

美洲大蠊提取物对肝硬化门静脉高压大鼠 NF- κ B 和 MIF 表达的影响

沈海容¹, 黄应武², 王大东¹, 罗显克¹, 王保健¹, 吴晓莉¹, 农云翠¹ (1.广西壮族自治区民族医院, 南宁 530001; 2.广西医科大学, 南宁 530021)

摘要:目的 观察康复新液(extract of *Periplaneta americana*, APA)对门静脉高压症大鼠核转录因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)及巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)表达的影响。方法 60只SD大鼠分为正常对照组、模型组、普萘洛尔组和APA高、中、低剂量组, 每组10只。采用CCl₄加乙醇建立大鼠门静脉高压症模型, 边造模边给药8周。测各组大鼠门静脉压力, 同时观察肝脏组织形态学改变, 并用免疫组化方法检测肝脏中NF- κ B及MIF的表达水平。结果 模型组门静脉压力较正常对照组明显升高($P<0.05$), APA组及普萘洛尔组门静脉压力较模型组明显下降($P<0.05$), 但仍高于正常组($P<0.05$); APA高、中剂量组不仅可以改善受损肝脏的病理形态; 还可降低肝脏组织中NF- κ B、MIF的表达。结论 APA不仅可以改善门静脉系统的高动力状态, 其治疗效果优于普萘洛尔, 而且还具有改善肝硬化门静脉高压症中肝脏组织形态的作用, 其机制除了与其具有促进血管增生、改善血液循环、促进组织修复有关之外, 还可能与其抑制肝组织中NF- κ B、MIF的表达有关。

关键词: 康复新液; 普萘洛尔; 门静脉高压; 核转录因子- κ B; 巨噬细胞移动抑制因子

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2019)01-0005-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.01.002

引用本文: 沈海容, 黄应武, 王大东, 等. 美洲大蠊提取物对肝硬化门静脉高压大鼠NF- κ B和MIF表达的影响[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(1): 5-9.

Effect of Extract of *Periplaneta Americana* on NF- κ B and MIF's Expression in Rats with Portal Hypertension

SHEN Hairong¹, HUANG Yingwu², WANG Dadong¹, LUO Xianke¹, WANG Baojian¹, WU Xiaoli¹, NONG Yuncui¹ (1.Minzu Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530001, China; 2.Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of extract of *Periplaneta americana*(APA) on nuclear transcription factor- κ B(NF- κ B) and macrophage migration inhibitory factor(MIF)'s expression in rats with portal hypertension. **METHODS** Sixty SD rats were divided into normal control group, model group, propranolol group, APA high, medium and low dose groups, 10 rats in each group. The model of rats with portal hypertension were prepared with CCl₄ and alcohol, 8 weeks of administration while modeling. The portal vein pressure of the rats were measured by direct manometric method, and the liver tissue morphology changes were observed. Besides, the expression level of NF- κ B and MIF were detected by immunohistochemistry. **RESULTS** The portal vein pressure of model group was increased significantly compared with that of normal group($P<0.05$), while such index in treatment groups(APA groups and propranolol group) was higher than that of normal group($P<0.05$), but was lower significantly than that of model group($P<0.05$). APA high and medium dose groups not only improved the pathology of damaged liver, but also decreased the expression of NF- κ B and MIF in liver tissue. **CONCLUSION** APA can not only alleviate the hyperdynamic state of portal system, it is superior to the propranolol group, but also can decrease the expression of NF- κ B and MIF, and finally improve the symptoms of portal hypertension. In addition to promoting angiogenesis, improving blood circulation and promoting tissue repair, the mechanism may be related to the inhibition of the expression of NF- κ B and MIF in liver tissue.

KEYWORDS: extract of *periplaneta americana*; propranolol; portal hypertension; nuclear transcription factor- κ B(NF- κ B); macrophage migration inhibitory factor(MIF)

肝硬化是各种慢性肝病发展的最主要结局。随着病情进展, 可导致门静脉高压, 出现一系列临床并发症(食管胃底静脉曲张、腹水、脾肿大、

脾功能亢进等), 直接威胁生命健康。门静脉高压症及其相关疾病的治疗主要有药物、手术、内镜、介入等治疗方法, 这些治疗方法存在适应证局限、

基金项目: 广西医科大学青年科学基金项目(GXMUYSF201540)

作者简介: 沈海容, 女, 博士, 主治医师 Tel: 0771-3108550

E-mail: 415487460@qq.com

不良反应多、复发率高等缺点。门静脉高压症的药物治疗更易被患者接受,以普萘洛尔为代表的 β 受体阻滞剂是临床治疗肝硬化门静脉高压的常用药物,但口服普萘洛尔的禁忌证较多,有效性较低,且部分患者因其降低心率明显,出现全身器官缺血表现,从而被迫停药。因此研究开发新的疗效好、不良反应少的药物成为广大医疗工作者努力的方向和目标。

研究发现,康复新液(美洲大蠊提取物, *extract of Periplaneta americana*, APA)对实验性肝损伤有较好的保护作用,能抑制雏鸭体内乙型肝炎病毒的复制,且有较好的抗实验性肝纤维化的作用^[1-2]。但有关 APA 对肝硬化门静脉高压的影响鲜见报道。为了进一步了解 APA 对肝硬化门静脉高压的影响,笔者拟通过实验观察 APA 对肝硬化门静脉高压大鼠的门静脉压力及其对肝组织核转录因子- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)、巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)表达的影响。

1 材料

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 60 只,♀♂各半,体重为 180~220 g,购自广西医科大学实验动物中心,实验动物许可证号:SCXKG2017-0002;质量合格证号:0017985。60 只大鼠按随机数字表法分为正常对照组、模型组、普萘洛尔组和 APA 高、中、低剂量组,每组 10 只。

1.2 药物、试剂及仪器

APA(四川好医师攀西药业有限责任公司,批号:151022);普萘洛尔(山西云鹏制药有限公司,批号:1509186);NF- κ B 单克隆抗体(批号:1603324)、MIF 单克隆抗体(批号:16023426)均购自北京索莱宝科技有限公司;CKX31 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司)。

2 方法

2.1 造模方法

采用 CCl₄ 综合法(即 CCl₄+乙醇 2 种复合因素)造模^[3]。除正常对照组外,其余各组大鼠适应性饲养 1 周,第 2 周时以蒸馏水配制的 10%乙醇溶液为其唯一饮用水;第 6 周开始用 50% CCl₄ 中性菜籽油溶液,以 5 mL·kg⁻¹ 腹腔注射,每周 2 次,持续 4 周,并以 30%乙醇溶液为其唯一饮用水至第 8

周实验结束。正常对照组按 5 mL·kg⁻¹ 体质量腹腔注射生理盐水,每周 2 次,并给予普通饮水和饲料,频度及剂量同其他实验组。

2.2 药物干预

自造模开始,正常对照组、模型组给予生理盐水 20 mL·kg⁻¹,灌胃给药,每日 1 次;参照文献^[4](APA 按人的千克体质量 10 倍的剂量给药,疗效明显、稳定、可控),APA 高、中、低剂量组按成人剂量的 20, 10, 5 倍(即 0.5, 0.25, 0.10 g·kg⁻¹)灌胃给药,每日 1 次;普萘洛尔组根据成人剂量(20 mg·d⁻¹ 普萘洛尔)给药,按体表面积换算大鼠每日剂量 1.8 mg·kg⁻¹,临用前用蒸馏水配成所需浓度,每日 1 次,灌胃给药。

2.3 标本采集

解剖前 12 h 禁食不禁水,测体质量。手术前先将大鼠用 10%水合氯醛(2 mL·kg⁻¹)腹腔注射麻醉,常规开腹,暴露门静脉,测定门静脉压力。于肝左叶同一部位取约 1 cm×1 cm 的 3 小块肝组织,于 10%中性福尔马林固定 6 h,酒精逐级脱水,石蜡包埋,切片后作苏木素-伊红(HE)染色观察肝脏组织病理形态学,免疫组化法检测 NF- κ B、MIF 蛋白表达水平。

2.4 一般情况

观察大鼠的体质量变化、皮毛颜色、食欲、活动情况及精神状态。

2.5 门静脉压力测量

大鼠打开腹腔后,分离显露门静脉,将导管针插入大鼠门静脉,接上已盛满无菌盐水的玻璃柱测压装置(自制),取与大鼠心房水平为基点,读取数值 0。待水柱稳定后再直接读取数值。

2.6 组织病理学检查

肉眼观察大鼠肝脏大体变化,并将肝脏保存于 4%的多聚甲醛溶液中,做病理切片,HE 染色,光镜下观察肝脏细胞结构的变化。

2.7 免疫组化检测 NF- κ B、MIF 蛋白的表达

按说明书进行。免疫组化结果由研究者及 1 名病理诊断人员分别阅读病理切片,取两者平均值。采用 Matsumura 等^[5]综合评分法判读结果,病理切片中发现细胞上有棕色细颗粒,则视为阳性表达。具体方法如下:在高倍镜下每张切片随机选择 5 个视野,计算阳性细胞所占百分比进行初步评分,<10%为 0 分,11%~25%为 1 分,26%~50%

为 2 分, 51%~75% 为 3 分, >75% 为 4 分; 另外对阳性细胞的细胞质或细胞核的染色深浅进行再评分, 凡细胞质或细胞核不着色为 0 分, 浅棕(黄)色为 1 分, 棕(黄)色为 2 分, 深棕(黄)色为 3 分; 再根据上述 2 项指标评分的乘积进行综合评分, 0 分(-)、1~4 分(+)、6 或 8 分(++)、9 或 12 分(+++)。

2.8 统计学分析

用 SPSS 13.0 统计软件分析处理数据, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 多组间比较用 Oneway ANOVA 检验, 组间两两比较用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 一般情况

正常对照组大鼠精神尚可, 食欲正常, 动作活跃, 对外界刺激反应灵敏, 皮肤有光泽, 体质量稳步增长; 模型组大鼠在造模后出现精神萎靡, 食欲不振, 活动减少, 对外界刺激反应迟钝, 皮肤无光泽、体毛脱落, 且伴有体质量增长缓慢; 相比模型组, APA 各剂量组及普萘洛尔组大鼠精神较好, 食欲一般, 活动增多, 但对外界反应仍迟钝, 皮肤无光泽, 体质量增长缓慢。

3.2 药物对大鼠门静脉压力的影响

APA 各剂量组和普萘洛尔组门静脉压力较模型组明显下降($P < 0.05$), 但仍高于正常对照组($P < 0.05$); 与普萘洛尔组比较, APA 高剂量组无显著差异, 而 APA 中、低剂量组存在显著差异($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 药物对肝硬化门静脉高压大鼠门静脉压力的影响

Tab. 1 Effect of drugs on the portal vein pressure in rats with portal hypertension

组别	n	门静脉压力/mmHg
正常对照组	10	9.49±0.35
模型组	7	17.73±0.94 ¹⁾
APA 高剂量组	8	12.50±0.41 ¹⁾²⁾
APA 中剂量组	8	13.45±0.55 ¹⁾²⁾³⁾
APA 低剂量组	8	15.25±0.48 ¹⁾²⁾³⁾
普萘洛尔组	7	12.72±0.44 ¹⁾²⁾

注: 与正常对照组比较, ¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较, ²⁾ $P < 0.05$; 与普萘洛尔组比较, ³⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with normal group, ¹⁾ $P < 0.05$; compared with model group, ²⁾ $P < 0.05$; compared with propranolol group, ³⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 药物对肝硬化门静脉高压大鼠肝脏形态学的影响

3.3.1 肉眼观察 正常对照组大鼠肝脏表面光

滑, 边缘锐利, 质地较软, 色暗红, 有光泽; 模型组大鼠肝脏表面较正常对照组欠光滑, 颜色浅, 边缘钝, 质地硬, 部分标本表面凹凸不平, 呈小结节状, 黄褐色; APA 组大鼠肝脏表面相对模型组光滑, 颜色较红, 颗粒状结节较少。

3.3.2 光镜下各组肝组织形态学变化 光镜下观察各组大鼠肝脏的病理变化。与正常对照组比较, 模型组可见肝小叶结构破坏, 肝细胞普遍变性, 可见程度不等、范围不一的肝组织坏死区, 汇管区、肝窦及中央静脉周围可见炎性细胞浸润。与模型组相比, APA 高剂量组肝小叶结构破坏轻微, 少量炎细胞浸润, 肝细胞结构基本正常; APA 中剂量组的炎细胞浸润相对 APA 高剂量组多, 肝细胞结构稍紊乱; APA 低剂量组则出现较多炎细胞浸润, 肝细胞排列紊乱。普萘洛尔组可见肝小叶结构完整, 无变性、坏死, 极少量的炎细胞浸润。结果见图 1。

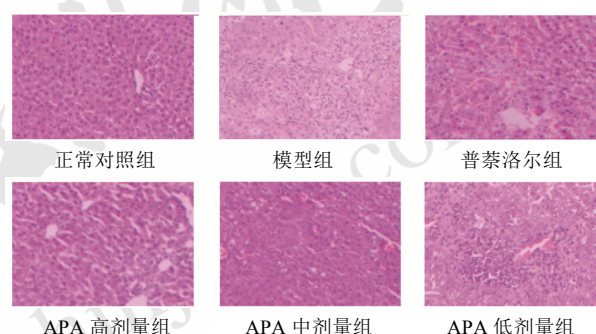


图 1 药物对肝硬化门静脉高压大鼠肝脏组织形态学的影响(HE, 100×)

Fig. 1 Effect of drugs on the liver tissue morphology in rats with portal hypertension(HE, 100×)

3.4 各组大鼠肝脏组织 NF-κB、MIF 蛋白表达的免疫组化结果

各组大鼠肝组织免疫组化结果显示, 正常对照组大鼠肝细胞胞浆内可见 NF-κB、MIF 微量表达; 模型组大鼠肝内 NF-κB、MIF 表达显著增强, 阳性细胞数目明显增多, 阳性细胞呈淡棕色、棕色或深棕色; NF-κB、MIF 在 APA 高、中剂量组大鼠肝组织内的表达量减少, 其中 APA 高剂量组大鼠肝组织内的表达量更少。而在 APA 低剂量组及普萘洛尔剂量组表达量则增多。与正常对照组相比, 模型组 NF-κB、MIF 表达显著增高($P < 0.05$); 与模型组相比, APA 高、中剂量组大鼠肝组织 MIF 表达显著降低($P < 0.05$)。结果见表 2 和图 2~3。

表 2 药物对肝硬化门静脉高压大鼠肝组织 NF- κ B、MIF 表达的影响

Tab. 2 Effect of drugs on the expression of NF- κ B and MIF in liver tissue of rats with portal hypertension

组别	视野数	综合评分	
		NF- κ B	MIF
正常对照组	15	0	0
模型组	15	11.57 $\pm$ 0.79 ¹⁾	9.71 $\pm$ 1.25 ¹⁾
APA 高剂量组	15	4.75 $\pm$ 0.89 ²⁾³⁾	3.75 $\pm$ 0.71 ²⁾³⁾
APA 中剂量组	15	6.87 $\pm$ 0.99 ²⁾³⁾	5.75 $\pm$ 0.71 ²⁾³⁾
APA 低剂量组	15	11.38 $\pm$ 1.06	9.25 $\pm$ 1.04
普萘洛尔组	15	11.43 $\pm$ 1.13	9.14 $\pm$ 1.35

注：与正常对照组比较，¹⁾ $P<0.05$ ；与模型组比较，²⁾ $P<0.05$ ；与普萘洛尔组比较，³⁾ $P<0.05$ 。

Note: compared with normal group, ¹⁾ $P<0.05$; compared with model group, ²⁾ $P<0.05$; compared with propranolol group, ³⁾ $P<0.05$.

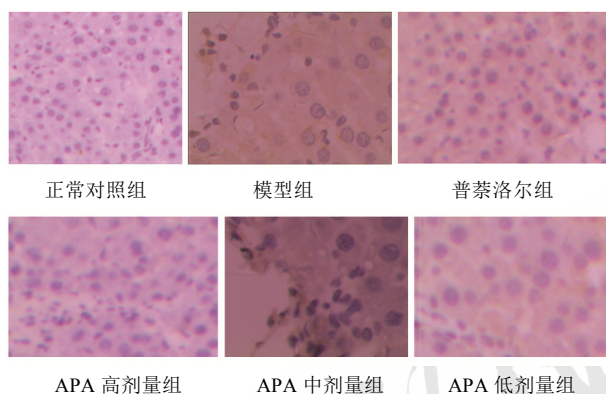


图 2 药物对肝硬化门静脉高压大鼠肝脏组织 NF- κ B 的影响(400 $\times$)

Fig. 2 Effect of drugs on NF- κ B of the liver tissue in rats with portal hypertension(400 $\times$)

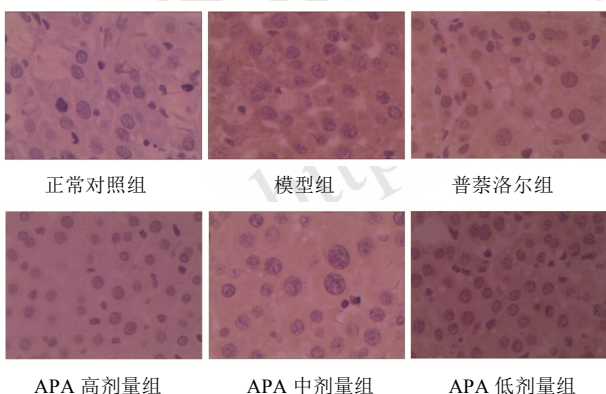


图 3 药物对肝硬化门静脉高压大鼠肝脏组织 MIF 的影响(400 $\times$)

Fig. 3 Effect of drugs on MIF of the liver tissue in rats with portal hypertension(400 $\times$)

4 讨论

研究表明，APA 富含多元醇类和多肽(表面细胞生长因子)，具有促进表皮细胞生长和肉芽组织

增生，改善局部血液循环，促进创面坏死组织脱落，加速创面修复，并且能分泌类白细胞介素、干扰素等物质消除炎症水肿，具有抗炎、抗肿瘤、增强免疫、保护肝脏功能等药理作用^[6-9]，其制备相应临床药品的价值得到肯定。那么 APA 对肝硬化门静脉高压症如门静脉高压性胃肠病是否具有同样的作用机制，有待进一步研究。本研究显示，模型组门静脉压力较正常对照组明显升高($P<0.05$)，APA 组及普萘洛尔组门静脉压力较模型组明显下降($P<0.05$)，但仍高于正常对照组($P<0.05$)。本研究表明 APA 不仅可以改善门静脉系统的高动力状态，其治疗效果优于普萘洛尔，而且 APA 具有改善受损肝脏病理形态的作用。笔者推测 APA 降低门静脉压力的机制与其具有促进血管增生、改善血液循环等药理作用相关，而其改善肝脏组织形态的作用与其具有的一些对肝脏起到保护和修复作用的修复因子活性小肽相关^[10]。

NF- κ B 为一种蛋白质复合物，为真核细胞常见的转录因子，与细胞炎症和凋亡等相关^[11]。通过干预 NF- κ B 信号通路，调控其他细胞通路的激活，在防治肝纤维化的研究具有重要意义^[12]，而中药抑制 NF- κ B 信号分子有显著优势^[12-13]。Madankumar 等^[14]研究发现桑色素(morin，膳食类黄酮)能抑制 I κ B α 的降解，抑制凋亡蛋白(如 Bcl-2)的表达，同时上调促凋亡蛋白(如 Bax)的表达，诱导 HSCs 的凋亡，从而达到抗肝纤维化的效果。那么，APA 作为一种中药，它对肝硬化门静脉高压大鼠肝脏组织 NF- κ B 的影响是否同样有抑制作用？本实验研究显示，与模型组比较，NF- κ B 蛋白在 APA 高、中剂量组大鼠肝组织内的表达量减少，差异具有统计学意义($P<0.05$)。本研究表明，APA 具有抑制 NF- κ B 在肝脏组织的表达水平的作用，另一方面也表明，NF- κ B 在肝硬化门静脉高压症进展方面起到一定的作用。

MIF 是一种介导多种炎症性疾病的关键因子，它可促使巨噬细胞在肝血窦中聚积，激活巨噬细胞分泌白介素-1(IL-1)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、干扰素- γ (IFN- γ)和一氧化氮(NO)等细胞因子，参与对肝细胞的损害^[15]。本研究显示，与模型组比较，MIF 蛋白在 APA 高、中剂量组大鼠肝组织内的表达量减少，差异具有统计学意义($P<0.05$)。本研究表明，APA 可降低 MIF 在肝脏组织的表达水平，另一方面也表明，MIF 同样也在肝硬化门静

脉高压症进展方面起到一定的作用。

综上所述, APA 降低门静脉压力的机制可能与其具有促进血管增生、改善血液循环等药理作用相关; 而其改善肝脏组织形态的作用不仅与 APA 所具有的活性小肽相关^[16], 另一方面也与 APA 降低肝脏组织 NF- κ B、MIF 的表达有一定关系, 其确切机制有待进一步研究。本研究表明, APA 在大鼠肝硬化门静脉高压方面有一定的治疗作用, 这为肝硬化门静脉高压的药物治疗提供了新思路, 也为其临床适应证提供了一定的依据。

REFERENCES

- [1] DU Y M, LI S N, CHEN H S, et al. Experimental research on antiviral activity of Gaulong capsule against duck hepatitis B virus [J]. J Dali Univ(大理学院学报), 2006, 5(4): 6-8.
- [2] 李武, 段丽芳, 何贵清, 等. 美洲大蠊提取物对实验性肝纤维化的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2009, 17(12): 948-950.
- [3] YE C H, LIU X Y. Study on method of inducing hepatic cirrhosis model in rats by carbon tetrachloride [J]. J Clin Res(医学临床研究), 2005, 22(5): 619-622.
- [4] 刘童婷, 黄秀深, 陈瑾, 等. 康复新液对大鼠乙酸烧灼型胃溃疡模型胃黏膜修复机制的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(12): 3028-3030.
- [5] MATSUMURA T, HAYASHI H, TAKII T, et al. TGF- β down-regulates IL-1 α -induced TLR2 expression in murine hepatocytes [J]. J Leukoc Bid, 2004, 75(6): 1056-1061.
- [6] LUO T S, GAO M T, MA F F, et al. Research advances in pharmacological action and clinical application of *Periplaneta americana* [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学), 2012, 40(10): 5933-5935.
- [7] 谢波, 舒彦, 梁臻, 等. 美洲大蠊提取物对大鼠膀胱黏膜损伤后修复的影响[J]. 浙江中西医结合杂志, 2012, 22(9): 689-691.
- [8] 罗珊珊, 于摇君, 王晓云, 等. 心脉隆注射液诱导大鼠骨髓间充质干细胞分化为神经元样细胞的研究[J]. 山东大学学报, 2012, 50(7): 32-36.
- [9] ZOU J, CUI P L, XU Y Q. Observation on the efficacy of Kangfuxin succus plus lansoprazole for the treatment of reflux esophagitis [J]. J Clin Res(医学临床研究), 2012, 29(2): 293-294.
- [10] ZHENG Z, YU M, ZHOU X L. The Effects of Kangfuxin solution on expression of epidermal growth factor and hepatocyte growth factor in experimental colitis [J]. Acta Acad Med Weifang(潍坊医学院学报), 2014, 36(6): 447-450.
- [11] CHEN J, CHEN Y, CHEN C, et al. Study on the anti-tumor activity of PEG-modified liposomes combined with sorafenib nuclear transcription factor NF- κ B inhibitors [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(1): 37-42.
- [12] WANG B, LI D F, HAN J C, et al. Improvement effects of myricetin against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Chin J new drugs(中国新药杂志), 2017, 26(12): 115-120.
- [13] 郑烈, 戴彦成, 张亚利, 等. 中医药对 NF- κ B 信号通路介导溃疡性结肠炎治疗进展[J]. 中华中医药学刊, 2016, 34(7): 1585-1587.
- [14] MADANKUMAR P, NAVEENKUMAR P, DEVARAJ H, et al. Morin, a dietary flavonoid, exhibits anti-fibrotic effect and induces apoptosis of activated hepatic stellate cells by suppressing canonical NF- κ B signaling [J]. Biochimie, 2015(110): 107-118.
- [15] LI G F, WANG C M, ZHOU X, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor in keloid [J]. J Clin Rehabil Tissue Eng Res(中国组织工程研究), 2015, 19(33): 5338-5343.
- [16] WU W, SHI Y, LI J, et al. Tim-3 expression on peripheral T cell subsets correlates with disease progression in hepatitis B infection[J]. Virol J, 2011, 8(1): 1-9.

收稿日期: 2017-12-07
(本文责编: 曹粤锋)