

efa[®]对 Con - A 诱导的小鼠肝脏损伤模型的保护作用研究

彭求贤¹, 赖冬妮², 翁建霖³

(1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙, 410208;

2. 科然药业有限公司, 香港, 999077; 3. 浸大科研顾问有限公司, 香港, 999077)

[摘要] 目的: 探讨 efa[®] 对刀豆蛋白 (con - A) 诱导的自身免疫性肝炎小鼠模型的保护作用及其可能的作用机制。方法: 将 50 只昆明种小鼠随机分为正常对照组、con - A 自身免疫性肝炎模型组及样品 efa[®] 高 (0.04 mL/20 g)、中 (0.02 mL/20 g)、低 (0.01 mL/20 g) 剂量组, 分别给予 0.9% 氯化钠注射液或相应浓度的 efa[®] 样品灌胃, 每天 1 次, 连续 7 d。本次灌胃结束禁食 1 晚后, 尾静脉注射 Con - A, 断头取血测生化指标, 并取肝右叶组织作病理切片, 对肝脏组织中的 CYP5A1、CYP2E1 和 CYP3A 进行蛋白分析。结果: efa[®] 能使自身免疫性肝炎模型小鼠血清中 IL - 10 升高以及 IFN - γ 、TNF - α 、PGE1 活性降低。结论: efa[®] 具有调节肝炎模型小鼠血清各细胞因子及 ALT 的水平, 并显著改善肝脏组织病理变化的作用, 其保护机制可能与 CYP2E1 相关。

[关键词] 自身免疫性肝炎; 小鼠; efa[®]; 刀豆蛋白; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.10.070

Protective effect of essential fatty acids against liver injury induced by concanavalin - A in mice

PENG Qiu - xian¹, Lai Lily², Yung Ken Kinlam³

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China;

2. Natur - Tech Pharmacal Co. Ltd., Hong Kong 999077, China;

3. HKBU Science Consultancy Company Limited, Hong Kong 999077, China)

Abstract: Objective: To investigate the protective effect of essential fatty acids (EFA) against liver injury induced by concanavalin - A (con - A) in mice and the possible mechanism of action. Methods: A total of 50 Kunming mice were randomly divided into normal control group, con - A - induced autoimmune hepatitis model group, and high -, medium -, and low - dose EFA groups (0.04, 0.02, and 0.01 mL/20 g) and were treated with 0.9% sodium chloride injection or EFA at the corresponding dose by gavage once a day for 7 consecutive days. Fasting was performed for one night after the last gavage, and con - A was injected via the caudal vein. The rats were decapitated and blood samples were collected to measure related biochemical parameters. The tissue of the right lobe of the liver was collected to prepare pathological sections, and CYP5A1, CYP2E1, and CYP3A in liver tissue were analyzed. Results: In mice with autoimmune hepatitis, EFA increased the serum level of interleukin - 10 and reduced the activities of interferon gamma, tumor necrosis factor - α , and prostaglandin E1. Conclusion: EFA has a regulatory effect on mice with the serum cytokine of hepatitis and can significantly improve liver pathological changes. Its protective effect may be associated with CYP2E1.

Key words: autoimmune hepatitis; mouse; essential fatty acids; concanavalin - A; experimental study

efa[®] 是一种口服药物配方, 主要包含植物精油和基底油两部分, 其中基底油包括脂肪酸, 其组份的气相色谱见图 1。植物精油是由母菊油、柑橘油、牛至油、迷迭香油、刺柏油和薰衣草油组成。经测试, efa[®] 主要的有效成分包括柠檬烯 (9.66%), 1,8 - 桉树脑 (9.34%) 和香芹酚等 (见表 1)。efa[®] 配方是香港自然疗法医师赖冬妮专家多年验方, 临床用

于抗衰老、肝炎及血管栓塞的治疗, 疗效确切。该配方的组成和使用方法已经申请中国香港专利 (专利号: MLI/CDT/HKS00709)。本文在既往研究和临床基础上, 利用刀豆蛋白 (Con - A) 诱导自身免疫性肝炎动物模型, 验证 efa[®] 的抗肝炎作用, 并明确其分子机制, 为进一步开发该配方提供理论依据。

第一作者: 彭求贤, 男, 副研究员, 研究方向: 中药药理及机制研究

通讯作者: 赖冬妮, 女, 自然疗法博士, 研究方向: 抗衰老和开发功能性食品配方研究;

翁建霖, 男, 教授, 研究方向: 神经药理研究, E - mail: kklyung@hkbu.edu

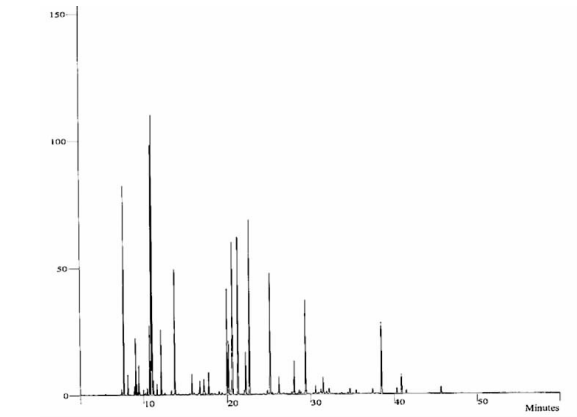


图 1 efa[®]的气相色谱图

表 1 气相色谱检测 efa[®]中的 10 种主要成分含量(%)

组分	体积百分比	组分	体积百分比
柠檬烯	9.66	α - 蒎烯	5.8
1,8 - 桉树脑	9.34	丁子香酚	5.63
香芹酚	8.05	橙花醛	4.74
香叶醛	7.17	芳樟醇	4.6
乙酸芳樟酯	6.23	反 - b - farnesene	4.41

1 实验材料

1.1 动物 昆明种小鼠, 清洁级, 雌雄各半, 体质量 18 ~ 22g, 由湖南中医药大学实验动物中心提供。

1.2 药物及试剂 刀豆蛋白(Sigma Chimica, Italy); 谷丙转氨酶(ALT)、IL - 10、IFN - γ、TNF - α、PGE1 测定试剂盒, 购于南京建成生物工程研究所。CYP5A1、CYP2E1、CYP3A、actin 一抗购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 仪器 离心机(PINGFAN TDZ5 - WS); 全自动生化仪(BECKMAN COULTER CX9); 倒置相差显微镜(OLYMPUS 公司); 多功能酶标仪(BioRad, 美国); 电泳仪(BioRad, 美国); 转膜仪(BioRad, 美国)。

2 实验方法

2.1 动物分组、造模及给药 50 只实验小鼠随机分为 5 组, 包括正常对照组, con - A 自身免疫性肝炎模型组(以下简称模型组), 样品 efa[®]高(0.04mL/20g)、中(0.02mL/20g)、低(0.01mL/20g)剂量组, 每组各 10 只。分别给予 0.9% 氯化钠注射液或相应浓度的 efa[®]样品灌胃。每天 1 次, 连续 7d。本次灌胃结束禁食 1 晚后, 尾静脉注射 Con - A (无菌 PBS 稀释至浓度为 20mg/kg), 末次喂食 8h 后断头取血, 室温放置 2h, 3000rpm 离心 10min 后取血清, -20℃ 密封保存备用, 根据标准曲线求得所测样品浓度。用试剂盒检测 ALT、IL - 10、IFN - γ、TNF - α、PGE1 水平。取肝组织用于 HE 染色和免疫印迹检测。

2.2 指标采集及检测 HE 染色: 肝组织用 10% 的中性福尔马林固定, 石蜡包埋。二甲苯浸泡 2 次脱蜡, 每次 10min。100% 的乙醇浸泡 2 次, 每次 5min。95% 的乙醇浸泡 2min, 70% 的乙醇浸泡 2min, 蒸馏水短暂冲洗。苏木精染色 8min, 用自来水冲洗 5min。1% 酸醇浸润 30s, 水冲洗 1min。发蓝

处理 0.2% 氨水溶液中 1min, 水冲洗 5min。10 滴 95% 的乙醇冲洗, 复染色用伊红溶液浸泡 1min, 95% 的乙醇脱水, 100% 乙醇浸泡 2 次, 每次 5min, 二甲苯冲洗 2 次, 每次 5min。用封固液和二甲苯封固, 光学显微镜下观察肝组织病理改变。免疫印迹: 肝组织在裂解缓冲液中用组织均质器匀浆后, 4℃ 14000rpm 离心 10min。定量后将蛋白质样品在 100℃ 10min 变性, 并于 -20℃ 下存储。等量(30μg)的蛋白质使用 10% sds - page 凝胶电泳。电泳后蛋白质被转印在 PVDF 膜(Bio - Rad), 5% 脱脂牛奶封闭过夜。随后孵化膜用 2% 牛血清白蛋白的一抗(CYP5A1、CYP2E1、CYP3A)在室温孵育 3h。用 TBST 洗涤 3 次, 每次 10min。2% 牛血清白蛋白稀释的二抗在室温孵育 1h。TBST 洗涤后, 膜上滴加 Abfrontier Westsave 化学发光检测试剂盒。通过 X 光片(柯达)显影。将光片扫描转换成数字图形分析(Image J, NIH)。蛋白质的表达通过评估灰度值表示, 用(平均光密度 ± SD)量化。

2.3 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理, 所用数据均用($\bar{x} \pm s$)表示, 2 组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 一般情况 除正常对照组外, 其余组 40 只小鼠尾静脉注射 Con - A 后, 均造模成功, 无死亡。模型组小鼠活跃程度较其他组减弱, 反应迟缓。

3.2 各组血清各细胞因子及 ALT 含量的比较 与正常对照组比较, 模型组血清 IL - 10 水平下降, IFN - γ、TNF - α、PGE1、ALT 水平均显著升高, 差异有统计学意义; 与模型组比较, efa[®]各剂量组均能显著升高 IL - 10 水平, 降低 IFN - γ、TNF - α、PGE1、ALT 水平, 差异均有统计学意义。(见表 2)

表 2 各组血清各细胞因子及 ALT 含量的比较(*n* = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL - 10(pg/mL)	IFN - γ(pg/mL)	TNF - α(pg/mL)	PGE1(pg/L)	ALT(mU/mL)
正常对照组	100.38 ± 2.93	34.59 ± 5.10	320.17 ± 17.67	820.69 ± 104.35	1.503 ± 0.116
模型组	17.21 ± 4.70 ^a	86.47 ± 5.46 ^a	1126.1 ± 121.69 ^a	1459.54 ± 86.97 ^a	13.03 ± 0.204 ^a
efa [®] 低剂量组	51.94 ± 3.17 ^b	82.80 ± 3.54 ^b	749.27 ± 12.00 ^b	1249.37 ± 44.75 ^c	4.856 ± 0.363 ^b
efa [®] 中剂量组	55.93 ± 9.50 ^b	40.47 ± 2.96 ^b	769.86 ± 57.98 ^b	1003.29 ± 66.77 ^b	5.501 ± 0.412 ^b
efa [®] 高剂量组	80.06 ± 2.72 ^b	39.64 ± 6.24 ^b	750.99 ± 72.96 ^b	1004.04 ± 88.59 ^b	10.83 ± 0.249 ^b

注: 与正常对照组比较, ^a*P* < 0.01; 与模型组比较, ^b*P* < 0.01, ^c*P* < 0.05。

3.3 各组 HE 染色结果 正常对照组小鼠肝细胞、肝窦未见异常(见图 2a)。模型组小鼠肝组织出现许多位于肝小叶或肝窦的凋亡细胞, 凋亡的肝细胞体积较正常缩小, 细胞皱缩, 胞浆内出现空泡, 胞核和胞浆浓缩, 可见许多凋亡小体肝细胞。凋亡小体呈现圆形, 大小不一, 在 HE 染色下小体胞浆呈现嗜伊红色, 中央核染色质深染, 胞核浓缩, 有些胞核裂解为碎片。肝细胞坏死程度相对较轻, 呈点状、灶状坏死。多数肝细胞浆肿胀、疏松, 有的呈气球样变, 枯否细胞增生, 肝窦内红细胞堆集, 汇管区纤维组织增生(见图 2b)。efa[®]各个浓度处理组肝细胞坏死和凋亡细胞减少, 炎症细胞浸润减少, 与模型组相比, 病理变化明显(见图 2c ~ e)。

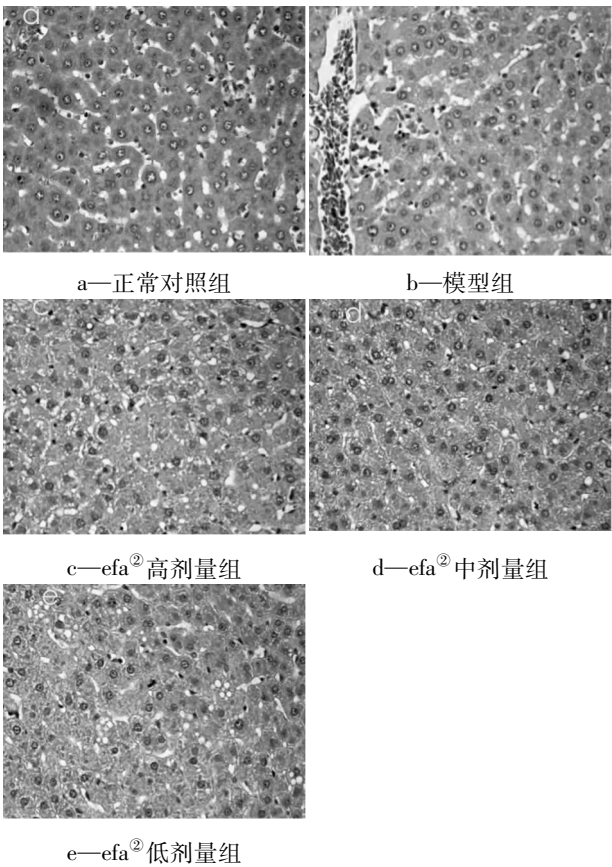


图2 Con - A 诱导肝炎小鼠肝组织病理改变(HE 染色,400 倍)

3.4 各组肝脏组织蛋白质含量检测结果 肉眼观察发现正常对照组:肝脏呈红褐色,表面光滑,质地柔软,边缘整齐。模型组:肝脏呈现深红色,表面可见大量白色斑点,质地易脆,边缘变钝。efa[®]各剂量组:肝脏颜色较正常组深,表面有少量白色斑点,质地柔软,边缘较模型组锐利。

免疫印迹结果显示:与正常对照组相比,模型组中 CYP2E1 和 CYP3A 表达量显著增加。与模型组相比,efa[®]各剂量组 CYP5A1 和 CYP2E1 表达量明显下降(见图3)。结果表明 Con - A 诱导的肝损伤机制与 CYP2E1 和 CYP3A 相关,efa[®]的肝损伤保护机制与 CYP2E1 相关,而对 CYP5A1 的表达无影响,但能使 CYP3A 表达增加。

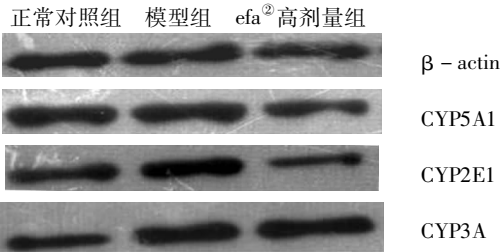


图3 efa[®]对肝脏组织蛋白质中

CYP5A1、CYP2E1 和 CYP3A 表达的影响

4 讨论

我国是肝炎发生率较高的国家之一,寻找和研究既具有抗病毒又具有保肝作用的有效天然药物,一直是医药科

研工作的重要方向。西医用于肝炎的治疗多见于抗病毒、免疫调节及护肝降酶类等药物。临床治疗结果表明,这些药物多具有良好的抑制病毒复制、恢复正常肝功能、保护肝细胞等作用,并且疗效迅速,不足之处为远期疗效不稳定,易反复,HBs Ag 转阴率低,有些药品价格昂贵,且表现出一定的毒副作用。中医药运用整体观念,能多途径、多层次、多靶点发挥功效,且具有价格低廉、毒副作用少的优势,在抗肝炎中取得了不错的疗效,越来越为广大医务工作者所重视。

Con - A 诱导肝炎(Concanavaline A Onduced Hepatitis, CIH)是研究免疫调节性肝炎以及 T 淋巴细胞参与的免疫性肝病的良好动物模型^[1],也是目前为止模拟人类临床自身免疫性肝炎及筛选抗肝损伤药物相对理想的模型^[2]。经小鼠尾静脉注射 Con - A 后,引起小鼠体内 T 细胞多克隆活化,造成以组织损伤为主要表现的急性肝炎,表现为肝脏内淋巴细胞浸润、肝细胞坏死、高水平的谷丙转氨酶(alanine-transaminase,ALT)活化以及大量炎症因子释放^[3]。在 Con - A 小鼠模型中,肝组织大量细胞浸润,CD4⁺ Th 引起 IFN - γ 及白介素 2(IL - 2)分泌增加,从而引起肝损伤^[4]。

本实验通过对动物血清中 ALT、IFN - γ 、TNF - α 、PGE1 等细胞因子的含量进行分析,验证 efa[®]对 Con - A 导致的肝脏损伤是否有保护作用及其相关作用机制。结果表明,Con - A 能引起模型小鼠血清中 IL - 10 的降低,IFN - γ 、TNF - α 、PGE1、ALT 水平的显著升高,与空白对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);efa[®]能显著升高 IL - 10 水平,并降低 IFN - γ 、TNF - α 、PGE1、ALT 水平,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。HE 染色表明,efa[®]各剂量组的肝脏病理变化较模型组明显减轻,各组之间未见明显差异。蛋白印迹结果表明,efa[®]的肝损伤保护机制与 CYP2E1 相关,而对 CYP5A1 的表达无影响。综上所述,efa[®]对 Con - A 诱导的肝脏损伤有明显的保肝降酶作用,为该药用于急性肝损伤提供了临床使用依据。

参考文献

[1] Tiegs G,Hentschel J,Wendel A. A T cell - dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A[J]. The Journal of clinical investigation,1992,90(1):196 - 203.

[2] Wang HX,Liu M,Weng SY, et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis[J]. World journal of gastroenterology,2012,18(2):119 - 125.

[3] Takeda K,Hayakawa Y, Van Kaer L, et al. Critical contribution of liver natural killer T cells to amurine model of hepatitis [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2000,97(10):5498 - 5503.

[4] Zhang X,Wei HX,Rui S, et al. Opposite effects of high and low doses of interleukin - 2 on T cell - mediated hepatitis in mice(interleukin - 2 on hepatitis) [J]. Hepatology international,2010,4(3):641 - 648. (收稿日期:2018 - 03 - 28)

脾胃培源灌肠方 对 UC 大鼠 DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 表达的影响

李学军¹, 俞红五¹, 吴婧¹, 陈亮亮¹, 金月萍¹, 李玉凤²

(1. 安徽中医药大学第二附属医院, 安徽 合肥, 230061;

2. 安徽中医药大学, 安徽 合肥, 230038)

[摘要] 目的: 研究脾胃培源灌肠方对 UC 大鼠 δ 阿片受体(DOR)、 β -arrestin1、Bcl-2 在结肠组织中表达的影响。方法: 雄性 SD 健康大鼠 120 只, 随机分为正常组, 模型组, 脾胃培源灌肠方大、中、小剂量组, 美沙拉嗪组, 每组 20 只。除正常组外, 其余组均采用 TNBS/乙醇法建立溃疡性结肠炎大鼠模型。正常组和模型组予 0.9% 氯化钠注射液 3mL/d 灌肠; 美沙拉嗪组予美沙拉嗪悬浊液 3mL/d 灌肠; 脾胃培源灌肠方大、中、小剂量组分别按含不同生药浓度(0.56g/L、0.28g/L、0.14g/L)的药剂 3mL/d 灌肠, 持续 15d, 第 16 天处死大鼠。采用免疫组织化学法和 Real time-PCR 检测大鼠结肠组织 DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 免疫阳性细胞表达及基因表达。结果: 与正常组比较, 模型组结肠组织 DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 免疫阳性细胞表达和 mRNA 表达显著升高($P < 0.05$); 与模型组比较, 脾胃培源灌肠方大、中、小剂量组和美沙拉嗪组 DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 免疫阳性细胞表达和 mRNA 表达均降低($P < 0.05$)。结论: 脾胃培源灌肠方通过对 UC 大鼠 DOR、 β -arrestin1、Bcl-2 表达的影响从而发挥其治疗作用。

[关键词] 溃疡性结肠炎; 大鼠; DOR; β -arrestin 1; Bcl-2; 脾胃培源灌肠方; 实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.10.071

Effect of Piwei Peiyuan enema prescription on the expression of delta opioid receptor, β -arrestin 1, and Bcl-2 in rats with ulcerative colitis

LI Xue-jun¹, YU Hong-wu¹, WU Jing¹, CHEN Liang-liang¹, JIN Yue-ping¹, LI Yu-feng²

(1. The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230061, Anhui, China;

2. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, Anhui, China)

Abstract: Objective: To investigate the effect of Piwei Peiyuan enema prescription on the expression of delta opioid receptor(DOR), β -arrestin 1, and Bcl-2 in colon tissue in rats with ulcerative colitis(UC). Methods: A total of 120 healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into normal group, model group, low-, medium-, and high-dose Piwei Peiyuan enema prescription groups, and mesalazine group, with 20 rats in each group. All rats except those in the normal group were treated with 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid/ethanol to establish a rat model of UC. The rats in the normal group and the model group were given enema with 0.9% sodium chloride injection, those in the mesalazine group were given enema with mesalazine suspension at a dose of 3mL/day, and those in the high-, medium-, and low-dose Piwei Peiyuan enema prescription groups were given enema with Piwei Peiyuan enema prescription 3mL/day at concentrations of crude drug of 0.56, 0.28, and 0.14 g/L, respectively; the course of treatment was 15 consecutive days for all groups, and the rats were sacrificed on day 16. Immunohistochemistry and real-time PCR were used to measure the number of DOR/ β -arrestin 1/Bcl-2-immunoreactive cells and the mRNA expression of DOR, β -arrestin 1, and Bcl-2. Results: Compared with the normal group, the model group had significant increases in the number of DOR/ β -arrestin 1/Bcl-2-immunoreactive cells and the mRNA expression of DOR, β -arrestin 1, and Bcl-2 in colon tissue($P < 0.05$). Compared with the model group, the high-, medium-, and low-dose Piwei Peiyuan enema prescription groups and the mesalazine group had significant reductions in the number of DOR/ β -arrestin 1/Bcl-2-immunoreactive cells and the mRNA expression of DOR, β -arrestin 1, and Bcl-2 in colon tissue($P < 0.05$). Conclusion: Piwei Peiyuan enema prescription exerts a therapeutic effect on rats with UC by affecting the expression of DOR, β -arrestin 1, and Bcl-2.