

三七皂苷 Rg1 对肝纤维化大鼠线粒体质子跨膜转运的作用机制

李剑瑜 刘鹏年 张霞 穆启梅 高飞 甄敬辉 柳伟 石娜 武凡

【摘要】 目的 探讨在三七皂苷(panax notoginseng saponins, PnS) Rg1 干预下,肝纤维化大鼠线粒体质子跨膜转运的变化和肝线粒体膜的流动性的变化,为开发三七单体 Rg1 在临床抗纤维化的应用提供详尽的试验依据和理论基础。**方法** 72 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)肝纤维化大鼠模型组、PnS Rg1 组各 24 只。除对照组外,其余 2 组用 5% CCl₄ 橄榄油按 5 mL/kg 灌胃制作肝纤维化大鼠模型。PnS Rg1 组在每次 CCl₄ 灌胃同时腹腔注射 PnS Rg1 (5 mg/kg) 用稳态荧光探针标记技术动态观察肝纤维化大鼠线粒体质子跨膜转运的变化,用荧光偏振法测定肝线粒体膜的流动性和膜的微黏度的改变。**结果** (1)与对照组相比,肝纤维化模型组大鼠用单因素多组间方差分析,发现模型组大鼠质子跨膜转运中,肝线粒体质子跨膜转运能力显著下降($P < 0.01$)。PnS Rg1 组与对照组相比质子跨膜转运的变化没有显著性意义($P > 0.05$),与模型组相比,有显著性差异($P < 0.01$)。(2)肝纤维化模型组大鼠用单因素多组间方差分析,与对照组相比,证实模型组大鼠线粒体膜的流动性显著下降($P < 0.01$),增加膜的微黏度($P < 0.01$);而 Rg1 组与模型组相比增加线粒体膜的流动性($P < 0.01$),降低膜的微黏度($P < 0.01$)。**结论** 肝纤维化大鼠肝线粒体质子跨膜转运能力下降和线粒体膜的流动性显著下降是导致肝纤维化的重要原因之一。PnS Rg1 通过增加肝线粒体质子跨膜转运能力和线粒体膜的流动性而防治肝纤维化的发生发展的。

【关键词】 肝纤维化; 线粒体; 质子跨膜转运; 膜的流动性; 三七皂苷 Rg1

【中图分类号】 R285 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.05.003

Action mechanism of proton translocation across mitochondrial membrane of notoginsenoside Rg1 on hepatic fibrosis rats LI Jian-yu, LIU Peng-nian, ZHANG Xia, et al. Blood Transfusion Department of Zhuozhou City Hospital, Zhuozhou 072750, China

Corresponding author: WU Fan, E-mail: wufanfan49@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the changes in proton translocation across mitochondrial membrane and hepatic mitochondria membrane fluidity of rats with hepatic fibrosis under the intervention of notoginsenoside Rg1, in order to provide detailed experimental and theoretical basis for the clinical application of notoginsenoside Rg1. **Methods** 72 Wistar rats were randomly divided into control group, carbon tetrachloride (CCl₄) group, model group and notoginsenoside Rg1 group, and with 24 rats in each group. All the rats received gavage administration with 5% CCl₄ solution (5 mL/kg) in addition to the control group, and rats in notoginsenoside Rg1 group received intraperitoneal injection with notoginsenoside Rg1 (5 mg/kg) based on the gavage administration. The change of proton translocation across mitochondrial membrane of rats with hepatic fibrosis was observed dynamically by using steady-state fluorescence probe technique. The change of hepatic mitochondria membrane fluidity and the viscosity of membrane were observed by using fluorescence polarization methods. **Results** (1) Compared with control group, the ability of proton-translocation across mitochondrial membrane in hepatic was declined significantly of rats in model group ($P < 0.01$). There was no significant difference in ability of proton-translocation across mitochondrial

作者单位:072750 河北省涿州市医院输血科(李剑瑜、刘鹏年、张霞、穆启梅、甄敬辉、柳伟、石娜),CT室(高飞),检验科(武凡)

作者简介:李剑瑜(1973-),女,本科,副主任技师。研究方向:临床检验。E-mail:ljj1797@163.com

通信作者:武凡(1949-),女,博士,教授。研究方向:细胞损伤与抗损伤。E-mail:wufanfan49@163.com

membrane in hepatic of rats between control and notoginsenoside Rg1 groups ($P > 0.05$), while the difference was significant between model and notoginsenoside Rg1 groups ($P < 0.01$). (2) Compared with control group, the mitochondrial membrane fluidity of rats in model group was declined significantly ($P < 0.01$), and the membrane viscosity was increased significantly ($P < 0.01$). Compared with model group, the mitochondrial membrane fluidity of rats in notoginsenoside Rg1 group was increased ($P < 0.1$), while the membrane viscosity was declined significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** One of the important causes of hepatic fibrosis rats was the decline in ability of proton-translocation across mitochondrial membrane and membrane fluidity in hepatic. Notoginsenoside Rg1 could prevent the occurrence and development of hepatic fibrosis through increasing the ability of proton-translocation across mitochondrial membrane and membrane fluidity of hepatic.

【Key words】 Hepatic fibrosis; Mitochondria; Proton-translocation across mitochondrial membrane; Mitochondrial membrane fluidity; Notoginsenoside Rg1

肝纤维化是很多慢性肝病的共同的病理过程, Banasch^[1]提出肝脏线粒体氧化磷酸化过程中, 线粒体氧化磷酸化的改变是影响肝纤维化发生发展的重要因素。在氧化磷酸化过程中, 质子跨膜转运是线粒体磷酸化能量的基础。在底物氧化还原能的驱动下, 质子由基质转运到线粒体内膜外侧, 形成质子电化学梯度。在此质子电化学梯度跨膜转运的驱动下形成线粒体磷酸化。然而, 在肝纤维化时线粒体质子跨膜转运的情况如何, 鲜见报道, 线粒体膜流动性对肝纤维化的形成具有重要的作用, 但对肝纤维化大鼠的线粒体膜流动性的研究还不够深入。本实验用生物化学和生物物理学的方法研究大鼠肝纤维化肝线粒体质子跨膜转运变化和线粒体膜流动性及其机理。目前线粒体质子跨膜转运和膜流动性的改变所导致肝纤维化尚无根本有效的治疗方法, 近年文献提出三七皂苷对治疗慢性肝病有一定疗效^[2], 但对三七皂苷抗纤维化机制的研究主要是探讨三七皂苷并非单体, 研究其对自由基和细胞因子的影响, 其对肝纤维化线粒体的质子跨膜转运和膜流动性的作用和机理目前鲜见报导。实验用 5% CCl_4 橄榄油溶液制作大鼠肝纤维化模型, 从生物化学和生物物理学方面地深入地研究三七皂苷单体 Rg1 对肝纤维化大鼠线粒体质子跨膜转运和膜流动性的作用及机理, 为开发三七单体 Rg1 在临床抗纤维化的应用提供详尽的试验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

72 只健康雄性 Wistar 大鼠, 体质量(250 ± 20)g, 购自河北医科大学实验动物中心, 合格证号: 冀医动字第 04056 号。

主要试剂: 三七皂苷 Rg1 购自昆明植物研究所, Hepes、IV 型胶原酶、胰蛋白酶抑制剂、Percoll、9-氨基-6-氯-2-甲氧基吖啶 (9-amino-6-chloro-2-meto-acridine, ACMA)、NADH、琥珀酸钠等均购于 sigma 公司。ATP 购于 Beckman Coulter inc。1,6-二苯基-1,3,5 乙三稀 (1,6-diphenyl -1,3,5,-hexatriene, DPH) 购自瑞典 Fluka 公司。

1.2 动物模型复制

将 72 只大鼠随机分为 3 组, 每组 24 只, I 组 PBS 灌胃作为对照组, II 组用 5% CCl_4 橄榄油按 5 mL/kg 灌胃, 每 2 天 1 次, 共 15 次, 作为 CCl_4 模型组, III 组在每次 CCl_4 灌胃同时腹腔注射 Rg1 5mg/kg 为 Rg1 组。各组均以普通饲料喂养, 配以 5% 酒精饮用水。每组于 2 周、3 周和 4 周均有 6 只大鼠供作生物物理学等的研究用。

1.3 标本采集与测定方法

1.3.1 测定肝线粒体质子跨膜转运 按差速离心法, 参考文献^[3]制备肝线粒体, 用 Lowry 法测定蛋白质含量。将制备的线粒体用 SET 液 (含 250 mmol/L 蔗糖, 2 mmol/L Tris-HCl pH 7.4) 放置 -20°C 储存。

采用 ACMA 标记法, 反应缓冲液 2 mL (含 250 mmol/L KCl, 75 mmol/L 蔗糖, 2 mmol/L MgSO_4 , 30 mmol/L Tris-HCl pH 8.0) 中加入 ACMA 至终浓度分别为 0.2 g/L 和 5 $\mu\text{mol/L}$ 。在 RF-540 荧光分光光度计上进行激发波长 (E_x) 和发射波长 (E_m) 扫描, 选取最适 E_x 和 E_m , 读取荧光强度值作为基线, 迅速加入 NADH 或琥珀酸钠至终浓度分别为 0.5 mmol/L 和 10 mmol/L 以测定呼吸链引起的跨膜 H^+ 梯度。测定 ATP 引起的跨膜 H^+ 转运, 先加入呼吸链阻断剂氰化钾 (1 mmol/L) 以阻断细胞色素 C 到氧的电子传递, 然后再加入 ATP (1 mmol/L), 观察并记录其荧光强度随时间的变化。以上均在 30°C 进行, 狭缝 10 nm, 用

稳态荧光探针标记技术动态观察肝纤维化大鼠线粒体质子跨膜转运的变化,最大荧光淬灭值,最大荧光淬灭时间和半数荧光淬灭时间。

1.3.2 线粒体膜流动性的测定 取新鲜肝组织,参考文献^[4]提取线粒体膜,采用荧光标记与荧光偏振法,以DPH作为荧光探针标记线粒体膜以测定线粒体膜的流动性,激发光波 362 nm,发射光波长 432 nm,在荧光分光光度计上(加偏振片)测定膜荧光偏振度(P),按公式 $\eta = 2p/0.46 - P$,求出平均微黏度。

1.4 统计学处理

统计软件为 SPSS 15.0 统计软件包。数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组之间比较采用 SNK 检验,相关分析用 pearson's r test。

2 结果

2.1 肝线粒体质子跨膜转运的变化

荧光波长扫描 ACMA 荧光 E_x 峰为 400 nm, E_m 峰为 480 nm。多组间比较采用单因素方差分析,两组之间比较采用 SNK 检验。与对照组相比,模型组大鼠线粒体在能量化(ATP)和底物 NADH、琥珀酸钠驱动下最大荧光淬灭值较对照组相比显著减少 ($P < 0.01$),最大荧光淬灭时间、半数荧光淬灭时间较对照组显著延长 ($P < 0.01$)。PnS Rg1 组与对照组相比,最大荧光淬灭值,最大荧光淬灭时间和半数荧光淬灭时间改变没有显著性意义 ($P > 0.05$),说明质子跨膜转运的变化没有显著性意义 ($P > 0.05$),表明 PnS Rg1 对肝纤维化大鼠肝线粒体质子跨膜转运能力有保护作用。见表 1。

2.2 肝线粒体膜流动性的变化

多组间比较采用单因素方差分析,两组之间比较采用 SNK 检验,与对照组相比,模型组大鼠线粒体膜的流动性显著下降 ($P < 0.01$),膜的微黏度增加 ($P < 0.01$),而 Rg1 组与模型组相比增加线粒体膜的流动性 ($P < 0.01$),膜的微黏度下降 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.3 肝纤维化大鼠线粒体荧光淬灭值与肝线粒体膜荧光偏振度的相关性

检测模型组大鼠在肝纤维化形成过程中各时相点的变化,与对照组相比,加入琥珀酸钠后线粒体荧光淬灭值在第 2 周明显下降,第 3 周就有明显差异 ($P < 0.05$),第 4 周有显著性差异 ($P < 0.01$)。线粒体荧光淬灭值与肝线粒体膜荧光偏振度的相关性分析用 pearson's 检验, $r = -0.836$,线粒体荧光

淬灭值与肝线粒体膜荧光偏振度呈负相关。见表 3。

表 1 第 4 周各组大鼠肝线粒体荧光淬灭值的变化

组别	ATP	NADH	琥珀酸
对照组 ($n = 6$)			
最大荧光淬灭值 (ΔA_{max})	19.35 ± 2.86	19.43 ± 2.06	17.94 ± 2.58
最大荧光淬灭时间 ($T \Delta A_{max}/min$)	3.13 ± 1.69	2.63 ± 1.46	3.06 ± 0.76
半数荧光淬灭时间 ($T \frac{1}{2} \Delta A_{max}/min$)	0.76 ± 0.38	0.75 ± 0.46	0.95 ± 0.22
模型组 ($n = 6$)			
最大荧光淬灭值 (ΔA_{max})	12.30 ± 2.72	9.55 ± 1.80	12.70 ± 1.02
最大荧光淬灭时间 ($T \Delta A_{max}/min$)	6.37 ± 1.28	5.32 ± 1.28	5.96 ± 0.69
半数荧光淬灭时间 ($T \frac{1}{2} \Delta A_{max}/min$)	1.61 ± 0.39	1.58 ± 0.41	1.62 ± 0.12
Rg1 大鼠组 ($n = 6$)			
最大荧光淬灭值 (ΔA_{max})	18.30 ± 2.72	20.55 ± 1.80	16.70 ± 2.02
最大荧光淬灭时间 ($T \Delta A_{max}/min$)	7.37 ± 1.28	10.45 ± 2.29	4.96 ± 0.69
半数荧光淬灭时间 ($T \frac{1}{2} \Delta A_{max}/min$)	1.81 ± 0.39	2.98 ± 0.49	1.41 ± 0.12

表 2 第 4 周各组大鼠肝线粒体膜荧光偏振度和微黏度的比较

组别	荧光偏振度	微黏度
对照组	0.43 ± 0.07	1.98 ± 0.17
模型组	0.76 ± 0.05	5.68 ± 1.36
Rg1 组	0.39 ± 0.06	2.54 ± 0.53

表 3 横型组肝纤维化大鼠线粒体荧光淬灭值与荧光偏振度的相关性

组别	最大荧光淬灭值 ΔA_{max}	荧光偏振度
0 周大鼠	19.35 ± 2.86	0.43 ± 0.07
模型组 2 周大鼠	15.86 ± 1.61	0.52 ± 0.06
模型组 3 周大鼠	14.51 ± 1.51	0.61 ± 0.06
模型组 4 周大鼠	12.70 ± 1.02	0.76 ± 0.05

3 讨论

ATP 酶由 F_0F_1 两部分构成。 F_0 是质子通道,当 H^+ 顺浓度经 F_0 回流时,催化 ADP 和 P_i 生成并释放 ATP 线粒体呼吸链通过质子的跨膜转运将底物氧化的化学能转变为线粒体膜质子电化学梯度,以供 ATP 合成需要^[5]。Huang 等^[6]认为早期线粒体氧供和氧耗发生改变是肝纤维化形成的主要原因。目前对肝线粒体氧化磷酸化的研究仅局限于测定线粒体氧耗和电子传递情况,对肝纤维化质子跨膜转运线和粒体膜的流动性的情况鲜见文献报道。

本实验中采用稳态荧光标记技术,用 ACMA 标记线粒体,并连续观察其在能量化和底物驱动下的荧光淬灭,以此反映质子跨膜转运的变化。正常动物肝线粒体能量化及底物引起的 ACMA 荧光淬灭值均较大,最大荧光淬灭时间较短,说明线粒体有较高的质子转运活性。加入呼吸链阻断剂 KCN 荧光强度升高,则证明质子转运与呼吸链氧化还原及磷酸化耦联有关。最大荧光淬灭时间($T\Delta A_{\max}$)、半数荧光淬灭时间($T\frac{1}{2}\Delta A_{\max}$)显著延长($P < 0.01$),这支持 Aoun^[5]认为肝变性大鼠肝线粒体内膜能量质子跨膜转运能力降低的观点,本实验进一步说明肝纤维化大鼠肝线粒体内膜能量质子跨膜转运以及呼吸链底物氧化引起的质子跨膜转运能力都降低,与对照组相比,三七皂苷 Rg1 组肝线粒体最大荧光淬灭时间($T\Delta A_{\max}$)、半数荧光淬灭时间($T\frac{1}{2}\Delta A_{\max}$)差异没有显著性意义($P > 0.05$),说明三七皂苷 Rg1 保护大鼠肝线粒体内膜能量质子跨膜转运以及呼吸链底物氧化引起的质子跨膜转运能力。

本实验采用荧光偏振法,以 DPH 作为荧光探针标记线粒体膜以测定线粒体膜的流动性,荧光偏振大,膜流动性小;反之,荧光偏振小,膜流动性大。实验检测到模型组肝脏线粒体膜流动性明显下降,其差异均有显著性($P < 0.01$),提示肝纤维化大鼠线粒体膜刚性增加,流动性下降,与模型组相比,三七皂苷 Rg1 组导致肝线粒体微黏度降低,膜流动性显著增加($P < 0.01$),保护了线粒体膜,加强线粒体的氧化磷酸化的功能,进一步产生 ATP。

本实验用生物化学和生物物理学的方法研究大鼠肝纤维化肝线粒体质子跨膜转运变化和线粒体膜的流动性,首次发现肝纤维化时肝线粒体质子跨膜转运能力明显减弱,线粒体膜的荧光偏振度显著增加,两者具有负相关性,进一步探讨其可能机制。前期工作已证实肝纤维化时自由基产生增多,分泌性磷脂酶 A2 增多,引起线粒体损伤^[6],本实验证实肝纤维化肝线粒体质子跨膜转运能力明显减弱,线粒体膜的流动性显著降低,导致氧化磷酸化解偶联,不能合成 ATP,因此肝纤维化引起线粒体氧化磷酸化作用受损,导致细胞内能量代谢障碍,加速肝纤维化的形成^[7-8]。

线粒体质子跨膜转运能力明显减弱和线粒体膜的流动性显著降低所影响和导致的疾病目前尚无根本有效的治疗方法,基因治疗带来了希望,包括基因转换、线粒体转染、基因的靶向治疗等,但由

于这些基因片段本身存在细胞通透性、细胞毒性、代谢稳定性等方面的问题,因此临床应用尚未有突破性进展^[9]。本课题运用逆向思维,从疗效入手,从临床已经使用的药物入手,来寻找防治肝纤维化线粒体损伤的抑制剂,选用三七皂苷 Rg1 作为研究对象。本实验中证实三七皂苷 Rg1 具有保护大鼠肝线粒体内膜能量质子跨膜转运以及呼吸链底物氧化引起的质子跨膜转运能力,可导致肝线粒体微黏度降低,膜流动性显著增加, $P < 0.01$,保护了线粒体膜,加强线粒体的氧化磷酸化的功能,因此可使 ATP 的合成增加,维持肝细胞进行正常生理功能的能力,防治肝纤维化的产生,为开发三七皂苷单体 Rg1 在临床抗肝纤维化的应用提供了详尽的试验依据和理论基础。

参 考 文 献

- [1] Banasch M, Ellrichmann M, Tannapfel A, et al. The non-invasive (13)C-methionine breath test detects hepatic mitochondrial dysfunction as a marker of disease activity in non-alcoholic steatohepatitis [J]. Eur J Med Res, 2011, 16(6): 258-264.
- [2] 武凡, 李剑瑜, 刘鹏年. 三七皂苷 Rg1、Rb1 抗大鼠肝纤维化的作用及机制研究[J]. 河北医药, 2013, 35(18): 2731-2734.
- [3] 杨鹤鸣, 陆松敏, 刘建仓, 等. 内毒素休克大鼠肝线粒体质子跨膜转运的改变[J]. 生物化学与生物物理进展, 1999, (1): 5-8.
- [4] Parker N, Affourtit C, Vidal-Puig A, et al. Energization-dependent endogenous activation of proton conductance in skeletal muscle mitochondria[J]. Biochem J, 2008, 412(1): 131-139.
- [5] Aoun M, Feillet-C, Fouret G, et al. Rat liver mitochondrial membrane characteristics and mitochondrial functions are more profoundly altered by dietary lipid quantity than by dietary lipid quality: effect of different nutritional lipid patterns[J]. Br J Nutr, 2012, 107(5): 647-659.
- [6] Huang P, Li G, Chen C, et al. Differential toxicity of Mn²⁺ and Mn³⁺ to rat liver tissues: oxidative damage, membrane fluidity and histopathological changes[J]. Exp Toxicol Pathol, 2012, 64(3): 197-203.
- [7] 李剑瑜, 张霞, 刘鹏年, 等. 三七皂苷 Rg1、Rb1 对肝纤维化大鼠线粒体 DNA 三磷酸腺苷酶 6、8 亚基的作用机理研究[J]. 环球中医药, 2014, 7(8): 591-594.
- [8] Arduini A, Serviddio G, Escobar J, et al. Mitochondrial biogenesis fails in secondary biliary cirrhosis in rats leading to mitochondrial DNA depletion and deletions[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2011, 301(1): 119-127.
- [9] Polyak SJ, Morishima C, Lohmann V, et al. Identification of hepatoprotective flavonolignan from silymarin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(13): 5995-5999.

(收稿日期: 2014-12-02)

(本文编辑: 董历华)