

· 基础研究 ·

复方茵丹汤对急性肝内胆胆汁淤积大鼠肝组织早期生长反应因子-1 和细胞间黏附分子-1 表达的影响

李晓玲¹ 孙凤霞¹ 李攀¹ 隋京利² 吴京京¹

摘要 目的 研究复方茵丹汤对 α -萘异硫氰酸酯(α -naphthalene isothiocyanate, ANIT) 诱导的大鼠急性肝内胆胆汁淤积作用机制。**方法** 将 108 只雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组, 模型组, 中药高、中、低剂量组和阳性药对照组, 每组 18 只, 依据取材时间不同又将各组随机分为 24、48、72 h 3 个亚组, 每组 6 只。模型组、中药组、阳性药对照组大鼠一次性给予 2% ANIT 按 100 mg/(kg·d) 灌胃造模, 空白对照组予等容积色拉油灌胃。造模 2 h 后, 中药高、中、低剂量组分别给予生药含量为 24.48、12.24 和 6.12 g/(kg·d) 的复方茵丹汤中药煎剂 1 mL/100 g 体重灌胃, 模型组和空白对照组给予等容积生理盐水灌胃, 阳性药对照组给予 67.5 mg/(kg·d) 去氧胆酸灌胃, 均 1 次/日。造模后分别于 24、48、72 h 处死相应时相大鼠, 采用 RT-q-PCR、Western blot 和 IHC 技术检测早期生长反应因子 1 (early growth response-1, Egr-1) 及细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) 在大鼠肝组织的表达水平。**结果** 与同时相空白对照组比较, 模型组 Egr-1、ICAM-1 基因及蛋白表达均明显升高 ($P < 0.01$)。与同时相模型组比较, 中药各剂量组及阳性药对照组 Egr-1 及 ICAM-1 基因及蛋白表达均明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。中药高剂量组 Egr-1、ICAM-1 基因及蛋白表达明显低于同时相中药中、低剂量组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 与阳性药对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 复方茵丹汤对 ANIT 灌胃诱导 AIC 大鼠的治疗作用可能与其下调 Egr-1 和 ICAM-1 基因和蛋白表达有关。

关键词 急性肝内胆胆汁淤积; α -萘异硫氰酸酯; 复方茵丹汤; 早期生长反应因子 1; 细胞间黏附分子-1

Effect of Compound Yindan Decoction on Expressions of Early Growth Response-1 and Intercellular Adhesion Molecule-1 in Acute Intrahepatic Cholestasis Rats LI Xiao-ling¹, SUN Feng-xia¹, LI Pan¹, SUI Jing-li², and WU Jing-jing¹ 1 Department of Infections, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Affiliated to Capital Medical University, Beijing (100010); 2 Department of Infections, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine Shunyi Branch, Beijing (101300)

ABSTRACT Objective To observe the mechanism of Compound Yindan Decoction (CYD) on α -naphthalene isothiocyanate (ANIT) induced acute intrahepatic cholestasis (AIC) rats. **Methods** Totally 108 male SD rats were randomly divided into normal control group, model group, high, medium, and low dose CYD groups, and positive control group, 18 in each group. According to different processing time points, rats in each group were further divided into 24, 48, and 72 h three sub-groups, 6 in each group. The rats of model group, CYD groups and positive control group were given separately with 2% ANIT (100 mg/kg⁻¹·d⁻¹) and equal volume of salad oil was given to the normal group by gastrogavage. After 2 h modeling, rats in high, medium, and low dose groups were administered with CYD at the daily dose of 24.48, 12.24, and 6.12 g/kg by gastrogavage (1 mL/100 g). Equal volume of physiological saline was administered to rats in model group and normal control group by gastrogavage. Ursodeoxycholic acid aqueous solution (at the daily dose of 67.5 mg/kg) was administered to rats in positive drug control group by gastrogavage, once per day. Rats were sacrificed at 24, 48, and 72 h after modeling. The expressions

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (No. 81573897); 北京中医医院院级课题暨两院合作课题 (No. YJ-201706)

作者单位: 1. 首都医科大学附属北京中医医院感染科 (北京 100010); 2. 北京中医医院顺义医院感染科 (北京 101300)

通讯作者: 孙凤霞, Tel: 010-52176608, E-mail: sunfengxia01969@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20181009.304

of early growth response-1 (Egr-1) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in rat liver were observed by Real-time quantitative PCR, Western blot, and immunohistochemistry (IHC). Results Compared with the simultaneous phase normal group, the expressions of Egr-1 and ICAM-1 genes and proteins in the model group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the simultaneous phase model group, the expressions of Egr-1 and ICAM-1 genes and proteins in each dose CYD group and ursodeoxycholic acid group were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The expressions of Egr-1 and ICAM-1 genes and proteins in the high dose CYD group was obviously lower than that in the simultaneous phase medium and low dose CYD groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). And there was no significant difference as compared with those of the ursodeoxycholic acid group ($P > 0.05$). Conclusion The therapeutic effect of CYD on ANIT-induced AIC rats might be related to down-regulating expressions of Egr-1 and ICAM-1 genes and proteins.

KEYWORDS acute intrahepatic cholestasis; ANIT; Compound Yindan Decoction; Egr-1; ICAM-1

急性肝内胆汁淤积(acute intrahepatic cholestasis, AIC)是指肝内胆汁酸代谢和转运障碍。临床可有黄疸、乏力、瘙痒、尿色深、粪便色浅等表现,生化指标上以 ALP 和 GGT 升高为特征性表现,并伴有胆红素升高,以直接胆红素为主。AIC 的发病机制尚不清楚,任何造成胆管功能受损或胆管阻塞的因素都有可能致胆汁淤积^[1]。AIC 的治疗以药物治疗为主,常用药物有阳性药对照、糖皮质激素及免疫抑制剂等,但临床效果不甚理想^[2]。AIC 归属于中医学“黄疸”范畴。复方茵丹汤由“茵陈蒿汤”为基础加减化裁而来,具有清热化湿、凉血活血的功效。前期的临床研究证实,复方茵丹汤治疗急性淤胆型肝炎,能够显著改善急性淤胆型肝炎患者的临床症状,降低患者血清 ALP 和 GGT 水平,促进胆红素消退,明显改善胆汁淤积^[3]。然而,复方茵丹汤治疗 AIC 的机制尚不明确,因此,探索及研究中药对 AIC 的作用机制对 AIC 的临床治疗具有重要的指导意义。

早期生长反应因子 1(early growth response-1, Egr-1)是一种对胆汁淤积的炎症和损伤有重要意义的转录因子,与 AIC 的发生发展有密切关系^[4],并可以通过调控下游因子细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)的表达来改善 AIC^[5]。复方茵丹汤对 AIC 的改善作用是否与调控 Egr-1、ICAM-1 的变化有关仍未知。本研究以 2% α -萘异硫氰酸酯(α -naphthalene isothiocyanate, ANIT)灌胃模型大鼠为对象,引入复方茵丹汤灌胃干预治疗,通过观察各组大鼠 Egr-1、ICAM-1 mRNA 和蛋白表达水平,以阐明复方茵丹汤在治疗 AIC 中的作用机制。

材料与方法

1 实验动物 清洁级雄性 4~6 周龄 SD 大鼠

108 只,体重(200 ± 10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司(许可证号:SCXK(京)0231993)。饲养于北京中医药大学东直门医院 SPF 级动物实验中心,室温(20 ± 2)℃,相对湿度:(50 ± 10%),动物饲料及饮用水均无菌。本实验遵守国家有关实验动物保护与使用准则。

2 药物 复方茵丹汤:所有药物均来源于北京中医医院中药房统一采购,方中药物剂量为 70kg 成人一日用量:茵陈 30 g 栀子 15 g 大黄 10 g 生地黄 30 g 赤芍 12 g 牡丹皮 9 g 白术 15 g 茯苓 15 g,成人一日剂量为 136 g/d,以上药物按体表面积换算成大鼠等效剂量为 12.24 g/(kg · d),将复方药物交由北京市卫生局临床药学研究所,煎制成生药含量为 2.448 g/mL 的药液。阳性对照药为熊去氧胆酸胶囊(优思弗),德国 Losan Pharma GmbH 公司生产,药物剂量按成人 750 mg/d 用量换算成大鼠等效剂量为每天 67.5 mg/kg。

3 试剂及仪器 ANIT(美国 Sigma 公司,生产批号:N4525-10G);Egr-1(购自美国 Proteintech 公司,生产批号:55117-1);ICAM-1(购自美国 Novus 公司,生产批号:AF583);TRNzol 总 RNA 提取试剂(购自天根生化科技(北京)有限公司,生产批号:DP405-02);引物合成,购自美国 Invitrogen 公司;RIPA 总蛋白提取试剂盒(生产批号:R0278)、BCA 蛋白定量试剂盒(生产批号:BCA1),以上试剂均购自美国 Sigma 公司;蛋白酶抑制剂(购自瑞士 Roche 公司,生产批号:11697498001);山羊抗兔 IgG(H + L),HRP(生产批号:111035003)、山羊抗鼠 IgG(H + L),HRP(生产批号:115035003)、驴抗羊 IgG(H + L),HRP(生产批号:705035003),以上试剂购自美国 Jackson 公司;GAPDH 鼠单抗,购自锐尔康生

物公司(生产批号:REK0005);ECL,购自美国 Millipore 公司(生产批号:WBKLS0500)。

涡旋振荡仪 QL-902(海口市其林贝尔仪器制造有限公司);分光光度计 NANODROP 2000(美国 Thermo scientific 公司);荧光定量 PCR 仪 ABI7500(美国 Applied Biosystems 公司);离心机 Centrifuge 5415D(德国 Eppendorf 公司);酶标仪 MultiSkan3(美国 Thermo 公司);电泳槽 Mini P-4(中国 Cavoy 公司);电泳仪 Mini Ge Tank、转膜仪 Mini Blot Module(美国 Thermo scientific 公司)。

4 动物分组 将 108 只雄性 SD 大鼠随机分为空白对照组,模型组,中药高、中、低剂量组,阳性药对照组,每组 18 只,依据取材时间不同又将各组分为 24、48、72 h 3 个亚组,每组各 6 只,分笼饲养。

5 模型制备 所有大鼠适应性喂养 3 天,第 4 天进行造模(造模前 12 h 禁食不禁水),模型组、中药组、阳性药对照组大鼠按照 100 mg/kg 体重给予 2%ANIT(1 g ANIT 溶于 50 mL 色拉油)一次性灌胃,空白对照组大鼠予等容积色拉油一次性灌胃^[6]。

6 给药方法 造模 2 h 后,中药高、中、低剂量组分别灌服复方茵丹汤中药制剂每天 24.48、12.24 和 6.12 g/kg,模型组和空白对照组予等容积生理盐水灌服,阳性药对照组予每天 67.5 mg/kg 优思弗水溶液灌服,均每天 1 次。

7 检测指标和方法

7.1 RT-q-PCR 检测肝组织 Egr-1、ICAM-1 mRNA 表达 取冻存肝组织,采用 TRNzol 总 RNA 提取试剂进行样本 RNA 提取,采用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录,cDNA 放 -20℃ 冰箱保存。以 2 × SYBR Premix Ex Taq II 10 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 0.5 μL,模板 2 μL,终体积 20 μL 进行 PCR 反应。反应条件:95℃ 30 s,(95℃ 5 s,60℃ 40 s) × 45 个循环。基因序列如下:Egr-1 上游引物:5'-CCTACGAGCACCTGAC-CACA-3';Egr-1 下游引物:5'-CTTCTCGTTAT-TCAGAGCGATGTC-3';ICAM-1 上游引物:5'-GGAGACTAACTGGATGAAAGACGA-3';ICAM-1 下游引物:5'-TCCCACGGAGCAGCACTACT-3';GAPDH 上游引物:5'-TTCCTACCCCAATGTATCCG-3';GAPDH 下游引物:5'-CCACCCTGTTGCTGTAGCCATA-3'。采用 2^{-ΔΔCT}法进行数据的相对定量分析。

7.2 IHC 检测肝组织 Egr-1、ICAM-1 蛋白表达 取各组大鼠肝组织切片进行脱蜡、抗原修复、过氧化物酶结合、抗原封闭,分别加入第一抗体(Egr-1 浓度 1:

500,ICAM-1 浓度 1:400),37℃ 2 h,分别加入第二抗体(山羊抗兔 IgG 浓度:1:500,驴抗羊 IgG 浓度 1:500),27℃ 50 min,DAB 显色后应用 Mayer 苏木素复染,脱水、透明、封固。图像定量分析:应用 Image Pro Plus 6.0 数码医学图像分析系统,在 40 倍放大倍数下,每张切片随机选取 5 个视野,测定 Egr-1、ICAM-1 棕黄色阳性表达颗粒的累积光密度值。

7.3 Western blot 检测肝组织 Egr-1、ICAM-1 蛋白表达 提取肝组织总蛋白,变性,SDS-PAGE 电泳。电泳条件:恒压 120 V,约 50 min,采用湿转法转膜,转膜条件:300 mA 恒流,0.45 μm 孔径 NC 膜,转膜时间 1 h 20 min,封闭。分别加入一抗(Egr-1 浓度 1:500,ICAM-1 浓度 1:1 000,GAPDH 鼠单抗浓度 1:10 000),4℃ 孵育过夜,洗涤,分别加入二抗山羊抗兔 IgG(H+L)HRP、驴抗羊 IgG(H+L)HRP、山羊抗鼠 IgG(H+L)HRP(1:10 000),孵育 40 min,洗涤,ECL 试剂发光,显影及定影。用 Quantity One 图像分析系统分析目标带的净光密度值。

8 统计学方法 应用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用独立样本的 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 RT-q-PCR 检测各组大鼠肝组织 Egr-1、ICAM-1 mRNA 表达水平比较(表 1) 与同时相空白对照组比较,模型组 Egr-1 mRNA 表达均显著升高(*P* < 0.01);与同时相模型组比较,中药各剂量组、阳性药对照组 Egr-1 mRNA 表达明显降低(*P* < 0.05,*P* < 0.01)。中药高剂量组各时相 Egr-1 mRNA 表达明显低于中药中、低剂量组(*P* < 0.05,*P* < 0.01);中药高剂量组和阳性药对照组比较,各时相 Egr-1 mRNA 表达差异无统计学意义(*P* > 0.05)。与同时相空白对照组比较,模型组 ICAM-1 mRNA 表达均明显升高(*P* < 0.01);与同时相模型组比较,除 24 h、72 h 中药低剂量组外,余中药剂量组及阳性药对照组各时相 ICAM-1 mRNA 表达均明显降低(*P* < 0.05,*P* < 0.01),中药高剂量组 24 h、72 h 时相及中药中剂量组 72 h 时相 ICAM-1 mRNA 表达明显低于低剂量组(*P* < 0.05,*P* < 0.01),中药高剂量组各时相 ICAM-1 mRNA 表达与阳性药对照组比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

2 IHC 检测各组大鼠肝组织 Egr-1、ICAM-1 蛋白表达水平比较(表 2,图 1、2) 与同时相空白对照组比较,模型组 Egr-1 蛋白表达均显著升高(*P* < 0.01);与

或间接增加促炎症介质 ICAM-1 的表达, ICAM-1 是存在与细胞表面的一类具有复杂功能的糖蛋白, 能够介导中性粒细胞参与炎症反应, 有研究发现, 野生小鼠发生胆汁淤积时, 沿静脉窦、门静脉和肝细胞可以观察到 ICAM-1 表达的增加^[11], 其发生机制可能与胆红素和胆盐活化 Kupffer 细胞, 炎症区活化的 Kupffer 细胞释放的 IL-1、TNF- α 等诱导 ICAM-1 表达上调有关^[12]。

本研究严格参照文献建立 AIC 动物模型^[6], 前期研究发现, SD 清洁大鼠 ANIT 造模后 24 h 出现 ALT、AST、ALP、GGT、TBIL、TBA 等生化指标升高, 多数指标于 48 h 达高峰, 72 h 有所下降, 但仍高于正常, 肝组织病理普遍可见肝细胞肿胀, 核仁粗大浓染, 汇管区内可见中性粒细胞浸润、胆管上皮细胞增生及小胆管的增生, 与文献[13]报道的一致, 提示造模成功。

本研究采用 ANIT 灌胃诱导 AIC 大鼠, 应用 PCR 及免疫组化、Western-Blot 等技术测定 Egr-1、ICAM-1 等因子基因转录和蛋白表达情况, 结果显示, 模型组大鼠的 Egr-1、ICAM-1 mRNA 及蛋白的表达较空白对照组明显升高, 提示 ANIT 可能通过上调 Egr-1、ICAM-1 的表达, 影响胆汁酸的正常代谢, 从而导致肝内胆汁淤积。

本实验发现, 中药复方茵丹汤组 Egr-1、ICAM-1 基因及蛋白表达均较模型组降低, 提示复方茵丹汤对 AIC 的作用机制可能与降低 Egr-1、ICAM-1 表达有关。中药高、中、低剂量组间比较结果显示, 高浓度中药对 Egr-1、ICAM-1 的影响作用优于中、低剂量组, 提示提高中药浓度可能会增强中药治疗 AIC 的疗效。中药高剂量组与阳性药对照组比较 Egr-1、ICAM-1 表达无明显差异, 提示中药复方茵丹汤用于治疗 AIC 大鼠与西药阳性药对照效果相当。

本研究虽然发现了复方茵丹汤可影响 AIC 大鼠 Egr-1、ICAM-1 的表达, 但是复方茵丹汤是通过直接调节 Egr-1、ICAM-1 通路还是通过其他调控因子或通路间接调控 Egr-1、ICAM-1 的表达尚需进一步深入研究。前期动物研究表明, 复方茵丹汤能够降低 AIC 大鼠 ALT、AST、TBIL、ALP、GGT 水平, 促进肝细胞病理学的恢复^[13], 本研究证明复方茵丹汤可降低 AIC 大鼠肝脏 Egr-1、ICAM-1 的表达, 提示复方茵丹汤对 AIC 大鼠的治疗作用可能与其下调 Egr-1、ICAM-1 表达有关。但是复方茵丹汤如何通过信号通路影响 Egr-1、ICAM-1 的表达尚不明确, 仍需进一步的研究。

利益冲突: 无。

参 考 文 献

- [1] 肝内胆汁淤积症诊治专家委员会. 肝内胆汁淤积症诊治专家共识[J]. 中华临床感染病杂志, 2015, 8(5): 402-406.
- [2] Corpechot C, Chazouilleres O, Poupon R. Early primary biliary cirrhosis: biochemical response to treatment and prediction of long term outcome [J]. J Hepatol, 2011, 55(6): 1361-1367.
- [3] 王建美, 孙凤霞. 复方茵丹汤治疗急性淤胆型肝炎的临床疗效评价[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [4] Ding Y, Zhao L, Huang ZH, et al. Role of early growth response factor-1 signal pathway in acute intrahepatic cholestatic hepatic injury in rats [J]. Chin J Hepatol, 2008, 16(3): 215-219.
- [5] Zhang Y, Xu N, Xu J, et al. E2F1 is a novel fibrogenic gene that regulates cholestatic liver fibrosis through the Egr-1/SHP/EID1 network [J]. Hepatology, 2014, 60(3): 919-930.
- [6] Trauner M, Meier PJ, Boyer JL. Molecular pathogenesis of cholestasis [J]. N Engl J Med, 1998, 339(17): 1217-1227.
- [7] Allen K, Kim ND, Moon JO, et al. Upregulation of early growth response factor-1 by bile acids requires mitogen-activated protein kinase signaling [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 243(1): 63-67.
- [8] Ding Y, Zhao L, Mei H, et al. Effect and mechanism of emodin on cholestatic hepatitis [J]. Chin J Hepatol, 2009, 17(5): 368-373.
- [9] 丁艳, 赵雷, 贾德胜, 等. 转录因子 κ B 和早期生长反应因子 1 在急性肝内胆汁淤积性肝损伤大鼠模型中的表达 [J]. 临床儿科杂志, 2008, 26(10): 879-884.
- [10] Rao YP, Studer EJ, Stravitz RT, et al. Activation of the Raf-1/MEK/ERK cascade by bile acids occurs via the epidermal growth factor receptor in primary rat hepatocytes [J]. Hepatology, 2002, 35(2): 307-314.
- [11] Gujral JS, Liu J, Farhood A, et al. Functional importance of ICAM-1 in the mechanism of neutrophil-induced liver injury in bile duct-ligated mice [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 86(3): G499-G507.
- [12] 刘凡, 王晓东, 黄志华. 可溶性细胞间黏附分子-1 在急性肝内胆汁淤积兔模型中的表达 [J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(19): 1303-1304.
- [13] 李晓玲, 孙凤霞, 王晓静, 等. 复方茵丹汤对大鼠急性肝内胆汁淤积的干预作用 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2014, 22(9): 497-500.

(收稿: 2018-05-18 在线: 2018-10-31)

责任编辑: 李焕荣
英文责编: 张晶晶