

电针对非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞角蛋白 18 表达的影响*

曾志华¹, 曾明慧², 黄学宽¹, 周萍^{1△}, 陈康³

(1. 重庆医科大学中医药学院, 重庆 400050; 2. 重庆医科大学校长办公室, 重庆 400050; 3. 中国人民解放军第三二四医院, 重庆 400020)

摘要:目的 研究电针对非酒精性脂肪肝(NAFLD)大鼠肝细胞角蛋白 18(CK18)表达的影响。方法 将 Wistar 大鼠分为正常组和造模组,造模组大鼠模型建立成功后,再分为 NAFLD 模型组、药物组、电针组,药物组给予东宝肝泰灌胃,电针组针刺脾俞、丰隆、阳陵泉、三阴交穴。治疗 4 周后处死所有动物,观察肝组织病理学变化情况;采用比色法检测肝内丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化,免疫组化法检测 CK18 的表达。结果 与 NAFLD 模型组比较,电针组和药物组大鼠肝组织脂肪变性得到不同程度的减轻;肝脏 CK18 表达均受抑制;肝内 MDA 均有不同程度的降低($P < 0.01$; $P < 0.05$),SOD 活性升高($P < 0.01$; $P < 0.05$)。结论 电针治疗可能通过抑制肝脏 CK18 表达的上调,减轻脂质过氧化反应。

关键词:电针;脂肪肝;细胞角蛋白 18

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.17.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)17-2164-03

Influence of Electroacupuncture intervention on liver CK18 expression in nonalcoholic fatty liver ratsZeng Zhihua¹, Zeng Minghui², Huang Xuekuan¹, Zhou Ping^{1△}, Chen Kang³

(1. School of Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400050, China; 2. President Office, Chongqing Medical University, Chongqing 400050, China; 3. 324 Hospital of PLA, Chongqing 400020, China)

Abstract: **Objective** To investigate the influence of electroacupuncture(EA) intervention on liver CK18 expression in nonalcoholic fatty liver (NAFL) rats. **Methods** Wistar rats were randomly divided into the normal group and the model group. After successfully establishing the rat model, the model group was redivided into the NAFLD group, drug group and EA group. The drug group was fed with Dongbao Gantai by gavage and the EA group was performed the EA acupuncture at the specific points of unilateral "Pishu", "Fenglong", "Yanglingquan" and "Sanyinjiao". After 4-week treatment, all animals were killed and the live histopathological changes were observed. The contents of liver malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were detected by the colorimetric method. The liver CK18 expression was detected by the immunohistochemical method. **Results** Compared with the model group, the steatosis of the liver tissue in the EA group and the drug group were alleviated to different extents; expression of hepatic CK18 was suppressed; liver MDA was decreased with various degrees ($P < 0.01$; $P < 0.05$) and the SOD activity was increased ($P < 0.01$; $P < 0.05$). **Conclusion** Electroacupuncture may reduce lipid peroxidation by inhibiting the up-regulation of hepatic CK18 expression.

Key words: electroacupuncture; fatty liver; cytokeratin 18

非酒精性脂肪肝(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)是指排除过量饮酒及其他明确的肝损害因素所致的以肝细胞内脂质沉积和变性为主要特征的临床病理综合征^[1]。随着肥胖症和糖尿病患者的日益增多,NAFLD患病率迅速上升^[2]。其发病机制尚不完全清楚,研究发现细胞角蛋白 18(cytokeratin 18, CK18)在 NAFLD 中的高表达导致脂质过氧化反应增强是脂肪肝发生、发展的重要因素^[3]。近年来临床采用针刺治疗 NAFLD 疗效确切^[4-5]。本研究通过电针干预 NAFLD 大鼠,观察大鼠肝脏 CK18 表达及肝内超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量的变化,从而探讨电针治疗脂肪肝的作用机制,现报道如下。

1 材料与方**1.1 材料** 雄性 Wistar 大鼠购自重庆医科大学动物实验中

心[动物使用许可证号:SCXK(渝)2007-0001];胆固醇购自上海生化试剂厂;猪油为市售;东宝肝泰片剂购自中国通化东宝药业股份有限公司,配制成 1% 的混悬液;MDA、SOD、CK18 抗体购自南京建成生物有限公司;即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒购自武汉博士德生物工程公司;一次性无菌针灸购自江苏医疗用品有限公司。匀浆机、低温离心机、加液器、紫外分光光度计、光学显微镜、图像采集系统、图像分析系统等设备由重庆医科大学中医药实验室和基础医学院提供。

1.2 方法**1.2.1 分组与造模** 雄性 SPF 级 Wistar 大鼠 43 只,体质量(200±20)g,适应性饲养 7 d,标记后分为正常组($n=11$)和造模组($n=32$)。造模组采用陈世清高脂饮食法建立 NAFLD 大鼠模型^[6],喂养饲料由 20 g/L 胆固醇、100 g/L 猪油和 880 g/L* 基金项目:重庆市卫生局中医药科技计划项目(2011-2-146)。
△ 通讯作者,E-mail:zhouping023@163.com。

作者简介:曾志华(1978—),硕士,讲师,主要从事电针治疗肝病的机制研究。

L 普通饲料混合组成(由重庆医科大学动物实验中心按配方配制)。8 周后随机处死正常组大鼠 1 只和造模组大鼠 2 只,取肝脏做病理组织学检查以验明造模情况。将余下的造模组大鼠 30 只予以标记后再分为 3 组:NAFLD 模型组($n=10$)、电针组($n=10$)、药物组($n=10$)。模型组不做任何治疗;电针组给予电针治疗;药物组给予东宝肝泰灌胃。根据活血化淤、化痰利湿的治则,取三阴交、丰隆、脾俞、阳陵泉穴。所取穴位参照《实验针灸学》^[7]定位。针刺方法:置大鼠于固定器中(重庆医科大学中医药实验室自制)中,取双侧穴位,用规格为 0.3 mm×50 mm 的毫针,分别刺入 4~6 mm 深度。然后接通电子针灸治疗仪(苏州医疗用品有限公司制造),采用强度 2 V,频率 10 Hz 的疏密波^[8],疏波和密波自动交替,以大鼠下肢抖动为宜,保持清醒状态,每天 1 次,每次 20 min,连续 4 周。药物组大鼠按照 0.28 g/kg(1%的混悬液 20 mL/kg)灌胃^[9],每天 1 次,连续 4 周。治疗期间,模型组大鼠分别置入固定器中 20 min,连续 4 周。正常组始终喂以基础饲料,模型组、药物组和电针组继续饲以高脂饲料。

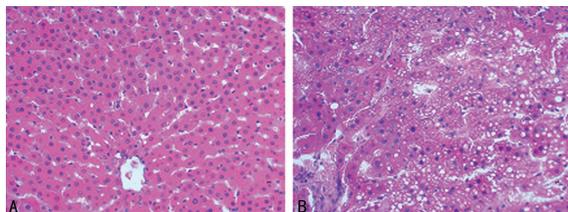
1.2.2 检测指标及检测方法 (1)肝脏生化指标检测:取大鼠肝右叶,在 4℃下加生理盐水制成 10%的肝匀浆液,3 000 r/min 离心 10 min 后取上清液,SOD 活性测定采用黄嘌呤氧化酶比色法;MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸比色法,严格按试剂盒说明书进行检测。(2)免疫组化检查:肝脏以 10%甲醛固定,常规石蜡切片(切片厚度约 4 μm),每块组织切片 3 张。采用 CK18 单克隆抗体进行免疫组化染色(ABC 法),DAB 显色,显微镜下观察。CK18 免疫组化显示棕黄色颗粒为阳性,每张切片最少取 20 个高倍视野观察棕黄色颗粒染色程度,用 IPP6.1 免疫组化分析软件对图片阳性区域进行累积光密度值(IOD)的量化测定。

1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 软件包进行统计学分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间

两两比较选用 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

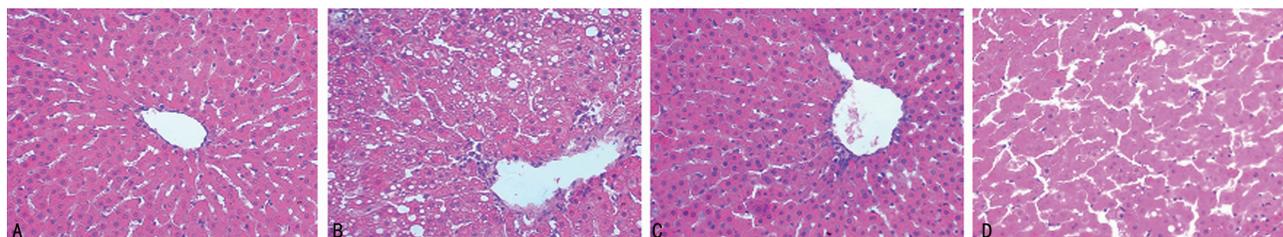
2.1 模型的验证 实验过程中,造模组大鼠体重明显增加、形体肥胖。肉眼可见造模组大鼠肝脏体积增大,颜色变黄;光镜下 HE 染色显示正常组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞呈放射状整齐排列,造模组肝细胞出现中度至重度的脂肪变性,肝索紊乱,大量的肝细胞肿胀呈圆形,细胞间界限不清,偶尔可见碎屑样坏死,细胞核被脂肪空泡挤到肝细胞的边缘,病理学检查可证实造模组大鼠脂肪肝已形成(图 1)。



A: 正常组; B: 造模组。

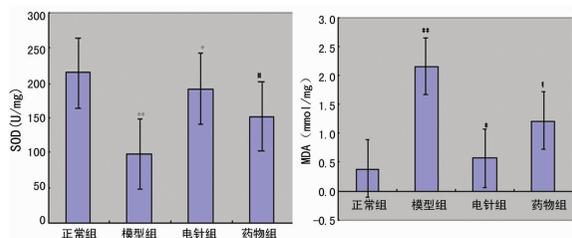
图 1 正常组与造模组大鼠肝组织病理切片(HE×400)

2.2 肝组织病理形态变化 至 12 周末,肉眼观察正常组大鼠肝色鲜红;模型组肝脏体积增大,颜色偏黄,电针组和药物组大鼠肝色接近正常组。光镜下:正常组肝小叶结构清晰,肝细胞形态正常,呈放射状整齐排列;模型组肝细胞出现中度至重度的脂肪变性,肝索紊乱,大量的肝细胞肿胀呈圆形,细胞间界限不清,胞质内充满以大泡型为主的脂肪空泡或脂滴,偶尔可见碎屑样坏死;电针组肝脏病理形态接近正常组,肝细胞结构趋于正常,胞质疏松,肝窦增宽,极少数肝细胞内可见小脂滴,无炎症细胞浸润;药物组有少数肝细胞内可见小泡型脂滴,未见坏死及纤维组织增生,有少量炎症细胞浸润。与模型组比较,电针组和药物组大鼠肝组织脂肪变性程度和炎症损伤均有不同程度的改善,电针组改善较为明显(图 2)。



A: 正常组; B: 模型组; C: 电针组; D: 药物组。

图 2 各组大鼠肝组织病理学改变(HE×400)



** : $P < 0.01$, 与正常组比较; * : $P < 0.01$, # : $P < 0.05$, 与模型组比较。

图 3 各组大鼠肝 SOD 和 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

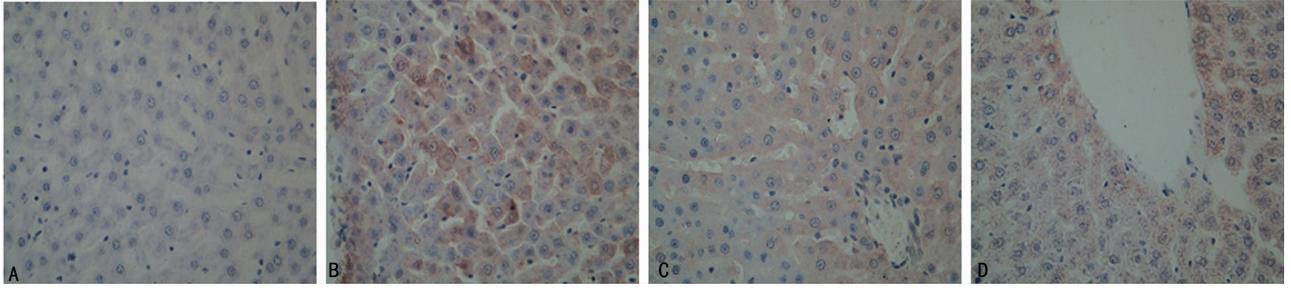
2.3 各组大鼠肝 SOD 和 MDA 含量变化 模型组与正常组比较,SOD 显著下降($P < 0.01$),MDA 显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,电针组和药物组 SOD 显著升高($P < 0.01$; $P < 0.05$),MDA 显著降低($P < 0.01$; $P < 0.05$),见图 3。

2.4 各组大鼠肝组织 CK18 表达 CK18 免疫组化显示棕黄色颗粒为阳性。正常组几乎未显示阳性表达细胞;模型组显示 CK18 阳性表达细胞数量比正常组明显增多;与模型组比较,电针组和药物组 CK18 阳性表达细胞数量均减少,电针组阳性表达细胞数量的减少更显著(图 4)。

采用 IPP6.1 软件对图片阳性区域进行 IOD 测定,见图 5。

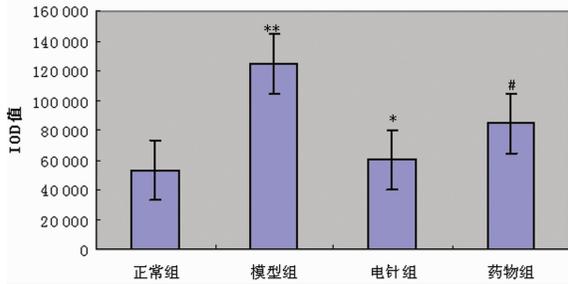
与正常组比较,模型组 IOD 值显著升高($P < 0.01$),为强阳性表达;与模型组比较,电针组和药物组 CK18 免疫组化 IOD 值

显著降低($P < 0.01$; $P < 0.05$)。



A: 正常组; B: 模型组; C: 电针组; D: 药物组。

图 4 各组大鼠肝 CK18 免疫组化染色($\times 400$)



*: $P < 0.01$, 与正常组比较; **: $P < 0.01$, #: $P < 0.05$, 与模型组比较。

图 5 各组大鼠肝 CK18 免疫组化 IOD 值变化

3 讨论

NAFLD 发病机制极其复杂,“二次打击”学说是目前比较公认的 NAFLD 的发病和进展机制,即胰岛素抵抗(IR)和脂质过氧化(LP)。首次打击主要指胰岛素抵抗影响脂质代谢导致的肝细胞内脂质沉积和脂肪变性,形成单纯性脂肪肝(NAFL);二次打击主要以脂质过氧化、促炎性细胞因子释放等因素导致脂肪变性的肝细胞发生炎症、坏死,引起非酒精脂肪性肝炎(NASH)。近年研究发现 CK18 与二次打击所造成的肝损伤关系密切^[10-11]。

CK18 是表达于成熟上皮细胞的中间丝蛋白,是肝细胞凋亡和坏死过程中相对特异的一种蛋白。CK18 作为一种细胞坏死的生物标志物,被认为是新发现与 NAFLD 相关的指标,目前对 CK18 参与 NAFLD 机制的研究尚处于起步阶段,许多研究结论尚存在分歧。CK18 在肝细胞病理生理过程中起着重要作用,环境损伤如嗜肝病毒、药物和乙醇等因素引起的持续损害使 CK18 基因发生了改变,导致 CK18 表达的异常从而使肝病进展甚至进入终末期^[12]。研究发现 CK18 在肝脏“二次打击”过程中发挥重要作用,参与 NAFLD 的发生和进展,以 IR 等因素导致的 LP 反应增强一方面造成肝细胞炎症坏死,促进 CK18 片段从坏死的肝细胞中释放到血中^[13],另一方面对肝造成持续损害,促使 CK18 基因发生改变,导致肝 CK18 表达异常,从而使 NAFLD 肝病持续发展至终末期^[14]。SOD 可有效清除体内超氧阴离子,其活性的变化间接反映体内自由基的生成和代谢。MDA 是脂质过氧化终产物,含量可间接反映脂质氧化的程度。

本实验结果表明,与模型组比较,病理学结果显示电针组

和药物组大鼠肝脂肪变性程度和炎性损伤均有不同程度的改善;MDA 含量均有不同程度的降低,SOD 活性升高;免疫组化显示肝 CK18 表达受到一定程度的抑制。以上研究结果证实电针治疗在一定程度上改善了 NAFLD 大鼠的肝脏脂肪变性和炎性损伤。推测其机制可能是电针通过抑制 NAFLD 大鼠肝 CK18 表达的上调,减轻脂质过氧化反应,增强了机体的抗氧化能力,以此保护肝细胞免受损伤。

NAFLD 在中医学中无独立的病名,可归属于“胁痛”、“肝着”、“积聚”等范畴。中医认为其主要病机为肝脾气化失司、痰浊内蕴、湿邪内生,致使后期肾精亏虚,肝、脾、肾功能失调,终致滞气、淤血、痰湿相互搏结,痹阻于肝脏脉络而成。临床采用针刺疗法治疗本病,以达疏肝健脾、理气燥湿、活血化淤之功,降脂作用肯定。实验证明三阴交和丰隆穴可加快脂肪代谢和促进血液循环;脾俞和阳陵泉穴善长调节消化系统功能^[15]。本次实验针刺大鼠脾俞、丰隆、三阴交、阳陵泉穴,加用电针治疗,使 NAFLD 大鼠获得了明显的疗效。此研究结果对应用电针治疗 NAFLD 有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3):163-166.
- [2] Williams R. Global challenges in liver disease[J]. Hepatology, 2006, 44(3):521-526.
- [3] Yilmaz Y, Dolar E, Ulukaya E, et al. Soluble forms of extra-cellular cytokeratin 18 may differentiate simple steatosis from nonalcoholic steatohepatitis[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(2):837-844.
- [4] 胡卫东, 杨浩明, 郑高坪, 等. 针灸治疗非酒精性脂肪性肝病的临床观察[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 23(1):39-41.
- [5] 王骏, 张春燕, 程玲, 等. 健脾法电针配合耳穴治疗肥胖性脂肪肝 30 例临床观察[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(7):41-42.
- [6] 陈世清, 刘杞, 孙航. 脂肪肝胰岛素抵抗大鼠模型的建立[J]. 中华肝脏病杂志, 2005, 13(2):105-108.
- [7] 李忠仁. 实验针灸学[M]. 北京: 中国中(下转第 2169 页)

理抗原,通过高表达主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)分子、共刺激分子、细胞黏附因子 1 (intercellular cell adhesion molecule 1, ICAM-1)以及淋巴细胞功能相关抗原(lymphocyte function associated antigen 1, LFA-1)等细胞表面分子,在体内外能有效激发初始和继发性 T 细胞免疫应答效应,同时可分泌辅助性 T 细胞 1 型细胞因子 IL-12,诱导 T 细胞和自然杀伤细胞(natural killer, NK)产生 IFN- γ 和增强激活 NK 细胞的细胞毒活性。CIK 细胞是由多种细胞因子如 IL-2、IFN- γ 和 CD3 单克隆抗体等诱导的一种免疫活性细胞,兼有 T 淋巴细胞强大的抗瘤活性与 NK 细胞的非主要组织相容性复合物(MHC)限制性杀瘤特点,并通过分泌高水平的 IL-12、IFN- γ 等辅助性 T 细胞 1 类细胞因子,以调节体内其他细胞因子的分泌达到促进 CIK 对肿瘤细胞杀伤作用的敏感性,起到抑制肿瘤和杀伤肿瘤的作用^[7]。将具有强大肿瘤抗原提呈能力的 DC 与具有高效杀瘤活性的 CIK 细胞共培养,二者可分别通过识别抗原、激活获得性免疫系统和发挥自身的细胞毒活性、分泌细胞因子协同杀伤肿瘤细胞,从而形成高效能的免疫效应。本研究证实 DC-CIK 组培养上清液中 IL-12、IFN- γ 浓度水平明显高于 CIK 组及其他两组。可见,大量分泌细胞因子是 DC-CIK 细胞抗肿瘤免疫效应的重要机制。

本研究通过体外诱导扩增 DC 和 CIK 细胞,将其一起培养,观察共培养物 DC-CIK 细胞对前列腺癌细胞的杀伤作用。结果显示 DC-CIK 细胞能产生强大的抗前列腺癌效应,比同条件下单纯 CIK 细胞抗肿瘤活性增强,与方慧云等^[8]报道的 DC-CIK 细胞抗鼻咽癌免疫应答效果一致。同时也证实 DC-CIK 细胞具有比 CIK 细胞更强的抗肿瘤活性。CIK 细胞属于异质细胞群,其抗肿瘤作用与 CD3⁺CD8⁺、CD3⁺CD56⁺ 双阳性细胞及分泌细胞因子的水平密切相关。同时 CIK 细胞又是具有 NK 活性的 T 细胞,具有 T 细胞的抗肿瘤活性和 NK 细胞的非 MHC 限制性杀瘤优点^[9]。本研究结果表明,DC-CIK 细胞具有高表达 CD8⁺ 细胞和 CD3⁺/CD56⁺ 细胞,即产生了大量的 NK 细胞样淋巴细胞和细胞毒性淋巴细胞,使抗前列腺癌细胞的免疫效应进一步增强。同时 DC 的抗原提呈作用能促使 CIK 细胞分泌 IFN- γ 的时间延长,分泌量增加,进一步增强对肿瘤细胞的细胞毒活性。本研究结果显示,DC-CIK 细胞作为一类强大的抗肿瘤免疫效应细胞,可作为一种抗前列腺癌的免疫治疗方法。

参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.
- [2] Bedognetti D, Wang E, Sertoli MR, et al. Gene-expression profiling in vaccine therapy and immunotherapy for cancer [J]. Expert Rev Vaccines, 2010, 9(6): 555-565.
- [3] Wang QJ, Wang H, Pan K, et al. Comparative study on anti-tumor immune response of autologous cytokine-induced killer (CIK) cells, dendritic cells-CIK (DC-CIK), and semi-allogeneic DC-CIK [J]. Chin J Cancer, 2010, 29(7): 641-648.
- [4] Li XD, Xu B, Wu J, et al. Review of Chinese clinical trials on CIK cell treatment for malignancies [J]. Clin Transl Oncol, 2012, 14(2): 102-108.
- [5] Leemhuis T, Wells S, Scheffold C, et al. A phase I trial of autologous cytokine-induced killer cells for the treatment of relapsed Hodgkin disease and non-Hodgkin lymphoma [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2005, 11(3): 181-187.
- [6] 龚奕, 陈幸华, 张曦, 等. DC-CIK 细胞输注治疗急性髓细胞白血病 50 例分析 [J]. 重庆医学, 2011, 40(30): 3039-3041.
- [7] Sangiolo D, Mesiano G, Carnevale-Schianca F, et al. Cytokine induced killer cells as adoptive immunotherapy strategy to augment graft versus tumor after hematopoietic cell transplantation [J]. Expert Opin Biol Ther, 2009, 9(7): 831-840.
- [8] 方慧云, 程伟民, 李晓玲, 等. CIK、DC-CIK 细胞抗鼻咽癌 CNE2 细胞的作用比较 [J]. 现代肿瘤医院, 2009, 17(11): 2077-2078.
- [9] Joshi PS, Liu JQ, Wang Y, et al. Cytokine-induced killer T cells kill immature dendritic cells by TCR-independent and perforin-dependant mechanisms [J]. J Leukoc Biol, 2006, 80(6): 1345-1353.

(收稿日期: 2013-11-02 修回日期: 2014-02-05)

(上接第 2166 页)

医药出版社, 2003: 314.

- [8] 胡卫东. 针灸治疗非酒精性脂肪肝的临床观察 [J]. 中国针灸, 2005, 12(1): 13-15.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 114-116.
- [10] Diab D, Yerian L, Schauer P, et al. Cytokeratin 18, a marker of cell death, is increased in children with suspected nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2008, 47(4): 481-485.
- [11] Gonzalez - Quintela A, Mallo N, Mella C, et al. Serum levels of cytokeratin - 18 (tissue polypeptide - specific antigen) in liver diseases [J]. Liver International, 2006, 26(10): 1217-1224.
- [12] Gilbert S, Lorange A, Daigle N, et al. Simple epithelium keratins 8 and 18 provide resistance to Fas - mediated ap-

optosis. The protection occurs through a receptor-targeting modulation [J]. J Cell Biol, 2001, 154(4): 763-773.

- [13] Malik R, Chang M, Bhaskar K, et al. The clinical utility of biomarkers and the nonalcoholic steatohepatitis CRN liver biopsy scoring system in patients with nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(4): 564-568.
- [14] Diab D, Yerian L, Schauer P, et al. Cytokeratin 18, a marker of cell death, is increased in children with suspected nonalcoholic fatty liver disease [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2008, 47(4): 481-485.
- [15] 胡卫东. 针灸治疗非酒精性脂肪肝的临床观察 [J]. 中国针灸, 2005, 21(9): 5-8.

(收稿日期: 2013-10-08 修回日期: 2014-01-10)