

清毒汤对实验性重症肝损伤大鼠肿瘤坏死因子 α 及核转录因子 κ B 表达的影响

曹吴冰 高连印 车念聪 张秋云 杜宇琼 付修文 王融冰 罗佳佳

【摘要】 **目的** 观察清毒汤对实验性重症肝损伤大鼠内毒素(endotoxin, ET)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 以及核转录因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B) 表达的影响, 探讨该方治疗慢性重型肝炎内毒素血症的作用机制。**方法** 建立硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA) 致实验性大鼠重症肝损伤模型, 给予清毒汤干预后, 检测大鼠 ET、TNF- α 以及 NF- κ B 表达的水平。**结果** 与正常组比较, 模型组大鼠血清 ET、TNF- α 以及 NF- κ B 蛋白含量水平均显著升高($P < 0.01$); 与模型组比较, 清毒汤中、低剂量组和乳果糖组 ET、TNF- α 以及 NF- κ B 蛋白含量水平显著降低($P < 0.01$), 清毒汤高剂量组除 ET 外各指标均明显改善($P < 0.05$); 与乳果糖组比较, 清毒汤中剂量组 ET 及 TNF- α 水平显著降低($P < 0.01$), 低剂量组 ET 及 TNF- α 水平无明显差异($P > 0.05$), 高剂量组 ET 及 TNF- α 水平明显高于乳果糖组($P < 0.05$)。**结论** 清毒汤对实验性肝损伤大鼠模型具有降低 ET、TNF- α 以及 NF- κ B 蛋白水平的作用, 尤其其中剂量组效果最为明显, 推测其分子机制可能为通过抑制 NF- κ B 因子的表达从而达到保肝目的。

基金项目: 北京市自然科学基金(7142023); 北京市教委课题(KM2011100025206)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学中医药学院[曹吴冰(硕士研究生)、高连印、车念聪、张秋云、杜宇琼、罗佳佳(硕士研究生)]; 首都医科大学校医院内科(付修文); 首都医科大学附属北京地坛医院中西医结合科(王融冰)

作者简介: 曹吴冰(1990-), 女, 2013 级在读硕士研究生。研究方向: 中医药防治慢性肝病内毒素血症机制研究。E-mail: xk.bangbang@163.com

通讯作者: 高连印(1966-), 博士, 副教授, 硕士生导师。研究方向: 中医药防治慢性肝病机制研究。E-mail: gly066@sina.com

【关键词】 肝损伤; 内毒素; 硫代乙酰胺; 肿瘤坏死因子 α ; 核转录因子 κ B
 【中图分类号】 R285.5 【文献标识码】 A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.10.009

Effects of Qingdu decoction on TNF- α and NF- κ B expressions in the rats with experimental severe liver injury CAO Wu-bing, GAO Lian-yin, CHE Nian-cong, et al. Capital Medical University School of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100069, China

Corresponding author: GAO Lian-yin, E-mail: gly066@sina.com

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of Qingdu decoction on the expressions of endotoxin (ET), Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and Nuclear factor kappa B (NF- κ B) in rats with severe liver injury and explore the mechanism of Qingdu decoction on treating Chronic severe hepatitis complicated with endotoxemia. **Methods** The severe liver injury rat model was induced by Thioacetamide (TAA), and treated with Qingdu decoction. And then the blood level of ET, TNF- α and NF- κ B were measured.

Results The expression levels of ET, TNF- α and NF- κ B in model group were significantly increased when compared to that of in normal group ($P < 0.01$). Compared to the model group, the expression levels of ET, TNF- α and NF- κ B were decreased significantly in the middle and low dose Qingdu decoction groups and Lactulose group ($P < 0.01$). All indexes except ET in the high dose Qingdu decoction group were decreased significantly ($P < 0.05$). Compared to lactulose group, the expressions of ET and TNF- α in the middle dose Qingdu decoction group were decreased significantly ($P < 0.01$), while the expressions of ET and TNF- α in the low dose group showed no significantly difference ($P > 0.05$). The expressions of ET and TNF- α in the high dose group were significantly higher than the Lactulose group ($P < 0.05$).

Conclusions Qingdu decoction can improve liver injury and decrease ET, TNF- α and NF- κ B expression levels in rats with hepatic injury complicated with endotoxemia, especially in the middle dose group. The mechanism could be related to the inhibition of NF- κ B activity.

【Key words】 Liver injury; Endotoxin; Thioacetamide; Tumor necrosis factor alpha; Nuclear factor kappa B

内毒素系由肠道革兰阴性菌死亡而产生的,由门静脉入肝,大量的内毒素入肝可引起已损伤的肝细胞过度炎性反应,加重肝细胞损伤。临床发现,慢性重型肝炎合并肠源性内毒素血症的病死率约为 50 ~ 90%^[1]。本研究拟建立硫代乙酰胺(Thioacetamide, TAA)致实验性大鼠重症肝损伤模型,予王融冰教授经验方清毒汤进行干预,通过观察清毒汤对模型大鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α) 以及核转录因子 κ B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) 表达的影响,进一步研究清毒汤通过抑制 NF- κ B 及 TNF- α 活性以保护肝脏的机制。

1 材料与方

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 48 只,雌雄各半,体质量为 180 ~ 200 g, 动物许可证号: SCXK (京) 2012-0001, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,饲养于首都医科大学动物实验科学部 SPF 级动物室,实验期间,各组大鼠均自由摄食、饮水,喂普通饲料。

1.2 药物

清毒汤药物组成: 大黄 10 g、枳实 10 g、厚朴

10 g、生地黄 12 g、茜草 9 g, 上述药物均购自北京同仁堂,由首都医科大学动物室煎制,制备成生药含量 1.5 g/mL 的水煎剂, 4℃ 冰箱保存备用。乳果糖购自北京科奥科技有限公司,批号: ka0009454; TAA 购自北京科奥科技有限公司,批号: S0646。

1.3 主要试剂和仪器

内毒素试剂盒(南京建成生物工程研究所), TNF- α (eBioscience, CA, USA), NF- κ B p65 抗体 (ab131485, abcam)。包埋机 (Leica EG1160, 德国), 切片机 (H93/RM2126, 德国), OLYMPUS BX-41 荧光显微镜 (日本), NIKON DIGITAL SIGHT 彩色 CCD (日本), Image Pro Plus 6.0 Media Cybernetics 公司, Multiskan MK3 酶标仪 (Thermo Fisher Scientific 公司), 高速冷冻离心机 (XIANGYI)。

1.4 造模分组及给药

48 只大鼠适应性喂养 1 周后, 随机选取 8 只作为正常组, 给予生理盐水灌服; 其余 40 只为造模组, 前 8 周给予 12 mg/kg 的 TAA 灌胃, 第 9 ~ 12 周给予 36 mg/kg 的 TAA 灌胃。在第 9 周开始, 将造模组随机分为模型组、乳果糖组、清毒汤 (高、中、低剂量) 组, 均为 10 只。清毒汤 (高、中、低剂

量)组每天 1 次灌服清毒汤浓缩液,剂量分别为 11.9 g/kg、5.95 g/kg、2.98 g/kg,乳果糖组每天 1 次灌服 3.5 mL/kg 乳果糖,模型组给以同等容积的生理盐水灌服作为对照。所有组连续给药至第 12 周。

1.5 标本制备

第 12 周末,大鼠禁食 12~14 小时后,用 10% 水合氯醛按 3.5 mL/100 g 体质量腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,注射于无菌真空采血管,离心后取上清分装,置于 -80℃ 冰箱保存备用。将部分新鲜肝组织置入 4% 多聚甲醛中,置 -4℃ 冰箱保存,其余肝组织置入冻存管, -80℃ 冰箱保存。

1.6 指标检测

将新鲜肝组织石蜡包埋、切片、HE 染色,用显微镜镜检,图像采集分析。ET、TNF- α 采用酶联免疫吸附法检测严格按照试剂盒说明执行。取肝组织裂解后的上清液抽提蛋白,经封闭、一抗孵育、二抗孵育后,胶片定影,用图像分析软件分析,目的蛋白表达量以目的蛋白/ β -actin 的灰度比值表示。

1.7 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,均采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据处理。各指标经正态检验后,均符合正态分布,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA);ET、TNF- α 组间方差不齐,采用 Tamhane's T2 检验;NF- κ B 蛋白表达量组间方差齐,采用 LSD 检验。各种检验的显著性水平均设定为 $P<0.05$ 。

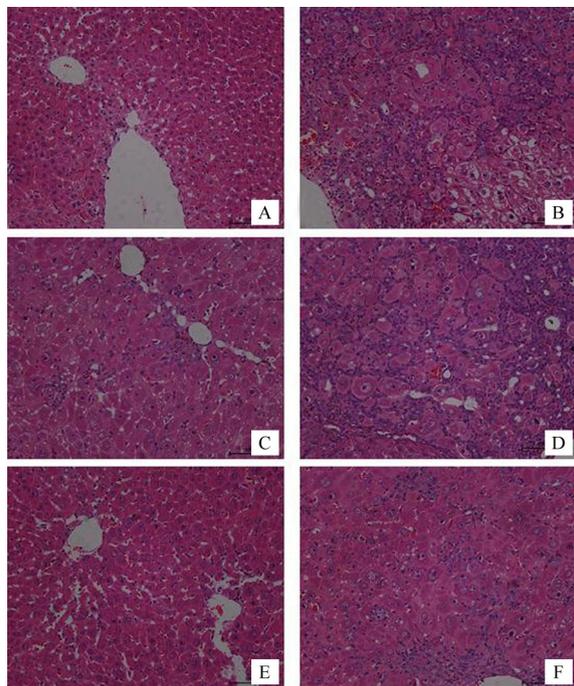
2 结果

2.1 大鼠肝脏组织病理形态学变化

大鼠肝组织 HE 染色结果显示:正常大鼠肝组织切片未见明显异常,肝细胞排列呈条索状,无细胞变性、坏死以及炎性细胞浸润;模型组大鼠肝组织见肝细胞结构紊乱,细胞变性、坏死及炎性浸润显著;各治疗组肝组织损伤较模型组均有不同程度的改善,尤其清毒汤中剂量组肝细胞排列没有明显破坏,较模型组显著改善。结果见图 1。

2.2 各组大鼠血清 ET 和 TNF- α 含量结果

与正常组比较,模型组血清 ET 和 TNF- α 含量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,乳果糖组和清毒汤中、低剂量组 ET 和 TNF- α 含量显著降低($P<0.01$),而清毒汤高剂量组 TNF- α 含量明显降低($P<0.05$),而 ET 含量差异无统计学意义($P>0.05$);与乳果糖



A: 正常组; B: 模型组; C: 乳果糖组; D: 清毒汤低剂量组; E: 清毒汤中剂量组; F: 清毒汤高剂量组

图 1 各组大鼠肝组织病理形态的变化(HE 染色 $\times 200$)

组比较,清毒汤中剂量组 ET、TNF- α 含量和高剂量组血清 TNF- α 含量显著降低($P<0.01$),清毒汤低剂量组差异无统计学意义($P>0.05$),高剂量组 ET 及 TNF- α 水平明显高于乳果糖组($P<0.05$)。由此提示大鼠实验性肝损伤内毒素血症模型造模成功,清毒汤具有降低实验性肝损伤大鼠血清内毒素 ET 和 TNF- α 含量的作用,其中剂量组效果最明显,低剂量组效果与乳果糖组相当。结果见表 1。

2.3 Western Blot 检测肝组织中 NF- κ B 蛋白表达量

各组任取 6 只大鼠检测肝组织 NF- κ B 蛋白表达量。与正常组比较,模型组大鼠肝组织的 NF- κ B 蛋白表达量显著升高($P<0.01$);与模型组比较,各治疗组 NF- κ B 蛋白表达量显著降低($P<0.01$)。提示清毒汤可以抑制实验性肝损伤大鼠肝组织 NF- κ B 的过度表达。见表 2、图 2。

3 讨论

中医学中并没有内毒素一词,但内毒素是中医热毒之邪重要的物质基础之一^[2]。有学者认为,中医“毒邪”与现代医学“内毒素”之间存在着密切相关性^[3],故大多学者从“毒邪”论治内毒素血症。刘铁军等^[4]认为采用“下法”能通腑实、祛毒邪、使毒性物质从肠道排出,从而切断肠肝循环,减轻或延缓肝性脑病的发展。本课题组采用国家级名老中

表 1 各组大鼠血清中 ET 和 TNF-α 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

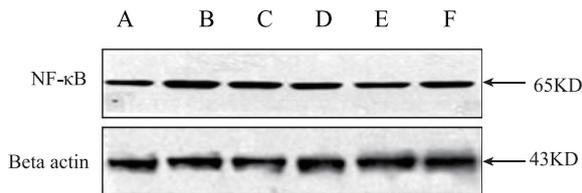
组别	n	ET (EU/L)	TNF-α (ng/mL)
正常组	8	70.01±13.41	55.86±13.97
模型组	8	109.33±12.44 ^a	240.84±37.86 ^a
乳果糖组	8	92.33±4.56 ^c	120.14±14.67 ^c
清毒汤低剂量组	8	92.87±4.63 ^c	126.87±11.51 ^c
清毒汤中剂量组	8	76.93±7.58 ^{ce}	79.22±5.65 ^{ce}
清毒汤高剂量组	8	101.87±1.69 ^d	169.07±6.92 ^{be}

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$;与模型组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$;与乳果糖组比较,^d $P < 0.05$,^e $P < 0.01$

表 2 各组大鼠肝组织中 NF-κB 蛋白表达量比较

组别	n	NF-κB 蛋白表达量
正常组	6	0.154±0.041
模型组	6	0.475±0.077 ^a
乳果糖组	6	0.329±0.095 ^b
清毒汤低剂量组	6	0.348±0.072 ^b
清毒汤中剂量组	6	0.263±0.060 ^b
清毒汤高剂量组	6	0.355±0.068 ^b

注:与正常组比较:^a $P < 0.01$,与模型组比较,^b $P < 0.01$



A: 正常组; B: 模型组; C: 乳果糖组; D: 清毒汤低剂量组; E: 清毒汤中剂量组; F: 清毒汤高剂量组

图 2 各组大鼠肝组织中 NF-κB 蛋白表达

医王融冰教授的经验方——清毒汤进行动物试验研究,清毒汤由小承气汤(出自《伤寒论》)加减化裁而来,具有清热解毒、通腑攻下、滋阴凉血的功效,可以有效地减少血中内毒素,阻断内毒素对肝脏的继发性损伤。

近年来研究证实,内毒素既可以直接损伤肝细胞,诱导肝细胞凋亡,也可以通过激活枯否细胞(kupffer cell, KC),诱导 NF-κB 活化发生级联反应,从而释放多种细胞因子 TNF-α、白细胞介素-1(interleukin 1, IL-1)、IL-6 等,对肝脏进行“第二次打击”,促进肝病的重症化与慢性化^[5],最终导致肝功能衰竭。其中 NF-κB 在调控促炎基因的合成和释放中起决定性作用^[6],NF-κB 被激活后,从细胞质转入细胞核,与 DNA 分子特定基因结合,从而启动多种炎性细胞因子(如 TNF-α、IL-1 等)基因的转

录^[7]。TNF-α 被认为是内毒素发挥毒性效应最重要的介质,不仅可以直接作用于肝细胞引起细胞的凋亡和坏死,还可以诱导其他炎性因子如 IL-1, IL-6 等产生,从而参与炎症反应^[8]。临床研究发现, TNF-α、NF-κB 可作为判断肝内炎症变化的有效指标^[9]。

本实验结果显示,模型组大鼠血清 ET 及 TNF-α 水平、肝组织 NF-κB 蛋白表达量较正常组显著升高,而治疗组 ET、TNF-α 及 NF-κB 水平较模型组有不同程度改善,尤其是清毒汤中剂量组效果最佳。同时,各组大鼠肝组织的病理变化提示清毒汤中剂量组较模型组肝损伤显著减轻。故推测清毒汤方通过抑制 NF-κB 表达,减少 TNF-α 入血,改善肝脏病理结构,以清除内毒素,达到保护肝脏的作用。但是,鉴于中药复方合剂的多重作用,清毒汤治疗肝病的机制有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 张文思,陈晓蓉. 中药灌肠治疗重型肝炎的临床研究现状[J]. 西部中医药, 2015, 28(1): 134-137.
- [2] 高连印,车念聪,张秋云,等. 清毒汤对硫代乙酰胺致肝损伤内毒素血症模型大鼠血清内毒素及 IL-6 水平的影响[J]. 中医学报, 2013, 28(8): 1165-1167.
- [3] 龙富立,毛德文,王秀峰,等. 中医药治疗肝病内毒素血症的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(5): 1028-1030.
- [4] 刘铁军,王立颖,李敏,等. 下法与肠肝循环的关系及在肝性脑病中的应用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2002, 12(3): 186-187.
- [5] Yang J M, Han D W, Xie C M, et al. Endotoxins enhance hepatocarcinogenesis induced by oral intake of thioacetamide in rats[J]. World J Gastroenterol, 1998, 4(2): 128-132.
- [6] Demirbilek S, Akin M, Gurunluoglu K, et al. The NF-kappaB inhibitors attenuate hepatic injury in bile duct ligated rats[J]. Pediatr Surg Int, 2006, 22(8): 655-663.
- [7] Wang T, Zhang X, Li J J. The role of NF-kappaB in the regulation of cell stress responses[J]. Int Immunopharmacol, 2002, 2(11): 1509-1520.
- [8] Billiar T R, Curran R D, Harbrecht B G, et al. Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo: NG-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrate/nitrite biosynthesis while promoting hepatic damage[J]. J Leukoc Biol, 1990, 48(6): 565-569.
- [9] 袁淑芳,张丽娟,郑嵘,等. NF-κB、TNF-α 与乙型肝炎患者肝细胞损伤和肝纤维化的关系[C]//第三届全国病毒性肝炎慢性化重症化基础与临床研究进展学术会议论文集, 重庆, 2013: 173-179.

(收稿日期: 2015-05-20)

(本文编辑: 董历华)