

progesterone receptors in uterine smooth muscle tumors[J].Coll Antropol,2010,34(1):93-97.

[9] O'Neill CJ, McBride HA, Connolly LE, et al. Uterine leiomyosarcomas are characterized by high p16, p53 and MIB1 expression in comparison with usual leiomyomas, leiomyoma variants and smooth muscle tumours of uncertain malignant potential[J].Histopathology,2007,50(7):851-858.

[10] 徐小义,胡坚.食管癌中 P53 和 Rb 信号通路变化及临床意义

[J].中华实验外科杂志,2016,2(33):505-508.

[11] Ismail A, Bandla S, BeveiUer M, et al. Early G cyclin-dependent kinases prognostic markers and potential therapeutic targets in esophageal adenocarcinoma[J].Clin Cancer Res,2011,17(13):4513-4522.

(收稿日期:2018-12-28)

(本文编辑:隋会敏)

益肝胶囊对刀豆蛋白 A 所致小鼠肝损伤 TGF-β1 和 ICAM-1 表达的影响

徐强 高艺书 侯志涛 李东东 韩玉生

【摘要】 目的 研究益肝胶囊对刀豆蛋白 A 所致小鼠肝损伤 TGF-β1 和 ICAM-1 表达的影响及作用机制。**方法** SPF 小鼠 50 只随机分为正常组、模型组及益肝胶囊高、中和低剂量组,每组各 10 只,连续灌胃给药 14 d。末次给药后 1 h 除正常组外,其余各组小鼠均一次性尾静脉注射 ConA 20 mg/kg 诱导小鼠肝损伤。检测血清 ALT、AST、TGF-β1 和 ICAM-1 水平;免疫组化法检测肝组织 TGF-β1 和 ICAM-13 蛋白表达;并观察肝组织病理变化。**结果** 与模型组比较,益肝胶囊各组小鼠血清 ALT、AST、TGF-β1 和 ICAM-1 水平显著降低($P < 0.01$);肝组织 TGF-β1 和 ICAM-1 蛋白表达显著降低;肝病理损伤程度明显减轻。**结论** 益肝胶囊通过调控 TGF-β1 和 ICAM-1 蛋白表达对刀豆蛋白 A 所致小鼠肝损伤起到保护作用。

【关键词】 益肝胶囊; 肝损伤; TGF-β1; ICAM-1

[中图分类号]R285 [文献标识码]A DOI:10.3969/j.issn.1002-1256.2019.04.006

在前期实验研究中发现益肝胶囊对免疫性肝损伤小鼠具有抗氧化、抗炎和抑制 HMGB1 蛋白表达的等药理作用^[1-2]。为进一步探讨其对免疫性肝损伤保护作用,本文研究益肝胶囊对刀豆球蛋白 A 所致小鼠肝损伤 TGF-β1 和 ICAM-1 表达的影响。现报道如下。

一、材料

1. 实验动物:50 只雄性 SPF 级昆明种小鼠,体重(20±2)g,由黑龙江中医药大学实验动物中心提供,实验动物生产许可合格证号:SCXK 黑 2013-004。适应性饲养 5 天,实验期内小鼠均自由饮食。

2. 药品与试剂:益肝胶囊由丹参、苦参和五味子按 3:1:3 比例组成,经提取加工后制成胶囊制剂,0.4 g/粒,成人每日三次,每次 3 粒,由黑龙江中医药大学实验中心提供;刀豆蛋白 A(ConA),美国 sigma 公司;ALT、AST 测定试剂盒,中生北控生物科技股份有限公司;小鼠 TGF-β1 和 ICAM-1 酶联免疫

试剂盒,武汉博士德生物工程公司;TGF-β1 和 ICAM-1 抗体,北京博奥森公司;二抗 PV6001 和 DAB 显色剂,北京中山;其余试剂为国产分析纯试剂。

3. 仪器:2135 型组织切片机(德国莱卡);Moticam3000 显微摄影成像系统(美国 Motic);A-6 半自动生化分析仪(北京松下技术有限公司);DNM-9602 型酶标仪(北京普朗新技术有限公司);高速离心机(科大创新)。

二、方法

1. 分组给药和模型制备^[3]:50 只小鼠随机分成正常组、模型组、益肝胶囊高、中和低剂量组,每组各 10 只。益肝胶囊高、中和低剂量组分别按 1.872 g/kg、0.936 g/kg 和 0.468 g/kg 连续灌胃给药 14 d,每日 1 次,正常组及模型组给予等体积的生理盐水。末次给药后 1 h,除正常组外,其余各组小鼠均一次性尾静脉注射 ConA 20 mg/kg 诱导小鼠肝损伤,禁食不禁水 8 h 取材检测。

2. 指标检测:采用生化法检测各组小鼠血清 ALT、AST 水平,ELISA 法检测血清中 TGF-β1 和 ICAM-1 水平,严格按试剂盒说明书进行操作。HE

基金项目:黑龙江省教育厅面上项目(12531608)

作者单位:150040 黑龙江哈尔滨,黑龙江中医药大学

通信作者:韩玉生,Email:hysh1973@126.com

染色后显微镜观察肝组织病理变化。免疫组化检测肝组织 TGF- β 1 和 ICAM-1 蛋白表达, Motich 3000 显微摄影系统于 400 倍下摄片, 采用 Image-pro plus 6.0 病理图像分析系统进行分析, 以积分光密度 (IOD) 代表 TGF- β 1 和 ICAM-1 蛋白相对表达量。

3. 统计学分析: 采用 SPSS 18.0 统计软件分析处理实验数据, 结果以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

三、实验结果

1. 各组小鼠肝脏病理病理学变化: 正常组小鼠肝组织结构完整, 肝细胞板排列规整, 胞质胞核染色清晰, 未见炎细胞浸润和充血。模型组肝组织结构紊乱, 可见大量炎细胞浸润, 局部肝细胞肿胀、脂肪样变或散在点状坏死。益肝胶囊组肝组织结构较清晰, 炎细胞数目明显减少, 肝细胞肿胀或脂肪样变明显减轻。

2. 各组小鼠血清 ALT、AST 水平的变化: 与正常组比较, 模型组 ALT 和 AST 水平均明显增高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 益肝胶囊给药组 ALT 和 AST 水平均有不同程度的降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组小鼠血清 ALT 和 AST 水平 ($\bar{x} \pm s$),

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常组	178.36 \pm 10.26	101.71 \pm 8.53
模型组	260.76 \pm 22.39**	162.04 \pm 8.66**
高剂量组	187.12 \pm 8.68##	106.59 \pm 8.56##
中剂量组	195.29 \pm 10.85##	112.00 \pm 9.18##
低剂量组	206.13 \pm 16.18##	127.93 \pm 5.85##

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3. 各组小鼠血清 TGF- β 1 和 ICAM-1 水平的变化: 与正常组比较, 模型组 TGF- β 1 和 ICAM-1 水平均明显增高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 益肝胶囊给药组 TGF- β 1 和 ICAM-1 水平均有不同程度的降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 各组小鼠血清 TGF- β 1 和 ICAM-1 水平 ($\bar{x} \pm s$),

组别	TGF- β 1 (pg/ml)	ICAM-1 (pg/ml)
正常组	51.38 \pm 6.21	34.25 \pm 4.75
模型组	112.37 \pm 8.81**	91.33 \pm 6.24**
高剂量组	64.29 \pm 7.53##	42.54 \pm 4.73##
中剂量组	73.28 \pm 5.47##	51.29 \pm 5.73##
低剂量组	81.82 \pm 7.16##	63.72 \pm 7.11##

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

4. 各组小鼠肝组织 TGF- β 1 和 ICAM-1 蛋白表达: 与正常组比较, 模型组 TGF- β 1 和 ICAM-1 蛋白表达明显增高 ($P < 0.01$); 与模型组相比, 益肝胶囊给药组 TGF- β 1 和 ICAM-1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 各组小鼠肝组织 TGF- β 1 和 ICAM-1 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$),

组别	TGF- β 1 (IOD 值)	ICAM-1 (IOD 值)
正常组	415.29 \pm 35.37	345.57 \pm 41.25
模型组	978.45 \pm 63.75**	879.45 \pm 56.88**
高剂量组	542.87 \pm 41.26##	425.67 \pm 39.47##
中剂量组	634.89 \pm 39.57##	512.66 \pm 61.38##
低剂量组	715.63 \pm 50.46##	586.38 \pm 51.28##

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

讨论 益肝胶囊由丹参、五味子和苦参三味中药组成, 临床治疗病毒性肝炎、酒精肝、脂肪肝等急慢性肝病取得很好的疗效。前期的药理学研究表明益肝胶囊, 能减少炎症细胞因子 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 等的释放, 显著降低血清中 ALT、AST 的活性, 同时具有抗氧化作用, 对 Con A 诱导的小鼠免疫性肝损伤有明显的保护作用。

TGF- β 1 是可使肝星形细胞分泌胶原纤维明显增多, 是导致肝纤维化的重要因素, 且与炎症程度呈正相关。ICAM-1 是血管内皮细胞表达的重要的粘附分子, 与 LFA-1 和 Mac-1 等结合, 能促进淋巴细胞、巨噬细胞及中性粒细胞与血管内皮细胞的粘附, 引起炎症损伤^[4-5]。本研究结果显示: 益肝胶囊能显著降低模型组小鼠血清 ALT、AST、TGF- β 1、ICAM-1 水平; 降低肝组织 TGF- β 1 和 ICAM-1 蛋白表达, 明显减轻肝病损伤程度。益肝胶囊可能通过降低 TGF- β 1 和 ICAM-1 表达, 抑制炎症细胞粘附, 减轻炎症反应, 对肝损伤起到保护作用。

参考文献

- [1] 徐强, 韦永昌, 徐启铭, 等. 益肝胶囊对免疫性肝损伤小鼠 HMGB1 蛋白表达的影响 [J]. 中医药学报, 2016, 44(6): 48-50.
- [2] 徐强, 孙笑姝, 朱刚, 等. 益肝胶囊对免疫性肝损伤小鼠保护作用及细胞因子表达的影响 [J]. 中医药信息, 2016, 33(3): 17-19.
- [3] 俞发. 当归多糖对刀豆蛋白 A 致小鼠免疫性肝损伤的保护作用 [J]. 中药材, 2009, 32(10): 1580-1583.
- [4] 郑晨宏, 谢晓华. 刀豆蛋白 A 诱导肝损伤模型中免疫细胞及因子研究进展 [J]. 解放军医学院学报, 2016, 37(2): 191-194.
- [5] 谢军, 韩造木, 尹琬凌, 等. 丹参多酚酸盐对刀豆蛋白 A 诱导小鼠免疫性肝损伤的保护作用 [J]. 中药材, 2017, 40(11): 2686-2688.

(收稿日期: 2018-12-14)

(本文编辑: 卜明)