

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.20.003

葛黄颗粒含药血清对乙醇诱导 L-02 肝细胞损伤的保护作用及其机制研究*

付裕^{1,2}, 郎涵^{1,2}, 陈袖伶^{1,2}, 仁德芳^{1,2}, 王洪连³, 魏喟⁴, 王晓栋⁴, 李志^{2△}

(1. 西南医科大学中西医结合学院, 四川泸州 646000; 2. 西南医科大学附属中医医院脾胃科, 四川泸州 646000; 3. 西南医科大学附属中医医院中西医结合防治器官纤维化实验室及中西医结合研究中心, 四川泸州 646000; 4. 西南医科大学附属中医医院肝胆内科, 四川泸州 646000)

[摘要] **目的** 观察葛黄颗粒含药血清对乙醇诱导的 L-02 肝细胞损伤的保护作用并探讨其分子机制。

方法 将 SD 大鼠分 3 组: 空白对照组、葛黄颗粒组 ($3.1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、美他多辛组 ($0.1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 每组 20 只, 每日灌胃给药 2 次, 连续给药 5 d 后, 取血制备含药血清。构建 3% 乙醇干预 24 h 诱导的体外肝细胞损伤模型。L-02 肝细胞分为 6 组, 包括正常组、模型组、葛黄颗粒高、中、低剂量组及阳性对照组, L-02 肝细胞接种培养 24 h 后, 正常组加入含 10% 正常大鼠血清的培养基, 模型组在正常组基础上同时加入 3% 乙醇, 葛黄颗粒高、中、低剂量组则加入 3% 乙醇及不同体积比的葛黄颗粒含药血清, 阳性对照组加入 3% 乙醇和美他多辛含药血清, 干预 24 h 后, 收集上清液及 L-02 肝细胞。采用全自动生化分析仪检测上清液天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH), 流式细胞仪检测细胞凋亡, 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 Fas、FasL、caspase3、caspase8 mRNA 的表达。**结果** 在模型组中, 细胞上清液 AST、LDH 的水平, L-02 细胞的凋亡率及 Fas、FasL、caspase3、caspase8 mRNA 的表达水平均较正常组明显增高 ($P < 0.05$), 经相应干预后, 上述各项检测指标在葛黄颗粒中、高剂量组和阳性对照组中的表达水平均显著下降 ($P < 0.05$); 中剂量组和阳性对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 高剂量组和阳性对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 葛黄颗粒含药血清可降低细胞上清液中 AST、LDH 的水平, 下调 Fas、FasL、caspase3、caspase8 mRNA 的表达, 减少凋亡率, 对酒精性肝病的保护作用可能与抑制细胞凋亡有关。

[关键词] 葛黄颗粒; 酒精性肝病; L-02 肝细胞; 分子作用; 细胞凋亡

[中图分类号] R575 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)20-2654-05

The protective effect of Gehuang granules medicated serum on the injured L-02 hepatocytes induced by ethanol and its mechanism*

FU Yu^{1,2}, LANG Han^{1,2}, CHEN Youling^{1,2}, REN Defang^{1,2}, WANG Honglian³, WEI Mei⁴, WANG Xiaodong⁴, LI Zhi^{2△}

(1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Spleen and Stomach Internal Medicine, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 3. Laboratory of Organ Fibrosis Prophylaxis and Treatment by Combine Tradition Chinese and Western Medicine/Research Center of Combine Traditional Chinese and Western Medicine, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China; 4. Department of Hepatobiliary Internal Medicine, the Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646000, China)

[Abstract] **Objective** To observe the protective effect of Gehuang granules medicated serum on the ethanol-induced injured L-02 hepatocytes and explore its mechanism. **Methods** The SD rats were divided into three groups with 20 cases in each group: the blank control group, the Gehuang granules group ($3.1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), and the metadoxine group ($0.1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), fed twice a day for five consecutive days, then collected aortic blood serum. Constructed hepatocytes injury model in vitro induced by 3% ethanol for 24 h. The L-02 hepatocytes were divided into six groups: the normal group, the model group, the high, middle and low dose Gehuang granules groups and the positive control group. After L-02 hepatocytes inoculation and cultivation for 24 h, the normal group was supplemented with medium containing 10% normal rat serum, the model

* 基金项目: 四川省泸州市科技局课题(2013LZLY-J24)。 作者简介: 付裕(1991—), 住院医师, 在读硕士, 主要从事消化系统疾病研究工作。 △ 通信作者, E-mail: 724232536@qq.com。

group was supplemented with 3% ethanol on the basis of the normal group, the high, middle and low dose Gehuang granules groups were added 3% ethanol and different doses of Gehuang granules, the positive control group was added 3% ethanol and metadoxine medicated serum, after 24-hour training, collected supernatants and L-02 hepatocytes for subsequent experiments. The aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected by automatic biochemical analyzer, and apoptosis was detected by flow cytometry. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA level of Fas, FasL, caspase3 and caspase8. **Results** The levels of AST, LDH, apoptosis rate, Fas, FasL, caspase3 and caspase8 mRNA in the model group significantly increased ($P < 0.05$); after intervention, the expressions of above indexes in the middle dose group, the high dose group and the control group decreased ($P < 0.05$), there was statistically significant difference between the middle dose group and the positive control group ($P < 0.05$), but there was no significant difference between the high dose group and the positive control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Gehuang granules medicated serum can decrease the levels of AST and LDH, down-regulate the mRNA expression of Fas, FasL, caspase3 and caspase8, reduce the apoptosis rate. The protective effect may be related to the inhibition of apoptosis.

[Key words] gehuang granules; alcoholic liver disease; L-02 hepatocytes; molecular mechanism; apoptosis

酒精性肝病(ALD)是我国常见的肝脏疾病之一,是长期大量饮酒所导致的一类疾病,严重危害人民身体健康。近年来 ALD 发病率越来越高。肝细胞凋亡在各种肝脏疾病中常常出现,其中 Fas/Fas 配体(Fas Ligand, FasL)通路是当前最重要的一条主导途径,发挥十分关键的作用。许多资料表明,在非酒精性脂肪性肝病的发展中 Fas/FasL 途径有着极其重要的影响,然而其在酒精性肝损伤的进程中所具有的影响和机制尚未阐明^[1-3]。目前 ALD 的治疗方法及药物较少,研发治疗 ALD 的新药是亟待解决的问题。本研究采用的实验模型是乙醇诱导的 L-02 肝细胞损伤模型,研究中应用葛黄颗粒含药血清来进行系列干预,并研究和分析 Fas/FasL 系统及其相关基因表达的情况,以期发现葛黄颗粒防治 ALD 的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与细胞系 健康雄性 SD 大鼠共 60 只,质量 180~220 g,由西南医科大学实验动物中心提供。人正常肝细胞 L-02,由西南医科大学附属中医医院中西医结合研究中心提供。

1.1.2 药物 葛黄颗粒药物构成:葛花、柴胡、赶黄草、虎杖、丹参、枳椇子等。将原生药制作成深褐色流浸膏以利于灌胃,2 g 原生药可制作成 1 mL 流浸膏。由西南医科大学附属中医医院制剂室提供。生产批号 20150504。美他多辛片,由山东齐都药业有限公司生产,规格每片 0.5 g。生产批号 1402002。

1.1.3 试剂 RPMI-1640 购自美国 Hyclone 公司; CCK8 购自同仁化学研究所;天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)及细胞凋亡试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;反转录试剂盒(RevertTra Ace qPCR RT Master Mix)购自日本 Tokoyo 公司。Fas 引物:上游 5'-ATAAGCCCTGTCCTCCAGGT-3',下游 5'-GTTGCTGGTGAGTGTGCATTT-3';

FasL 引物:上游 5'-AGAGAGGGAACACAGCA-CA-3',下游 5'-TGCCAGCTCCTTCTGTAGGT-3'; caspase8 引物:上游 5'-TCTGTGCCCAAATCAACAAG-3',下游 5'-GCTCTTCAAAGGTCGTGGTC-3'; caspase3 引物:上游 5'-AAATGGACCTGTTGACCTGA-3',下游 5'-CACAAAGCGACTGGATGAAC-3';内参 18S:上游 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3',下游 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'。

1.2 方法

1.2.1 葛黄颗粒含药血清的制备 雄性 SD 大鼠 60 只(180~220 g),喂养 1 周后,分为空白对照组、葛黄颗粒组及美他多辛组,3 组各 20 只,均给予一般饲料喂养。含药血清制备给药剂量参照《动物与人的每千克体重剂量折算系数表》及李仪奎^[4]提出的相关理论,最终用药剂量为葛黄颗粒组($3.1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、美他多辛组($0.1 \text{ g} \cdot 100 \text{ g}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、空白对照组(等体积蒸馏水),每天早、晚灌胃给药各 1 次,连续灌胃 5 d。最后一次灌胃前禁食 12 h,但不禁水,在最后一次灌胃给药 1 h 后,采用 2%戊巴比妥钠($0.3 \text{ mL} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$)腹腔注射麻醉,腹主动脉取血,离心转速 3 000 r/min,离心 10 min 后将上层血清吸取出来,同组血清合并归放,将收集的血清放置于 56 °C 恒温水浴箱中灭活 30 min,过滤除菌,−20 °C 保存备用。

1.2.2 细胞培养 将 L-02 肝细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,在 37 °C、5% CO₂、湿度 95% 的培养箱中培养。

1.2.3 乙醇作用浓度的确定 通过参考文献[5],将 L-02 肝细胞以每毫升 1×10^5 个接种于 96 孔板,待细胞贴壁后,更换培养液为 10% 胎牛血清和含不同浓度(0、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、5.0%)乙醇的培养液,将不含乙醇组设为对照组。于 6、12、24 h 后,分别将 96 孔板中的培养基全部吸出,然后在

96 孔板中加入浓度为 10% CCK-8 的不含胎牛血清的培养基后,再分别于 30 min、1、2、4 h 不同时间段,将酶标仪数值设定在 450 nm 处检测各孔的吸光值,然后计算 L-02 肝细胞活力。每个小组设置 5 个复孔。最后根据 L-02 肝细胞的活力选择出最合适的乙醇浓度。

1.2.4 造模时间的确定 用含 0、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、5.0% 不同浓度的乙醇作用于 L-02 肝细胞,再分别于 6、12、24 h 不同时间点收集 L-02 肝细胞上清液,最后用于测定 AST、LDH 水平。根据 AST、LDH 水平的高低,同时结合 L-02 肝细胞活力最终确定细胞造模的最佳时间。

1.2.5 细胞模型的建立和分组 用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液将 L-02 肝细胞配制成每毫升 2×10^5 个的细胞悬液,并将其接种于 6 孔板中培养,待细胞贴壁生长后分为 6 组,正常组、模型组、葛黄颗粒低、中、高剂量组、阳性对照组,正常组加入 10% 正常大鼠血清,模型组在上述基础上加入 3% 乙醇,葛黄颗粒低、中、高剂量组分别加入 3% 乙醇、不同浓度 (1.25%、2.5%、5%) 葛黄颗粒含药血清及 (8.75%、7.5%、5.0%) 正常大鼠血清,阳性对照组则加入 3% 乙醇、5% 美他多辛含药血清及 5% 正常大鼠血清。然后再培养 24 h 后,将 L-02 肝细胞及上清液收集用于后续指标检测。

1.2.6 观察指标及方法 采用日本 Olympus 公司 AU 2700 全自动生化分析仪检测细胞上清液 AST、LDH 水平。流式细胞仪检测细胞凋亡,使用反转录聚合酶链反应 (RT-PCR) 法检测 Fas、FasL、caspase3、caspase8 mRNA 的表达。

1.3 统计学处理 运用 SPSS17.0 统计软件将计量资料进行数据统计分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 乙醇作用浓度的确定 当乙醇浓度为 3.0% 时,

各时间点的细胞活力均大于 75% ($P < 0.05$),镜下观察肝细胞体积稍增大,悬浮的细胞较对照组增多。见表 1。

2.2 乙醇作用时间的确定 当乙醇浓度为 3.0% 时,作用时间为 24 h 时 AST、LDH 水平最高 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 乙醇诱导 L-02 肝细胞损伤模型的建立 模型组镜下显示,用含浓度为 3.0% 乙醇的培养液培养 L-02 肝细胞 24 h 后,其 L-02 肝细胞体积变大,悬浮未贴壁的细胞与正常组相比增多。见图 1。

2.4 各组细胞上清液 AST、LDH 水平的比较 模型组的 AST、LDH 水平均较正常组显著增加,且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组相比,高、中、低剂量组的 AST、LDH 水平均有不同程度的下降,且随着剂量越高,下降幅度越大。中、高剂量组与模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),阳性对照组 AST、LDH 水平较模型组更低 ($P < 0.05$)。阳性对照组和中剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),阳性对照组和高剂量组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

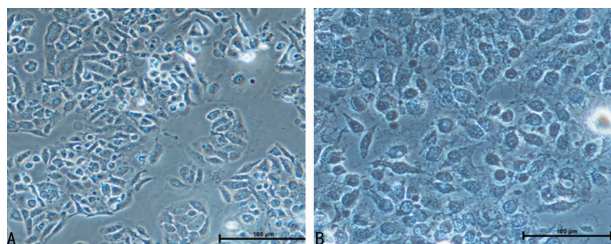
表 1 不同浓度乙醇对 L-02 肝细胞 6、12、24 h CCK8 检测结果的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

乙醇浓度 (%)	6 h	12 h	24 h
	细胞活力 (%)	细胞活力 (%)	细胞活力 (%)
0	100	100	100
0.5	119.25 ± 3.22	115.86 ± 4.08	112.85 ± 0.31
1.0	114.49 ± 3.69	117.33 ± 4.48	112.11 ± 1.75
1.5	112.62 ± 2.78	108.43 ± 5.03	97.32 ± 5.38
2.0	107.45 ± 3.64	109.58 ± 3.70	87.84 ± 4.22
2.5	100.51 ± 2.79	95.30 ± 3.64	85.76 ± 2.05
3.0	82.03 ± 6.06	79.48 ± 1.00	75.89 ± 2.16
5.0	76.14 ± 3.41	73.51 ± 5.67	61.59 ± 7.81

表 2 不同浓度乙醇作用于 L-02 肝细胞 6、12、24 h 后 AST、LDH 水平 ($\bar{x} \pm s, U/L, n = 4$)

乙醇浓度 (%)	6 h		12 h		24 h	
	LDH	AST	LDH	AST	LDH	AST
0	131.30 ± 1.85	8.50 ± 1.00	133.33 ± 0.93	8.50 ± 0.58	134.45 ± 3.18	8.00 ± 0.82
0.5	133.48 ± 3.34	8.25 ± 0.50	134.38 ± 2.69	8.25 ± 0.50	131.68 ± 2.95	9.00 ± 0.82
1.0	133.45 ± 1.89	8.25 ± 0.96	135.75 ± 2.28	8.25 ± 0.96	134.13 ± 1.05	9.00 ± 0.82
1.5	135.68 ± 0.62 ^a	8.75 ± 0.96	135.68 ± 1.36	8.75 ± 0.50	137.18 ± 1.64	8.75 ± 0.96
2.0	136.83 ± 1.92 ^a	8.50 ± 0.58	135.53 ± 2.20	9.25 ± 0.50	137.08 ± 0.86	9.75 ± 0.96
2.5	138.15 ± 1.08 ^a	9.25 ± 0.50	138.55 ± 1.54 ^a	9.00 ± 0.82	168.70 ± 11.53 ^a	13.00 ± 1.63 ^a
3.0	138.08 ± 1.15 ^a	9.25 ± 1.26	141.73 ± 1.62 ^a	9.25 ± 0.96	227.53 ± 8.52 ^a	22.25 ± 1.70 ^a
5.0	142.10 ± 1.96 ^a	9.50 ± 0.88	140.50 ± 1.39 ^a	9.75 ± 0.96 ^a	199.15 ± 3.57 ^a	21.50 ± 1.73 ^a

^a: $P < 0.05$, 与乙醇浓度 0% 比较



A: 正常组; B: 模型组

图 1 乙醇诱导的肝细胞损伤模型 (×400)

表 3 各组细胞上清液 AST、LDH 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=4, U/L$)

组别	LDH	AST
正常组	134.75 ± 3.40	12.50 ± 1.29
模型组	234.00 ± 2.16 ^a	25.75 ± 1.26 ^a
低剂量组	229.50 ± 1.29 ^b	24.50 ± 0.58 ^b
中剂量组	205.50 ± 4.20 ^{cd}	20.75 ± 0.96 ^{cd}
高剂量组	190.75 ± 2.99 ^{ce}	15.75 ± 1.26 ^{ce}
阳性对照组	189.00 ± 3.65 ^e	15.25 ± 1.26 ^e

^a: $P < 0.05$, 与正常组比较; ^b: $P > 0.05$; ^c: $P < 0.05$, 与模型组比较; ^d: $P < 0.05$; ^e: $P > 0.05$, 与阳性对照组比较

2.5 L-02 肝细胞凋亡的比较 从肝细胞凋亡率分析, 与正常组比较, 模型组 L-02 肝细胞凋亡率明显升高, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。阳性对照组和模型组相比, 均明显降低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。中、高剂量组、阳性对照组 L-02 肝细胞凋亡率和模型组相比明显下降 ($P < 0.05$)。阳性对照组和中剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 阳性对照组与高剂量组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2。

2.6 各组 L-02 肝细胞的 Fas、FasL、caspase3、caspase8 mRNA 表达水平的比较 模型组中 Fas、FasL、caspase3、caspase8 mRNA 表达水平和正常组相比, 以上指标均明显升高 ($P < 0.05$)。阳性对照组和模型组相比, 上述指标均明显降低, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 高、中、低剂量组上述指标均下降, 且随剂量的高低不同呈现出正相关, 中、高剂量组和模型组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。阳性对照组和中剂量组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 阳性对照组和高剂量组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

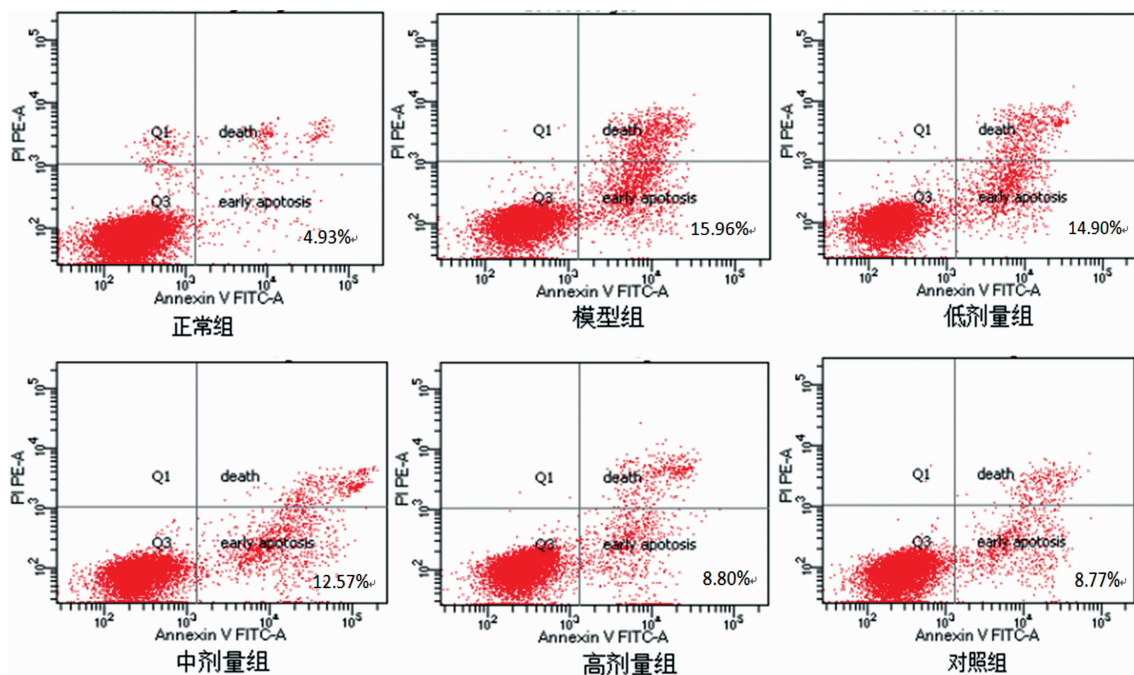


图 2 流式细胞检测各组 L-02 肝细胞凋亡

表 4 各组细胞的 Fas、FasL、caspase3、caspase8 mRNA 相对表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	Fas mRNA	FasL mRNA	caspase3 mRNA	caspase8 mRNA
正常组	1.03 ± 0.29	1.01 ± 0.11	1.01 ± 0.14	1.02 ± 0.19
模型组	2.07 ± 0.10 ^a	1.93 ± 0.16 ^a	1.99 ± 0.38 ^a	1.89 ± 0.12 ^a
低剂量组	1.95 ± 0.04 ^b	1.79 ± 0.03 ^b	1.87 ± 0.08 ^b	1.76 ± 0.13 ^b
中剂量组	1.72 ± 0.06 ^{cd}	1.40 ± 0.04 ^{cd}	1.63 ± 0.05 ^{cd}	1.36 ± 0.06 ^{cd}
高剂量组	1.50 ± 0.04 ^{ce}	1.18 ± 0.09 ^{ce}	1.32 ± 0.06 ^{ce}	1.20 ± 0.03 ^{ce}
阳性对照组	1.44 ± 0.04 ^c	1.22 ± 0.07 ^c	1.29 ± 0.05 ^c	1.19 ± 0.05 ^{ce}

^a: $P < 0.05$, 与正常组比较; ^b: $P > 0.05$; ^c: $P < 0.05$, 与模型组比较; ^d: $P < 0.05$; ^e: $P > 0.05$, 与阳性对照组比较

3 讨 论

ALD 是因长期大量饮酒所引起的肝脏损害的一系列疾病。随着我国酒文化的快速发展,使 ALD 患者数量逐渐的上升,但是当前还缺乏较好的治疗手段,且 ALD 发病机制仍不明确。较多研究者认为 ALD 的发生可能与肝细胞凋亡有关。肝细胞凋亡是引起各种肝脏疾病及肝脏损伤的非常关键的环节,所以有效降低其凋亡发生率将有可能成为一种防治肝脏疾病的重要方法^[6]。许多研究表明,细胞内及细胞外凋亡途径是引发细胞凋亡的最主要的信号转导途径^[7]。NEPAL 等^[8]研究发现 Fas/FasL 系统通路是细胞外凋亡途径中引起肝细胞凋亡最关键的一环,虽然 Fas/FasL 通路是细胞外凋亡途径,然而可以同时通过细胞内外途径激活效应分子 caspase-3, caspase-3 又能激活下游的相关基因而导致细胞凋亡的发生。美他多辛片是现在临床治疗 ALD 的主要药物,但是具有很多的不良反应,并且价格较高,所以急需研发出治疗该病的其他药物。中药与西药相比价格低廉,不良反应少,可多途径、多靶点对机体各方面起到疗效,大量研究表明中医药在治疗 ALD 方面具有显著的效果^[9-10]。大部分医家学者认为 ALD 的基本病机为肝胆不畅,以致疏泄失常。本病多因酒食无制,内损脾胃,脾胃失于运化水湿,湿浊积聚,蕴而化热,以致湿热内蕴,郁于肝胆,肝胆失于疏泄,气机内阻,继而血瘀内停,从而导致以肝脏损伤,同时波及其他多脏腑。葛黄颗粒是西南医科大学附属中医医院全国名老中医孙同郊教授在其长时间治疗 ALD 的经验之中整理归纳的经验方“葛黄解酒方”,主要有葛花、柴胡、赶黄草、虎杖、丹参、枳椇子等,主要功效为醒酒解毒、清热利湿、健脾疏肝。本方就是依据上述的基本病机化裁而来,在临床实际运用当中效果显著。前期动物实验已证实葛黄颗粒对 ALD 的防治作用^[11]。本研究是基于细胞层面对其防治 ALD 进一步探究,这对完善其治疗依据有极为关键的作用。

本实验参考大量相关文献研究,同时结合 CCK8 检测的 L-02 肝细胞活力结果及不同时间段上清液 AST、LDH 水平,最终成功建立 3%乙醇干预 24 h 诱导的体外肝细胞损伤模型。(1)当细胞损伤、凋亡或死亡时,会引起细胞膜结构的完整性受到破坏,从而造成细胞质内的 AST、LDH 进入到细胞外^[12]。本实验结果提示葛黄颗粒含药血清具有保肝降酶的功效,且该功效和含药血清的体积比呈现正相关。(2)长时间摄入酒精,会促进肝脏、胃黏膜等细胞出现凋亡,并且在酒精性肝损伤发生发展的全过程之中,始终有肝细胞凋亡的存在^[13]。本实验结果表明葛黄颗粒含药血清能有效地降低肝细胞凋亡率,且降低肝细胞凋亡率与含药血清的体积比呈正相关。(3)很多研究表明,在凋亡途径之中,死亡受体途径是一个极其关键的途径,是指配体与死亡受体结合之后造成的凋亡,而主要的配体有 FasL 等。Fas 和配体 FasL 结合后,

激活下游的效应分子 caspase8、caspase3,引发逐级活化,最终导致细胞凋亡。本研究表明葛黄颗粒含药血清可以减少 L-02 肝细胞凋亡,其主要的机制或许是抑制 Fas/FasL 途径及其下游效应因子相关。

综上所述,葛黄颗粒含药血清能够抑制 Fas/FasL 途径及其下游效应因子的活化,发挥防治 ALD 的作用。因此,通过抑制 Fas/FasL 途径及其下游效应因子的活化或许是葛黄颗粒治疗 ALD 的重要机制之一。

参考文献

- [1] 刘云龙,宋卓,彭冰洁,等. 绿原酸对 Fas/FasL 途径介导的非酒精性脂肪肝细胞凋亡的影响[J]. 中国食物与营养,2015,21(7):67-70.
- [2] LI C P, LI J H, HE S Y, et al. Roles of Fas/FasL, Bcl-2/Bax, and caspase-8 in rat nonalcoholic fatty liver disease pathogenesis[J]. Genet mol Res, 2014, 13(2):3991-3999.
- [3] 康敏,钟德君,李鹏,等. Fas/FasL 信号转导通路对 NAFLD 大鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 重庆医学,2011,40(7):633-635.
- [4] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理,1999,10(2):95-98.
- [5] 沈菲. 葛黄颗粒对酒精性肝病模型大鼠的防治作用及其机制研究[D]. 泸州:西南医科大学,2016.
- [6] WAN J, BENKDANE M, TEIXEIRA-CLERC F, et al. M2 Kupffer cells promote M1 Kupffer cell apoptosis: a protective mechanism against alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease. [J]. Hepatology, 2014, 59(1):130-142.
- [7] MORIO Y, TSUJI M, INAGAKI M, et al. Ethanol-induced apoptosis in human liver adenocarcinoma cells (SK-Hep1): Fas- and mitochondria-mediated pathways and interaction with MAPK signaling system[J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(6):1820-1829.
- [8] NEPAL S, PARK P H. Activation of Autophagy by Globular Adiponectin Attenuates Ethanol-induced Apoptosis in HepG2 Cells: Involvement of AMPK/FoxO3A Axis [J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(10):2111-2125.
- [9] 王敏,龚先琼. 茵胆平肝胶囊治疗酒精性肝病 18 例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2015, 30(11):60-62.
- [10] 郑翔鸿,王春霞,万雪梅,等. 自拟赶黄葛花汤治疗酒精性肝病 30 例临床观察[J]. 云南中医中药杂志, 2015, 36(2):35-36.
- [11] 郎涵,魏媚,汪静,等. 葛黄颗粒对酒精性肝病模型大鼠的防治作用[J]. 重庆医学, 2017, 46(3):305-307.
- [12] OH R C, HUSTEAD T R. Causes and evaluation of mildly elevated liver transaminase levels[J]. Am Fam Physician, 2011, 84(9):1003-1008.
- [13] RONIS M J, KOROURIAN S, BLACKBURN M L, et al. The role of ethanol metabolism in development of alcoholic steatohepatitis in the rat[J]. Alcohol, 2010, 44(2):157-169.