

· 论 著 ·

血必净注射液对脂多糖性肝损伤大鼠 PPAR- γ 基因表达及肝损伤的影响刘明伟¹, 苏美仙², 王 强³, 郝 丽¹, 曲 艳¹, 张明谦¹, 王 旭¹

(1. 云南省昆明市延安医院急诊科 650051; 2. 昆明医学院第二附属医院 SICU 650101;

3. 昆明医学院第一附属医院普外科 650031)

摘要:目的 研究血必净注射液对急性肝损伤大鼠肝组织中过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR- γ)表达的动态影响。方法 将 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和治疗组,采用腹腔注射 D-氨基半乳糖(D-Gal)、脂多糖建立急性肝损伤大鼠模型。治疗组在造模前 6 h 及制模后大鼠腹腔内给予血必净注射液 2.5 g/kg,12 h 1 次,共 4 次,各组于造模后 6、12、24、48 h 4 个时间点留取大鼠血及肝脏标本。观察大鼠肝功能及肝脏病理变化;用 RT-PCR 法测定各组肝 PPAR- γ mRNA 表达水平;ELISA 法测定血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)水平。结果 模型组大鼠肝组织 PPAR- γ mRNA 表达明显低于对照组,治疗组组织大鼠肝 PPAR- γ mRNA 水平明显高于模型组,组间比较差异有统计学意义。结论 血必净注射液对实验性急性肝损伤有一定保护作用,其机制可能与升高鼠肝 PPAR- γ mRNA 表达水平有关。

关键词:脂多糖;急性肝损伤;血必净注射液;过氧化物酶体增殖物激活受体

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2010.22.012

中图分类号:R575.05

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)22-3029-03

Effect of Xuebijing on PPAR- γ in liver tissue of endotoxin-induced acute liver injury rat modelsLIU Ming-wei¹, SU Mei-xian², WANG Qiang³, et al.

(1. Department of Emergence, Kunming Yan'an Hospital, Kunming, Yunnan 650051, China;

2. Department of SICU, Second Hospital Affiliated to Kunming Medical College,

Kunming, Yunnan 650101, China; 3. Department of General Surgery, First Hospital

Affiliated to Kunming Medical College, Kunming, Yunnan 650031, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Xuebijing on peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR- γ) in the liver of the acute liver injury model rats induced by endotoxin. Methods One hundred and eighty SD rats were divided into 3 groups randomly: control group, model group and treatment group. The model of acute liver injury was induced by injecting lipopolysaccharide and D-galactosamine(D-Gal) into abdomen. Xuebijing was injected into the abdomen of the rats in treatment group, and at 6 h before the establishment of models and 12, 24, 36 h after the establishment of models injected into the other side abdomen. At 6, 12, 24, 48 h after the establishment of models, serum and liver samples were collected from rats to determine the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6) by ELISA, and PPAR- γ mRNA by RT-PCR. Pathologic change of liver tissue was examined by microscope. Results The levels of IL-6 and TNF- α of serum in treatment group were obviously reduced than those in model group($P < 0.05$); The level of PPAR- γ mRNA of liver tissue in treatment group was higher than that in model group($P < 0.05$). Conclusion Xuebijing has a protective effect through the way of promoting PPAR- γ mRNA level to the acute liver injury model rats induced by endotoxin.

Key words: endotoxin; acute liver injury; Xuebijing; peroxisome proliferators-activated receptor

研究发现,血必净注射液对各种炎症细胞因子的产生和释放有明显的保护作用,因此广泛应用于外科手术、烧伤、休克等疾病^[1],对急性肺损伤^[2]、肝脏的缺血再灌注损伤也有一定的保护作用^[3]。脂多糖可通过多种途径导致肝功能受损,而细胞因子水平的改变、氧化应激、脂质代谢障碍是肝损伤的主要病理机制^[4]。过氧化物酶增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR- γ)是属于配体激活的一类核转录因子超家族成员,在炎症、脂质代谢、糖代谢和肿瘤中起着重要的调节作用^[5]。本研究通过观察血必净注射液对脂多糖诱导肝损伤大鼠 PPAR- γ mRNA 以及其他炎症细胞因子变化的影响,进一步探讨血必净注射液在急性肝损伤中的抗炎及对肝损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 脂多糖购自北京宝希迪科技有限公司。D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-Gal)购自江苏南通通吕生物制品

有限公司。血必净注射液购自天津红日药业股份有限公司(批号:Z20040033)。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6) ELISA 试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司。PPAR- γ 引物由上海生物工程技术公司合成,RT-PCR 试剂盒购自美国 GibcoBRL 公司。

1.1.2 实验动物 选用健康雄性 SD 大鼠 180 只(由昆明医学院动物中心提供),体质量 200~250 g,22 ℃ 恒温房内饲养,标准颗粒混合饲料(由昆明医学院动物中心提供)喂养,自由饮水。

1.2 实验方法

1.2.1 分组与给药 将 180 只 SD 大鼠随即分为 3 组,分别为:对照组 20 只、模型组及治疗组各 80 只,后两组又随机分为 4 个小组(每组 20 只),分别为 6、12、24、48 h 4 个时间点,每个时间点为一组。通过腹腔注射脂多糖 4 μ g/kg(10 g/L)、D-Gal 800 mg/kg(250 g/L)建立急性肝损伤模型,治疗组在建立模型前 6 h 及造模后 12、24、36 h 腹腔注射 2.5 g/kg 血必净注射

表 1 血必净注射液对急性肝损伤大鼠血清 ALT、AST、TNF- α 、IL-6 的影响($\bar{x}\pm s$)

时间(h)	组别	n	ALT(u/L)	AST(u/L)	TNF- α (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
6	对照组	20	27.105 \pm 2.137	76.572 \pm 8.437	102.316 \pm 14.735	19.814 \pm 3.059
	模型组	20	31.572 \pm 5.451 \diamond	146.338 \pm 26.183 \diamond	210.274 \pm 28.734 \diamond	59.701 \pm 22.083 \diamond
	治疗组	20	28.145 \pm 7.330*	94.219 \pm 13.582*	156.855 \pm 22.341*	27.550 \pm 13.013*
12	模型组	20	48.336 \pm 5.015 \diamond	200.016 \pm 27.251 \diamond	260.719 \pm 15.842 \diamond	154.190 \pm 69.752 \diamond
	治疗组	20	34.219 \pm 9.361*	159.459 \pm 18.248*	150.376 \pm 15.013*	75.420 \pm 21.347*
24	模型组	20	38.712 \pm 10.167 \diamond	199.519 \pm 32.736 \diamond	147.627 \pm 12.472 \diamond	53.904 \pm 10.691 \diamond
	治疗组	20	31.837 \pm 7.143*	147.837 \pm 19.119*	101.256 \pm 14.714*	14.548 \pm 4.093*
48	模型组	20	23.391 \pm 4.961 \diamond	105.703 \pm 21.615 \diamond	104.582 \pm 8.753 \diamond	31.731 \pm 10.115 \diamond
	治疗组	20	19.234 \pm 3.367*	69.820 \pm 17.842*	93.104 \pm 13.296*	23.094 \pm 9.359*

\diamond :与对照组比较, $P<0.05$;*:与对照组、模型组比较 $P<0.05$ 。

液。对照组给予等量生理盐水。

1.2.2 标本采集 各组于造模后 6、12、24、48 h 4 个时间点处死各组大鼠,切皮开腹,下腔静脉取血,迅速取出肝脏,以液氮冻存。部分肝脏浸泡于体积分数为 4%多聚甲醛溶液 48 h 后,进行石蜡包埋、切片、HE 染色。

1.2.3 检测指标 (1)血液离心后血清送本院生化室检测 ALT、AST;(2)苏木素-伊红(HE)染色,观察肝脏病理改变;(3)用 ELISA 法检测血清中 TNF- α 和 IL-6 含量,按 ELISA 试剂盒说明书操作;(4)测定 PPAR- γ mRNA 的表达,肝组织总 RNA 采用 TRIzol 一步法提取,经紫外分光光度计测定各总 RNA 的吸光度值(A260),根据 PPAR- γ 的 cDNA 文库进行引物设计、合成。上游引物为 5'-TGAAACTCTGGGAGATC-CTCC,下游引物为 5'-ACAAGTCCTTGTAGATCTCCTG-GA,预计扩增产物长度为 193 bp,以特异性引物反转录合成 cDNA,再以其为模板进行扩增 PPAR- γ 基因片段和琼脂糖凝胶电泳,经凝胶密度扫描系统处理,测定各电泳带灰度值,计算各组 PPAR- γ mRNA 相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。对方差齐性的统计数据采取方差分析、F 检验,方差不齐者采用非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血必净注射液对急性肝衰竭大鼠血清 ALT、AST、TNF- α 、IL-6 的影响 各时间点治疗组、模型组与对照组比较,ALT、AST 明显增高,以 12 h 升高明显,差异有统计学意义($P<0.05$),而治疗组较模型组降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。治疗组、模型组 IL-6、TNF- α 含量较对照组明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$),12 h 即达顶峰,治疗组 IL-6、TNF- α 含量较模型组明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 2 各组大鼠各时间点肝组织 PPAR- γ mRNA 表达($\bar{x}\pm s$)

组别	n	6 h	12 h	24 h	48 h
对照组	20	0.611 \pm 0.127	0.568 \pm 0.032	0.650 \pm 0.154	0.585 \pm 0.141
模型组	20	0.257 \pm 0.021	0.155 \pm 0.067	0.179 \pm 0.048	0.375 \pm 0.094
治疗组	20	0.38 \pm 0.039*	0.213 \pm 0.027*	0.402 \pm 0.012*	0.479 \pm 0.028*

*:与对照组、模型组比较, $P<0.05$ 。

2.2 HE 染色 随着脂多糖作用时间的延长,病理损害逐渐

加重,12 h 达到顶峰,随后开始减轻。模型组肝组织呈弥漫性病变,肝细胞浊肿,变大,有脂质沉积,可见点灶状坏死,肝小叶完整,局部有炎细胞浸润;治疗组肝组织病理改变明显轻于模型组。见插彩 I 图 1~3(造模后 12 h)。

2.3 血必净注射液对各组大鼠肝脏 PPAR- γ mRNA 表达的影响 根据电泳图灰度值计算出各组大鼠肝组织 PPAR- γ mRNA 的表达量。各时间点治疗组、模型组大鼠肝组织 PPAR- γ mRNA 的水平显著低于对照组($P<0.05$),以 12 h 降低明显;治疗组 PPAR- γ mRNA 的水平显著高于模型组($P<0.05$),见表 2。

3 讨 论

脂多糖是 G⁻菌细胞外壁的一种糖脂复合物成分,是引起脓毒症和全身炎性反应综合征的主要因素,肝脏是脓毒症时最易受损的器官之一。脂多糖不仅可以造成肝脏微循环障碍、直接损伤肝细胞,更为重要的是它可以刺激肝内单核/巨噬细胞系统活化,生成大量炎性因子如 TNF- α 、IL-1 及 IL-6 等,触发级联反应,对肝脏造成较为持久而且广泛的损伤^[6-7]。动物经 D-Gal 致敏后可增强对脂多糖的敏感性及肝脏器官损害特异性^[8]。本实验通过 D-Gal 联合脂多糖腹腔注射方法建立的急性肝损伤动物模型,死亡率高,给药 6 h ALT、AST 显著升高,肝脏组织出现显著病理改变,肝小叶内可见灶状和小片状坏死伴炎症细胞浸润,符合急性肝损伤表现。目前对肝损伤的治疗方法很多,且均有一定的疗效,但也存在明显的不足。肝移植疗法受患者年龄、人类白细胞抗原相同供者来源不足、感染等并发症多、移植抗宿主病治疗难度大、病死率高等限制。西医对肝损伤的药物治疗疗效并不十分肯定,同时又具有较大的毒副作用。还有一些疗法虽然对肝损伤有效,但因其价格昂贵,使患者经济上难以承受,因而极不利于临床推广。为此,开展多种疗法联合治疗的疗效分析,走中西医结合道路,发挥中医药治疗肝损伤的优势,日渐成为研究热点。本研究发现,血必净注射液作用后,肝功能好转,病理改变明显减轻,显示血必净注射液对急性肝损伤有一定的保护作用。

研究表明,血必净注射液具有对抗细菌毒素、降低脂多糖水平、拮抗炎症介质与改善人体免疫功能的保护作用相结合的双重药理作用,与抗生素联用可显著提高 MODS 患者存活率^[8]。大量临床资料证实,血必净注射液对脓毒症、脓毒性休克、MODS 具有减轻组织损伤、调节细胞因子平衡的作用,从而提高存活率^[9];具有对抗脂多糖及与发病有关的多种炎症介质的作用,能拮抗 TNF- α 、脂多糖、IL-6 的释放,增强单核细胞

人白细胞 DR 抗原 (HLA-DR) 表达, 促进免疫功能恢复^[10]。王静恩等^[11] 研究显示, 早期给予血必净注射液治疗后, 治疗组 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-10 水平从 3 d 起即有所下降, 尤以 5 d 时下降明显, APACHE II 评分治疗组也较对照组下降明显, 最终治疗组脓毒症、MODS 发生率和病死率也均较对照组低。

已有研究表明, 急性肝损伤严重程度、预后与细胞因子关系密切, TNF- α 是造成肝损伤的主要细胞因子^[12], IL-6 能抑制肝细胞再生^[13]。过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARs) 是一类能被过氧化物酶体增殖物激活的核内受体, 其由 3 个亚家族 PPAR α 、PPAR β/δ 、PPAR γ 组成。它主要分布于脂肪组织, 在脾脏、肝脏、结肠、单核-巨噬细胞、淋巴细胞、平滑肌细胞及动脉粥样硬化病灶等部位中低度表达^[14]。其生物学功能为促进脂肪细胞的分化及维持糖、脂肪代谢平衡^[15]。许多实验证明, PPAR γ 可以从不同水平调控细胞内多条炎症信号转导途径, 其中对促炎介质基因的转录抑制是其抗炎效应的分子基础, 对 NF- κ B 的作用突出^[16-17]。在人脐静脉内皮细胞过度表达的 PPAR γ 能显著抑制 TNF- α 引起 ICAM-1、VCAM-1 和 E-选择素的产生, 减少白细胞黏附^[17]。实验证实炎症因子 TNF- α 、IL-1B、IL-6 可抑制脂肪细胞 PPAR γ mRNA 的表达^[18]。

本研究发现, 肝损伤模型建立后, PPAR- γ mRNA 水平明显降低, 而 TNF- α 、IL-6 升高, AST、ALT 也明显升高, 可能由于 PPAR- γ 表达减少, 抑制炎症表达减弱, 导致炎症介质生成增加, 使肝脏受损加重。而血必净注射液可使急性肝损伤小鼠的 PPAR- γ mRNA 表达增加, 而其他损伤性炎症介质如 TNF- α 、IL-6 及 AST、ALT 较模型组明显降低。这一结果提示血必净注射液可促进肝组织 PPAR- γ mRNA 表达而抑制炎症因子。从病理组织学上, 光镜观察可见模型组部分肝细胞出现细胞水肿, 点状肝细胞坏死伴炎细胞浸润。而治疗组损伤程度明显减轻, 直观上证实了血必净注射液能控制或减轻肝细胞的变性、坏死, 促进肝细胞再生, 对脂多糖性肝损伤有一定的防治作用。

综上所述, 血必净具有促进 PPAR- γ 的表达而抑制炎症介质保护重要脏器的作用, 为血必净注射液在脓毒症、多器官功能障碍等危重病的临床应用提供了实验依据和临床参考价值。

参考文献:

- [1] 吴允孚, 陈刚, 席与斌, 等. 血必净注射液对内毒素性肺损伤治疗作用的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(3): 181.
- [2] 黄善灶, 王静飞. 血必净注射液治疗创伤后急性肺损伤 40 例临床分析[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(4): 244.
- [3] 刘清泉, 朱雪琦, 王蕾, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠存活率和肾功能影响的研究[J]. 中国中医急症, 2008, 17(2): 203.
- [4] Malhi H, Gores GJ. Cellular and molecular mechanisms of liver injury[J]. Gastroenterology, 2008, 134(6): 1641.
- [5] Orasanu G, Ziouzenkova O, Devchand PR, et al. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist pi-

oglitazone represses inflammation in a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha-dependent manner in vitro and in vivo in mice[J]. J Am Coll Cardiol, 2008, 52(10): 869.

- [6] 杨颂华, 任成山, 高全杰, 等. 内毒素致大鼠急性肝损伤时血清 TNF- α 、MDA 的变化及其意义[J]. 重庆医学, 2003, 32(1): 82.
- [7] Levels JH, Lemaire LC, Van Den Ende AE, et al. Lipid composition and lipopolysaccharide binding capacity of lipoproteins in plasma and lymph of patients with systemic inflammatory response syndrome and multiple organ failure[J]. Crit Care Med, 2003, 31(6): 1647.
- [8] 陈焱, 陈耀凯, 王宇明, 等. 肝细胞再生抑制肝损伤大鼠模型的构建[J]. 重庆医学, 2008, 37(15): 1697.
- [9] 陈齐红, 郑瑞强, 林华, 等. 血必净注射液治疗脓毒性休克的前瞻性随机对照研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(6): 364.
- [10] 张畔, 曹书华, 崔克亮, 等. 血必净对多脏器功能障碍综合征单核细胞 HLA-DR 表达影响的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2002, 9(1): 21.
- [11] 王静恩, 蔡金芳, 王志华, 等. 血必净注射液对多发性创伤患者早期的治疗作用及对预后的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(5): 276.
- [12] Schwabe RF, Brenner DA. Mechanisms of liver injury. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290(4): 583.
- [13] Prieto J. Inflammation, HCC and sex; IL-6 in the centre of the triangle[J]. J Hepatol, 2008, 48(2): 380.
- [14] Yang Q, Li Y. Roles of PPARs on regulating myocardial energy and lipid homeostasis [J]. J Mol Med, 2007, 85(7): 697.
- [15] Heikkinen S, Auwerx J, Argmann CA. PPAR gamma in human and mouse physiology [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1771(8): 999.
- [16] Magee TR, Han G, Cherian B, et al. Down-regulation of transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor in programmed hepatic lipid dysregulation and inflammation in intrauterine growth-restricted offspring [J]. Am J Obstet Gynecol, 2008, 199(3): 271.
- [17] Straus DS, Pascual G, Li G, et al. 15-deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 97(9): 4844.
- [18] 姜景平, 徐萍, 陈令全, 等. 急性胰腺炎大鼠胰腺过氧化物酶体增殖物激活受体的表达 [J]. 中华胰腺病杂志, 2008, 8(4): 250.