

七叶皂苷钠对胆管结扎诱导的肝纤维化作用研究

王玮琛 周大臣 崔笑侯 辉张彬

摘要 目的 探究七叶皂苷钠(SA)对胆管结扎诱导的肝纤维化作用机制。方法 54只雄性SD大鼠随机均分为:假手术组(Sham组)仅行开腹,术后每日注射等量生理盐水、生理盐水组(OJ组)行胆管结扎术后每日注射等量生理盐水、SA组(SA组)行胆管结扎术后每日注射SA 3.6 mg/kg。通过ELISA测定各组大鼠血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)的水平。HE及Masson染色观察大鼠肝脏形态结构和胶原纤维的改变。免疫荧光检测I、III型胶原。免疫组化及Western blot检测eIF-4E、P-4EBP1蛋白表达。结果 OJ组大鼠肝脏结构紊乱,血清中的ALT、AST、TBIL水平上升,I、III型胶原增多,eIF-4E、P-4EBP1在肝细胞中表达减少。SA干预的大鼠血清中ALT、AST、TBIL较OJ组下降,大鼠肝脏中I、III型胶原表达减少且上调,OJ组大鼠肝细胞中原本下调的P-4EBP1、eIF-4E。结论 七叶皂苷钠可以通过促进肝细胞中的4EBP1的磷酸化及eIF-4E的激活保护肝细胞从而减少了肝纤维化。

关键词 eIF-4E; P-4EBP1; 胆管结扎; 肝纤维化; 七叶皂苷钠
中图分类号 R 575

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)08-1257-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.08.017

2021-03-10 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:1808085MH270);安徽医科大学研究基金(编号:2017xkj034)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院普外科,合肥 230601

作者简介:王玮琛,男,硕士研究生;

张彬,男,副教授,副主任医师,研究生导师,责任作者,
E-mail: 65208928@qq.com

梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)是由于胆管管壁堵塞或胆管狭窄所致的急性胆汁胆管淤积症而引起的一种全身性的机体病理或生理功能改变,是一种临床常见症状^[1],且对肝脏损伤最严重,易引起肝纤维化肝硬化。OJ常见的病因主要是胆管结石、胆管恶性肿瘤、胰头部恶性肿瘤等^[2]。真核细胞翻译起始因子4E(eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF-4E)是真核细胞翻译起始因子,广泛分布于细胞质与细胞核中,可与mRNA 5'端7-甲基鸟苷(7-methylguanosine, m7G)帽状结构特异性结合,从而介导翻译,其在多种疾病中起到调节作用^[3]。肝纤维化的疾病进程中受到了多种蛋白的调控,但是eIF-4E是否参与了OJ所引起的肝纤维化过程,目前并不清楚。

七叶皂苷钠(sodium aescate, SA)具有消炎、减少渗出、改善水肿等作用^[4],对急性肺损伤、肺纤维化及急性肝损伤有保护作用^[5-6]。但SA对OJ引起的肝纤维化的作用尚未见报道。因此,该研究以大鼠为实验对象,进而验证SA对梗阻性黄疸所引起的肝纤维化病理生理过程的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 54只雄性、健康、适龄的SD大鼠,体质量200~250 g,购自安徽医科大学动物实验中心,动物使用许可证号为SYXK(皖)2020-001。

cell apoptosis was detected by flow cytometry with Annexin V-FITC/PI staining, cell migration and invasion were detected by Transwell assay, and the expression levels of proteins related to Wnt/ β -catenin pathway were detected by Western blot. After treating OSCC cells transfected with si-circPIP5K1A with Wnt/ β -catenin signaling agonist LiCl, cell viability, colony formation, apoptosis, migration and invasion were determined. **Results** CircPIP5K1A was up-regulated in OSCC tissues and cells ($P < 0.05$). After silencing of circPIP5K1A, the cell viability, colony formation, migration and invasion in OSCC cells decreased (all $P < 0.05$), cell apoptosis significantly increased ($P < 0.05$), and the expression levels of Wnt1 and β -catenin protein decreased ($P < 0.05$). LiCl inhibited the inhibitory effect of silencing circPIP5K1A on the growth and metastasis of OSCC cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Silencing of circPIP5K1A can inhibit the growth and metastasis of OSCC cells by inhibiting the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Key words circPIP5K1A; oral squamous cell carcinoma; Wnt/ β -catenin signaling pathway

1.1.2 试剂 SA(山东绿叶制药有限公司);七氟醚(美国艾伯维公司);Masson 染色液(北京索莱宝有限公司);I型胶原蛋白抗体(collagen I, COL-I)、III型胶原蛋白抗体(collagen III, COL-III)(武汉博士德生物工程有限公司);P-4EBP1 抗体、eIF-4E 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);免疫组化试剂盒(北京中山金桥有限公司)。丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)检测试剂盒(厦门仑昌硕生物科技有限公司)。

1.1.3 主要仪器 高速低温离心机(美国 Eppendorf 公司);荧光正置显微镜(德国 ZEISS 公司);冷冻切片机(赛默飞世尔科技公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、模型建立与给药 将大鼠进行随机分为3组,每组各18只:假手术组(Sham组)开腹后暴露大鼠胆总管后不予结扎仅行关腹。胆管结扎开腹后暴露大鼠胆总管后于胆总管十二指肠汇合部及次级胆管交汇处分别用4-0丝线结扎后关腹。术前12h所有大鼠禁食水,七氟烷吸入麻醉后行胆管结扎,暖灯复苏后,予以正常饮食。术后12h内大鼠尿液变黄即造模成功。将造模成功的大鼠随机分为OJ组及SA组。SA组术后每日腹腔注射SA 3.6 mg/kg(溶于生理盐水配制为1 mg/ml溶液)。Sham组、OJ组应在相同的时间段内予以等量的生理盐水溶液腹腔注射。药物干预7d后对大鼠标本进行采集。

1.2.2 标本采集 大鼠称重后,予以七氟烷进行麻醉,于大鼠门静脉处穿刺采取2 ml血液,离心15 min取上清液后手术切取大鼠肝脏并于-80℃冻存。

1.2.3 肝脏组织病理学检查 将成年大鼠的肝脏组织制成石蜡切片。HE染色:切片于甲基二甲苯中进行脱蜡,并通过下降浓度的乙醇进行水化。苏木精、伊红染色后,用一定上升浓度的乙醇脱水,二甲苯漂洗后,加入树脂密封。光镜下可以进行病理学的观察。Masson石蜡染色:前期脱水石蜡水化染色步骤同前,而后将切片依次经Weigert铁苏木精、酸性乙醇染色分化液、Masson染色蓝化液、丽春红品红染色液、磷酸铝溶液、固绿染色液、弱酸工作液特殊处理,再进行脱水操作,步骤同HE染色。二甲苯脱水漂洗后树脂封片。正置显微镜镜下观察,采集所需图像并进行分析。

1.2.4 血清指标检测 将离心好的血清依照试剂盒步骤依次进行操作,测量ALT、AST、TBIL水平。

1.2.5 免疫荧光 大鼠肝组织冰冻切片常温复温40 min。山羊血清封闭,孵育一抗,切片4℃过夜。避光孵育荧光二抗。DAPI复染,荧光封片剂封片。荧光光学显微镜镜检,采集所需光学图像并对其进行分析。

1.2.6 肝脏组织免疫组化 切片脱蜡,置于枸橼酸钠缓冲液中(含0.05% Tween-20, pH6.0),在高压锅内加压直至煮沸后进行抗原修复。切片滴加过氧化氢与甲醇的混合液封闭过氧化物酶,经1% Triton10-X破膜10 min,于室温滴入山羊血清溶液封闭2 h,而后滴加一抗,将切片组织置于湿盒中于4℃过夜,次日室温孵育二抗,DAB显色,用苏木精复染,乙醇脱水,二甲苯漂洗后封片。正置显微镜镜检,采集所需图像并进行分析。

1.2.7 肝脏蛋白 Western blot 提取肝脏组织匀浆上清液后,按BCA试剂盒说明书步骤测定蛋白浓度。配制12%的SDS-PAGE凝胶,经电泳、转膜后以5% BSA封闭2 h,加入一抗于4℃孵育过夜。第2天于室温二抗孵育2 h,显影。

1.3 统计学处理 采用GraphPad prism 8.0统计软件进行数据分析,两组之间数据采用t检验进行比较,多组间数据比较采用单因素方差分析。每组实验均重复3次, P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清指标测定结果 3组大鼠的血清ALT、AST、TBIL差异均有统计学意义(F = 50.56、27.82、59.50, P < 0.01)。与Sham组比较,OJ组ALT、AST、TBIL升高(t = 10.06、17.18、34.29, P < 0.05);与OJ组比较,SA组ALT、AST、TBIL均有一定程度降低(t = 8.35、2.63、15.30, P < 0.05)。见图1、2。

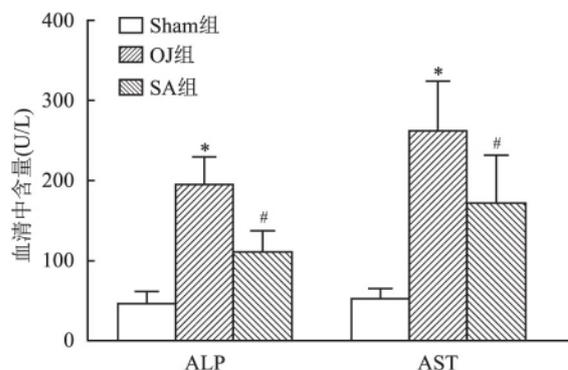


图1 3组大鼠血清ALT、AST水平比较
与Sham组比较: * P < 0.05; 与OJ组比较: # P < 0.05

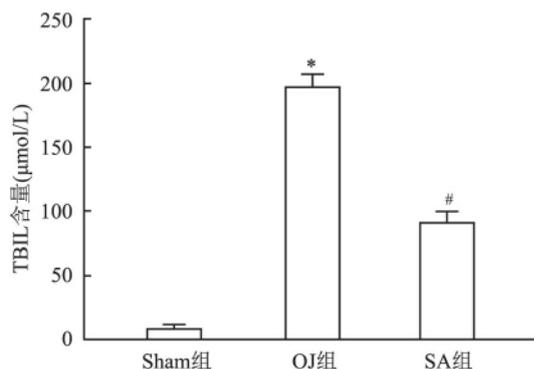


图2 3组大鼠血清TBIL水平比较
与Sham组比较: * $P < 0.05$; 与OJ组比较: # $P < 0.05$

2.2 肝脏组织病理观察及免疫荧光结果 Sham组的大鼠肝脏形态结构正常。OJ组腹腔可见少量淡黄色腹水,胆管扩张,肝脏肿大粗糙,质地韧。HE染色可见Sham组肝实质规整,有形态大小正常的肝细胞和肝窦。OJ组肝索紊乱,肝细胞变性和嗜酸性粒细胞、汇管区内可见胆管增生,实质单核炎性浸润且周围出现纤维条索。Masson染色,Sham组胶原较少,单纯结扎组胶原广泛出现呈条索状。SA组腹腔仍可见少量腹水,胆管扩张,肝脏表面颗粒较OJ组细小,质地稍韧;HE染色肝细胞的变性及嗜酸性粒细胞较OJ组均减少,Masson染色胶原纤维表达

少于OJ组,见图3。免疫荧光结果显示,SA组较OJ组Col-I、Col-III的表达均有一定程度的减少。对荧光强度进行分析,各组Col-I、Col-III的荧光强度差异有统计学意义($F = 9.129, 12.72, P < 0.05$)且OJ组较Sham组Col-I、Col-III的荧光强度显著增加($t = 3.664, P < 0.01$),经SA干预后Col-I、Col-III的荧光强度出现下降($t = 7.430, P < 0.01$)。见图4、5。

2.3 Western blot 以及免疫组化结果 3组大鼠肝脏组织中eIF4E、P-4EBP1表达差异有统计学意义($F = 8.962, 7.421, P < 0.01$),而4EBP1的表达差异无统计学意义($F = 0.377, P = 0.692$),见图6。eIF4E、P-4EBP1蛋白的表达水平Sham组表达水平最高,与OJ组比较差异有统计学意义($t = 2.827, 3.801, P < 0.05$);SA组eIF4E、P-4EBP1两种蛋白表达均升高($t = 2.245, 2.889, P < 0.05$)。Sham组可见eIF4E及P-4EBP1在细胞质及胞核中表达。OJ组可见细胞核中eIF4E及P-4EBP1在细胞核的表达减少,而胞质中仍可见部分表达。SA组eIF4E及P-4EBP1的表达少于Sham组,但在细胞核中的表达多于OJ组。而4EBP1在三组大鼠肝细胞中均有表达,且分布与胞质及胞核中,在肝细胞中差异并不显著。见图7。

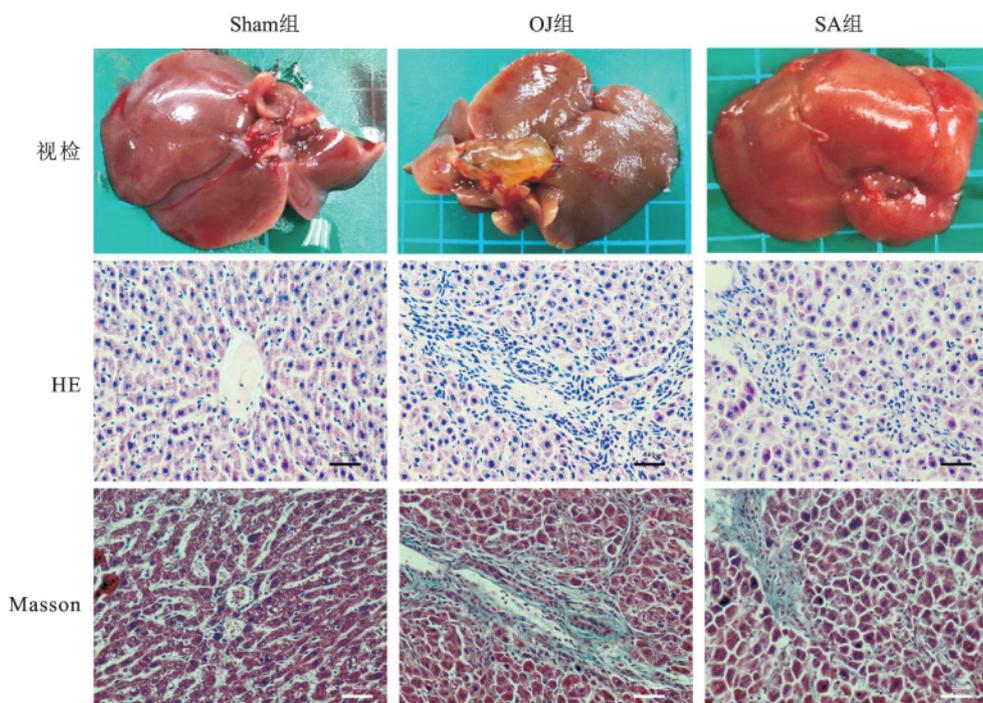


图3 3组大鼠的视检、HE染色($\times 200$)、Masson染色($\times 200$)

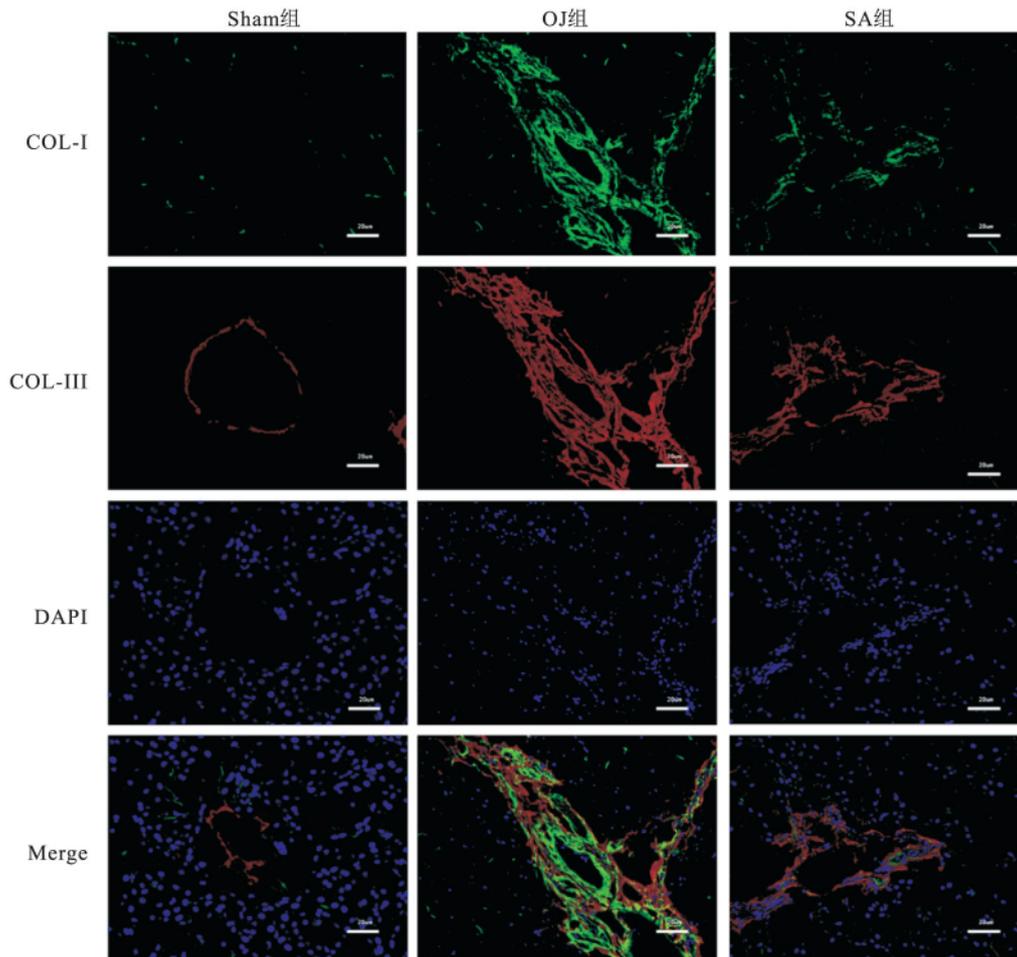


图4 3组免疫荧光结果 ×400

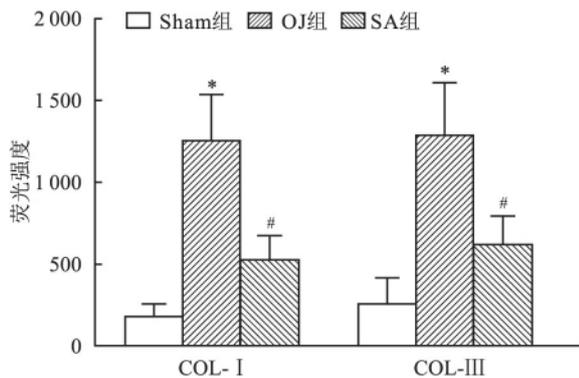


图5 3组免疫荧光 COL-I、COL-III 荧光强度统计图
与 Sham 组比较: * $P < 0.05$; 与 OJ 组比较: # $P < 0.05$

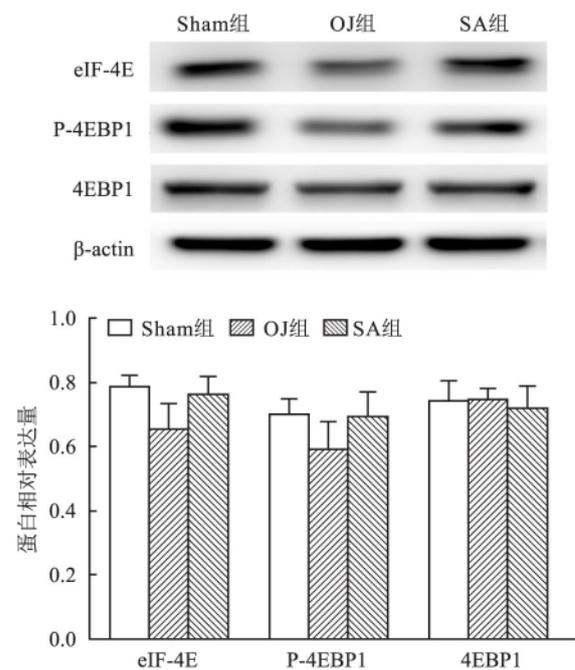


图6 3组 eIF4E、P-4EBP1、4EBP1 肝脏组织表达水平

3 讨论

肝纤维化通过调控细胞外基质沉积的综合信号网络发生。在此过程中,肝星状细胞被激活,并被诱导表现出收缩、增殖和成纤维细胞样表型,导致胶原和其他细胞外基质成分的积累^[7]。其中以 Col-I、

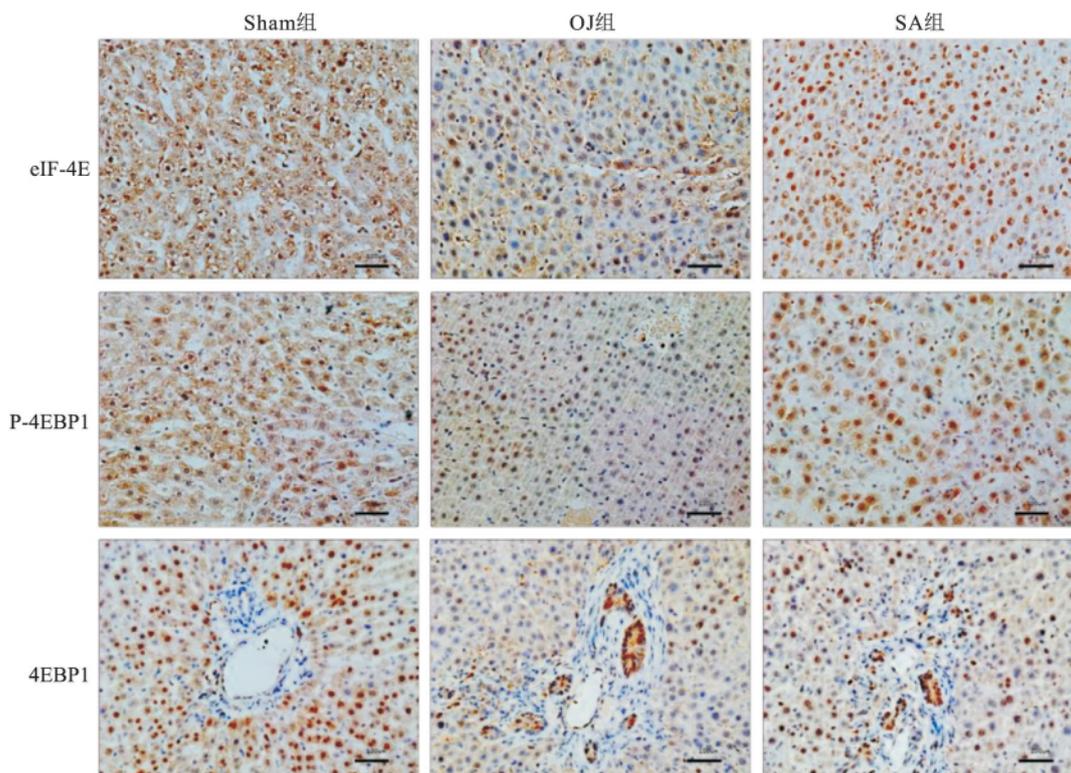


图7 3组免疫组化 eIF-4E、P-4EBP1、4EBP1 结果 ×200

Col-III 占主导地位,这些物质的持续刺激积累导致肝结构和肝正常功能的破坏。而 Col-I、Col-III 表达则可进一步推动肝星状细胞激活,从而使肝纤维化进一步进展^[8]。因此 Col-I、Col-III 的表达反映了肝纤维化程度。SA 作为抗炎抗氧化药物在临床上一直被应用^[9],随着对该药的研究进一步深入,发现 SA 对肝癌细胞存在抑制作用,对肺纤维化存在抗纤维化作用^[10]。本研究 HE、Masson 染色显示 SA 干预后肝脏结构规整,炎性细胞浸润减少,胶原的表达量减少,免疫荧光实验显示经过 SA 干预后 Col-I、Col-III 的表达下调。提示 SA 在 OJ 大鼠肝脏的存在抗纤维化作用。

肝细胞损伤后炎症和固有免疫系统激活导致肝星状细胞激活和细胞外基质 (ECM) 分离和沉积继而引发肝纤维化。因此减少肝细胞的损伤继而减少免疫系统的激活及炎症的发生则可有效地减缓肝纤维化的发生。Du et al^[11] 研究证实 SA 对急性肝损伤存在一定的保护机制。在本研究中 OJ 大鼠的肝细胞因胆汁淤积,导致正常肝细胞因内毒素及炎症反应等作用受到破坏,而经 SA 处理后的大鼠血清 ALT、AST、TBIL 下降,并且肝脏病理镜检下炎性细胞的浸润减少。说明肝细胞在 SA 的作用下破坏减少,SA 对肝细胞存在保护作用。

eIF-4E 在 mRNA 的翻译起始过程具有重要的调节作用^[12]。eIF-4E 与 eIF-4G 形成复合物,可以启动 Cap 依赖性 mRNA 的翻译起始过程,为细胞增殖及相关活动提供物质基础。但是 eIF-4E: eIF-4G 的结合,受蛋白 4EBP1 的动态调控。4EBP1 的 Thr37/46 激酶的磷酸化状态,可以竞争性的与 EIF4E 结合,从而形成 4E[~]4EBP1 复合物,进而抑制 4E[~]4G 的结合,从而抑制 mRNA 的翻译^[13]。本研究免疫组化及 Western blot 的结果证实,胆管结扎可在大鼠体内的肝脏中抑制 4EBP1 的磷酸化以及下调 eIF-4E 的表达。因此推断,胆道梗阻引起的胆汁淤积,损伤了大鼠的肝细胞正常的 mRNA 翻译过程,应引起特定蛋白的合成障碍。但是经 SA 处理后,研究结果证实,大鼠肝脏内肝细胞 4EBP1 的磷酸化增高并且 4E 的表达水平增高,对缓解胆道梗阻所引起的 mRNA 翻译功能障碍具有一定的作用。所以课题组认为,SA 可以缓解梗阻性黄疸基础上继发对肝脏合成功能障碍,从而可以用于缓解梗阻性黄疸患者的肝功能损伤。

目前临床治疗肝纤维化尚无特效药物,本研究论证了 SA 在胆管结扎大鼠肝脏中的保护及抗纤维化作用,后续需完善细胞实验,望今后为 OJ 所致的肝纤维化提供新的治疗思路。

参考文献

- [1] 陈秋源, 钟小生, 谭志健. 梗阻性黄疸的中西医治疗进展[J]. 现代中西医结合杂志 2016 25(2): 221-5.
- [2] 金龙, 邹英华. 梗阻性黄疸经皮肝穿刺胆道引流及支架植入术专家共识(2018)[J]. 临床肝胆病杂志 2019 35(3): 504-8.
- [3] Coutinho De Oliveira L, Volpon L, Rahardjo A K, et al. Structural studies of the eIF4E-VPg complex reveal a direct competition for capped RNA: Implications for translation[J]. Proc Natl Acad Sci USA 2019 116(48): 24056-65.
- [4] Liang J, Jin W, Li H, et al. *In vivo* cardiotoxicity induced by sodium aescinate in zebrafish larvae[J]. Molecules 2016 21(3): 190.
- [5] 黄桑, 蒙凌, 王志远, 等. 七叶皂苷钠对急性肺损伤大鼠肺纤维化的干预作用[J]. 广东药科大学学报 2018 34(1): 59-63.
- [6] 苏艺伟, 李峰, 赵远, 等. 七叶皂苷钠对百草枯致大鼠肺损伤的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志 2018 36(5): 327-30.
- [7] Parola M, Pinzani M. Liver fibrosis: pathophysiology, pathogenetic targets and clinical issues[J]. Mol Aspects Med 2019 65: 37-55.
- [8] Tsuchida T, Friedman S L. Mechanisms of hepatic stellate cell activation[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2017 14(7): 397-411.
- [9] 熊艳, 李海池, 彭银, 等. 娑罗子中七叶皂苷类成分的最新研究进展[J]. 中药材 2016 39(5): 1195-9.
- [10] Hou H, Li W X, Cui X, et al. CARMA3/NF- κ B signaling contributes to tumorigenesis of hepatocellular carcinoma and is inhibited by sodium aescinate[J]. World J Gastroenterol 2019 25(36): 5483-93.
- [11] Du Y, Wang T, Jiang N, et al. Sodium aescinate ameliorates liver injury induced by methyl parathion in rats[J]. Exp Ther Med 2012 3(5): 818-22.
- [12] Bastet A, Robaglia C, Gallois J L. eIF4E resistance: natural variation should guide gene editing[J]. Trends Plant Sci 2017 22(5): 411-9.
- [13] Volpon L, Osborne M J, Borden K L B. Biochemical and structural insights into the eukaryotic translation initiation factor eIF4E[J]. Curr Protein Pept Sci 2019 20(6): 525-35.

Effect of sodium aescinate on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation

Wang Weichen, Zhou Dachen, Cui Xiao, et al

(Dept of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To explore the effect of sodium aescinate (SA) on hepatic fibrosis induced by bile duct ligation. **Methods** 54 male SD rats were randomly divided into 3 groups. Rats in the control group (Sham) were only given equivalent normal saline (NS) injection each day after laparotomy. Rats in obstructive jaundice group (OJ group) were only given equivalent NS injection each day after operation. Rats in SA group were given SA injection at the dose of 3.6 mg/kg each day after operation. There were 18 rats in each group. The expression of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBIL) was detected by ELISA. The changes of morphological structure and the collagen fiber of rats' liver were revealed by HE and Masson staining. The expression of collagen I and collagen III was detected by immunofluorescence. The expression of P-4EBP1, eIF-4E was detected by immunohistochemical and Western blot analysis. **Results** In OJ group, the structures of liver were disordered, the expression level of ALT, AST and TBIL in SA group significantly increased, the expression level of collagen I and collagen III significantly increased, and the expression of eIF-4E and P-4EBP1 in hepatocytes decreased. Compared with OJ group, the expression levels of ALT, AST and TBIL in SA group significantly decreased, the expression levels of collagen I and collagen III significantly decreased, and the expression of eIF-4E and P-4EBP1 in hepatocytes increased. **Conclusion** SA can reduce liver fibrosis by promoting the phosphorylation of 4EBP1 and activating the expression of eIF-4E to protect liver cells.

Key words eIF-4E; P-4EBP1; bile duct ligation; hepatic fibrosis; sodium aescinate