

杏苑之星

清肝活血方和拆方对脂多糖介导库普弗细胞活化的调控作用研究

季光¹ 王淼¹ 龙爱华¹ 刘成海²

1. 上海中医药大学附属龙华医院脂肪肝研究室 (上海 200032)

2. 上海中医药大学肝病研究所 (上海 201203)

【摘要】目的 探讨脂多糖(LPS)介导库普弗细胞(KC)活化的功能变化及清肝活血方和拆方对其调节作用。方法 原代分离 KC,筛选 LPS 最适剂量和最佳作用时间;制备清肝活血方及其拆方含药血清,以 ELISA、Western blot 方法检测清肝活血方及其拆方含药血清对 LPS 激活 KC 表达 TNF- α、ERK1/2 和激活蛋白 1(AP-1)的影响。结果 正常培养的 KC 在加入 LPS 后,TNF- α 蛋白在 2 h 开始明显增加,6h 到达峰值;1mg/L 刺激分泌到达峰值,P- ERK 表达明显增加。清肝方通过抑制 P- ERK 来调节核因子 AP- 1 的表达;活血方下调 P- ERK,抑制效应产物 TNF- α 的表达;清肝活血方可以抑制 P- ERK,抑制核因子 AP- 1 的表达。结论 清肝活血方及其拆方含药血清通过影响 ERK 信号通路,抑制效应因子 TNF- α 的产生,从而起到保护肝细胞的作用。

【关键词】清肝活血方;拆方;药理学;库普弗细胞;信号转导

【中图分类号】R285.5 【文献标识码】A 【文章编号】1007- 1334(2007)01- 0018- 04

Regulative Effects of “Qinggan Huoxue Recipe” and Its Separated Recipes on Kupffer Cells Mediated by LPS

Ji Guang¹ WANG Miao¹ LONG Ai-Hua¹ LIU Cheng-hai²

1. Laboratory of Fatty Liver Disease, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine

2. Institute of Hepatopathy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine

Abstract:

Objective To investigate the regulative effects of “Qinggan Huoxue Recipe” and its separated recipes on ERK signaling pathway in activation of Kupffer cells mediated by LPS. Methods Kupffer cells were isolated from the liver of male Wistar rats by in situ perfusion with collagenase and Nycondenz density-gradient centrifugation, and were stimulated with LPS in different doses at different time to observe the expression of TNF- α. The drug serum of “Qinggan Huoxue Recipe” and its separated recipes were prepared and added to the medium. The levels of expression of TNF- α were evaluated by ELISA. Western blot analysis were performed to detect protein expression of ERK1/2 and AP- 1. Results The protein expression of TNF- α began increasing after LPS was added to the medium 2 hours and reached its peak 6 hours later with the dose of 1 mg/L. “Qinggan Recipe” could inhibit the phosphorylation of ERK to regulate the expression of nuclear factor AP- 1. “Huoxue Recipe” could inhibit the expression of TNF- a by down-regulating the levels of phosphorylated ERK. In a similar manner, “Qinggan Huoxue Recipe” could inhibit phosphorylation of ERK and weaken expression of AP- 1. Conclusion The drug serum of “Qinggan Huoxue Recipe” and its separated recipes exhibit multiple effects on a series of molecular events in KC that acted via ERK signaling pathway, regulating abnormal functional state of cytokines network and suppressing the production of TNF- α, thus to protect hepatocytes from damage.

Key Words:

“Qinggan Huoxue Recipe”; separated recipe; pharmacology; Kupffer cells; signal transduction

在酒精性肝病(Alcoholic Liver Disease, ALD)的发病机制中,内毒素-库普弗细胞(lipopolysaccharide- Kupffer cell, LPS- KC)的作用机制受到诸多学者的重视。酒精的摄入能增加脂多糖(LPS)刺激的细胞外受体活性激酶 1/2 (extracellular signal regulated protein kinase, ERK1/2)的活

性,促进早期生长反应因子 1(early growth response 1, Egr- 1) 的表达,并使 Egr- 1 与肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor α, TNF- α)启动子结合力增加,从而增加 TNF- α 表达^[1-2]。库普弗细胞经 LPS 刺激后,可通过膜受体 CD14 (soluble CD14, sCD14)、Toll 样受体 4(Toll like receptor, TLR4),经 ERK1/2 信号转导诱导 TNF- α 释放,从而产生肝损伤^[3-5]。既往研究证实^[6-7],清肝活血方能拮抗乙醇引起的大鼠肝脏脂质过氧化损害,调节免疫活性因子。本研究拟从对细胞信号转导调控的角度,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30572380)

[作者简介] 季光(1968-),男,江苏张家港人,博士,主任医师,博士生导师,主要从事中医肝病的临床和科研工作。

探讨清肝活血方及其拆方作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 雄性大鼠,上海中医药大学实验动物中心提供,SPF 级,体重 300~350 g,普通饲料喂养,自由饮水。

1.2 实验药物 清肝活血方(柴胡、黄芩、丹参、鳖甲、葛根)、清肝方(柴胡、黄芩)、活血方(丹参、鳖甲、葛根)由本院制剂室按水煎醇沉方法提取,分别浓缩至含生药 2.14 g/ml、1.34 g/ml、1.95 g/ml。

1.3 主要试剂 链酶蛋白酶、IV型胶原酶、latex beads 颗粒、脂多糖、nuclei EZ prep nuclei isolation kit 蛋白提取试剂盒, sigma 公司;无钙 MEM、DMEM 培养基,上海汉尼生物公司;Nycodenz,挪威 AXIS-SHIELD 公司;I 型 DNA 酶、小牛血清,华美生物工程公司;CD-14 多克隆抗体,博士德公司;TLR4 多克隆抗体、激活蛋白 1 (AP-1) c-FOS 亚基多克隆抗体、单克隆小鼠抗大鼠磷酸化 ERK 抗体 (E-4)、多克隆兔抗大鼠 ERK1 抗体 (Rabbit polyclonal IgG)(C-16), Santa Cruz Biotechnology 公司;蛋白浓度测定试剂盒,碧云天公司;ELISA 试剂盒, Biosource 公司;LDH 检测试剂盒,南京建成生物工程研究所产品。其余试剂均为国产或进口分析纯。

1.4 KC 分离 SD 雄性大鼠,体重 300~350 g,常规麻醉,以蛋白酶、胶原酶灌注,同时剪断下腔静脉放血,剥离肝包膜制成细胞悬液。150 目网筛过滤,加 Dnase 酶将滤液振荡,离心 2 次沉淀。加适量含 20%新生小牛血清的 DMEM,调整细胞浓度为 1×10^7 个/ml。

1.5 KC 的培养、鉴定 将细胞接种于 12 孔细胞培养板上,37℃,5%CO₂ 培养箱中培养 60 min,弃去未贴壁细胞。培养 8 h 后换液。培养的 KC 加入 40 μl 的 latex beads 颗粒,2 h 后用含 10%小牛血清的 DMEM 冲洗,显微镜下观察并摄像。

1.6 含药血清制备 SD 雄性大白鼠,体重 300 g,将清肝活血方、清肝方、活血方,按临床成人单位体重 10 倍的剂量分别给大鼠灌胃,连续 3 d,2 次/d,在末次灌胃 1 h 后从腹腔静脉取血,3 000 rpm 离心 10 min,无菌分离血清后,56℃ 30 min 灭活,0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,-20℃冰箱保存。

1.7 分组与用药 KC 培养 48 h,用含 10%小牛血清的 DMEM 换液,同时加入 LPS,终浓度为 5 mg/L、1 mg/L、100 μg/L、50 μg/L、10 μg/L,1 h 后收集上清和细胞,ELISA 法测定 TNF-α。一定浓度的 LPS,时间点设为 15 min、30 min、1 h、3 h、6 h、12 h,观察不同作用时间对

TNF-α 蛋白的影响。将原代培养 KC 分成清肝活血方、清肝方、活血方含药血清组、模型组及正常对照组,以一定的 LPS 浓度作用一定时间激活 KC,观察对 TNF-α 的影响。

1.8 Western blot 法检测 P-ERK 按照 nuclei EZ prep nuclei isolation kit 说明进行。培养皿中先加入 nuclei EZ lysis buffer,收入 1.5 ml 离心管中,混匀,冰上静置 5 min。碧云天试剂盒测定蛋白浓度。

1.9 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS11.0 统计软件处理,用 ANOVA 法进行分析。

2 结果

2.1 细胞鉴定 分离后细胞台盼蓝染色,显示细胞活性大于 95%,latex beads 颗粒鉴别,Kupffer 细胞纯度大于 90%(图 1,图 2)。

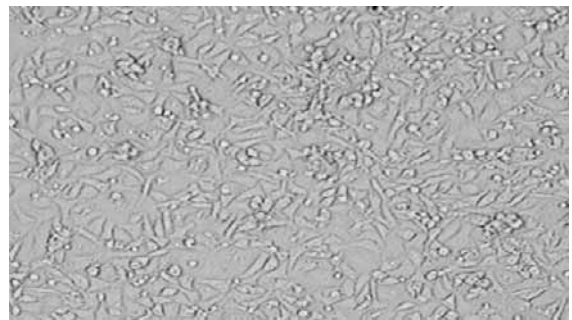


图 1 分离 24 h 的 KC(×400)

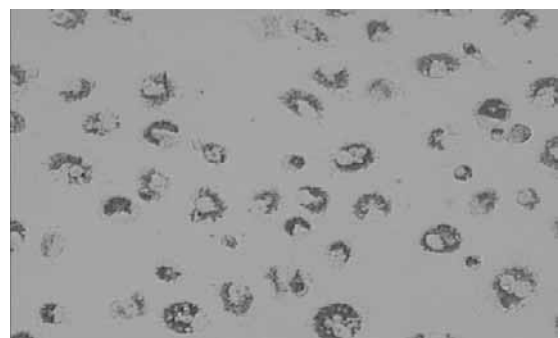


图 2 KC 吞噬 latex beads 颗粒(×400)

2.2 LPS 不同剂量对 KC 表达 TNF-α 的影响 加入不同剂量 LPS 刺激 KC 1 h。随着 LPS 剂量的加大,TNF-α 蛋白的分泌量呈现增加趋势,50 μg/L 开始明显增加($P < 0.01$),1 mg/L 到达峰值 ($P < 0.01$),1 mg/L 与 100 μg/L 比较分泌量无明显差异 ($P > 0.05$),5 mg/L 时分泌量下降($P < 0.01$)(表 1)。

表 1 LPS 不同剂量对 KC 表达 TNF-α 的影响(̄x±s, pg/g)

组别	n	TNF-α(校正值)
5mg/L 组	6	273.77±6.47***
1mg/L 组	6	333.79±6.66**
100 μg/L 组	6	325.83±6.46**
50 μg/L 组	6	220.77±6.74***
10 μg/L 组	6	134.12±2.86***
正常组	6	114.99±4.59

注:与正常组比较,**P<0.01;与 100 μg/L 组比较,##P<0.01。

2.3 LPS 不同时点对 KC 表达 TNF-α 的影响 加入 LPS(100 μg/L),分别于 30 min、1h、2 h、3 h、6 h 及 12 h,观察培养上清液中 TNF-α 的表达。ELISA 法检测显示,随着时间的延长,TNF-α 蛋白的分泌量呈现增加趋势,2 h 开始明显增加(P<0.01),6h 到达峰值(P<0.01),12 h 分泌下降(P<0.01)。2 h 与 3 h 分泌量无明显差异(P>0.05)(表 2)。

表 2 LPS 不同时点对 KC 分泌 TNF-α 蛋白的影响(̄x±s, pg/g)

组别	n	TNF-α(校正值)
正常组	6	261.21±4.44
15 min 组	6	279.73±4.48###
30 min 组	6	303.97±0.68###
1h 组	6	287.07±1.89###
2h 组	6	656.62±0.24**
3h 组	6	759.80±3.93**
6h 组	6	948.19±6.75***
12h 组	6	591.56±9.42***

注:与正常组比较,**P<0.01;与 2 h 组比较,###P<0.01。

2.4 清肝活血方及其拆方对 KC 表达 TNF-α 的影响 将 LPS(100 μg/L)加入原代培养 KC 中,同时分别加入浓度为 5%的清肝方、活血方、清肝活血方含药血清,共同孵育 2 h。结果显示,正常组有少量 TNF-α 蛋白表达,模型组表达量明显增高(P<0.01),清肝方组与模型组比较无明显差异(P>0.05),活血方组表达量减少最明显(P<0.01),清肝活血方组次之(P<0.01)(表 3)。

表 3 清肝活血方及其拆方对 KC TNF-α 表达的影响(̄x±s, pg/g)

组别	n	TNF-α(校正值)
正常组	6	176.54±63.50###
模型组	6	5317.17±574.04**
清肝方组	6	4646.32±544.71**
活血方组	6	3398.75±87.94***
清肝活血方组	6	3774.38±33.18***

注:与正常组比较,**P<0.01;与模型组比较,##P<0.01。

2.5 清肝活血方及其拆方对 KC 表达 P-ERK/ERK 的影响 将正常大鼠血清及清肝方、活血方、清肝活血方含药血清分别加入原代分离 KC 中,同时加入浓度为

100 μg/L 的 LPS 共同孵育 2 h。结果显示:正常组有少量 P-ERK1/2 蛋白表达,模型组 P-ERK1/2 表达明显,活血方组 P-ERK1/2 表达量抑制最明显,清肝方组、清肝活血方组效果次之(图 3,图 4)。

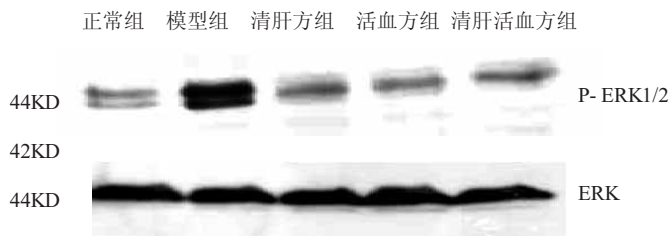


图 3 LPS 激活 KC 后各组 P-ERK/ERK 蛋白含量表达

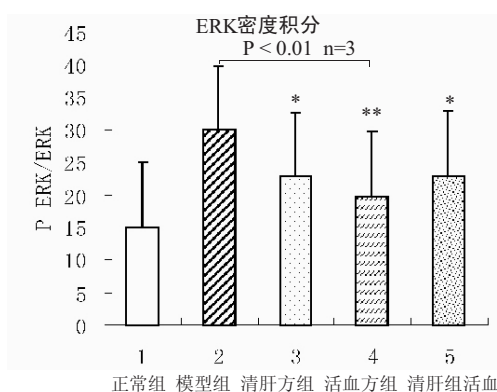


图 4 各组 P-ERK/ERK 蛋白含量的表达

注:Western 印迹法,图像半定量分析。与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

2.6 清肝活血方及其拆方对 KC 表达 AP-1 的影响 经 LPS 刺激后,原代 KC 的核蛋白 AP-1 表达明显增多。加入清肝方、活血方、清肝活血方含药血清共同孵育 2h,正常组有少量 AP-1 核蛋白表达,清肝活血方组 AP-1 表达抑制最明显,清肝方组效果次之,活血方组对 AP-1 作用不明显(图 5,图 6)。

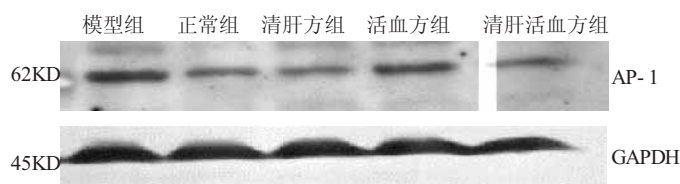


图 5 各组 LPS 激活 KC 后 AP-1 蛋白含量表达

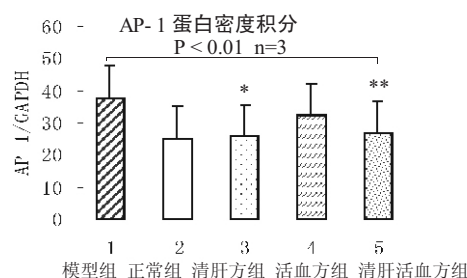


图 6 各组 AP-1 蛋白含量的表达

注:Western 印迹法,图像半定量分析。与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

3 讨论

中医学认为酒为水谷之精气,其气剽悍,乃湿热之品,味甘、苦、辛,性温、有毒,入心、肝、肺、胃经。本课题组前期 ALD 患者主要病理要素的临床流行病学调查发现^[9]，“湿热”与“瘀血”是本病发病过程中的主要病理症结,治疗宜清肝利湿、活血化痰并用,确立了清肝活血方,并针对“湿热”与“瘀血”将清肝活血方拆方为清肝方和活血方。

长期过量饮酒是 ALD 的主要原因,但许多嗜酒者发生脂肪肝而没有其他的并发症,有 30% 的大量饮酒者成为肝硬化。种种迹象显示,从脂肪变性进展到更严重的肝病可能需要其他刺激或危险因子的参与。这其中酒精性肝损伤时伴发的内毒素血症被认为在酒精性肝病的发生、发展及预后转归中起着重要作用。许多动物实验及临床研究均证实,内毒素在嗜酒者和实验动物模型的血液中是升高的,其可引起大量细胞因子的释放,加重对肝细胞的损伤^[10]。

酒精的摄入使肠黏膜通透性增加,肠细菌移位导致肠源性内毒素血症,可致使炎症细胞对炎症刺激过度反应,产生大量的炎症介质、细胞因子,造成肝细胞损伤,也激活肝内的 KC^[11]。KC 是肝内定居的巨噬细胞,约占肝脏细胞总量的 15%,占人体单核巨噬细胞的 80%~90%。KC 在内毒素所致的肝损害中有双重作用,一方面它能清除内毒素,另一方面又可被内毒素激活,通过多种途径,对肝脏造成损害。研究发现^[12],KC 经其特异性抑制剂氯化钆(GdCl₃)处理后,同对照组相比其肝损害明显改善,肝组织病理也有明显改善,大鼠对酒精的耐受提高 2~3 倍,可在很大程度上阻断 ALD 的发生,阻断内毒素的信号转导,减轻酒精引起的肝损伤,显示了 KC 在 ALD 发病中起重要作用。

酒精的摄入能增加内毒素刺激的细胞外受体活性激酶 1/2 (ERK1/2) 的活性,增加 TNF- α 表达。提示 TNF- α 释放与 ERK1/2 活化密切相关。ERK1/2 信号转导通路参与了 LPS 诱导的 TNF- α 释放,并在其中起着重要作用。ERK 通路、NF- κ B 和 AP-1 的活化均可导致炎症因子如 TNF- α 、白介素 6(interleukin-6, IL-6) 和黏附分子等的大量表达,细胞黏附分子和细胞因子受体表达也增加,多种细胞因子和炎症介质可引起肝细胞坏死、凋亡、炎症和肝纤维化形成^[13]。总之,肠源性内毒素血症及其对 KC 的激活在 ALD 的发病中起着重要作用,调节 LPS 激活 KC 的信号转导过程可能是治疗 ALD

的一个重要环节。

本实验研究结果显示:清肝方含药血清是通过调控 P-ERK 环节来发挥作用的;活血方含药血清通过调控 P-ERK、核因子 AP-1 环节,抑制了 TNF- α 的产生;清肝活血方含药血清是通过调控 P-ERK、核因子 AP-1 来发挥作用,从而抑制 TNF- α 的产生。清肝活血方及其拆方含药血清通过影响 ERK 信号通路的多环节来发挥药物作用,其作用机理是调节细胞因子网络的异常功能状态,抑制 TNF- α 的产生,从而起到保护肝细胞的作用。拆方研究结果表明:清肝活血方全方清肝、活血并用,加强了对核因子 AP-1 的调控效果,但在对磷酸化 ERK 调控及抑制效应产物 TNF- α 方面不如活血方。基于此,我们在今后的工作中可以进一步筛选药物,精简方药,以便发现药物的新成分和有效成分,进而为开发新药奠定基础。

参考文献:

- [1] Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade[J]. FASEB J, 1995, 9(9): 726-735.
- [2] Karin M. The regulation of AP-1 activity by nitrogen-activated protein kinase[J]. J Biol Chem, 1995, 270(28): 16483-16486.
- [3] Perera P Y, Vogel S N, Detore G R, et al. CD14-Dependent and CD14-independent signaling pathways in murine macrophages from normal and CD14 knockout mice stimulated with lipopolysaccharide or taxol[J]. J Immunol, 1997, 158(9): 4422-4429.
- [4] Li-Li D, Jian-Ping G, Guo-Qing Z, et al. Synthesis of endotoxin receptor CD14 protein in Kupffer cells and its role in alcohol-induced liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(3): 622-626.
- [5] Uesugi T, Froh M, Arteel G E, et al. Toll-like receptor 4 is involved in the mechanism of early alcohol-induced liver injury in mice[J]. Hepatology, 2001, 34(1): 101-108.
- [6] 郑培永,季光,尤圣富.清肝活血方对酒精性肝病大鼠肝脏脂质过氧化损伤的影响[J].江苏中医药, 2004, 25(8): 50-51.
- [7] 季光,曹承楼,张玮,等.清肝活血方对酒精性肝病大鼠 ADH 及 CYP11E1 的影响[J].中西医结合肝病杂志, 2002, 12(4): 215-217.
- [8] Figliomeni M L, Abdel-Rahman M S. Ethanol does not increase the hepatotoxicity of cocaine in primary rat hepatocyte culture[J]. Toxicology, 1998, 129(2-3): 125-135.
- [9] 季光,王育群,曹承楼,等.清肝活血方防治酒精性肝病的临床研究[J].中国中西医结合杂志, 2004, 24(1): 13-16.
- [10] Keshavarzian A, Hohnes E W, Patel M, et al. Leaky gut in alcoholic cirrhosis: a possible mechanism for alcohol-induced liver damage[J]. Am J Gastroenterol, 1999, 94(1): 200-207.
- [11] Wenzel R P, Pinsky M R, Ulevitch R J, et al. Current understanding of sepsis[J]. Clin Infect Dis, 1996, 22(3): 407-412.
- [12] Adachi Y, Bradford B U, Gao W, et al. Inactivation of Kupffer cells prevents early alcohol-induced liver injury[J]. Hepatology, 1994, 20(2): 453-460.
- [13] Tak P P, Firestein G S. NF- κ B: a key role in inflammatory disease[J]. J Clin Invest, 2001, 107(1): 7-11.

编辑:李艳红

收稿日期:2006-10-11