

清肝活血方及其拆方对脂多糖介导库普弗细胞活化 ERK 表达调控的研究*

王 淼¹ 龙爱华² 刘成海³ 季 光¹

1. 上海中医药大学附属龙华医院、上海中医药大学脾胃病研究所 (上海, 200032)

2. 江苏扬州大学医学院中西医结合研究所 3. 上海中医药大学

摘 要 目的: 探讨清肝活血方及其拆方对脂多糖介导库普弗细胞 (Kupffer cell, KC) 活化表达细胞外受体活性激酶 (ERK) 的影响。**方法:** 原代分离 KC, 筛选 LPS (脂多糖) 合适剂量和作用时间; 制备清肝活血方及其拆方含药血清, 以 ELISA、Western 方法检测该方及其拆方含药血清对 KC 表达肿瘤坏死因子、细胞外受体活性激酶 1/2 (ERK1/2) 和激活蛋白 1 (AP-1) 的影响。**结果:** 选择 LPS 合适剂量为 100μg/L, 合适时间为 2 小时。清肝方通过抑制磷酸化的 ERK (P-ERK) 来调节核因子 AP-1 的表达。活血方可以下调 P-ERK, 抑制效应产物 TNF α 的表达。清肝活血方调控磷酸化 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 TNF α 的产生, 从而起到保护肝细胞的作用。

关键词 库普弗细胞; 脂多糖; 信号转导; 清肝活血方/药理作用; 拆方/药理作用; 肿瘤坏死因子; 细胞外受体活性激酶 1/2; 激活蛋白-1

Effect of Qinggan Huoxue recipe and its separated recipe on ERK signaling pathway in Kupffer cell mediated by LPS

WANG Miao, LONG Ai-hua, LIU Cheng-hai, et al. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (Shanghai, 200032) China

Abstract Objective: To investigate the effect of Qinggan Huoxue recipe and its separated recipe on ERK signaling pathway in Kupffer cells mediated by LPS. **Methods:** Kupffer cells were isolated from the livers of male Wistar rats by in situ perfusion with collagenase and Nycondenz density-gradient centrifugation, and were stimulated with LPS in different doses for different time to observe the expression of TNF α ; The drug serum of Qinggan Huoxue recipe and its separated recipe were prepared and were 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:** After LPS was added to the medium, the protein expression of TNF α increased. A significant effect was observed 2 hours after LPS stimulation, and reached its peak 6 hours later with the dose of 1mg/L showing the most evident effect. Qinggan recipe could down-regulate the expression of membrane inhibit the phosphorylation of ERK to suppress the expression of nuclear factor AP-1. Huoxue recipe could decrease the levels of phosphorylated ERK, lower the expression of TNF α . In a similar manner, Qinggan Huoxue recipe could regulatresult in reduced phosphorylation of ERK and weaken expression of AP-1. **Conclusion:** The drug serum of Qinggan Huoxue recipe and its separated recipe exhibited 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 Kupffer cells; lipopolysaccharide; signal transduction; Qinggan Huoxue recipe/pharmacological effect; separated recipe/pharmacological effect; TNF α ; ERK1/2; AP-1

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30572380)

在酒精性肝病 (ALD) 的发病机制中, 内毒素-库普弗细胞的作用机制受到诸多学者的重视^[1,2]。乙醇的摄入能增加 LPS (脂多糖) 刺激的细胞外受体活性激酶 1/2 (ERK1/2) 的活性, 促进早期生长反应因子 1 (Egr-1) 的表达, 并使 Egr-1 与肿瘤坏死因子 (TNF) 启动子结合力增加, 从而增加了 TNF 表达。LPS 刺激后通过膜受体 CD14、TLR₄, 经 ERK1/2 信号转导诱导了 TNF 释放, 产生肝损伤^[3-5]。

我们先前的研究表明, 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^[6]。我们推测, 清肝活血方可能通过干预 ERK 信号转导通路发挥其对 ALD 的治疗效应。那么该方究竟通过哪些环节干预炎症介质的产生, 目前仍不明了。本研究从对细胞信号转导调控角度探讨清肝活血方及其拆方作用的分子机制。

1 材料和方法

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

1.2 药物 清肝活血方组成: 鳖甲、葛根、丹参、黄芩、柴胡; 清肝方: 黄芩、柴胡; 活血方组成: 鳖甲、葛根、丹参。由龙华医院制剂室煎制。链酶蛋白酶, 型胶原酶, latex beads 颗粒, 脂多糖, nuclei EZ prep nuclei isolation kit 蛋白提取试剂盒为 sigma 公司产品; 无钙 MEM、DMEM 培养基, 上海汉尼生物公司产品; Nycodenz, 挪威 AXIS-SHIELD 公司产品; 1 型 DNA 酶, 小牛血清, 华美生物工程公司产品; 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 公司产品; 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天公司产品; ELISA 试剂盒, Biosource 公司产品; 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。

1.3 KC 分离 以 SD 雄性大白鼠, 胶原酶、链蛋白酶两步酶灌注法, Nycodenze 密度梯度离心分离 KC 方法; 常规麻醉, 原位肝脏灌注, 同时剪断下腔静脉放血, 直至肝脏变浅褐色后, 以蛋白酶灌注、胶原酶灌注, 肝脏变软后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, 细胞悬液按 1×10^7 个/ml 细胞接种至 12 孔细胞培养板上, 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养 60 分钟, 弃去未贴壁细胞。

1.4 KC 的培养、鉴定 细胞接种于 12 孔细胞培养板内, 培养基为 10% DMEM, 5% CO₂ 培养箱中 37℃ 培养, 8 小时后换液。鉴定: 培养板内的 KC 加入 40μl 的 latex beads 颗粒, 2 小时后用含 10% 小牛血清的 DMEM 冲洗, 显微镜下观察并摄像。

1.5 含药血清制备 以 SD 雄性大白鼠, 体重 300g, 清肝活血方、清肝方、活血方, 按临床成人单位体重 10 倍的剂量给大鼠灌胃, 连续 3 天, 2 次/d, 在末次灌胃 1 小时后从腹腔静脉取血, 3000rpm/min 离心 10 分钟, 无菌分离血清后, 经 56℃, 30 分钟灭活, 0.22μm 微孔滤膜过滤除菌, -20℃ 冰箱

保存。

1.6 分组与给药 KC 培养 48 小时, 用含 10% 小牛血清的 DMEM 换液, 同时加入 LPS 使其终浓度为 5mg/L、1mg/L、100μg/L、50μg/L、10μg/L 在 1 小时后收集上清液和细胞, 观察 TNF 蛋白变化。以一定的 LPS 浓度, 时间点设为 15 分钟、30 分钟、1 小时、3 小时、6 小时、12 小时观察作用时间对 TNF 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, 以前面测定的 LPS 浓度, 作用时间加入 KC 培养液中, 共同培育激活 KC, 观察对 TNF 的影响, ELISA 检测。

1.7 Western blot 法检测 按照 Sigma 公司 nuclei EZ prep nuclei isolation kit 说明进行操作。先加入 nuclei EZ lysis buffer 收入 1.5ml 离心管中, 混匀, 4℃ 500g 离心 5 分钟, 取上清液, 分提胞浆蛋白、胞核蛋白, -70℃ 冰箱保存备用。

以碧云天试剂盒测定蛋白浓度, 按每条泳道 50μg, 进行 SDS-PAGE 分离蛋白电泳, 泳毕经电转将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 封闭后加入抗体, 4℃ 孵育过夜, 加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 小时以 TTBS 洗涤后, 加显影剂显影、曝光。

1.8 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 11.0 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 > 95%, latex beads 颗粒鉴别, Kupffer 细胞纯度 > 90%。

2.2 大鼠血清对 KC 的毒性测定

2.2.1 正常大鼠血清对 KC 的毒性 以 2.5%、5%、10%、20%、40% 浓度正常大鼠血清加入原代分离的 KC 中, 培养 48 小时, 用 LDH 漏出量反映正常大鼠血清对培养细胞的损害情况。结果显示, 正常大鼠血清与小牛血清相比较, LDH 升高不明显, 并且没有随剂量加大出现毒性, 显示对 KC 无毒性作用。

2.2.2 含药血清对 KC 的毒性 分别以 5%、10%、20% 浓度清肝方、活血方、清肝活血方含药血清加入原代分离的 KC 中培养。48 小时后结果显示: 20% 浓度清肝方、清肝活血方含药血清与小牛血清相比较, LDH 明显升高; 其余浓度含药血清未显示出对 KC 的毒性作用。

2.3 LPS 对 KC 表达 TNF 蛋白变化的影响及药物干预作用

2.3.1 LPS 不同剂量对 KC 表达 TNF 蛋白的影响 加入 5mg/L、1mg/L、100μg/L、50μg/L、10μg/L 剂量 LPS 刺激 KC 1 小时, 检测显示: 随着 LPS 剂量的加大, TNF 蛋白的分泌量呈现增加趋势, 50μg/L 开始明显增加, 1mg/L 到达峰值, 1mg/L 与 100μg/L 比较分泌量无明显差异, 5mg/L 时分泌量下降。

2.3.2 LPS 不同时间点对 KC 分泌 TNF 蛋白的影响 加入 LPS 100μg/L 分别于 30 分钟、1 小时、2 小时、3 小时、6 小时及 12 小时观察培养上清液中 TNF 表达。ELISA 法检测显示: 随着时间的延长, TNF 蛋白的分泌量呈现增加趋势,



2 小时开始明显增加, 6 小时到达峰值, 12 小时随着时间延长分泌下降。2 小时与 3 小时分泌量无明显差异。

2.4 清肝活血方及其拆方对 KC TNF- α 蛋白表达的影响
LPS 100 μ g/L, 加入原代分离 KC 中, 同时加入浓度为 5% 的清肝方、活血方、清肝活血方含药血清共同孵育 2 小时。检测显示: 正常组有少量 TNF- α 蛋白表达; 模型组 TNF- α 表达量明显增高; 清肝方组与模型组比较无明显差异; 活血方组 TNF- α 表达量减少最明显; 清肝活血方组次之, 见表 1。

组别	n	TNF- α 校正值 (pg/g)
正常组	6	176.54 \pm 63.50 [#]
模型组	6	5317.17 \pm 574.04
清肝方	6	4646.32 \pm 544.71
活血方	6	3398.75 \pm 187.94 [#]
清肝活血方	6	3774.38 \pm 433.18 [#]

与模型组比较, [#] $P < 0.05$

2.5 清肝活血方及其拆方对 KC 表达 P-ERK、ERK 的影响

正常大鼠血清及 5% 清肝方、活血方、清肝活血方含药血清, 加入原代分离 KC 中, 同时加入浓度 LPS 100 μ g/L 共同孵育 2 小时。结果显示: 各组间 ERK 蛋白表达没有变化。模型组 P-ERK1/2 表达明显, 正常组有少量 P-ERK1/2 蛋白表达; 活血方组 P-ERK1/2 表达量抑制最明显; 清肝方组、清肝活血方组效果效之。见图 1、2。



图 1 各组 LPS 激活 KC 后 P-ERK/ERK 蛋白水平表达

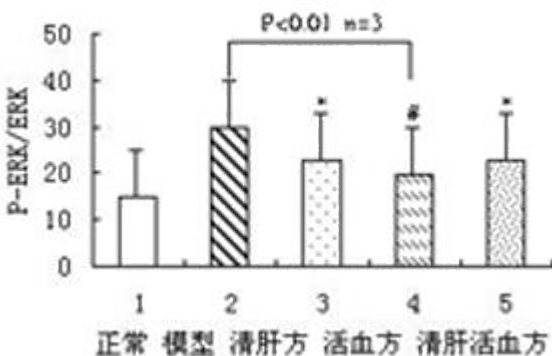


图 2 各组 P-ERK/ERK 蛋白水平的表达
与模型组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

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 5% 清肝方、活血方、清肝活血方含药血清共同孵育 2 小时。正常组有少量 AP-1 核蛋白表达; 清肝活血方组 AP-1 表达量抑制最明显; 清肝方组效果次之; 活血方组对 AP-1 作用不明显。见图 3、4。

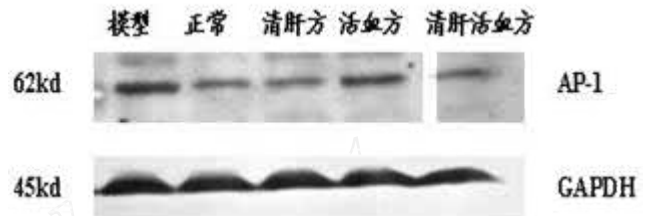


图 3 各组 LPS 激活 KC 后 AP-1 蛋白水平表达

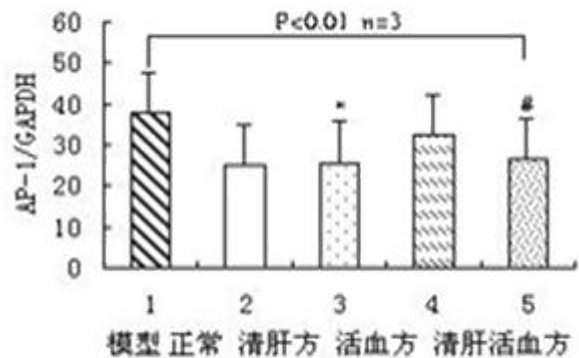


图 4 各组 AP-1 蛋白含量的表达
与模型组比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.01$

3 讨论

祖国医学认为酒为水谷之精气, 其气剽悍而有火毒。酒乃湿热之品, 味甘、苦、辛, 性温、有毒, 入心、肝、肺、胃经。对酒精性肝病患者主要病理要素的临床流行病学调查发现^[7], “湿热”与“瘀血”是 ALD 发病过程中的主要病理症结。《证治汇补》称“好酒之人, 湿热内积, 生痰生火”。酒乃大热之品, 为水谷之液, 血亦为水谷之液, 酒入中焦必求同类, 故直走血分, 致血热互结, 而煎灼血中津液, 使血液黏稠而运行不畅, 形成血瘀。据此, 确立清肝活血方, 清肝利湿、活血化瘀并用。针对“湿热”与“瘀血”将清肝活血方拆方为清肝方、活血方^[8,9]。

酒精的摄入使肠粘膜通透性增加, 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, 也激活肝内的库普弗细胞。乙醇的摄入能增加 LPS 刺激的 ERK 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, 并在其中起重要作用。ERK 通路 AP-1 的活化导致 TNF- α 释放可引起肝细胞坏死、凋亡^[5]。

TNF α 是一个具有多种生物活性的细胞因子,是机体免疫反应和炎症反应的重要介质,主要由巨噬细胞分泌产生。研究发现,阻断 TNF α 引起的效应,可以起到保护肝脏,降低死亡率的作用^[10,11],凡是能够中和 TNF α 影响 TNF α 产生或功能的方法都会在一定程度上保护肝脏。我们的实验研究显示:以 ELISA 方法检测 TNF α 蛋白,加入 LPS 后 TNF α 蛋白的分泌量呈现增加趋势,2 小时开始明显增加,6 小时到达峰值,12 小时时分泌量减少。加入不同剂量 LPS 刺激 KC 后观察,随着 LPS 剂量的加大,TNF α 蛋白分泌量增加,50 μ g/L 开始明显增加,1mg/L 到达峰值,1mg/L 与 100 μ g/L 分泌量无明显差异,5mg/L 时分泌量下降。加入清肝方、活血方、清肝活血方药物血清共同孵育后,活血方组 TNF α 表达量减少最明显;清肝活血方组次之;清肝方组效果不明显。

接下来我们研究药物对 ERK 通路及核因子 AP-1 的影响,ERK 通路是重要的胞内信号通路,是多种信号的汇总点,是 LPS 的信号途径之一,与激活 KC 参与炎症反应有着密切关系^[12]。LPS 刺激后对原代 KC 的 ERK 蛋白表达没有影响,但 ERK1/2 磷酸化表达明显增多;正常组有少量 P-ERK1/2 蛋白表达;活血方组 P-ERK1/2 表达量抑制最明显;清肝活血方组、清肝方组则效果相似。对核蛋白 AP-1 表达变化的影响:加入清肝方、活血方、清肝活血方药物血清后,正常组有少量 AP-1 蛋白表达;清肝活血方组 AP-1 表达量抑制最明显;清肝方组效果次之;活血方组对 AP-1 作用不明显。

通过以上结果,我们推测清肝方含药血清可以调控 P-ERK 环节;清肝活血方、活血方含药血清可以调控 P-ERK、核因子 AP-1 环节,进而抑制了 TNF α 的产生。但是 TNF α 的基因调控区存在 NF- κ B、AP-1、Egr-1 等多种核转录因子的结合位点^[13],这提示我们,在 LPS 介导的信号转导过程中,TNF α 等炎症介质的过度表达可能是 AP-1、NF- κ B 等多种核转录因子共同作用的结果。我们的研究主要针对 AP-1,其他核转录因子还需进一步验证。

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,其作用机制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:清肝活血方全方清肝、活血并用,可以对核因子 AP-1 进行调控;在对磷酸化 ERK 调控及抑制效应产物 TNF α 上不如活血方,从中我们可以进一步筛选药物,精简方

药,为发现新成分、有效成分,为开发新药奠定基础。

参考文献

- 1 Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*, 1995, 9 (9): 726-735
- 2 Parlesak A, Schafer C, Schutz T, *et al*. Increased intestinal permeability to macromolecules and endotoxemia in patients with chronic alcohol abuse in different stages of alcohol-induced liver disease. *J Hepatol*, 2000, 32: 742-747
- 3 HAN DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure. *World J Gastroenterol*, 2002, 8: 961-965
- 4 Liang Shi, Raj Kishore, Megan R, *et al*. Lipopolysaccharide stimulation of ERK1/2 increases TNF α production via Egr-1. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002, 282: 1205-1211
- 5 Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci*, 2004, 117 (25): 5965-5973
- 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. *江苏中医药*, 2004, 25 (8): 50-51
- 7 邢练军,季光,张玮,等.清肝活血方防治酒精性肝损伤的机理研究. *上海中医药大学学报*, 2002, 16 (2): 48-50
- 8 许亦斌,季光,曹承楼,等.清肝活血方对肝星状细胞增殖及胶原生成的影响. *实用临床医药杂志*, 2003, 7 (6): 223-251
- 9 许亦斌,季光.清肝活血方防治酒精性肝病的临床研究. *江苏中医*, 2003, 24 (9): 18-21
- 10 Bruk R. Analysis of Arg-Gly-Asp mimetics and soluble receptor of TNF as therapeutic modalities for ConA induced hepatitis in mice. *Gut*, 1997, 40: 133
- 11 Mark JC. Prevention of carbon tetrachloride-induced rat liver injury by soluble tumor necrosis factor receptor. *Gastroenterology*, 1995, 108: 1849
- 12 Dziareke R, Jin YP, Gupta D. Differential activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1, ERK2, P38 and c-Jun N-terminal kinase mitogen-activated protein kinases by bacterial peptidoglycan. *J Infect Dis*, 1996, 174 (4): 777-785
- 13 Sang H, Wallis GL, Stewart CA, *et al*. Expression of cytokines and activation of transcription factors in lipopolysaccharide administered rats and their inhibition by phenyl N-tert-butyl nitron. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 363 (2): 341-343

(收稿日期: 2006-06-03 编辑: 李晓东)

(上接第 276 页)

- 4 叶维法主编. 临床肝胆病学. 天津: 天津科学技术出版社, 1991. 747-748
- 5 吴福宁,李猛.慢性乙型病毒性肝炎中医证型与肝功能指标相关性研究. *安徽中医学院学报*, 2003, 22 (6): 22-23
- 6 谢达桓.血清总胆汁酸水平与慢性乙型肝炎严重程度的关系. *现代临床医学生物工程学杂志*, 2004, 10 (3): 255-256
- 7 王宝珍,刘成,薛惠明,等.慢性乙型肝炎肝纤维化中医证型与

肝组织病理分级分期关系的探讨. *上海中医药杂志*, 2001, 12 (1): 10-12

- 8 蒋健,高月求,吴潇,等.慢性乙型肝炎中医证型与实验室指标相互关系的研究. *上海中医药杂志*, 2002, 36 (6): 15-17
- 9 朱清静,杨玲,盛国光,等.慢性乙型肝炎病毒前 C 区基因突变与中医证型的关系. *中国中西医结合脾胃杂志*, 1999, 7 (2): 87-88

(收稿日期: 2007-06-12 编辑: 韦怡)

