

• 论 著 •

赖氨大黄酸对胆汁淤积性肝纤维化大鼠 Smad2、Smad3 表达的影响^{*}

王 琳¹, 郝晓方², 张荣花¹, 王密斯¹, 孔艺璇¹, 冯雪妍¹, 章广玲^{1,3,△}

(1. 华北理工大学基础医学院病原生物学与免疫学教研室, 河北唐山 063000; 2. 华北理工大学附属医院检验科, 河北唐山 063000; 3. 河北省唐山市慢性病临床基础研究重点实验室 063000)

摘 要:目的 探讨赖氨大黄酸(RHL)对胆汁淤积性肝纤维化模型大鼠 Smad2、Smad3 表达的影响。方法 采用胆总管结扎(BDL)的手术方法建立大鼠胆汁淤积性肝纤维化模型, 将大鼠随机分为 5 组: 对照组、模型组、赖氨酸组、低剂量 RHL 组[35 mg/(kg·d)]、高剂量 RHL 组[70 mg/(kg·d)]。应用实时荧光定量 PCR 的方法检测大鼠肝脏组织中 Smad2、Smad3 mRNA 的相对表达量。Western blot 的方法检测 Smad2、Smad3 蛋白时相对表达量的变化。结果 与模型组大鼠比较, 经 RHL 治疗后胆汁淤积性肝纤维化大鼠肝脏组织中 Smad2、Smad3 mRNA 相对表达量降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与模型组大鼠相比, 经 RHL 治疗后胆汁淤积性肝纤维化大鼠肝脏组织中 Smad2、Smad3 蛋白的相对表达量降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 RHL 能够抑制肝纤维化的发展, 可能是通过抑制 Smad2、Smad3 mRNA 和蛋白的表达, 阻断 TGF- β 1/Smads 信号传导通路实现的。

关键词:胆汁淤积; 肝纤维化; 赖氨大黄酸; Smad2; Smad3

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2016. 16. 001 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2016)16-2233-03

Effects of rhein lysine on expression of Smad2 and Smad3 in the model of cholestatic rat with liver fibrosis^{*}

WANG Lin¹, HAO Xiaofang², ZHANG Ronghua¹, WANG Misi¹, KONG Yixuan¹, FENG Xueyan¹, ZHANG Guangling^{1,3,△}

(1. Department of Pathogen Biology and Immunology, College of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei 063000, China; 3. Tangshan Key Laboratory for Preclinical and Basic Research on Chronic Diseases, Tangshan, Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To observe the effects of rhein lysine on expression of Smad2 and Smad3 in the model of cholestatic rat with liver fibrosis. Methods The model of cholestatic hepatic fibrosis rats was established by ligation of bile duct. The rats were assigned to the following five groups: control group, model group, lysine group, lower RHL dose group[35 mg/(kg·d)] and higher RHL dose group[70 mg/(kg·d)]. The expression of Smad2 and Smad3 were detected by RT-qPCR and the changes of Smad2 and Smad3 were detected by Western blot. Results RT-qPCR showed that compared with the model group, the expressions of mRNA of Smad2 and Smad3 in both lower RHL dose group and higher RHL dose group were significantly higher ($P<0.05$). Western blot showed that compared with model group the expressions in both lower RHL dose group and higher RHL dose group were also significantly higher ($P<0.05$). Conclusion RHL can inhibit the activation and proliferation of cholestatic liver fibrosis. And this result may due to the inhibitory effect on conduction of TGF- β 1/Smadss signal as well as the protein and mRNA of Smad2 and Smad3.

Key words: cholestatic; liver fibrosis; rhein lysine; Smad2; Smad3

目前, 国内外专家从化学药物、细胞因子、基因等全方位多领域对治疗肝纤维化展开了深入的研究, 但到现在为止, 因这些治疗方案存在不足, 不能广泛应用于临床。中医在慢性病治疗中的优势逐渐在国际上被认可, 有相关研究表明, 临床中应用较多的中药主要集中于促进血液循环、消炎、保护细胞膜、促进干细胞再生等, 如丹参、三七、扶正化瘀胶囊等。大黄酸(RH)是蒽醌类化合物, 为大黄、何首乌等传统中药的主要有效

成分之一。但是大黄酸水溶性较差, 限制其进一步应用, 以赖氨酸作为溶剂对大黄酸进行结构改造获得赖氨大黄酸(RHL), 可提高其水溶性。本实验所需药物 RHL 由卫生部北京医院/卫生部老年医学研究所林雅军博士惠赠^[4]。前期研究中已经证实了 RHL 对胆汁淤积性肝纤维化大鼠具有保肝和抗肝纤维化的作用^[1-3], 但对 RHL 抗肝纤维化的具体机制目前还不明确, 仍需进一步实验验证该药物逆转肝纤维化的具

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81201281); 河北省自然科学基金资助项目(H2013209180, C2012401037, H2013209040), 河北唐山市科技计划资助项目(12140209A-4); 华北理工大学研究生创新项目(2015S16, 2015S17); 国家级、省级大学生创新项目(201410081021)。

作者简介: 王琳, 女, 在读硕士, 主要从事肝纤维化发病机制和治疗研究。 △ 通讯作者, E-mail: zhguangling@aliyun.com。

体作用机制,从而提供治疗纤维化的实验数据或可行的方法。

1 材料与方法

1.1 材料来源及主要试剂和仪器 SD 雄性大鼠,购于天津实验动物研究所,体质量 240~280 g,于恒温(22℃)、恒湿(65%~70%)的环境中饲养 3 d 后实验。RHL(自制,纯度 98%,相对分子质量:430,室温储存)^[1];Trizol 总 RNA 提取试剂、M-MLV 酶 cDNA 第一链合成试剂盒、PCR 试剂盒(美国 invitrogen 公司),引物由上海生物工程有限公司设计并合成;RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(Beyotime 公司);Smad2、Smad3 抗体(ABCCOME 公司);GAPDH 抗体、抗兔二抗(KPL 公司)。FLUKO 超细匀浆机(F6/10-8G),5810R 低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司),PCR 扩增仪(德国 Eppendorf 公司),Gemini EM 荧光读板机(美国 Molecular Devices 公司),电泳转印系统、凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠胆汁淤积性肝纤维化模型的建立 首先测量每只大鼠的体质量,按 3 mL/kg 的比例腹腔注射 10%的水合氯醛进行麻醉,固定于手术台上,沿大鼠腹中线左侧肋下处剪出一个小心,剪开肌肉组织后找到肝脏,于肝脏和十二指肠连接处分离胆总管,分别结扎其近端和远端后从中间剪断胆总管。然后关闭腹腔,采用连续缝合肌肉,间断缝合皮肤,青霉素伤口覆盖,让大鼠平躺至苏醒,手术结束^[2-3]。对于对照组只开腹但不结扎胆总管。

1.2.2 动物分组及处理 设对照组、模型组、赖氨酸组、低剂量 RHL 组[35 mg/(kg·d)]、高剂量 RHL 组[70 mg/(kg·d)]。将动物按体质量随机分组,每组 3 只。用药方案:赖氨酸组、RHL 组灌胃给药。对照组、模型组灌胃等量生理盐水。所有实验大鼠在整个实验期间均自由饮食、饮水。

1.2.3 标本收集 治疗 2 周后称质量,采集标本,术前大鼠禁食水 8 h,按 3 mL/kg 的比例腹腔注射 10%水合氯醛进行麻醉,开腹后留取肝脏组织,用 4℃预冷的生理盐水冲洗 3 次,肝大叶中央纵切取 3~4 mm 肝组织(整个操作在冰上进行),迅速置于液氮中速冻,后放置于-80℃冰箱中长期保存。

1.2.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测 Smad2、Smad3 相对水平 取-80℃冰箱中冻存的大鼠肝脏组织,采用 Trizol 酚氯仿方法提取各组大鼠肝脏组织总 RNA,样品在 260~280 nm 处检测吸光度值(A),按 1 OD=40 μg/mL RNA 计算 RNA 的产量。A260/A280 在 1.8~2.0 方可使用。用双蒸水为空白对照,按如下公式计算总 RNA 的浓度,用时调整 RNA 浓度为 1 μg/μL。

$$A_{260} \times 40 \times \text{稀释倍数} / 1\,000 = \mu\text{g} / \mu\text{L RNA}$$

以 RNA 为模板,使用 M-MLV 逆转录酶进行第一链 cDNA 的合成,构建 20 μL 的反应体系可以逆转录 1 ng~5 μg 总 RNA。逆转录反应体系 20 μL:组织总 RNA 2 μL,Oligo(dT) 1 μL,dNTP 混合物(10 mmol)1 μL,5×第一链合成缓冲液 4 μL,0.1 mol/L DTT 2 μL,RNaseOUT™ 核酸酶抑制剂(40 / μL)1 μL,M-MLV 逆转录酶(200 / μL)1 μL,其余用无 RNA 酶的 DEPC 水补齐至 20 μL。反应条件为:37℃孵育 50 min,70℃加热 15 min 灭活 M-MLV 反转录酶以终止反应,-20℃保存备用。取 cDNA 进行 PCR 检测,反应体系 20 μL:cDNA 产

物 2 μL,上下游引物(10 nmol)各 1 μL,dNTP 1 μL,Taq 2 μL,其余用无 RNA 酶的 DEPC 水补齐至 20 μL。加样完成后震荡混匀,瞬间离心后,置于 PCR 仪扩增。设置反应条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 15 s,58℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,循环 30 次,72℃延伸 5 min。在反应结束后,以 Comparative Deltadelta Ct 相对定量方法分析结果。

1.2.5 Western blot 检测 Smad2、Smad3 相对水平 称取 1 g 冻存的肝脏组织,按比例加入新鲜配制的 RIPA 裂解液,在冰上匀浆 1 min,4℃裂解 20 min,离心(4℃、12 000 r/min)15 min,留取上清液,BCA 法检测蛋白浓度。12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)将等量蛋白(50 μg)分离后,电转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,按照 Maker 将条带进行切割,分别入抗 GAPDH(1:1 000),Smad2(1:10 000)和 Smad3(1:10 000)的抗体,4℃冰箱孵育过夜。第二天取出,TBST 溶液洗膜 10 min×4 次,含辣根过氧化物酶(HRP)标记的抗兔二抗(1:5 000)室温孵育 2 h,洗膜 10 min×4 次,按照试剂说明配制化学发光增强剂(BeyotimeECL Plus),滴加到膜上,使用凝胶成像仪采集图片,ImageJ 图像分析软件测量条带灰度值,目的条带与 GAPDH 条带灰度值的比值即为目的蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RT-qPCR 检测各实验组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 mRNA 的表达水平 采用 RT-qPCR 技术检测各实验组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 mRNA 的相对表达量。与对照组比较,模型组大鼠纤维化肝组织中 Smad2、Smad3 mRNA 的表达量升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,赖氨酸组、RHL 组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 mRNA 的表达量均降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。与赖氨酸组比较,RHL 组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 mRNA 的表达量均降低,差异具有统计学意义($P < 0.05$);且高剂量 RHL 组降低较低剂量 RHL 组明显,见表 1。

表 1 RT-qPCR 法测各组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 mRNA 表达水平($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Smad2	Smad3
对照组	1	1
模型组	76.44±5.56 ^a	51.22±2.79 ^a
赖氨酸组	35.55±2.04 ^{ab}	31.43±1.62 ^{ab}
低剂量 RHL 组	10.50±1.07 ^{abc}	7.80±0.99 ^{abc}
高剂量 RHL 组	5.03±0.85 ^{abc}	0.96±0.09 ^{abc}
F	399.467	644.470
P	0.002	0.001

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与模型组相比,^b $P < 0.05$;与赖氨酸组相比,^c $P < 0.05$ 。

2.2 Western Blot 检测各实验组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 蛋白的相对表达量 采用 Western blot 法检测各实验组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 蛋白的相对表达量。与对照组比较,

模型组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 蛋白相对表达量升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,RHL 组和赖氨酸组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 蛋白的相对表达量降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与赖氨酸组比较,RHL 组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 蛋白相对表达量降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),且高剂量 RHL 组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 蛋白相对表达量降低较低剂量组明显,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 1、表 2。

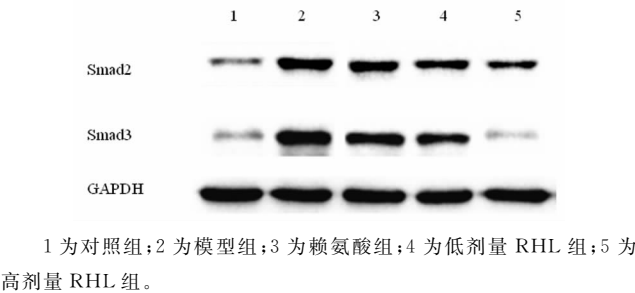


图 1 Western blot 法检测各组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 表达电泳图

表 2 Western blot 法测各组大鼠肝组织中 Smad2、Smad3 蛋白相对表达水平 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

组别	Smad2	Smad3
对照组	0.27±0.01	0.17±0.02
模型组	0.92±0.04 ^a	0.93±0.04 ^a
赖氨酸组	0.76±0.07 ^{ab}	0.69±0.06 ^{ab}
低剂量 RHL 组	0.66±0.02 ^{abc}	0.52±0.06 ^{abc}
高剂量 RHL 组	0.49±0.01 ^{abcd}	0.1±0.08 ^{bcd}

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与赖氨酸组相比,^c $P<0.05$;与低剂量 RHL 组相比,^d $P<0.05$ 。

3 讨 论

肝纤维化可发展到肝硬化,直至肝癌,是所有慢性肝病晚期的共同病理基础^[4]。目前认为,TGF-β 是一种广泛分布于组织中的促纤维化细胞因子,属于转化生长因子超家族,可由多种细胞合成,可参与哺乳动物的各种病理生理过程^[5]。其中 TGF-β1 是激活星状细胞(HSC),促进肝纤维化形成过程中的关键因子,很多实验研究表明 TGF-β1 可促进肝纤维化的发生和发展^[6-7]。Smads 家族蛋白是目前可知的唯一的 TGF-β1 受体的胞内底物,是 TGF-β1 信号从受体到细胞核的传导分子,可介导 TGF-β1 细胞内信号传导^[8]。Smad2、Smad3 是受体激活型的 Smad(R-Smad),可被活化的 TGF-β1 磷酸化,激活 TGF-β1/Smads 信号传导通路,促进肝纤维化的形成与发展^[9-10]。

在前期研究中,本课题组发现 RHL 能抑制 HSC 激活及肝脏纤维变性,并通过抑制 α-SMA 蛋白的表达,来抑制 HSC 的活化^[11]。在本实验中,经 RHL 治疗的胆汁淤积性肝纤维化大鼠,其 Smad2、Smad3 的 mRNA 和蛋白相对表达量均降低。由实验结果发现,虽然赖氨酸组大鼠的 Smad2、Smad3 的 mRNA 和蛋白的相对表达量均低于模型组,差异有统计学意义;

但 RHL 组大鼠的 Smad2、Smad3 的 mRNA 和蛋白的相对表达量明显低于赖氨酸组,且高剂量 RHL 组效果优于低剂量 RHL 组。

综上所述,RHL 可能是通过下调胆汁淤积性肝纤维化大鼠肝组织内 Smad2、Smad3 mRNA 和蛋白的表达,靶向阻断 Smad2、Smad3 信号,反馈抑制 HSC 的活化和增殖,进一步阻断了肝内胶原过度沉积和 TGF-β1 的分泌与释放,从而减轻和控制肝纤维化进一步发展。证实了 RHL 具有良好的抗肝纤维化的疗效,其作用的发挥与剂量大小成正相关,其发挥作用的确切机制之一是通过抑制 TGF-β1/Smads 信号传导通路。

参考文献

[1] 林雅军,甄永占,魏洁,等. 赖氨大黄酸盐的合成工艺及活性研究[J]. 中国现代应用药学,2010,27(11):1010-1012.

[2] 刘玲,谭正怀. 胆总管结扎致肝纤维化动物模型研究现状[J]. 重庆医学,2013,42(23):2793-2796.

[3] 刘迎春,顾小红. SD 大鼠胆汁淤积性肝纤维化动物模型的建立与评价[J]. 重庆医学,2012,41(5):458-460.

[4] Germani G,Burroughs AK,Dhillon AP. The relationship between liver disease stage and liver fibrosis: a tangled web [J]. Histopathology,2010,57(6):773-784.

[5] Klironomos S,Notas G,Sfakianaki O,et al. Octreotide modulates the effects on fibrosis of TNF-α, TGF-β and PDGF in activated rat hepatic stellate cells[J]. Regul Pep, 2014, 188 (1):5-12.

[6] Lee WR,Kim KH,An HJ, et al. Apamin inhibits hepatic fibrosis through suppression of transforming growth factor β1-induced hepatocyte epithelial-mesenchymal transition[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 450 (2): 195-201.

[7] Hernandez-Gea V,Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Annual review of pathology, 2011, 6 (4): 425-456.

[8] Pratap A,Singh S,Mundra V, et al. Attenuation of early liver fibrosis by pharmacological inhibition of smoothened receptor signaling[J]. J Drug Targeting, 2012, 20(9): 770-782.

[9] Go Elpek. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(23): 7260-7276.

[10] 张华,戴立里,曾维政,等. 红景天甙对大鼠肝组织 TGF-β1/Smads 信号通路的作用[J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(6): 699-703.

[11] 郝晓方,张荣花,王琳,等. 赖氨大黄酸对胆汁淤积性肝纤维化模型大鼠的治疗作用及其分子机制[J]. 吉林大学学报, 2015, 41(3): 481-485.