

· 论著 ·

三七皂甙 Rg1 对脂多糖诱导的大鼠肝细胞损伤的防护作用

李剑瑜 刘毅 高波 戴富林 武凡

【摘要】 目的 探讨脂多糖诱导大鼠肝细胞的损害特点,并探讨三七皂甙 Rg1 抗肝细胞损害的保护作用。**方法** 用胶原酶灌注法分离肝细胞。脂多糖诱导大鼠肝细胞损害,透射电镜观察肝细胞形态学的变化,DNA 凝胶电泳观察其生化变化,用单细胞凝胶电泳法(SCGE)进一步探讨肝细胞损害的特点,并探讨三七皂甙 Rg1 对肝细胞损害的保护作用。**结果** 由脂多糖诱导的肝细胞在形态上表现出染色质凝聚、凋亡小体形成等凋亡特征,生化方面表现出典型的 DNA 梯度,此过程可被凋亡抑制剂 Quinacrine 抑制。用 SCGE 法检测出,肝细胞凋亡和死亡数量与脂多糖的诱导时间有明显的相关性。在此基础上,观察到三七皂甙 Rg1 可抑制肝细胞凋亡和坏死,其抑制效果与 Quinacrine 无明显差异。**结论** 三七皂甙 Rg1 可显著抑制肝细胞凋亡和坏死,是防治肝细胞损害的良好药物。

【关键词】 脂多糖; 单细胞凝胶电泳; 三七皂甙 Rg1; 肝细胞损害

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.01.005

Investigation of the protective effect of panax Notoginseng saponins Rg1 on damage of isolated rat hepatocytes LI Jian-yu, LIU Yi, GAO Bo, et al. Laboratory Department, Zhuozhou Hospital, Zhuozhou 072750, China

Corresponding author: WU Fan, E-mail: foxfoxzhou@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of liposaccharide (LPS) on hepatocyte damage and find out effective hepatoprotectants by means of single cell gel electrophoresis. **Methods** The hepatocytes were isolated in the way of liver perfusion with collagenase. Transmission electron microscope technique was used to observe the morphological change of hepatocyte. The biochemical changes were analyzed by the DNA agarose gel electrophoresis. The SCGE was used to study hepatic damage and find out effective hepatoprotectants. **Results** The hepatocytes incubated with LPS exhibited the condensation of nuclear chromatin and formed apoptotic bodies. The DNA fragment was demonstrated in biochemistry, but it was inhibitory by Quinacrine. The rate of hepatic apoptosis and necrosis has a good conelationship with LPS-treated time. Panax notoginseng saponins Rg1 can inhibit both of them. The inhibited effect had no difference with Quinacrine. **Conclutions** Panax notoginseng saponins Rg1 can inhibit hepatic apoptosis and necrosis remarkably, It has a good protective effect on damage of rat hepatocytes.

【Key words】 Liposaccharide; Single cell gel electrophoresis; Panax notoginseng saponins Rg1; Liver damage

现在广泛认为脂多糖(liposaccharide, LPS)是导

致脓毒血症、败血症休克的直接原因,并可导致多功能不全综合征(multi organ dysfunction syndrome, MODS)发生,而肝脏则是 MODS 最早受损和受损最为严重的脏器^[1,2]。由于缺乏简便有效的治疗药物,对 MODS 的治疗至今未取得突破性的进展。三七皂甙 Rg1 是中国传统中草药三七的单体成分,其对急性肝损伤的作用和保护机理,目前鲜见报导。

作者单位:072750 河北省涿州市医院检验科(李剑瑜、武凡),呼吸科(刘毅、高波、戴富林)

作者简介:李剑瑜(1974-),女,本科,主治医师。研究方向:肝细胞的损害与抗损害。E-mail:ljy1797@163.com

通讯作者:武凡(1949-),女,博士,教授。研究方向:肝细胞的损害与抗损害。E-mail:foxfoxzhou@sina.com

文献标引格式:

李剑瑜,刘毅,高波,等.三七皂甙Rg1对脂多糖诱导的大鼠肝细胞损伤的防护作用[J].环球中医药,2012,5(1):19-22.

本实验用透射电镜、DNA 凝胶电泳、单细胞凝胶电泳法(single cell gel electrophoresis assay, SCGE, 又称慧星电泳)探讨 LPS 所致肝细胞损害的特点,并探讨三七皂甙 Rg1 抗肝细胞损害的作用及作用机理,为急性肝细胞损伤的治疗决策提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

LPS、胶原酶IV、percoll 均购自 sigma 公司;triton x-100 购于 Furka 公司,三七皂甙 Rg1 为昆明植物研究所产品。

1.2 实验动物

Wistar 大鼠 32 只,体重(200±12)g。

1.3 实验方法

1.3.1 肝细胞分离与纯化 胶原酶原位灌注法分离大鼠肝细胞,参照文献^[3]进行。取 Wistar 大鼠 32 只,随机分为 4 组,每组 8 只,胶原酶原位灌注法分离大鼠肝细胞后用台盼蓝排除试验检测肝细胞存活率>90%,计算细胞浓度,调整细胞数为 10⁶ 个/ml。于正常对照组、LPS 组、LPS+Rg1 组、LPS+Quinacrine 组分别加入 20 mmol/L PBS、3 mg/L LPS、3 mg/L LPS+20 mmol/L Rg1、3 mg/L LPS+5 μmol/L Quinacrine,于施加因素后 0、2、4、6、8、12 小时分别收集肝细胞和肝细胞培养液进行各指标测定。

1.3.2 透射电镜观察 肝细胞收获后,离心弃上清,PBS 漂洗三次,2% 戊二醛液固定,1 mol/L 二甲砷酸缓冲液漂洗,1% 四氧化锇固定,丙酮系列脱水,环氧树脂包埋,切片染色后观察。

1.3.3 DNA 片段的提取 参照文献^[4]提取培养肝细胞的 DNA 片段,经空气干燥后,溶于 20 μl 的双蒸水中,4℃ 保存。用于 DNA 梯度电泳。

1.3.4 SCGE 检测 参照文献^[3]并加以改进。于 45℃,100 μl 1% 正常熔点琼脂糖的无 Ca²⁺、Mg²⁺ PBS 悬液浇注到磨粗的 Dakin 载玻片上将纯化后的肝细胞进行固化成三层。然后将玻片置水平电泳槽液面下 0.25 cm,在碱性电泳缓冲液中放置 20 分钟后 25 V,300 mA,电泳 20 分钟。用 0.4 mol/L Tris(pH 7.5)浸洗,每次 15 分钟,共 3 次,然后用溴化乙锭水溶液染色。染色后的单个肝细胞应尽快在荧光显微镜下观察。

1.4 统计学分析

统计软件为 SPSS 17.0 统计软件包。SCGE 玻片用 CM-2000B 彩色医用图像分析系统分析。数

据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并经正态性检验以及方差齐性检验。凋亡与坏死的时相性变化相关分析采用 pearson's 检验。Rg1 对大鼠肝细胞损害的抑制作用数据采用方差分析和组间 q 检验。

2 结果

2.1 肝细胞形态学变化

大鼠肝细胞在加入 LPS(终浓度 3 mg/L)后培养 2 小时,透射电镜下观察,图 1 可见较早期凋亡的肝细胞。染色质固缩聚集于核膜,呈境界分明的块状或新月状,在上方可见一个较小的凋亡小体。图 2 可见正在形成凋亡小体的肝细胞,该细胞胞质浓缩,细胞周围有大小不等的凋亡小体。

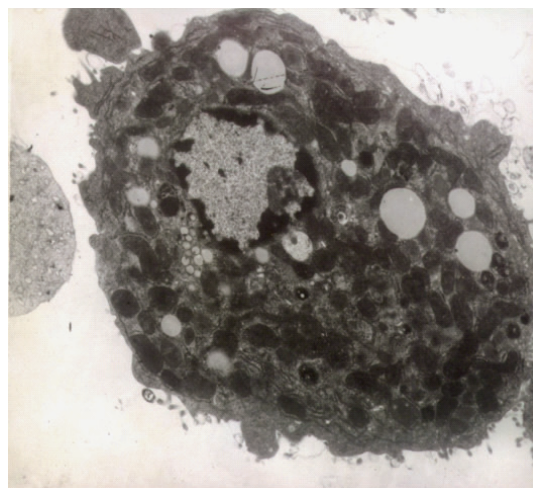


图 1 LPS 处理 2 小时后肝细胞凋亡的电镜检测(×6000)

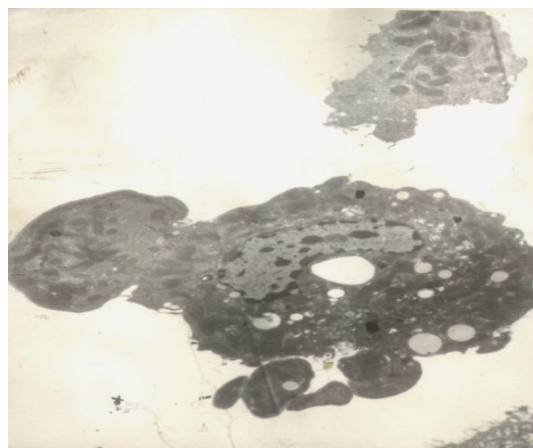


图 2 LPS 处理 2 小时后肝细胞凋亡的电镜检测(×3500)

2.2 DNA 梯度电泳

各组大鼠肝细胞在加入施加因素后于 4 小时后提取细胞 DNA,在 1.5% 的琼脂糖上电泳,35 V,电泳 2 小时,泳道 1 为 marker,泳道 2 和 3 为 LPS

组,泳道 4 为 LPS+Rg1 组、泳道 5 为 LPS+Quinacrine 组,泳道 6 为正常对照组,泳道 2 和 3 均出现典型的梯状条带,说明有明显的凋亡现象,泳道 4 和泳道 5 的条带颜色较浅,说明凋亡细胞明显减少,而泳道 6 对照组无此现象,说明没有凋亡细胞(见图 3)。

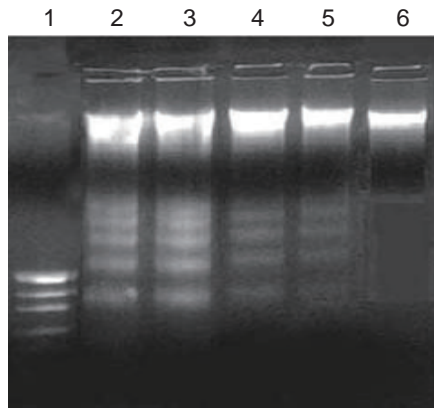
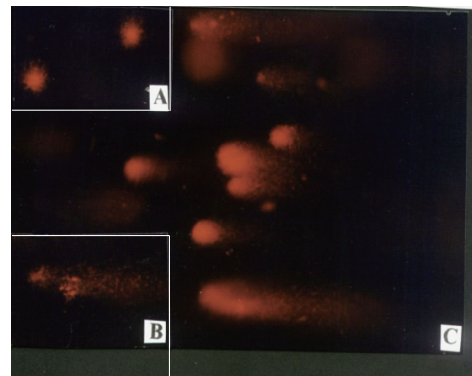


图 3 DNA 梯度电泳

2.3 单细胞凝胶电泳检测

在通常情况下,DNA 双链以组蛋白为核心。盘旋形成核小体。在核小体中 DNA 为负超螺旋结构。如果有去污剂进入细胞,核蛋白被浓盐提取,DNA 便形成残留的类核,镜下可见荧光强度较强的图形头部,无拖尾,为正常细胞(见图 4A)。如果类核中 DNA 断裂,就会在核外形成一个 DNA 晕轮,DNA 断裂将引起超螺旋松散,电泳时 DNA 断裂片向阳极伸展,形成特征性慧星(见图 4C)。细胞凋亡时 DNA 在质膜损伤以前断裂,这种断裂很容易被这种方法显示,被称为“凋亡之慧星”。凋亡慧星的数量可以代表凋亡细胞的数量。在慧星电泳中,

坏死细胞由于细胞膜受损,DNA 随机断裂,形成没有明显头部的拖尾(见图 4B)。因为慧星电泳能将正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞定量地区分开来,所以更有利于凋亡的深入研究。原代培养肝细胞于各培养皿中加入处理因素后培养 0、2、4、6、8、12 小时进行电泳。图 4 为电泳 2 小时的各组细胞,对照组为正常细胞(见图 4A),而 LPS 组为凋亡细胞(见图 4C),坏死细胞(见图 4B)。



A 正常细胞,B 坏死细胞,C 凋亡细胞

图 4 单细胞凝胶电泳检测

由表 1 可见用 SCGE 法检测 LPS 诱导肝细胞损害的时相性变化,6 小时内凋亡细胞数增加较快,8 小时后坏死细胞数急剧增加,12 小时坏死细胞占绝大多数。

由表 2 可见三七皂甙 Rg1 明显抑制 LPS 所致的肝细胞凋亡与坏死,其效果与凋亡抑制剂 Quinacrine 无明显差异。

表 1 用 SCGE 法检测 LPS 诱导肝细胞凋亡与坏死的时相性变化($n=8, \bar{x} \pm s, \%$)

	0 小时	2 小时	4 小时	6 小时	8 小时	12 小时
凋亡细胞	0	7.2 ± 2.6	13.2 ± 3.4	16.7 ± 5.1	19.5 ± 4.6	22.2 ± 5.4
坏死细胞	5.9 ± 1.1	10.2 ± 2.4	14.5 ± 3.6	30.2 ± 4.4	42.2 ± 6.4	45.2 ± 7.4

注:凋亡细胞与处理时间的相关性 $r=0.971, P<0.01$;坏死细胞与处理时间的相关性 $r=0.941, P<0.01$ 。

表 2 Rg1 对 LPS 诱导的原代培养 8 小时大鼠肝细胞损害的抑制作用($n=8, \bar{x} \pm s$)

组 别	凋亡细胞(%)	坏死细胞(%)
正常对照组	2.2 ± 0.4	6.1 ± 1.2
LPS 组	20.3 ± 5.2^a	42.5 ± 6.3^a
LPS+Rg1 组	11.4 ± 3.1^b	13.4 ± 3.8^b
LPS+Quinacrine 组	13.5 ± 4.3^b	14.9 ± 4.1^b

注:与正常对照组细胞相比^a $P<0.01$;与 LPS 组相比^b $P<0.01$ 。

文献标引格式:

李剑瑜,刘毅,高波,等.三七皂甙Rg1对脂多糖诱导的大鼠肝细胞损伤的防护作用[J].环球中医药,2012,5(1):19-22.

3 讨论

已知认为肝脏是 LPS 导致受损最为严重的器官^[1,2],但受损的性质和机制尚存在争议^[5],更缺乏有效的治疗药物。三七皂甙具有抗炎、抗氧化、抗衰老作用,但对急性肝细胞损伤的作用机理尚未见报导。在本实验中,用 LPS(3 mg/L)处理原代培养肝细胞 2 小时,电镜可见典型的凋亡细胞和凋亡小体。DNA 凝胶电泳也表现明显的凋亡梯度,用 SCGE 检测发现 LPS(3 mg/L)处理 2 小时肝细胞即可得到凋亡细胞为 $7.2\% \pm 2.6\%$,坏死细胞为 $10.2\% \pm 2.4\%$,提示 LPS 引起的肝损害的性质及严重程度。这说明 LPS 可以直接诱导肝细胞凋亡与坏死。LPS 引起的肝细胞损害的时相性变化,至今也未见报导,本资料用改进的 SCGE 法做进一步探讨发现 LPS 引起的肝细胞凋亡与坏死都有显著的时相性变化。

SCGE 也叫慧星电泳,是一种直接显示单个细胞 DNA 损伤的微电泳技术^[2,6]。但 SCGE 鲜见应用于肝细胞损伤研究的报道。由于 SCGE 能将正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞定量地区分开,而且敏感性高、方法简便、价格便宜,因而可以成批的检测标本,SCGE 比起昂贵的 1995 年 Verma 首次使用的 AnnexinV/pI 法定量分析凋亡细胞与坏死细胞显示了更多的优越性,所以有利于肝损害的研究。用 SCGE 检测原代培养肝细胞,加 3 mg/L LPS 2 小时可以观察到明显的肝细胞凋亡与坏死,这比最近报导的使用 LPS 10 mg/L 4 小时发现凋亡细胞与坏死细胞敏感的多^[6]。表 1 显示在 8 小时之内凋亡细胞与坏死细胞的增加与处理时间有明显的相关性,到 12 小时凋亡细胞数急剧下降,而坏死细胞数从第 8 小时迅速上升,于 12 小时占绝大多数。本资料提示 LPS 诱导的肝脏损害是一个从肝细胞凋亡到坏死的过程。这一过程可能是细胞死亡连锁反应的不同阶段,其原因可能在于虽然凋亡与坏死是细胞死亡的两种不同形式,但两者不是毫无关联的。它们之前的交错在于无论哪种死亡形式,最终都伴有能量不足、大分子物质的降解以及自由基的形成^[4],另一方面同一种诱导因素,如本实验中刺激因素 LPS,由于时间的不同而导致连锁反应的两个

阶段。

本资料用 SCGE 法表明 LPS 诱导的肝细胞损害的存在以及严重程度,因此寻找有效的特异治疗 MODS 的药物成为笔者进一步研究的焦点。Quinacrine 可以抑制肝损害,但考虑到 Quinacrine 的作用有脏器选择性及效应多样性,该药在进入治疗急性肝损伤前,仍有许多问题尚未解决^[3,4]。在国外学者把 MODS 称为介质病,在用介质疗法显得苍白无力的时候^[3],本课题组用灵敏度高、价格便宜的 SCGE 对中药进行筛选。研究发现具有抗炎、抗氧化、抗衰老作用的三七皂甙单体 Rg1 对急性肝损害有明显抑制作用,显著地抑制肝细胞凋亡与坏死,在治疗急性肝损伤有着 Quinacrine 不可替代的优越性,预示其应用的广泛前景。

总之,本资料提示 SCGE 法是研究肝细胞损害并进行药物筛选的良好方法。用该法笔者发现 LPS 诱导的肝细胞损害是一个从肝细胞凋亡到坏死的过程,并证实三七皂甙 Rg1 为肝细胞损害的有效的保护剂,深化了对 MODS 的认识,为 MODS 的治疗提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] 武凡,张树三,康格非.三七皂甙对肝纤维化大鼠分泌型磷脂酶 A2 和肿瘤坏死因子表达的影响[J].中华肝脏病杂志,2003,11(1):51-52.
- [2] 褚丽萍,刘强,王芹,等.线粒体 DNA 4977 bp 缺失和彗星分析评价肿瘤细胞的辐射敏感性[J].中华放射医学与防护杂志,2008,28(2):142-145.
- [3] Relja B, Schweska B, Lee VS, et al. Inhibition of C-Jun N-terminal kinase after hemorrhage but before resuscitation mitigates hepatic damage and inflammatory response in male rats[J]. shock,2009,32(5):509-516.
- [4] Croner RS, Hohenberger W, Jeschke MG. Hepatic gene expression during endotoxemia[J]. J Surg Res, 2009,154(1):126-134.
- [5] 王东吉,武凡.三七皂甙单体 Rb1 对大鼠脑缺血再灌注时脑细胞凋亡及 cPLA2 蛋白表达的影响[J].中国康复医学杂志,2007,22(5):414-415.
- [6] Greulich KO. Photons bring light into DNA repair: The comet assay and laser microbeams for studying photogenotoxicity of drugs and ageing[J]. J Biophotonics, 2011,4(3):165-171.

(收稿日期:2011-08-30)

(本文编辑:刘群)