

文章编号 1006-8147(2023)03-0252-06

论 著

茵陈蒿汤对阻塞性黄疸大鼠肝细胞 ATF6/GRP78/CHOP 凋亡信号通路的影响

孙一萌¹, 刘浩², 刘军舰³, 吴艳丽⁴, 张西波³, 戚经天³, 李忠廉³

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.湖北省第三人民医院肾内科, 武汉 430033; 3.天津市中西医结合医院肝胆胰外科二, 天津 300100; 4.东营市中医院重症医学科, 东营 257055)

摘要 目的:探讨茵陈蒿汤对阻塞性黄疸大鼠肝细胞凋亡通路转录激活因子6(ATF6)、葡萄糖调节蛋白78(GRP78)、C/EBP同源蛋白(CHOP)及谷丙转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的影响。方法:将正常大鼠肝细胞系(BRL-3A)分为胎牛血清配制的培养基培养的对照组(S组)、阻塞性黄疸血清配制的培养基培养的阻塞性黄疸组(O组)以及梗阻性黄疸血清+茵陈蒿汤含药血清配制的培养基培养的阻塞性黄疸+茵陈蒿汤组(Y组),分别于培养6、24、48 h后收集细胞。观察细胞形态且采用TUNEL法检测细胞凋亡情况,采用Western印迹和q-PCR法测定各组ATF6、GRP78及CHOP的蛋白及mRNA表达。采用ELISA法测定ALT、AST水平。结果:与S组相比,O组和Y组细胞各时间点均明显变小、变形和数量减少,凋亡指数明显升高,CHOP、ATF6和GRP78 mRNA及蛋白表达水平明显上调,上清液中AST、ALT含量均升高($F=29.75\sim 154.3$,均 $P<0.05$);与O组相比较,Y组细胞状态在每个时间点均有显著改善,凋亡指数均下降,CHOP、ATF6和GRP78 mRNA及蛋白表达水平明显下调或趋于下调,上清液中AST、ALT含量均下降($F=29.75\sim 154.3$,均 $P<0.05$)。结论:茵陈蒿汤可通过调控GRP78/ATF6/CHOP通路抑制细胞凋亡,减轻阻塞性黄疸引起的肝细胞损伤。

关键词 茵陈蒿汤;阻塞性黄疸;细胞凋亡;ATF6;GRP78;CHOP

中图分类号 R575

文献标志码 A

Influence of Yinchenhao decoction on the expression of ATF6/GRP78/CHOP apoptotic signaling pathway in hepatocyte of rats with obstructive jaundice

SUN Yi-meng¹, LIU Hao², LIU Jun-jian³, WU Yan-li⁴, Zhang Xi-bo³, Qi Jing-tian³, Li Zhong-lian³

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Nephrology, Hubei Third People's Hospital, Wuhan 430033, China; 3. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Tianjin Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Tianjin 300100, China; 4. Department of Critical Care Medicine, Dongying Hospital of Traditional Chinese Medicine, Dongying 257055, China)

Abstract Objective: To investigate the effects of Yinchenhao decoction on transcriptional activator 6 (ATF6), glucoregulatory protein 78 (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in hepatocyte apoptosis pathway of obstructive jaundice rats. **Methods:** The normal rat hepatocytes line (BRL-3A) was divided into the control group (S group) of media culture prepared by fetal bovine serum, the obstructive jaundice group (O group) of media cultured by obstructive jaundice serum and obstructive jaundice + Yinchenhao decoction (Y group) prepared by medium culture prepared with obstructive jaundice serum + Yinchenhao decoction, and the cells were collected after 6 h, 24 h and 48 h, respectively. The cell morphology was observed and apoptosis was detected by TUNEL method, and the protein and mRNA expression of ATF6, GRP78 and CHOP were determined by Western blotting and q-PCR. The levels of ALT and AST were determined by ELISA method. **Results:** Compared with the S group, the cells of the O group and Y group decreased significantly in size, deformation, and quantity at each time points, the apoptosis index increased significantly, the expression levels of ATF6, GRP78 and CHOP mRNA and protein were significantly regulated, and the contents of ALT and AST in the supernatant increased ($F=154.3\sim 29.75$, all $P<0.05$). Compared with group O, the cell state of group Y was significantly improved at each time point, the apoptosis index decreased, the expression levels of CHOP, ATF6 and GRP78 mRNA and protein were significantly downregulated or tended to be down-regulated, and the contents of AST and ALT in the supernatant decreased ($F=154.3\sim 29.75$, all $P<0.05$). **Conclusion:** Yinchenhao decoction can inhibit apoptosis and reduce hepatocyte damage caused by obstructive jaundice by regulating ATF6/GRP78/CHOP pathway.

Key words Yinchenhao decoction; obstructive jaundice; apoptosis; ATF6; GRP78; CHOP

基金项目 国家自然科学基金面上项目(81273952);天津市中医药重点领域科技项目(2021006);天津市卫生健康委员会中医中西医结合科研课题(2021042);2022 中央财政转移支付地方项目;天津市教委科研计划项目(2022KJ271)

作者简介 孙一萌(1997-),女,硕士在读,研究方向:中西医临床专业;通信作者:李忠廉, E-mail: nkyylzl@163.com。

阻塞性黄疸多因胆管结石、胆道闭塞、肿瘤压迫等胆管机械性梗阻使胆汁淤积,无法排除所致。通常会引起肝功能指标异常和肝细胞损害以及高胆红素血症、高胆汁酸血症、内毒素血症、细菌移位等病理改变,造成多器官功能障碍,其中肝损伤首当其冲^[1]。肝细胞凋亡是肝损伤最重要的基本发病机制之一,细胞凋亡是引起肝脏损伤和肝脏疾病的中心环节^[2]。茵陈蒿汤的主要组成药物是茵陈蒿、栀子、大黄,具有清热利胆、保肝疏肝、抗纤维化、降低血糖、降低血脂、抗炎止痛、抑制肝细胞凋亡的多种功效,对治疗肝损伤有很好的作用。近年来,内质网应激(ERS)在肝细胞凋亡中的作用机制是当前的研究热点,目前尚未完全阐明。未折叠蛋白(UPR)应答是 ERS 的一个重要信号转导通路,它包括肌醇依赖性激酶(IRE)1 α 和蛋白激酶 R 样内质网激酶(PERK)、转录活化因子 6(ATF6)3 个内质网跨膜蛋白。葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)是 ERS 诱导表达的关键蛋白,是 ERS 与 UPR 应答启动的一个标志。课题组在前期实验研究中发现,IRE1 α 、PERK 介导 ERS 过程中可能存在阻塞性黄疸肝细胞凋亡现象,茵陈蒿汤肝脏保护机制也可能与 ERS 在 IRE1 α 和 PERK 介导下发挥相关作用有关^[3-4]。本研究通过建立阻塞性黄疸肝损伤细胞模型,探讨阻塞性黄疸的肝损伤机制与 ATF6 介导的信号通路的关系,进一步阐明茵陈蒿汤减轻肝损害的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物与细胞 健康 SPF 级 Sprague-Dawley (SD)大鼠 12 只[许可证号:SCXK-(军)2014-0001],体重 200 g 左右(北京华阜康生物科技股份有限公司),在室温 20~25℃,相对湿度(50±20)%,12 h/12 h 明暗周期的环境下分笼饲养于动物实验室。实验细胞为大鼠正常肝细胞 BRL-3A,购自中国科学院上海细胞库,使用 DMEM 高糖培养基+1%青链霉素培养。接种于直径 6 cm 的培养皿中,每 2~3 d 传代 1 次,取生长情况良好的细胞用于本次实验。

1.1.2 主要试剂、药物与仪器 茵陈蒿汤由茵陈蒿 30 g、栀子 20 g、大黄 10 g 组成(天津市中西医结合医院);DMEM 高糖培养基(Hyclone 公司,美国);胎牛血清、胰蛋白酶(EDTA)(Gibco 公司,美国);二甲亚砜(DMSO)(Sigma 公司,美国);Anti-actin、Anti-ATF6、Anti-CHOP、Anti-GRP78、兔二抗、鼠二抗(北京百奥思科公司,货号分别为 MD409、MD4830、MD4846、MD886、MD2141、MD2142);cDNA 反转录试剂盒(Thermo Scientific 公司,美国,货号 K1621);

实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time PCR)试剂盒(南京建成公司,货号 N117);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(MDL 公司,货号 MD913053);TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(德国罗氏,货号 11684795910);大鼠谷丙转氨酶(ALT)ELISA 试剂盒(泽叶生物公司,货号 ZY60182R);大鼠天冬氨酸转氨酶(AST)ELISA 试剂盒(泽叶生物公司)。BHC-1300 II A2 型超净工作台(苏州金净净化设备科技有限公司);311 型 CO₂ 恒温培养箱(Thermo 公司,美国);3-30 型号 K 低温离心机(Sigma 公司,德国);电热恒温水浴槽(上海医用恒温设备厂);倒置相差显微镜(Olympus 公司,日本);TS-100 型脱色摇床(海门其林贝尔仪器制造公司);BG-sub MIDI 型电泳仪(北京百晶生物技术有限公司);170-8280 型 ChemiDoc MP 化学发光成像系统(Bio-rad 公司,美国);Gel Doc-It310 型凝胶成像系统(UVP 公司,美国);SDS-PAGE 电泳系统(BIO-Rad 公司,美国);QuantStudio 3 型 PCR 扩增仪(ABI 公司,美国);T100 型热循环聚合酶链式反应(PCR)仪。

1.1.3 中药及含药血清制备 中药冷水浸泡 30 min 后大火烧开,转文火煎药 45 min,再次加水以文火煎 30 min,保留汤药。阻塞性黄疸血清:SD 大鼠麻醉后消毒,上腹正中切口入腹,胆总管中上 1/3 行双重结扎,7 d 后留取阻塞性黄疸模型大鼠血清。茵陈蒿汤含药血清:根据茵陈蒿汤的临床用量计算出大鼠的等效剂量,按每 100 g 体重 1 mL 茵陈蒿汤剂量给 SD 大鼠灌胃^[5],2 次/d,连续灌胃 7 d,末次给药 2 h 后采血,留取茵陈蒿汤含药血清。下腔静脉采血,3 000 r/min 离心 15 min,分离血清,经 56℃、30 min 灭活处理后,用 0.22 μ m 微孔滤膜过滤细菌,-80℃冻存备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组与处理 将浓度为 2×10^5 /mL 的 BRL-3A 细胞接种到 12 孔培养板中,每孔 2 mL,共接种 27 孔,置 CO₂ 恒温箱中培养 24 h,观察细胞贴壁达 80%左右后将培养板移至超净工作台,吸弃每孔中的培养基并用 PBS 缓冲液洗 2 次,27 孔被随机分为 3 组,每组 9 孔,分别为对照组(S 组):DMEM 高糖培养基+15%胎牛血清常规培养;阻塞性黄疸组(O 组):DMEM 高糖培养基+5%阻塞性黄疸血清+10%胎牛血清;阻塞性黄疸+茵陈蒿汤组(Y 组):DMEM 高糖培养基+5%阻塞性黄疸血清+10%茵陈蒿汤含药血清。3 组细胞加入含相应血清的培养基 2 mL,分别在培养 6、24、48 h,3 个时间点取细胞沉淀与上清液,每个时间点每组取 3 孔。用 Western 印

迹法与 q-PCR 测每组细胞中 ATF6、GRP78、CHOP 蛋白与基因含量,上清液中测 ALT、AST 含量。

1.2.2 细胞一般形态观察 将细胞培养板从培养箱中取出,观察细胞培养液的颜色和清澈度,用 20 倍物镜观察细胞的轮廓、形状和内部结构。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(q-PCR)检测 BRL-3A 细胞中 ATF6、GRP78、CHOP mRNA 的水平 按照说明书裂解组织,提取总 RNA 并检测其浓度和纯度。根据逆转录试剂盒将 RNA 逆转录合成扩增前 cDNA。以 2 μ L cDNA 为模板,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参 mRNA,用 SYBR Green 按 95 $^{\circ}$ C 顺序预变性 2 min,94 $^{\circ}$ C 变性 20 s,60 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 40 个循环,按照 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行定量分析,PCR 引物由北京赛百盛基因技术有限公司设计,所需引物见表 1。

表 1 引物序列

Tab 1 Primer sequences

引物	序列	长度(bp)
GAPDH	上游 5'-GTTACCAGGCTGCCTTCTC-3'	249
	下游 5'-GGGTTTCCCGTTGATGACC-3'	
ATF6	上游 5'-ACCAGGTGAAGACTGGGAGT-3'	180
	下游 5'-TTAATGCTCTGAGCAGAAGTGGCT-3'	
GRP78	上游 5'-CTACGAAGGTGAACGACCC-3'	78
	下游 5'-GCAGGAGGGATTCCAGTCAG-3'	
CHOP	上游 5'-TGTGAAGATGACCGGTGG-3'	172
	下游 5'-CCGGTTTCTGCTTTCAGGTG-3'	

1.2.4 Western 印迹检测 BRL-3A 中 ATF6、GRP78、CHOP 蛋白表达 根据 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白变性后,以每孔 40 μ g 的量进行上样,进行电泳分析,转膜,封闭,裁剪目的条带,按照说明书配制稀释比例均为 1:1 000,将剪取条带置于一抗 4 $^{\circ}$ C 条件下孵育过夜,TBST 洗膜,按照说明书以二抗 1:2 000 的稀释比例配制二抗稀释液,室温孵育 2 h,洗膜,成像仪上进行信号检测,分析条带。

1.2.5 原位末端标记法(TUNEL)检测细胞凋亡情况 根据说明书,使用 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒进行 TUNEL 染色,检测细胞凋亡。通过末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)结合生物素化的脱氧核苷酸 DNA 片段。用 TACS Blue Label 检测生物素化核苷酸。TUNEL 染色后,切片用 4'-6-二氨基-2-苯基吡啶(DAPI)复染以检测细胞核,呈蓝色染色。TUNEL 阳性细胞为绿色染色的细胞(波长 488 nm)。

1.2.6 ELISA 试剂盒检测培养液中 ALT、AST 情况 收集得各孔细胞培养液,将细胞培养液经离心机 3 000 r/min 离心 10 min,取上层液使用全自动生

化仪检测各组血清 ALT、AST 水平。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 26.0 软件包分析数据。正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间的比较用单因素方差分析,进一步两两比较用 $LSD-t$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学变化 BCL-3A 大鼠肝细胞的正常形态特征如图 1A、1B、1C 所示。与 S 组相比,O 组和 Y 组细胞在所有时间点(图 1D、1E、1F)均明显变小、变形,数量减少;但与 O 组相比,Y 组细胞状态在每个时间点(图 1G、1H、1I)均有显著改善。

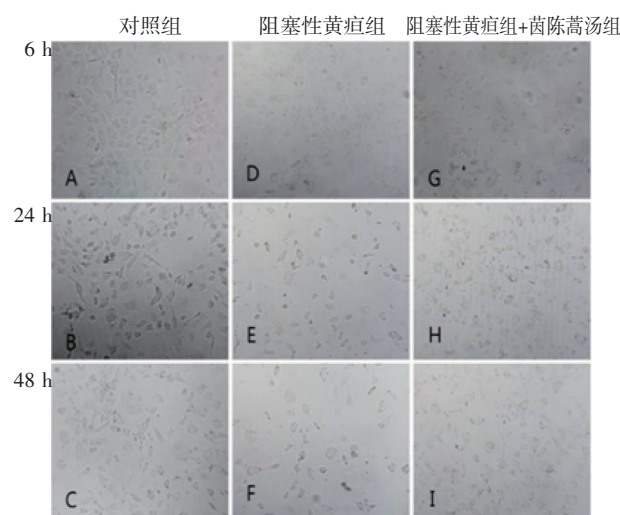


图 1 细胞形态学变化(100 \times)

Fig 1 Changes in cell morphology(100 \times)

2.2 TUNEL 法检测细胞凋亡 TUNEL 阳性染色结果如图 2 所示。与 S 组相比,O 组和 Y 组在每个时间点的凋亡指数均升高;与 O 组相比,Y 组在各时间点的凋亡指数均下降(均 $P < 0.05$),见表 2。

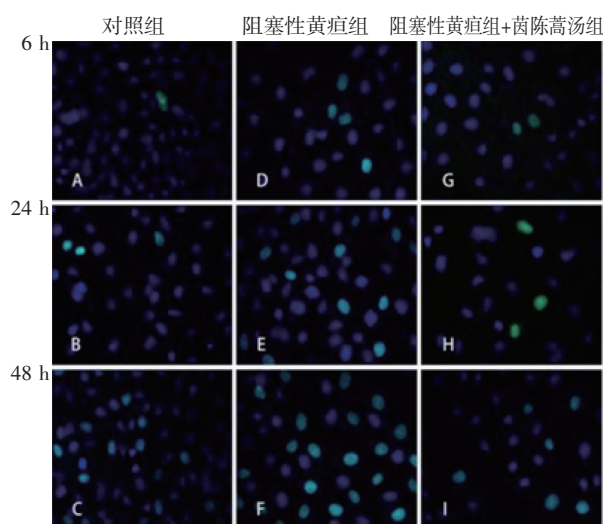


图 2 TUNEL 法检测细胞凋亡(100 \times)

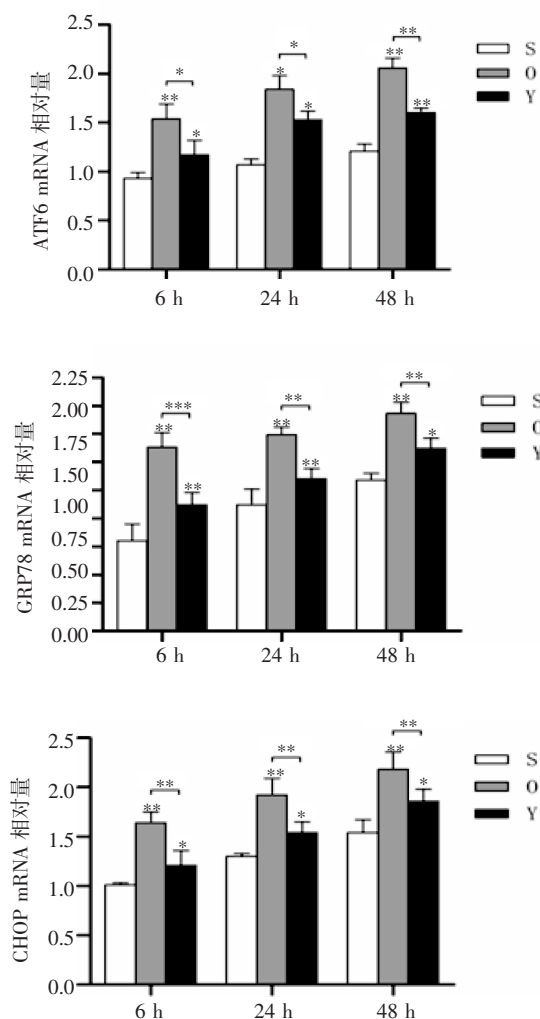
Fig 2 Apoptosis detected by TUNEL(100 \times)

表2 BCL-3A 大鼠肝细胞凋亡指数(%, $\bar{x}\pm s$)Tab 2 Hepatocyte apoptosis index in BCL-3A rats(%, $\bar{x}\pm s$)

时间点	S 组	O 组	Y 组	F	P
6 h	2.47±0.91	10.40±1.41	4.66±0.73	51.94	<0.001
24 h	8.73±1.76	24.56±1.96	13.93±1.91	46.62	<0.001
48 h	15.64±1.29	50.95±3.04	21.79±2.70	241.4	<0.001

注:O 组:阻塞性黄疸血清配制的培养基培养的阻塞性黄疸组;
Y 组:梗阻性黄疸血清+茵陈蒿汤含药血清配制的培养基培养的阻塞性黄疸+茵陈蒿汤组

2.3 mRNA 的表达水平 q-PCR 显示,在每个时间点,O 组和 Y 组的 ATF6、GRP78 和 CHOP 的 mRNA 表达水平均高于正常组(均 $P<0.05$)。与 O 组相比,Y 组在各时间点的 ATF6、GRP78 和 CHOP mRNA 表达水平均显著降低($F=52.46$ 、 129.5 、 280.9 、 91.87 、 81.36 、 108.4 、 79.95 、 62.98 、 43.40 ,均 $P<0.05$),见图 3。

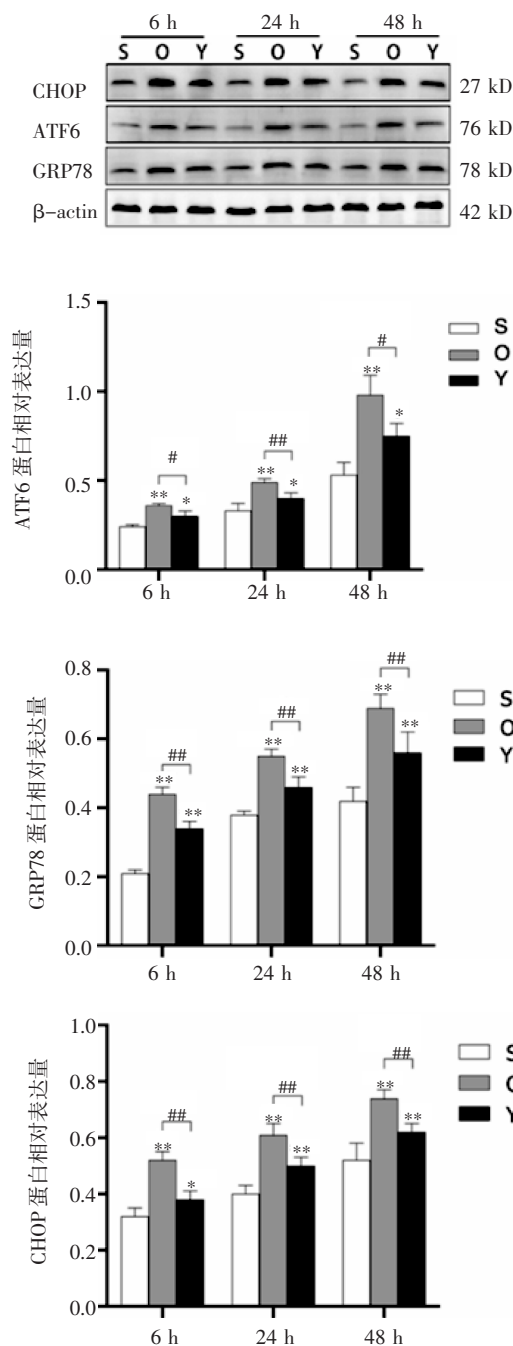


注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; GRP78: 葡萄糖调节蛋白 78; ATF6: 转录激活因子 6; CHOP: C/EBP 同源蛋白

图3 茵陈蒿汤对 ATF6、GRP78 和 CHOP mRNA 表达的影响

Fig 3 Effects of Yinchenhao decoction on the expression of ATF6, GRP78 and CHOP mRNA

2.4 蛋白质表达水平 Western 印迹显示,与 S 组比较,O 组和 Y 组的 CHOP、ATF6 和 GRP78 蛋白表达水平在各时间点均高于 S 组(均 $P<0.05$)。与 O 组相比,Y 组的 CHOP、ATF6 和 GRP78 蛋白表达水平在各时间点均显著降低($F=88.36$ 、 59.90 、 46.07 、 127.7 、 111.2 、 107.1 、 71.09 、 107.0 、 154.3 ,均 $P<0.05$),见图 4。



注: GRP78: 葡萄糖调节蛋白 78; ATF6: 转录激活因子 6; CHOP: C/EBP 同源蛋白; β -actin: 内参蛋白; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, # $P<0.05$

图4 Western 印迹检测蛋白质的表达水平

Fig 4 The expression of the protein detected by Western blotting

2.5 各时间点培养液中 ALT、AST 测定结果 与 S 组比较, O 组与 Y 组在各时间点 AST、ALT 水平均高于 S 组(均 $P < 0.05$); 与 O 组比较, Y 组在各时间点 AST、ALT 水平均低于 O 组, 但较 S 组高(均 $P < 0.05$), 见表 3。

表 3 ALT、AST 测定结果

Tab 3 Results of ALT and AST determination

指标	时间点	S 组	O 组	Y 组	F	P
AST(U/L)	6 h	25.20±1.62	43.59±2.24	36.51±1.71	73.29	<0.001
	24 h	29.43±2.81	57.75±3.93	43.96±1.73	68.72	<0.001
	48 h	30.92±2.92	64.82±4.47	48.24±2.16	77.96	<0.001
ALT(U/L)	6 h	20.29±2.79	36.23±2.98	26.43±1.70	29.75	<0.001
	24 h	26.94±1.68	45.45±3.37	36.48±2.57	37.10	<0.001
	48 h	32.92±2.05	54.43±4.88	41.99±2.56	30.36	<0.001

注: S 组: 培养基培养的对照组; O 组: 阻塞性黄疸血清配制的培养基培养的阻塞性黄疸组; Y 组: 梗阻性黄疸血清+茵陈蒿汤含药血清配制的培养基培养的阻塞性黄疸+茵陈蒿汤组; ALT: 谷丙转氨酶; AST: 谷草转氨酶

3 讨论

长期胆道梗阻可使胆汁阻塞无法正常排出, 胆汁瘀滞不畅使胆管增宽扩张, 含毒素胆汁也随流入血中, 肝脏在毒素作用下产生炎症, 毒素在胆道梗阻的作用下因不能排出体外而形成内毒素血症, 内毒素与肝损伤的形成有直接关系, 进而可能导致肝纤维化, 严重者会导致肝功能衰竭^[6-7]。从中医理论来讲, 黄疸多以感染湿热、疫毒、寒湿为主, 皮肤橘黄、颜色鲜明为多阳黄, 病因以感受湿热之邪, 邪湿内蕴为主, 发病较急, 病程较短; 皮肤虽黄但颜色晦暗多为阴黄, 多以感受寒湿之邪为主, 发病较缓, 病程较长。梗阻性黄疸的病因若持续存在, 会升高胆红素, 引起皮肤巩膜黄染, 严重时可能会引起肝细胞损害, 因此利用茵陈蒿汤降低胆红素, 进而褪去黄疸和治疗肝损害成为治疗本病的关键。茵陈蒿汤作为古今清热、利湿、退黄的代表方剂, 主要用于治疗湿热证为主的黄疸病。虽用药颇简, 配伍却十分严谨。此方茵陈为君药, 药量达 6 两, 重取其清热利湿、利胆退黄之功效, 从而利小便排出湿热之邪。栀子作为臣药, 用量 14 枚以清利中焦与下焦的湿热之邪, 佐以大黄 2 两, 增强其清热泻火退黄、泻下攻积之功效, 使谷疸不留于宿食, 湿热瘀积之邪褪去, 黄疸则消。现代药理学研究表明, 茵陈色原酮可以阻滞细胞周期从而抑制前列腺癌细胞增殖^[8], 茵陈蒿中乙酸乙酯能够通过阻断磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B 信号通路来诱导肝癌细胞的凋亡^[9]。栀子中的藏红花素在肠道内的水解为西红花酸, 有研究

显示, 西红花酸可显著抑制乙醛诱导的大鼠肝星状细胞增殖模型, 降低 I 型及 III 型胶原的合成并通过调控肝星状细胞 Bax、Bcl-2 的表达, 促进细胞凋亡^[10]。

内质网可以通过一系列协同适应性反应, 使内环境处于稳定状态, 当细胞受到缺氧、钙平衡紊乱、氧化应激或毒物反应等刺激时, 会影响内质网折叠修饰蛋白质的功能, 导致未折叠蛋白在内质网腔内聚集, 称为 ERS。研究发现, 许多肝脏疾病的发生、发展过程与 ERS 诱导的肝细胞凋亡均有密切关系。ERS 作为细胞对内质网压力反应的自我保护机制, 具有重要意义, 适度的 ERS 可通过 UPR 来减轻内质网蛋白质负荷, 保护内质网功能, 而 UPR 在内质网中的长时间积聚则会损伤内质网功能, 细胞会以凋亡的形式消除受损细胞。

ATF6 是一种 II 型跨膜感受蛋白, 存在于真核细胞内质网膜上, 是 CREB/ATF 转录因子家族的一员。在非应激状态下, ATF6 以酶原的形式处于抑制状态, 在应激状态下时, 激活的 ATF6 在高尔基体上转位后发生切割。之后, 裂解的 ATF6 移动到细胞核, 作为一个活性转录因子, 上调 GRP78 蛋白的转录, 使 X-盒结合蛋白 1(XBP1)与 CHOP 等内质网相关伴侣分子蛋白的表达增加, 提高了细胞对 UPR 的处理能力^[11]。GRP78 作为分子伴侣主要存在于真核生物中的内质网膜上, 它与错误折叠的蛋白质和未组装的复合物结合, 并启动负责 UPR 调节的内质网相关降解(ERAD)^[12-14]。在非应激状态下, GRP78 与 ATF6、PERK、IRE1 以非活性形式相结合, 在细胞接触内质网内累积的未折叠蛋白质后, GRP78 被释放出来, 在消耗能量后促进蛋白的正确折叠, 与此同时, GRP78 过量表达可以减少内质网内钙离子水平, 减轻 ERS, 在内质网稳态中发挥重要作用^[15-16]。非应激状态下, 细胞内 CHOP 的含量极少, 当 ERS 诱导细胞凋亡时, 活化的 ATF6 在胞核内与 ERS 反应元件结合, 启动 CHOP 转录与表达并积聚于细胞核内, 作为转录因子, CHOP 能调节如 Bcl-2、TRB3、GADD34 等许多促凋亡因子的表达, 进而诱导细胞凋亡^[17-18]。

本研究结果显示, 与 S 组比较, O 组肝细胞在各时间点肝功能指标及凋亡指数均高于 S 组, O 组肝细胞在各时间点 ATF6、GRP78、CHOP 蛋白与 mR-NA 表达水平均高于 S 组, 提示阻塞性黄疸肝损伤中存在 ERS 的激活, ERS 中的 ATF6 信号通路及细胞凋亡途径在阻塞性黄疸肝损伤细胞中被激活。与 O 组比较, Y 组肝细胞在各时间点肝功能指标及凋亡指数均明显降低, Y 组肝细胞在各时间点 ATF6、

GRP78、CHOP 蛋白与 mRNA 表达水平均低于 O 组,提示茵陈蒿汤含药血清干预阻塞性黄疸肝损伤细胞模型后 GRP78 表达下调,使 ERS 得到一定程度缓解,茵陈蒿汤含药血清一定程度上抑制了阻塞性黄疸肝损伤细胞中 ATF6 的表达,从而降低了其对下游信号分子 CHOP 的激活,减少了 ERS 诱导的肝细胞凋亡,进而改善阻塞性黄疸肝功能损伤。

综上所述,ERS 中的 ATF6 信号通路可能被激活并参与了阻塞性黄疸诱导的肝细胞凋亡病理过程,茵陈蒿汤含药血清可改善阻塞性黄疸细胞模型的肝功能情况,其机制可能与其下调 ATF6、GRP78 和 CHOP 的表达,进而缓解 ERS 进而抑制肝细胞凋亡相关。

参考文献:

- [1] MODHA K. Clinical approach to patients with obstructive jaundice[J]. Tech Vasc Interv Radiol, 2015, 18(4): 197–200.
- [2] LI J, ZHUO S, CHEN B, et al. Clinical efficacy of laparoscopic modified loop cholecystojejunostomy for the treatment of malignant obstructive jaundice[J]. J Int Med Res, 2020, 48(2): 1219665837.
- [3] 宋仕军, 李忠廉, 张西波. 茵陈蒿汤对梗阻性黄疸大鼠肝细胞中 IRE1 α 蛋白表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(16): 2520–2524.
- [4] WU Y L, LI Z L, ZHANG X B, et al. Yinchenhao decoction attenuates obstructive jaundice-induced liver injury and hepatocyte apoptosis by suppressing protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase-induced pathway[J]. World J Gastroenterol, 2019, 25(41): 6205–6221.
- [5] 吴艳丽. 茵陈蒿汤通过调节 PERK 通路和 Bcl-2/Bax 比例抑制梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡及改善肝功能的体内和体外研究[D]. 天津医科大学中西医结合(中西医结合临床), 2019.
- [6] 杨雨佳. 水飞蓟宾对梗阻性黄疸致肝损伤小鼠的干预研究[D]. 南华大学临床医学(外科学), 2019.
- [7] 肖黄满. 加味大柴胡汤对梗阻性黄疸大鼠肝损伤及 JNK、Bcl-2 蛋白表达的影响[D]. 天津医科大学中西医结合(中西医结合临床), 2020.
- [8] TSUI K H, CHANG Y L, YANG P S, et al. The inhibitory effects of capillarisin on cell proliferation and invasion of prostate carcinoma cells[J]. Cell Prolif, 2018, 51(2): e12429.
- [9] 袁满, 张君利, 傅风华, 等. 鲜茵陈提取物对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的作用[J]. 中医药信息, 2020, 37(6): 45–49.
- [10] 朱艳虹, 陈真, 钱之玉, 等. 西红花酸对乙酰诱导的肝星状细胞增殖和胶原合成的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2013, 18(8): 841–847.
- [11] KRAWCZYK K K, EKMAN M, RIPPE C, et al. Assessing the contribution of thrombospondin-4 induction and ATF6 α activation to endoplasmic reticulum expansion and phenotypic modulation in bladder outlet obstruction[J]. Sci Rep, 2016, 6: 32449.
- [12] LITTLE E, RAMAKRISHNAN M, ROY B, et al. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications[J]. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1994, 4(1): 1–18.
- [13] PFAFFENBACH K T, LEE A S. The critical role of GRP78 in physiologic and pathologic stress[J]. Curr Opin Cell Biol, 2011, 23(2): 150–156.
- [14] WANG M, WEY S, ZHANG Y, et al. Role of the unfolded protein response regulator GRP78/BiP in development, cancer, and neurological disorders[J]. Antioxid Redox Signal, 2009, 11(9): 2307–2316.
- [15] PATTERSON M A, BANDYOPADHYAY A, DEVARANENI P K, et al. The ribosome–sec61 translocon complex forms a cytosolically restricted environment for early polytopic membrane protein folding[J]. J Biol Chem, 2015, 290(48): 28944–28952.
- [16] FLOURAKIS M, VAN COPPENOLLE F, LEHEN'KYI V, et al. Passive calcium leak via translocon is a first step for iPLA2-pathway regulated store operated channels activation[J]. FASEB J, 2006, 20(8): 1215–1217.
- [17] MA N, XU N, YIN D, et al. Levels of circulating GRP78 and CHOP in endoplasmic reticulum stress pathways in Chinese type 2 diabetic kidney disease patients[J]. Medicine (Baltimore), 2021, 100(33): e26879.
- [18] HUANG L, LIU Q, ZHOU T, et al. Deficiency of beta-arrestin2 alleviates apoptosis through GRP78–ATF6–CHOP signaling pathway in primary Sjogren's syndrome[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101(Pt A): 108281.

(2022-12-21 收稿)