

· 综述 ·

中医药防治肝脏疾病的分子机制研究

聂 广

自从分子生物技术开展以来,中医药治疗各种肝脏疾病的机理研究已经取得了不少进展,现综述如下。

中医药防治肝癌的分子生物学基础

1 抑制肿瘤细胞 DNA 合成 吴万垠等⁽¹⁾用莪术油进行小鼠肝癌 HepA 抑制实验,以病理细胞图像分析仪分析莪术油对小鼠细胞 DNA 含量的影响,结果其抑瘤率明显高于对照组($P < 0.01$),能显著降低小鼠肝癌细胞的 DNA 光密度值、核面积及 DNA 指数,同时能提高肝癌细胞中二倍体细胞的比例,降低超五倍体细胞比例,提示其抗癌活性与抑制肿瘤细胞 DNA 合成有关。

2 对癌基因和抑癌基因表达的影响 周振华等⁽²⁾研究了健脾益气方对小鼠 HAC 肝癌细胞凋亡和 bax 基因表达的影响,结果实验组凋亡指数较对照组明显升高($P < 0.01$),电镜证实凋亡细胞发生特征性形态学改变,其 bax 基因蛋白呈强阳性表达,而对照组无阳性表达。周建峰等⁽³⁾研究了不同扶正药物血清对 SMMC-7721 人肝癌细胞 p53、N-ras 基因的调控作用,结果发现,养阴、益气养阴、温阳养阴及补肾养阴组细胞 p53 蛋白表达增强,N-ras 蛋白表达降低,其中又以益气养阴组的作用最为明显;益气养阴组 p53 转录增强,N-ras 转录减弱。刘琳等⁽⁴⁾进行了三氧化二砷(As_2O_3)选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究,发现 As_2O_3 能显著地抑制人肝癌细胞 QGY-7701 和 QGY-7703 的生长,用药后诱导其出现了典型的细胞凋亡形态学改变,并使细胞周期阻滞于 S 期,且 bcl-2 基因表达明显下降,bax 和 Fas 基因表达显著增强。

3 降低 HBV 转基因小鼠 AFB₁-DNA 加成物水平 吴万垠等⁽⁵⁾采用 HBV 转基因小鼠暴露于 AFB₁ 中,以观察中药对其 AFB₁-DNA 加成物的含量,以及 AFB₁ 代谢有关的两种酶的活性的影响,结果健脾益气合剂能使小鼠暴露 AFB₁ 后 1h 及 24h 时升高的肝脏 AFB₁-DNA 加成物水平降至近正常水平,并能提高小鼠肝脏 P450、谷胱甘肽含量及激活 GST 活性。

4 抗基因突变作用 陈永培等⁽⁶⁾用鼠伤寒沙门氏回复突变(Ames)实验平板掺入法对临床常用的 75 种抗肿瘤中草药进行抗突变研究,结果:椿根皮、石菖蒲、大黄、甘草、虫、王不留行、草河车、艾叶、半夏、蜈蚣、虎杖和苦参等 12 种有相当的抗突变作用;冬虫夏草等 7 种中药有一定抗突变作用。甘草有抗移码型和抗置换型基因突变作用,大黄、椿根皮、虫、王不留行、草河车和蜈蚣等有抗移码型基因突变作用,石菖蒲、艾叶、半夏和虎杖有抗置换型基因突变作用。Wong BYY 等⁽⁷⁾以 TA100(碱基置换型突变株)为试验菌株,小鼠肝脏 S₉ 上清液为代谢激活系统,研究了 4 种中药对苯并芘(BaP)诱变及 [³H]BaP 与小牛胸腺 DNA 结合形成 BaP-DNA 复合体的抑制作用,经检测,4 种中药的水提取物均有明显的浓度依赖性抑制作用,趋势为半枝莲 > 女贞子 > 白花蛇舌草 > 膜荚黄芪。

5 抑制肝癌细胞的侵袭粘附能力 孙婧憬等⁽⁸⁾观察了丹参对 SMMC-7721 肝癌细胞株侵袭粘附能力和对裸鼠人肝癌切除术后转移复发的影响,结果表明,丹参处理的 SMMC-7721 细胞粘附分子-1 表达明显低于对照组,丹参可抑制 SMMC-7721 细胞的侵袭能力,促进已粘附细胞的脱落,并对早期和晚期裸鼠人肝癌切除术后的肝内和远处转移、复发有防治作用。

中医药抗肝纤维化的分子药理学依据

1 抑制 I、Ⅲ、Ⅳ型前胶原 mRNA 表达和转录 王吉耀等⁽⁹⁾采用不同剂量的甘草酸作用于 NIH₃T₃ 细胞株,分离细胞总 RNA,作质粒扩增和斑点杂交,发现不同剂量的甘草酸对 NIH₃T₃ 细胞株 I、Ⅲ型前胶原 mRNA 表达有直接抑制作用,可使 I、Ⅲ型胶原明显减少。张斌等⁽¹⁰⁾以二甲基亚硝胺复制大鼠肝纤维化模型,采用胶原酶消化法分离造模大鼠和正常大鼠肝星状细胞和肝细胞,以 Northern 印迹杂交检测大鼠肝组织中 $\alpha_1(I)$ 、 $\alpha_1(III)$ 和 $\alpha_1(IV)$ 前胶原 mRNA 的表达特征,结果造模组大鼠肝脏前胶原 mRNA 表达量明显增加,肝星状细胞 3 种前胶原 mRNA 表达亦增加,其中尤以 I 型前胶原 mRNA 表达明显增加,正常组大鼠肝细胞未见 I、Ⅲ、Ⅳ型前胶原阳性杂交信号。抗纤复

方对肝星状细胞、肝细胞和肝脏组织 $\alpha_1(\text{I})$ 、 $\alpha_1(\text{III})$ 和 $\alpha_1(\text{IV})$ 前胶原 mRNA 表达均有抑制。

2 增加肝组织胶原酶 mRNA 表达 邱德凯等⁽¹¹⁾采用不同剂量虫草多糖脂质体治疗肝纤维化大鼠 10 周,运用印迹杂交检测大鼠肝组织中的胶原酶 mRNA 含量,结果小剂量虫草多糖脂质体可明显增加肝组织胶原酶 mRNA 的表达,提示其抗肝纤维化作用可能与促进 I、III 型胶原降解有关。

3 抑制转化生长因子(TGF β_1)等的表达 朱清静等⁽¹²⁾采用不同剂量别毒护肝方药物血清作用于大鼠传代肝星状细胞,观察其对产生 I 型胶原及 TGF β_1 的影响,结果小剂量和中剂量药物血清组 TGF β_1 分泌量明显降低,提示别毒护肝方可影响 TGF β_1 细胞内信号传导,从而下调肝星状细胞 I 型前胶原的基因转录。王宝恩等⁽¹³⁾发现,中药复方 861 治疗大鼠肝纤维化后,分子杂交显示肝组织中 I、III、IV 型胶原 mRNA 含量明显减少,同时可见 TGF β_1 mRNA 量也同步受抑,推测其可能是胶原基因转录活性降低的原因。姜春萌等⁽¹⁴⁾观察了扶正化瘀方对大鼠 CCl₄ 损伤肝 Kupffer 细胞功能的影响,结果药物血清组血小板衍生生长因子(PDGF)和 TGF β_1 活性均显著降低,说明扶正化瘀方可能对 CCl₄ 损伤大鼠肝星状细胞旁分泌激活有抑制作用。

中医药防治肝损害作用的分子机制

1 对肝细胞 Fas、FasL 表达的影响 向晓星等^(15,16)研究了氧化苦参碱及甘草甜素对脂多糖诱发的暴发型肝衰竭小鼠肝细胞凋亡的影响,发现治疗组小鼠血清 ALT 及 TNF- α 水平明显低于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$),其肝损害程度及 Fas、FasL 表达均较模型组为轻($P < 0.01$),提示氧化苦参碱及甘草甜素可能通过抑制 TNF- α 活性及 Fas、FasL 表达而阻断脂多糖所致的肝细胞凋亡及坏死。杨大国等⁽¹⁷⁾研究了通里攻下法对急性肝衰竭大鼠肝细胞凋亡的影响,结果表明,内毒素脂多糖加 D-氨基半乳糖可引起严重的急性肝坏死并有广泛的肝细胞凋亡,中药组有明显改善作用。

2 对肝脏增殖有关基因表达的影响 姚明忠等⁽¹⁸⁾研究了固真方对老年大鼠肝脏增殖有关基因表达的影响,结果老年对照组 c-fos、c-jun 和 β -微管蛋白基因表达较青年对照组分别降低 14.5%、85.0% 和 90.8%,老年用药组则分别增高了 0.32 倍、5.56 倍和 6.09 倍,表明固真方可以通过增强 c-fos、c-jun 和 β -微管蛋白基因表达而促进老年大鼠肝细胞的增殖。张克纯等⁽¹⁹⁾研究了补肾延年丹对老年大鼠肝染色质基因

活性的影响,发现中剂量组老年大鼠肝染色质 D Nase I 消化百分率显著高于对照组,接近于 5 月龄青年大鼠,提示补肾延年丹使老年大鼠肝染色质基因活性得到一定恢复。

3 提高大鼠肝细胞 DNA 的甲基化水平 吴志奎等⁽²⁰⁾用 HPLC 法分析了老年大鼠肝细胞 DNA 的甲基化水平,发现补肾生血药可明显增高老年大鼠的 DNA 甲基化水平,从而提高基因稳定性。

4 对脂肪代谢基因表达的影响 戴宁等⁽²¹⁾采用高脂饲料诱导大鼠脂肪肝模型,复方中药能抑制非酒精性肝细胞色素 P450 II E₁ 的表达,同时肝脏组织病理得改善,各项指标得到恢复。姜传仓等^(22,23)利用 Northern 印迹杂交法研究丹参、大黄对实验性高脂血症大鼠肝细胞肝低密度脂蛋白(LDL)受体 mRNA 水平的影响,发现两种药物均能升高大鼠 LDL 受体 mRNA 水平,且有量效依赖关系。体内外实验表明,丹参能升高大鼠肝及培养的人成纤维细胞 LDL 受体 apoA-I mRNA 水平,而丹参素的作用较丹参注射液明显(有量效依赖关系),但降血清总胆固醇(TC)及 LDL-胆固醇(LDL-C)作用不明显,一旦停止高脂喂养,则引起 TC 及 LDL-C 水平降低。

中医药对病毒基因及其表达的影响

1 体外抗乙型肝炎病毒作用 温志坚等⁽²⁴⁾采用 2.2.15 细胞株,研究了小柴胡汤提取物(大孔树脂提取工艺制备)的体外抗 HBV 作用,结果在无细胞毒浓度作用 14 天时,对 2.2.15 细胞分泌 HBsAg、HBeAg 的抑制率分别为 60.89% ~ 75.09% 和 51.62% ~ 68.59%,且可使培养上清液中 HBV DNA 含量减少。连粤湘等⁽²⁵⁾采用复方双草退黄冲剂进行体外抗乙型肝炎病毒实验,当药物浓度在 20mg/ml、10mg/ml、5mg/ml 和 2.5mg/ml 时,对 2.2.15 细胞分泌 HBsAg 的抑制率分别为 62.43%、53.26%、51.85% 和 36.82%,IC₅₀为 4.63mg/ml。

2 体内抗鸭乙型肝炎病毒作用 陈压西等⁽²⁶⁾采用小柴胡汤胶囊进行抗鸭乙型肝炎病毒的体内实验,其大剂量组用药 2 周、1 个月及中、小剂量组用药 1 个月,可使血清中 DHBV DNA 滴度显著降低($P < 0.01$ 和 0.05),但停药 1 周后,有 DNA 滴度回升现象。

3 体外抗丙型肝炎病毒作用 李建蓉等⁽²⁷⁾采用 RT-PCR 半定量法检测重组体 PBK-HCV mRNA 的表达量,进行了复方黄芪汤和小柴胡汤抗 HCV 的体外实验,结果复方黄芪汤对 SMMC-7721 细胞半数抑制量为 55mg/ml,小柴胡汤为 75mg/ml,提示两方的抗 HCV 作用不是抑制 mRNA 的转录,而可能是通过调

节机体免疫功能发挥作用。

展 望

笔者在最近出版的《医学分子生物学原理和方法》的绪论中,总结了当代分子生物学发展的 4 个特征:

(1)从基因重组、聚合酶链反应到生物芯片的技术化特征(2)从基因工程、蛋白质工程到各种生物技术开发应用的产业化特征(3)从方法渗透到知识爆炸,学科分化的科学化特征(4)以人类基因组计划为先导带动生物学、信息学及其相关科学更新的革命化特征⁽²⁸⁾。

当前,随着分子生物学理论和技术应用的日益扩大,中医药治疗肝脏疾病的分子机制将会逐步得到揭示。然而值得指出的是,目前的研究水平普遍较低,还有很多具体的工作要做,我们相信在新的世纪,中西医结合肝病领域一定会从宏观到微观,从基础到临床,取得更加辉煌的成就,中西医结合医学也一定会得到更加广泛的传播。

参 考 文 献

1. 吴万垠,罗云坚,程剑华,等. 莪术油对小鼠细胞 DNA 作用的图像分析. 中西医结合肝病杂志 1999 ;5(1):18—20.
2. 周振华,宋明志,于尔辛,等. 健脾益气方对小鼠 HAC 肝癌细胞凋亡和 bax 基因表达影响的实验研究. 中国中西医结合脾胃杂志 2000 ;2(2):78—80.
3. 周建锋,王怡兵,刘平,等. 不同扶正药物对 SMMC-7721 人肝癌细胞 p53、N-ras 基因的调控作用. 中西医结合肝病杂志 2000 ;10(增):121—122.
4. 刘琳,秦叔逵,陈惠英,等. 三氧化二砷选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究. 中华肝脏病杂志 2000 ;8(6):367—368.
5. 吴万垠,钱耕荪,于尔辛. 健脾益气合剂抑制小鼠 HBV 协同 AFB₁ 致肝癌的机制. 华人消化杂志 1998 ;7(7):594—596.
6. 陈永培. 临床常用抗肿瘤中草药的抗突变初步研究. 中国中药杂志 1992 ;17(7):426—428.
7. Wong BYY. 中药对苯并芘诱变与 DNA 结合及代谢的调节. 国外医药植物药分册 1993 ;1(1):30—32.
8. 孙婧憬,周信达,刘银坤. 丹参对肝癌转移复发防治作用的研究. 中国中西医结合杂志 1999 ;19(5):292—293.
9. 王吉耀,刘维田,胡美玉,等. 甘草酸对成纤维细胞 I、III 型前胶原 mRNA 表达的抑制作用. 中华消化杂志 1997 ;17(1):60—61.
10. 张斌,赵钢,王灵台,等. 肝纤维化大鼠肝星状细胞和肝细胞胶原表达特征的实验研究. 中西医结合肝病杂志 2000 ;10(增):94—96.

11. 邱德凯,李海,曾民德. 虫草多糖脂质体对大鼠肝纤维化胶原酶 mRNA 变化的影响. 新消化病学杂志 1997 ;5(7):417—418.
12. 朱清静,邓欣,杨玲,等. 剔毒护肝方药物血清对大鼠肝星状细胞产生 I 型胶原及转化生长因子 β_1 的影响. 中西医结合肝病杂志 2000 ;10(6):25—28.
13. 王宝恩,赵洪涛,王泰玲,等. 复方 861 对肝炎肝纤维化疗效的病理组织学分析. 中华肝脏病杂志 1997 ;3(2):27—29.
14. 姜春萌,刘成,刘成海,等. 扶正化癥方对大鼠 CCl₄ 损伤肝 Kupffer 细胞功能的影响. 中西医结合肝病杂志 2000 ;10(5):26—28.
15. 向晓星,王国俊,蔡雄,等. 氧化苦参碱对小鼠暴发型肝衰竭的保护作用. 临床肝胆病杂志 2000 ;16(2):92—94.
16. 王俊学,王国俊,蔡雄,等. 氧化苦参碱及甘草甜素对小鼠肝细胞凋亡的影响. 第二军医大学学报 1999 ;20(4):222—224.
17. 杨大国,吴其凯,乐小华,等. 通里攻下法对急性肝衰竭大鼠肝细胞凋亡影响. 中西医结合肝病杂志 2000 ;10(增):72—74.
18. 姚明忠,顾文聪,丁卫. 固真方对老年大鼠肝脏增殖有关基因表达的影响. 中国中医药科技 1996 ;3(3):17—19.
19. 张克纯,徐桂香,郭悟彬. 补肾延年丹对老年大鼠肝染色质基因活性的影响. 中国老年学杂志 1997 ;17(5):301—303.
20. 吴志奎,危巍,何忠效. 肾髓理论分子基础的研究. 中医杂志 1996 ;37(2):109—111.
21. 戴宁,曾民德,李继强,等. 复方中药抑制非酒精性脂肪肝病肝细胞色素 P450 II E₁ 表达的实验研究. 中国中西医结合杂志 2000 ;20(6):453—455.
22. 姜传仓,蔡海江,范乐明. 中药丹参及大黄对实验性高血脂症大鼠 LDL 受体基因表达的影响. 中国病理生理学杂志 1993 ;9(1):108—110.
23. 姜传仓,蔡海江,范乐明. 丹参对 LDL 受体 apoA-I mRNA 水平的影响. 南京医科大学学报 1994 ;14(4):522—524.
24. 温志坚,曾毓,彭龙玲,等. 小柴胡汤提取物体外抗 HBV 活性研究. 中西医结合肝病杂志 2000 ;10(4):29—31.
25. 连粤湘,谭俊,邓子德,等. 复方双草退黄冲剂的体外抗乙型肝炎病毒作用. 中西医结合肝病杂志 2000 ;10(2):20—22.
26. 陈压西,郭树华,齐珍元,等. 小柴胡汤胶囊抗鸭乙型肝炎病毒的实验研究. 中西医结合肝病杂志 2000 ;10(2):17—19.
27. 李建容,刘克洲. 复方黄芩汤和小柴胡汤抗 HCV 的实验研究. 中西医结合肝病杂志 2000 ;10(5):18—20.
28. 伍欣星,聂广,胡继鹰主编. 医学分子生物学原理与方法. 北京:科学出版社,2000:1—8.

(收稿 2001—03—08 修回 2001—09—20)