

体外培育牛黄制剂对血吸虫病家兔肝纤维化门静脉壁 ERK_{1/2} 表达的影响

梁志鹏 杨 镇 蔡红娇 邹卫龙 李崇健 李 涛

摘要 目的:探讨血吸虫病家兔肝纤维化门静脉高压时门静脉壁 ERK_{1/2} 的表达及体外培育牛黄复方制剂(In-vitro cultivated calculus bovis compound preparation ICCBco)对其影响。方法:血吸虫尾蚴皮肤敷贴法感染 14 只家兔构建肝纤维化模型。其中 7 只家兔于感染后 40 d 开始给以 ICCBco 喂养。分别用 Western blot 及免疫组织化学方法检测家兔门静脉壁 ERK_{1/2} 及 C-fos 的表达。结果:血吸虫病家兔形成过和程中门静脉壁 ERK_{1/2} 活性较健康家兔明显增高,ICCBco 可以降低 ERK_{1/2} 活性。血吸虫病组门静脉壁 pERK_{1/2} 光密度值较 ICCBco 干预组和正常对照组高 2~3 倍($P < 0.01$)。C-fos 的平均染色指数由模型组的 10.3716 ± 0.9375 降低到治疗组的 5.6921 ± 0.7924 , 差异有显著性($P < 0.01$)。结论:提示 ICCBco 可降低 ERK_{1/2}/C-fos 活性,并可能通过影响 ERK_{1/2}/C-fos 信号途径来干预血吸虫性门脉高压性血管病变的形成。

关键词 肝硬化 高血压 门静脉 血吸虫病 牛黄 有丝分裂素激活蛋白激酶类

Effects of in-vitro cultivated calculus bovis compound preparation (ICCBco) on expression of ERK_{1/2} of portal vein with experimental liver fibrosis in rabbits with schistosomiasis japonicum LIANG Zhi-peng, YANG Zhen, CAI Hong-jiao, ZOU Wei-long, LI Dong-jian, LI Tao. Department of Surgery, Tongji Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of in-vitro cultivated calculus bovis compound preparation (ICCBco) on expression of ERK_{1/2} of portal vein with experimental liver fibrosis in rabbits with schistosomiasis japonicum. **Methods** the model of liver fibrosis, which was percutaneously induced by the infection of cercaria of *S. japonicum* in rabbit, and then six of them started to be treated with ICCBco by breeding at 60 d after the infection 40 d. The expression of ERK_{1/2} of portal vein were determined by western blot and immunohistochemical examination, respectively. **Results** The expression of ERK_{1/2} increased in portal vein from rabbits with schistosomiasis, and reversed by ICCBco therapy. The expression of ERK_{1/2} was decreased significantly after the ICCBco therapy. **Conclusions** ERK_{1/2}/c-fos signal transduction pathway may play an important role in the pathogenesis of portal vein with experimental liver fibrosis in rabbits with *S. japonicum*, and ICCBco can effectively decrease the the expression of ERK_{1/2} of portal vein in rabbit with schistosomiasis.

【Key words】 Liver cirrhosis Hypertension, portal Schistosomiasis Calculus bovis Mitogen-activated protein kinases

近年来偶见牛黄护肝、利胆、治疗黄疸性肝炎及四氯化碳导致的肝损害的零星报道,但对其基础研究及作用机制的研究报道则极少,其作用途径及分子生物学机制也有待进一步研究证实。本研究应用体外培育牛黄复合制剂(in-vitro cultivated calculus bovis compound preparation, ICCBco),通过构建血吸虫病家兔肝硬化模型,研究血吸虫病家兔门静脉壁 ERK_{1/2} 表达情况,同时采用 ICCBco 干预,以探讨血吸虫病家兔肝纤维化门静脉高压时门静脉壁 ERK_{1/2} 表达及 ICCBco 对其影响及其可能的作用机制。

1 材料与方

1.1 实验动物组和模型构建 肝纤维化模型的建立:成年雄性中国大耳白兔 20 只,体重 1.5~2.2 kg,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供。随机

分为 3 组:正常对照组,6 只;模型对照组,7 只;ICCBco 干预组,7 只。模型组及 ICCBco 干预组 14 只家兔,腹部去毛,滴以含尾蚴液(200 ± 5)条/只家兔,皮肤敷贴法感染血吸虫^[1]。其中干预组给以 ICCBco 喂养,600 mg/(kg·d),1 次喂服;模型组给以单料喂养。

1.2 标本检测 家兔饲养至 90 d 时成批过量麻醉处死(1% 硫喷妥钠 50 mg/kg),剖腹采集标本,相应固定,保存备检。

1.3 实验仪器 DU650 型紫外可见分光光度计(美国 Beckman 公司生产);MV-II 型双垂直板电泳槽(大连竞迈仪器公司生产);ST-T 型半干式转移电泳槽(大连竞迈仪器公司生产);JM-250 数显电泳仪(大连竞迈仪器公司生产);低温离心机(美国 Beckman 公司生产);CP-130 型超声粉碎仪(美国 Cole Parmer 公司生产);UVP 凝胶成像分析系统(英国 UVP 公司生产)。

1.4 主要实验试剂及配制 ICCBco(主要成分为体外培育牛黄,重楼皂甙等)由同济医院体外培育牛黄

本课题为国家自然科学基金资助项目(项目编号 30170920)

作者单位 430030 武汉市,华中科技大学同济医学院附属同济医院外科

实验室提供;抗 ERK_{1/2} 磷酸化抗体(SC-7976)系美国 Santa Cruz Biotechnology, Inc;抗 c-fos 抗体(SC-1694)系美国 Santa Cruz Biotechnology, Inc;ECL 试剂(sc-7976)系美国 Santa Cruz Biotechnology, Inc。

1.5 肝组织病理学检查 肝脏石蜡切片作 HE 染色及 Masson 三色胶原染。

1.6 血吸虫病家兔门静脉血管总蛋白提取及制备

(1)冰冻门静脉血管组织快速复温,置平皿剪碎;(2)将剪碎组织移入匀浆器,加入细胞裂解液 100 μL,置冰上进行匀浆;(3)超声破碎仪粉碎细胞 5 s × 4 次(4)4℃ 14 000 r/min 离心 10 min;(5)取上清;(6)取 1 μL 样品按 Bradford 法测定总蛋白浓度;(7)按 2:1(体积比)加入 3 × SDS 加样缓冲液;(8)煮沸 5 min,置 -80℃ 保存。

1.7 Western blot 检测脾血管组织 ERK_{1/2} 活性

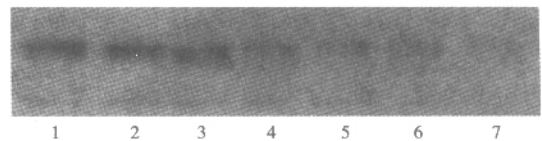
(1)分离胶制备(12%):装配垂直电泳玻板后,将分离胶加入至距梳孔约 1 cm 处,加异丁醇约 200 μL 压平胶面,室温静置 30 min,弃去异丁醇,双蒸水清洗胶面 3 次,滤纸吸除多余水分。加入浓缩胶至短板顶端,插入梳子,室温静置 15 ~ 120 min。将电泳板装入垂直电泳槽,倒入 1 × 电泳缓冲液。拔出梳子,准备加样;(2)每孔点样一份蛋白样品,每份蛋白样品上样量均为 60 μg;(3)电泳:① 80 V 电压:至溴酚兰泳动至浓缩胶与分离胶界面;② 120 V 电压:由浓缩胶与分离胶界面至底部;(4)转膜:将滤纸及硝酸纤维滤膜用转膜缓冲液浸泡 5 min,先铺 3 层滤纸于半干式转膜槽阴极板,将硝酸纤维滤膜铺于滤纸上,再将电泳后的分离胶铺于硝酸纤维滤膜上,上层再铺 3 层滤纸,赶除各层中气泡,再装上阳极板,转膜 2 h;(5)丽春红显色:取出膜,置平皿中加入丽春红染液染色约 1 min,双蒸水洗膜,可见蛋白条带,根据蛋白质标准参照确定 ERK_{1/2} 分子量,ERK_{1/2} 位于 42 ~ 44 KD 处。双蒸水洗膜 5 min × 3 次;(6)封闭:将滤膜装入封闭袋,加入封闭液约 4 mL,4℃ 封闭过夜;(7)一抗孵育:取出硝酸纤维素滤膜,置入新的封闭袋,加入 1:200 稀释的磷酸化 ERK_{1/2} 抗体孵育 1 h;(8)二抗孵育:取出滤膜,置平皿用 15 mL TBST 洗膜 10 min × 3 次,装入新的封闭袋,加入 1:5 000 稀释的二抗 4 mL 封闭,室温下轻摇孵育 1 h;(9)增强化学发光法显影(enhanced chemiluminescence, ECL):将二抗孵育后的硝酸纤维至少滤膜取出,15 mL TBST,清洗 10 min × 3 次。暗室中等量混合 ECL 试剂 A、B 液,吸去滤膜上多余水分后,平铺滴加 ECL 试剂于滤膜上,反应 1 min 后将 ECL 试剂吸净,于暗盒中对滤膜进行 X 线曝光 5 min,冲洗 X 线胶片。(10)用 UVP 凝胶成像分析系统 GEL work 1D Advanced 4.01 版本对蛋白条带进行密度分析。

1.8 统计方法 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 统计软件,经方差齐性检验后采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 实验模型 经病理解剖证实,模型对照组家兔感染成功率为 100%,没有家兔死亡。模型对照组家兔解剖见肝脏表面散在有大量的慢性灰白色粟粒样颗粒虫卵结节,呈中重度纤维化;伴腹水,脾脏肿大,门静脉系统充血,扩张。HE 染色显示模型对照组家兔肝脏汇管区有大量虫卵肉芽肿形成,炎性细胞积聚,大量胶原纤维形成条束状纤维隔,重新分隔肝小叶;肝板排列紊乱,肝细胞广泛空泡样变性;细小胆管和血管增生明显;模型对照组 Masson 染色可见肝汇管区结缔组织胶原纤维呈兰绿色条索状分布,紫红色条索状为弹性纤维,汇管区周围肝细胞间可见兰绿色条索状胶原纤维和紫红色短线状弹性纤维;胶原纤维增多,大量胶原纤维沿汇管区或炎症坏死区向外延伸,形成薄厚不一的纤维间隔分隔包绕肝小叶。ICCBco 干预组没有出现明显的纤维化和假小叶,肉芽肿较小且数目少;肝脏纤维结构存在,基本维持肝小叶结构,纤维成份局限于汇管区。

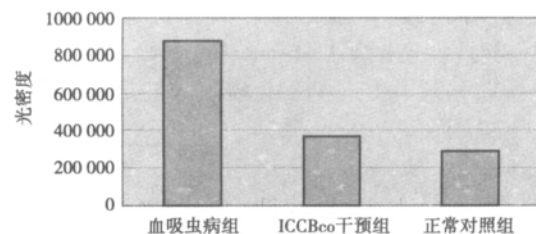
2.2 各组家兔门静脉壁 ERK_{1/2} 活性表达 血吸虫病模型组门静脉壁 ERK_{1/2} 活性较正常对照明显增高 1 倍以上($P < 0.01$)。ICCBco 干预组的 ERK_{1/2} 活性血吸虫病模型组明显降低,如图 1 所示。



注:1~3 为血吸虫病家兔模型组门静脉壁 pERK_{1/2} 表达;4,5 为 ICCBco 干预组门静脉壁 pERK_{1/2} 表达;6,7 为正常对照门静脉壁 pERK_{1/2} 表达

图 1 Western blot 检测门静脉组织 ERK_{1/2} 活性

2.3 各组家兔门静脉壁 pERK_{1/2} 光密度值 见图 2。正常对照组光密度 285404 ± 0.129 ,血吸虫病组光密度 875085 ± 0.105 ,ICCBco 干预组光密度 365935 ± 0.161 。



注:血吸虫病组门静脉壁 pERK_{1/2} 光密度值较 ICCBco 干预组和正常对照组高 2 ~ 3 倍($P < 0.01$)

图 2 各组家兔门静脉壁 pERK_{1/2} 光密度值

3 讨论

体外培育牛黄(In-vitro cultivated calculus bovis compound preparation, ICCB)是华中科技大学同济医学院附属同济医院研制的具有自主知识产权的国家一

类新药,临床前药理学、药理学、毒理学和特殊毒理学试验结果表明,体外培育牛黄性状、结构、成份、含量及药效均与天然牛黄一致。实验证明^[2]体外培育牛黄能明显延长小鼠的生存时间,提高缺氧小鼠的脑、肝、心组织及血清 SOD 活性,降低 MDA 含量,并能明显减轻脑组织的病理损伤。并有实验证实,牛黄具有预防四氧化碳对小鼠肝损伤的作用。但关于牛黄的作用机制及分子生物学基础研究的报道则罕见。本文采用 ICCBco 对血吸虫病家兔门静脉高压性血管病变进行干预治疗,实验结果表明,ICCBco 可影响门静脉高压性血管壁 ERK_{1/2}/C-fos 的活性表达,具有改善和治疗血吸虫性家兔肝纤维化及门静脉病变的作用。

血吸虫性家兔肝纤维化门静脉高压是研究门静脉血管病变较为理想的模型,符合人类肝纤维化自然病程和病理发展过程。本研究采用日本血吸虫尾蚴感染中国大耳白兔得到了较为理想的血吸虫病性肝纤维化门静脉高压血管病变模型,病理证实感染 90 d 时,中、重度肝脏纤维化及门静脉血管病变已经基本形成,肝脏大量胶原沉积是脏纤维化基本病理学改变,是公认血吸虫病性肝纤维化门静脉高压血管病变。本实验结果证实,血吸虫病模型组门静脉壁 ERK_{1/2} 活性较正常对照明显增高 1 倍以上 ($P < 0.01$)。ICCBco 干预组 ERK_{1/2} 活性较血吸虫病模型组明显降低;实验结果提示:ICCBco 可降低血吸虫病性肝纤维化门静脉高压血管壁 ERK_{1/2}/C-fos 活性,并可能是通过 ERK_{1/2}/C-fos 途径的激活细胞外信号传导通路而实现对血管 VSMC 表型转变的调控及抗血管壁病变的作用。

ERK 信号通路在多种因子介导的细胞增殖过程中发挥重要的作用已为人们公认。研究表明^[3-6]多种损伤因子如机械损伤、应激反应、细胞因子、炎症介质及生长因子可诱导 VSMC 上调 ERK_{1/2} 活性,参与 VSMC 增殖、迁移、合成 ECM 等多种病理过程的调控。上调 VSMC ERK_{1/2} 活性可使细胞骨架蛋白重构并促进 ECM 合成与分泌。缺氧可使 VSMC P38 及 ERK_{1/2} 活性上调而激活 β_1 整合素, β_1 整合素激活后可促进 VSMC 与纤维连接素(Fibronectin, FN) I 型胶原等细胞外基质粘附而促进 VSMC 增殖。本实验针对 ERK_{1/2}

204 位 Tyr 磷酸化位点特异性抗体研究证实,ERK_{1/2}/c-fos 信号传导途径也参与了血管平滑肌细胞多种生理与病理过程的调控。在正常的平滑肌细胞中,ERK_{1/2} 可对细胞收缩性蛋白进行磷酸化而保持持续性的可收缩性^[7]。在血吸虫性门脉高压症时,门静脉血管壁磷酸化 ERK_{1/2} 表达增高,同时,病理切片也证实门静脉壁出现血管内膜损伤、脱落,血管中膜肌层增殖、增厚、平滑肌细胞排列紊乱等血管病变表现^[8]。

初步研究结果提示,ERK_{1/2}/c-fos 信号传导通路的激活可能参与了血吸虫性门脉高压性血管病变的发生与发展过程,同时表明 ICCBco 可能是通过该通路实现其干预作用的。但表达主要是于平滑肌细胞还是内皮细胞?静脉壁中弹性纤维和胶原纤维的变化与 ERK_{1/2}/c-fos 信号传导途径及 ICCBco 对其影响的作用机制如何,有待进一步研究证实。

4 参考文献

- 1 杨镇,裘法祖,王在华. 家兔血吸虫病模型的建立及特点. 中华实验外科杂志,1993,10(4):145-147
- 2 蔡虹娇,裘法祖,刘仁则,等. 体外培育牛黄的药学研究. 中国天然药物杂志,2004,2(6):335-338
- 3 Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science,2002,298(5600):1911-1912
- 4 Agell N, Bachs O, Rocamora N, et al. Modulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by Ca²⁺, and calmodulin. Cell Signal,2002,14(8):649-654
- 5 Graf K, Xi XP, Yang D, et al. Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. Hypertension,1997,29(1 Pt2):334-339
- 6 Conway EM, Van de Wouwer M, Pollefeyt S, et al. The lectin-like domain of thrombomodulin confers protection from neutrophil-mediated tissue damage by suppressing adhesion molecule expression via nuclear factor kappaB and mitogen-activated protein kinase pathways. J Exp Med,2002,196(5):565-577
- 7 Takahashi E, Berk BC. MAP kinase and vascular smooth muscle function. Acta Physiol Scand,1998,164(4):611-621
- 8 Goetze S, Kintscher U, Kaneshiro K, et al. TNFalpha induces expression of transcription factors c-fos, Egr-1, and Ets-1 in vascular lesions through extracellular signal-regulated kinases 1/2. Atherosclerosis,2001,159(1):93-101

(收稿 2005-03-21)

网上投稿注意事项

本刊接受网上投稿,邮箱为 LQ4644@163.net,但需注意下列事项:(1)作者网上投稿后,请务必通过邮局将单位证明信及审稿费寄至本刊编辑部。(2)网上投稿与邮局投稿尽量不要重复,本刊邮箱设置了自动回复功能,网上投稿后可在投稿邮箱中查到本刊回条,半月内可以收到本刊寄出的收稿回条(已注明稿件编号)。(3)网上投稿的稿件请以 word 编辑,务必以附件的形式发出,注意文档不要设密码。(4)网上新投稿件,请在主题栏注明“投稿”,如为邮寄投稿后补充电子文本请注明“补电子文本”及论文编号,如对原有稿件内容进行了修改请注明“修改稿”及论文编号。(5)网上投稿时请注意标明作者单位名称及邮政编码,与第一作者非同一单位的作者的单位名称、邮码也要注明,最好能提供联系电话或 E-mail 地址,以便本刊与您联系。(6)如有通讯作者请注明通讯作者的 E-mail 地址。

本刊编辑部