

大承气汤对急性肝衰竭大鼠 FADD 介导的 肝细胞凋亡作用研究

王春妍*,胡东胜,刘亚敏
(天津市第二人民医院,天津 300192)

【摘要】 目的:研究大承气汤对急性肝衰竭大鼠 Fas 相关死亡结构域蛋白(FADD)介导肝细胞凋亡的干预作用。**方法:**40 只大鼠随机分为 4 组,分为正常对照组(A 组),急性肝衰竭造模组(B 组),大承气汤低剂量治疗组(C 组),大承气汤高剂量治疗组(D 组),每组各 10 只。C、D 组大鼠于造模前 2 d 分别灌胃不同剂量大承气汤 2 mL,A、B 组予同等剂量生理盐水灌胃,继而 B、C、D 组大鼠均采用皮下注射硫代乙酰胺完成急性肝衰竭动物模型,造模完成后继续予药物灌胃 3 d,处死所有大鼠,进行肿瘤坏死因子测定,进行肝脏病理学,FADD,肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1),Caspase-8 免疫组化及肝脏组织细胞凋亡检测。**结果:**硫代乙酰胺可引起急性肝衰竭并有广泛的肝细胞凋亡,同时可见 FADD,TNFR1,Caspase-8 蛋白在肝细胞中强表达;与模组比较,大承气汤各组肝组织衰竭减轻,肝细胞凋亡率降低,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量下降,FADD,TNFR1,Caspase-8 在肝细胞中的表达降低。高剂量组治疗效果更好。**结论:**大承气汤可防治肝细胞凋亡,其作用机制可能与抑制 FADD 介导的肝细胞凋亡有关。

【关键词】 大承气汤;急性肝衰竭;Fas 相关死亡结构域蛋白;肝细胞凋亡
【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2013)20-0234-04
【doi】 10.11653/syfy2013200234

Experimental Study on Intervention of Dachengqi Tang for Liver Apoptosis Induced FADD in Acute Hepatic Failure Rats

WANG Chun-yan*, HU Dong-sheng, LIU Ya-min
(Tianjin Second People's Hospital, Tianjin 300192, China)

【Abstract】 Objective: To explore the effect of Dachengqi tang on liver apoptosis induced Fas-associated death domain (FADD) in acute hepatic failure rats. **Method:** Forty Wistar rats were randomLy divided into 4 groups: normal group (group A), model group (group B), treatment group of Dachengqi tang at low dose (group C), treatment group at high dose (group D). There were 10 rats in every group. The level of tumor necrosis factor- α (TNF- α) was measured, Hepatic FADD, tumor necrosis factor receptor type 1 (TNFR1) and Caspase-8 activities were examined, liver cell apoptosis was observed. Liver pathology was observed. **Result:** Thioacetamide (TAA) could induce acute hepatic failure, with extensive liver apoptosis, the expression of FADD, TNFR1 and Caspase-8 were significantly increased in TAA model group. Compared with group B. the percentage of liver cell apoptosis was decreased in C, D groups, the pathology change of liver was decreased in C, D groups, the level of TNF- α was decreased in C, D groups. The expression of FADD, TNFR1 and Caspase-8 were decreased in C, D groups. **Conclusion:** Dachengqi tang can prevent and cure liver apoptosis, it may be related to depress rhe liver apoptosis induced FADD.

【Key words】 Dachengqi tang; acute hepatic failure; Fas-associated death domain; apoptosis

肝细胞凋亡是病毒性肝炎及肝衰竭的重要发病 机制之一。细胞凋亡是级联式基因表达的结果,细

【收稿日期】 20121204(014)
【基金项目】 天津市科委青年基金项目(12JCQNJC09000)
【通讯作者】 *王春妍,博士,副主任医师,从事慢性肝病的中西医诊治研究,Tel:15822661389,E-mail:water4645@sina.com

胞内部的基因直接调控凋亡的发生和发展,细胞外部因素通过信号转导通路影响这些基因的表达,从而间接调控凋亡。目前已发现多种基因编码的产物参与了凋亡的发生与调控,其中凋亡调节基因 Fas 相关死亡区蛋白(FADD)在诱导肝细胞凋亡中起着十分重要的作用。以往研究发现,大承气汤对硫代乙酰胺所致的大鼠急性肝衰竭有一定的干预作用^[1-2]。为了进一步研究其治疗急性肝衰竭的机制,本研究观察了其对急性肝衰竭大鼠 FADD 介导肝细胞凋亡的作用。合格证号 SCXK(津)2010-008。

1 材料

1.1 动物 选用 Wistar 大鼠 40 只,体重 230 ~ 250 g,清洁级,由天津市放射研究所实验动物中心提供。

1.2 试剂 硫代乙酰胺购自天津市大茂化学试剂厂。肿瘤坏死因子-α(TNF-α)放免试剂盒购于北京尚柏生物医学技术有限公司。FADD,肿瘤坏死因子受体 1(TNFR1)多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司,Caspase-8 多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,TUNNEL 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。大承气汤制备参考文献资料^[3-4],大黄、芒硝、枳实、厚朴各配伍比例为 15:10:12:10,质量分数分别为 100%,250%,由天津市第二人民医院试剂中心制备。

2 方法

2.1 动物模型的制备 40 只大鼠随机分为 4 组,分为正常对照组(A 组),急性肝衰竭造模组(B 组),大承气汤低剂量治疗组(C 组),大承气汤高剂量治疗组(D 组),每组各 10 只。C、D 组大鼠于造模前 2 d 分别灌胃不同剂量大承气汤 2 mL,A、B 组予同等剂量生理盐水灌胃,继而 B、C、D 组大鼠均采用皮下注射硫代乙酰胺 0.3 g·kg⁻¹,24 h 后相同剂量重复皮注 1 次,48 h 后完成急性肝衰竭动物模型,造模完成后继续予药物灌胃 3 d。A 组大鼠予同等剂量生理盐水灌胃。处死所有大鼠,在无菌条件下腹主动脉采血,进行肿瘤坏死因子测定,取部分肝左叶以 10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,进行病理学、免疫组化及肝脏组织细胞凋亡检测。

2.2 标本检测 TNF-α 应用放免试剂盒说明测定;肝脏病理学检测:将经处理的肝脏组织制成常规石蜡切片,HE 染色后进行组织学检查;SP 法免疫组化检测肝脏组织中 TNFR1,Caspase-8 及 FADD 活性:不论染色强度,凡显色者均为阳性。每只大鼠取切片 5 张,每张切片取 5 个高倍镜视野(每个视野 >

500 个细胞),分别计算阳性率,阳性率 = 阳性细胞数/总细胞数 × 100%。每张切片取 5 个视野的均值,每只大鼠的每个指标取 5 张切片的均值;TUNEL 法测定肝细胞凋亡率;染色后细胞浆呈棕褐色染色为阳性细胞,即凋亡细胞。每张切片任选 10 个高倍视野计数并计算细胞凋亡指数(apoptosis indices, AI),以细胞凋亡指数估计凋亡程度。

AI = 凋亡细胞数/细胞总数 × 100%

2.3 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间数值比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般状态观察 造模组大鼠处死前死亡 3 只。其余大鼠在处死前均出现不同程度的毛发竖立,精神萎靡,进食及活动减少,反应迟钝,抗捕能力减弱。对照组大鼠未出现死亡及中毒性鼓肠。大承气汤治疗组的动物饮水量和排便次数明显高于造模组动物,一般状态较造模组大鼠好。处死前死亡大鼠 3 只,死亡率为 15% (3/20)。

3.2 对急性肝衰竭大鼠肝细胞凋亡率的影响 造模组大鼠肝组织内可见大量凋亡细胞,染色阳性的细胞主要分布在中央静脉周围区,呈现不同程度的棕褐色,染色阳性细胞胞膜完整,核浆比例减小,胞核变圆变小,部分细胞固缩,胞浆消失,呈凋亡小体样改变。大承气汤各组大鼠肝组织内凋亡细胞数明显减少,有统计学意义(*P* < 0.05, *P* < 0.01),见表 1,图 1。

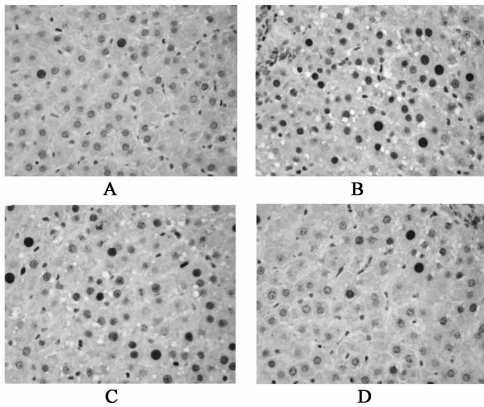
表 1 大承气汤对急性肝衰竭模型大鼠肝细胞凋亡及血浆 TNF-α 生成的抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	肝细胞凋亡率/%	TNF-α/μg·L ⁻¹
A	10	13.0 ± 4.96	0.94 ± 0.26
B	7	37.2 ± 6.01 ²⁾	5.39 ± 1.81 ²⁾
C	8	28.6 ± 6.26 ^{2,3)}	3.75 ± 1.20 ^{2,3)}
D	9	27.25 ± 5.12 ^{2,4)}	2.31 ± 1.09 ^{2,4)}

注:与 A 组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与 B 组相比,³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01(表 2 同)。

3.3 各组血浆 TNF-α 检测结果分析 与 A 组大鼠相比,B 组大鼠 TNF-α 含量均显著升高(*P* < 0.01)。与 B 组各项指标相比,D、C 组有显著性差异(*P* < 0.01, *P* < 0.05)。说明大承气汤能减少急性肝衰竭动物模型血浆 TNF-α 含量。见表 1。

3.4 各组肝组织免疫组化结果分析 与 A 组大鼠相比,B 组大鼠肝脏组织 FADD,TNFR1 及 Caspase-8 活化明显(*P* < 0.01)。与 B 组相比,C、D 组 FADD,



A. 对照组;B. 模型组;C. 大承气汤低剂量组;D. 大承气汤高剂量组
图 1 大承气汤对各组肝细胞凋亡结果的影响(×400)

TNFR1 及 Caspase-8 活化减弱 ($P < 0.05$)。大承气汤对肝组织 FADD, TNFR1 及 Caspase-8 的活化具有改善作用。见表 2。

表 2 大承气汤对急性肝衰竭模型大鼠肝组织 FADD, TNFR1, Caspase-8 活化的抑制作用($\bar{x} \pm s$) %

组别	动物数	FADD	TNFR1	Caspase-8
A	10	22.25 ± 6.13	16.50 ± 8.54	27.01 ± 15.12
B	7	76.60 ± 26.87 ²⁾	66.20 ± 18.53 ²⁾	84.00 ± 19.50 ²⁾
C	8	62.00 ± 19.8 ²⁾	46.80 ± 10.93 ^{2,3)}	67.21 ± 16.66 ²⁾
D	9	56.50 ± 16.80 ^{2,3)}	40.75 ± 14.86 ^{2,4)}	50.50 ± 15.18 ^{2,4)}

注:与 A 组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$, 与 B 组相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.5 肝组织病理学 A 组大鼠肝细胞排列整齐,肝窦结构清楚,无炎性细胞浸润;B 组大鼠肝细胞呈灶状及片状坏死,肝窦结构被破坏,可见大量炎症细胞浸润;C 组大鼠肝脏病理改变较 B 组明显减轻,肝细胞坏死面积明显减少,炎性细胞浸润。D 组大鼠肝小叶清晰,肝索排列接近正常,接近正常肝组织。说明大承气汤对急性肝衰竭动物模型肝脏组织病理具有改善作用。见图 6。

4 讨论

肝细胞凋亡异常参与了病毒性肝炎、酒精性肝病、自身免疫性肝炎、肝细胞癌等多种肝脏疾病的发生发展过程^[5],尤其与肝衰竭发生关系密切,为肝衰竭发病的关键环节^[6]。肝细胞凋亡主要是 Fas/FasL 途径介导所致^[7],而 FADD 在由 Fas 介导的多条凋亡通路中起着重要作用^[8]。Fas/FasL 结合后,需要 Fas 蛋白的胞内区通过其 C 末端死亡区(DD)与 Fas 相关的 FADD 结合,而 FADD 羟基末端与 Fas 蛋白的胞内区结合后,其氨基末端则是引起死亡信号转导的必需成分,称为死亡效应(DED)。FADD 通过 DED 区直接与 Caspase-8 结合使后者活化,进

一步启动 Caspase 级联反应,导致肝细胞凋亡的发生^[9]。

作为细胞凋亡信号传递的连接蛋白,FADD 介导着多种死亡受体诱导的细胞凋亡信号传导通路,起着承上启下的桥梁作用,是细胞凋亡的中转站。FADD 通路被认为是细胞膜死亡受体,包括 Fas (APO-1/CD95/FasL receptor)、肿瘤坏死因子受体 1 (tumor necrosis factor receptor type1, TNFR1)、肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL) 等参与细胞凋亡的主要通路^[10]。FADD 是 TNFR1 介导凋亡的必需蛋白,当 TNF-α 与 TNFR1 结合后,TRADD (TNF-R1 相关死亡域蛋白)首先被招募到 TNFR1 信号复合体上,通过其聚集的死亡结构域与 FADD 的死亡结构域结合,转导凋亡信号。

大承气汤是祖国医学具有泻下作用的经典名方,其源于汉代张仲景的《伤寒杂病论》,由大黄、厚朴、枳实、芒硝 4 味中药组成,具有峻下热结的功能,为通里攻下的代表方剂。笔者前期研究结果证实:大承气汤可改善急性肝衰竭大鼠肠道菌群失调,降低血浆内毒素水平,同时可降低核因子-κB 及 CD14 活性,阻断内毒素生物学效应,对急性肝衰竭肠源性内毒素血症具有明显干预作用,对急性肝衰竭大鼠具有保护作用。

实验研究表明,中药能够抑制急性肝衰竭大鼠肝细胞凋亡,从而保护肝脏功能^[11]。本研究结果显示大承气汤抑制了肝组织内 FADD, TNFR1 及 Caspase-8 的表达,减少了血浆 TNF-α 含量,同时结果显示急性肝衰竭大鼠肝脏有大量肝凋亡细胞,而经大承气汤干预后各组凋亡细胞明显减少,肝脏病理明显改善,且高剂量组治疗效果优于低剂量组,提示大承气汤可减轻急性肝衰竭大鼠肝细胞衰竭和降低肝细胞凋亡指数,提示大承气汤抑制肝细胞凋亡和坏死可能是其预防和治疗急性肝衰竭的机制之一。

其防治肝细胞凋亡机制可能是大承气汤通过抑制 FADD 表达,减轻炎症细胞因子的释放和浸润,及 TNF-α 因子的产生,以达到抑制 Caspase-8 介导的细胞凋亡过程,影响了蛋白酶级联切割过程,从而对肝细胞的衰竭有明显的保护作用。

[参考文献]

[1] 王春妍,范玉强,胡东胜,等. 大承气汤对急性肝衰竭大鼠肠源性内毒素血症的干预作用[J]. 时珍国医国药,2009,20(9):2325.

基于因子分析的定经汤调节卵巢早衰生物学机制研究

张磊, 邓树泳, 张琰, 王秀凤, 罗来成^{*}
(广东药学院基础学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:探讨定经汤调节卵巢早衰的生物学机制。方法:SD 大鼠 90 只,随机分为 3 组:正常组、模型组、定经汤干预组;分别检测其与卵巢早衰相关的生物分子:β-内啡肽(β-EP)、白介素-1(IL-1)、一氧化氮合酶(NOS)、一氧化氮(NO)、雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)、促性腺激素释放激素(GnRH)、促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)、促卵泡激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌二醇(E₂)、孕酮(P)、促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质醇(CORT);利用因子分析方法探究定经汤干预下各生物分子之间的相互调控关系,并探寻定经汤调节卵巢早衰过程中的关键生物分子。结果:定经汤干预状态的生殖内分泌网络主调控因子主要包括垂体-卵巢轴上的 4 个生物分子,垂体-肾上腺轴靶腺层生物分子 CORT 以及部分下丘脑生物分子;IL-1 是定经汤干预状态生殖内分泌网络主调控因子与其他公共因子共有的下丘脑部位的生物分子。结论:定经汤一方面可以直接调节垂体-肾上腺轴生物分子,另一方面又可以通过下丘脑间接调节垂体-肾上腺轴生物分子;各调控因子之间起枢纽作用的生物分子为 IL-1。

[关键词] 定经汤; 卵巢早衰; 生物学机制; 因子分析; 主调控因子

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2013)20-0237-04

[doi] 10.11653/syfy2013200237

Study on Biological Mechanisms of Premature Ovarian Failure in Rats by Curing with Dingjing Decoction Based on Factor Analysis

ZHANG Lei, DENG Shu-yong, ZHANG Yan, WANG Xiu-feng, LUO Lai-cheng^{*}

[收稿日期] 20130117(016)
[基金项目] 国家自然科学基金项目(81073073)
[第一作者] 张磊, 硕士, 从事生物系统与数值计算研究, Tel:13450415421, E-mail:zhanglei.st@163.com
[通讯作者] ^{*} 罗来成, 教授, 从事生物信号处理研究, Tel:13560443416, E-mail:llc1963@163.com

[2] 王春妍,杨世忠,迟宝荣. 大承气汤对急性肝衰竭大鼠肠源性内毒素血症生物学效应的阻断作用[J]. 中西医结合肝病杂志,2006,16(6):356.

[3] 李文,郑芳,张集圣. 大承气汤对急性细菌性腹膜炎家兔重要脏器血流的影响[J]. 中国中西医结合外科杂志,1999,5(2):114.

[4] 谢文利,林秀珍,齐刚. 大承气汤颗粒剂对大鼠肠平滑肌细胞内三磷酸肌醇的影响[J]. 中草药,1999,30(12):923.

[5] Yoon J H,Gores G J. Death receptor-mediated apoptosis and the liver[J]. J Hepatol,2002,37:400.

[6] 臧国庆,周霞秋,俞红,等. 肿瘤坏死因子-α 诱导肝细胞凋亡在暴发性肝衰竭中的作用[J]. 中华消化杂志,2000,20(3):163.

[7] Faubion W A,Gores G J. Death receptors in liver biology and pathobiology[J]. Hepatology,1999,29(1):1.

[8] Juo P, Woom S, Kuoc J, et al. FADD is required for multiple signaling events downstream of the receptor Fas [J]. Cell Growth Differ,1999,10(12):797.

[9] Fuentes-Prior P, Salvesen G S. The protein structures that shape caspase activity. specificity, activation and inhibition[J]. Biochem J,2004,384(Pt2):201.

[10] 葛海燕,甄真. Fas 相关死亡结构域蛋白介导的肝细胞凋亡在肝脏疾病中的作用[J]. 中华实验和临床感染病杂志,2010,4(4):455.

[11] 朱海鹏,高志良,谭德明,等. 酸枣仁汤对小鼠试验性急性肝衰竭的影响[J]. 中国中药杂志,2007,32(8):718.

[责任编辑 邹晓翠]