

大黄廬虫丸对大鼠原代肝星状细胞 BAMBI 表达的影响*

徐新杰 刘旭东[#] 赵壮志 吕萍

(广西中医药大学附属瑞康医院肝病科 广西 530011)

摘要: 目的 通过检测大鼠原代肝星状细胞(HSC)中骨形成蛋白-激活素膜结合阻断因子(BAMBI)的表达,探讨大黄廬虫丸抑制及逆转肝纤维化的作用机制。**方法** 采用清洁级 Wistar 大鼠,成功复制大鼠肝纤维化模型,分离培养在体大鼠原代 HSC,分为正常组、模型组和大黄廬虫丸组。培养 24 h 后,采用实时荧光定量 PCR 法检测原代 HSC 细胞 Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子 88(MyD88)、BAMBI 的基因表达变化,采用免疫组化、蛋白质印迹法(Western blot)检测原代 HSC 中蛋白的表达变化,采用凝胶电泳迁移率实验(EMSA)检测各组细胞核因子 κ B(NF- κ B)的活性。**结果** 在大鼠原代 HSC 中,与正常组比较,大黄廬虫丸组和模型组 TLR4、MyD88 蛋白及基因的表达增强($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$),BAMBI 蛋白及基因表达降低($P < 0.001$);与模型组比较,大黄廬虫丸组 TLR4、MyD88 蛋白及基因的表达降低($P < 0.05$),BAMBI 蛋白及基因表达增强($P < 0.05$)。EMSA 结果显示:与正常组比较,模型组 HSC 核转录因子 NF- κ B 的活化增强;与模型组比较,大黄廬虫丸组 NF- κ B 的活化受抑制。**结论** 大黄廬虫丸可以改善肝纤维化。其作用机制可能是降低肝星状细胞 TLR4、MyD88 的表达,抑制 HSC 核转录因子 NF- κ B 的活化,进而增加 BAMBI 的表达,降低 HSC 对转化生长因子- β (TGF- β)的敏感性,从而改善肝纤维化。

关键词: 大黄廬虫丸; 原代肝星状细胞; 肝纤维化; 大鼠

中图分类号: R285.5

doi: 10.3969/j.issn.1006-2157.2018.07.008

Influence of *Dahuang Zhechong* Pill on expression of BAMBI in primary hepatic stellate cells in rats*

Xu Xinjie, Liu Xudong[#], Zhao Zhuangzhi, Lyu Ping

(Department of Liver Disease, Ruikang Hospital, Guangxi University of Chinese Medicine, Guangxi 530011, China)

Abstract: Objective To investigate the effective mechanism of *Dahuang Zhechong* (Rhubarb and Dormant Insect) Pill in inhibition and reversion of hepatic fibrosis through detecting the expression of bone morphogenic protein and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) in primary hepatic stellate cells (HSC). **Methods** The model of hepatic fibrosis was established in clean Wistar rats, primary HSC in vivo were isolated and cultured, and then divided into normal group, model group and *Dahuang Zhechong* Pill group. After culturing for 24 h, the genetic expressions of TLR4, MyD88 and BAMBI in HSC were detected by using real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein expressions of HSC were detected by using immunohistochemistry technique and Western blotting assay, and activity of nuclear factor- κ B (NF- κ B) was detected by using electrophoretic mobility shift assay (EMSA). **Results** Compared with normal group, the protein and genetic expressions of

徐新杰,女,在读硕士生

[#] 通信作者: 刘旭东,男,博士,主任医师,硕士生导师,研究方向:中西医结合防治肝纤维化,E-mail: lxdhx@163.com

* 国家自然科学基金资助项目(No. 81473532),广西自然科学基金资助项目(No. 2013GXNSFBA019188),广西八桂学者建设专项经费资助项目

National Natural Science Foundation of China (No. 81473532), Guangxi Natural Science Foundation (No. 2013GXNSFBA019188), Guangxi Ba-Gui Scholars Program Foundation

TLR4 and MyD88 increased ($P < 0.001$), and protein and genetic expressions of BAMBI decreased ($P < 0.001$) in model group. Compared with model group, the protein and genetic expressions of TLR4 and MyD88 decreased ($P < 0.05$), and protein and genetic expressions of BAMBI increased ($P < 0.05$) in *Dahuang Zhechong* Pill group. The protein and genetic expressions of TLR4 and MyD88 were higher ($P < 0.05$), and protein and genetic expression of BAMBI were lower ($P < 0.05$) in *Dahuang Zhechong* Pill group than those in normal group. The results of EMSA showed that the activation of NF- κ B was improved in model group compared with normal group, and was inhibited in *Dahuang Zhechong* Pill group compared with model group. **Conclusion** *Dahuang Zhechong* Pill can relieve hepatic fibrosis, and the effective mechanism may be related to reducing expressions of TLR4 and MyD88, inhibiting activation of NF- κ B and improving expression of BAMBI in HSC, and reducing HSC sensitivity to TGF- β .

Keywords: *Dahuang Zhechong* (Rhubarb and Dormant Insect) Pill; primary hepatic stellate cells; hepatic fibrosis; rats

肝纤维化是各种慢性肝脏疾病的发展导致肝硬化形成的共同病理基础^[1]。肝纤维化特征是以胶原为主的细胞外基质(extracellular matrix, ECM)各成分合成增多、降解相对不足而在肝内过量沉积。而肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)的活化是肝纤维化发生、发展的中心环节。致病因子造成肝星状细胞损伤,引起肝枯否细胞、血小板、肝窦内皮细胞和肝细胞激活,分泌多种细胞因子与某些化学递质共同作用于静止期 HSC,使 HSC 激活,合成大量的细胞外基质^[2],从而形成肝纤维化。目前针对肝纤维化治疗的主要方向是病因治疗,例如通过核苷类似物及干扰素抗病毒来延缓慢性病毒性肝炎进展为肝纤维化及肝硬化^[3]。大黄廬虫丸是中医学活血祛瘀的代表方,被中国中西医结合学会在肝纤维化诊治指南中推荐使用^[4]。抗肝纤维化成为控制慢性肝病进展不可缺少的环节。骨形成蛋白-激活素膜结合阻断因子(BAMBI)是转化生长因子- β (TGF- β)的假受体,肝星状细胞的活化受 Toll 样受体 4(TLR4)通路调节。本文从这个角度在原代肝星状细胞上探索大黄廬虫丸抗肝纤维化机制。

1 材料

1.1 动物

清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重 250 ~ 300 g,11 只,动物合格证号: SCXK(军)2012-0010,购于第三军医大学实验动物中心。

1.2 伦理审查

本研究符合广西中医药大学附属瑞康医院实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准,编号: CLS-EAW-2016-4-2。

1.3 仪器

实时荧光定量 PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);凝胶成像仪稳压 DNA 电泳仪(美国 Tianneng);GDS8000 凝胶扫描系统(美国 UVP 公司);Trans-Blot[®] SD Cell 半干转仪(美国 Bio-Rad 公司);PVDF 膜(美国 Bio-Rad 公司);凝胶电泳迁移率实验(EMSA)试剂盒(PIERCE 公司);PHILIPS TECNAI-10 透射电子显微镜(荷兰飞利浦公司);倒置显微镜、照像系统(OLYMPUS 公司);分光光度仪(上海精密仪器厂)。

1.4 试剂

山羊血清(美国 Hyclone 公司);胎牛血清、M199 培养基(美国 Gibco 公司);MyD88 抗体(美国 Abcam 公司,批号: ab131071);BAMBI 抗体(美国 Abcam 公司,批号: ab203070);TLR4 抗体(美国 Abcam 公司,批号: ab83444);HRP 标记的二抗(美国 Abcam 公司,批号: ab7090);内参-抗(美国 Abcam 公司);二抗:羊抗兔 IgG(美国 sigma 公司,批号: 41155);青霉素-链霉素溶液(碧云天公司);台盼蓝粉末(美国 Sigma 公司);荧光定量 PCR 试剂盒、sybr green I(威斯腾生物公司);一抗: α -SMA(美国 Abcam 公司,批号: ab108424);一抗稀释液、二抗稀释液(碧云天公司);HRP 素标记的二抗(美国 Abcam 公司,批号: ab7090)。

2 方法

2.1 药物制备

根据《金匱要略》记载,大黄廬虫丸的药物由熟大黄、土鳖虫(炒)、水蛭(制)、虻虫(去翅足,炒)、蛭螭(炒)、干漆(煨)、桃仁、苦杏仁(炒)、黄芩、地黄、白芍、甘草组成,其剂量比例为 3.0 : 0.3 : 0.6 :

0.45:0.45:0.3:1.2:1.2:0.6:0.3:1.2:0.9。将上述12味中药药物粉碎成粗粉,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412 g/L,成为大黄廬虫丸提取液。

2.2 分组

模型组大鼠颈背部皮下注射40%四氯化碳花生油混悬液。首次注射5 mL/kg,后每隔3日3 mL/kg皮下注射。第4周末正常组及模型组大鼠各随机处死2只,做病理检测证实肝纤维化形成。为防止肝脏自然对实验结果的影响,于用药后仍每周注射40% CCl₄油剂(3 mL/kg)一次,正常组除外。造模4周后各组分别予以灌胃给药,大黄廬虫丸组给予大黄廬虫丸提取液(成人10倍量0.8 mL/d);正常组和模型组给予生理盐水0.8 mL/d。

2.3 大鼠原代肝星状细胞分离提取方法

2.3.1 分离方法:各组大鼠于用药治疗后6周末,禁食12 h,将大鼠以10%水合氯醛麻醉,常规消毒后打开腹腔,经门静脉插管并肝素化(1 000 U/只)后,连接滴液瓶,剪断下腔静脉放血,快速灌注500 mL D-Hanks液至肝脏变白,流出液清亮。分离肝脏至大培养皿中,继续灌注0.05%链酶蛋白酶液100 mL和0.025%胶原酶液100 mL,每分钟约60滴。收集灌注液于烧杯内,剪碎肝脏剔除肝包膜及大血管后,连同收集的酶液置于磁力搅拌器上,加入DNaseI(终浓度40 mg/L),调整至200 r/min,继续消化45 min,200目钢丝滤网过滤。

2.3.2 洗涤收集:室温条件下滤液离心低速离心(50 g,3 min)1~2次,去除未消化完全的肝细胞,然后以1 200 r/min离心7 min,吸弃上清,加入Hanks液,小心吹打使细胞充分分散悬浮,再按上述条件离心洗涤1~2次,直至上清液较澄清,弃上清液,得到沉淀的肝非实质细胞(non-parenchymal cells, NPC),加20 mL的DMEM培养液充分吹散悬浮细胞。

2.3.3 分离纯化:将1份生理盐水加入9份的Percoll细胞分离原液,然后再稀释成30%和70%两种浓度各10 mL。取7支5 mL的玻璃离心管,依次小心加入约1.5 mL 70% Percoll液(1.097 g/mL)、30%(1.045 g/mL)、和肝NPC悬液,低温离心30 min。分别仔细吸取肝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。加Hanks液按上述条件再洗涤2遍,以含20%新生小

牛血清的DMEM或M199培养液悬浮细胞。

2.4 原代肝星状细胞鉴定

2.4.1 活性的鉴定:活性检测采用台盼蓝染色法。细胞在325 nm波长紫外光的激发下自发绿色荧光。

2.4.2 活化期原代HSC标记 α -SMA的鉴定:细胞用消化液消化后,肝星状细胞在完全培养基外培养细胞密度至 $2 \times 10^7 L^{-1}$,12孔板铺细胞爬片30 min,取出培养皿,PBS漂洗2遍,多聚甲醛固定20 min,PBS漂洗3遍,体积分数0.5% Triton X-100透膜,PBS漂洗3遍,3% H₂O₂处理,PBS漂洗3遍,山羊血清封闭60 min,一抗孵育(稀释比1:50)4℃过夜,PBS清洗3遍,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(湿盒)37℃×30 min,清洗,DAB显色10 min,洗脱,复染,返蓝,梯度酒精脱水,二甲苯透明2次3 min,封胶。显微镜采图。

2.5 观察指标及其方法

2.5.1 实时荧光定量PCR法:以 β -actin为内参基因,引物序列:TLR4上游序列: TGATCTACTCGAGC-CAGAATGAG,下游序列: GTTGGCAGCAATGGCTA-CAC; MyD88上游序列: AGAAATACATACGCAAC-CAGCAG,下游序列: GAAGCGCTCGAAAAGCTCC; BAMI上游序列: AGACATCTGCCGAGCCAAAC,下游序列: CTGGTATCTGTTTCCTTGTCTCTG; β -actin上游序列: CCCATCTATGAGGGTTACGC,下游序列: TTTAATGTCAACGACGATTTTC。用TRIzol法提取原代肝星状细胞总RNA,定量后按试剂盒操作说明反转录酶进行cDNA的合成。荧光定量PCR扩增条件的设置:94℃预变性4 min;94℃变性20 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,共35次循环,72℃检测信号。反应结束后得到各组的目的基因和内参基因的CT值,根据公式: $\Delta CT = \text{目的基因CT} - \text{内参基因CT}$,相对表达量 = $2^{(-\Delta CT)}$,计算各组的相对表达量。

2.5.2 免疫组织化学法:制作细胞爬片,进行组化前处理,经过4%多聚甲醛固定,0.5% TritonX-100处理,3% H₂O₂处理,同时多次PBS漂洗,山羊血清室温封闭60 min,取出甩干封闭液;一抗孵育(稀释比1:50)4℃过夜。阴性对照用PBS液代替一抗,按照免疫组化试剂盒操作进行。DAB显色10 min,苏木素复染,返蓝,各级梯度酒精脱水,封片。结果判定采用免疫组化半定量积分法^[7]。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,阳性细胞数所占

比例 <5% 为 0 分, 5% ~ 25% 为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 75% 为 3 分, >75% 为 4 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 分为 (-), 2 ~ 3 分为 (±), 4 ~ 5 分为 (+), 6 ~ 7 分为 (++) , 其中 (+) 和 (++) 判为阳性。

2.5.3 Western blot 检测: 进行总蛋白的提取, 通过 BCA 法测蛋白浓度, 制备 BSA 标准曲线, 测定检测样品, SDS-PAGE 电泳, 进行转膜, 取膜, 标记, 在 TBST 中清洗 1 min, 用 5% 脱脂牛奶封闭液室温封闭 2 h, 稀释成一定的浓度 (1:500), 内参一抗的稀释终浓度为 1:1 000, 然后温育 4 ℃ 孵育过夜, 用 TBST 清洗 3 次, 5 min/次, 继续稀释 (1:1 000), 然后温育 1.5 h, 用 TBST 清洗 3 次, 5 min/次, 用封闭液将二抗稀释成一定的浓度 (1:1 000), 然后温育 1.5 h, TBST 清洗。曝光, 通过灰度值的比值来表示目的蛋白的相对表达量。计算 TLR4/GAPDH, MyD88/

GAPDH, BAMBI/GAPDH 值。

2.5.4 EMSA 实验: 使用 PIERCE 公司 EMSA 试剂盒进行凝胶迁移实验, 检测 NF-κB 的活性。抽提核蛋白步骤, 探针由上海生物工程生物制品有限公司合成、纯化, NFκb 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。

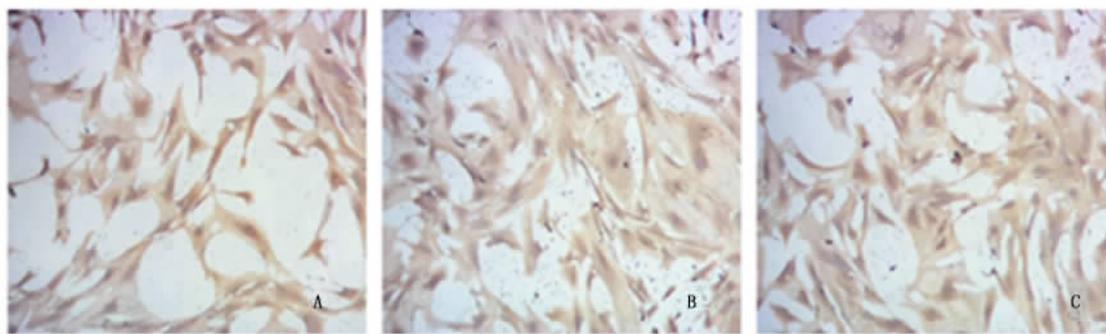
2.6 统计方法

用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学处理。计量数据符合正态分布以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本间比较用单因素方差分析, 2 组间比较方差齐采用 LSD 检验, 等级资料采用 Kruskal-Wallis 检验。检验水准 $\alpha = 0.05, P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 原代肝星状细胞活化期鉴定

α-SMA 蛋白免疫组化染色以细胞浆染成棕褐色或黄色者表明肝星状细胞活化。见图 1。



A: 正常组; B: 模型组; C: 大黄廬虫丸组。
A: normal group; B: model group; C: Dahuang Zhechong Pill group.

图 1 不同组别肝星状细胞活化期鉴定 (×100)

Fig. 1 Identification of HSC activation in different groups (×100)

3.2 实时荧光定量 PCR 法检测原代 HSC 细胞 TLR4、MyD88、BAMBI 的基因相对表达

与正常组比较, 模型组和大鼠廬虫丸组大鼠肝星状细胞中的 TLR4、MyD88 的基因相对表达升高 ($P < 0.05, P < 0.001$), BAMBI 的基因相对表达降

低 ($P < 0.05, P < 0.001$)。与模型组比较, 大黄廬虫丸组大鼠肝星状细胞中 TLR4、MyD88 基因相对表达降低 (P 均 < 0.05), BAMBI 的基因相对表达升高 ($P < 0.05$)。结果见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 检测各组肝星状细胞 TLR4、MyD88、BAMBI 基因表达情况 ($n = 3; \bar{x} \pm s$)

Table 1 Genetic expressions of TLR4, MyD88 and BAMBI in HSC detected by using RT-PCR in all groups ($n = 3; \bar{x} \pm s$)

组别 Group	TLR4	MyD88	BAMBI
正常组 Normal group	0.003 4 ± 0.000 4	0.002 0 ± 0.000 3	0.005 3 ± 0.001 0
模型组 Model group	0.009 9 ± 0.001 4 ^{***}	0.007 1 ± 0.001 0 ^{***}	0.001 6 ± 0.003 0 ^{***}
大黄廬虫丸组 Dahuang Zhechong Pill group	0.005 7 ± 0.000 3 ^{* #}	0.003 2 ± 0.000 5 ^{* #}	0.003 1 ± 0.000 5 ^{* #}
F	40.664	45.255	24.302
P	0.000	0.000	0.001

注: 与正常组比较* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较# $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ compared with normal group; # $P < 0.05$ compared with model group.

3.3 免疫组化法检测各组原代 HSC 中 TLR4、MyD88、BAMBI 蛋白变化

TLR4、MyD88、BAMBI 的阳性表达均为胞浆中褐色颗粒沉积,各组中 HSC 胞浆均有,细胞核周围明显,但各组在阳性细胞数量及染色深浅上有所不同。模型组与正常组比较,TLR4、MyD88 阳性细胞数量较多,颜色稍深。BAMBI 阳性细胞数量较少,

颜色较浅;大黄廬虫丸组和模型组比较,TLR4、MyD88 阳性细胞数量较少,颜色稍浅。BAMBI 阳性细胞数量稍多,颜色较深。正常组、模型组和大黄廬虫丸组的 TLR4、MyD88、BAMBI 的 χ^2 分别是 11.000、8.800、8.733, P 值分别是 0.004、0.012、0.013,各组各蛋白的表达具有差异。见表 2、图 2。

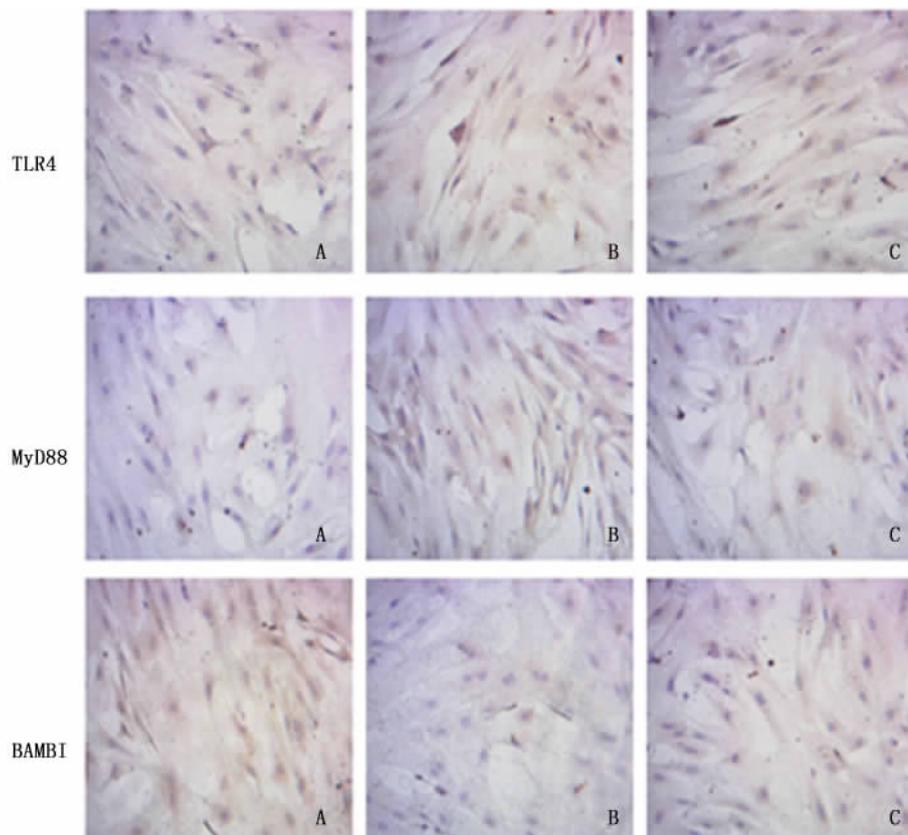
表 2 免疫组化法检测各组肝星状细胞 TLR4、MyD88、BAMBI 蛋白表达情况($n=4$)

Table 2 Protein expressions of TLR4, MyD88 and BAMBI in HSC detected by using immunohistochemistry technique in all groups($n=4$)

组别 Group	TLR4 半定量				Myd88 半定量				BAMBI 半定量			
	TLR4 semi-quantitative				Myd88 semi-quantitative				BAMBI semi-quantitative			
	-	±	+	++	-	±	+	++	-	±	+	++
正常组 Normal group	2	2	0	0	0	3	1	0	0	0	0	4
模型组 Model group	0	0	0	4	0	0	0	4	1	3	0	0
大黄廬虫丸组 <i>Dahuang Zhechong Pill group</i>	0	2	2	0	0	0	3	1	0	2	2	0
χ^2	11.000				8.800				8.733			
P	0.004				0.012				0.013			

注:着色强度积分与数量积分相加,0分为(-),2~3分为(±),4~5分为(+),6~7分为(++).

Note: Color intensity integrals plus quantity integrals: 0: (-), 2-3: (±), 4-5: (+), 6-7: (++) .



A: 正常组; B: 模型组; C: 大黄廬虫丸组。

A: normal group; B: model group; C: *Dahuang Zhechong Pill group*.

图 2 免疫组化法检测各组原代 HSC 中 TLR4、MyD88、BAMBI 蛋白变化($\times 200$)

Fig. 2 Protein changes of TLR4, MyD88 and BAMBI in HSC detected by using immunohistochemistry technique in all groups($\times 200$)

3.4 Western blot 法检测原代 HSC 中 TLR4、MyD88、BAMBI 蛋白变化

与正常组相比,模型组和大黄廬虫丸组肝星状细胞 TLR4、MyD88 的蛋白表达增强 (P 均 < 0.001),

BAMBI 的蛋白表达降低 ($P < 0.001$)。与模型组相比,大黄廬虫丸组中 TLR4、MyD88 的蛋白表达降低 (P 均 < 0.001),BAMBI 的蛋白表达增强 ($P < 0.001$)。实验重复 3 次,每次 2 标本。结果见表 3、图 3。

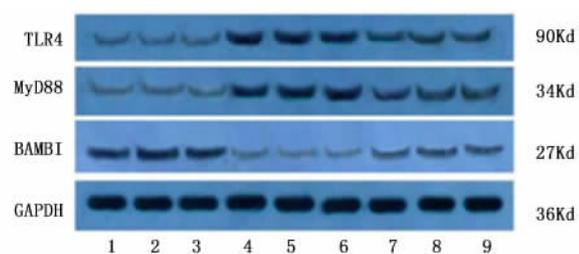
表 3 Western blot 法检测各组 TLR4、MyD88、BAMBI 光密度的相对比值 ($n = 6; \bar{x} \pm s$)

Table 3 Relative ratio of optical density of TLR4, MyD88 and BAMBI detected by Western blotting assay in all groups ($n = 6; \bar{x} \pm s$)

组别 Group	TLR4	MyD88	BAMBI
正常组 Normal group	0.079 ± 0.003	0.082 ± 0.001	0.220 ± 0.003
模型组 Model group	0.219 ± 0.006 ***	0.214 ± 0.005 ***	0.083 ± 0.004 ***
大黄廬虫丸组 <i>Dahuang Zhechong Pill group</i>	0.150 ± 0.002 *** ###	0.149 ± 0.003 *** ###	0.147 ± 0.006 *** ###
<i>F</i>	857.398	1 138.701	792.690
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

注:与正常组比较*** $P < 0.001$;与模型组比较### $P < 0.001$ 。

Note: *** $P < 0.001$ compared with normal group; ### $P < 0.001$ compared with model group.



1、2、3: 正常组; 4、5、6: 模型组; 7、8、9: 大黄廬虫丸组。

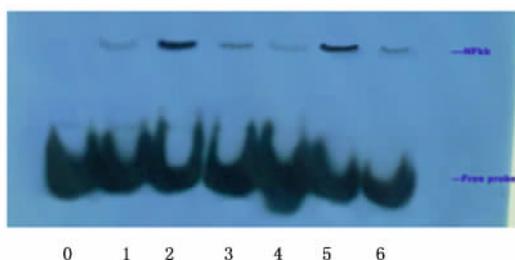
1, 2, 3: normal group; 4, 5, 6: model group; 7, 8, 9: *Dahuang Zhechong Pill group*.

图 3 Western blot 法检测各组 TLR4、MyD88、BAMBI 相关蛋白的表达

Fig. 3 Protein expressions of TLR4, MyD88 and BAMBI detected by using Western blotting assay in all groups

3.5 EMSA 法检测原代 HSC 细胞中 NF- κ B 活性

原代 HSC 各组中均有不同程度 NF- κ B 活性表达。与正常组比较,模型组中 NF- κ B 活性显著升高,大黄廬虫丸组中 NF- κ B 活性略有升高;与模型组相比较,大黄廬虫丸组中 NF- κ B 活性下降。见图 4。



0: 阴性; 1、4: 正常组; 2、5: 模型组; 3、6: 大黄廬虫丸组。

0: negative; 1, 4: normal group; 2, 5: model group; 3, 6: *Dahuang Zhechong Pill group*.

图 4 EMSA 检测大鼠 NF- κ B 蛋白活性比较

Fig. 4 Comparison in NF- κ B protein activity detected by using EMSA in rats

4 讨论

肝纤维化是肝脏受到慢性损伤时,大量的炎症细胞因子及生物活性物质共同参与的病理生理过程^[5]。正常情况下肠黏膜可允许少量内毒素通过进入门静脉,当肝脏发生严重病变如肝硬化,对内毒素的处理能力下降时,则会导致大量的 LPS 进入肝脏。Manigold 等^[6] 研究发现肝硬化患者 TLR4 与 LPS 交联调控可能参与了系统性低反应性的发生,从而加重肝硬化。多项研究表明,在激活的 HSC 中存在着完整的 TLR4 信号通路,LPS 是 TLR4 的外源性配体,而 LPS 通过激活 HSC 表面的 TLR4,从而诱导炎症细胞因子的表达,启动了肝纤维化的发生^[7]。我们前期研究^[8] 发现大黄廬虫丸可抑制肝纤维化大鼠内毒素血症。这可能是大黄廬虫丸抗肝纤维化的一个原因。目前研究表明,TLR4 信号通路在肝纤维化的发展中发挥了重要作用,HSC 在静止和活化状态下均表达 TLR4,而活化状态下的 HSC 则表达完整的 TLR4 信号通路^[9-10]。

骨成形蛋白-激活素膜结合阻断因子(BAMBI)是一种横跨膜的功能型糖蛋白^[11],BAMBI 的蛋白构造与 TGF 超家族的 I 型受体(TGF- β RI/BMP-RI)的结构类似^[11-12],因此被认为是 TGF- β 信号通路的假受体。转化生长因子- β (TGF- β) 是原代肝星状细胞活化最主要的因子,对调节生长和分化至关重要。Onichtchouk D 等^[11] 研究发现 BAMBI 对 TGF- β 信号的抑制作用主要是与细胞内结构域介导有关,BAMBI 结构类似于 I 型受体的同源二聚化界面,能阻止其受体复合物的形成,其研究表明,BAMBI 通过信号受体与假受体相互作用的调控机制负调节 TGF- β 家族信号传导。Liu C 等^[13] 证明 BAMBI 主

要在 HSC 中表达,而不是枯否细胞和肝细胞。BAMBI 表达的缺失可以增强纤维化信号。因此, BAMBI 在肝脏炎症和纤维发生中起作用。

大黄廬虫丸出自汉代医家张仲景的《金匱要略·血痹虚带病脉症并治》:“五劳虚极羸瘦,腹满不能饮食,食伤、忧伤、饮伤、房室伤,经络营卫气伤,内有干血,肌肤甲错,两目黯黑。缓中补虚,大黄廬虫丸主之。”具有活血祛瘀、益气养阴、清热祛湿、泻下通腑的功效,达到攻补兼施,扶正不留瘀,祛瘀不伤正的作用,即《金匱心典》“润以濡其干,虫以动其瘀,通以去其闭”之意,切合肝纤维化形成的病机。大量的临床研究结果表明^[14-15],大黄廬虫丸联合核苷酸类似物治疗慢性乙型肝炎不仅改善 HA、LN、PCⅢ等纤维化指标,也在改善 ALT 方面优于单用核苷酸类似物,现在大黄廬虫丸在临床广泛应用于肝纤维化的治疗。

本实验从基因和蛋白水平研究结果表明肝纤维化模型组 TLR4、MyD88 表达上调, HSC 核转录因子 NF- κ B 的活化, BAMBI 表达受抑制。大黄廬虫丸干预后,肝星状细胞 TLR4、MyD88 的表达明显下降, HSC 核转录因子 NF- κ B 的活化受抑制, BAMBI 的表达明显上升。因此,推测大黄廬虫丸可能通过下调肝纤维化大鼠肝星状细胞内 TLR4、MyD88 蛋白和基因的表达,抑制 HSC 核转录因子 NF- κ B 的活化,上调假受体 BAMBI 表达,降低 HSC 对 TGF- β 的敏感性,从而改善肝纤维化。

参考文献:

- [1] Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis [J]. ClinInvest, 2005, 115(2): 209-218.
- [2] Puche JE, Saiman Y, Friedman SL. Hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. Compr Physiol, 2013, 3(4): 1473-1492.
- [3] Schuppan D, Pinzani M. Anti-fibrotic therapy: lost in translation? [J]. Hepatol, 2012, 56(1): 66-74.
- [4] 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 [J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(11): 866-870.
Liver Diseases Committee, Chinese Association of Integrative Medicine. Guideline for the diagnosis and treatment of liver fibrosis in integrative medicine practice [J]. Chinese Journal of Hepatology, 2006, 14(11): 866-870.
- [5] 王海兰, 何娟, 曹文富, 等. 川芎含药血清对肝星状细胞 Toll 样受体 4 及下游信号因子 MyD88 表达的影响 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(11): 2191-2194.
Wang HL, He J, Cao WF, et al. Effect of Ligusticum wallichii-containing serum on expressions of Toll-like receptor 4 and myeloid differentiation factor 88 in hepatic stellate cells [J]. Chinese Journal of China Materia Medica, 2015, 40(11): 2191-2194.
- [6] Manigold T, Bocker U, Hanck C, et al. Differential expression of Toll-like receptors 2 and 4 in patients with liver cirrhosis [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2003, 15(3): 275-282.
- [7] Paik YH, Schwabe RF, Bataller R, et al. Toll-like receptor 4 mediates inflammatory signaling by bacterial lipopolysaccharide in human hepatic stellate cells [J]. Hepatology, 2003, 37(5): 1043-1055.
- [8] 刘旭东, 赵晓芳, 唐艳芳, 等. 大黄廬虫丸对肝纤维化大鼠内毒素血症的影响 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(9): 2091-2093.
Liu XD, Zhao XF, Tang YF, et al. Effect of Dahuang Zhechong Pills on endotoxemia in rats with hepatic fibrosis [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2017, 28(9): 2091-2093.
- [9] Zhu Q, Zou L, Jagavelu K, et al. Intestinal decontamination inhibits TLR4 dependent fibronectin-mediated cross-talk between stellate cells and endothelial cells in liver fibrosis in mice [J]. Hepatol, 2012, 56(4): 893-899.
- [10] Guo J, Loke J, Zheng F, et al. Functional linkage of cirrhosis-predictive single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptor 4 to hepatic stellate cell responses [J]. Hepatology, 2009, 49(3): 960-968.
- [11] Onichtchouk D, Chen YG, Dosch R, et al. Silencing of TGF- β signalling by the pseudoreceptor BAMBI [J]. Nature, 1999, 401(6752): 480-485.
- [12] Knight C, Simmons D, Gu TT, et al. Cloning, characterization, and tissue expression pattern of mouse Nma/BAMBI during odontogenesis [J]. DentRes, 2001, 80(10): 1895-1902.
- [13] Liu C, Chen X, Yang L, et al. Transcriptional repression of the transforming growth factor beta (TGF- β) Pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor (BAMBI) by Nuclear Factor kappaB (NF- κ B) p50 enhances TGF- β signaling in hepatic stellate cells [J]. J Biol Chem, 2014, 289(10): 7082-7091.
- [14] 梁小力. 大黄廬虫丸治疗病毒性肝炎肝硬化临床观察 [J]. 中外医疗, 2009, 28(11): 129-130.
Liang XL. Curative effect of Dahuang Zhechong Pill on liver cirrhosis of viral hepatitis [J]. China Foreign Medical Treatment, 2009, 28(11): 129-130.
- [15] 李太平. 拉米夫定联合大黄廬虫丸治疗乙型病毒性肝炎肝硬化的疗效观察 [J]. 临床荟萃, 2008, 23(8): 588-589.
Li TP. Curative effect of lamivudine combined with Dahuang Zhechong Pill on liver cirrhosis of viral hepatitis B [J]. Clinical Focus, 2008, 23(8): 588-589.

(收稿日期: 2018-01-02)