

粗叶悬钩子总生物碱抑制肝细胞凋亡的超微结构与 TUNEL 染色观察

陈文列^{1,2}, 洪振丰^{1*}, 李天骄¹, 赵锦燕^{1,2}, 林久茂^{1,2}, 周建衡¹, 黄美雅^{1,2}

(1. 福建中医学院 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350108;

2. 福建中西医结合研究院 重点实验室, 福建 福州 350108)

[摘要] 目的:研究粗叶悬钩子总生物碱对肝细胞凋亡及肝细胞超微结构的影响。方法:60只大鼠随机分为正常组、模型组、粗叶悬钩子总生物碱处理组和阳性药对照组。采用CCl₄腹腔内注射建立肝损伤大鼠模型。应用TUNEL检测各组肝组织的凋亡指数,电镜观察肝细胞超微结构。结果:粗叶悬钩子总生物碱处理组与阳性药对照组的大鼠肝细胞超微结构损伤程度、肝组织中凋亡指数,均分别较模型组显著减轻与下降。结论:粗叶悬钩子总生物碱能明显减轻肝细胞超微结构损伤,抑制肝组织中细胞凋亡。

[关键词] 粗叶悬钩子;总生物碱;细胞凋亡;超微结构;原位末端标记法

粗叶悬钩子 *Rubus alceaefolius* Poir 为蔷薇科悬钩子属植物,根、叶均可入药,在福建闽南安溪一带广泛应用于各型肝炎治疗,疗效显著。该草药具有良好民间用药基础,是一种极具潜力药用资源,值得大力开发研究。本课题组前期研究工作表明粗叶悬钩子根部粗提物与总生物碱对急性肝损伤有防治作用^[1-2],为探讨其作用机制,进一步研究其抑制肝细胞凋亡现象及其损伤的超微结构。

1 材料

1.1 动物 清洁级SD大鼠60只,体重180~220g,雌雄各半,上海斯莱克实验动物有限责任公司提供;适应性饲养5d后再行实验。

1.2 总生物碱的制备^[3-4] 粗叶悬钩子根部醇提取液沉淀,晾干;所得物质分别经饱和苦味酸检识证明是生物碱,再配制成低、中、高(1:3:6)剂量组待用。

2 方法

2.1 分组造模与给药 SD大鼠按体重随机分为6组,分别为正常空白组、急性肝损伤模型组、总生物

碱(低、中、高剂量)干预组和阳性药对照组,雌雄各半,每组10只。空白组给予生理盐水一次性腹腔注射0.2mL;其余各组给予99.5%四氯化碳(CCl₄,分析纯)一次性腹腔注射(100g体重0.1mL),造成大鼠急性肝损伤模型。造模24h后,空白组及模型组用生理盐水灌胃;阳性药组给予联苯双酯灌胃(0.1g·kg⁻¹,1%);总生物碱干预组分别给予生物碱低剂量3.6%、中剂量7.2%、高剂量14.4%,灌胃量2mL/只,1次/d(相当于总生物碱0.36,0.72,1.44g·kg⁻¹·d⁻¹),连续7d。

2.2 常规光镜制片与观察 于末次操作后禁食不禁水,24h后取材。取肝右叶中央部位组织,10%中性福尔马林溶液中固定,石蜡包埋,切片5μm,HE染色,光镜下作组织病理学观察。

2.3 TUNEL(原位末端标记法)染色观察凋亡细胞 石蜡切片5μm,二甲苯脱蜡,PBS冲洗,胃蛋白酶消化,PBS冲洗;加TUNEL反应液(福建迈新公司提供试剂盒)37℃孵育60min,PBS冲洗;加碱性磷酸酶抗体37℃孵育30min,PBS冲洗;加1~2滴BCIP/NBT,室温下孵育10~30min,PBS冲洗;苏木素复染;水性封片剂封片、烘干,光镜观察细胞核蓝色为阳性。每组取6个样本,每个样本计数5个不同视野凋亡肝细胞的总数。

2.4 细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)统计学分析 凋亡细胞Tunel法染色片,每张切片在显微镜高倍镜下随意选取5个视野,计算阳性率平均值,并分为5

[收稿日期] 2009-10-12

[基金项目] 福建省自然科学基金(2006J0109);福建省老年性疾病重点实验室开放课题基金(2008J1004-35);陈可冀中西医结合发展基金(CKJ2008072);福建省教育厅重点课题(JA07J11)

[通信作者] *洪振丰,教授,硕士研究生导师,主要从事中医药抗肝损伤药理研究, E-mail: zfhong1953@163.com

[作者简介] 陈文列,研究员,硕士研究生导师,从事中医药干预的细胞生物学研究, E-mail: chen.wl@126.com

级(0 级 < 2% , 1 级 < 3% ~ 9% , 2 级 < 10% ~ 19% , 3 级 < 20% ~ 39% , 4 级 > 40%)^[5]。观察各组肝凋亡细胞比例以确定凋亡指数。用 SPSS 11.5 版本统计软件处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差分析, 计数资料用秩和检验。

2.5 透射电镜制样与观察 取材后经 3% 戊二醛-1.5% 多聚甲醛前固定数天(4 ℃), 1% 锇酸-1.5% 亚铁氰化钾后固定 1.5 h, PBS 漂洗; 70% 乙醇饱和醋酸铀染液块染, 乙醇-丙酮梯度脱水, 环氧树脂 618 包埋剂包埋。超薄切片 80 nm, 醋酸铀、柠檬酸铅各染色 5 min; 在日立透射电镜下观察、摄影。

3 结果

3.1 TUNEL(原位末端标记)染色光镜观察

TUNEL 染色阳性的凋亡细胞核呈紫黑色。空白组肝细胞状态良好, 细胞圆形或类圆形, 细胞质

形状规则, 细胞核仅见极少数明显的紫黑色细胞。模型组中有很多细胞核被深染为紫黑色的凋亡细胞, 可见细胞缩小, 细胞间隙增大, 凋亡细胞体积变小、变形; 细胞凋亡晚期可见凋亡小体, 而坏死细胞的体积胀大, 细胞膜损伤或裂解成碎片。阳性药对照组中可见到小片坏死脱落细胞碎片, 但细胞形态明显好于模型组。生物碱低剂量组可见凋亡细胞, 数量与模型组相比没有显著性差异, 多个细胞有明显凋亡形态改变, 细胞染色质浓缩、靠近核膜和出现核着边现象, 核膜裂解、染色质分割成块状; 细胞周围可见多个完整膜包裹的凋亡小体; 偶可见坏死细胞, 细胞肿胀崩解, 形态不规则。生物碱中剂量组可见散在凋亡细胞, 但数量明显少于模型组。生物碱高剂量组偶见凋亡细胞(图 1)。

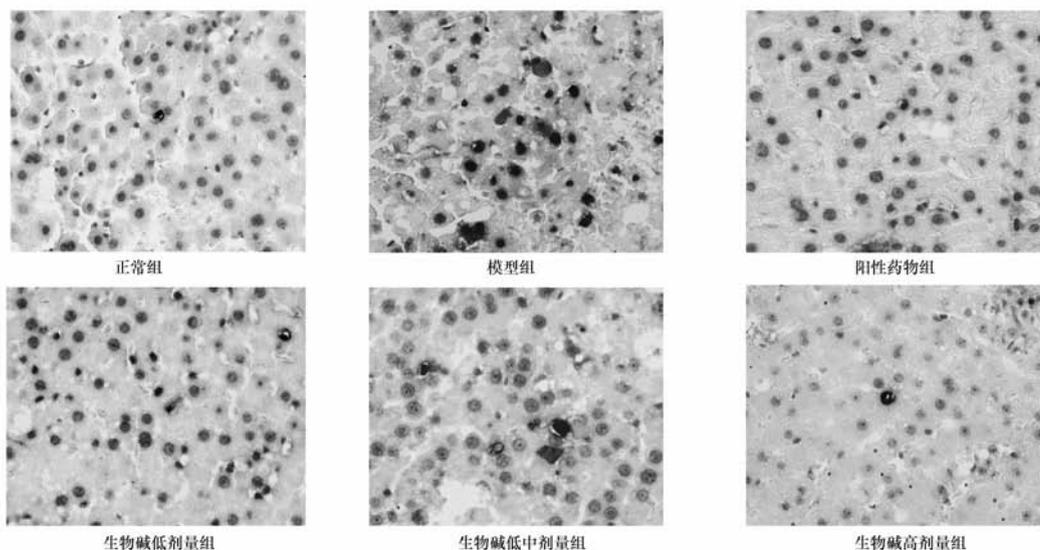


图 1 各组肝组织细胞凋亡观察(TUNEL 法, ×200)

3.2 TUNEL 染色检测凋亡指数(AI) 模型组大鼠肝组织凋亡指数明显增高, 与空白组相比有高度显著性差异($P < 0.01$); 粗叶悬钩子生物碱治疗组不同程度地降低了肝组织凋亡指数, 中剂量组与造模组比较具有显著性差异($P < 0.05$), 高剂量组与造模组比较具有高度显著性差异($P < 0.01$)(表 1)。

3.3 透射电镜观察 空白组: 多数细胞结构正常, 线粒体丰富、散在或成堆; 板层状粗面内质网(RER)可见, 滑面内质网(SER)呈小泡状; 未见空泡样结构及内质网扩张; 糖原量中等或偏少, 多散

表 1 粗叶悬钩子总生物碱对 CCl₄所致大鼠急性肝损伤凋亡指数(AI)的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	AI
空白	-	0.23 ± 0.16
模型	-	3.75 ± 1.04 ¹⁾
联苯双酯	0.10	1.91 ± 1.02 ³⁾
生物碱	0.36	2.87 ± 0.93
	0.72	2.30 ± 0.76 ²⁾
	1.44	1.32 ± 0.91 ³⁾

注: 与空白组比¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组比²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

在;部分细胞可见中小溶酶体;少数细胞内可见数个较小脂滴。模型组:胞质粗面内质网急剧扩张,可见大小不一“池内隔离”现象;大量滑面内质网增生;并有大量大小不同脂滴,空泡样结构常见;可见溶酶体及髓鞘样结构;线粒体固缩、基质深或形态结构较不规则,散在分布。少数区域少数细胞内尚有糖原散在。多数细胞呈上述不同程度变性外,肝窦附近的肝细胞受损较明显,坏死细胞多见,一些细胞已崩解,释出胞质成分;并见白细胞浸润。可见早期凋亡细胞,核固缩变小,或异染色质边聚(沿着核膜下分布)。阳性药对照组:大部分区域细胞结构未见明显受损,未见明显扩张的 RER 或“池内隔离”现象;少部分区域 RER 扩张;少部分细胞的局部 SER 较多,可见少量小残体或空泡,有的细胞中小脂滴较常

见,个别细胞局部区域见糖原;部分近肝窦的区域细胞受损仍明显,见大脂滴散在、中小脂滴成堆,线粒体肿胀;并见早期凋亡细胞,核染色质边聚。生物碱中剂量组:部分组织区域细胞结构较好,相当多细胞中线粒体形态结构较好;线粒体丰富,糖原丰富;溶酶体常见,残体可见;细胞未见空泡样变及明显扩张的 RER。部分区域胞质基质松散,线粒体基质深, SER 扩张,少数板层状 RER 可见;或脂滴较多、大小不一;见个别早期凋亡细胞。近肝窦处可见细胞破坏;脂滴比高剂量组多。生物碱高剂量组:大多数细胞结构较正常,线粒体丰富, RER 较丰富、散在;未见空泡样结构或内质网扩张。少部分细胞内糖原成堆或散在;少部分细胞中见一点中小脂滴。未见凋亡细胞(图 2)。

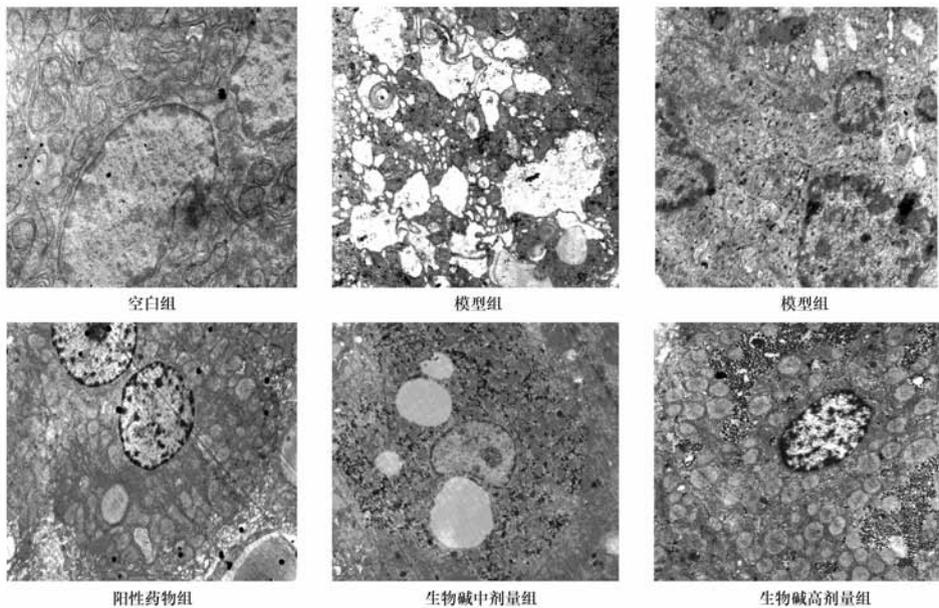


图 2 各组肝细胞超微结构观察(TEM, $\times 5\ 000$)

4 讨论

肝细胞凋亡是肝炎及肝衰竭的重要病理变化之一,既可直接引起肝细胞数量减少,也可引起继发性的肝细胞坏死和肝内炎症,而影响肝细胞数量和功能;在缺乏肝细胞再生前提下,肝细胞凋亡可引起肝萎缩^[5]。研究表明抗氧化剂能抑制肝细胞凋亡^[6],而粗叶悬钩子就有减轻脂质过氧化等作用^[2]。

CCl_4 诱导的急性肝损伤模型组,细胞凋亡指数比正常组显著增高,表明细胞凋亡是导致急性肝损

伤重要作用之一,电镜下可见一些早期凋亡细胞和坏死细胞。而许多细胞超微结构出现不同程度破坏,如粗面内质网急剧扩张,形成大量“池内隔离”现象,将严重影响蛋白质合成功能,是药物中毒后出现的细胞致死性变化;肝细胞大量滑面内质网增生,是细胞增强解毒功能的表现;线粒体固缩等变化将影响细胞供能;髓鞘样结构出现,提示细胞生物膜结构受损明显,故溶酶体也相应增加,通过自噬作用清除受损膜性结构;而大量脂滴出现,表明正常脂代谢

受影响,故大量 CCl_4 也可以造成脂肪性肝炎。由于 CCl_4 及其代谢物通过血循环进入肝脏,因此血窦附近受破坏的细胞较明显。由于肝细胞膜和线粒体膜受损致通透性增加,甚至细胞坏死,使分布于细胞质与线粒体中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)释放入血,致血清中转氨酶活性增高^[7]。

本研究结果显示粗叶悬钩子生物碱干预组不同程度地降低了肝组织中凋亡指数,其中高剂量组与模型组比较具有高度显著性差异,表明粗叶悬钩子能抑制肝细胞凋亡。电镜观察见生物碱高剂量组,大多数细胞结构恢复正常,线粒体和内质网结构与分布较正常,未见凋亡细胞、内质网扩张,只有少部分细胞中见小脂滴。结果显示粗叶悬钩子生物碱可改善在细胞凋亡进程中具有重要作用的内质网和线粒体超微结构,修复肝细胞的生物膜,而抑制肝细胞凋亡,从而减少肝损伤。其机制可能是粗叶悬钩子的粗提物^[1]尤其是总生物碱^[2],通过抑制 CCl_4 引起的脂质过氧化反应、NO 细胞毒作用,以及总多糖^[4]抑制炎症因子异常增高,而抑制中毒的肝细胞凋亡,从而减轻肝细胞损害,故此可降低血清转氨酶^[7-8]活性。同时,生物碱高剂量组肝细胞脂滴明显减少,表明粗叶悬钩子具有调节肝脏脂类代谢,避免脂肪肝形成的潜在作用,值得深入研究开发。因此,粗叶悬

钩子与几种不同保肝中药有类似作用现象^[9],通过抑制肝细胞凋亡,并促进正常肝细胞增值,而达到保肝与治疗的作用。

[参考文献]

- [1] 洪振丰,王玉华,陈艳华. 粗叶悬钩子对小鼠急性肝损伤保护作用的研究[J]. 中国中医药科技,2005,12(6):375.
- [2] 黄玲,洪振丰,周建衡,等. 粗叶悬钩子根部提取物对急性肝损伤大鼠血清 NO 和肝组织 SOD、MDA 的影响[J]. 中国中医药科技,2008,15(1):36.
- [3] 卢艳花. 中药有效成分提取分离技术[M]. 北京:化学工业出版社,2005:304.
- [4] 洪振丰,周建衡,李天娇,等. 粗叶悬钩子根部提取物对急性肝损伤大鼠 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的影响[J]. 中华中医药学刊,2007,25(6):1137.
- [5] Papakvriakou P, Tzardi M, Valatas V, et al. Apoptosis and apoptosis related proteins in chronic viral liver disease[J]. Apoptosis, 2002,7:133.
- [6] Kaplowitz N, Tsukamoto H. Oxidative stress and liver disease[J]. Prog Liver Dis, 1996:131.
- [7] 洪振丰,李天娇,赵锦燕,等. 粗叶悬钩子总生物碱对急性肝损伤大鼠肝组织 CYP2E1 与 CYP3A1 酶 mRNA 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志,2009,29(8):711.
- [8] 周建衡,洪振丰,李天娇,等. 粗叶悬钩子根部提取物对急性肝损伤的治疗作用研究[J]. 实用中西医结合临床,2007,7(1):78.
- [9] 梅景良,黄一帆,祁保民,等. 中药对欧鳊实验性肝病保护作用的超微结构观察[J]. 中国实验动物学报,2007,15(5):342.

Ultrastructure and TUNEL staining on inhibition of *Rubus alceaefolius* total alkaloids for apoptosis of liver in rat models of acute hepatitis

CHEN Wenlie, HONG Zhenfeng, LITianjiao, ZHAO Jinyan^{1,2}, LIN Jiumao^{1,2}, ZHOU Jianheng¹, HUANG Meiya^{1,2}

(1. Key Laboratory of Basics of Integrative Medicine of Fujian Higher Education, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. Key Laboratory of Fujian Academy of Integrative Medicine, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anti-apoptosis effects of *Rubus alceaefolius* total alkaloids in rats with hepatic injury.

Method: The hepatic injury model of rat was induced by intraperitoneal injection with CCl_4 . Sixty SD rats were randomly divided into the normal group, the model group, the *R. alceaefolius* total alkaloids intervened group, and the bifendate intervened group. The expressions of the levels of liver cell apoptosis were determined by TUNEL. Ultrastructures of the liver cells were observed with transmission electron microscope. **Result:** Compared with the model group, the degree of hepatic injury and the positive expressions of apoptosis in liver tissues in the *R. alceaefolius* total alkaloids intervened groups and the bifendate intervened group were significantly lower. **Conclusion:** *R. alceaefolius* total alkaloids could reduce the pathological changes and degree of hepatic injury in rats, which may be partially through inhibiting the expressions of apoptosis in liver tissue.

[Key words] *Rubus alceaefolius*; total alkaloids; apoptosis; ultrastructure; TUNEL

doi: 10.4268/cjcm20100827