

异常黑胆质性肝癌病证模型肝硬化期免疫、内分泌紊乱状态

张有辉¹, 玉苏甫·吐尔逊², 哈木拉提·吾甫尔², 阿不都卡德尔·库尔班³, 阿布力孜·阿卜杜扎依尔³, 斯坎德尔·白克力¹

1. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学维吾尔医学系, 乌鲁木齐 830011
3. 新疆医科大学药学院, 乌鲁木齐 830011

摘要 根据维吾尔医学理论, 采用干寒饲养环境、干寒属性的饲料、慢性间断足底电刺激等多因素复合作用 3 周, 建立维吾尔医异常黑胆质证载体大鼠模型后, 用二乙基亚硝胺 (DEN) 诱发建立维吾尔医异常黑胆质性肝癌病证模型至模型大鼠发生肝硬化。检测外周血白细胞介素 1 β (IL-1 β)、白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、皮质醇 (CORT) 等免疫、内分泌指标的变化。结果表明, 与正常对照组相比, 异常黑胆质病证模型组血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 (IL-1 β , $P < 0.01$; IL-6、TNF- α , $P < 0.001$); 与模型对照组相比, 异常黑胆质病证模型组 IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与正常对照组相比, 模型对照组、异常黑胆质证组、异常黑胆质病证模型组血清 ACTH 和 CORT 水平显著升高; 与模型对照组相比, 异常黑胆质病证模型组 ACTH 水平显著升高 ($P < 0.05$)。由此表明, 异常黑胆质性肝癌病证模型发生肝硬化时其免疫-内分泌网络功能处于紊乱状态。在异常黑胆质性肝癌病证模型肝脏病变的发生过程中, DEN 是其发生的主要原因, 异常黑胆质体液起了促进作用, 并且异常黑胆质体液、免疫-内分泌网络的紊乱和 DEN 三者之间相互联系、相互促进。

关键词 异常黑胆质; 病证动物模型; 免疫-内分泌网络; 二乙基亚硝胺

中国分类号 R256.4

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)11-0039-04

Disordered Immune-endocrin Network in Hepatocirrhosis Phase of Hepatocarcinoma of Carrying Abnormal Savda Model

ZHANG Youhui¹, TURSUN Yusup², UPUR Halmurat², KURBAN Abdukadir³, ABDUZAYIR Abliz³, BAKRI Iskandar¹

1. College of Basic Medical Sciences, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. Department of Uighur Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
3. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract According to the theory of Uighur traditional medicine, male wistar rats were fed with a diet of cold-nature under cool dry environment, stimulated with chronic and interrupted electric foot shocks to establish abnormal savda syndrome rat model in Uighur medicine in three weeks. DEN was used further to establish hepatocarcinoma carrying abnormal savda disease animal model till the hepatocirrhosis occurred. The alterations of IL-1 β , IL-6, TNF- α , ACTH and CORT in serum level were monitored. The results show that compared with the normal group the serum levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the abnormal savda syndrome model group were increased (for IL-1 β , $P < 0.01$; for IL-6 and TNF- α , $P < 0.001$); compared with the model control group the serum levels of IL-6 and TNF- α in the

收稿日期: 2010-04-21

基金项目: 国家杰出青年科学基金项目 (30525023)

作者简介: 张有辉, 硕士研究生, 研究方向为维医维药与疾病, 电子信箱: qab_qa@sina.com; 斯坎德尔·白克力 (通信作者), 副教授, 研究方向为维医维药与疾病, 电子信箱: ikdbr@yahoo.com.cn

abnormal savda syndrome model group were increased ($P<0.01$); compared with the normal group the serum levels of ACTH and CORT in the model control group, the abnormal savda disease group and the abnormal savda syndrome model group were all increased, with significant mathematical differences, compared with the model control group the serum level of ACTH in the abnormal savda syndrome model group was significantly increased ($P<0.05$). These findings indicate that the immune-endocrin network was disordered in hepatocirrhosis phase of hepatocarcinoma carrying abnormal savda model. In the process of pathological changes of hepatic tissue in hepatocarcinoma carrying abnormal savda model, DEN is the main induction agent, and abnormal savda hilit is the accelerative factor. In addition, the abnormal savda, disordered immune-endocrin network and DEN are closely related and stimulated with each other.

Keywords abnormal savda; animal disease model; immune-endocrine network; DEN

维吾尔医学认为,异常黑胆质是在各种内外因素作用下,体液质平衡紊乱、体液质被燃烧继而沉淀的最终病理产物或表现形式,是肿瘤、糖尿病、高血压等复杂性疾病发生的原因^[1-2]。中国的原发性肝癌多合并慢性肝炎及肝硬化(85%)。西方国家中,80%以上的肝细胞癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)发生在肝硬化的基础上,其发病过程目前普遍认为是由肝细胞炎症坏死、纤维化到硬化、癌变的演变过程,绝大多数肝癌患者在其发病过程中经历了肝硬化阶段。全世界每年死于HCC者达25万人,中国占44%,所以早期诊断、早期治疗是肝癌防治的关键所在。本研究以维吾尔医学理论为指导,在建立异常黑胆质载体大鼠模型的基础上,用二乙基亚硝胺(DEN)诱发建立维吾尔医异常黑胆质性肝癌病证模型至模型大鼠发生肝硬化,通过检测外周血IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、ACTH和CORT等指标,探讨异常黑胆质性肝癌病证模型肝硬化期免疫-内分泌网络的紊乱及异常黑胆质体液、免疫-内分泌网络的紊乱和DEN三者之间的相互关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Wistar大鼠140只,清洁级,雄性,体重(150 $\pm$ 30)g,由新疆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要仪器

RQH-350型人工气候箱(上海精宏实验设备有限公司),JXDT-1型小鼠跳台仪器(上海精宏实验设备有限公司),BS-110型电子天平(北京赛多科斯特平有限公司),低温超速离心机(美国Beckman公司)。

1.1.3 试剂

DEN(Sigma公司),大鼠血清ACTH、CORT放射免疫试剂盒(北京北方生物技术研究所),IL-1 β 、IL-6、TNF- α 酶联免疫试剂盒(美国R&D公司),其他试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 干寒属性饲料的制备

普通鼠饲料、芫荽子和大麦(1:1)按7:3的比例,制成颗粒状干饲料,委托自治区医学试验动物中心加工。

1.2.2 动物分组及喂养

选取雄性Wistar大鼠140只,稳定饲养3d后分为2组。

1) 实验组(70只):按文献[3]~[5]和维吾尔医学异常体液与环境的的关系,将实验动物置于适宜的喂养环境。采用干寒饲养环境(温度6 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C,相对湿度25%~32.8%)、干寒属性饲料(普通鼠饲料中添加干寒属性的大麦和芫荽子)、间断足底电刺激(第1周每次30min、电压35V、1次/d;第2周每次35min、电压40V、1次/d;第3周每次45min、电压45V、1次/d)、制动(第1周每次45min、1次/d;第2周每次60min、1次/d;第3周每次90min、1次/d)、强迫游泳(水温(20 $\pm$ 5) $^{\circ}$ C,1次/d,每次5min)等多因素复合作用3周,建立维吾尔医学异常黑胆质证载体大鼠模型。

3周异常黑胆质证载体大鼠模型成功后处死6只动物并取标本,再分为:①异常黑胆质证组(29只):整个实验过程中均饮用灭菌食用水;②异常黑胆质病证模型组(35只):用灭菌食用水配制浓度0.1mg/mL的DEN溶液,自由饮用,每天更换1次,连续饮用11周停药。上述两组采用异常黑胆质证造模复合因素第2周强度维持异常黑胆质证。

2) 对照组(70只):在室温下((25 $\pm$ 3) $^{\circ}$ C,相对湿度60%~80%)用普通鼠饲料饲养,随机饮食水,未受任何刺激,饲养3周后处死6只动物并取标本,再分为:①正常对照组(29只):整个实验过程中均饮用灭菌食用水;②模型对照组(35只):用灭菌食用水配制浓度0.1mg/mL的DEN溶液,自由饮用,每天更换1次,连续饮用11周停药。

1.2.3 样品制备及血清指标的检测

各组动物分别在DEN诱发的第5、7、9周,麻醉状态下眼静脉取血后颈椎脱臼处死6只,至11周在麻醉状态下取血后颈椎脱臼处死其余所有动物。4 $^{\circ}$ C离心分离血清,分离后的血清放置在-80 $^{\circ}$ C保存待测。分别采用大鼠ACTH、CORT放射免疫试剂盒,IL-1 β 、IL-6、TNF- α 酶联免疫试剂盒检测外周血ACTH、CORT、IL-1 β 、IL-6和TNF- α 各项指标。

1.2.4 统计学处理

应用SPSS 16.0统计软件进行数据处理和分析。各项数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

DEN诱发第11周时,与正常对照组相比,模型对照组、异常黑胆质证组和异常黑胆质病证模型组的ACTH水平均

升高,具有统计学差异,且后两者与正常对照组差异显著($P<0.001$)。与模型对照组相比,异常黑胆质病证模型组 ACTH 含量显著增高($P<0.05$);DEN 诱发第 11 周时,与正常对照组相比,CORT 含量在模型对照组、异常黑胆质证组、异常黑胆质病证模型组均升高,但以前者和正常对照组之间的差异更显著($P<0.001$)(表 1)。DEN 诱发第 11 周时,与正常对照组相比,模型对照组、异常黑胆质证组、异常黑胆质病证模型组血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 水平均升高,尤其异常黑胆质病证模型组与正常对照组相比具有显著性差异,且异常黑胆质病证模型组的 IL-6 和 TNF- α 与模型对照组相比显著升高 ($P<0.01$)(表 2)。但在第 5、7、9 周时,上述指标在模型对照组和异常黑胆质病证模型组之间无显著差异。

3 讨论

在维吾尔医学理论中,正常黑胆质的主要生理功能是参与感觉、情绪、思维、记忆等神经系统活动。研究发现,异常黑

表 1 异常黑胆质性肝癌病证模型肝硬化期血清 ACTH、CORT 含量变化($\bar{x}+s$)

Table 1 Concentration of the serum ACTH and CORT in the hepatocirrhosis phase of hepatocarcinoma of carrying abnormal savda model ($\bar{x}+s$)

组别	例数	ACTH/(pg·mL ⁻¹)	CORT/(pg·mL ⁻¹)
正常对照组	10	2.60±2.40	4.93±1.49
模型对照组	16	12.28±9.96**	11.51±6.23***
异常黑胆质证组	10	30.69±9.05*** $\Delta\Delta\Delta$	8.80±1.81*
异常黑胆质病证模型	8	21.06±9.09*** Δ	9.28±3.17*

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型对照组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $P<0.001$ 。

Notes: Compared with normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** indicates $P<0.001$;compared with model control group, Δ , $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta$, $P<0.001$.

表 2 异常黑胆质性肝癌病证模型肝硬化期血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 含量变化($\bar{x}+s$)

Table 2 Concentration of the serum IL-1 β 、IL-6 and TNF- α in the hepatocirrhosis phase of hepatocarcinoma of carrying abnormal savda model ($\bar{x}+s$)

组别	例数	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)
正常对照组	10	105.33±6.50	211.88±1.74	3.16±0.37
模型对照组	16	114.85±7.08	216.35±5.10	4.04±0.61
异常黑胆质证组	10	114.61±15.46	219.58±18.18	3.46±0.64
异常黑胆质病证模型组	8	127.24±13.78**	236.48±9.32*** $\Delta\Delta$	5.49±1.39*** $\Delta\Delta$

注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型对照组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta$ $P<0.001$ 。

Notes: Compared with normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;compared with model control group, Δ , $P<0.05$, $\Delta\Delta$, $P<0.01$, $\Delta\Delta\Delta$, $P<0.001$.

胆质证患者出现体形消瘦、情绪焦虑、易怒易惊、健忘失眠等症状与下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPAA) 功能失调引起的认知、行为、感情等脑功能紊乱症状相一致^[6]。下丘脑分泌的促肾上腺皮质激素释放因子 (CRF) 作用于腺垂体促进其分泌 ACTH, 而 ACTH 又作用于肾上腺皮质, 促进其分泌 CORT。CORT 除完成一系列生理功能外,还参与负反馈调节机制。当血浆 CORT 浓度增高时,通过负反馈调节抑制 CRF 和 ACTH 的分泌, 组成了一个功能和调节极其周密的 HPA 功能轴,对维持内环境的稳定和调节机体神经内分泌功能发挥了十分重要的作用,是神经内分泌免疫网络的下行通路^[7-8]。神经系统通过神经细胞分泌的细胞因子、广泛的外周神经突触及其分泌的神经递质、众多的内分泌激素共同调控免疫系统的功能;免疫系统通过免疫细胞产生的多种细胞因子、激素样物质反馈作用于神经内分泌系统。神经内分泌系统同免疫系统间有着紧密的双向互相调节的联系,形成神经内分泌免疫网络。免疫系统及其产物可以调节神经内分泌系统的功能;某些神经内分泌激素也可以影响和调节免疫功能^[9]。

维吾尔医学的体液学说认为,异常黑胆质不仅包括一定的病理生理状态,而且代表疾病在发展过程中某一阶段的动

态表现。异常黑胆质不仅是病理产物,更是一种致病因素。在维医恶性肿瘤的分型中,异常黑胆质型最为常见,异常黑胆质型肿瘤患者的神经内分泌免疫网络处于紊乱状态,而且比非异常黑胆质型肿瘤严重。因此,将维吾尔医学证型与高发、恶性肿瘤相结合进行研究,可为恶性肿瘤的发病机制研究提供新的思路。异常黑胆质病证与神经内分泌免疫网络密切相关,其中 HPAA 形态和功能紊乱表现突出。异常黑胆质的产生可使 HPAA 内分泌障碍,反馈调节机制破坏,导致 HPAA 从形态到功能的紊乱^[10],HPAA 功能的紊乱又会导致机体的免疫功能发生异常,这种神经内分泌免疫网络功能的紊乱状态可促进异常黑胆质性肝癌病证模型肝硬化的发生和发展。

本研究在建立异常黑胆质载体大鼠模型的基础上,用 DEN 诱发建立维吾尔医异常黑胆质性肝癌病证模型至模型大鼠发生肝硬化,并观察其外周血 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、ACTH 和 CORT 等免疫、内分泌指标的变化。结果发现,异常黑胆质病证模型组外周血 IL-6、TNF- α 、ACTH 的含量较正常对照组、模型对照组都显著升高;与正常对照组相比,IL-1 β 、CORT 的水平显著升高。临床研究发现,肝硬化患者血清中 IL-1 β 水平明显升高,肝病晚期导致内毒素血症,可刺激外周血单核

细胞产生 IL-1 β , IL-1 β 可能通过刺激成纤维细胞增殖, 参与肝纤维化的过程, 加速肝硬化的形成^[11]。有研究认为 IL-1 β 与病毒感染导致的肝细胞癌有关^[12]。IL-6 为多功能细胞因子, 在抗肿瘤免疫和炎症反应中起着十分重要的作用^[13]。肝硬化、肝癌患者通常伴有慢性内毒素血症, 可激活肝内内皮细胞、库普弗细胞、浸润的单核/巨噬细胞等产生 IL-6, 从而使 IL-6 产生增多^[14]。TNF- α 是一种具有多种生物活性的细胞因子, 它以自分泌的方式促进自身合成, 在病变部位产生并选择性集中在该区域, 各类感染和外来刺激均引起 TNF- α 的表达和释放^[5]。有研究表明, 肝硬化患者血清 TNF- α 水平增高, TNF- α 与肝坏死的程度及肝纤维化程度密切相关, 在肝硬化的发生发展中参与肝脏的损伤、修复循环, 最终导致肝硬化^[16]。有报道称恶性肿瘤患者血清中 TNF- α 水平升高^[17]。在异常黑胆质性肝癌病症模型肝硬化的发生过程中, 肝细胞损伤、纤维化、再生和假小叶形成, 可能引起肝脏灭活激素和细胞因子的功能减弱; 并且再生肝细胞可能通过刺激免疫细胞使其分泌的 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 增多, 而 IL-1 β 、IL-6 等又可刺激 HPAA, 使其分泌的 ACTH、CORT 增加。这种内分泌和免疫因子之间的相互促进作用又进一步加重了免疫-内分泌网络的紊乱。与模型对照组相比, 异常黑胆质证模型组的血清 IL-6、TNF- α 、ACTH 的显著升高, 说明异常黑胆质与 DEN 两因素相叠加起到了一种互相促进、互为动因的作用。

4 结论

在异常黑胆质性肝癌病症模型肝硬化的发生过程中, DEN 是其发生的主要原因, 异常黑胆质体液起到了促进作用, 并且异常黑胆质体液、免疫-内分泌网络的紊乱和 DEN 三者之间是相互联系、相互促进的。

参考文献 (References)

- [1] 哈木拉提·吾甫尔, 阿不都热依木·玉苏甫. 维吾尔医气质、体液论及其现代研究[M]. 乌鲁木齐: 新疆科学技术出版社, 2003.
Halmurat Upur, Abdiryim Yusup. Theory of mizaj and hilit in Uighur medicine and modern study [M]. Urumqi: Xinjiang Scientific and Technical Publisher, 2003: 44-52.
- [2] 易沙克江·马合穆德, 阿不都热依木·卡地尔. 中国医学百科全书 (维吾尔医学)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2005: 89-94.
Ishakjan Mahmud, Abdiryim Kadir. Traditional Uighur medicine of China medical encyclopaedia [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 2005: 89-94.
- [3] Beaufour C C, Ballon N, Le Bihan C, et al. Effects of antidepressants in operant conflict procedure of anxiety in the rat [J]. *Pharmacol Biochem Behavior*, 1999, 62(4): 591-599.
- [4] Palermo-Neto J, de O liveira Massoco C. Effects of physical and psychological stressor on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth[J]. *Brain Behavior Immun*, 2003, 17(1): 43-54.
- [5] 哈木拉提·吾甫尔, 阿依努尔·买提斯迪克, 努尔买买提·艾买提, 等.

- 异常黑胆质证载体动物模型的建立及其自然恢复反证[J]. *新疆医科大学学报*, 2006, 29(10): 910-914.
Halmurat Upur, Aynur Matsidik, Nurmammat Amat, et al. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2006, 29(10): 910-914.
- [6] 哈木拉提·吾甫尔, 努尔买买提·艾买提, 阿地里江·阿布力米提. 异常黑胆质载体动物模型的下丘脑-垂体-肾上腺轴功能紊乱的物质基础研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2007, 13(9): 670-672.
Halmurat Upur, Nurmammat Amat, Adiljan Abilmit, et al. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2007, 13(9): 670-672.
- [7] 姚泰, 乔健天, 马青年, 等. 生理学 [M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 375-380.
Yao Tai, Qiao Jiantian, Ma Qingnian, et al. *Physiology* [M]. 5th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 375-380.
- [8] Yan C, Deng Z Y, Wang J. Effect of TGF β on neuro endocrine immune function in stressed rats[J]. *Chin Immunol*, 2000, 16: 488-490.
- [9] 孙葳, 陆大祥. 神经-内分泌-免疫调节网络与疾病 [J]. *中国病理生理杂志*, 2000, 16(8): 761-763.
Sun Wei, Lu Daxiang. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2000, 16(8): 761-763.
- [10] 阿依努尔·买提斯迪克, 尼加提·热合曼, 哈木拉提·吾甫尔, 等. 异常黑胆质载体动物模型下丘脑-垂体-肾上腺轴组织形态学观察[J]. *新疆医科大学学报*, 2006, 29(10): 914-916.
Aynur Matsidik, Nijat Rahman, Halmurat Upur, et al. *Journal of Xinjiang Medical University*, 2006, 29(10): 914-916.
- [11] 祝英华, 宋红丽, 张义, 等. 白介素 1 和肿瘤坏死因子 α 在肝硬化中的临床研究[J]. *临床肝胆病杂志*, 2001, 17(4): 233-234.
Zhu Yinghua, Song HongLi, Zhang Yi, et al. *Chin J Clin Hepatol*, 2001, 17(4): 233-234.
- [12] Hirankarn N, Kimkong I, Kummee P, et al. Interleukin -1 β gene polymorphism associated with hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus infection[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(5): 776-779.
- [13] Baggiolini W. A neutrophil-activating Reptide/interleukin-8, a novel cytokine that activates neutrophils [J]. *J Clin Invest*, 1989, 84: 1045-1049.
- [14] Lumsden A B, Henderson J M, Kutner M H. Endotoxin levels measured by a chromogenic assay in portal, hepatic and peripheral venous blood in patients with cirrhosis[J]. *Hepatology*, 1988, 8(2): 232-236.
- [15] 付体辉. TNF 分子结构的修饰与生物学活性[J]. *国外医学分子生物学分册*, 1991, 13(4): 164-166.
Fu Tihui. *Foreign Medical Sciences Section Molecular biology*, 1991, 13(4): 164-166.
- [16] 詹东昂, 何生松. 肝硬化患者血清 TNF- α 、IL-8 与 sICAM-1 的检测意义[J]. *中国误诊学杂志*, 2007, 7(24): 5785-5786.
Zhan Dongang, He Shengsong. *Chin J Misdiagn*, 2007, 7(24): 5785-5786.
- [17] 贾绮宾, 梁学亚, 吴改玲, 等. 肝癌、肝硬化患者血清 TNF- α 、IL-2、sIL-2R 检测的临床意义 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2002, 11(3): 243-247.
Jia Qibin, Liang Xueya, Wu Gailing, et al. *Chinese Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2002, 11(3): 243-247.

(责任编辑 吴晓丽)