

· 基础研究 ·

荣肝合剂对 ConA 诱导急性免疫性肝损伤小鼠
免疫调节及肝细胞凋亡相关因子的影响张引强¹ 唐旭东² 王凤云³ 杨斌⁴ 刘燕玲¹ 郭朋¹ 王萍² 卞立群² 赵迎盼⁵

摘要 目的 探讨荣肝合剂对刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 介导的急性免疫性肝损伤小鼠免疫调节因子及细胞凋亡相关基因的影响。方法 乙肝病毒 (hepatitis B virus, HBV) 转基因小鼠 60 只, 随机分为 6 组, 即空白组、模型组、荣肝合剂组、茵陈蒿汤组、茵陈组、联苯双酯组, 每组 10 只。采用 ConA 尾静脉注射制备急性免疫性肝损伤模型。造模前 14 天, 空白组、模型组给予生理盐水灌胃, 其余各组分别给予: 荣肝合剂、茵陈蒿汤、单味茵陈煎液、联苯双酯溶液, 每日灌胃给药干预。末次灌胃给药后 1 h, 空白组给予磷酸盐缓冲液 (PBS) 尾静脉注射, 其余各组按照 ConA 3 $\mu\text{g/g}$ 体重尾静脉注射造模。造模给药后 8 h 处死动物取血或组织标本检测丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TBil)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (INF- γ)、白介素 -4 (IL-4)、白介素 -10 (IL-10) 及凋亡相关基因 (Fas、FasL、Bax、bcl-2) 等指标。结果 模型组各指标与空白组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较, 荣肝合剂组、联苯双酯组小鼠 ALT、AST 及荣肝合剂组 TBil 水平显著降低 ($P < 0.01$); 荣肝合剂组小鼠肝组织 TNF- α 的水平降低 ($P < 0.05$), 荣肝合剂组、茵陈蒿汤组小鼠肝组织 INF- γ 的表达水平均降低 ($P < 0.05$), 各干预药组小鼠肝组织 IL-4 的表达提高 ($P < 0.05$), 荣肝合剂组小鼠肝组织 IL-10 的表达提高 ($P < 0.05$); 荣肝合剂组、茵陈蒿汤组小鼠肝组织 Fas 的表达下降 ($P < 0.05$), 荣肝合剂组小鼠肝组织 FasL 的表达下降 ($P < 0.05$), bcl-2 基因的表达升高 ($P < 0.05$), 荣肝合剂、茵陈组小鼠肝组织 Bax 基因的表达下调 ($P < 0.05$), 荣肝合剂组 bcl-2/Bax 比值上调。同时, 荣肝合剂组降低 ALT、AST 作用优于茵陈组 ($P < 0.05$); 荣肝合剂组降低 TNF- α 表达水平优于联苯双酯、茵陈组 ($P < 0.05$); 荣肝合剂组提高 IL-10 表达水平作用优于茵陈蒿汤组 ($P < 0.01$); 荣肝合剂组降低 Fas、FasL 表达作用优于茵陈蒿汤、茵陈组及联苯双酯组 ($P < 0.05$); 荣肝合剂组提高肝组织 bcl-2 基因的表达作用优于茵陈组 ($P < 0.05$)。结论 荣肝合剂对 ConA 所致转基因小鼠急性免疫性肝损伤具有保护作用, 其保护作用是通过改变 Th1/Th2 因子平衡 (降低 TNF- α 、INF- γ 的表达, 提高 IL-10、IL-4 表达) 和调控肝细胞凋亡相关因子 (下调 Fas、FasL、Bax 基因表达, 上调 bcl-2 基因表达, 上调 bcl-2/Bax 比值) 实现的。

关键词 荣肝合剂; 降酶; 刀豆蛋白 A; 免疫性肝损伤; 免疫调节; 细胞凋亡

Effect of Ronggan Mixture on Immunoregulation and Hepatocyte Apoptosis-related Factors in Concanavalin A Induced Acute Immunological Liver Injury Mice ZHANG Yin-qiang¹, TANG Xu-dong², WANG Feng-yun³, YANG Bin⁴, LIU Yan-ling¹, GUO Peng¹, WANG Ping², BIAN Li-qun², and ZHAO Ying-Pan³ 1 Department of Hepatic Diseases, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China; 2 Department of Gastroenterology, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China; 3 Experimental Center, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China; 4 Department of Pathology, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China; 5 Center for Clinical Pharmacology, China Academy of

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30672688, No. 30973735)

作者单位: 1. 中国中医科学院西苑医院肝病科 (北京 100091); 2. 中国中医科学院西苑医院脾胃病科 (北京 100091); 3. 中国中医科学院西苑医院实验中心 (北京 100091); 4. 中国中医科学院西苑医院病理科 (北京 100091); 5. 中国中医科学院西苑医院临床药理中心 (北京 100091)

通讯作者: 唐旭东, Tel: 010-62872389, E-mail: txldy@sina.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.11.1500

Chinese Medical Sciences, Beijing (100091), China

ABSTRACT **Objective** To explore the effect of Ronggan Mixture (RM) on immunoregulation and hepatocyte apoptosis-related factors in concanavalin A (Con A) induced acute immunological liver injury mice. **Methods** Totally 60 hepatitis B virus (HBV) transgenic mice were randomly divided into 6 groups, i.e., the blank control group, the model group, the RM group, the *Herba Artemisiae Scopariae* (HAS) group, the Yinchenhao Decoction (YD) group, and the Bifendate group, 10 mice in each group. The acute immunological liver injury model was established by tail vein injection of ConA. Fourteen days before modeling, normal saline was administered to mice in the blank control group and the model group. RM, YD, HAS decoction, and Bifendate solution was respectively given to mice in the RM group, the YD group, the HAS group, and the Bifendate group. The medication was performed once daily. One h after the last gastrogavage, phosphate buffer solution (PBS) was injected to mice in the blank control group from the tail vein. Modeling was conducted by injecting Con A at 3 $\mu\text{g/g}$ body weight from the tail vein. Mice were sacrificed 8 h after modeling. Blood or tissue samples were collected to detect lab indicators such as alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBil), tumor necrosis factor α (TNF- α), interferon γ (INF- γ), IL-4, IL-10, Fas, FasL, Bax, and bcl-2. **Results** There was significant difference in all lab indicators between the normal group and the blank control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, ALT and AST levels were significantly lower in the RM group and the Bifendate group ($P < 0.01$); TBil significantly decreased in the RM group ($P < 0.01$). The expression level of TNF- α decreased in the RM group ($P < 0.05$). The expression level of INF- γ decreased in the RM group and the YD group ($P < 0.05$). The expression level of IL-4 could be elevated in all medicated groups ($P < 0.05$). RM could elevate the expression level of IL-10 ($P < 0.05$). The expression level of Fas in the liver tissue decreased in the RM group and the YD group ($P < 0.05$). The expression level of FasL decreased and the expression of bcl-2 gene increased in the RM group (both $P < 0.05$). The expression level of Bax was down-regulated in the RM group and the YD group ($P < 0.05$). The ratio of bcl-2/Bax was up-regulated in the RM group ($P < 0.05$). Meanwhile, RM showed better effect in decreasing expressions of ALT and AST than HAS ($P < 0.05$). The effect of increasing IL-10 expression levels was better in the RM group than in the YD group ($P < 0.01$). The effect of decreasing expressions of Fas and FasL was better in the RM group than in the HAS group, the YD group, and the Bifendate group ($P < 0.05$). The effect of enhancing the expression of IL-10 in the liver tissue was better in the RM group than in the HAS group ($P < 0.05$). **Conclusion** RM had protective effect on Con A induced acute immunological liver injury mice, which might be achieved by changing the immunological balance of Th1/Th2 factors (decreasing expressions of TNF- α and INF- γ , elevating expressions of IL-10 and IL-4) and regulating hepatocyte apoptosis-related factors (down-regulating gene expressions of Fas, FasL, and Bax; up-regulating bcl-2 gene expression, and up-regulating the bcl-2/Bax ratio).

KEYWORDS Ronggan Mixture; decreasing enzyme; Concanavalin A; immunological liver injury; immunoregulation; apoptosis

对各种肝脏疾病发病机制的深入探讨与治疗药物的筛选,很大程度上依赖于与人类肝病病理机制相似的实验动物模型的建立与应用^[1,2]。刀豆蛋白 A (concanavalin A, ConA) 诱导的小鼠急性肝损伤模型被认为最适合研究人类病毒性肝炎、自身免疫性肝病等肝脏疾病的病理机制。荣肝合剂是唐旭东教授临床治疗慢性乙型肝炎疗效确切的经验方,具有清热利湿、活血健脾的功效,其降酶作用尤

为显著。中医药的降酶效应已为学界所认可,但其机制尚不明确。本实验以乙型肝炎转基因小鼠为实验对象,成功复制了 ConA 急性肝损伤动物模型,模拟乙型肝炎 (hepatitis B virus, HBV) 急性感染状态,观察小鼠血清酶学、细胞凋亡、肝组织细胞因子水平等指标的变化,与经方茵陈蒿汤、单味茵陈煎液、西药降酶药联苯双酯相比较,探讨中药复方荣肝合剂降酶的作用机理。

材料与方法

1 动物 HBV/ayw 亚型全基因组的转基因小鼠(鉴定后进一步杂交传代),为 C57BL/6 品系,经血清抗原 HBsAg 的 ELISA 检测均阳性,由北大医学部实验动物科学部 SPF 级动物实验室提供,许可证号:SCXK(京)2006-0008,血清学指标由该实验室检测,共 60 只,8 周龄,雄性 30 只,雌性 30 只,体重(21.05 ± 3.75)g,昼夜节律 12:12,即早 6:00 开灯,晚 6:00 熄灯。实验动物由中国中医科学院西苑医院实验动物中心饲养,SPF 级,22℃,55% 湿度。

2 药物 荣肝合剂(由鸡骨草、黄芪、白术、滑石、丹参等组成)浓缩液含生药 2 mg/mL,茵陈蒿汤(茵陈蒿 18 g 大黄 9 g 栀子 6 g,剂量参照《方剂学》^[3])浓缩液含生药 1 mg/mL,茵陈浓缩液含生药 1 mg/mL,均由中国中医科学院西苑医院制剂室提供。联苯双酯滴丸由北京协和药厂生产(生产批号: H11020980),每滴丸含联苯双酯 7.5 mg,以生理盐水溶解成 10 mg/mL 溶液。

3 试剂 ConA 规格为 100 mg/支,购自美国 Sigma 公司。丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBil)试剂盒购自北京中生北控生物科技股份有限公司(批号分别为 080521、080451、080381)。Fas、FasL、Bax、bcl-2 抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司,SP-9001 三步法试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。氯仿、异丙醇、无水乙醇均为分析纯,购自北京化学试剂公司;DEPC H₂O、Trizol 试剂,购自美国 Invitrogen 公司(批号:1382739);Fermentas K1622 RT 逆转录试剂盒购自美国 MBI 公司(批号:00044977);SYBR Green PCR Master Mix 试剂盒购自美国应用生物公司(批号:0805109)。

4 分组与给药 将 60 只动物随机分为空白组、模型组、荣肝合剂组、茵陈蒿汤组、茵陈组、联苯双酯组,每组 10 只。适应性饲养 3 天后分别给予药物干预:荣肝合剂组以 26.52 g/kg、茵陈组以 0.39 g/kg、茵陈蒿汤组以 7.02 g/kg、联苯双酯组以 150 mg/kg 剂量分别灌胃给药,空白组、模型组以蒸馏水 0.2 mL/10 g 灌胃,每天 1 次,共给药 14 天。

5 模型制备 造模方法参照文献[4]。末次灌胃给药后 1 h,空白组小鼠尾静脉注射磷酸盐缓冲液(PBS)0.3 mL,其余各组小鼠均一次性按 ConA 3 μg/g 体重尾静脉注射,ConA 以生理盐水稀释,浓度

为 1 mg/mL。

6 检测指标及方法

6.1 血清 ALT、AST、TBil 水平测定 造模给药后 8 h,处死小鼠,摘眼球取血。室温静置 30 min,3 000 r/min(离心半径 87 mm)离心 15 min 后,分离血清。按试剂盒说明测定血清 ALT、AST、TBil 水平。

6.2 RT-PCR 肝组织中肿瘤坏死因子 α(TNF-α)、干扰素 γ(INF-γ)、白介素-4(IL-4)、白介素-10(IL-10)表达水平检测 取小鼠相同部位肝组织,根据试剂盒说明书,采用 Trizol 提取肝组织总 RNA,测定紫外吸光度以检验纯度并计算 RNA 浓度,取 1 μg 总 RNA 合成 cDNA(进行)。引物序列设计分别为:TNF-α(323 bp),上游:5'-CCAACAAG-GAGGAGAAGT-3',下游:5'-GTATGAAT-GGGCAAATCG-3';INF-γ(310 bp),上游:5'-TG-GATATCTGGAGGAAGTGG-3',下游:5'-CGACTC-CTTTCCGCTTCCT-3';IL-4(206 bp),上游:5'-ACCAGACGTCCTTACGGC-3',下游:5'-GCGTG-GACTCATTACGG-3';IL-10(112 bp),上游:5'-ATTTGAATTCCCTGGGAGAGA-3',下游:5'-TCAT-TCTTCACCTGCTCCACT-3'。在 20 μL 反应体系中,分别加入定量阳性标准品及待测样本 cDNA 1.5 μL,上下游引物(IL-4、IL-10、TNF-α、INF-γ)各 1.5 μL,2 × SyBr Green Mix 各 10 μL,DEPC H₂O 5.5 μL。在 PRISM 5700 型荧光定量 PCR 仪中进行扩增,反应条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s;53℃ 30 s;72℃ 50 s;40 cycles;72℃ 8 min。反应结束后,采用定量 PCR 仪自带分析软件根据标准曲线分析并计算结果。

6.3 免疫组化法细胞凋亡相关基因(Fas、FasL、Bax、bcl-2)检测 取血处死小鼠后,在每只小鼠肝左叶取肝组织 2 mm,10%甲醛固定,石蜡包埋切片,采用 SABC 法,实验步骤按试剂盒说明进行,DAB 显色。

6.3.1 免疫组化法主要步骤 (1)石蜡切片脱蜡至水;(2)3% H₂O₂ 室温孵育 5~10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性;(3)蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 2 × 5 min;(4)抗原修复;(5)5%~10% 正常山羊血清(PBS 稀释)封闭,室温孵育 10 min,倾去血清,勿洗;滴加一抗工作液,37℃ 孵育 1~2 h 或 4℃ 过夜;(6)PBS 冲洗,3 × 5 min;(7)滴加适量生物素标记二抗工作液,37℃ 孵育 10~30 min;(8)PBS 冲洗,3 × 5 min;(9)滴加适量的辣根酶或碱性磷酸酶标记的

链霉卵白素工作液,37 ℃ 孵育 10 ~ 30 min;(10) PBS 冲洗,3 × 5 min;(11) 显色剂显色 3 ~ 15 min (DAB);(12) 自来水充分冲洗,复染,脱水,透明,封片。

6.3.2 细胞凋亡的评判 免疫组化法测细胞凋亡相关基因 Fas、FasL、Bax、bcl-2,其表现为阳性细胞结构清晰,棕黄色颗粒定位良好,染色明显高于背景。Fas 和 FasL 以胞浆和(或)胞膜、胞核出现棕黄色颗粒为阳性细胞。Bax 和 bcl-2 主要表达在肝细胞浆,部分呈粗大颗粒分布。采用 IDA-2000 数字医学图像分析系统,每张切片随机取 5 个视野,图像放大 200 倍,测量阳性染色面积,取平均值,计算其占视野面积的百分数。

7 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计学软件处理。计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据进行正态性检验及方差齐性检验后,采用单因素方差分析。亚组间的比较,当方差齐时采用单因素方差分析 SNK 检验,当方差不齐时采用 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 一般情况 灌胃给药过程中,各组小鼠均毛色光泽较好,进食进水活动较多。造模给药后,各组小鼠则均较安静,进水活动较少(已禁食)。造模后,除空白组外,其余各组均有小鼠死亡,其中:茵陈蒿汤组死亡 2 只,其余各组各死亡 1 只。

2 各组小鼠血清 ALT、AST、TBil 变化比较(表 1) 与空白组比较,模型组小鼠血清 ALT、AST、TBil 均显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,联苯双酯组及荣肝合剂组 ALT 水平显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);各用药组 AST 水平显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$);荣肝合剂组 TBil 水平显著下降,差异有统计学意义($P < 0.01$),其余各组 TBil 水平变化不明显。与茵陈组比较,荣肝合剂组 ALT 水平

表 1 各组小鼠血清 ALT、AST、TBil 变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBil(μmol/L)
空白	10	37.03 ± 9.16	37.54 ± 4.29	4.85 ± 3.02
模型	9	204.39 ± 67.78 *	421.13 ± 84.11 *	31.54 ± 6.58 *
联苯双酯	9	83.58 ± 20.78 [△]	169.23 ± 31.21 ^{△△}	28.30 ± 7.81
茵陈	9	184.03 ± 48.95 ^{▲▲}	297.52 ± 32.71 ^{▲▲}	26.51 ± 7.36
茵陈蒿汤	8	151.77 ± 18.58	240.58 ± 19.61 [△]	26.11 ± 9.30
荣肝合剂	9	69.45 ± 23.94 [△]	119.52 ± 23.36 [△]	18.39 ± 4.99 [△]

注:与空白组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$;与荣肝合剂组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$

下降更为显著($P < 0.01$),与茵陈组及联苯双酯组比较,荣肝合剂组 AST 水平下降更为显著($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 各组小鼠肝组织中 TNF-α、INF-γ、IL-4、IL-10 变化比较(表 2) 与空白组比较,模型组小鼠肝组织 TNF-α、INF-γ 水平均显著升高($P < 0.05$),IL-4、IL-10 水平明显下降($P < 0.05$)。与模型组比较,荣肝合剂组 TNF-α 水平显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);荣肝合剂组与茵陈蒿汤组肝组织 INF-γ 水平显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);各药物干预组肝组织 IL-4 的表达水平显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$);荣肝合剂组肝组织 IL-10 的表达水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与联苯双酯及茵陈组比较,荣肝合剂组 TNF-α 水平下降更为显著($P < 0.05$);与联苯双酯组比较,荣肝合剂组肝组织 IL-4 上升水平更显著($P < 0.05$);与茵陈蒿汤组比较,荣肝合剂组肝组织 IL-10 表达上升水平更显著($P < 0.05$)。

表 2 各组小鼠肝组织 TNF-α、INF-γ、IL-4、IL-10 变化比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF-α	INF-γ	IL-4	IL-10
空白	10	28.80 ± 0.93	29.29 ± 1.62	33.60 ± 1.39	34.41 ± 2.17
模型	9	31.13 ± 1.39 *	35.02 ± 1.39 *	30.13 ± 1.22 *	30.74 ± 1.39 *
联苯双酯	9	30.16 ± 1.36 [▲]	32.85 ± 1.72	31.27 ± 0.93 ^{△▲}	32.00 ± 1.53
茵陈	9	29.47 ± 1.06 [▲]	33.06 ± 1.14	32.63 ± 1.36 ^{△△}	33.38 ± 1.70
茵陈蒿汤	8	29.17 ± 1.14	32.11 ± 1.27 [△]	31.94 ± 1.06 ^{△△}	31.11 ± 1.86 [▲]
荣肝合剂	9	28.96 ± 1.72 [△]	30.16 ± 1.36 [△]	31.64 ± 1.14 ^{△△}	33.18 ± 1.98 [△]

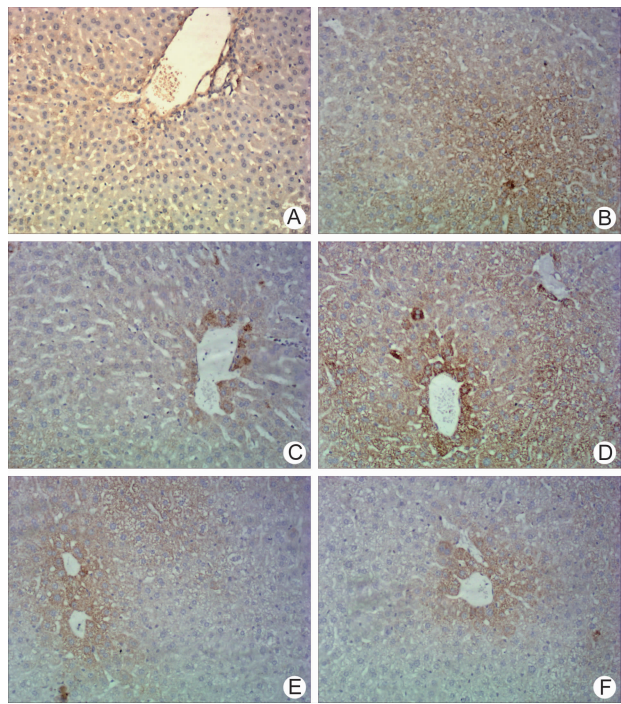
注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与荣肝合剂组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$

4 各组小鼠肝组织细胞凋亡相关基因(Fas、FasL、Bax、bcl-2)变化比较(图 1-4,表 3) 空白组 FasL 和 Bax 没有表达,Fas 和 bcl-2 有少许表达。与空白组比较,模型组小鼠肝组织 Fas、bcl-2 表达水平均显著升高($P < 0.05$)。与模型组比较,荣肝合剂组、茵陈蒿汤组 Fas 基因表达水平显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);荣肝合剂组 FasL、Bax 基因的表达水平显著下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);荣肝合剂组 bcl-2 基因的表达水平及 bcl-2/Bax 比值显著上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与联苯双酯组、茵陈蒿汤组、茵陈组比较,荣肝合剂组 Fas 基因及 FasL 基因下降水平更显著($P < 0.05$);与茵陈组比较,荣肝合剂组 bcl-2 表达水平上升更显著($P < 0.05$)。

表 3 各组小鼠肝组织细胞凋亡相关基因变化比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Fas (%)	FasL (%)	bcl-2 (%)	Bax (%)	bcl-2/Bax
空白	10	1.05 ± 0.37	—	1.20 ± 0.15	—	—
模型	9	18.26 ± 5.65 *	17.54 ± 5.70	17.78 ± 6.15 *	18.28 ± 4.69	0.86 ± 0.37
联苯双酯	9	16.29 ± 6.01 ▲	15.83 ± 5.99 ▲	17.24 ± 5.37	16.84 ± 5.67	0.87 ± 0.44
茵陈	9	15.97 ± 2.34 ▲	14.59 ± 3.96 ▲	14.67 ± 5.02 ▲	14.79 ± 3.59 △	0.90 ± 0.24
茵陈蒿汤	8	11.98 ± 3.49 △▲	14.61 ± 4.64 ▲	16.26 ± 4.28	15.47 ± 3.43	0.96 ± 0.39
荣肝合剂	9	9.97 ± 2.79 △	10.02 ± 3.19 △	18.54 ± 4.67 △	15.41 ± 3.92 △	1.20 ± 0.41 △

注:与空白组比较,**P* < 0.01;与模型组比较,△*P* < 0.05;与荣肝合剂组比较,▲*P* < 0.05



注:A 为空白组;B 为模型组;C 为联苯双酯组;D 为茵陈组;E 为茵陈蒿汤组;F 为荣肝合剂组;下图同

图 1 各组小鼠肝组织 Fas 基因表达比较 (SABC 法,DAB 显色,×400)

讨 论

ConA 是一种植物凝集素,在体外试验,可以促进 T 细胞的分裂。Imose M 等^[5]报道 BALB/c 静脉注射小鼠 ConA 8 h 后可引起明显的急性肝损害,并证明损伤机制为 CD4⁺T 细胞介导。此结果与人类的急性肝炎发病机理非常相似,所以 Con A 诱导的肝损伤动物模型是一种理想的肝损伤动物模型。中医学临床实践认为,急性肝损伤以湿热、血瘀为主要病机,但湿可困脾,脾运不能更助湿邪,“未病先防”,急性肝炎亦当健脾以祛湿,健脾乃治本之法。荣肝合剂是唐旭东教授治疗急慢性肝炎的经验方,由鸡骨草、黄芪、白术、滑石、丹参等组成,全方具有清热利湿、活血健脾之功,正中急性肝炎病机。笔者前期研究结果显示:荣肝合

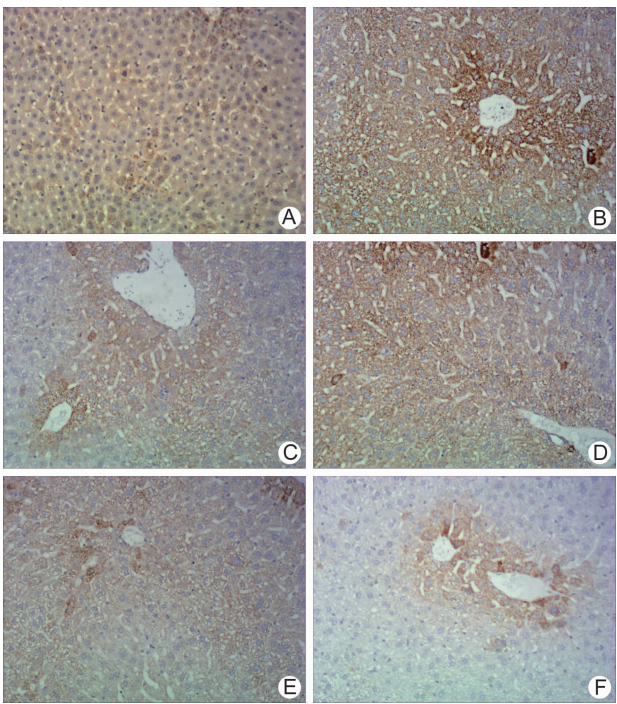


图 2 各组小鼠肝组织 FasL 基因表达比较 (SABC 法,DAB 显色,×400)

剂干预慢性免疫性肝损伤小鼠,可降低血清酶学水平,减轻肝细胞的炎症、坏死和纤维化程度,促进损伤肝细胞的修复,可调节体内 CD4⁺、CD8⁺细胞的水平,提高机体免疫力^[6,7];荣肝合剂对 ConA 所致 HBV 转基因小鼠急性免疫性肝损伤也具有降酶作用,其作用可能是通过抑制 HBV DNA,改善肝细胞膜脂质过氧化反应水平而起效的^[8]。

由于 HBV 感染可使机体免疫系统活化,产生并释放各种细胞因子,这些细胞因子促进肝内炎症反应,介导肝细胞损伤。机体免疫状态是 HBV 感染后病情发展方向的决定因素,而辅助性 T 细胞(Th)应答类型与机体的免疫状态密切相关。而 Th1/Th2 失衡可能是 HBV 感染慢性化的重要机制^[9,10]。其中,以产生 IL-2 和 IFN-γ 为主的 Th1 细胞,可诱导巨噬细胞依赖性免疫反应,增强杀伤细胞的细胞毒作用,介导细胞免

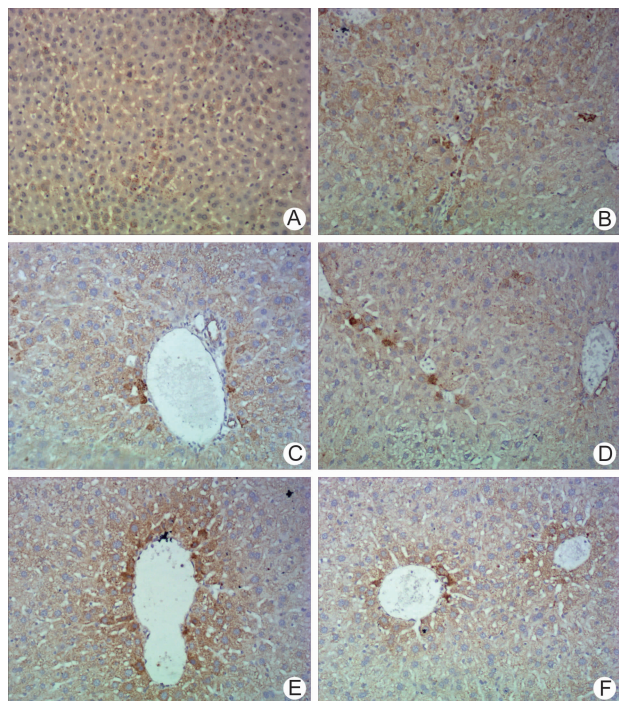


图3 各组小鼠肝组织 bcl-2 基因表达比较
(SABC 法, DAB 显色, $\times 400$)

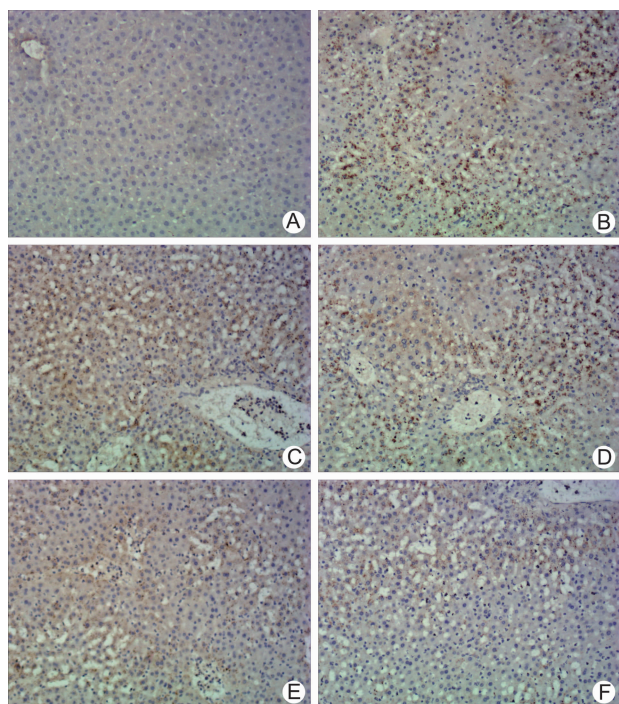


图4 各组小鼠肝组织 Bax 基因表达比较
(SABC 法, DAB 显色, $\times 400$)

疫应答,但反应过度时也会引起组织损伤;以产生 IL-4、IL-10 为主的 Th2 细胞则可促进体液免疫应答,而且 Th2 也可以通过负性调节机制抑制 Th1 细胞介导的免疫反应而发挥抗炎作用。TNF- α 已被证实为细胞因子网络中介导肝损伤的中末介质,它既是细胞

凋亡的正性触发因子,且直接损伤血管内皮细胞,亦可活化中性粒细胞促进其趋化聚集于肝脏;而且 TNF- α 是导致 ConA 肝损伤最重要的细胞因子。本研究显示,经过药物干预后,荣肝合剂组的 TNF- α 、IFN- γ 水平均有所降低,而 IL-4、IL-10 水平升高,因此可降低 Th1/Th2 比例,炎症情况亦得到改善,而其余干预组则仅对部分指标有效。

细胞凋亡(apoptosis)是多细胞有机体为调控机体发育、维护内环境的稳定由基因控制的细胞主动死亡过程,又称程序性细胞死亡。目前公认参与细胞凋亡信号途径的通路有死亡受体通路、线粒体依赖性通路和内质网通路。Fas 受体-配体系统是激发肝细胞凋亡最主要的受体介导途径。Fas 介导的死亡信号通过 Fas 配体和受体的相互作用而转导。肝细胞表面组成表达 Fas 受体,其配体主要分布于活化的 T 细胞,当活化 T 细胞膜表面的 Fas 配体与靶细胞表面的 Fas 受体结合激活后,Fas 的死亡结构域(DD)与 Fas 牙相关死亡域(Fas associated death domain, FADD)结合,并激活天门冬氨酸特异性的半胱氨酸蛋白酶(Caspase-8,10),进而激活 Caspase-3 和一系列级联反应,诱发肝细胞凋亡^[11,12]。Bcl-2 蛋白是一种重要的对抗细胞凋亡的物质,Bax 为 bcl-2 家族蛋白,可抑制 bcl-2 的活性,促进凋亡。Bcl-2 蛋白和 Bax 二者均可广泛定位于线粒体膜等细胞器上,bcl-2 通过稳定线粒体的膜电位,防止促凋亡蛋白细胞色素 C 释放入胞浆,维持线粒体的完整性。然而,Bax 则易化细胞色素 C 释放,增加活性氧类(ROS)的产生,促进细胞凋亡。Bcl-2 家族蛋白在肝组织表达,发生病毒性肝炎时常同时有肝细胞凋亡和坏死。在坏死区及其周围,Bax 表达的阳性程度明显高于 bcl-2 蛋白的表达。Bax 可与 bcl-2 蛋白形成异二聚体并使之失活,加强表达 Bax 形成同二聚体,加速细胞死亡。所以 Bax 与 bcl-2 的比率影响了凋亡信号刺激后细胞的存活或死亡的比率,Bax 可直接抑制 bcl-2 活性以促进凋亡,Bax 表达占优势,提示肝细胞处于凋亡的活跃状态,直接促使肝细胞死亡^[13,14]。

HBV 致病的过程是免疫介导的炎症反应,细胞毒性 T 淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)通过抗原递呈作用对靶细胞识别和破坏,通过膜表面 FasL 与靶细胞 Fas 抗原结合引起靶细胞凋亡。同时,在坏死区域也有着明显的促凋亡因子 Bax 和抑凋亡因子 bcl-2 的表达,且 bcl-2/Bax 有所下降。本实验过程中,ConA 尾静脉注射转基因小鼠形成急性肝损伤实验中,空白组 FasL 和 Bax 没有表达,Fas 和 bcl-2 仅有少许表达。

与空白组比较,模型组 Fas、FasL、bcl-2 和 Bax 的表达水平均有明显的升高($P < 0.05$)。通过药物干预,荣肝合剂对各基因的表达水平均有影响($P < 0.05$),说明中医药干预乙型病毒性肝炎可通过 Fas/FasL 和 bcl-2/Bax 途径对病理组织的损伤产生作用,中药复方可减轻炎症因子的表达水平,其中抑凋亡因子的加强(bcl-2/Bax 升高)是其获得疗效的分子基础。

中药茵陈蒿具有清利湿热、利胆退黄的功效,常用于急慢性肝炎的治疗。经方茵陈蒿汤出自《伤寒论》,是清热利湿方的祖方,也是当下临床治疗急慢性肝炎的常用方剂。较之茵陈蒿汤,荣肝合剂更兼具健脾与活血之功,组方更为全面。本实验表明,较之单味茵陈煎液、茵陈蒿汤,荣肝合剂的降酶疗效也更为确切,说明中药复方疗效优于单味药,清利活血健脾法治疗慢性乙型肝炎优于单纯清热利湿法。与单味茵陈、茵陈蒿汤、联苯双酯相比较,荣肝合剂不仅对小鼠的 AST、AST、TBil 有降低作用,同时对细胞凋亡和免疫调节指标有所改善。荣肝合剂可能是通过抑制了细胞凋亡,改善了 Th1/Th2 免疫调节水平而起效。

荣肝合剂降酶机制是多方面的,故荣肝合剂对 T 淋巴细胞亚群功能、细胞凋亡等方面的干预机制有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Wei HS, Li DG, Lu HM, et al. Effects of AT1 receptor antagonist, losartan, on rat hepatic fibrosis induced by CCl_4 [J]. World J Gastroenterol, 2000,6(4): 540–545.
- [2] Liu HL, Li XH, Wang DY, et al. Matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 expression in fibrotic rat liver [J]. World J Gastroenterol, 2000,6(6): 881–884.
- [3] 段富津.方剂学[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1995:241–242.
- [4] Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A [J]. J Clin Invest, 1992,90(1): 196–203.
- [5] Imose M, Nagaki M, Kimura K, et al. Leflunomide protects from T-cell-mediated liver injury in mice through inhibition of nuclear factor kappaB [J]. Hepatology, 2004,40(5): 1160–1169.
- [6] 王凤云,唐旭东,刘燕玲,等.荣肝合剂对 ConA 诱导慢性免疫性肝损伤小鼠的影响[J]. 胃肠病学和肝病学, 2008,17(6): 492–495.
- [7] 王凤云,唐旭东,许勇钢,等.荣肝合剂对 ConA 诱导慢性免疫性肝损伤小鼠细胞凋亡功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2008,28(9): 835–838.
- [8] 张引强,唐旭东,王凤云,等.荣肝合剂对刀豆蛋白 A 诱导急性免疫性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 中医杂志, 2010,51(5): 453–456.
- [9] 黄育华,晏雪生,彭亚琴,等.免疫性肝损伤小鼠 Th1/Th2 细胞的变化 [J]. 中医药学刊, 2005,23(7): 1209–1211.
- [10] 牛智强,范昕建.中药复方 FZQX 对免疫性肝操作小鼠 Th1/Th2 细胞的调节作用 [J]. 西部医学, 2008,20(5): 917–918.
- [11] Larsen BD, Rampalli S, Burns LE, et al. Caspase 3/Caspase-activated DNase promote cell differentiation by inducing DNA strand breaks [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(9): 4230–4235.
- [12] 曹健美,陶庆,慕永平,等.一贯煎对 CCL_4 诱导肝纤维化大鼠肝细胞凋亡及其调控基因表达的影响 [J]. 上海中医药大学学报, 2012,26(5): 70–75.
- [13] 龚非力,沈关心,李亚卓,等.医学免疫学[M]. 北京:科学出版社, 2003:262.
- [14] 金成,张培建. Bcl-2/Fas 蛋白在肝脏缺血再灌注损伤实验领域中的研究进展 [J]. 中国普通外科杂志, 2008,17(1): 85–87.

(收稿:2012-12-05 修回:2013-06-28)