

茵陈蒿汤对肝纤维化大鼠肝组织内质网应激 caspase-12 通路的影响

李木松 张贵贤 魏媛媛 刘震霞

(保定市传染病医院肝五 A 科,保定,071000)

摘要 目的:观察茵陈蒿汤对胆汁瘀积性肝纤维化大鼠肝组织内质网应激 caspase-12 通路的影响,探讨茵陈蒿汤抗胆汁瘀积性肝纤维化的作用机制。方法:将 35 只 SD 大鼠分为假手术组和造模组,采用胆总管结扎法复制胆汁瘀积性肝纤维化大鼠模型,1 周后将造模组动物分为模型组和中药组,中药组予以 3.5 g/kg 茵陈蒿汤灌胃,4 周后处死动物,HE、Masson 染色观察肝脏组织病理学变化;Western blot 法检测各组大鼠肝脏 GRP78、eIF2 α 和 Caspase-12 蛋白表达变化。结果:肝脏组织病理学变化显示模型组大鼠肝纤维化程度较假手术组明显增加($P < 0.05$),中药组大鼠肝纤维化程度较模型组减轻($P < 0.05$),但仍重于假手术组。Western blot 结果显示,模型组肝脏 GRP78、eIF2 α 和 Caspase-12 蛋白的表达与假手术组相比显著升高($P < 0.01$),中药组较模型组 eIF2 α 和 Caspase-12 明显降低($P < 0.01$)。结论:抑制 eIF2 α 和 Caspase-12 的活化,从而减少肝细胞凋亡,进而抑制内质网应激在胆汁瘀积性肝纤维化中的促进作用,是茵陈蒿汤抗胆汁瘀积性肝纤维化的作用机制之一。

关键词 胆汁瘀积性肝纤维化;茵陈蒿汤;内质网应激;细胞凋亡;Caspase-12

Effects of Yinchenhao Decoction on Endoplasmic Reticulum Stress Pathway of Caspase-12 in Hepatic Fibrosis Rats

Li Musong, Zhang Guixian, Wei Yuanyuan, Liu Zhenxia

(Liver diseases five A department of Baoding Infectious Disease Hospital, Baoding 071000, China)

Abstract Objective: To observe the effects of Yinchenhao decoction on endoplasmic reticulum stress caspase-12 pathway of cholestasis liver fibrosis rat and its action mechanism on anti bile stasis liver fiber. **Methods:** Thirty five SD rats were divided into sham operation group and the duplicate model group. The common bile duct ligation method was used to replicate cholestasis liver fibrosis in rats. After 1 week of building, the rats were divided into model group and TCM group. TCM group was given 3.5 g/kg Yinchenhao decoction by intragastric administration. The rats were killed after four weeks. HE and Masson staining method were used to observe the changes of the liver tissue pathology, and Western blot method was used to detect GRP78, eIF2 α and Caspase-12 protein expression changes in liver tissue of each group. **Results:** The liver histopathology examination showed that the liver fibrosis rat model was duplicated successfully. The degree of liver fibrosis in the TCM group was lower than that of the model group ($P < 0.05$), but it was more severe than that of the Sham operation group. Blot Western showed that the expression of Caspase-12, eIF2 α and GRP78 in the model group was significantly higher than those of the Sham operation group ($P < 0.01$). Besides, eIF2 α and Caspase-12 significantly decreased in the TCM group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Inhibiting eIF2 α and caspase-12 activation, reducing apoptosis of liver cells, thereby inhibiting the promoting effect of ERS in the liver fibrosis of bile stasis is one possible action mechanism of Yinchenhao decoction in removing bile stasis liver fibrosis.

Key Words Cholestatic liver fibrosis; Yinchenhao decoction; Endoplasmic reticulum stress; Apoptosis; Caspase-12

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2016.09.050

肝纤维化的发生发展与肝细胞的凋亡密切相关,抑制肝细胞凋亡可有效地防止肝纤维化的进展^[1-2]。内质网应激(Endoplasmic Reticulum Stress, ERS)与细胞凋亡及器官纤维化的发生发展关系密切^[3-4]。Caspase-12 是内质网特有的 Caspase, Caspase-12 的活化可诱发凋亡蛋白酶级联反应。茵陈蒿汤有较好的保护肝细胞、抗肝纤维化作用^[5-6],本研究通过观察茵陈蒿汤对肝组织内质网应激

Caspase-12 通路的影响,进一步阐明茵陈蒿汤防治肝纤维化的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂 35 只 SPF 级雄性 SD 大鼠,体重(180 $\pm$ 20) g,由河北医科大学实验动物中心提供。HE 染液和 Masson 染液购自福州迈新生物技术公司;细胞组织裂解液 RIPA 和蛋白酶抑制剂 PMSF 购自上海碧云天公司;丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺

购自美国 Sigma 公司; GRP78、eIF2 α 和 Caspase-12 和 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 药品制备 茵陈蒿汤《伤寒论》由茵陈 18 g, 栀子 12 g, 大黄(去皮)6 g, 根据《中药药理研究方法学》大鼠剂量 = 人剂量 $\times$ 35(人转换因子)/6(大鼠转换因子)计算出人鼠等效剂量为 3.5 g/kg。按传统工艺制备成水煎剂, 减压浓缩至 0.35 g/mL 备用。

1.3 实验方法 将实验动物随机分为造模组(25 只)和假手术组(10 只), 采用胆管结扎法复制胆汁淤积性肝纤维化模型。术前禁食不禁水 12 h, 用盐酸氯胺酮肌肉注射进行麻醉(100 mg/kg), 常规皮肤消毒后, 沿腹部正中中线切开皮肤以充分暴露胆总管, 于胆总管远近端分别结扎后从中间离断, 关腹; 假手术组仅开腹暴露并游离胆总管但不结扎, 关腹。于造模 1 周后, 造模组随机分为模型组(11 只), 中药组(各 12 只)。于 4 周末处死动物。按造模时方法盐酸氯胺酮麻醉, 腹主动脉采血, 分离血清, $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。取全肝脏称重后, 于肝右叶固定位置切取 $1.0\text{ cm} \times 1.0\text{ cm}$ 大小 2 块肝组织, 中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋后行 HE、Masson 染色; 其余肝组织于液氮中速冻后转移至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

1.4 病理学检查 将甲醛固定后的肝组织行石蜡包埋, 苏木精-伊红(HE)染色和 Masson 三色胶原纤维染色, 400 倍光镜下观察肝组织病理变化。肝纤维化程度参照文献^[7], 每个“+”记 1 分, 总积分越高, 表明肝脏纤维化程度及病理损害越重。

1.5 Western blot 法检测肝组织 GRP78、eIF2 α 和 Caspase-12 蛋白表达 在缓冲液样品中将细胞裂解进行 SDS-PAGE 检测。聚丙烯酰胺凝胶电泳后, 电转移法将蛋白转移至 PVDF 滤膜上。用 5% 的脱脂牛奶封闭 3 h, 将膜用兔抗大鼠单克隆培养。免疫反应性蛋白用增强的化学发光试剂显影。ECL 显色, Quantity One 软件测定分析结果。采用 β -actin 作为内参照, 以光密度比值表示该蛋白相对表达水平。

1.6 统计学方法 所有数据采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 正态计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 等级资料采用 F 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义, 计量资料采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况 模型组大鼠体质量较假手术组增长缓慢, 2 d 后开始出现小便发黄, 7 d 后在尾巴、耳朵、皮毛出现黄染, 胆总管渐进性扩张, 肝脏体积增大, 色泽黄染, 第 3~4 周肝脏质地逐渐变硬, 4 周表面呈桔皮样, 弹性明显降低。有 4 只动物在造模后

第 1 周和第 4 周因消化道出血和腹水死亡。

2.2 肝组织病理学变化 HE 和 Masson 染色显示, 假手术组大鼠肝细胞索以肝小叶中央静脉为中心呈放射状排列, 肝小叶结构清晰, 有少量炎性细胞浸润, 无明显坏死, 无胶原纤维增生; 模型组肝索排列紊乱, 汇管区纤维结缔组织大量增生, 增生的胆管上皮细胞分化为小胆管, 与纤维组织形成间隔, 肝组织结构破坏严重, 大量胶原组织沉积形成纤维间隔, 可见假小叶形成; 中药组可见增生的胆管上皮细胞周围有纤维组织增生, 汇管区面积扩大, 较模型组炎性细胞浸润和肝细胞坏死减少($P < 0.05$)。见图 1, 图 2, 表 1。

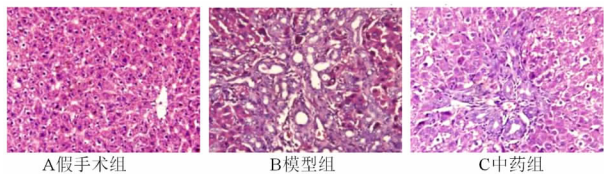


图 1 HE 染色检测各组大鼠肝组织病理改变

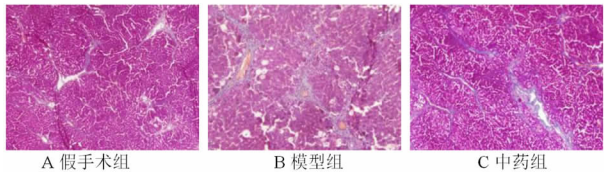


图 2 Masson 三色染色检测各组大鼠肝组织病理改变

表 1 茵陈蒿汤对 ALF 大鼠肝纤维化程度的影响

组别	只数	肝纤维化程度			
		-	+	++	+++
假手术组	10	10	0	0	0
模型组	11	0	3	4	4
中药组	10	1	7	1	1

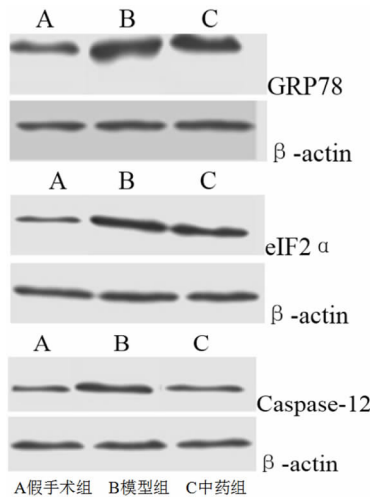


图 3 茵陈蒿汤对胆汁淤积性肝纤维化大鼠内质网应激 Caspase-12 通路的影响

2.3 Western blot 法检测茵陈蒿汤对胆汁淤积性肝纤维化大鼠内质网应激 Caspase-12 通路的影响 模

型组大鼠与假手术组相比肝脏 GRP78、eIF2 α 和 Caspase-12 蛋白表达明显增多差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 中药组较模型组 eIF2 α 和 Caspase-12 明显降低 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 2。

表 2 茵陈蒿汤对胆汁瘀积性肝纤维化大鼠内质网应激 Caspase-12 通路的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	GRP78	eIF2 α	Caspase-12
假手术组	10	0.49 $\pm$ 0.04	0.46 $\pm$ 0.05	0.36 $\pm$ 0.06
模型组	11	1.83 $\pm$ 0.30 **	3.28 $\pm$ 0.09 **	1.18 $\pm$ 0.05 **
中药组	10	1.90 $\pm$ 0.53	1.50 $\pm$ 0.11 $\Delta\Delta$	0.58 $\pm$ 0.04 $\Delta\Delta$

注: ** $P < 0.01$, 与假手术组比较; $\Delta\Delta P < 0.01$, 与模型组比较。

3 讨论

内质网参与新生蛋白质的合成、储存、加工修饰和运输。错误折叠蛋白在内质网腔过多聚积从而引发 ERS^[7]。ESR 有利于恢复细胞内环境稳态, 是一种重要的细胞自我防御机制, 但高强度或持续的 ERS 则可通过激活下游 Caspase-12 的活化, 继而诱发凋亡蛋白酶级联反应^[8]。研究表明, ERS 诱导的肝细胞凋亡参与了肝纤维化的发生机制^[9]。葡萄糖调节蛋白-78 (Glucose-regulated Protein, GRP78) 是内质网稳态的感受器, 应激状态下 GRP78 大量表达, 与未折叠蛋白结合, 恢复蛋白质的正确构象。因此, GRP78 被认为是 ERS 的标志性分子。GRP78 也通过磷酸化真核细胞起始因子 2 α (Eukaryotic Initiation factor 2 α , eIF2 α) 抑制细胞蛋白质合成, 并通过活化 Caspase-12, 发生凋亡蛋白酶级联反应^[10]。Caspase-12 位于内质网腔内, 是内质网特有的 Caspase, 也是 ERS 介导细胞凋亡的一个主要调节因子^[11], 其活化是不依赖线粒体凋亡途径和细胞色素 C 来完成。ERS 与细胞凋亡及器官纤维化密切相关^[12-13]。

本研究发现, 通过胆管结扎诱导的胆汁瘀积性肝纤维化模型大鼠肝组织结构紊乱, 大量纤维结缔组织增生, 胶原纤维形成纤维间隔, 可见假小叶形成, 纤维化程度积分明显增高, 证明模型复制成功^[14-15]。内质网应激的标志性蛋白 GRP78 表达增强, 以及 eIF2 α 和 Caspase-12 表达明显增加, 提示在胆汁瘀积性肝纤维过程中发生了内质网应激, 从而导致肝细胞凋亡的发生。茵陈蒿汤由茵陈蒿、栀子和大黄组成, 首载于《伤寒论》, 有保肝利胆退黄等功效^[16], 为临床上治疗湿热内蕴型肝胆疾病的首选方剂, 本实验研究提示, 茵陈蒿汤可明显改善胆汁瘀积性肝纤维化大鼠肝纤维化程度, 提示该方具有抗胆汁瘀积所造成的肝纤维化作用。胆汁瘀积性肝纤

维化大鼠肝脏 GRP78、eIF2 α 和 Caspase-12 蛋白表达明显增加, 用药后 eIF2 α 和 Caspase-12 明显降低, 提示抑制 eIF2 α 的表达和 Caspase-12 的活化, 从而减少肝细胞凋亡, 进而抑制 ERS 在胆汁瘀积性肝纤维化中的促进作用, 是茵陈蒿汤抗胆汁瘀积性肝纤维化的作用机制之一。

参考文献

- [1] Ramachandran P, Iredale JP. Liver fibrosis: a bidirectional model of fibrogenesis and resolution[J]. QJM, 2012, 105(9): 813-817.
- [2] Roychowdhury S, Chiang DJ, Mandal P, et al. Inhibition of apoptosis protects mice from ethanol-mediated acceleration of early markers of CCl₄-induced fibrosis but not steatosis or inflammation[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2012, 36(7): 1139-1147.
- [3] Liu Y, Wang J, Qi SY, et al. Reduced endoplasmic reticulum stress might alter the course of heart failure via caspase-12 and JNK pathways[J]. Can J Cardiol, 2014, 30(3): 368-375.
- [4] Huang Y, Li X, Wang Y, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced hepatic stellate cell apoptosis through calcium-mediated JNK/P38 MAPK and Calpain/Caspase-12 pathways[J]. Mol Cell Biochem, 2014, 394(1-2): 1-12.
- [5] 时昭红, 苏文, 张介眉, 等. 银杏叶提取物对大鼠肝纤维化的治疗作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2006, 16(3): 147-149, 封三.
- [6] 叶蕾, 李剑霜, 陈芝芸, 等. 银杏叶提取物对肝纤维化大鼠肝组织 GRP78 及 CHOP 表达的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(4): 377-380.
- [7] 王泰龄. 酒精性肝病的病理诊断标准分级、分期与分类[J]. 中华肝脏病杂志, 2001, 9(5): 312-313.
- [8] Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions[J]. J Clin Invest, 2005, 115(10): 2656-2664.
- [9] Schinoni MI, Parani R. Apoptosis and progression of hepatic fibrosis in liver diseases[J]. Acta Gastroenterol Latinoam, 2006, 36(4): 211-217.
- [10] Zhu Y, Men R, Wen M, et al. Blockage of TRPM7 channel induces hepatic stellate cell death through endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis[J]. Life Sci, 2014, 94(1): 37-44.
- [11] Fu S, Yang L, Li P, et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity[J]. Nature, 2011, 473(7348): 528-531.
- [12] Liu Y, Wang J, Qi SY, et al. Reduced endoplasmic reticulum stress might alter the course of heart failure via caspase-12 and JNK pathways[J]. Can J Cardiol, 2014, 30(3): 368-375.
- [13] Kim dY, Chung SI, Ro SW, et al. Combined effects of an antioxidant and caspase inhibitor on the reversal of hepatic fibrosis in rats[J]. Apoptosis, 2013, 18(12): 1481-1491.
- [14] 杨丽, 曹燕, 杨长青. 胆汁淤积的发生机制及相关疾病[J]. 内科理论与实践, 2014, 9(5): 308-312.
- [15] 宣佑, 田耀洲, 曹鹏, 等. 胆汁淤积性肝硬化大鼠模型的改良[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4): 57-61, 65.
- [16] 陈友英, 陈宣伊, 梁国强. 茵陈加味汤联合熊去氧胆酸治疗妊娠肝内胆汁淤积症 62 例[J]. 东南大学学报: 医学版, 2014, 33(2): 159-161.

(2015-09-21 收稿 责任编辑: 王明)