁRDENO A, et al. Protective effect of ellagic acid, a natural polyphenolic compound, in a murine model of Crohn's disease [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(7): 737-745.
- [50] JEONG H W, HSU K C, LEE J W, et al. Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2009 296(4): E955-964. Doi: 10.1152/ajpendo.90599.2008.
- [51] LI X W, ZHU R, LI B, et al. Mechanism underlying carbon tetrachloride-inhibited protein synthesis in liver [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(31): 3950-3956.
- [52] AMIN A, MAHMOUD-GHONEIM D. *Zizyphus spina-christi* protects against carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(8): 2111-2119.
- [53] SAAD E A. Curative and protective effects of L-arginine on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 423(1): 147-151.
- [54] TSAI J C, PENG W H, CHIU T H, et al. Hepatoprotective effect of *Scoparia dulcis* on carbon tetrachloride induced acute liver injury in mice [J]. Am J Chin Med, 2010, 38(4): 761-775.
- [55] JIN J J, ZHONG M, YU S M, et al. Protective effect of *Cudrania cochinchinensis* against experimental acute liver injury induced by carbon tetrachloride [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2012, 23(8): 1903-1904.
- [56] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 159-160.
- [57] KIM H Y, PARK J, LEE K H, et al. Ferulic acid protects against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. Toxicology, 2011, 282(3): 104-111.
- [58] HU M, WANG Z, RAO J, et al. Inhibition of inducible nitric

- oxide synthase worsens liver damage regardless of lipopolysaccharide treatment in small-for-size liver transplantation [J]. *Transpl Immunol*, 2010, 23(1/2): 6-11.
- [59] RONCHETTI D, BORGHI V, GAITAN G, et al. NCX 2057, a novel NO-releasing derivative of ferulic acid, suppresses inflammatory and nociceptive responses in *in vitro* and *in vivo* models [J]. *Br J Pharmacol*, 2009, 158(2): 569-579.
- [60] ZHU H B, WANG C H, ZHENG Q S. Protective effects of *Laminaria japonica* polysaccharide on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice [J]. *J Yantai Univ(Nat Sci Eng Ed)*(烟台大学学报: 自然科学与工程版), 2008, 21(3): 204-208.
- [61] CABRINI M, NAHMOD K, GEFFNER J. New insights into the mechanisms controlling neutrophil survival [J]. *Curr Opin Hematol*, 2010, 17(1): 31-35.
- [62] CHATTERJEE S, KUNDU S, BHATTACHARYA A. Mechanism of cadmium induced apoptosis in the immunocyte [J]. *Toxicol Lett*, 2008, 177(2): 83-89.
- [63] LIU X, KIM CN, YANG J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c [J]. *Cell*, 1996, 86 (1): 147-157.
- [64] HÜTTEMANN M, PECINA P, RAINBOLT M, et al. The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis [J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(3): 369-381.
- [65] WANG I K, LIN-SHIAU S Y, LIN J K. Induction of apoptosis by apigenin and related flavonoids through cytochrome c release and activation of caspase-9 and caspase-3 in leukaemia HL-60 cells [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35(10): 1517-1525.
- [66] MA J Q, DING J, ZHANG L, et al. Hepatoprotective properties of sesamin against CCl₄-induced oxidative stress-mediated apoptosis in mice via JNK pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 64: 41-48.
- [67] TIEN Y C, LIAO J C, CHIU C S, et al. Esculetin ameliorates carbon tetrachloride-mediated hepatic apoptosis in rats [J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(6): 4053-4067.
- [68] JUNNILA M, RAHKO T, SUKURA A, et al. Reduction of carbon tetrachloride-induced hepatotoxic effects by oral administration of betaine in male Han-Wistar rats: a morphometric histological study [J]. *Vet Pathol*, 2000, 37(3): 231-238.
- [69] VYSSOKIKH M Y, ZOROVA L, ZOROV D, et al. Bax releases cytochrome c preferentially from a complex between porin and adenine nucleotide translocator Hexokinase activity suppresses this effect [J]. *Mol Biol Rep*, 2002, 29(1/2): 93-96.
- [70] KALVAKOLANU D V. The GRIMs: a new interface between cell death regulation and interferon/retinoid induced growth suppression [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2004, 15(2/3): 169-194.
- [71] BHATTACHARYA K, SAMANTA S K, TRIPATHI R, et al. Apoptotic effects of mahanine on human leukemic cells are mediated through crosstalk between Apo-1/Fas signaling and the Bid protein and via mitochondrial pathways [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(3): 361-372.
- [72] ZHANG S, LU B, HAN X, et al. Protection of the flavonoid fraction from *Rosa laevigata* Michx fruit against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, 55: 60-69.
- [73] MA J Q, DING J, ZHANG L, et al. Hepatoprotective properties of sesamin against CCl₄ induced oxidative stress-mediated apoptosis in mice via JNK pathway [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 64: 41-48.
- [74] YANG L, ROZENFELD R, WU D, et al. Cannabidiol protects liver from binge alcohol-induced steatosis by mechanisms including inhibition of oxidative stress and increase in autophagy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 68: 260-267.
- [75] YUN N, CHO H I, LEE S M. Impaired autophagy contributes to hepatocellular damage during ischemia/reperfusion: Heme oxygenase-1 as a possible regulator [J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 68: 168-177.
- [76] NI H M, WILLIAMS J A, JAESCHKE H, et al. Zonated induction of autophagy and mitochondrial spheroids limits acetaminophen-induced necrosis in the liver [J]. *Redox Biol*, 2013, 1: 427-432.
- [77] SONG J, DE L J, WOLF S E. Hepatic autophagy after severe burn in response to endoplasmic reticulum stress [J]. *J Surg Res*, 2014, 187(1): 128-133.
- [78] YANG M C, CHANG C P, LEI H Y. Endothelial cells are damaged by autophagic induction before hepatocytes in Con A-induced acute hepatitis [J]. *Int Immunol*, 2010, 22(8): 661-670.
- [79] SHEN M, CHEN K, LU J, et al. Protective effect of astaxanthin on liver fibrosis through modulation of TGF- β 1 expression and autophagy [J]. *Mediators Inflamm*, 2014: 954502. Doi: 10.1155/2014/954502.

收稿日期: 2014-12-26

抗肿瘤活性多肽的研究现状

胡楠, 卞筱泓, 许激扬* (中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

摘要: 由于发病率和死亡率的逐年攀升, 恶性肿瘤目前成为威胁人类健康的重大疾病, 对于恶性肿瘤的高效治疗已成为医学领域的研究热点。随着小分子化学药物开发难度的增大, 具有高效低毒等诸多优点的活性多肽开始受到重视, 相关药物市场也不断扩大。本文通过对抗肿瘤活性多肽的特点与来源、制备技术、结构修饰、作用机制及研发现状等方面进行综述, 为后续的研究工作提供参考。

基金项目: 江苏省社会发展基金项目(BE2012742)

作者简介: 胡楠, 女, 硕士生 Tel: 15851832263 E-mail: lfyzhn@126.com *通信作者: 许激扬, 男, 博士, 教授, 硕导 Tel: (025)83271306 E-mail: jiyangx@126.com