

● 论 著 ●

片仔癀肝宝对慢性肝损伤凋亡的影响 *

赵锦燕^{1,2} 张毓宸^{1,2} 万芸^{1,2} 曾建伟^{1,2} 洪振丰^{1,2#}

(1 福建中医药大学中西医结合研究院 福州 350122; 2 福建省老年性疾病重点实验室 福州 350122)

摘要:目的:探讨片仔癀肝宝(肝宝)对 CCl₄ 诱导大鼠慢性肝损伤凋亡的影响。方法:60 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、西利宾胺组、肝宝低剂量组、肝宝中剂量组、肝宝高剂量组,每组 10 只。除正常对照组外,SD 大鼠腹腔注射 50% CCl₄ 橄榄油溶液 1 ml/kg,2 次/周,连续 8 周。于造模第四周开始给药,设正常对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性药对照组(西利宾胺,50 mg/kg),肝宝低剂量组(150 mg/kg)、肝宝中剂量组(300 mg/kg)、肝宝高剂量组(600 mg/kg),1 次/d,连续 4 周。于末次给药 24 h 后,HE 染色观察肝宝对肝组织病理学的影响,TUNEL 法观察肝组织凋亡情况,比色法检测 Caspase-3 和 Caspase-9 的变化,western blot 检测肝宝对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响。结果:HE 染色发现,各用药组均可不同程度缓解 CCl₄ 诱导的肝损伤;肝宝抑制肝细胞凋亡;降低 Caspase-3 和 Caspase-9 的活力;下调 Bax 表达,上调 Bcl-2 表达。结论:片仔癀肝宝可以抑制 CCl₄ 诱导的肝细胞凋亡。

关键词:肝损伤;凋亡;片仔癀肝宝

Effect of Pianzaihuang Ganbao on the Apoptosis of Chronic Liver Injury

ZHAO Jin-yan^{1,2}, ZHANG Yu-chen^{1,2}, WAN Yun^{1,2}, ZENG Jian-wei^{1,2}, HONG Zhen-feng^{1,2#}

(1 The Institute of Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122;

2 Fujian Provincial Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Fuzhou 350122)

Abstract: Objective: To explore the effect of Pianzaihuang Ganbao (GB) on the apoptosis of chronic liver injury induced by CCl₄ in rats. Methods: Sixty Sprague - Dawley (SD) rats were randomly divided into control, model, silymarin, GB-low, GB-middle and GB-high groups, ten rats per group. Except the control group was received olive oil, the rest groups were intraperitoneally injected with CCl₄ 1 ml/kg, twice a week for 8 weeks constitutively. At the fourth week, the model and the control group were orally administration physiological saline (PS), while the silymarin (50 mg/kg), GB-Low (150 mg/kg), GB-middle (300 mg/kg), GB-high (600 mg/kg) were orally administrated in treatment group respectively for 4 weeks. Twenty-four hours after the last treatment, HE staining was used to observe the histopathological change in liver; the apoptosis was determined by TUNEL assay; Caspase-3 and Caspase-9 were detected; the protein expression of Bax and Bcl-2 were determined by western blot. Results: The results from HE staining found that all treatment could alleviate the injured liver tissues differently; GB could inhibit the apoptosis and decrease the activity of Caspase-3 and Caspase-9; furthermore, down-regulated the expression of Bax and up-regulated Bcl-2. Conclusion: GB could inhibit the apoptosis induced by CCl₄.

Key words: Liver injury; Apoptosis; Pianzaihuang Ganbao

中图分类号:R965

文献标识码:B

doi:10.13638/j.issn.1671-4040.2017.01.001

片仔癀肝宝是一种由多种中草药混合而成的中成药制剂,由牛黄、田七、茵陈、龙胆草、栀子、大黄、白芍、甘草等多种名贵药材组成,具有较好的保肝护肝作用。本实验以四氯化碳(CCl₄)诱导慢性肝损伤模型,用片仔癀肝宝进行干预治疗,观察片仔癀肝宝对慢性肝损伤的凋亡的影响,为临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物及饲养条件 雄性 SD 大鼠,SPF 级,体重 (200± 20) g,雄性,许可证号:SCXK (沪) 2008-0016,由上海斯莱克实验动物有限公司提供。动物实验室,温度 22 ℃,湿度 65%,风速 0.1~0.2 m/s,气流≥28 次/min。

1.2 实验药物及试剂 片仔癀肝宝由福建省片仔癀药业股份有限公司提供;TUNEL 试剂盒购自迈新生物技术有限公司;Caspase-3 和 Caspase-9 试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;Bax、Bcl-2 和 GAPDH 抗体购自 abcam 公司;四氯化碳,分析

纯,上海凌峰化学试剂有限公司生产,批号:090209。

2 实验方法

2.1 动物分组、模型制备及给药 雄性 SD 大鼠 60 只,随机分为六组(正常对照组、模型组、阳性药对照组,肝宝低剂量组、肝宝中剂量组、肝宝高剂量组),每组 10 只。正常对照组腹腔注射等体积橄榄油,其余各组腹腔注射 50% CCl₄ 橄榄油溶液 1 ml/kg,2 次/周,连续 8 周。于造模第四周开始给药,正常对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、阳性药对照组(西利宾胺,50 mg/kg),肝宝低剂量组(150 mg/kg)、肝宝中剂量组(300 mg/kg)、肝宝高剂量组(600 mg/kg),0.5 ml/100 g 体重,1 次/d,连续 4 周。末次给药 24 h 后,空腹用 2%戊巴比妥钠 60 mg/kg 腹腔注射麻醉后,腹主动脉采血,脱颈处死,剥离完整肝脏,称重,然后取右叶肝组织 1 cm× 1 cm× 1 cm,用 4%多聚甲醛(以 pH 7.4 的 PBS 配制)固定,用于组织形态学和 TUNEL 检测;取等量组织,用于分子生

* 基金项目:陈可冀中西医结合发展基金(编号:CKJ2013015)

通讯作者:洪振丰, E-mail: zfhong1953@163.com

物学指标检测。

2.2 观察大鼠一般状态 每天上午 8:30 左右,观察并记录大鼠的精神状态、行为、毛发光泽度、饮食、尿液、粪便以及死亡等情况。

2.3 肝组织病理学观察 多聚甲醛固定的肝组织制备石蜡切片,HE 染色,光镜下观察肝组织病理改变。

2.4 TUNEL 法检测细胞凋亡 按照 TUNEL 试剂盒说明书操作步骤及反应条件进行实验。高倍镜下观察肝细胞形态、标记强度及背景着色,低倍镜下用 Image-pro plus 获取图像并分析计数凋亡细胞阳性率及积分吸光度值。实验同时设阴性对照(无末端转移酶)及阳性对照(DNase I 处理),每张切片随机选择 10 个视野拍摄分析,计数 1 000 个细胞。

2.5 比色法检测肝组织 Caspase-3 和 Caspase-9 的活力 按照凯基生物公司 Caspase-3 和 Caspase-9 说明书进行。各取 50 mg 肝组织匀浆后加入裂解液提取总蛋白,取少量样品测定蛋白浓度。按试剂盒体系加入反应液,裂解液,待测样品和 Caspase-3 (Caspase-9)底物,37℃ 孵育 4 h,在酶标仪 λ =405 nm 处检测吸光度值,通过计算 OD 干预组 /OD 阴性组的倍数确定 Caspase-3 和 Caspase-9 的活化程度。

2.6 western blot 法检测肝组织 Bax、Bcl-2 的蛋白表达 取 100 mg 大鼠肝脏相同部位组织,每组加 1 ml 裂解液(含 10 μl PMSF),冰上裂解 30 min。4℃、12 000 rpm 离心 10 min,取上清。加入上样缓冲液,100℃ 加热 10 min 使蛋白变性。每孔上样 8 μl 总蛋白,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后用半干转仪器将蛋白转到 PVDF 膜上,电压 15 V,时间 30 min。膜室温下用 5%脱脂奶粉封闭 3 h,膜洗清后加入一抗,一抗浓度以 1:200 稀释后使用,4℃ 过夜。再分别加入与相应的二抗,室温放置 1 h,ECL 发光试剂盒显影,以 GAPDH 为内参,分析条带吸光度值。

2.7 统计学分析 采用 SPSS11.5 统计软件分析,实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组均数间比较采用单因素方差分析检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 病理组织学结果 肉眼观察正常对照组大鼠肝脏表面光滑,呈红褐色,轻按质软;模型组大鼠肝脏体积明显缩小,颜色黯淡,边缘钝,质硬,表面有大量纤维渗出物,与周围组织粘连明显;复方片仔癀肝宝各剂量组和阳性药对照组有效改善大鼠肝脏的颜色及质地,其中高剂量组变化明显。光镜下观察,可见正常对照组大鼠肝小叶结构正常,肝索排列整齐,结构清晰,未见肝细胞变性、淋巴细胞浸润及肝脏组

织坏死等病理变化;模型组大部分肝小叶结构破坏,肝索排列紊乱,部分气球样变及空泡变性,严重者可见肝细胞坏死灶及炎性浸润;各用药组均明显改善了肝细胞气球样变及空泡变性,炎性浸润有效缓解,无明显组织坏死。见图 1。

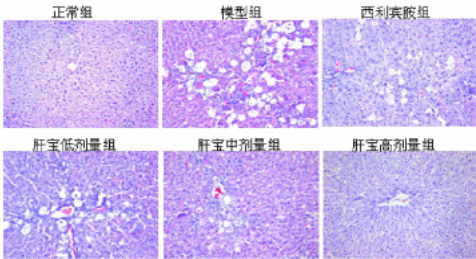


图 1 片仔癀肝宝对肝脏病理组织学的影响(HE 染色,× 100)

3.2 复方片仔癀肝宝抑制 CCl₄ 诱导的细胞凋亡 (1)TUNEL 结果显示,模型组大鼠肝组织细胞核呈现明显棕褐色染色,表明 CCl₄ 诱导了肝细胞的凋亡,与对照组比较,具有统计学意义 ($P < 0.05$);西利宾胺和肝宝各剂量组均不同程度地抑制了阳性率的表达,与模型组比较,均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。(2)复方片仔癀肝宝对线粒体凋亡的影响:与对照组比较,模型组大鼠 Caspase-9 和 Caspase-3 表达上升,具有统计学意义 ($P < 0.05$),西利宾胺和肝宝不同剂量组均抑制了 Caspase-9 和 Caspase-3 的表达。见图 3。进一步研究发现,与对照组比较,模型组大鼠肝组织 Bax 表达上调,Bcl-2 表达下调,肝宝高剂量显著抑制了 Bax,上调了 Bcl-2 的表达。见图 4。

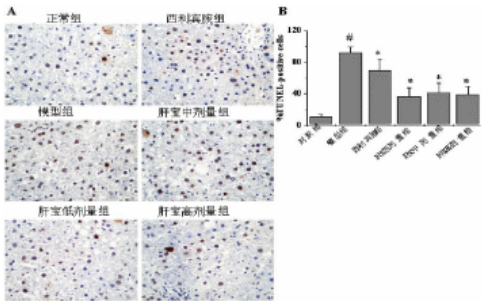


图 2 片仔癀肝宝对肝组织凋亡的影响(TUNEL,× 400)

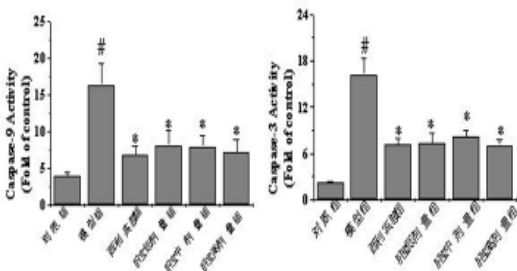


图 3 片仔癀肝宝对 Caspase-3 和 Caspase-9 的影响

式桩核修复后牙残冠的临床效果显著,可明显恢复牙齿的咀嚼功能,增加固位性,降低桩折、根折的发生几率。这主要是由于临床中应用的成品桩是依据根管情况选用预先完成的桩,用配套的钻头对根管进行预备,不用做蜡型,可减少操作时间及患者再次就诊的次数^[5]。虽然预成桩核系统桩的结构可恢复根管桩的固位力,但是成品桩仍有一些缺点,如成品桩与根管壁贴合度不够,在根管长度中长度不足等。此外成品桩旋入根管后,主要靠牙本质弹性与根管壁机械结合,嵌入时易在尖端及根管壁形成很大的压应力^[6]。若旋入桩时用力过度或成品桩直径较大,可极大程度上提高根折几率。由于磨牙多根管、根分叉大、根管变异等情况,很难获得共同就位道^[7]。但本研究中应用的插栓式桩核修复技术,其中插栓式分体式桩核可利于桩就位,充分确保桩的数目,便于加大桩核固位力,同时保持各桩严格依据根管形态制作成型,进一步增加了根管与牙体密合程度,从而提高磨牙残冠修复长期效果。此外插栓式桩核修复后牙残冠,可加强各桩核之间的相互制锁作用,充

分提高桩对抗非轴向力的效果,合理分布应力,提高咀嚼功能,减少牙周炎症、修复体松动、根折等发生,提高修复成功率^[8]。综上所述,插栓式桩核修复后牙残冠临床效果显著,值得推广。

参考文献

[1]杜劲英,穆锦全,李建,等.不同纤维桩设计修复磨牙残冠:桩折断与固位力比较[J].中国组织工程研究,2015,19(16):2500-2504
[2]李焕玉.纤维桩和树脂核加全冠修复磨牙残冠的临床体会[J].昆明医科大学学报,2014,35(12):160-161
[3]郭灿灿,王丹,黄勤武,等.106 例老年人残冠残根保存与修复的临床疗效[J].中国老年学杂志,2015,35(21):6206-6208
[4]张莹,许艳华.三种插栓式嵌体冠应用于短冠磨牙修复的临床效果对比研究[J].实用医学杂志,2014,30(20):3369-3370
[5]王万伟,陈洲华.老年患者后牙残冠钛合金成品桩和树脂核修复的临床效果观察[J].中华老年口腔医学杂志,2014,12(5):298-300
[6]陆晓丰,沈琰.插栓式嵌体冠在短牙合龈磨牙残冠修复中的临床应用[J].口腔医学,2015,35(12):1053-1055
[7]蔚庆玲,黄静,刘宝娟.插栓式分体桩与核桩烤瓷冠在磨牙残根残冠修复中的应用[J].陕西医学杂志,2014,43(11):1565-1565
[8]杜琛,霍红.桩核冠对不同病情后牙残冠患者的修复效果研究[J].河北医学,2015,21(9):1471-1474

(收稿日期: 2016-12-16)

(上接第 2 页)

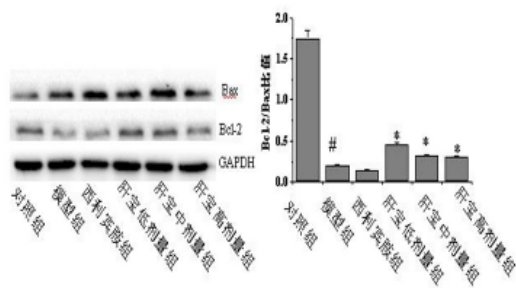


图 4 片仔癀肝宝对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

4 讨论

CCl₄ 是一种经典的化学毒物, 利用 CCl₄ 制备的慢性肝损伤模型已广泛用于研究慢性肝损伤和肝纤维化的发病机制、血清标志物的研究及保肝药物的药效评价等^[1]。本实验采用腹腔注射 50% CCl₄ 橄榄油溶液制备慢性肝损伤以观察 片仔癀肝宝的 药效及其可能机制。

正常情况下, 凋亡被认为是维持肝脏生理平衡的有效机制, 然而, 在肝脏损伤的情况下, 凋亡过度超过其自身的调节范围, 凋亡就会成为加剧肝损伤的病理因素^[2]。越来越多的研究发现, 凋亡在肝损伤的发病中发挥重要作用^[3-4]。本实验结果发现, CCl₄ 腹腔注射可以促进肝细胞凋亡, 片仔癀肝宝能有效缓解肝细胞凋亡情况。线粒体功能失调是凋亡的重

要因素^[5], Caspase-3 凋亡执行蛋白, 实验结果显示, CCl₄ 增加肝组织 Caspase-3 的表达; Bax 和 Bcl-2 的比率失调一直被认为是线粒体凋亡途径的重要标志^[6], 在本实验中发现, 片仔癀肝宝可以调节 Bax 和 Bcl-2 的比率抑制凋亡的发生。综上所述, 片仔癀肝宝可以改善慢性肝损伤大鼠肝组织的病理状况, 说明片仔癀肝宝能有效预防慢性肝损伤, 其机制可能与抑制肝细胞凋亡, 促进肝细胞再生有关。

参考文献

[1]吴丽,魏伟.肝纤维化的动物模型及治疗药物研究[J].中国药理学通报,2004,20(5):481-485
[2]Jaeschke H,Gujral JS,Bajt ML.Apoptosis and necrosis in liver disease [J].Liver Int,2004,24(2):85-89
[3]Higuchi H,Kurose I,Kato S,et al.Ethanol-induced apoptosis and oxidative stress in hepatocytes [J].Alcohol Clin Exp Res,1996,20(9): 340A-346A
[4]Bhattacharyya S,Ghosh S,Sil PC.Amelioration of aspirin induced oxidative impairment and apoptotic cell death by anovel antioxidant protein molecule isolated from the herb Phyllanthus niruri [J].Plos One,2014,9(2):e89026
[5]Hoek JB,Cahill A,Pastorino JG.Alcohol and mitochondria: a dysfunctional relationship [J].Gastroenterology,2002,122 (7): 2049-2063
[6]Martinou JC,Youle RJ.Mitochondria in apoptosis:Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics [J].Dev Cell,2011,21 (1): 92-101

(收稿日期: 2016-12-19)