

· 实验研究 ·

丹参改善小鼠慢性酒精性肝损伤机制的研究

熊宗斌 吴 萍 黄云峰 张 力 黄艳君 袁 萍 叶笃筠

摘要 目的 探讨丹参改善小鼠慢性酒精性肝损伤的机制。方法 建立小鼠慢性酒精性肝损伤模型,采用苏木素-伊红(Hematoxylin-eosin, HE)染色,观察丹参干预后肝组织形态学改变,逆转录多聚酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测肝组织 toll 样受体 4(toll like receptor 4, TLR4)mRNA 及血红素氧合酶-1(hemeoxygenase-1, HO-1)mRNA 的水平,以免疫组织化学方法检测 TLR4 蛋白表达水平。结果 丹参能减轻酒精所引起的肝细胞脂肪变性、坏死,下调 TLR4 mRNA 表达及 HO-1 mRNA 表达,并能使 TLR4 阳性细胞数明显减少。结论 丹参可通过对 TLR4 信号传导途径的影响来减少酒精所引起的肝损伤。

关键词 丹参注射液 酒精性肝损伤; toll 样受体 4 血红素氧合酶-1

Protective Mechanisms of Radix Salviae Miltiorrhizae against Chronic Alcoholic Liver Injury in Mice XIONG Zong-bin, WU Ping, HUANG Yun-feng, et al Department of Pathophysiology, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030)

Abstract Objective To investigate the protective mechanisms of Radix Salviae miltiorrhizae (RSM) on chronic alcoholic liver injury in mice. **Methods** The chronic alcoholic liver injury mouse model was established. The morphologic change of hepatic tissue was observed with hematoxylin-eosin (HE) staining; the levels of toll-like receptor-4 (TLR-4) mRNA in hepatic tissue and hemeoxygenase-1 (HO-1) mRNA were determined using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique; and the expression of TLR-4 protein was determined by immunohistochemistry method. **Results** RSM could alleviate the fatty degeneration and adiponecrosis of hepatic cells induced by alcohol, down-regulate the expressions of TLR-4 mRNA and HO-1 mRNA, and significantly decrease the number of TLR-4 positive cells. **Conclusion** RSM could prevent liver injury from alcohol by way of influencing TLR-4 signal transcription.

Key words Radix Salviae miltiorrhizae; alcoholic liver injury; toll-like receptor 4; hemeoxygenase-1

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)是一种常用中药,有活血化瘀、安神宁心、抗氧化等功效,其临床应用范围广泛^[1]。以往的研究业已证明,丹参可通过提高血中超氧化物歧化酶的活性,清除细胞内氧自由基,从而发挥抗炎及增强机体免疫作用^[1,2],对四氯化碳等造成的肝细胞损伤也有明显的保护作用^[3]。新近有学者研究发现丹参对酒精所致的肝损伤同样具有改善作用^[4],但其作用机制不甚明了。本研究对其改善作用的可能机制进行了初步探讨。

材料与方法

1 药品及试剂 丹参注射液:上海通用药业股份有限公司第三公司,批号 030976,每毫升相当于丹参 1.5g。RT-PCR 相关试剂:Trizol (Invitrogen 公司); M-MLV 逆转录酶、Oligo(dt)等(Promega 公司);Taq DNA Polymerase、Rnasin(华美生物工程公司);TLR4 引物(北京赛百盛基因技术有限公司);免疫组化相关试剂(北京中山生物技术有限公司);一抗(TLR4 羊抗鼠抗体, Santa Cruz 公司)。

2 动物分组及处理 昆明种小鼠,体重 17~21 g,雌雄兼用,6 周龄,由华中科技大学同济医学院动物实验中心提供。按文献^[5]方法,将 30 只小鼠随机分成 3 组,每组 10 只。酒精组:每天以 50% 酒精 20 ml/kg 灌胃 2 次,小鼠自由饮食;对照组:小鼠自由饮食及饮水;丹参治疗组:按酒精组灌胃,并同时按 5 ml/kg 腹

基金项目 国家自然科学基金资助课题(No. 30100226, 30200373)

作者单位 华中科技大学同济医学院病理生理教研室(武汉 430030)

通讯作者:吴 萍, Tel: 027-83657984, 027-62231750, E-mail:

yedy@mails.jhu.edu.cn

腔注射丹参注射液,小鼠自由饮食。8 周后处死所有小鼠,分别取各组动物肝脏用于检测。

3 形态学检查 取动物的肝右叶,置 10% 中性福尔马林固定液中过夜,石蜡包埋、切片。常规 HE 染色,常规脱蜡,HE 染色,脱水、透明,封片观察。

4 TLR4 mRNA 及 HO-1mRNA 的 RT-PCR 检测

4.1 引物序列^[6] 目的基因鼠 TLR4 上游引物 5'-AGT GGG TCA AGG AAC AGA AGC A-3',下游引物 5'-CTT TAC CAG CTC ATT TCT CAC C-3' 内参照 β -actin,上游引物 5'-TGG AAT CCT GTG GCA TCC ATG AAA C-3',下游引物 5'-TAA AAC GCA GCT CAG TAA CAG TCC G-3',扩增产物大小分别为 311 bp,349 bp,HO-1 上游引物^[7] 5'-CAC CAG CCA CAC AGC ACT AC-3',下游引物 5'-CAC CCA CCC CTC AAA AGA CA-3'。扩增产物大小为 1042 bp。

4.2 按试剂盒方法,取肝组织总 RNA 及逆转录合成 cDNA,PCR 扩增及电泳。PCR 扩增条件:目的基因 TLR4、HO-1 在 4℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 1 min,50℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,最后一次延伸 10 min;目的基因扩增 35 个循环,内参扩增 30 个循环。扩增产物用含 EB 的 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在紫外灯下观察照相。应用图像分析系统软件(ID 软件)处理电泳图谱,以 TLR4、HO-1 与内参 β -actin 的平均光密度比值进行半定量分析。

5 组织细胞 TLR4 蛋白的免疫组织化学检测 免疫组化染色(SP 法)参照北京中山生物技术有限公司试剂盒说明书方法。(1)切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育,阻断内源性过氧化物酶。(2)水洗,放入抗原修复液内微波修复。(3)5%~10% 正常山羊血清室温孵育 10 min。勿洗,加一抗工作液,4℃ 过夜。(4)PBS 冲洗 5 min,3 次。(5)滴加第 2 代生物素标记二抗工

作液,37℃,30 min。(6)PBS 冲洗,5 min 3 次。(7)滴加第 2 代辣根过氧化物酶标记链霉素卵白素工作液,室温 30 min。(8)PBS 冲洗,DAB 显色。(9)水洗。苏木素复染,脱水,透明,封固。

6 统计学方法 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 t 检验。

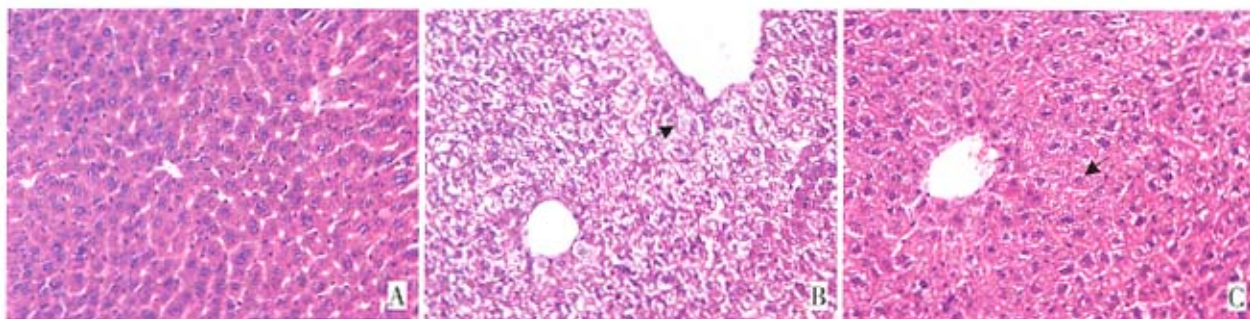
结 果

1 丹参注射液对肝组织病理变化的影响 见图 1。在普通光镜下,HE 染色检查,观察到对照组肝切片组织结构肝小叶清晰,肝索排列整齐,肝细胞具有正常的多边形的细胞形状和结构。胞浆丰富,细胞核结构清楚呈圆形。酒精组切片中肝细胞发生明显的肿胀,细胞内有大量的大小不一的脂肪滴,胞质疏松,肝小叶呈现如网状,有大量的气球样变,细胞核因挤压而偏向肝细胞边缘,肝小叶内有坏死区。丹参治疗组切片见肝细胞肿胀,并有脂肪滴,其程度比酒精组明显减轻,肝小叶内偶见有坏死发生。

2 丹参注射液对 TLR4 mRNA 表达的影响 对照组小鼠肝组织可见较低水平 TLR4 mRNA 的表达,酒精灌胃 8 周后 TLR4 mRNA 表达显著增加,在丹参治疗组中,可见 TLR4 mRNA 水平明显降低($P < 0.05$,见图 2a、b)。

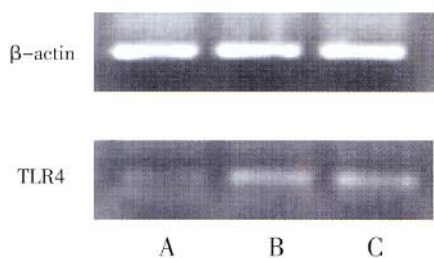
3 丹参注射液对 HO-1mRNA 表达的影响 对照组小鼠肝组织可以观察到 HO-1mRNA 有较弱表达,酒精组中 HO-1mRNA 表达明显增加($P < 0.01$),并且明显高于对照组和丹参治疗组(见图 3a、b)。

4 丹参注射液对肝组织 TLR4 蛋白表达的影响 光镜下,TLR4 蛋白免疫组化检查,对照组中偶见 TLR4 阳性细胞。酒精组肝组织切片中有明显枯否氏细胞的阳性表达,阳性细胞胞核多为不规则状,细胞着



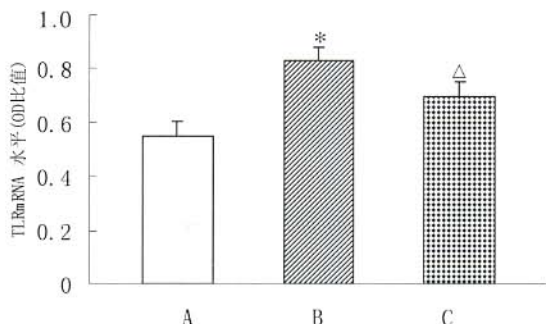
注:A:对照组,组织细胞形态正常;B:酒精组,组织细胞排列紊乱,肝细胞有大量气球样变;C:丹参治疗组,肝细胞发生肿胀、脂肪变性,程度较酒精组轻。

图 1 肝组织形态学观察结果($\times 400$)



注: A 为对照组; B 为酒精组; C 为丹参治疗组; (下图同)

图 2a 肝组织中 TLR4 mRNA 的 RT-PCR 检测结果



注: 与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

图 2b TLR4 mRNA 在肝组织中的表达

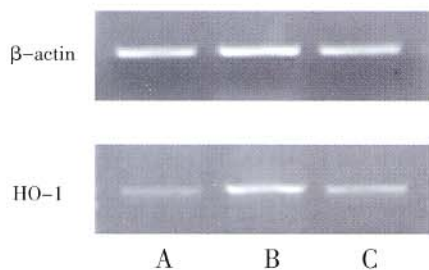
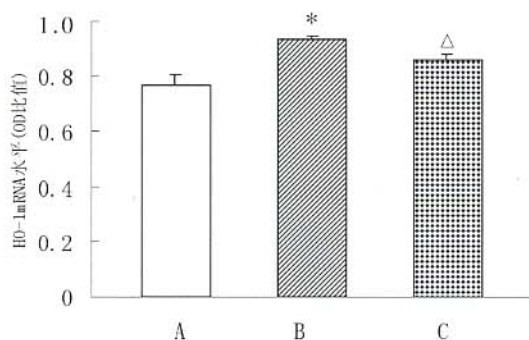
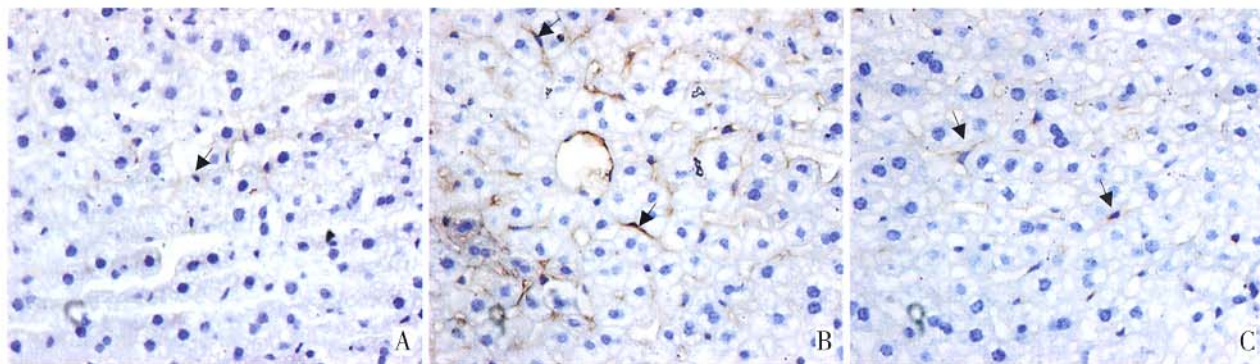


图 3a 肝组织中 HO-1 mRNA 的 RT-PCR 检测结果



注: 与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, $^{\Delta}P < 0.01$

图 3b HO-1 mRNA 在肝组织中的表达



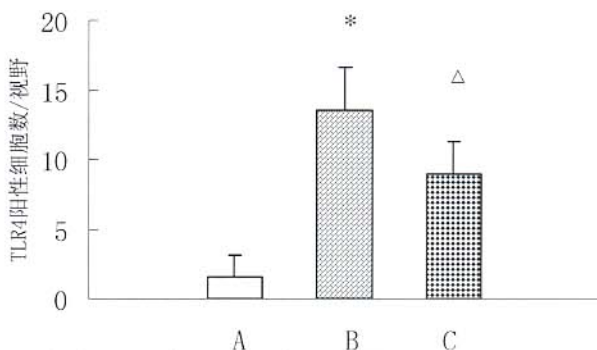
注: 箭头所指为 TLR4 阳性表达细胞

图 4a 肝组织 TLR4 蛋白的表达($\times 400$)

色呈棕褐色。丹参治疗组中, 阳性表达的枯否氏细胞较酒精组显著较少, 但比正常对照组多(图 4a、b)。

讨论

在日常生活中, 长期大量饮酒对人体的危害已经引起人们的重视。对酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)发病机制的研究表明细胞因子不仅参与了肝脏炎症的发生、肝细胞的坏死和凋亡, 以及肝组织的纤维化和肝硬变的发生, 且由激活的 Kupffer 细胞产生的 TNF- α 、IL-6 等的量与酒精性肝损伤及其损伤程度有着密切的关系^[8,9]。



注: 与 A 组比较, * $P < 0.01$; 与 B 组比较, $^{\Delta}P < 0.01$

图 4b 免疫组化 TLR4 阳性细胞数

TLR4 作为一类跨膜的受体,是炎症信号传导途径中的重要组成部分,它能识别细胞外源的微生物或内源性的配体,激活机体的单核巨噬细胞系统,启动天然免疫和炎症反应^[10]。对酒精肝的研究证实,内毒素低敏感性的 CH3/HeJ 自然突变不表达 TLR4 的小鼠在慢性乙醇暴露引起肝损伤中表现出较低程度的损伤^[11,12],进一步说明了 TLR4 及其信号传导途径在酒精性肝损伤过程中有着极其重要的地位。临床上,丹参的护肝作用已得到认同,丹参可通过抑制单核巨噬细胞 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 等细胞因子的产生,起到抗炎和增强机体免疫功能的作用^[2]。在本研究中,我们观察了丹参对酒精性肝损伤组织 TLR4 的影响,结果显示:丹参可显著降低酒精引起的肝组织 TLR4 mRNA 的高表达,免疫组化染色切片上也反应了 TLR4 阳性细胞经丹参治疗后比酒精组明显减少;同样在 HE 切片中,可观察到肝脏组织的损伤程度丹参治疗组比酒精组减轻。

由此我们认为,TLR4 减少与肝损伤程度减轻有明显的相关性,这可能与 TLR4 在信号传导途径中的门户作用有关,从而最终影响其他转录因子及炎症等相关因子的表达;另外,在本实验中,慢性酒精处理组 HO-1 mRNA 高表达,说明 HO-1 可能参与了肝损伤过程,丹参治疗组中,炎症等损伤程度减轻,HO-1 mRNA 的表达减少,从而起到增强抗炎的作用。总的来说,丹参可通过对巨噬细胞系统的信号传导通路及相关信号分子的影响来实现抗炎护肝的作用。

参 考 文 献

- 1 杨卫东,朱鸿良,赵保路,等. 丹参的氧自由基清除作用. 中国药理学通报 1990 36(2):118—120.
Yang WD, Zhu HL, Zhao BL, et al. The scavenging effect of salvia miltiorrhizae on oxygen free radicals. Chin Pharmacol Bull 1990 36(2):118—120.
- 2 Wang WJ, Wu XZ, Yao Z, et al. The influence of emodin and Danshensu on monocyte's secretion of inflammatory cytokines. Chin J Immunol 1995 11(6):370—372.
- 3 李 菁,李跃华,薛隆翠,等. 丹参素对实验性肝细胞损伤的

防护作用. 中西医结合肝病杂志 1996 36(3):29—30.

- Li J, Li YH, Xue LC, et al. Protective effect of danshensu on experimental liver injury. Chin J Integr Tradit West Med Liver Dis 1996 36(3):29—30.
- 4 陈小国,朱 晞,何加环,等. 丹参注射液对大鼠酒精性肝损伤组织学影响观察. 浙江中医杂志 2003 38(4):172—173.
Chen XN, Zhu X, He JG, et al. Observation on histological influence of Danshen injection to alcoholic liver injury of great gerbil. Zhejiang J Tradit Chin Med 2003 38(4):172—173.
- 5 杜施霖,迟宝荣. 酒精性肝损伤动物模型的研究. 白求恩医科大学学报 2001 27(6):682—685.
Du SL, Chi BR. Experimental models of alcohol-induced liver injury. J Norman Bethune Univ Med Sciences 2001 27(6):682—685.
- 6 Iwami K, Matsuguchi T, Masuda A, et al. Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. J Immunol 2000 165(12):6682—6686.
- 7 Hill-Kapturczak N, Thamilselvan V, Liu F, et al. Mechanism of heme oxygenase-1 gene induction by curcumin in human renal proximal tubule cells. Am J Physiol Renal Physiol 2001 281(5):F851—859.
- 8 Kamimura S, Tsukamoto H. Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. Hepatology 1995 22(4 pt 1):1304—1309.
- 9 Hanck C, Glatzel M, Singer MV, et al. Gene expression of TNF-receptors in peripheral blood mononuclear cells of patients with alcoholic cirrhosis. J Hepatol 2000 32(1):51—57.
- 10 Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. Nat Immunol 2001 2(8):675—680.
- 11 Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10Sc Cr mice: mutations in TLR4 gene. Science 1998 282(5396):2085—2088.
- 12 Uesugi T, Froh M, Arteel GE, et al. Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice. Hepatology 2001 34(1):101—108.

(收稿 2004-10-08 修回 2005-01-27)