

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)19-1765-04

三七总皂甙对梗阻性黄疸肝组织中 bax, bcl-2 表达的影响及意义

周斌¹, 于博¹, 姚南², 宋少莉²(¹ 甘肃省干部医疗保健院, 甘肃 兰州 730020; ² 兰州大学第一医院, 甘肃 兰州 730000)**Effect of Panax notoginoside on the expressions of bax and bcl-2 in hepatic tissue of rabbits with obstructive jaundice and its significance**ZHOU Bin¹, YU Bo¹, YAO Nan², SONG Shao-Li²¹ Cadre's Health Care Center of Gansu Province, Lanzhou 730020, China, ² First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

【Abstract】 AIM To explore the protective mechanism of Panax notoginoside (PNS) against hepatic injury after obstructive jaundice (OJ) in rabbits. **METHODS** Forty-eight healthy Japanese white rabbits were randomized into 2 groups, 24 in each group: group A treated with common bile duct ligation (BDL), group B of BDL + PNS. All animals were kept under the same condition. Immunohistochemistry was used to determine the expressions of Bax and Bcl-2 in hepatic tissues. **RESULTS**: In group A, expressions of bcl-2 and bax in the hepatic tissue were observed after OJ. Expression of bax reached the peak at the 9th day after OJ, then tended to decline. Similarly, the highest expression of bcl-2 was observed at the 21th day after OJ. The apoptosis index (AI) increased with the increase of bax expression but decreased with bcl-2 strong expression. After treatment with PNS in group B, a lower expression of bax and a higher expression of bcl-2 were found, and the AI value was also lower, compared with group A. **CONCLUSION**: The pathology of OJ may be related to the initiation of apoptosis. PNS may play a protective role against hepatic injury after OJ, which may be realized through up-regulating the expression of bcl-2 and down-regulating the expression of bax in the hepatic tissues.

【Keywords】 obstructive jaundice; bax; bcl-2; Panax notoginoside liver; rabbits

【摘要】目的 探讨梗阻性黄疸肝损伤中的病理调控机制及三七总皂甙(PNS)的保护。方法 健康日本大耳白兔48只,雌雄各半,随机分为2组,每组24只。A组:胆总管接扎组(BDL) B组:BDL+PNS组。建立实验动物模型。所有实验动

物均在相同条件下饲养。采用免疫组化法检测肝组织 bax, bcl-2 的表达情况。结果:A组动物在胆道梗阻后,肝组织可见 bcl-2 和 bax 蛋白表达,bax 蛋白在梗阻9 d 达高峰,此后开始下降。而 bcl-2 蛋白在梗阻21 d 达高峰。凋亡指数(AI)随 bax 升高而升高,随 bcl-2 的升高而降低。B组动物 bax 表达较同时相A组弱,而 bcl-2 蛋白强于A组,B组 AI 值较A组降低。结论 梗阻性黄疸所致的肝组织病理变化可能与凋亡程序的启动有关。PNS 对梗阻性黄疸肝组织损伤有明显的保护作用,其机制可能是与上调肝组织 bcl-2 蛋白及下调 bax 蛋白有关。

【关键词】 阻塞性黄疸; bax; bcl-2; 三七总皂甙; 肝; 兔

【中图分类号】 R26 **【文献标识码】** A

0 引言

梗阻性黄疸是外科的常见病症,肝脏是最先受损并损伤最重的器官。本实验我们通过检测梗阻性黄疸大耳白兔肝组织 bax, bcl-2 蛋白在不同时期的表达情况,同时给予三七总皂甙(Panax notoginoside, PNS)干预,探讨梗阻性黄疸肝损伤的病理调控机制及药物保护。

1 材料和方法

1.1 材料 日本大耳白兔72只,体质量1.8~2.5 kg,雌雄各半,兰州生物制品研究所提供。bax, bcl-2 免疫组化试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。PNS 由山西三九万荣药业有限责任公司提供,批号20020628。

1.2 方法

1.2.1 分组 将48只日本大耳白兔,雌雄各半,随机分为2组,每组24只。A组:胆总管接扎组(BDL) B组:BDL+PNS组。分别于术后3, 6, 9, 21 d 每组随机取6只处死取材。

1.2.2 模型制作 ①BDL组 20 g/L 戊巴比妥钠(40 mg/kg ip)麻醉,距胆总管起始部位1 cm 处双重结扎。②BDL+PNS组:自胆总管结扎术日起腹腔注射 PNS 25 mg/kg, 1次/d, 至取材。

1.2.3 观察指标及检测方法 ①肝组织的病理变化:剪取肝右叶组织约5 mm×5 mm×4 mm 大小,置于40 g/L 多聚甲醛固定,然后脱水、透明、浸蜡、包

收稿日期 2005-09-16; 接受日期 2005-12-25

作者简介:周斌,硕士,主治医师。Tel: (0931) 4681795 Email: zhoubin1218@sohu.com

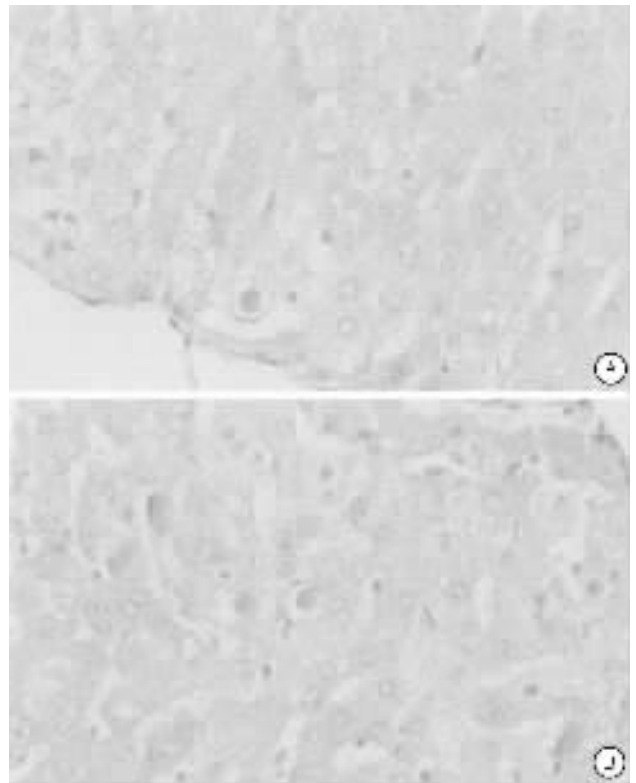
埋,制成4 μm 厚的石蜡片,HE染色,显微镜观察病理变化。②肝功能检测:分别于术后3、6、9、21 d将各组大耳白兔取材,自下腔静脉取血3.0 mL,4 $^{\circ}\text{C}$ 3000 r/min离心10 min后取上层血清测定谷丙转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)、血清白蛋白(ALB)。③ bax、bcl-2的免疫组化检测:先剖腹剪取肝右叶组织,约5 mm \times 5 mm \times 4 mm大小,置于40 g/L多聚甲醛固定24 h,后依次进行脱水、透明、浸蜡、包埋,然后切成4 μm 厚的石蜡片,贴片后行免疫组化染色。染色操作步骤:抗生物素链酶亲和素复合物法(SABC)。切片脱蜡至水,30 mL/L H₂O₂处理,微波II挡修复抗原20 min,滴加正常山羊血清10 min,滴加一抗,湿盒内4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 h,0.01 mol/L PBS洗2 \times 3次,滴加生物素兔化山羊抗兔IgG 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min,0.01 mol/L PBS洗2 \times 3次,滴加SABC复合物37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育20 min,0.01 mol/L PBS洗5 \times 4次,DAB显色,镜下控制反应时间,双蒸水终止反应,苏木素轻度复染,脱水、透明、封片、显微镜观察。结果判断和数据处理采用网格测试法。细胞质出现棕黄色颗粒为染色阳性细胞,染色结果综合染色强度及阳性细胞数量两个方面进行半定量分析,分别评分0~3分。染色强度:阴性(0分)浅黄色(1分);棕黄色(2分);棕褐色(3分)。阳性细胞数计分:无着色细胞(0分);阳性细胞数 \leq 1/3(1分);1/3~2/3(2分);大于2/3(3分)。根据两项结果相加分数判断结果:0分(-);2分(\pm);3分(+);4分(++)5分(+++)。每例切片观察5个高倍(\times 400)视野(向同一方向移动切片,不重复,不重叠)作为观察区,分别计数每个视野中的阴性与阳性细胞数,最后计算阳性百分率,即AI, AI = 阳性细胞数/(阳性细胞数+阴性细胞数)。

统计学处理:所有实验数据用SPSS 8.0软件进行统计学处理,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间观测指标随时相变化比较采用重复测量数据的方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 术后一般状况及取材时肉眼观察 A组实验动物于胆总管结扎手术后12 h出现尿色加深,术后2 d出现皮肤及巩膜黄染,大便颜色变浅,随梗阻时间延长,食欲及精神减退,反应逐渐迟钝,皮肤及巩膜黄染进一步加重。取材时见肝脏明显增大,边缘变钝,颜色逐渐由暗红转变为棕黄色,质地由软变硬。术后21 d取材时见有腹水,肝脏表面呈结节样改变。B组皮肤巩膜黄染较轻,发生时间较晚;肝脏表面结节较小量少。

2.2 光镜下形态学改变 A组动物于胆总管接扎3 d即见肝细胞轻度水肿,肝内胆管扩张,汇管区炎性细胞浸润,可见少量细胞凋亡,表现为肝细胞嗜酸性变,细胞质浓缩,核染色质向核仁或核周边聚集。结扎6 d,肝细胞轻至中度水肿,纤维组织增生,胆小管扩张及中度增生,胆栓形成,汇管区炎性细胞浸润增多,细胞凋亡增加。结扎9 d,肝细胞中度水肿,部分细胞脂肪变性,可见再生的肝细胞,汇管区胶原结缔组织明显增生并向肝小叶内扩展,细胞凋亡达到高峰,可见嗜酸性小体(图1A);结扎21 d,肝脏结构广泛改变,细胞凋亡有所减少,肝假小叶形成,肝索变窄,肝窦增宽,大部分肝细胞胞质浓缩,部分肝细胞变性坏死。B组与同时期A组比较,肝细胞凋亡、炎性细胞浸润及肝纤维化程度均较轻(图1B)。



A:胆总管结扎9 d;B:胆总管结扎+注射三七总皂甙9 d。

图1 大耳白兔肝组织形态学改变 HE \times 400

2.3 肝功能的改变 A组和B组的血清TBIL和ALT随胆道梗阻的时间延长而逐渐升高,而白蛋白逐渐下降。B组与A组ALT比较明显降低($P < 0.05$,表1)。

2.4 各组肝组织 bax、bcl-2 的表达及与 AI 的关系 胆道结扎后,肝脏可见 bcl-2 和 bax 蛋白表达。表达最多的是肝实质细胞胞质,枯否细胞和内皮细胞也有表达。bax 蛋白于结扎3 d即有表达,结扎9 d达高

峰,此后开始下降。而 bcl-2 蛋白在梗阻 21 d 表达最明显。AI 于结扎 3 d 开始升高,随 bax 的表达增强而上升,于结扎 9 d 达高峰,此后随 bcl-2 的表达增强而下降,于 21 d 降至最低。PNS 干预组的大耳白兔肝组织 bax 蛋白较同时相单纯结扎组明显下调,bcl-2 蛋白较同时相单纯结扎组上调,凋亡指数较低(表 2,3)。

表 1 术后各组血清 TBIL, ALT 及 ALB 含量变化

(n=6, $\bar{x} \pm s$)

指标	组别	3 d	6 d	9 d	21 d
TBIL(μmol/L)	A	20.1±6.2	34.7±9.5	64.7±11.1	140.9±21.7
	B	17.5±4.6	30.3±8.4	63.8±12.9	131.9±24.2
ALT(μkat/L)	A	1.7±0.2	6.1±0.5	9.5±0.6	12.3±0.8
	B	1.4±0.1	5.4±0.3	8.5±0.4	11.1±0.8
ALB(g/L)	A	50.9±6.3	39.6±4.3	32.1±3.4	16.6±3.3
	B	48.9±6.7	39.7±3.0	29.0±4.7	18.8±2.9

表 2 各组肝组织 bax, bcl-2 表达评分 (n=6)

指标	组别	3 d	6 d	9 d	21 d
bax	A	3	4	5	3
	B	2	2~3	4	3
bcl-2	A	2	3	3~4	4
	B	3	3~4	4	4~5

表 3 各组肝组织 AI 值 (n=6, $\bar{x} \pm s$)

组别	3 d	6 d	9 d	21 d
A	23.7±3.1	43.6±4.8	72.9±5.7	29.2±5.1
B	13.4±2.3	31.8±3.5	49.3±4.4	20.7±3.9

3 讨论

bax 和 bcl-2 基因是目前最受关注的与细胞凋亡相关的基因,通过转基因动物和基因转染实验研究发现 bcl-2 对细胞凋亡具有明显的抑制作用,而 bax 拮抗 bcl-2,促进细胞凋亡^[1]。本实验提示 bcl-2 和 bax 可能多以二聚体的形式调控肝细胞凋亡。胆道梗阻 9 d 前 bax 同二聚体的数量增多,从而促进细胞凋亡, AI 值较高,而 9 d 后 bcl-2 增多,促进形成 bcl-2/bax 异二聚体,并使 bcl-2 同二聚体的量增多,从而抑制细胞凋亡, AI 值降低。梗阻性黄疸肝损伤发生细胞凋亡的可能机制为:①钙超载。梗阻性黄疸时肝细胞内胆汁酸含量明显上升,肝细胞内线粒体受损,使肝细胞内氧化磷酸化产能减少,导致了肝细胞生物膜损伤、钙泵功能丧失,胞内 Ca²⁺ 升高,触发细胞凋亡。②氧自由基致损伤。胆道梗阻后肝脏氧自由基增多,氧自由基能够导致 DNA、蛋白质、脂膜的氧化损伤,从而导致细胞凋亡^[2]。氧自由基增多的原因一是肝脏

有效血流量明显减少,缺氧导致线粒体呼吸链电子传递障碍,结果产生大量氧自由基;二是自由基清除酶系在体内合成减少,自由基清除能力下降;三是胆盐阻碍线粒体呼吸链的电子传递,增加电子外泄率,促进氧自由基的形成^[3]。③炎症细胞浸润。胆道梗阻后,由于肠道胆盐缺乏,清除内毒素的能力下降,大量内毒素吸收入血,形成肠源性内毒素血症,内毒素具有刺激单核细胞产生 TNF-α 等的作用。而肝细胞功能受损,对 TNF-α 等细胞因子灭活能力下降,使这些细胞因子在血液及组织中持续升高^[4]。TNF 可能通过激活细胞 Ca²⁺ ~ Mg²⁺ 依赖的限制性核酸内切酶,导致基因组 DNA 分子降解为寡聚核苷酸片段,引发细胞凋亡^[5-6]。

PNS 主要包含人参二醇型皂甙 Rb1、人参三醇型皂甙 Rg1 和三七皂甙 R1。实验研究证实 PNS 是一种选择性的慢钙通道阻滞剂,它能减少自由基的产生和清除已产生的自由基,对心、肝、肾缺血性再灌注损伤中有明显的保护作用^[7]。PNS 有肝保护和抗肝纤维化作用^[8]。另外,它还有抗炎作用。李晓辉等^[9]报道 PNS 具有良好抗炎活性,其机制与抑制炎症细胞因子 TNF 及 NO 水平的升高有密切关系,发现胆总管结扎后随着胆红素水平的逐渐升高,肝脏病理损伤加重,肝脏合成蛋白的能力下降,表现为 ALT 的值升高, ALB 的下降。但是 PNS 干预组的大耳白兔肝组织病理损害较同时期未干预组轻,ALT 较低,ALB 较高,而且其 bax 蛋白较同时相单纯结扎组大耳兔明显下调,bcl-2 蛋白较同时相单纯结扎组上调, AI 值较同时相单纯结扎组降低,说明 PNS 对梗阻性黄疸肝细胞的凋亡有抑制作用,其原因可能为:①PNS 作为一种钙通道阻滞剂,能阻滞细胞内钙超载,进而减少凋亡的启动,使肝细胞凋亡减少;②自由基是一种凋亡刺激因子,PNS 能减少自由基的产生和清除已产生的自由基,从而减少肝细胞凋亡的发生;③PNS 可能通过其抗炎作用减轻内毒素血症和细菌移位对肝细胞等的损害,从而减少凋亡的启动。

我们推测 PNS 可能通过抑制肝细胞的凋亡来发挥其保护作用,其机制可能是与上调肝组织 bcl-2 蛋白及下调肝组织 bax 蛋白有关。

【参考文献】

- [1] Wolter KG, Hsu YT, Smith CL, et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis[J]. J Cell Biol, 1997, 139(5): 1281-1292.
- [2] 范作文,王均志,黄从新. 线粒体与心肌细胞凋亡的研究进展[J]. 中华心血管杂志 2002, 30(5): 317-318.
- [3] 张永刚, 迟彦邦, 杨彤翰. 粉防己碱对胆汁性肝纤维化保护作用

的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 1999, 5(5) 317 - 320.

- [4] 李端阳, 吴金生, 马庆久, 等. 实验大鼠梗阻性黄疸形成中 TNF- α 和 IL-6 对肝脏的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 1999, 15(2) 126 - 128.
- [5] Enari M, Hug H, Hayakawa M, et al. Different apoptotic pathways mediated by Fas and the tumor-necrosis-factor receptor. Cytosolic phospholipase A2 is not involved in Fas-mediated apoptosis[J]. Eur J Biochem, 1996, 236(2) 533 - 538.
- [6] Deocster E, Vanhaesebroeck B, Vandenaabeele P, et al. Generation and biological characterization of membrane-bound, uncleavable mu-

rine tumor necrosis factor[J]. J Biol Chem, 1995, 270(31) : 18473 - 18478.

- [7] 马珂, 汤金士. 三七皂甙的实验研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志, 2002, 12(3) 197 - 199.
- [8] 张荣华, 周子成, 洪多伦, 等. 三七抗肝纤维化的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(4) 307 - 309.
- [9] 李晓辉, 李淑慧. 三七总皂苷对 TNF、NO 含量的影响及其机制研究[J]. 中草药, 1999, 7(30) 514 - 517.

编辑 何扬举

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)19-1768-01

典型十二指肠淤滞症 1 例

黄良珍, 黄进, 郭炜, 董茵茵
(第四军医大学唐都医院放射科, 陕西 西安 710038)

【关键词】十二指肠 淤滞症 肠系膜
【中图分类号】R574. 51 【文献标识码】B

1 临床资料 患者, 男, 35 岁, 7 a 前无明显诱因出现上腹部疼痛、饱胀、呃逆、恶心、呕吐, 以进食后较著, 采取俯卧位及左侧卧位上述症状可缓解。曾做胃镜检查未见明显异常, 给予对症支持治疗, 症状未见明显好转, 患者体质量下降, 面色灰白。查体: 上腹部膨隆, 可见肠型及蠕动波, 腹壁静脉无扩张, 腹软, 无明显压痛及反跳痛, 肝脾肋下未及。双肺呼吸音清, 未闻及干湿罗音, 心律齐, 各瓣膜无杂音, 体温、脉搏、呼吸、血压均正常。实验室检查: 血尿粪常规、肝功、乙肝系列、肾功均正常。胸部 X 线正位片无异常。腹部 B 超肝、胆、胰、脾、肾未见异常。上消化道钡餐造影见十二指肠下水平部(横部) 一外压性呈笔杆样充盈缺损, 其近端肠管扩张, 钡剂壅积, 通过不畅, 蠕动增强, 有频繁的逆蠕动, 并见钡剂由十二指肠球部返流入胃(图 1)。患者采取左侧卧位及俯卧位后见逆蠕动消失, 钡剂顺利通过。手术及病理: 20 mL/L 利多卡因 37 mL 硬膜外全身麻醉, 行“十二指肠空肠吻合 + 十二指肠悬韧带松解术”。术中见十二指肠降部及水平部近端扩张, 肠系膜上动脉紧贴十二指肠水平部前壁向下走行。取点状肠系膜组织全包送病检, 镜下见少许淋巴及系膜组织均呈慢性炎性改变。



图 1 十二指肠横部中段以上十二指肠淤滞, 宽约 3.7 cm

2 讨论 十二指肠淤滞症又称肠系膜上动脉压迫综合症或 Wilkie 病, 压迫性肠梗阻, 以肠系膜上动脉压迫十二指肠水平部所引起的十二指肠部分或完全梗阻而出现的一系列症状。多见于瘦长型患者, 中青年女性偏多, 发病常在 30 岁以后。一般病程较长, 呈间歇性发病, 极少数可急性发作。主要症状是餐后 15 ~ 40 min 出现腹痛、腹胀、暖气、恶心、呕吐, 呕吐物为胃内容物, 其中可带有胆汁。若采取俯卧位、左侧卧位或胸膝位时 2/3 患者上述症状可缓解, 病程较长者可有消瘦、体质量下降和贫血等营养不良, 还有部分患者可出现神经官能症状。放射学表现为吞钡剂后, 在十二指肠下水平部, 见一与肠系膜上动脉走行一致的光滑的笔杆形纵形压迹呈刀割样阻断, 此压迹可与其他原因引起的十二指肠淤滞症相鉴别^[1], 一般位于脊信偏右处, 其近端扩张壅积, 蠕动增强, 并有频繁逆蠕动, 呈钟摆样运动。常在数分钟后, 方见钡剂少量通过狭窄处进入空肠, 而钡剂在近端长时间停留, 不能顺利通过。此时若采取俯卧位透视, 常见逆蠕动消失, 钡剂顺利通过。若肠系膜上动脉压迫严重时, 除十二指肠淤滞扩大外, 钡剂还可经逆蠕动返流入胃, 甚至出现胃排空延迟、胃扩张与胃潴留。除上述肠系膜上动脉压迫为主要原因外, 还要与十二指肠动力功能失调、先天性畸形、屈氏(Treitz) 韧带过短和附近的肠系膜过厚、其他器质病变、十二指肠外的其它病变压迫等原因引起的十二指肠淤滞症相鉴别^[2]。

本病临床少见, 缺乏特异性消化道症状, 不典型病例常被临床医师及影像科医师忽视, 易造成误诊或漏诊。首选检查方法是钡餐造影, 典型病例一般都可确诊, 不典型病例通过多体位、多角度仔细观察, 并结合有关临床资料, 如间歇性进食后腹胀、恶心、呕吐, 诊断和鉴别诊断并不困难。其症状与体位有关, 仰卧位时加重, 俯卧位、侧卧位时减轻。近年来, 腹腔薄层 CT 及血管重建显像的应用为本病诊断及鉴别诊断提供了更先进的手段。必要时还可经内镜逆行胰胆管造影、超声内镜等进一步明确病变。本病症状较轻者可保守治疗, 一般可好转; 症状较重者或保守治疗效果欠佳者首选手术治疗。本例患者术后随访消化道症状消失, 病情痊愈。

【参考文献】

- [1] 吴恩惠. 医学影像诊断学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002 : 528.
- [2] 王 濂. X 线诊断学[M]. 石家庄: 河北教育出版社, 1993 : 531 - 532.

编辑 袁天峰