



本文经编委遴选,英文版将通过 ScienceDirect 全球发行。

肝络通对门静脉高压症大鼠肝组织 $\alpha 7$ -烟碱样乙酰胆碱受体的影响*

□姜俊杰** 杜庆红 韩琳 Arezou Mashoufi 李澎涛**

(北京中医药大学基础医学院 北京 100029)

摘要:目的:分析肝络通对门静脉高压症大鼠肝组织中 $\alpha 7$ -烟碱样乙酰胆碱受体表达的影响特征,探讨肝络通治疗门静脉高压症的可能机制。方法:取体重 240~260g 的清洁级雄性 SD 大鼠 40 只,根据体重随机分为假手术组、2 周模型组、2 周肝络通组、4 周模型组、4 周肝络通组。模型组及给药组采用胆总管结扎术(CBDL)对大鼠进行造模,分别于造模 2 周、4 周测量门静脉压力,并用免疫印迹法检测 $\alpha 7$ -烟碱样乙酰胆碱受体(nAChR $\alpha 7$)在肝组织中的表达。结果:胆总管结扎后 2 周和 4 周门静脉压力均显著升高,模型组 nAChR $\alpha 7$ 的表达较假手术组明显增多,门静脉压力和 nAChR $\alpha 7$ 的表达具有随术后时间延长而加重的一致性趋势。肝络通组门静脉压力显著低于模型组,术后 4 周作用最为显著;2 周肝络通组 nAChR $\alpha 7$ 的表达与 2 周模型组比较无显著差异,4 周肝络通组较 4 周模型组显著减少。结论:肝组织 nAChR $\alpha 7$ 的表达变化与门静脉压力变化具有一致性趋势,肝络通降低门静脉压力的作用可能与调节肝组织内 nAChR $\alpha 7$ 的表达有关。

关键词:肝络通 $\alpha 7$ -烟碱样乙酰胆碱受体 门静脉高压症 肝组织

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.03.014

门静脉高压症是由于各种原因使门静脉血流受阻而引起的门静脉压力病理性升高,从而出现一系列门静脉压力增高的症状和体征,如脾大、腹水、食管及胃静脉曲张、肝肾综合征等,其致死率高,严重威胁人类健康。目前,治疗多以西药、手术为主,但其副作用大,不利于疾病恢复。为此,寻找有效药物延缓、阻断门静脉高压症的发展是亟待解决的问题。

肝络通由甘草和丹参提取有效成分甘草酸二铵和

丹酚酸 B 配伍构成,为临床治疗肝纤维化门脉高压症的现代制剂,具有解毒通络、益气活血之功^[1]。现代研究表明^[2],该制剂具有良好的抗肝纤维化的作用,其作用机制有待于进一步探讨。本实验采用 Western Blot 检测胆汁性肝纤维化所致门静脉高压症大鼠的肝组织中 nAChR $\alpha 7$ 的表达,探讨 nAChR $\alpha 7$ 在门静脉高压症中的作用以及肝络通在治疗门静脉高压症中的可能机制。

一、材料和方法

1. 药物、试剂和仪器

收稿日期: 2010-03-07

修回日期: 2010-03-26

* 科学技术部“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09102-144):门脉高压症创新药物肝络通咀嚼片临床前研究,负责人:王新月。

** 联系人:姜俊杰,博士研究生,主要研究方向:中医药防治门静脉高压症的基础研究,Tel:010-64286190,E-mail:studentjiangjunjie@tom.com;李澎涛,本刊编委,教授,博士生导师,主要研究方向:中药复方抗缺血性脑血管病的基础研究,E-mail:lptao@263.net。

肝络通由北京华信万邦医药有限公司提供(批号:041001)。免疫印迹用一抗 nAChR α 7 购自 Santa 公司, β -actin 一抗购自 PRODUCT DESCRIPTION 公司, 二抗购自北京中杉生物技术公司。RIPA 裂解液和 PMSF 裂解液购自上海碧云天生物技术有限公司。BL-420E 生物机能实验系统购自成都泰盟科技有限公司。

2. 动物模型及分组、给药

研究采用北京维通利华公司提供的健康清洁级雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 240~260g。随机分为假手术组、2 周模型组、2 周肝络通组、4 周模型组、4 周肝络通组, 每组 8 只。在 10%水合氯醛(4mL·kg⁻¹) 的麻醉后进行手术, 手术过程中均为无菌操作。上腹部备皮, 常规消毒。打开腹腔, 翻转十二指肠, 分离胆总管, 用 1.0 丝线结扎两道, 在两结之间将胆总管剪断。假手术组只暴露胆总管, 不予以结扎及剪断。造模术后给药组每日给肝络通 25mg·kg⁻¹, 连续给药 2 周或 4 周, 模型组和假手术组每日给等容积的蒸馏水。

3. 测量门静脉压力

将大鼠麻醉后, 打开腹腔, 找到回肠静脉, 用 PE50 导管(充满肝素生理盐水)插入其末端, 进入门静脉主干, 与 BL-420E 生物机能实验系统压力换能器相连接, 测量 30min, 之后 10min 的平均压力作为观察数据。

4. nAChR α 7 免疫印迹定量分析

称取适量肝组织 100~200mg, 按照 5 μ L·mg⁻¹ 加入 RIPA 和 PMSF 裂解液, 研磨组织。4 $^{\circ}$ C, 12000rpm 离心 20min, 取上清液, 按照 BCA 方法进行蛋白定量。根据定量结果, 将上清液稀释一倍, 加入 5 \times 上样缓冲液, 混匀, 沸水中加热 5min, 分装, -20 $^{\circ}$ C 保存。另外, 配制 12.5%凝胶, 上样, SDS-PAGE 电泳约 2.5h, 转膜 2h, 5%脱脂奶粉(TBST 配) 封闭 1h, 加入 nAChR α 7 一抗(1:200, 5%脱脂奶粉稀释), 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜。次日用 5%脱脂奶粉(TBST 稀释)洗涤, 并加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:2000), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h, 再用 TBST 洗涤, 每次 10min, 共 3 次, 滴加超敏发光液, 曝光, 显影, 定影。

5. 实验设计类型

采用完全随机化分组设计。如上所述, 将大鼠随机分为 5 组—假手术组、2 周模型组、2 周肝络通组、4 周模型组、4 周肝络通组。

6. 统计方法

实验数据用 SPSS11.5 中的 One-Way ANOVA 进行处理, 结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示, $P<0.05$ 为统计学上有显著差异, $P<0.01$ 有极显著差异。

二、结果

1. 肝络通对大鼠胆总管结扎后门静脉压力的影响

胆总管结扎后 2 周及 4 周, 与假手术组比较, 各组门静脉压力均有显著增高($P<0.01$), 4 周模型组的门静脉压力显著高于 2 周模型组($P<0.05$), 模型组呈现了随时间推移门静脉压力进一步增高的特征。肝络通具有显著的降低该门静脉高压的作用, 2 周及 4 周肝络通组与同时段模型组比较, 门静脉压力明显降低($P<0.05$, $P<0.01$), 4 周时差异尤为显著。结果见表 1。

2. nAChR α 7 在门静脉高压症大鼠肝组织中的表达分析

胆总管结扎后 2 周和 4 周各组大鼠肝组织 nAChR α 7 的表达与假手术组比较明显增多, 有极显著统计学差异($P<0.01$)。与门静脉压力变化趋势趋同, 4 周模型组 nAChR α 7 的表达显著高于 2 周模型组, 有极显著统计学差异($P<0.01$)。造模术后 2 周时, 肝络通组与模型组 nAChR α 7 表达的比较无显著差异; 造模术后 4 周, 肝络通组 nAChR α 7 表达显著低于模型组, 有极显著统计学差异($P<0.01$)。结果见图 1、表 2。

三、讨论

肝纤维化发生门静脉高压时, 肝脏自身会启动一系列的修复机制, 血管新生是其中之一。原有的血

表 1 大鼠胆总管结扎后 2 周和 4 周各组大鼠门静脉压力的变化($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

实验分组	门静脉压力(mmHg)
假手术组	8.73 \pm 0.88
2 周模型组	14.15 \pm 0.92**
2 周肝络通组	11.3 \pm 0.63 Δ
4 周模型组	17.21 \pm 0.92***
4 周肝络通组	12.13 \pm 1.3 $\Delta\Delta$

注: One-way ANOVA 模型组 vs. 假手术组 ** $P<0.01$; 4 周模型组 vs. 2 周模型组 # $P<0.05$; 与同时段模型组比较 Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$ 。

管以芽出或非芽出方式形成新的血管的过程,称为血管新生。在低氧、某种细胞因子等刺激下,血管通透性增高,随后原血管外基质降解,内皮细胞迁移、增殖,并形成管状结构,即形成一条新的血管^[3]。血管新生既是肝组织损伤后组织修复的表现,同时它又在损伤因素、细胞因子等共同作用下影响肝纤维化的进展和结局。

肝纤维化门静脉高压大鼠新生血管增加,并伴有明显的肝内血管紊乱。新生血管位于汇管区周围的纤维间隔中^[4],肝血窦周围亦有分流血管。胆汁性肝纤维化的大鼠,由于胆管阻塞,胆汁不能排泄,故胆管周围亦有新生的血管。它们都随着肝纤维化程度的加重而增多。血管新生使肝组织结构发生变化,肝内固有的网状支架扭曲或塌陷;肝内微循环障碍,肝血窦和肝细胞物质交换障碍,肝细胞功能下降;肝内血液循环体系逐渐地被破坏,血流阻力增加,引起门静脉高压症。

由上述可知,血管新生的重要机制之一是细胞因子诱导。大量研究表明^[5],烟碱型乙酰胆碱受体参与血管内皮细胞的新生调节,它所造成的内皮细胞形态学改变与血管内皮生长因子(VEGF)相一致;内皮

细胞 nAChR 亚单位研究指出^[6],在血管新生反应涉及的烟碱信号转导通路中, $\alpha 7$ 受体起关键作用;体外实验证明^[7], $\alpha 7$ 受体激动剂 DMXB 能够复制烟碱的体外血管新生作用, $\alpha 7$ 受体选择性拮抗剂 α -BTX 能够抑制毛细血管网形成,而 nAChR 拮抗剂美加明,能部分抑制毛细血管网的形成。本实验研究结果表明,模型组 nAChR $\alpha 7$ 的表达水平与假手术组比较明显增加,且 4 周模型组与 2 周比较亦明显增加,与门静脉压力的增高变化具有一致的趋势,说明随着肝纤维化的发展,肝内新生的血管逐渐增多,微循环障碍加重,阻力增加,门静脉压力升高,为肝纤维化“毒损肝络”形成肝病络的病机新学说提供了证据。

肝络通其组分丹酚酸 B 盐是丹参水溶性成分中重要的有效成分,甘草酸二胺是中药甘草中重要的化学成分,单独应用这两味中药均具有良好的抗肝纤维化的作用,二药配伍效果更佳^[2],其作用于门静脉高压的机制是多方面的。本实验的研究发现,肝络通组在胆总管结扎 2 周及 4 周后门静脉压力均降低,说明肝络通有降低门静脉压力的作用。免疫印迹结果表明,4 周肝络通组 nAChR $\alpha 7$ 的表达较模型组减少,而 2 周肝络通组 nAChR $\alpha 7$ 的表达与模型组比较无显著差异。说明肝络通能够通过减少 nAChR $\alpha 7$ 的含量来减轻血管新生,从而降低门静脉压力,但这种调节作用在初期可能并不明显,而是发生于门静脉高压症的后期,反映了肝络通解毒通络、益气和血的功效特点。

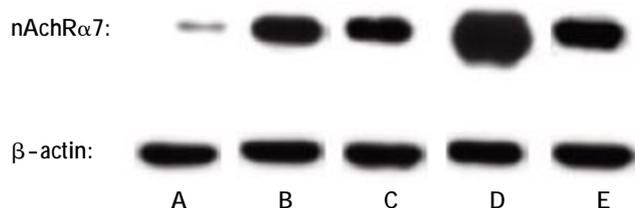


图 1 nAChR $\alpha 7$ 在大鼠肝组织中表达的变化

注:One-way ANOVA 模型组 vs. 假手术组 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;4 周模型组 vs.2 周模型组 ## $P < 0.01$;4 周肝络通组 vs.4 周模型组 && $P < 0.01$ 。A:假手术组 B:2 周模型组 C:2 周肝络通组 D:4 周模型组 E:4 周肝络通组。

表 2 大鼠胆总管结扎后 2 周和 4 周各组大鼠肝组织中 nAChR $\alpha 7$ 平均密度值的变化($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	nAChR $\alpha 7$ 平均密度值
假手术组	0.628±0.103
2 周模型组	1.249±0.068*
2 周肝络通组	1.05±0.091
4 周模型组	2.553±0.152* ^{###}
4 周肝络通组	1.679±0.248 ^{&&}

注:与假手术组比较,* $P < 0.01$;与 2 周模型组比较,# $P < 0.05$;与同时段模型组比较,▲ $P < 0.05$,▲▲ $P < 0.01$ 。

参考文献

- 1 韩琳,杜庆红,姜俊杰,等.肝络通对大鼠肝纤维化门脉高压症的药理学研究.中成药,2009,31(3):350-354.
- 2 刘树峰,蔡大勇,李澎涛,等.优化甘参复方抗肝纤维化组分配伍的研究.中华中医药杂志,2005,20(6):373-375.
- 3 邓伟哲,李柏.门静脉高压侧支循环与血管内皮细胞生长因子.世界华人消化杂志,2006,14(16):1621-1626.
- 4 Oben JA, Roskams T, Yang S, et al. Hepatic fibro-genesis requires sympathetic neurotransmitters. Gut, 2004, 53 (3):438-445.
- 5 陈凯,汪海.血管内皮细胞非神经性乙酰胆碱系统的研究进展.中国临床药理学与治疗学,2005,10(3):254-258.
- 6 Wang Y, Pereira EF, Maus AD, et al. Human bronchial epithelial and endothelial cells express $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. Mol Pharmacol, 2001, 60:1201-1209.
- 7 Heeschen C, Jang JJ, Weis M, et al. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. Nat Med,2001,7:833-837.

Effect of Glytan on the Expression of Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 7$ in Portal Hypertension Rats

Jiang Junjie, Du Qinghong, Han Lin, Arezou Mashoufi, Li Pengtao

(School of Preclinical Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: In this study, the expression of nAChR $\alpha 7$ in the liver tissue was observed after portal hypertension (PHT) was induced by common bile duct ligation. 40 male SD rats, weighing 240-260 g, were randomly divided into the sham group, the model group and the Glytan group according to the rat weight. Each group had 2 time points, i.e. 2 weeks and 4 weeks after PHT. PHT was induced by common bile duct ligation (CBDL) in rats. The portal pressure of each group was measured, and the expression of nAChR $\alpha 7$ in the liver was detected by Western blotting at each time point. The portal pressure and the expression of nAChR $\alpha 7$ of the model groups significantly increased 2 and 4 weeks after PHT. The portal pressure of the Glytan group decreased compared with the model group, especially 4 weeks after PHT. The expression of nAChR $\alpha 7$ in the liver of the Glytan group significantly decreased 4 weeks after PHT. Taken together, the portal pressure varied with the expression of nAChR $\alpha 7$ in the model group and the Glytan group. Glytan may down-regulate the portal pressure by affecting the nAChR $\alpha 7$ level in the liver.

Keywords: Glytan, Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$, Portal hypertension, Liver tissue

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立崑)