

益肝降脂方预处理对酒精性脂肪肝 SD 大鼠 肝脏 PKC α 表达的影响

侯珊珊¹ 赵远红² 贾英杰² 李 正² 李小江² 李全征¹ 尹纪红¹ 张小瑞¹ 杨彩霞¹ 顾宏韬³
(1.天津中医药大学,天津 300193; 2.天津中医药大学第一附属医院,天津 300193;
3.天津市中医药研究院附属医院,天津 300120)

摘 要 目的:观察中药益肝降脂方预处理对酒精性脂肪肝 SD 大鼠肝脏蛋白激酶 C α (PKC α)基因与蛋白表达的影响,探讨益肝降脂方对酒精性脂肪肝内源性保护机制的诱发与强化的效应。方法:将 116 只 SD 大鼠随机分为模型组与中药干预组,所有大鼠均连续 12 周予高脂+酒精灌胃进行酒精性脂肪肝造模,中药组分别于实验第 3 周、第 6 周、第 9 周起实施干预。于实验 6、9、12 周末不同时段宰杀取样,观察大鼠的一般情况及肝脏组织病理学变化以评价造模,蛋白免疫印迹法(Western blot)观测 PKC α 蛋白表达量,RT-PCR 法检测 PKC α mRNA 的表达活性。结果:HE 染色显示模型组大鼠肝小叶结构改变,肝细胞索紊乱,肝细胞呈不同程度的脂肪变性、点状坏死及炎性细胞浸润;中药各干预组大鼠肝组织脂肪变均较模型组明显改善。中药各时段干预组大鼠肝组织 PKC α 蛋白含量与模型组比较均明显升高,PKC α mRNA 的相对表达量明显高于模型组,且 PKC α mRNA 相对表达量随用药时间的先后呈进行性降低。结论:中药益肝降脂方早期干预能促进 PKC α 基因和蛋白的表达,有显著的药物预适应作用;益肝降脂方的预适应作用与用药早晚成正相关;中药益肝降脂方防治酒精性脂肪肝的机制可能与早期促发内源性保护实现预适应相关。

关键词 益肝降脂方 酒精性脂肪肝 蛋白激酶 C α 实验研究

中图分类号 R575.505 **文献标识码** A **文章编号** 1672-397X(2015)01-0070-04

益肝降脂方是我们临床应用多年具有升清降浊解郁功效的经验方,能有效调节酒精性肝病(ALD)的血脂代谢,降酶保肝,改善中医症状^[1]。本课题前期实验已证实益肝降脂方具有类抗氧化剂样效应,能起到防护酒精性脂肪肝(alcoholic fatty liver,AFL)的作用^[2]。蛋白激酶 C(protein kinase C,PKC)属丝氨酸/苏氨酸激酶家族中的一种,是细胞内外不同刺激信号转导的关键环节,目前由于其在肝细胞缺血/低氧预适应内源性保护机制中的作用

而受到人们的广泛关注。药物预适应(pharmacologic preconditioning,PPC)是用药物模拟缺血预适应中的介质,使其产生预处理效应,是减轻缺血再灌注损伤,保护组织的一种有效方法^[3]。中药具有安全范围大、不良反应小、作用靶点多等优点,目前关于中药在肝脏预适应保护作用中的报道很少,且中药预处理的作用机制复杂,尚未阐明。本研究在前期实验证实益肝降脂方保肝降脂抗氧化作用的基础上,尝试通过不同时间的干预造模,观察

基金项目:天津市应用基础及前沿技术重点项目(11JCZDJC19900)

与,人员涉及范围广,专业分工有所不同,需要协调好团队合作与个人发展的关系,工作任务需合理分配,以及多学科一体化诊疗服务的深入发展和科研成果转化如何惠及于民等。我们将继续在“一体化”诊疗服务模式的实践中加以探索,对运行过程中存在的问题和难点进行不断改进完善,进一步建立有效的协作机制,不断提升综合服务能力,让群众享受更加优质、高效、价廉、便捷的医疗服务。

参考文献

- [1] 秦霞玉,王彬夫.中医院一体化诊疗服务探讨.中国医院管理,2013,33(12):47

第一作者:周蓉(1979-),女,硕士,副研究员,从事医院管理工作。

通讯作者:黄继人,zhour21@163.com

收稿日期:2014-05-09

编辑:王沁凯

PKC α 基因和蛋白的表达, 分析中药复方预处理是否诱导或协助产生预适应样效应, 探讨 PKC α 在大鼠酒精性脂肪肝中的表达以及益肝降脂方对酒精性脂肪肝的保护作用是否与诱导促进 PKC α 的表达有关, 为益肝降脂方防治 ALD 建立理论基础。

1 实验材料

1.1 动物 SPF 级成熟雄性 SD 大鼠 116 只, (180 $\pm$ 20)g, 购自中国人民解放军军事医学科学院, 合格证: 0023015, 许可证: SCXK-(军)2007-004, 饲养于天津中医药大学第一附属医院实验动物房。

1.2 药物 益肝降脂方药(黄芪:葛根:丹参:苏叶:黄连:水红花子=2:3:1:1.3:0.8:2) 由本院制剂室按比例规范制备成中药浸膏(含生药 1.33g/mL)。

1.3 试剂 PKC 鼠抗人单克隆抗体(sc-8393)购自 Santa Cruz 公司, 山羊抗小鼠 IgG(ZB2305)、山羊抗兔 IgG(ZB2301)、 β -actin 鼠抗人单克隆抗体(TA-09)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司, 组织蛋白抽提试剂盒(BSP003)、高灵敏 ECL 发光试剂盒(PW044)购自生工生物工程(上海)股份有限公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒(PC0020)、丽春红染色试剂(P0012)、PVDF 膜(ISEQ00010)、Western blot 封闭液 II(奶粉, pH7.5)(PC0020)、TBS(pH8.0, 20 $\times$)(T1080)、SDS-PAGE 上样缓冲液(还原, 4 $\times$)(P1015)均购自北京索莱宝科技有限公司, Western Show 预染蛋白 Marker(sm0671)由 Thermo 提供。高脂饲料(1%胆固醇, 10%猪油, 0.3%胆酸钠, 8%蛋黄粉, 80.7%基础饲料)由中国医学科学院放射医学研究所提供; 体积分数 56%牛栏山二锅头白酒(北京顺鑫农业股份有限公司)。

1.4 主要仪器 分光光度计(上海 722RS 型), LAUDA-C3 型循环恒温水浴箱(泰克仪器有限公司), 光学显微镜(日本 OLYMPUS 公司), Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System(BIO-RAD USA), BIO-RAD ChemiDoc XRS 凝胶成像系统(BIO-RAD USA), Powerpac Basic 电泳仪(BIO-RAD USA), 温控摇床(New Brunswick USA), ABI Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪。

2 实验方法

2.1 动物分组 在完成前期综合评价益肝降脂方对实验大鼠酒精性脂肪肝的药效学研究后, 本实验参照前期造模成功实验结合本期研究目的未设立正常对照组^[4], 将 116 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为模型组 22 只, 中药干预组 94 只(其中第 3 周干预组 35 只, 第 6 周干预组 31 只, 第 9 周干预组 28 只), 饲养温度 18~22 $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 40%~70%。

2.2 造模与给药 连续 12 周予 SD 大鼠高脂+酒精梯度灌胃进行酒精性脂肪肝造模, 酒精剂量为

1.5mL/100g, 按每周测得体重每日早晚灌胃 2 次(时间间隔 8h 以上), 酒精体积分数初起为 40%(4.8g $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$)并持续至第 4 周末, 后增加至 45%(5.4g $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$)至第 8 周末, 第 9 周开始增加至 50%(6.0g $\cdot$ kg $^{-1}\cdot$ d $^{-1}$)持续到 12 周末实验结束(适应性饲养不计入实验周)。酒精性脂肪肝造模的同时, 中药干预组按药理实验方法学计算^[5], 分别于第 3 周、第 6 周及第 9 周开始, 酒精灌胃 0.5h 后, 分别灌服中药浸膏 2mL, 2 次/d。

2.3 取材 分别于实验第 6 周、9 周、12 周末随机抽取各组大鼠数只, 前 1d 禁食 12h, 自由饮水, 于第 2 天称重后乙醚麻醉, 目内眦取血后, 3000r/min 离心 10min, 分离血清, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏。取血后迅速解剖, 取下肝脏, 在肝右叶部分距边缘 5mm 处取 0.8cm $\times$ 0.8cm $\times$ 0.8cm 大小肝组织 2 块, 分别放入洁净的 EP 管中密封, -80 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏; 取肝左叶组织大小约 1.0cm $\times$ 0.3cm $\times$ 0.3cm 一块, 浸泡于 4%多聚甲醛中固定, 切片行 HE 染色后, 在显微镜下观察肝组织的脂肪变、炎症活动以及纤维化情况。

2.4 观察及指标测定方法

2.4.1 动物表现 每周测体重 1 次, 每日观察并记录各组大鼠的精神、皮毛光泽、进食、大小便及饮酒情况。

2.4.2 内源性保护的媒介物质 PKC α 测定

2.4.2.1 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定肝组织 PKC α 蛋白的表达 提取肝组织中总蛋白, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白定量, 根据 SDS-PAGE 上样量需要, 取适量样品加入 4 $\times$ loading buffer 后, 100 $^{\circ}\text{C}$ 煮沸变性 5min。浓缩胶恒压 80V, 约 40min; 分离胶恒压 120V, 电泳至溴酚蓝到凝胶底部。设置恒流 300mA, 冰浴转膜 2h。转膜后用丽春红染色试剂对膜染色, 观察转膜效果。将膜浸没在 Western blot 封闭液 II(TBST 溶解的 5%脱脂奶粉, pH7.5)中室温轻摇 90min(封闭液须覆盖整张膜, 且膜在其中能够摇动为宜)。用 Western blot 封闭液 II 稀释一抗, 室温孵育 30min, 放 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 洗膜 7 次。用 Western blot 封闭液 II 稀释二抗, 目的蛋白用羊抗鼠-HRP 1:10000 或羊抗兔-HRP 1:10000(根据一抗进行选择)室温孵育 60min, TBST 洗膜 7 次; 内参用羊抗鼠 β -Actin 1:1000, 室温孵育 30min, 放 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, 洗膜 7 遍, 再加羊抗鼠-HRP 1:10000 二抗, 室温孵育 60min, 洗膜 7 次。分别用 ECL 试剂盒显色, 暗室显影。用 KS400 图像分析系统进行灰度扫描, 目的条带的光密度值与相应内参照 β -actin 的光密度比值即为目的蛋白表达的相对表达值。

2.4.2.2 实时荧光定量 PCR 检测肝脏 PKC α mRNA 的表达 使用 Trizol 法提取肝脏组织总 RNA, 电泳

检测提取 RNA 的完整性,参照逆转录试剂盒说明将 RNA 逆转录为 cDNA,收集 cDNA -20℃保存,参照 UltraSYBR 二步法荧光定量 PCR 试剂盒进行荧光定量 PCR,以 GAPDH 为内参基因,相同模板相同基因设 3 复孔,3 次平行实验,得到各扩增反应的 CT 值。引物序列由 Primer Premier5.0 软件在线设计,管家基因(GAPDH)引物序列——F:CAAGTTCACG-GCACAGTCAA,R:CGCCAGTAGACTCCACGACA,产物长度为 140bp;PKC α 引物为——F:CAAGTTCACG-GCACAGTCAA,R:CGCCAGTAGACTCCACGACA,产物长度为 140bp;PKC α 引物为——F:CAAGTTCACG-GCACAGTCAA,R:CGCCAGTAGACTCCACGACA,产物长度为 140bp;PKC α 引物为——F:CAAGTTCACG-GCACAGTCAA,R:CGCCAGTAGACTCCACGACA,产物长度为 140bp。PCR 反应条件:95℃ 2min,95℃ 10s,60℃ 40s,40 个循环。

2.4.3 肝脏组织病理形态学观察 肉眼观察肝脏的大小、颜色、质地等外观情况,取小块用 4%多聚甲醛固定的肝组织,经过酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片,HE 染色封片后,在光学显微镜下观察组织结构及肝脏细胞脂肪变性及炎症浸润程度,病理组织学诊断参考《酒精性肝病诊疗指南》^[6]。

2.5 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计软件处理,计量资料结果以($\bar{x} \pm s$)表示,计量资料选用多样本单因素方差分析,等级资料选用秩和检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

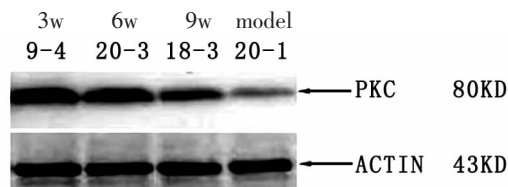
3 实验结果

实验结束时,116 只大鼠共死亡 16 只,其中模型组 9 只,第 3 周干预组 2 只,第 6 周干预组 3 只,第 9 周干预组 2 只。死因经术后病理解剖证实,主要为灌胃不当或反复酒精灌胃后返流入食道吸入肺部误入气管所致。

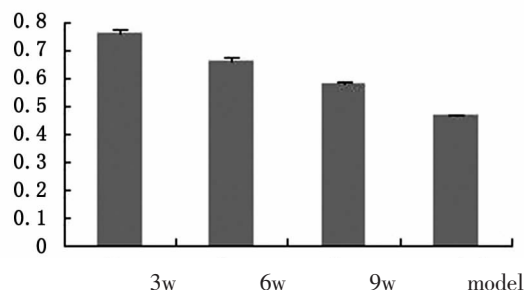
3.1 各组大鼠一般情况 初期各组大鼠精神状况正常,皮毛光泽,饮食正常;灌酒后约 15min 后均出现行动迟缓、不同程度嗜睡、喜卧的状态;随造模时间延长,模型组大鼠皮毛干枯蓬乱、无光泽,易激惹,食量减少,大便偏稀,中药组大鼠皮毛蓬乱、欠光泽,易激惹,但程度明显轻于模型组,大便偏软色深呈黑色,灌酒后行动迟缓,但少见嗜睡或嗜睡时间较模型组大鼠缩短。

3.2 PKC α 蛋白在各组中的表达情况 Western Blot 结果显示,与模型组相比,中药干预组大鼠肝脏 PKC α 蛋白表达水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),且第 3 周干预组与第 6 周干预组、第 9 周干预组比较明显升高($P < 0.05$),中药干预组 PKC α 蛋白表达水平随开始用药时间的延迟呈进行性下降。见图 1。

3.3 各组大鼠 PKC α mRNA 的水平变化 中药各干预组 PKC α mRNA 相对表达量均显著高于模型组(均 $P < 0.05$),且中药各干预组之间比较也存在明显差异(均 $P < 0.05$)。PKC α mRNA 相对表达量在中药各干预组中随开始用药时间的延迟呈进行性下降。见图 2。



A.各组大鼠肝组织 PKC α 蛋白表达的 Western Blot 检测结果



B.各组大鼠肝组织 PKC α 蛋白的表达

图 1 益肝降脂方对 SD 大鼠肝脏 PKC α 蛋白表达的影响

注:3w:第 3 周干预组;6w:第 6 周干预组;9w:第 9 周干预组;model:模型组。下同。

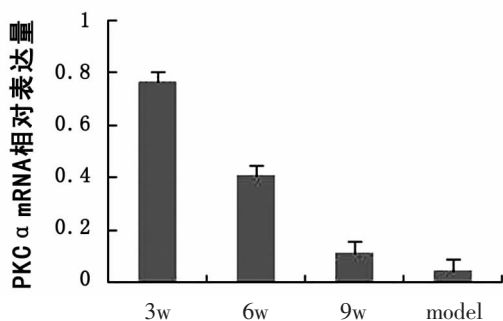


图 2 各组大鼠肝脏 PKC α mRNA 的表达

3.4 各组大鼠肝脏病理情况 肉眼观察:模型组大鼠肝脏色泽较正常肝脏色暗淡,表面粗糙,表面及切面呈灰黄色或布有白色脂肪斑点,质地较脆韧,被膜与周围组织粘连,包膜紧张,边缘钝而厚;中药干预组大鼠肝脏呈红褐色,质地稍软,肝脏薄膜与周围组织有轻度粘连,边缘稍钝。

HE 染色后光镜下观察,实验结束时(12 周末)各组病理形态表现——模型组:肝小叶结构改变,肝细胞内出现大小不等的脂滴,细胞胞质呈现空泡状,可见 F3-4 级脂肪变,肝窦略狭窄,病变以中央静脉周围最明显,汇管区有炎性细胞浸润,散在点状坏死,个别标本肝血窦周围可见纤维组织轻度增生。第 3 周干预组(用药 9 周):肝小叶结构完整,肝细胞边界较清,中度水样变性,大鼠肝组织多表现为 F1-2 级脂肪变,汇管区少量炎性细胞浸润,肝小叶内偶见点状坏死,未见纤维化和肝硬化形成。第 6 周干预组(用药 6 周):肝小叶结构较规则,可见肝细胞体积增大,肝血窦变窄,多见混合型的脂肪变性,可见少量嗜酸性变、

点状坏死,汇管区可见大量炎性细胞浸润及纤维增生。第9周干预组(用药3周):肝小叶结构不规则,肝细胞体积增大,胞质淡染,染色质呈颗粒状,甚至呈气球样变,肝血窦变窄,可见广泛的混合型脂肪变性,中央静脉周围散在点状坏死,汇管区可见大量炎性细胞浸润及纤维增生。见图3。

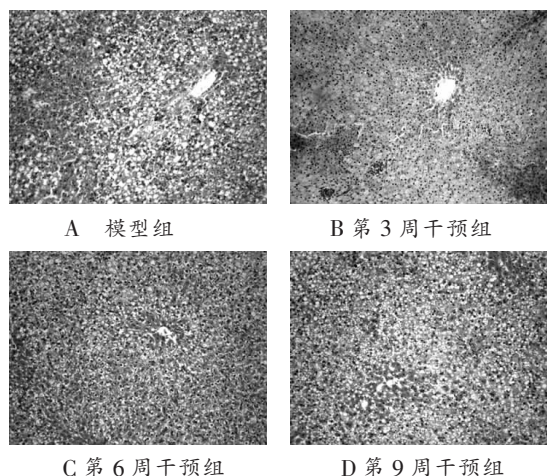


图3 各组大鼠肝脏病理组织学变化(HE,×100)

4 讨论

蛋白激酶C(PKC)是细胞信号转导途径中的重要物质,其PKC α 为经典PKC,主要存在于胞质中,以Ca²⁺依赖形式从胞质中转位到细胞膜上而被激活^[7],并导致一系列信号通路的开放,是重要的第二信使。研究发现在预处理对人肝细胞的保护作用中,PKC通路激活和预处理导致细胞保护作用密切相关,PKC的激活参与了细胞保护^[8]。本研究在建立酒精性脂肪肝大鼠模型的同时予以中药益肝降脂方不同时间点干预,观察比较PKC α 基因和蛋白在各组大鼠肝脏中的表达,探讨益肝降脂方是否具有预适应样效应。

药物预适应是指通过药物激发或模拟机体内源性物质,而呈现的保护作用。药物预处理的研究是基于对缺血预处理(IPC)保护机制的理解,因其可以有效避免IPC的有创性损伤,简单易行,且便于控制剂量,目前已引起普遍关注,且具有广泛的临床应用价值。预适应样保护的信号传导路径分三个环节:触发物质—中介物质—效应物质^[9]。触发物质主要是指预处理性短暂缺血时机体释放的内源性活性物质,在受体水平发挥调节作用;中介物质以受体后多种蛋白激酶为主;效应物质主要包括产生终末效应的细胞保护蛋白和离子通道。PKC通路激活在预适应保护信号传导通路中发挥重要作用,是下游效应物质发挥延迟保护作用的前提。

本研究采用高脂饮食联合酒精灌胃法成功诱导SD大鼠AFLD模型,并以中医不同时间点的干预模拟药物预处理方式,结果肝脏组织病理学显

示,益肝降脂方各干预组肝脏组织改变较模型组轻,两者存在差异。通过蛋白免疫印迹可以看出,中药干预组大鼠肝组织PKC α 蛋白较模型组高表达,且用药越早,蛋白表达相对越多,各组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。各组大鼠肝脏中PKC α mRNA的表达结果显示,中药干预组PKC α mRNA的相对表达量明显高于模型组,两者存在显著性差异($P<0.05$);中药各干预组组间比较,第3周干预组PKC α mRNA表达水平高于第6周干预组($P<0.05$),第6周干预组PKC α mRNA表达水平高于第9周干预组($P<0.05$)。可见PKC α 蛋白和mRNA的表达随用药时间的先后,其表达量逐渐降低,PKC α 蛋白和基因的表达与中药干预时间的早晚呈正相关,表现出明显的时、效一致趋势。推测针对酒精性脂肪肝早期予益肝降脂方干预,能促进内源性保护媒介物之一PKC α 蛋白和基因的表达,从而诱导出预适应样效应,PKC α 可能参与了益肝降脂方对酒精性脂肪肝的保护作用。

总之,PKC α 是应激性肝损伤时内源性保护信号传导路径的关键物质,益肝降脂方不同时间干预可影响酒精性脂肪肝SD大鼠肝组织中PKC α mRNA和蛋白的表达,中药用药越早PKC α 蛋白及mRNA表达越强,其防治酒精性脂肪肝的机制可能与早期促发内源性保护实现预适应相关。

参考文献

- [1] 赵远红,贾英杰,董承超,等.益肝降脂方预处理对早期酒精性肝损伤的保护作用研究.天津中医药,2010,27(3):封三
- [2] 韩素恒,赵远红,董承超,等.益肝降脂方药对酒精诱导SD大鼠脂肪肝的干预效应与分析.四川中医,2013,31(8):40
- [3] 黄诗栋,郭光伟.药物预适应的心肌保护作用.山西医科大学学报,2006,37(3):325
- [4] 徐雨,赵远红,左小娜,等.高脂加酒精灌胃法诱导大鼠脂肪肝成模及思考.时珍国医国药,2012,23(12):2986
- [5] 陈奇.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,1993:33
- [6] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组.酒精性肝病诊疗指南(2010年1月修订).现代医药卫生,2011,27(6):801
- [7] 董璁瑾,赵艳威,杨彩凤,等.蛋白激酶C α 结构及其组织分布.武警医学院学报,2011,20(11):918
- [8] 单毓强,高毅,王瑜,等.蛋白激酶c在肝细胞缺氧预处理中的作用.世界华人消化杂志,2003,11(6):723
- [9] Murphy E. Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce cardioprotection. Circ Res, 2004, 94(1):7

第一作者:侯珊珊(1989-),女,硕士研究生,研究方向:中医内科学肿瘤方向。

通讯作者:赵远红,yuanhongzh98@163.com

收稿日期:2014-06-04

编辑:吴宁