

黄芩对大鼠肝硬化内毒素血症肠黏膜损伤的保护性机制研究

刘昉 叶峰 邹文静 邱根全 刘小静 蔺淑梅 杨雪亮

【摘要】目的 探讨黄芩对大鼠肝硬化内毒素血症肠黏膜损伤的保护性机制。**方法** 复合因素造模法建立肝硬化内毒素血症大鼠模型。模型确立后将大鼠随机分为3个实验组,即模型组、黄芩组治疗组和谷氨酰胺治疗组,每组各20只;另设正常对照组大鼠10只。各组大鼠给予灌胃治疗,共2周。实验结束后,采用ELISA法检测大鼠血清内毒素水平,TUNEL法检测各组大鼠肠黏膜细胞凋亡并计算凋亡率,采用RT-PCR检测肠黏膜细胞凋亡相关基因Bcl-2 RNA和Bax RNA的表达水平。**结果** 3个实验组较正常对照组大鼠内毒素组水平均显著升高($F = 3.31, P < 0.05$);其中模型组显著高于黄芩治疗组($q = 5.12, P = 0.0000$);黄芩治疗组显著低于谷氨酰胺组($q = 3.74, P = 0.0123$)。3个实验组与正常对照组比较,肠黏膜细胞的凋亡率均显著升高($F = 4.77, P < 0.01$);其中模型组显著高于黄芩治疗组和谷氨酰胺组($q = 4.56、4.35, P$ 均 < 0.01);黄芩治疗组显著低于谷氨酰胺组($q = 3.78, P = 0.012$)。3个实验组与正常对照组比较,肠黏膜组织Bcl-2 mRNA水平显著下降($F = 3.55, P < 0.05$);其中模型组显著低于黄芩治疗组和谷氨酰胺治疗组($q = 3.89、3.40, P < 0.05$);黄芩治疗组显著高于谷氨酰胺组($q = 2.77, P < 0.05$)。3个实验组大鼠肠黏膜Bax mRNA水平则显著高于正常对照组($F = 3.67, P < 0.05$);模型组显著高于黄芩治疗组和谷氨酰胺治疗组($q = 3.62、2.91, P < 0.05$);黄芩治疗组显著低于谷氨酰胺组($q = 2.85, P < 0.05$)。**结论** 黄芩能够通过降低肠黏膜细胞的凋亡而减少肝硬化内毒素血症的发生。

【关键词】 黄芩;肝硬化;内毒素血症;肠黏膜;凋亡

Protective mechanism of Scutellaria baicalensis georgi on the intestinal mucosal injury of endotoxemia in rats with liver cirrhosis LIU Yi, YE Feng, ZOU Wen-jing, QIU Gen-quan, LIU Xiao-jing, LIN Shu-mei, YANG Xue-liang. Department of Traditional Chinese Medicine, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China
Corresponding author: YE Feng, Email: yefeng.jiaotong@163.com

【Abstract】Objective To explore the protective mechanism of Scutellaria baicalensis georgi on the intestinal mucosal injury of endotoxemia in rats with liver cirrhosis. **Methods** Compound factors modeling was used to establish endotoxemia rat model with liver cirrhosis. The rats were randomly divided into 3 experimental groups: model group, the scutellaria treatment group and glutamine treatment group with 20 in each group. There were 10 rats in normal control group. Gavage was conducted to each group for 2 weeks. At the end of the experiment, serum endotoxin levels of rats and intestinal mucosa apoptosis of rats in each group were detected by ELISA and TUNEL, respectively. And the expression levels of gene Bcl-2 RNA and Bax RNA related to intestinal mucosa apoptosis were detected by RT-PCR. **Results** The endotoxin level of the three experimental groups was significantly elevated compared with that of the normal control group ($F = 3.31, P < 0.05$). The endotoxin level of the model group was significantly higher than that of the scutellaria treatment group ($q = 5.12, P = 0.0000$). The endotoxin level of the scutellaria treatment group was significantly lower than that of the glutamine group ($q = 3.74, P = 0.0123$). The increase of intestinal mucosal apoptosis rate in the three experimental groups was significantly higher than that of the normal

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2013.06.002

基金项目: 陕西省中医药管理局科研课题项目 (No. jc30)

作者单位: 710061 西安市, 西安交通大学医学院第一附属医院中医科 (刘昉、邹文静、邱根全); 西安交通大学医学院第一附属医院传染科 (叶峰、刘小静、蔺淑梅、杨雪亮)

通讯作者: 叶峰, Email: yefeng.jiaotong@163.com

control group ($F = 4.77, P < 0.01$). The intestinal mucosal apoptosis rate of the model group was significantly higher than that of the scutellaria treatment group and the glutamine group ($q = 4.56, 4.35; P = 0.0000$). The rate of intestinal mucosal apoptosis in the scutellaria treatment group was significantly lower than that of the glutamine group ($q = 3.78, P = 0.012$). The intestinal mucosal Bcl-2 mRNA level of the three experimental groups significantly decreased than that of the normal control group ($F = 3.55, P < 0.05$). The intestinal mucosal Bcl-2 mRNA levels of the model group were significantly lower than that of the scutellaria treatment group and the glutamine treatment group ($q = 3.89, 3.40; P < 0.05$). The intestinal mucosal Bcl-2 mRNA level of the scutellaria treatment group was significantly higher than that of the glutamine group ($q = 2.77, P < 0.05$). The intestinal mucosal Bax mRNA level of the three experimental groups was significantly higher than that of the normal control group ($F = 3.67, P < 0.05$). The intestinal mucosal Bax mRNA level of the model group was significantly higher than that of the scutellaria treatment group and the glutamine treatment group ($q = 3.62, 2.91; P < 0.05$). The intestinal mucosal Bax mRNA level of the scutellaria treatment group was significantly lower than that of the glutamine group ($q = 2.85, P < 0.05$). **Conclusions** Scutellaria baicalensis georgi could reduce the occurrence of liver cirrhosis endotoxemia by reducing intestinal mucosal apoptosis.

【Key words】 Scutellaria baicalensis georgi; Liver cirrhosis; Endotoxemia; Intestinal mucosa; Apoptosis

肝硬化容易并发内毒素血症,而且内毒素血症也是引起疾病进展以及发生多器官功能衰竭的重要因素。肝硬化内毒素血症的形成机制现有很多研究^[1-2],其中肝硬化后门脉高压造成肠黏膜水肿、缺血,进一步肠黏膜细胞发生坏死、凋亡,使肠道保护功能下降、肠道菌群移位,而造成内毒素入血形成内毒素血症被认为是主要原因^[3-5]。显然,该机制中肝硬化为始动因素,但内毒素血症形成的关键环节是肠黏膜完整性的消失,即肠黏膜细胞的凋亡及坏死。因此,治疗肝硬化内毒素血症的关键因素就是肠黏膜细胞的坏死和凋亡。

中医理论认为肝硬化合并内毒素血症是正虚邪盛的表现,治疗应以清热解毒、活血化瘀为主^[6]。现代中医研究发现黄芩具有细胞保护和抗凋亡的作用,并在心肌细胞、肝细胞和肾细胞等多种细胞的研究中得以证实^[7-9],其机制可能是通过调节与细胞凋亡有关的基因,例如B淋巴细胞瘤-2基因(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、自杀相关因子(factor associated suicide, FAS)和胱冬肽酶(caspase-3)等发挥作用^[10-11],但对肠黏膜细胞的保护作用以及肠黏膜上皮细胞凋亡与内毒素血症的关系尚无研究。

本研究拟在前期已明确证实黄芩能够降低肝硬化大鼠及患者体内的内毒素水平的基础上,进一步探讨黄芩对肠黏膜上皮细胞的保护作用以及其与内毒素血症的关系。

材料与方 法

一、实验动物

健康清洁8周龄SD大鼠90只,体重190~220 g,

均购自西安交通大学实验动物中心。动物合格证号:陕医动字08-005。

二、实验材料

黄芩购自西安交通大学第一附属医院中药房,谷氨酰胺购自西安交通大学第一附属医院西药房,四氯化碳(CCl_4)分析纯购自天津市纵横兴工贸有限公司化工试剂分公司,橄榄油分析纯购自国药集团化学试剂有限公司。大鼠内毒素定量检测试剂盒购自北京金山川科技发展有限公司,细胞凋亡试剂检测盒购自博奥森生物工程有限公司。

三、实验方法

1. 试剂配制: CCl_4 油溶液: CCl_4 40 ml溶解于橄榄油60 ml中,配成40%的 CCl_4 油溶液,常温保存。30%酒精饮料:无水乙醇与动物标准饮用水按照3:7体积配制,常温保存。黄芩煎剂:保持煎煮中药操作程序一致,即煎煮容器一致、煎煮火候一致、加水体积一致、煎煮时间一致、同一人操作。药材经自来水浸泡40 min,第1遍煎煮时加6倍水,第2遍加3倍水。严格控制煎煮时间,沸腾后,用控温电炉保持微沸30 min。合并2次煎液,脱脂棉过滤,90℃水浴浓缩至1000 g/L浓度。冷藏保存,用时温热。谷氨酰胺溶液:15 g谷氨酰胺溶于15 ml蒸馏水,配制为1g/ml溶液。

2. 肝硬化内毒素血症大鼠模型的建立:采用 CCl_4 联合高脂饮食的复合因素造模法进行肝硬化内毒素血症大鼠模型的造模^[12]。动物常规适应性饲养1周后开始实验,随机分为模型组80只及正常对照组10只。第8周时随机选取5只模型组大鼠进行肝脏组织病理及血清内毒素水平检测,确定肝硬化内毒素血症鼠模型成立后,再进行后续实验。造模期间

肝硬化内毒素血症大鼠共有15只因肝功能衰竭死亡,病死率为6%,正常对照组及各治疗组均无大鼠死亡。

3. 给药方法:将造模成功后的模型组大鼠60只随机分为3个实验组:黄芩治疗组、谷氨酰胺组和模型对照组,每组各20只。

自第9周开始,每日清晨8:00给予实验动物灌胃1次,用药剂量按成人日常用剂量10 g/60 kg,参考《药理实验方法学》第3版不同种属动物体型系数换算公式计算。黄芩组1 ml/100 g灌服黄芩水煎剂,谷氨酰胺组灌服1 ml/100 g谷氨酰胺水溶液、空白对照组灌服1 ml/100 g生理盐水,灌胃时间共计2周。

4. 标本采集制备:治疗后第14天,即末次给药24 h禁食后,进行标本采集。记录大鼠体重后,以10%水合氯醛溶液1 ml/100 g腹腔注射麻醉后,在无菌条件下打开腹腔,在无热原条件下采腹主动脉血,注入去热原试管,留做ELISA检测。

采血完毕后,暴露肝脏,肠道取回肠组织约3 cm,一部分置于4%多聚甲醛溶液内留做TUNEL检测,另一部分置于液氮中保存备用。

5. 双抗体两步夹心酶联免疫吸附法检测血清内毒素水平:按照试剂盒说明书完成血清内毒素水平的检测。

实验结果的判定:在酶标仪450 nm处读取其吸光度(A)值,以A值为纵坐标,以标准品浓度为横坐标,绘制标准曲线,根据待测血清样品的A值在标准曲线上查出其浓度,所得数据以平均值表示。

6. TUNEL法检测肠黏膜细胞凋亡:按照试剂盒说明书完成肠黏膜细胞凋亡的检测。

染色结果判定及凋亡率的计算。细胞核染为黄色为凋亡细胞。TUNEL阳性细胞定量:在高倍($\times 400$)视野下行肠黏膜细胞计数。每例取5个高倍视野,每个视野至少计数200~400个细胞,数其中的凋亡细胞数。凋亡细胞数/所计细胞数 $\times 100\%$ = 该视野的凋亡率,5个视野的凋亡率的平均值既为该组大鼠肠黏膜细胞的凋亡率。

7. RT-PCR检测凋亡基因Bcl-2、Bax的RNA:引物的合成:根据Bcl-2、Bax和 β -actin的cDNA序列,分别设计两对引物,Bcl-2的上游引物为5'-GAACTGGGGGAGGATTGTGG-3',下游引物为5'-CCACCGAACTCAAAGAAGG-3',产物长度269 bp。Bax的上游引物为5'-GTTACAGGGTTTCATCCAGG-3',下游引物为5'-CAAAGTAGAAGAGGGCAACC-3',产

物长272 bp;管家基因 β -actin的上游引物为:5'-AACCCCTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3',下游引物为:5'-TCATGAGGTAGTCTGTCAG-3',产物长度241 bp。所有引物均由北京奥科公司设计及合成。

组织总RNA提取按所购试剂盒操作说明提取总RNA。RNA逆转录成cDNA:按照Invitrogen的Superscript III First-Strand Synthesis反转录试剂盒说明书进行逆转录反应。获得的产物 -20°C 保存或直接使用。

扩增管家基因:PCR反应体系(0.5 μl Taq DNA聚合酶(5 U/ μl) 5 μl 5倍浓度Buffer(1.5 mmol/L MgCl_2), 1 μl 的 P_1 (100 $\mu\text{mol/L}$), 1 μl 的 P_2 (100 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μl dNTP(10 mmol/L), 10 μl 模板cDNA, 4 μl 50 mmol/L MgCl_2 , 28 μl ddH₂O,反应总体积为50 μl)。PCR反应扩增条件:预变性:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,变性:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,复性:58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,延伸:72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,35个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

PCR扩增基因片段:反应体系(0.5 μl Taq DNA聚合酶(5 U/ μl), 5 μl 5倍浓度Buffer(1.5 mmol/L MgCl_2), 1 μl 的 P_1 (100 $\mu\text{mol/L}$), 1 μl 的 P_2 (100 $\mu\text{mol/L}$), 0.5 μl dNTP(10 mmol/L), 10 μl 模板cDNA, 4 μl 50 mmol/L MgCl_2 , 28 μl ddH₂O,反应总体积为50 μl)。PCR反应扩增条件:预变性:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min,变性:94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,复性:56 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,延伸:72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,35个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min后。

PCR产物在2%的琼脂糖凝胶中电泳,80 V电压,30 min,在凝胶成像仪中观察并照相,采用Quantity One分析系统进行电泳条带分析,计算Bcl-2、Bax产物与 β -actin产物的数值,即为其在组织中mRNA的表达量。

上述过程均重复3次。

四、统计学处理

采用SPSS 13.0统计分析软件包。与正常对照组比较,行随机分组变量的单因素方差分析(one-way ANOVA),SNK(q 检验)进行两两比较,数据皆以($\bar{x} \pm s$)表示,方差不齐时,数据经平方根转换,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、肝硬化内毒素血症大鼠模型的验证

造模期间肝硬化内毒素血症大鼠模型共有15只(6%)大鼠因肝功能衰竭死亡,正常对照组无大

鼠死亡。

第8周时随机选取模型组大鼠5只均做病理并检测血清内毒素水平。每只模型大鼠均出现不同程度肝硬化。病理结果显示:肝小叶结构破坏,肝细胞索排列紊乱,明显肿胀、变性,脂肪变性广泛,部分有坏死,炎细胞浸润明显,见图1。

模型组大鼠平均内毒素检测水平为(67.4 ± 22.6) pg/ml,高于文献所报道的肝硬化内毒素血症模型形成时内毒素平均水平^[12]以及对照组,证实肝硬化内毒素血症模型造模成功。

二、干预后各组内毒素水平

3个实验组与正常对照组比较内毒素水平均显著升高($F = 3.31, P < 0.05$)。模型组的血清内毒素水平由造模结束时的(67.4 ± 22.6) pg/ml升高至(115.12 ± 45.68) pg/ml,显著高于黄芩治疗组($q = 5.12, P < 0.01$);虽然也高于谷氨酰胺组,但无统计学差异($q = 1.78, P = 0.3310$)。黄芩治疗组的内毒素水平显著低于谷氨酰胺组($q = 3.74, P = 0.0123$),见表1。

三、TUNLE法检测各组大鼠肠黏膜细胞的凋亡情况

正常大鼠肠黏膜细胞偶可见凋亡(见图2A)。肝硬化内毒素血症大鼠的肠黏膜细胞凋亡明显增加,阳性细胞核呈棕黄色或黑色,在视野里弥漫散在,核呈固缩状、或染色质向周边聚集、或呈核碎

片状(见图2B)。黄芩组与谷氨酰胺组的肠黏膜细胞凋亡较对照组有所增加,凋亡细胞核呈棕黄色或黑色,但较模型组显著改善,以黄芩组改善最为显著(见图2C, 2D)。

实验组各组与正常对照组比较肠黏膜细胞的凋亡率显著升高($F = 4.77, P < 0.01$)。模型组肠黏膜细胞的凋亡率显著高于黄芩治疗组和谷氨酰胺组($q = 4.56, 4.35, P < 0.01$)。黄芩治疗组的肠黏膜细胞的凋亡率显著低于谷氨酰胺组($q = 3.78, P < 0.05$),见表2。

四、各组Bcl-2 mRNA和Bax mRNA的水平

RT-PCR反应结果显示,各组在241 bp处有内参照 β -actin条带(见图3A)。269 bp处有特异性的Bcl-2条带(见图3B),定量值显示见表3。3个实验组与正常对照组比较肠黏膜组织Bcl-2 mRNA水平显著下降($F = 3.55, P$ 均 < 0.05)。模型组肠黏膜组织Bcl-2 mRNA水平显著低于黄芩治疗组和谷氨酰胺治疗组($q = 3.89, 3.40, P$ 均 < 0.05)。黄芩治疗组肠黏膜组织Bcl-2 mRNA水平 P 值显著高于谷氨酰胺组($q = 2.77, P < 0.05$)。

RT-PCR结果显示272 bp处有特异性的Bax条带(见图3C),定量值显示见表4。3个实验组与正常对照组比较肠黏膜组织Bax mRNA水平显著升高($F = 3.67, P$ 均 < 0.05)。模型组肠黏膜组织Bax mRNA水平显著高于黄芩治疗组和谷氨酰胺治疗组

表1 干预后各组大鼠血内毒素的水平(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	内毒素水平
正常组	10	3.78 ± 2.35
模型组	20	115.12 ± 45.68 ^a
谷氨酰胺组	20	96.29 ± 38.21 ^a
黄芩组	20	8.27 ± 4.56 ^{abc}

注: ^a与正常组比较, $F = 3.31, P_{\text{模}} = 0.0000, P_{\text{谷}} = 0.0139, P_{\text{黄}} = 0.0132$; ^b与模型组比较, $q_{\text{谷}} = 1.78, P_{\text{谷}} = 0.3310; q_{\text{黄}} = 5.12, P_{\text{黄}} = 0.0000$; ^c与谷氨酰胺组比较, $q_{\text{黄}} = 3.74, P_{\text{黄}} = 0.0123; q_{\text{模}} = 1.78, P_{\text{模}} = 0.3310$

表2 各组大鼠肠黏膜细胞的凋亡率(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	凋亡率
正常组	10	4.80 ± 1.92
模型组	20	48.80 ± 6.98 ^a
谷氨酰胺组	20	16.00 ± 2.92 ^{ab}
黄芩组	20	12.80 ± 2.17 ^{abc}

注: ^a正常组比较, $F = 4.77, P_{\text{模}} = 0.0000, P_{\text{谷}} = 0.0000, P_{\text{黄}} = 0.0000$; ^b与模型组比较, $q_{\text{谷}} = 4.35, P_{\text{谷}} = 0.0000; q_{\text{黄}} = 4.56, P_{\text{黄}} = 0.0000$; ^c与谷氨酰胺组治疗组比较, $q_{\text{黄}} = 3.78, P_{\text{黄}} = 0.0120; q_{\text{模}} = 4.35, P_{\text{模}} = 0.0000$

表3 各组肠黏膜组织Bcl-2 mRNA的相对表达量(拷贝/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Bcl-2 mRNA
正常组	10	0.7328 ± 0.1243
模型组	20	0.5012 ± 0.1287 ^a
谷氨酰胺组	20	0.6583 ± 0.1303 ^{ab}
黄芩组	20	0.6801 ± 0.1121 ^{abc}

注: ^a与正常组比较, $F = 3.55, P_{\text{模}} = 0.0006, P_{\text{谷}} = 0.0416, P_{\text{黄}} = 0.0466$; ^b与模型组比较, $q_{\text{谷}} = 3.40, P_{\text{谷}} = 0.0143; q_{\text{黄}} = 3.89, P_{\text{黄}} = 0.0057$; ^c与谷氨酰胺组治疗组比较, $q_{\text{黄}} = 2.77, P_{\text{黄}} = 0.0478; q_{\text{模}} = 3.40, P_{\text{模}} = 0.0143$

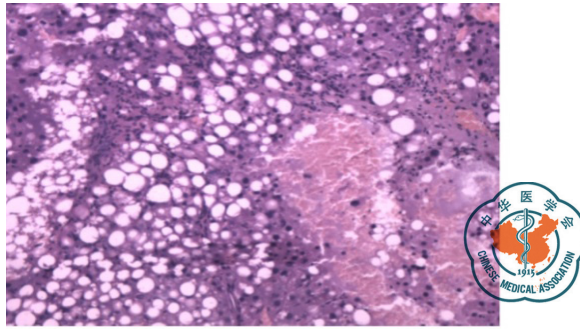
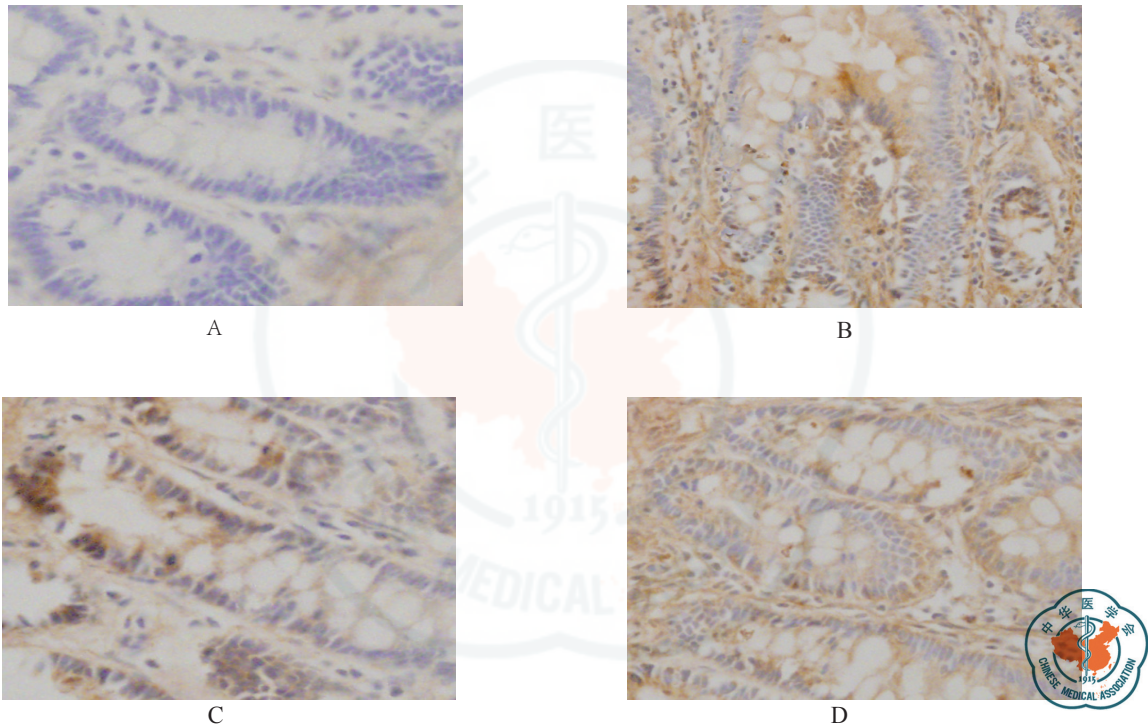
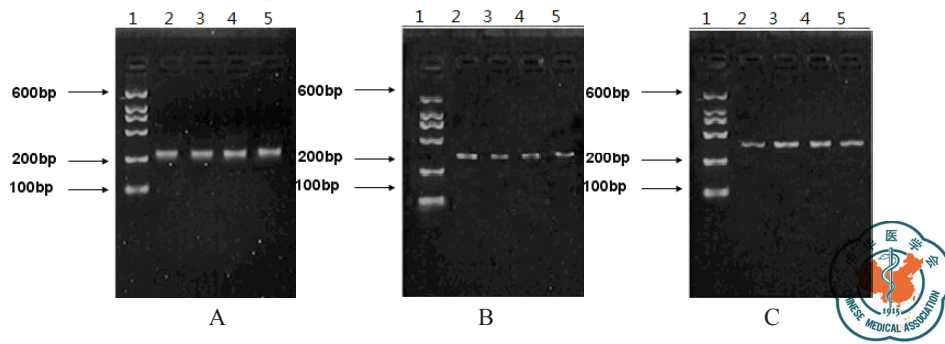


图1 模型组肝脏组织病理变化 (10 × 40, HE染色)



注: A: 正常组肠黏膜细胞的凋亡; B: 模型组肠黏膜细胞的凋亡; C: 谷氨酰胺治疗组肠黏膜细胞的凋亡; D: 黄芩治疗组肠黏膜细胞的凋亡

图2 各组大鼠肠黏膜细胞凋亡的检测结果 (TUNLE染色, 10 × 40)



注: 目的条带: 241 bp。泳道: 1: marker; 2: 正常组; 3: 模型组; 4: 谷氨酰胺组; 5: 黄芩组。A: 各组的 β -actin mRNA 的表达; B: 各组的 Bcl-2 mRNA 的表达; C: 各组的 Bax mRNA 的表达

图3 各组 Bcl-2 mRNA 和 Bax mRNA 的表达情况

表4 各组大鼠肠黏膜组织Bax mRNA的表达水平(拷贝/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Bax mRNA
正常组	10	0.5214 ± 0.1225
模型组	20	08121 ± 0.1126
谷氨酰胺组	20	0.7923 ± 0.1431 ^b
黄芩组	20	0.6612 ± 0.1321 ^{bc}

注: ^a与正常组比较, $F = 3.67$, $P_{\text{组}} = 0.0000$, $P_{\text{谷}} = 0.0002$, $P_{\text{黄}} = 0.0202$; ^b与模型组比较, $q_{\text{谷}} = 2.91$, $P_{\text{谷}} = 0.0411$; $q_{\text{黄}} = 3.62$, $P_{\text{黄}} = 0.0131$; ^c与谷氨酰胺组治疗组比较, $q_{\text{黄}} = 2.85$, $P_{\text{黄}} = 0.0474$; $q_{\text{模}} = 2.91$, $P_{\text{模}} = 0.0411$

($q = 3.62$ 、 2.91 , P 均 < 0.05)。黄芩治疗组显著低于谷氨酰胺组($q = 2.85$, $P < 0.05$)。

讨 论

肠黏膜细胞是抵御细菌、病毒侵袭以及内毒素等外源性物质进入体内的第一道防线,正常情况下肠黏膜细胞3~5 d更新1次,这种平衡过程通过黏膜细胞凋亡与再生来维持,一旦肠黏膜细胞凋亡大于增生就会导致肠屏障功能破坏,大量的外源性物质进入体内,包括内毒素,而形成内毒素血症。

本研究结果证实肝硬化内毒素血症大鼠模型组的肠黏膜细胞大量凋亡,而且内毒素水平随着时间的延长而增加,进一步说明肠黏膜上皮细胞的凋亡是造成肝硬化内毒素血症的重要因素,而具有保护肠黏膜作用的药物谷氨酰胺能够减少肠黏膜上皮细胞的凋亡,进而使大鼠体内的内毒素水平下降,也进一步证实了肠黏膜细胞凋亡与内毒素血症形成密切相关。黄芩治疗组的肠黏膜上皮细胞的凋亡率以及血清内毒素水平显著低于模型组及谷氨酰胺治疗组则提示黄芩具有更强的保护黏膜细胞的能力以及进一步促使内毒素水平下降的作用。

RT-PCR进一步检测结果显示,抑制凋亡发生基因Bcl-2 mRNA水平在模型组肠黏膜组织最低,黄芩治疗组中表达最高;而促进凋亡基因Bax mRNA水平在黄芩组最高,在模型组最低,在黄芩治疗其他疾病的研究中也有类似结果^[9-11]。Bcl-2家族是与细胞凋亡相关的一组基因,包括Bcl-2、Bal-xl、Bcl-xs和Bax等,其中Bcl-2和Bax是与细胞凋亡关系最为密切的一对基因,这两个基因分别以同源二聚体存在,也可形成异源二聚体。细胞内当Bax高表达,细胞对死亡信号敏感,加速细胞凋亡。当Bcl-2高表达,Bcl-2可与Bax形成异源性二聚体抑制细胞凋亡^[13]。当Bax同源二聚体形成,便诱导凋亡,随着Bcl-2表达增加,越来越多的Bax二聚体分开,与Bcl-2形成比Bax-Bax更稳定的Bax-Bcl-2异源二聚体,从而抑制Bax-Bax诱导凋亡的作用,即细胞内Bax和Bcl-2的比例是调节细胞凋亡的重要因素。本

研究提示黄芩虽然使Bax高表达,但同时也增加抑制凋亡基因Bcl-2的表达,最终通过提高Bcl-2/Bax的比值来抑制肠黏膜细胞的凋亡进而减少内毒素血症的形成。

肝硬化内毒素血症患者的肠黏膜细胞容易发生凋亡^[14],肠黏膜细胞的大量凋亡会造成肠黏膜的保护作用下降,加速内毒素血症的形成,从而形成内毒素血症-肠黏膜损伤的恶性循环,推动病情进展,在肝硬化无法改变的现实情况下,肠黏膜的完整性则成为疾病治疗的关键。

中医理论对肝硬化内毒素的论述认为,肝硬化患者中,病邪(肝炎病毒)浸淫机体日久,气滞血淤,其正气虚是在所必然。肝在五行属木,脾胃在五行属土,在五行生克关系上为木克土,肝病日久必然会导致肝木伐土,出现脾虚胃弱而表现为正虚邪盛。

黄芩为唇形科多年生草本植物黄芩的干燥根,其性苦寒,入肺、胃、胆和大肠经,有清热燥湿,泻火解毒之功。临床应用中已发现黄芩制剂对肝硬化合并内毒素血症的患者具有一定的疗效,且基础研究也证实黄芩提取物具有保护肝细胞以及抗内毒素的功能^[15-16]。

本研究证实从机理上证实了黄芩能够通过降低凋亡基因Bax的表达同时增加抑制凋亡基因Bcl-2的表达,提高Bcl-2/Bax的比值来抑制肠黏膜细胞的凋亡,保护肠黏膜的完整性,减少内毒素的吸收,进而减少肝硬化内毒素血症的形成。

黄芩治疗肝硬化内毒素血症是目前研究的热点,本研究仅从凋亡的角度研究了黄芩对肝硬化内毒素血症的治疗作用,更完整和深入的研究还有待于进一步的探讨。

参 考 文 献

- 1 刘肆辉,张永华.肝硬化内毒素血症的发生机制及治疗进展.浙江中西医结合杂志,2007,8(17):528-529.
- 2 Lin HC, Yang YY, Tsai TH, et al. The relationship between endotoxemia and hepatic endocannabinoids in cirrhotic rats with portal hypertension. J Hepatol,2011,54(6):1145-1153.

- 3 胡兵. 肝硬化肠源性内毒素血症的研究进展. 临床和实验医学杂志,2012,11(4):313-316.
- 4 吕震, 张友祥. 肝硬化肠源性内毒素血症临床研究现状. 肝脏,2011,16(3):262-263.
- 5 Choi Y, Jeon WK, Hwang SJ, et al. The role of the gut barrier function in the pathophysiology of viral liver cirrhosis. Hepatogastroenterology,2011,58(109):1244-1247.
- 6 施梅姐, 池晓玲, 萧焕明, 等. 593例乙型肝炎肝硬化患者中医证候特征的回顾性分析. 中西医结合肝病杂志,2011,21(6):326-329.
- 7 周晓慧, 龚明玉, 杨鹤梅, 等. 黄芩茎叶总黄酮对缺氧/复氧诱导心肌细胞凋亡的影响. 中国中西医结合杂志,2011,31(6):803-806.
- 8 万巧凤, 顾立刚, 殷胜骏, 等. 黄芩苷对FM1肺炎小鼠肺组织细胞凋亡FAS/FAS-L系统的影响. 中国药理学通报,2011,27(11):1555-1559.
- 9 孙洁, 田林红, 王收宝, 等. 黄芩苷对糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡及其Bcl-2和Bax表达的影响. 实用医学杂志,2011,27(5):757-760.
- 10 周晓慧, 齐洁敏, 梅立新, 等. 黄芩茎叶总黄酮对缺氧/复氧诱导
- 的心肌细胞凋亡相关基因Bcl-2、Bax表达的影响. 四川中医,2007,25(9):18-20.
- 11 陆定波, 张赤志, 晏雪生, 等. 乳黄制剂对肝硬化大鼠内毒素和肠道防御功能的影响. 中华中医药杂志,2008,23(9):821-823.
- 12 贾晋斌, 谷峰, 陈尉华, 等. 内毒素血症在大鼠实验性肝硬化腹水形成中的作用及其与肿瘤坏死因子- α 和一氧化氮的关系. 胃肠病学,2006,11(7):420-422.
- 13 柳向军, 张令强, 刘小林, 等. 细胞凋亡中的Bcl-2家族蛋白及其BH3结构域的功能研究. 生物化学与生物物理进展,2006,33(3):221-225.
- 14 吴秀清, 王虹, 孙梅, 等. 幼年大鼠内毒素血症时小肠上皮细胞凋亡及Caspase-3的表达. 中国当代儿科杂志,2005,7(2):167-170.
- 15 刘建新, 汪秀荣, 张文平, 等. 黄芩苷元对四氯化碳诱导小鼠脂质过氧化反应的影响. 中药药理与临床,2008,24(1):25-27.
- 16 伏建峰, 曹红卫, 王宁, 等. 黄芩抗内毒素组分的制备及其生物学活性研究. 微循环学杂志,2008,18(1):20-23.

(收稿日期: 2013-05-28)
(本文编辑: 孙荣华)

刘昶, 叶峰, 邹文静, 等. 黄芩对大鼠肝硬化内毒素血症肠黏膜损伤的保护性机制研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2013, 7(6): 797-803.

CHINESE MEDICAL ASSOCIATION
1915
中藥醫學會