

鲨肝刺激物质类似物对 CCl_4 致小鼠急性肝损伤的保护作用

王 颖, 赵艳景, 叶波平*, 冯 颖, 吴梧桐, 王 蔚

(中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210009)

【摘 要】 目的: 探讨重组鲨肝刺激物质类似物(r-sHSA)对 CCl_4 致小鼠急性肝损伤的保护作用及其作用机制。**方法:** 利用腹腔注射 CCl_4 制备小鼠急性肝损伤动物模型, 以血清转氨酶活性以及组织病理变化为指标判断 r-sHSA 对化学性肝损伤的保护作用, 并通过定量 RT-PCR 方法测定肝组织中相关细胞因子表达量的变化。**结果:** 8~200 $\mu\text{g/kg}$ r-sHSA 均可显著降低损伤小鼠血清转氨酶的活性, 明显减轻肝细胞肿胀, 减少中性粒细胞浸润, 具有显著的肝保护作用, 其机制可能与 r-sHSA 诱导 $\text{TNF-}\alpha$ 和肝细胞生长因子(HGF)表达, 并下调 $\text{TGF-}\beta 1$ 的表达有关。**结论:** r-sHSA 对 CCl_4 致小鼠急性肝损伤具有明显的保护作用, 其机制可能与细胞因子的表达调控有关。

【关键词】 鲨肝刺激物质类似物(r-sHSA); CCl_4 ; 肝损伤; 保护作用; 细胞因子

【中图分类号】 Q789; R963 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2005)04-0368-05

肝脏疾病是严重威胁人类健康的重大疾病之一, 我国是肝炎高发区, 研制高效、低毒的新型抗肝损伤药物是当前肝脏疾病预防和治疗药物研究的一个热点。

在前期研究过程中, 本研究小组从鲨鱼再生肝组织中获得一种新的 cDNA 片段 sHSA^[1], 对该基因的重组表达产物 r-sHSA (M_r 17 500 Da) 的体外生物活性研究表明: 该重组产物具有明显刺激肝癌细胞株 SMMC-7721 增殖的生物活性^[2], 与报道的鲨肝刺激物质(sHSS)类似, 故命名为鲨肝刺激物质类似物(hepatic stimulator substance analogue, sHSA)。上述研究结果同时也暗示 r-sHSA 具有开发成抗肝炎药物的潜力。

为进一步评价 r-sHSA 的抗肝炎药效, 利用 CCl_4 建立了小鼠急性肝损伤动物模型, 通过腹腔给药的方式考察了 r-sHSA 对化学性肝损伤的保护作用, 并对其作用机理进行了初步的研究。

1 材 料

1.1 试 剂

r-sHSA 由中国药科大学海洋药用生物资源学教研室提供, 其纯度为 97.3%, 以生理盐水配制成 1 mg/mL 溶液。转氨酶活性测定试剂盒(南京建成生

物技术有限公司, 批号为: 20040518); 联苯双酯(bifendate, 北京协和药厂, 批号为: 030004); 无 RNase 的 DNase、逆转录酶 M-MLV (Promeiga 公司); PCR 相关试剂(上海 Sangon 公司)。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 动 物

健康雄性 ICR 小鼠, 18~22 g, 购自南京青龙山养殖场, 合格证号: SCXK(苏)2002-0018。

2 方 法

2.1 CCl_4 致小鼠急性肝损伤动物模型的建立与动物处理^[3]

健康雄性 ICR 小鼠按体重随机分为 6 组, 每组 10~12 只。分别为: 正常对照组、模型组、联苯双酯组(200 mg/kg)、r-sHSA 组(根据前期预实验结果, 设置高、中、低 3 个剂量, 剂量依次为 200, 40, 8 $\mu\text{g/kg}$), 造模前 24 h 腹腔给药, 早晚各一次, 给药体积为 20 mL/kg, 连续给药 4 d, 正常组和模型组均给予等体积生理盐水。

第 3 次给药后 0.5 h, 除正常对照组外, 其余各组用 0.2% 的 CCl_4 豆油溶液 20 mL/kg 腹腔注射, 建立小鼠急性肝损伤模型。造模后继续给药, 48 h 后小鼠眼眶取血采用改良赖氏法测定 ALT 活性。断头处死动物, 取出肝脏, 甲醛固定肝脏的左叶和中

*【收稿日期】 2004-11-12 【*通讯作者】 Tel: 025-83271016 Fax: 025-83271249 E-mail: yebp2001@yahoo.com.cn

【基金项目】 国家高技术研究计划(“八六三”计划)资助项目(No. 2005AA624010); 霍英东教育基金会高等院校青年教师基金资助项目(No. 91039); 江苏省自然科学基金创新人才资助项目(No. BK2002418)

叶, 右叶于液氮冷冻, -80℃保存, 供提取 RNA 用。

2.2 病理组织学检测

各组小鼠肝脏用 10% 甲醛固定, 经脱水、浸蜡、包埋, 制成 4 μm 厚石蜡切片, HE 染色, 光镜观察肝组织的病理变化情况。

2.3 r-sHSA 对肝细胞中细胞因子表达量的影响

2.3.1 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成^[4]
按照《分子克隆实验指南》中的方法提取肝组织中的总 RNA, 分别测定 A₂₆₀和 A₂₈₀, 检测 RNA 纯度, 计算总 RNA 含量。将总 RNA 逆转录成 cDNA 第一链后于-20℃保存。

2.3.2 不同细胞因子的定量分析 选用 3-磷酸甘油醛脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内对照基因, 根据相关细胞因子的序列设计引物。

TGF-β1 上游引物: 5'GGACCGCAACAACGCCATCTA3';

下游引物: 5'AAAGCCCTGTATTCCGTCTCCT3';

HGF 上游引物: 5'TACAGGGGAACACGAATACC3';

下游引物: 5'TGGCTCCAGAAAGATATGACG3';

TNF-α 上游引物: 5'TGAACGGAATGGGTGTTTCATC3';

下游引物: 5'CAGGGAAGAGTCTCGAAAGGTC3';

GAPDH 上游引物: 5'ATTCAACGGCACAGTCAAGC3';

下游引物: 5'GCAGAAGGGCGGAGATGA3'

以逆转录获得的 cDNA 为模板, 通过半定量 PCR 方法分别扩增不同细胞因子的基因^[5]。100 μL PCR 扩增体系包括: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.2 mmol/L dNTPs, 各细胞因子上、下游引物各 160.0 pmol, GAPDH 上、下游引物各 40.0 pmol, 3 U Taq DNA 聚合酶, 0.05 μg cDNA 模板; PCR 循环参数: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 进行 25 个循环; 72℃再延伸 10 min。

PCR 反应结束后取 20 μL 反应液于 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测扩增产物, 硝酸银染色。通过 Labworks 软件分析系统对电泳条带进行扫描积分计算, 以目的基因与内对照的比值分析细胞因子的相对表达水平。

3 结 果

3.1 r-sHSA 对急性肝损伤小鼠血清转氨酶活性的影响

实验结果表明: 与模型对照组相比, 3 个剂量组的 r-sHSA 均可明显降低模型小鼠血清转氨酶的

活性 ($P < 0.01$), 并呈现良好的量效关系 (见表 1), 其中高剂量组的转氨酶水平已接近正常对照组的水平, 其降转氨酶的效果要优于目前临床上常用的保肝降酶药物联苯双酯。

Tab. 1 Effects of recombinant hepatic stimulator substance analogue (r-sHSA) on the activity of transaminase in mice serum induced by CCL₄ ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Group	Dose(mg/kg)	ALT(A ₅₅)	ALT(cal's unit)
Control	—	0.135±0.021 [*]	33.26±10.03 [*]
Model	—	0.327±0.054 ^Δ	124.7±25.59 ^Δ
Bifendate	200	0.177±0.037 [*]	53.36±17.54 [*]
r-sHSA	0.2	0.136±0.032 [*]	34.0±15.45 [*]
	0.04	0.163±0.053 [*]	46.81±25.32 [*]
	0.008	0.208±0.080 [*]	68.36±38.15 [*]

^{*} $P < 0.01$ vs model; ^Δ $P < 0.01$ vs control

3.2 r-sHSA 对急性肝损伤小鼠肝细胞的作用

通过病理切片观察了 r-sHSA 对受损肝组织的保护作用, 结果显示: 模型组肝细胞明显肿胀, 胞浆疏松化, 中性粒细胞大量浸润, 肝窦扩张充血; r-sHSA 各给药组可明显改善肝细胞损伤程度, 减轻肝细胞肿胀, 减少汇管区中性粒细胞的浸润以及对肝小叶的破坏作用 (图 1), 不同剂量组的 r-sHSA 的作用程度与血清转氨酶水平有一定对应性。

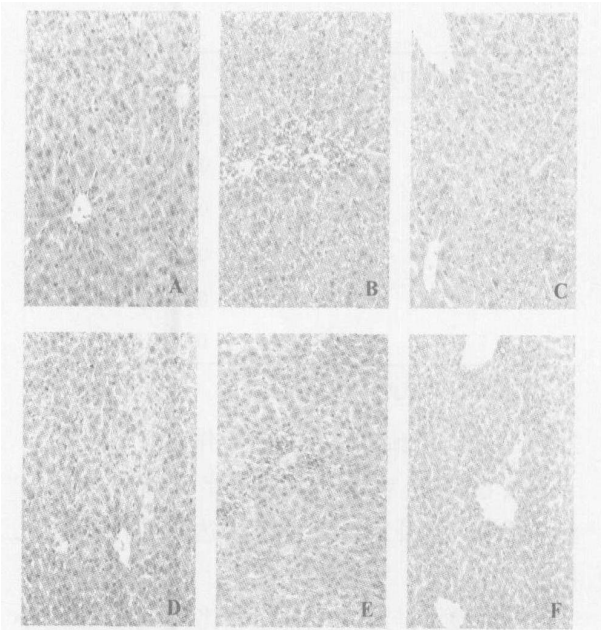


Fig. 1 Effect of r-sHSA on the protection of hepatocytes induced by CCL₄ (HE, ×100)

A: Control; B: Model; C: Bifendate; D: r-sHSA (0.2 mg/kg); E: r-sHSA (0.04 mg/kg); F: r-sHSA (0.008 mg/kg)

3.3 r-sHSA 对细胞因子 TGF-β1 的作用

以 GAPDH 为内对照, 通过半定量 RT-PCR 方法分析了各组肝组织中 TGF-β1 表达水平的变化 (见图 2)。

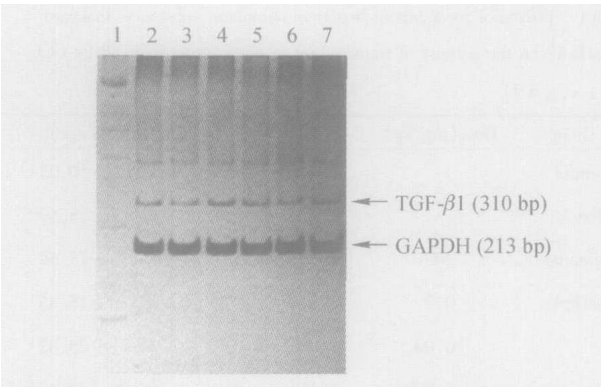


Fig. 2 Semi-quantitative RT-PCR analysis of TGF-β1 in hepatic tissues of mice

Lane 1: DL2000 DNA markers; Lane 2: Control; Lane 3: Model; Lane 4: Bifendate (200 mg/kg); Lane 5: r-sHSA (0.2 mg/kg); Lane 6: r-sHSA (0.04 mg/kg); Lane 7: r-sHSA (0.008 mg/kg)

表 2 显示: CCl₄ 损伤的肝组织中 TGF-β1 表达异常升高, 联苯双酯和 r-sHSA 高、中剂量组均可以显著降低肝组织中因 CCl₄ 损伤导致的 TGF-β1 表达的异常升高 ($P < 0.01$), 而低剂量组的 r-sHSA 对小鼠肝组织中 TGF-β1 的表达无显著影响。

Tab. 2 Expression level of TGF-β1 in hepatic tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Group	Dose (mg/kg)	TGFβ1/GAPDH
Control	—	0.318 ± 0.031
Model	—	0.354 ± 0.073 ^Δ
Bifendate	200	0.285 ± 0.094 *
r-sHSA	0.2	0.254 ± 0.056 *
	0.04	0.299 ± 0.087 *
	0.008	0.349 ± 0.091

* $P < 0.01$ vs model; ^Δ $P < 0.05$ vs control

3.4 r-sHSA 对细胞因子 HGF 的作用

以 GAPDH 为内对照, 通过半定量 RT-PCR 方法分析了各组肝组织中 HGF 表达水平的变化 (见图 3)。

结果显示: 与正常对照组相比, CCl₄ 处理后, 小鼠肝组织中的 HGF 表达水平下降, 联苯双酯和 r-sHSA 均可以显著提高受损肝组织中 HGF 的表达 ($P < 0.01$), 并呈现出明显的剂量相关性 (见表 3)。

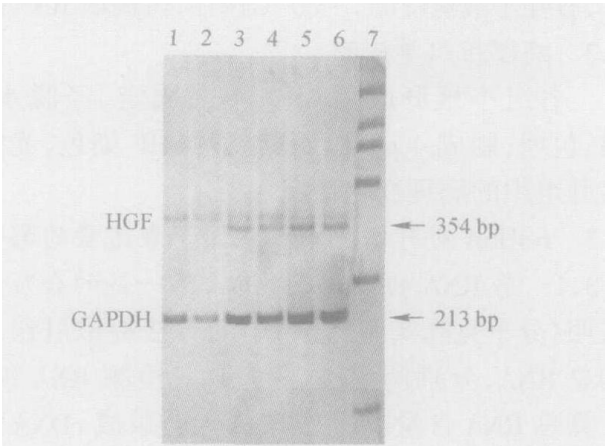


Fig. 3 Semi-quantitative RT-PCR analysis of hepatocyte growth factor (HGF) in hepatic tissues of mice

Lane 1: Control; Lane 2: Model; Lane 3: Bifendate (200 mg/kg); Lane 4: r-sHSA (0.2 mg/kg); Lane 5: r-sHSA (0.04 mg/kg); Lane 6: r-sHSA (0.008 mg/kg); Lane 7: DL2000 DNA markers

Tab. 3 Expression level of HGF in hepatic tissues of mice ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

Group	Dose (mg/kg)	HGF/GAPDH
Control	—	0.228 ± 0.042
Model	—	0.129 ± 0.038 ^Δ
Bifendate	200	0.321 ± 0.170 *
r-sHSA	0.2	0.396 ± 0.243 *
	0.04	0.378 ± 0.120 *
	0.008	0.353 ± 0.086 *

* $P < 0.01$ vs model; ^Δ $P < 0.01$ vs control

3.5 r-sHSA 对细胞因子 TNF-α 的作用

以 GAPDH 为内对照, 通过半定量 PCR 方法分析了各组肝组织中 TNF-α 表达水平的变化 (图 4)。

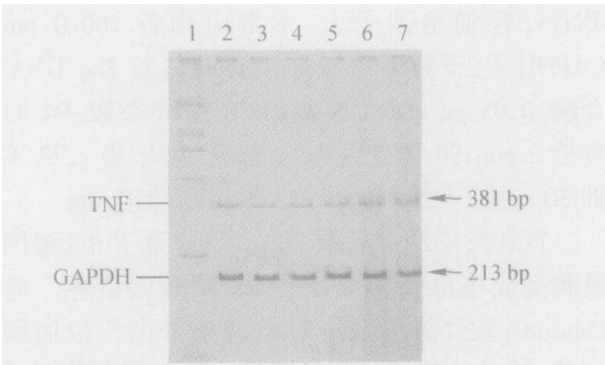


Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR analysis of TNF-α in hepatic tissues of mice

Lane 1: DL2000 DNA marker; Lane 2: Control; Lane 3: Model; Lane 4: Bifendate (200 mg/kg); Lane 5: r-sHSA (0.2 mg/kg); Lane 6: r-sHSA (0.04 mg/kg); Lane 7: r-sHSA (0.008 mg/kg)

结果显示: 与正常对照组相比, CCl₄ 处理后, 小鼠肝组织中的 TNF-α 表达水平显著下降, r-sHSA 可以显著提高肝组织中 TNF-α 的表达 ($P < 0.01$), 而

阳性药物对照组则不能上调 TNF-α 的表达(表 4)。

Tab. 4 Expression level of TNF-α in hepatic tissues of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

Group	Dose(mg/kg)	HGF/GAPDH
Control	—	0.430±0.130
Model	—	0.281±0.119 ^Δ
Bifendate	200	0.257±0.078
r-sHSA	0.2	0.331±0.161*
	0.04	0.508±0.041*
	0.008	0.401±0.036*

* $P<0.01$ vs model; ^Δ $P<0.01$ vs control

4 讨 论

CCl₄是常用的化学性肝损伤诱导剂,通过细胞色素 P₄₅₀起作用,在肝细胞内形成高活性的三氯甲基基团(CCl₃⁺),诱发脂质过氧化从而损害肝细胞的细胞膜,使内源性转氨酶释放到细胞外,导致血清中的转氨酶活性显著升高,并导致细胞因子和氧自由基的释放;同时,激活 Kupffer 细胞及中性粒细胞,影响肝细胞的 DNA 合成和分裂,引起急性肝损伤^[6]。本研究显示, r-sHSA 可明显降低 CCL₄肝损伤小鼠血清转氨酶活性,并能减轻肝细胞的肿胀程度和中性粒细胞的浸润,说明 r-sHSA 抑制 CCL₄对肝脏细胞的损伤,从而起到对肝脏的保护作用。

大量的研究数据显示在肝脏的损伤再生过程中细胞因子(如: TGF-β1^[7]、TNF-α^[8]、HGF^[9]和 IL-6^[9]等)的表达发生异常。本研究结果证明: CCL₄损伤 48 h 后的模型小鼠肝组织中的 TGF-β1 表达相对较高,而 TNF-α 和 HGF 表达水平较低,但未检测到 IL-6 的表达(数据未显示)。

研究显示: TGF-β1 与肝再生存在着密切的关系,高水平的 TGF-β1 对肝损伤再生具有较强的抑制作用,而持续高水平的 TGF-β1 与肝纤维化的发生发展过程相关^[7]。TNF-α 则是一类炎症相关的细胞因子^[8],在肝损伤的早期,该细胞因子的表达可以诱导 IL-6 和 HGF 的表达,并激发和启动肝细胞的再生^[9],同时,通过抑制 TGF-β1 的表达而使其对肝细胞再生的抑制作用减弱。

r-sHSA 可以显著提高肝组织中 TNF-α 和 HGF

的表达,并显著抑制 TGF-β1 的表达,高水平的 TNF-α 和 HGF 可以启动受损肝细胞的增殖,而低水平的 TGF-β1 同样可以减轻其对肝细胞增殖的抑制作用,因此, r-sHSA 有利于受损肝组织的修复,起到一定的肝保护作用。在本实验过程中发现:中、低剂量的 r-sHSA 诱导的 TNF-α 上调表达程度要高于高剂量组,没有呈现明显的量效关系,鉴于体内细胞因子表达的复杂性,其原因有待进一步探讨。

本研究过程中未检测到 IL-6 的表达,推测 r-sHSA 的作用可能与 TNF-α→IL-6 的信号传导途径无关,而与 TNF-α→HGF 的信号传导途径存在较为密切的关系。本研究为揭示 r-sHSA 抗急性肝炎的机制提供了一定的依据。

【参 考 文 献】

[1] 叶波平(Ye BP),奚 涛(Xi T),吕正兵(Lü ZB),等. 鲨肝刺激物质类似物 cDNA 片段的克隆及序列分析[J]. 中国天然药物 (Chin J Nat Med), 2003, 1(2): 111—116.

[2] 王 颖(Wang Y),边 杉(Bian S),张婷婷(Zhang TT),等. 鲨肝刺激物质类似物基因在大肠杆菌中的表达[J]. 海洋科学 (Marine Science), 2004, 28(6): 37—41.

[3] 徐叔云(Xu SY),卞如瀛(Bian RL),陈 修(Chen X),主编. 药理学实验方法学[M]. 第三版,北京:人民卫生出版社,2002. 1346—1348.

[4] J. 萨姆布卢克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著,金冬燕,黎孟枫等译. 分子克隆实验指南[M]. 第二版,北京:科学出版社,1996. 352—355.

[5] 边 杉(Bian S),王 颖(Wang Y),于 涛(Yu T),等. 聚丙烯酰胺凝胶银染技术在半定量 RT-PCR 中的应用[J]. 中国药科大学学报(J China Pharm Univ), 2004, 35(2): 178—182.

[6] Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration[J]. Bio-materials, 2004, 25(9): 1601—1611.

[7] Boulton RA, Alison MR, Golding M. Augmentation of the early phase of liver regeneration after 70% partial hepatectomy in rats following selective Kupffer cell depletion[J]. J Hepatol, 1998, 29(2): 271—280.

[8] Webber EM, Bruix J, Pierce RH. Tumor necrosis factor primes hepatocytes for DNA replication in the rat[J]. Hepatology, 1998, 28(5): 1226—1234.

[9] Ohira H, Miyata M, Kuroda M. IL-6 induces proliferation of rat hepatocytes in vitro[J]. J Hepatol, 1996, 25: 944—947.

Effect of Recombinant Hepatical Stimulator Substance Analogue on CCl₄-induced Acute Liver Injury in Mice

WANG Ying, ZHAO Yan-Jing, YE Bo-Ping, FENG Ying, WU Wu-Tong, WANG Min

(School of Life Science & Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

【ABSTRACT】 **AIM:** To study the effect of recombinant-shark hepatical stimulator analogue (r-sHSA) on acute liver injury induced by CCl₄ in mice. **METHODS:** The animal model of acute hepatitis was established by CCl₄ (0.2%, 20 mL/kg, ip), serum ALT were tested after ip administration. The changes of hepatocytes were observed through pathological section. The mechanism of r-sHSA on the liver protection was analyzed by the method of semi-quantitative RT-PCR. **RESULTS:** Within the concentration of 8 ~ 200 μg/kg, r-sHSA could significantly decrease the activities of rat serum ALT, and was capable of protecting liver from chemical damage. The liver protection mechanism of r-sHSA might be related with increased expression level of HGF and TNF-α and decreased expressing level of TGF-β1 as well. **CONCLUSION:** r-sHSA is promising to be developed as a liver protecting drug.

【KEY WORDS】 Recombinant shark hepatical stimulator analogue (r-sHSA); CCl₄; Liver injury; Protection; Cytokine

This study was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (No. 2005AA624010); Young Teachers of Higher Education Institutes by Fok Ying Tung Education Foundation (No. 91039); and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (No. BK2002418)

·征订启事·

欢迎订阅 2006 年药学期刊

《药学教育》是由国家教育部主管, 中国药科大学、广东药学院、中国医药教育协会联合主办的高等药学教育研究期刊, 是药学教育界唯一公开发行的社科类刊物。《药学教育》是中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊, 被中国核心期刊(遴选)数据库、万方数据库、中国期刊全文数据库、中文科技期刊数据库等大型检索数据库全文收录。设有教育研究、学科与课程建设、素质教育、教学园地、实践训练、现代教育技术、教师队伍、学生管理、调研与评估、中等教育、成人教育、国外教育、药学史、药学人物、资料信息等近 20 个栏目, 内容丰富, 形式新颖, 信息容量大。

自 2005 年起, 本刊改为双月刊, 逢双月 25 日出版, 大 16 开本, 64 页, 每册定价 10 元, 全年定价 60 元。欢迎到当地邮局订阅, 邮发代号: 28-314 漏订者可向编辑部补订。地址: 南京市童家巷 24 号 中国药科大学《药学教育》编辑部; 电话: 025-83271476; 传真: 025-83271366; 邮编: 210009; E-mail: phamedu@cpu.edu.cn, pham@163.com。

《中国药理学通报》是国家级核心期刊和权威的文献源期刊, 主要刊登药理学研究论文。多次荣获国家及华东地区优秀科技期刊奖, 2003、2005 年两获国家期刊奖百种重点期刊奖; 被国家权威机构认定为医学类、药学类核心期刊, 并被几乎所有国内检索性期刊及数十种国外著名检索期刊收录。

《中国药理学通报》为月刊, 大 16 开, 128 页, 彩色铜版纸印刷, 每期定价 15 元(零售: 20 元/期), 全年 180 元。邮发代号: 26-52, 请及时向当地邮局订阅, 漏订读者请直接汇款至我刊编辑部, 免收邮寄费。地址: 安徽省合肥市安徽医科大学校内《中国药理学通报》编辑部, 邮编: 230032。联系人: 吴慧、程西望、武明静。电话: 0551-5161221/5161222; E-mail: cpb@ahmu.edu.cn。