

丹参素、熊去氧胆酸对大鼠脂肪肝肝细胞糖代谢的影响

丁钢, 王宝仁, 陈乐明

丁钢, 王宝仁, 陈乐明, 天津港口医院 天津市 300456
通讯作者: 丁钢, 300456, 天津市塘沽区二马路, 天津港口医院.
dq57@medmail.com.cn
电话: 022-81910143 传真: 022-25706348
收稿日期: 2005-05-13 接受日期: 2005-06-15

摘要

目的: 用丹参素和熊去氧胆酸培养脂肪肝模型鼠肝细胞, 观察药物对细胞糖代谢能力的影响。

方法: 将丹参素和熊去氧胆酸加入模型鼠肝细胞的培养液, 经1 wk培养后, 再调整培养液中糖至13.9 mmol/L和胰岛素至250 mU/L, 2 h和24 h测定糖含量, 24 h测定胰岛素含量。

结果: 丹参素组2 h糖含量 11.581 ± 0.501 mmol/L和24 h糖含量 8.188 ± 0.770 mmol/L, 均低于熊去氧胆酸组2 h 11.881 ± 0.608 mmol/L、24 h 10.019 ± 0.900 mmol/L和对照组2 h 12.306 ± 0.360 mmol/L、24 h 11.669 ± 0.832 mmol/L, 并有明显差异(2 h $F = 4.25$, $P = 0.0282$; 24 h $F = 34.74$, $P = 0.0001$)。24 h胰岛素丹参素组含量 29.513 ± 2.638 mU/L, 亦明显低于熊去氧胆酸组 40.888 ± 6.869 mU/L和对照组 57.125 ± 8.104 mU/L ($F = 38.57$, $P = 0.0001$)。

结论: 脂肪肝模型鼠肝细胞经丹参素培养后, 对胰岛素的摄取、结合能力提高, 糖代谢能力增强。

丁钢, 王宝仁, 陈乐明. 丹参素、熊去氧胆酸对大鼠脂肪肝肝细胞糖代谢的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1907-1909
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1907.asp>

0 引言

近年来, 脂肪肝形成的“二次打击”学说已经得到了普遍认同. 此学说认为肝细胞本身的糖耐量异常和对胰岛素的耐受在脂肪肝形成中起重要作用. 为了解丹参素和熊去氧胆酸对脂肪肝的影响, 本研究通过对大鼠脂肪肝细胞的体外培养, 以观察上述两种药物对脂肪肝细胞糖代谢的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 纯系♂ Wistar大鼠共20只(军事医学科学院卫生环境所提供), 每只体质量约 180 ± 20 g. 饲料采用高脂肪混合饲料: 颗粒饲料(购于天津市卫生局动物中心), 猪油(自制)、胆固醇(购于天津化学试剂公司), 以79:20:1比例混合。

1.2 方法

1.2.1 脂肪肝动物实验模型的建立 大鼠自由进食、饮水, 室内自然采光10:14, 温度23-28℃, 湿度40-60%,

于第16 wk每只大鼠体质量达 450 ± 40 g, 随机取其中一只, 450 g, 肝指数 >5 , 肝脏25.6 g, 黄褐色, 病理检查: 弥漫性肝细胞脂肪变, 95%的肝细胞内有大泡性脂肪滴贮积-重度脂肪肝. 表明脂肪肝造模成功。

1.2.2 肝细胞分离 取脂肪肝模型大鼠一只, 作为肝细胞供体大鼠, 戊巴比妥麻醉, 仰卧位, 胸腹部备皮、消毒、铺无菌巾, 经腹正中切口进入腹腔, 暴露分离腹主动脉、下腔静脉、门静脉, 预置结扎线, 腹主动脉插管固定, 以一定压力向腹主动脉内推注含肝素(100 U/kg)的4℃生理盐水(NS), 同时迅速切开胸腔, 关闭胸主动脉, 剪开心脏, 即快速推注灌洗液, 共100 mL, 可见血液及灌洗液顺利流出心脏; 推注同时切开门静脉, 插管固定, 快速推注4℃灌洗液100 mL. 在肾静脉水平剪开下腔静脉, 插管固定, 关闭上下腔静脉, 可见灌洗液从下腔静脉插管流出, 逐渐肝脏呈淡黄色. 将门静脉插管连接驱动泵输出端, 输入端放入胶原酶溶液内(37℃), 下腔静脉插管亦放入此容器, 形成门静脉-腔静脉循环, 循环胶原酶溶液30 min, 流速20 mL/min, 取下肝脏, 轻轻剥离肝包膜, 以肝上下腔静脉为中心用小木梳轻轻快速梳下肝细胞, 弃去残留支架组织, 经200目滤网滤过去除未消化组织, 即得较稠厚肝细胞悬液. 将肝细胞悬液在4℃、1 200 r/m条件离心2.5 min, 弃去上清液, 然后用4℃ PBS液洗1次, MEM洗2次, 分别以1 200 r/m条件离心2 min、1.5 min、1 min. 细胞悬浮于含100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基, 接种于24孔培养皿中, 在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养。

1.2.3 肝细胞存活率测定 台盼蓝拒染试验: 取少量肝细胞悬液, 与等量4 g/L台盼蓝溶液混合, 静置1 min, 立即在显微镜下计数200个细胞, 细胞核着色者为死细胞, 不着色者为活细胞。

1.2.4 肝细胞培养 以100 mL/L胎牛血清的DMEM培养基调整细胞浓度至 1×10^6 /L, 接种于24孔培养皿中, 在37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养24 h后, 分别加入一定浓度丹参素及熊去氧胆酸, 设空白对照, 每孔设3个复孔, 定时取样测定. 经10次细胞分离试验后, 肝细胞平均产量为 $(9.10 \pm 0.40) \times 10^7$, 台盼蓝拒染实验细胞活性率 $(94.30 \pm 1.89)\%$, 倒置显微镜下观察单个游离细胞, 细胞呈圆形。

1.2.5 丹参素、熊去氧胆酸对脂肪肝大鼠肝细胞糖代谢的影响 取分别经丹参素(10 mg/L)、熊去氧胆酸(0.1 mg/L)培养7 d的脂肪肝大鼠肝细胞, 和空白培养的对照组, 分为三组, 每孔设复孔3个, 各孔约含有2 m肝细胞

(10⁹/L) 混悬液, 于实验开始前更换同一培养液, 并加入一定含量的普通胰岛素和葡萄糖. 加入后调整浓度: 葡萄糖 13.9 mmol/L, 普通胰岛素 250 mU/L, 培养 2, 24 h 后, 测量比较培养液中糖和普通胰岛素的含量. 观察脂肪肝细胞在普通胰岛素存在的情况下对糖的利用情况. 以上过程重复 8 次. 糖含量由本院生化室使用 Olympus AU640 型全自动生化分析仪和日本第一化学公司试剂进行测定, 胰岛素含量由天津医科大学内分泌研究所中心实验室测定. 用每次各组平均数进行统计.

统计学处理 采用 *F* 检验进行统计学处理, 各组间用 SNK 法进行比较. 用 SAS6.12 软件进行分析, *P* < 0.05 为有统计学意义.

2 结果

对照组和 II 实验组之间在培养 2 h 后糖含量即出现差异, 实验组明显低于对照组 (*P* = 0.028). 培养 24 h 后各组之间均有明显差异 (*P* < 0.001) (表 1).

培养 24 h 后各组胰岛素含量之间均有明显差异, 实验组明显低于对照组 (*P* < 0.001, 表 2).

表 1 丹参素、熊去氧胆酸对脂肪肝大鼠脂肪肝细胞糖代谢的影响 (*n* = 8, mean ± SD, mmol/L)

时间	丹参素	熊去氧胆酸	对照组	<i>F</i>	<i>P</i>
2h	11.581 ± 0.501	11.881 ± 0.608	12.306 ± 0.360	4.250	0.028
24h	8.188 ± 0.770	10.019 ± 0.900	11.669 ± 0.832	34.740	<0.001

表 2 丹参素、熊去氧胆酸对脂肪肝大鼠脂肪肝细胞胰岛素的影响 (*n* = 8, mean ± SD, mU/L)

时间	丹参素	熊去氧胆酸	对照组	<i>F</i>	<i>P</i>
24h	29.513 ± 2.638	40.888 ± 6.869	57.125 ± 8.104	38.570	<0.001

3 讨论

胰岛素抵抗是引起非酒精性脂肪肝的一个重要因素, 导致肝细胞的糖利用障碍. 脂肪性肝病是遗传-环境-代谢应激相关因素所致的, 以肝细胞脂肪变性为主的临床病理综合征^[1]. Day *et al*^[2-3] 在 1998 年提出了“二次打击”学说, 经过近年来不断发展, 目前较为公认的“多重打击学说”为统一发病机制学说, 其初次打击主要是胰岛素抵抗^[4-5], 通过促使外周脂肪分解增加和胰岛素血症引起肝细胞脂肪堆积, 并诱导其对损害因子的敏感性增高. 在此阶段, 由于机体组织适应性反应机制的抗氧化、抗细胞凋亡、瘦素的抗脂肪毒性等防御功能可与上述因素相抗衡, 故大多数单纯脂肪肝的结构和功能改变是可逆的^[6]. 二次打击主要是氧应激, 最后导致炎症和纤维化. 在脂肪的演变中, 发生肿瘤坏死因子 (TNF) α-瘦素-胰岛素反馈轴改变, 胰岛素抵抗进一步削弱了抗葡萄糖变性和抗脂肪变性的能力, 适应性反应出现缺陷, 细胞防御机制减弱. 另外, 缺氧、内毒素、药物等作为附加因素实行多重打击.

因此, 在脂肪肝的发展中, 胰岛素抵抗造成的肝细胞糖代谢异常, 作为第一次打击的基础, 起到了重要的作用. 对脂肪肝治疗的方法包括如何减少胰岛素抵抗, 减少反应性氧化体系的生成增多, 减少肝脂质过氧化等因素, 就有可能阻碍脂肪肝的形成.

本研究中, 脂肪肝模型大鼠肝细胞经加入丹参素培养基培养 1 wk, 再加入葡萄糖和胰岛素. 经过 24 h 的培养, 分别对 2 h 和 24 h 的培养液中各组糖含量、胰岛素含量进行比较, 发现丹参素组培养液中葡萄糖的浓度较熊去氧胆酸组和对照组明显下降, 24 h 普通胰岛素的含量各组之间有明显差异. 这一结果表明, 大鼠脂肪肝细胞在丹参素的作用下, 其细胞对糖的利用有一定的改善, 机制不明. 丹参是中医药中的一味良药, 除具有活血化瘀、改善微循环的作用外, 还具有降低血脂、抑制细胞内源性胆固醇的合成, 抗脂蛋白氧化, 降低血液中的甘油三酯和胆固醇的含量, 抑制低密度脂蛋白形成的作用. 同时, 丹参对肝细胞的急慢性损害还具有保护作用, 保护肝细胞膜, 减少细胞坏死, 降低肝纤维化水平. 根据研究还发现, 丹参可降低肝脏的丙二醇含量, 同时对肝脏的超氧化物歧化酶活性有明显的升高作用, 说明在一定程度上具有抗氧自由基及抗脂质过氧化的作用^[7-8].

丹参素影响模型大鼠脂肪肝肝细胞糖代谢的作用, 可能通过以下途径: (1) 丹参素具有多种细胞因子活性, 促进细胞代谢, 改善细胞功能. 能促进脂肪肝细胞本身的物质合成、分解代谢能力和能量产生、利用能力. 增加白蛋白的合成和降低游离脂肪酸 (FFA) 水平, 增加对胰岛素的摄取和结合, 提高对胰岛素的敏感性, 使得细胞对糖的吸收、利用增加, 减轻胰岛素的抵抗. (2) 目前研究发现瘦素、FFA^[9]、TNF^[10-12] 和自由基^[13] 在脂肪肝的形成过程中起重要作用, 这些因子相互作用和影响, 干扰细胞的糖代谢、脂肪代谢和能量合成, 导致脂肪肝. 丹参素能减少细胞产生的氧自由基, 并能减轻自由基的损伤, 减少 FFA 的产生, 调控 TNF 的产生^[14-15]. 他们在胰岛素受体、细胞酶的活性和基因的表达等不同的水平影响细胞内的糖代谢和能量的供应. (3) 丹参素通过抗氧自由基、FFA 等损伤因子的作用, 减少脂肪肝细胞的损伤, 减少细胞的凋亡, 保护肝细胞, 使总的糖代谢改善.

至今为止, 在脂肪肝的形成过程中, 糖代谢的异常改变一直扮演着一个重要角色, 糖耐量下降, 胰岛素抵抗被认为是脂肪肝形成的重要一环. 通过本研究的观察, 在脂肪肝大鼠肝细胞的培养中, 对照比较了丹参素溶液和熊去氧胆酸溶液对其糖代谢的影响. 发现以丹参素溶液培养过的脂肪肝细胞在有一定浓度的胰岛素存在的情况下, 经一定时间培养后, 其细胞培养液中的葡萄糖的含量, 较熊去氧胆酸组和对照组有明显的差异. 证明在普通胰岛素存在的情况下, 丹参素可以明显改善脂肪肝细胞对葡萄糖的利用, 提高对胰岛素的反应性, 降低胰岛素抵抗的现象.

致谢: 感谢天津第三中心医院肝胆研究所张金卷博士在实验中给予的指导和帮助。

4 参考文献

- 1 赵彩彦, 李丽. 瘦素与脂肪性肝病. 中华肝病杂志 2004;12:510-512
- 2 Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* 1998;114:842-845
- 3 曾民德. 重视非酒精性脂肪性肝病的研究. 中华肝病杂志 2003;11:69
- 4 Yu AS, Keeffe EB. Nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Gastroenterol Disord* 2002;2:11-19
- 5 van Hoek B. Non-alcoholic fatty liver disease: a brief review. *Scand J Gastroenterol* 2004;39(Suppl 241):56-59
- 6 曾民德. 脂肪肝发病机制“二次打击”的假说. 肝脏 2001;6:145
- 7 李跃华, 吴翠贞, 阙玲莉. 丹参素增强肝细胞生长及其在药物性肝细胞损伤中的保护作用. 南京医科大学学报(中文版) 1996;16:346-348
- 8 王南, 蔡海江, 朱宇, 陈秀英. 丹参素对牛主动脉平滑肌细胞氧化修饰LDL的抑制作用. 南京医科大学学报 1994;14:529-531
- 9 Sanyal AJ, Campbell-Sargent C, Mirshahi F, Rizzo WB, Contos MJ, Sterling RK, Luketic VA, Shiffman ML, Clore

- JN. Nonalcoholic steatohepatitis: association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities. *Gastroenterology* 2001;120:1183-1192
- 10 Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998;12:57-65
- 11 Memon RA, Hotamisligil GS, Wiesrock SM, Uysal-Teoman K, Faggioni R, Moser AH, Feingold KR, Grunfeld C. Upregulation of uncoupling protein 2 mRNA in genetic obesity: lack of an essential role for leptin, hyperphagia, increased tissue lipid content, and TNF- α . *Biochem Biophys Acta* 2000;1484:41-50
- 12 Straczkowski M, Kowalska I, Dzienis-Straczkowska S, Stepień A, Skibinska E, Szelachowska M, Kinalska I. Changes in tumor necrosis factor- α system and insulin sensitivity during an exercise training program in obese women with normal and impaired glucose tolerance. *Eur J Endocrinol* 2001;145:273-280
- 13 Xie HS, Lutt WW. Insulin resistance caused by hepatic cholinergic interruption and reversed by acetylcholine administration. *Am J Physiol* 1996;270:E858-E863
- 14 黄双盛, 吴勇杰. 丹参的抗氧化与抗炎作用研究进展. 中国中医药信息杂志 2002;9:88-89
- 15 王文俊, 吴咸中, 姚智, 李会强. 人参素、丹参素对单核细胞分泌炎症细胞因子的调节. 中国免疫学杂志 1995;11:370-372

编辑 王谨晖 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

人食管鳞癌中细胞周期调节基因蛋白的表达

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强, 河北省北方学院病理学教研室 河北省张家口市 075029
河北省自然科学基金课题, No. C2005000664
河北省普通高等学校博士科研资助基金课题, No. B2004101
通讯作者: 张林西, 075029, 河北省张家口市长青路 14号, 河北北方学院病理学教研室. linxizhang@sohu.com
电话: 0313-8041652 传真: 0313-8045177
收稿日期: 2005-06-10 接受日期: 2005-06-13

摘要

目的: 探讨细胞周期调节基因 cyclin D1、CDK4、cyclin E 和 p27Kip1 在我国食管鳞癌(SCC)中的表达特点及其在食管上皮癌变中的可能作用。

方法: 应用流式细胞术对 81 例食管鳞癌中 cyclin D1、CDK4、cyclin E、p27Kip1 的表达进行检测, 并对结果进行定量分析。

结果: cyclin D1、CDK4、cyclin E 蛋白在正常食管上皮的表达都较低, 在异型增生上皮中有所增高, 而在 SCC 中表达都较高, 且随分化程度的降低而逐渐增高, 组间差异显著(分别为 $F = 28.369$, $P < 0.01$; $F = 9.016$, $P < 0.01$; $F = 22.667$,

$P < 0.01$)。p27Kip1 在正常食管上皮中表达最高, 随分化程度的降低而显著减少, 组间差异显著($F = 5.783$, $P < 0.01$)。p27Kip1 表达分别与 cyclin D1、CDK4 和 cyclin E 基因表达呈显著负相关($r = -0.380$, -0.242 , -0.333 ; $P < 0.05$), 而后三种基因表达之间呈显著正相关(cyclin D1 与 CDK4 $r = 0.711$, $P < 0.01$; cyclin D1 与 cyclin E $r = 0.638$, $P < 0.01$; CDK4 与 cyclin E $r = 0.430$, $P < 0.01$)。

结论: 在食管鳞癌中细胞周期调节基因 cyclin D1、CDK4、cyclin E 和 p27Kip1 表达异常与食管上皮细胞癌变密切相关。

金春亭, 张林西, 李海军, 李玉珍, 武欣, 范婕, 左东升, 王淑强. 人食管鳞癌中细胞周期调节基因蛋白的表达. 世界华人消化杂志 2005;13(15):1909-1912
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1909.asp>

0 引言

细胞周期调节基因与细胞癌变的关系, 是近年来生命科学领域的研究热点之一。目前, 已发现在癌变过程中有多