

大黄廔虫丸含药血清调控大鼠原代肝星状细胞 BAMBI 表达的研究

吕萍, 刘旭东, 徐新杰, 赵壮志

(广西中医药大学附属瑞康医院肝病科, 广西南宁 530011)

摘要:目的: 研究大黄廔虫丸含药血清对 LPS 诱导大鼠肝星状细胞(HSC)骨形成蛋白-激活素膜结合阻断因子(BAMBI)表达的影响及其作用机制。方法: 体外培养并鉴定 Wistar 大鼠原代 HSC, 提取并制备大黄廔虫丸含药血清, 分别予空白对照血清、大黄廔虫丸中药含药血清培养细胞, LPS 刺激后, 应用 Western Blot 法和免疫组化检测 HSC 中 TLR4、MyD88、BAMBI 蛋白变化; EMSA 检测 NF- κ B 结合蛋白的活性; 结果: Western Blot 法和免疫组化结果: 与空白对照组比较, LPS 处理组 TLR4、MYD88 表达升高, BAMBI 表达降低。与 LPS 处理组比较, 含药血清和 LPS 共处理组 TLR4、MYD88 降低, BAMBI 表达升高。EMSA 结果显示, LPS 处理组 NF- κ B 结合蛋白的活性增强, LPS 与含药血清共处理组 NF- κ B 结合蛋白的活性降低。结论: 大黄廔虫丸含药血清可通过抑制 LPS 诱导的 HSCs 中 TLR4-MYD88 的表达, 进而减少 NF- κ B 活化, 促进 TGF- β 假受体 BAMBI 的表达, 这可能是发挥其抗纤维化作用的机制之一。

关键词: BAMBI; 大黄廔虫丸; TLR4 通路; HSC

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1673-7717(2019)05-1088-05

Serum Containing Dahuang Zhechong Pills Regulates BAMBI Expression in Rats Primary Hepatic Stellate Cells

LYU Ping, LIU Xudong, XU Xinjie, ZHAO Zhuangzhi

(Department of Liver Disease, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi, China)

Abstract: *Objective:* To investigate the effect of serum containing Dahuang Zhechong Pills (DHZC) on the expression of bone morphogenetic protein-activator membrane-blocking factor (BAMBI) induced by LPS in rats hepatic stellate cells (HSC) and its mechanism. *Methods:* The primary HSCs of Wistar rats were cultured and identified in vitro, and the DHZC containing serum was extracted and prepared. The cells were cultured with control serum and DHZC containing serum respectively. After LPS stimulation, Western blot and immunohistochemistry were used to detect TLR4, MyD88 and BAMBI protein in HSCs. EMSA was used to detect NF- κ B binding protein activity. *Results:* Western blot and immunohistochemistry results: Compared with the control group, the expressions of TLR4 and MYD88 were increased and the expression of BAMBI was decreased in the LPS treatment group. Compared with the LPS treatment group, TLR4 and MYD88 were decreased and BAMBI expression was increased in the DHZC + LPS group. EMSA results showed that the activity of NF- κ B binding protein was increased in LPS treatment group, and the activity of NF- κ B binding protein was decreased in DHZC + LPS group. *Conclusion:* Serum containing Dahuang Zhechong Pills can inhibit the expression of TLR4-MYD88 in LPS-induced HSCs, and further reduce NF- κ B activation and promote the expression of TGF- β pseudo-receptor BAMBI, which may be one of the mechanisms of its anti-fibrosis.

Key words: BAMBI; Dahuang Zhechong Pills; TLR4 signal; HSC

基金项目: 国家自然科学基金项目(81473532); 广西自然科学基金项目(2013GXNSFBA019188); 广西一流学科建设重点项目(2018XK084); 广西八桂学者建设专项经费项目

作者简介: 吕萍(1991-), 女, 广西玉林人, 医师, 硕士研究生, 研究方向: 肝脏疾病的基础与临床。

通讯作者: 刘旭东(1976-), 男, 山西兴县人, 主任医师, 硕士研究生导师, 博士, 研究方向: 中西医结合防治肝纤维化。E-mail: lxdlhx@163.com。

肝纤维化是慢性肝病的重要病理过程,已有的研究表明,肝星状细胞(HSC)活化是肝纤维化发生发展的中心环节^[1],TGF- β 是纤维化最重要的促进因子^[2-3],而BAMBI是TGF- β 的假受体^[4],上调其表达可减少TGF- β 对HSC的活化,进而减缓纤维化。慢性肝病常伴随肠源性内毒素血症,内毒素血症与肝纤维化关系密切^[5],内毒素的主要成分是G-细胞壁上的脂多糖(LPS)。LPS是TLR4的配体,其通过HSC细胞TLR4-MYD88-NF- κ B通路抑制BAMBI的表达,进而促进肝纤维化进展^[4]。

大黄廬虫丸是传统活血化瘀的代表方剂,其抗纤维化效果显著,已被写进《肝纤维化中西医结合诊疗指南》^[6],中医药抗纤维化具有“多效、多环节、多靶点”的特点,但大黄廬虫丸是否从TLR4信号转导途径干预肝星状细胞发挥抗纤维化的作用是不完全清楚的。本课题组前期动物试验表明大黄廬虫丸可降低血清LPS,本实验通过研究大黄廬虫丸含药血清对LPS诱导的肝星状细胞TLR4、MyD88、转录因子NF- κ B及BAMBI表达,探讨大黄廬虫丸抗肝纤维化可能的作用机制。

1 实验资料与方法

1.1 动物分组

清洁级Wistar大鼠(制备含药血清和对照血清用),体重250~300g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。本研究符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。含药血清组予大黄廬虫丸提取物灌胃给药,每次0.8mL,持续灌胃7d,2次/d。其中空白对照组给予相应的生理盐水。各组大鼠于末次给药后1h后腹腔注射7%水合氯醛(0.5mL/100g)麻醉,腹主动脉采血,静置2h以上,3000r/min离心15min,分离血清,55℃处理30min,0.22 μ m微孔滤膜过滤,置-20℃保存备用。

1.2 主要试剂

抗TLR4一抗(兔来源)(abcam,美国,ab83444);抗MyD88一抗(兔来源)(abcam,美国,ab131071);抗BAMBI一抗(兔来源)(abcam,美国,ab203070);GAPDH一抗(Abcam,美国);羊抗兔二抗(sigma,美国,41155);山羊血清(Gibco,美国);ECL增强化学发光检测试剂盒(PIERCE,美国);DMEM培养基(Gibco,美国);FBS(Gibco,美国);PIERCE LightShift Chemiluminescent EMSA试剂盒。

1.3 大黄廬虫丸药物的制备

根据《金匱要略》记载大黄廬虫丸的药物组成,将药物粉碎成粗粉,按照临床用药习惯,以10倍量水浸泡1h后加水煮2h,共3次。合并后采用超声提取法,减压浓缩,冷冻干燥得到总提取物粉末。在使用时加生理盐水将上述材料调至所需浓度。

1.4 原代HSC的提取鉴定

Wistar大鼠用10%水合氯醛麻醉,打开腹腔,分离肝脏至大培养皿中,灌注0.05%链酶蛋白酶液100mL和0.025%胶原酶液100mL,收集灌注液,剪碎肝脏,加入DNase I(终浓度40 μ g/mL),消化45min,过滤,滤液低速

离心(200r/min,3min)2次,去除未消化的肝细胞,1200r/min离心7min,弃上清,加入Hanks液,再次离心,获得沉淀的肝NPC。1份生理盐水加入9份的Percoll细胞分离原液,稀释成30%和70%两种浓度各10mL。依次加入1.5mL70%Percoll液(1.097g/mL)、30%(1.045g/mL)和肝NPC悬液,低温离心30min。吸取肝NPC悬液和30%Percoll液、30%Percoll液和70%Percoll液界面之间的细胞,上层为HSC细胞,下面的为枯否细胞。洗涤2遍,以含20%新生小牛血清的DMEM培养液悬浮细胞,台盼蓝染色并计算存活率及细胞数,培养的单层细胞可在带网格的显微镜下计数,分别对生长3d和7d的HSC采用荧光显微镜观察,细胞在325nm波长紫外光的激发下自发绿色荧光。

1.5 含药血清的制备

参照文献报道^[7],选择正常Wistar大鼠,予大黄廬虫丸提取物灌胃,给予正常成人(以体重50kg计)剂量的10倍剂量。每日分2次给药,连续7d,于末次给药后1h采血,严格无菌操作,腹主动脉采血,血样置于10mL离心管,静置2h以上,待血块收缩良好后,3000r/min,15min无菌分离血清,血清以55℃处理30min,用0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌,置-20℃保存备用。空白对照组血清除给予生理盐水代替中药之外,同大黄廬虫丸含药血清制备方法。

1.6 细胞干预

原代肝星状细胞接种至六孔板,待生长融合至70%~80%时,原代HSC细胞分为4组:空白对照组(用20%正常饮食喂养大鼠的血清培养)、含药血清处理组(用20%含药血清培养)、LPS处理组(用20%正常饮食喂养大鼠的血清培养再加入100ng/mL LPS培养)、含药血清和LPS共同处理组(含20%含药血清培养再加入100ng/mL LPS培养)。各组均培养24h后提取蛋白。

1.7 蛋白印迹分析(Western blotting analysis)

按照实验要求收集培养的细胞,提取总蛋白,蛋白浓度测定(BCA法),SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白;电泳完毕后,凝胶上的蛋白质转移约1~3h至恒流200mA的PVDF膜上;转膜,取膜,标记,用5%脱脂牛奶(TBST中清洗1min)封闭液室温封闭2h,加入封闭液(含5%脱脂奶粉的TBST缓冲液)稀释(1:500)的内参一抗(浓度1:1000)温育4℃孵育过夜,TBST清洗3次,每次5min。加入羊抗兔IgG的二抗(浓度1:1000)温育1.5h,TBST清洗4次,每次5min。将ECL曝光液(A液:B液为1:1混匀)均匀覆盖在整片膜上,反应2min放入曝光仪曝光检测。再对结果进行光密度扫描分析。以GAPDH表达水平作为内参蛋白。通过目标蛋白条带灰度与内参蛋白条带灰度的比值来衡量蛋白表达量。

1.8 免疫组化

制备细胞爬片,PBS漂洗2次 \times 2min,4%多聚甲醛固定20min,PBS漂洗3次 \times 2min,0.5%Triton X-100处理20min;PBS漂洗;3% H_2O_2 处理15min,PBS漂洗,山羊血

清室温封闭 60 min,一抗孵育(稀释比 1:400)4℃过夜。阴性对照用 PBS 液代替一抗,PBS 清洗 3 次×5 min,标记的二抗工作液孵育 37℃×30 min,PBS 清洗,碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液 37℃×30 min,PBS 清洗,DAB 显色(镜下观察至棕色)10 min,蒸馏水洗 2 次×5 min。苏木素复染。返蓝。梯度酒精脱水。封片。其结果判定采用免疫组化半定量积分法^[8]。在每张高倍镜照片中随机选取 2 张原代肝星状细胞切片,进行光密度测量、计量其阳性细胞数,初步计算阳性细胞百分率。阳性细胞的选择标准为光镜下细胞膜或细胞浆染色呈高于背景色的黄色至深棕色细胞或间质成分。着色强度积分:着色强度无色为 0 分,淡黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。着色强度积分与数量积分相加:0~1 分为(-),2~3 分为(±),4~5 分为(+),6~7 分为(++),其中(+)和(++)判为阳性。

1.9 电泳迁移率实验(EMSA)

提取核蛋白,使用 PIERCE Light Shift Chemiluminescent EMSA 试剂盒进行凝胶迁移实验,检测 NF-κB 的活性并重复 3 次,探针由上海生物工程生物制品有限公司合成、纯化,NF-κB probe 的序列为 Biotin + 5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3',3'-TCA ACT CCC CTG AAA GGG TCC G-5'+biotin,并在 5 端标记生物素。实验步骤按试剂盒说明书进行。

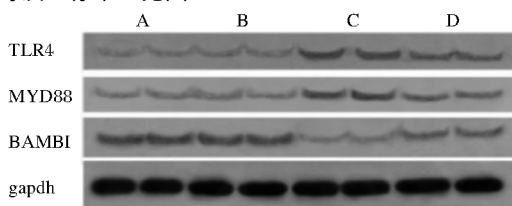
1.10 统计学分析

用 SPSS 20.0 统计分析软件处理。计量资料以均数 $\bar{x} \pm s$ 表示,等级资料采用秩和检验;检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 被认为有统计学差异。

2 结果

2.1 用 Western Blot 法检测大鼠原代 HSC 细胞 TLR4 相关通路蛋白相对表达水平

与空白对照组比较,含药血清处理组 TLR4、MyD88、BAMBI 蛋白表达水平无显著差异;与空白对照组比较,LPS 处理组 TLR4、MyD88 的蛋白表达显著上升($P < 0.05$),BAMBI 蛋白表达下降($P < 0.05$)。与空白对照组比较,含药血清和 LPS 共同处理组的 TLR4、MyD88 的蛋白表达增强,BAMBI 的蛋白表达降低。与 LPS 处理组比较,含药血清和 LPS 共同处理组 TLR4、MyD88 的蛋白表达降低($P < 0.05$),BAMBI 的蛋白的表达上($P < 0.05$)。实验重复 2 次,每次 2 标本。见图 1。



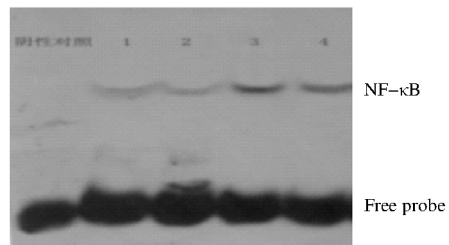
A 为空白对照组;B 为含药血清处理组;C 为 LPS 处理组;D 为含药血清和 LPS 共同处理组。

图 1 WB 检测大鼠原代 HSC 细胞 TLR4、MyD88、BAMBI 蛋白表达

2.2 用免疫组化法检测大鼠原代 HSC 细胞 TLR4 相关通路蛋白表达水平 原代大鼠 HSC 中 TLR4、MyD88、BAMBI 在空白对照组、含药血清处理组、LPS 处理组、含药血清及 LPS 共同处理组中的半定量积分,其中 TLR4 半定量积分分别是(4.5±0.58)、(3.5±1.29)、(6.5±0.58)、(3.0±0.82),MYD88 半定量积分分别是(3.5±0.58)、(2.72±0.96)、(5.75±0.96)、(3.5±1.29),BAMBI 半定量积分分别是(2.25±0.50)、(5.75±0.96)、(2.25±0.50)、(3.50±0.58)。含药血清组的 TLR4、MYD88 的半定量积分明显低于 LPS 处理组(χ^2 分别是 11.090、6.737, P 值分别是 0.004、0.029),BAMBI 的半定量积分明显高于 LPS 处理组($\chi^2 = 6.901, P = 0.029$)。说明大黄廬虫丸可阻断 TLR4 - MYD88 通路的活化。实验重复 2 次,每次 2 标本。见插图 VII 图 2。

2.3 用 EMSA 法检测大鼠原代 HSC 细胞 NF-κB 的活性

大鼠肝 HSC 细胞各组中均有不同程度 NF-κB 活性表达,但 LPS 处理组中 NF-κB 活性较各组显著升高,而 LPS 组加入大黄廬虫丸含药血清后中 NF-κB 活性有所下降。见图 3。



1. 空白对照组;2. 含药血清处理组;3. LPS 处理组;4. 含药血清和 LPS 共同处理组。

图 3 EMSA 法检测原代 HSC NF-κB 的活性

3 讨论

肝纤维化是慢性肝脏疾病的共同病理改变^[9],是肝星状细胞(HSC)激活产生细胞外基质(extracellular matrix, ECM)并且大量沉积的一种病理过程^[10]。HSC 作为肝纤维化发病的关键环节倍受关注^[11-12],它的激活、凋亡受到许多细胞因子及胞内信号转导途径的调节,以 HSC 为靶点的干预治疗逐渐成为抗纤维化的重要方法。

BAMBI 是一种跨膜蛋白,其胞外结构与 TGF-β I 型受体的蛋白序列具有相似性,可与 TGF-β II 型受体形成聚合物,阻滞 TGF-β 的信号传导^[13]。研究者发现由 LPS 调节的肝星状细胞 121 个基因中,仅有一个 LPS 相关的基因—骨成形蛋白-激活素膜结合阻断因子(BAMBI)是明显下调的^[14]。进一步研究显示,当腺病毒感染阴性表达了 BAMBI,模拟了星状细胞中 TLR4 活化后 BAMBI 表达降低的信号,导致 HSC 对 TGF-β 的信号变得更加敏感,说明 BAMBI 下调是内毒素引起纤维化的主要机制。HSC 是 LPS 产生应答的初始细胞^[15],激活的 HSC 表达 TLR4,并且对低浓度的 LPS 有较高的应答^[16-17],由于 LPS 是明确的 TLR4 的配体^[15,18],TLR4 介导的 MyD88 信号通路参与肝组

织的病理反应,其机制为损伤相关分子模式和 LPS 触发了 TLR4 信号^[19]。当 TLR4 与 LPS 结合后,通过 MyD88 - NF - κ B 通路激活 HSC,活化的 HSC 分泌 TGF - β 等重要纤维化因子,同时又分化成为肌成纤维细胞并产生大量的 ECM 累积在肝组织中,最终形成肝纤维化^[20]。因此研究后续研究探讨是否 TLR - MYD88/TRIF - NF - κ B 通路参与调控 BAMBI 表达,他们使用腺病毒表达 I κ B 阻滞剂,阻断 NF - κ B 活化,BAMBI 的下调被完全的抑制了,证实 NF - κ B 的重要性;MyD88 和 TRIF 是 TLR4 信号重要的中介,MYD88 在缺陷的 HSC 中,BAMBI 的下调被完全抑制,而在 TRIF 被抑制后,BAMBI 仍然是下调的,证实 MYD88 是调控 BAMBI 表达的重要中介分子。以此为基础,我们的研究探讨了大黄廬虫丸是否也会阻断 LPS 活化的 TLR4 - MYD88 - NF - κ B 通路而发挥抗纤维化作用。

中医学主要将肝纤维化归类为“积聚”“胁痛”“鼓胀”等,其主要病机为肝血瘀阻,主要治疗以活血化瘀为主。大黄廬虫丸是祖国医学活血化瘀的代表方剂,其抗纤维化作用明确,已有的研究证实大黄廬虫丸对慢性肝病患者肝功能生化、肝纤维化指标、B 超等指标有改善作用^[21-22];此外,李文新等^[23]实验研究发现大黄廬虫丸在大鼠肝纤维化模型中可以调控 TIMP - 1 mRNA 的表达减少,MMP - 1 mRNA 的表达增强,从而达到抗大鼠肝纤维化的作用。

我们在大鼠原代 HSC 的实验发现,大黄廬虫丸含药血清组和空白对照组在 LPS 诱导的 TLR4、MYD88 和转录因子 NF - κ B 的活化以及 BAMBI 的表达无明显差异,说明大黄廬虫丸可能并不直接作用于 HSC,其调节 BAMBI 的表达可能是间接作用。LPS 可以诱导大鼠肝星状细胞 TLR4 的表达,激活下游炎症信号通路,促进下游信号因子 MyD88 的表达,增强 NF - κ B 结合蛋白的活性,降低 BAMBI 表达,大黄廬虫丸含药血清干预后,原代 HSC 细胞 TLR4、MyD88 的表达明显下降,BAMBI 的表达上升,NF - κ B 结合蛋白的活性降低,说明大黄廬虫丸可阻断 LPS 诱导的 BAMBI 的表达降低,进而抑制肝纤维化。这可能是大黄廬虫丸一个新的抗纤维化机制。

参考文献

- [1] Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Compr Physiol, 2013, 3(4): 1473 - 1492.
- [2] Cassiman D, Libbrecht L, Desmet V, et al. Hepatic stellate cell/myofibroblast subpopulations in fibrotic human and rat livers[J]. J Hepatol, 2002, 36(2): 200 - 209.
- [3] Tahashi Y, Matsuzaki K, Date M, et al. Differential regulation of TGF - β signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury[J]. Hepatology, 2002, 35(1): 49 - 61.
- [4] Onichtchouk D, Chen YG, Dösch R, et al. Silencing of TGF - β signalling by the pseudoreceptor BAMBI[J]. Nature, 1999, 401(6752): 480 - 485.
- [5] 陈云,杜建,王玉梅. 慢性乙型肝炎血浆内毒素与肝纤维化指标及肝脏病的关系[J]. 临床肝胆病杂志, 2005, 21(1): 3 - 4.
- [6] 中国中西医结合学会肝病专业委员会. 肝纤维化中西医结合诊疗指南[S]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(11): 866 - 870.
- [7] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 50 - 53.
- [8] 赵彤,朱梅刚,黄宗义,等. 肺癌癌基因蛋白产物同步检测的对比分析[J]. 癌症, 1995(1): 13 - 15.
- [9] Weiskirchen R, Tacke F. Liver fibrosis: From pathogenesis to novel therapies[J]. Digestive diseases, 2016, 34: 410 - 422.
- [10] Xiao L, Christopher B, Sven H, et al. The Mechanism of hepatic stellate cell inactivation during reversal of liver fibrosis[J]. Gastroenterology, 2016, 150(4): S1020 - S1021.
- [11] Bilzer M, Roggel F, Gerbes AL. Role of Kupffer cells in host defense and liver disease[J]. Liver Int, 2010, 26(10): 1175 - 1186.
- [12] Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis[J]. Compr Physiol, 2013, 3(4): 1473 - 1492.
- [13] Friedman SL. A deer in the headlights: BAMBI meets liver fibrosis[J]. Nat Med, 2007, 13(11): 1281 - 1282.
- [14] Shi H, Dong L, Dang X, et al. Effect of chlorogenic acid on LPS - induced proinflammatory signalling in hepatic stellate cells[J]. Inflamm Res, 2013, 62(6): 581 - 587.
- [15] Aoyama T, Paik YH, Seki E. Toll - like receptor signaling and liver fibrosis[J]. Gastroenterol Res Pract, 2010, 2010: 1687 - 6121.
- [16] Brun P, Castagliuolo I, Pinzani M, et al. Exposure to bacterial cell wall products triggers an inflammatory phenotype in hepatic stellate cells[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(3): G571 - G578.
- [17] Muhlbauer M, Weiss TS, Thasler WE, et al. LPS - mediated NF - κ B activation varies between activated human hepatic stellate cells from different donors[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 325(1): 191 - 197.
- [18] Guarner C, Soriano. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2005, 17(1): 27 - 31.
- [19] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. Cytokine, 2008, 42(2): 145 - 151.
- [20] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll - like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. Nat Immunol, 2001, 2(8): 675 - 680.
- [21] 张红星,刘旭东,王朝阳. 大黄廬虫丸联合恩替卡韦治疗慢性乙型肝炎肝硬化疗效观察[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2016(8): 575 - 577.
- [22] 潘志恒,程木华,李林,等. 大黄廬虫丸对慢性肝病核素肝脏功能显像定量分析结果的影响[J]. 第四军医大学学报, 2006(23): 2193 - 2196.
- [23] 李文新,车念聪,王金光,等. 大黄廬虫丸加黄芪、水红花子对拮抗大鼠肝纤维化作用的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(12): 5320 - 5322.

大黄廑虫丸含药血清调控大鼠原代肝星状细胞 BAMB1 表达的研究

(正文见 1088 - 1091 页)

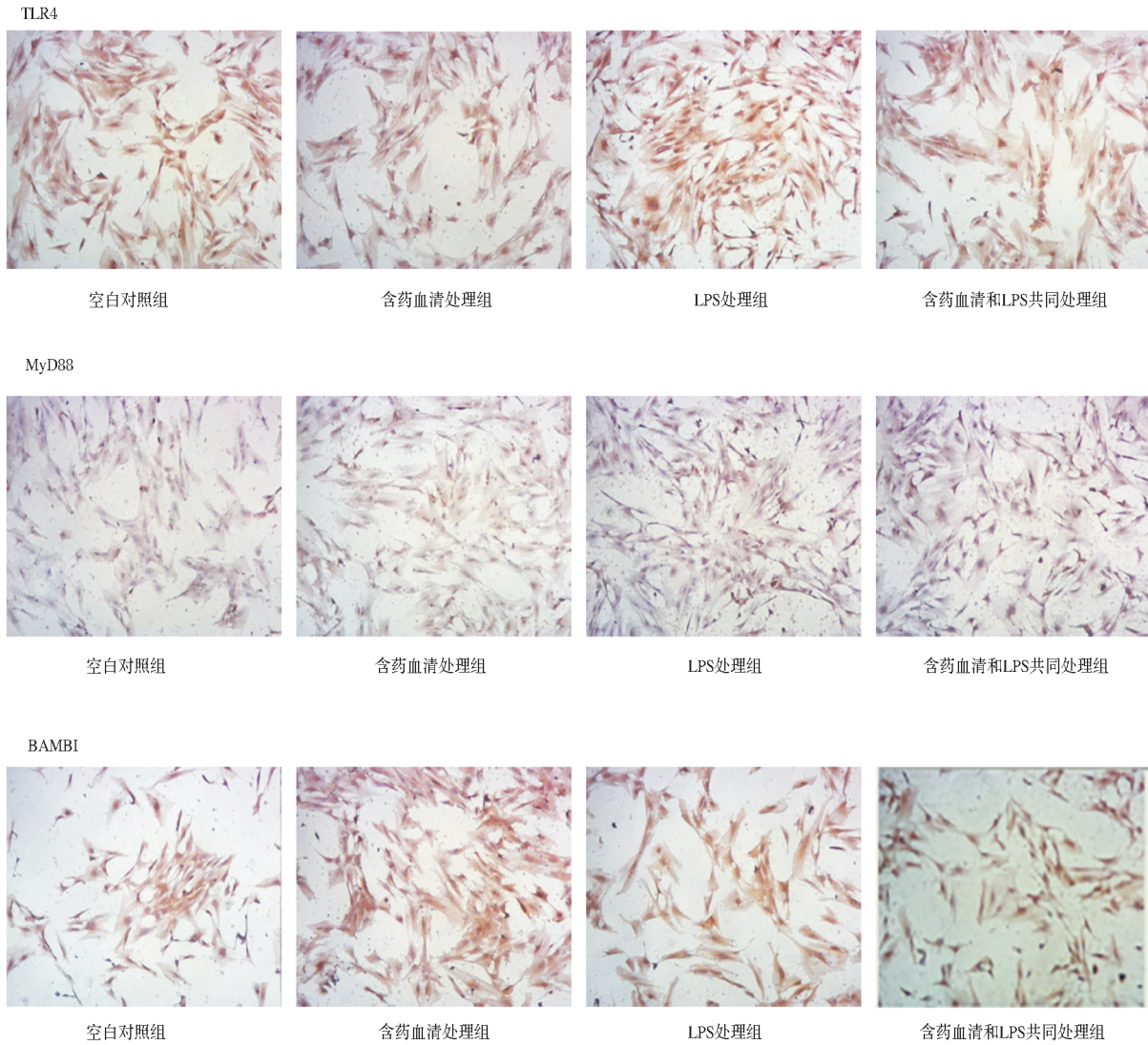


图2 免疫组化检测各组原代肝星状细胞 TLR4、MyD88、BAMB1 的蛋白表达(×100)