

· 论 著 ·

蛋白激酶 CK2 α 在大鼠肝纤维化病理过程中的表达变化

王珂琪, 许维恒, 丁力, 张俊平 (第二军医大学药学院生化药学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的** 观察蛋白激酶 casein kinase II α (CK2 α)在大鼠肝纤维化病理过程中的表达变化,以及 10-甲氨基-8-硫代苦参碱(MASM)抗肝纤维化治疗对 CK2 α 表达的影响。**方法** 采用二甲基亚硝胺(DMN)和胆管结扎术(BDL)的方法建立大鼠肝纤维化模型,造模后灌胃给予 MASM (50 mg/kg)和生理盐水进行治疗。肝组织切片分别采用苏木精-伊红染色进行病理分析,用天狼星红和 Masson 胶原染色判定肝纤维化程度,免疫组织化学法观察纤维化肝组织中 CK2 α 和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达变化。**结果** 与对照组相比,DMN 及 BDL 诱导的肝纤维化组织中 CK2 α 的表达水平均显著上调;注射 DMN 造模 1~4 周,随着造模时间的延长, α -SMA 表达逐渐增加,CK2 α 的表达水平相应显著上调;与模型组相比,MASM 药物治疗组大鼠肝纤维化程度明显缓解,同时 CK2 α 的表达水平显著下调。**结论** 蛋白激酶 CK2 α 的表达水平与肝纤维化的形成呈正相关关系;苦参碱衍生物 MASM 抗肝纤维化作用伴随下调 CK2 α 的表达水平,提示 CK2 α 是一个肝纤维化治疗的潜在靶点。

[关键词] 蛋白激酶 CK2 α ;肝纤维化;苦参碱衍生物;靶点

[中图分类号] Q555⁺.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)06-0518-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.06.010

The expression of protein kinase CK2 α in rat hepatic fibrogenesis process

WANG Keqi, Xu Weiheng, Ding Li, ZHANG Junping (Department of Biochemic Pharmacy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To observe the dynamic characteristics of protein kinase, casein kinase II α (CK2 α), expression during hepatic fibrogenesis in rats; and the effects of a matrine derivative, 13-methylamino-18-thione-matrine (MASM), on CK2 α expression when it is used for anti-fibrotic treatment. **Methods** Hepatic fibrosis model was established in SD rats by dimethylnitrosamine (DMN) injection or by bile duct ligation (BDL). The established fibrotic rats were given 50 mg/kg MASM or saline as a control by gavage for three weeks. The level of hepatic fibrosis was evaluated by histopathology examination using hematoxylin-eosin staining, and using the sirius red and Masson's trichrome staining for collagen determination in fibrosis. The expressions of CK2 α and α -smooth muscle actin (α -SMA) in hepatic tissues were detected by immunohistochemistry. **Results** CK2 α is mainly expressed in the stellate cells of fibrotic livers induced by DMN or BDL comparing the control group. Along with the development of hepatic fibrosis as evidenced by α -SMA expression, increased CK2 α -positive cells in liver were detected while injecting DMN in the rats for one to four weeks. MASM treatment significantly inhibited the hepatic fibrosis and suppressed the expression of CK2 α comparing the model group. **Conclusion** The expression level of CK2 α , and hepatic fibrosis formation are positively correlated. The matrine derivative, MASM, can significantly inhibit hepatic fibrosis and suppress the CK2 α expression. These results suggest CK2 α may be a potential target for hepatic fibrosis therapy.

[Key words] casein kinase II α (CK2 α); hepatic fibrosis; matrine derivative; target

肝纤维化(hepatic fibrosis, HF)的形成是肝脏对各种病因所致慢性肝损伤的修复反应,是慢性肝病共有的病理改变,主要特征是以胶原为主的细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)在肝内的过度

沉积,导致肝脏结构改变和肝功能丧失。肝纤维化发生、发展的机制十分复杂,涉及多种细胞、细胞因子和 ECM^[1,2]。目前研究认为,肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)在肝纤维化发生、发展过程中发挥关键作用,是肝纤维化治疗的重要靶细胞。肝脏受损后,静息状态的 HSC 被激活,表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),并增殖、收缩、生成胶原和分泌细胞因子,促进肝纤维化的发生。研究表明,HSC 的活化和 HSC 活化表型的维持涉及多个转录因子,如 NF κ B、Foxf1、JunD、C/EBP 等,也与多条细

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81170404)

[作者简介] 王珂琪,硕士研究生。Tel: (021) 81871331; E-mail: 13611655682@163.com

[通讯作者] 张俊平,教授,博士生导师。研究方向:抗炎免疫药理。Tel: (021) 81871328; E-mail: jpzhang08@163.com

胞内信号通路,如蛋白激酶 AKT 通路、MAPK 通路、Smad 通路等有关^[3]。虽然近年来肝纤维化的病理机制研究已取得很大进展,但是肝纤维化的发病及调控机制尚未阐明。因此,寻找并发现影响 HSC 活化和肝纤维化进程的关键性蛋白,对于肝纤维化的治疗具有重要意义。

蛋白激酶 II (casein kinase II, CK2) 是一种高度保守的丝苏氨酸蛋白激酶,由催化亚基 α 、 α' 和催化亚基 β 组成,广泛分布于真核细胞的胞浆和胞核中,在细胞生长、增殖、凋亡和癌变等过程中发挥重要作用,参与多种疾病的发生和发展进程,如神经退行性病变、炎症、心血管疾病、肿瘤以及病毒和寄生虫感染等^[4]。CK2 可通过调控细胞内多条信号通路调节细胞功能,例如,CK2 参与 NF κ B 的激活过程,可磷酸化 I κ B Ser32、Ser35 和磷酸化 p65 Ser529,促进 NF κ B 基因转录功能^[5]。此外,CK2 也作为 ectokinases,磷酸化细胞外蛋白,影响细胞黏附、运动和细胞相互作用^[6]。由于 CK2 参与了多种疾病进程,它已成为一个有前景的治疗靶点^[7]。但是,CK2 与肝纤维化之间的关系尚未见文献报道。

苦参碱(matrine)是传统中药苦参的主要活性成分,具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒和抗肝纤维化等药理学活性^[8-11]。但是,苦参碱药理活性较低,为此,我们设计并合成了一系列苦参碱衍生物,发现苦参碱衍生物的抗炎、抗肝纤维化和抗肿瘤作用比苦参碱显著提高^[12-15],其中,13-甲氨基-18-硫代苦参碱(MASM)体外能抑制 HSC 的活化,体内能抑制 DMN 和 BDL 诱导的实验性大鼠肝纤维化^[13],其抗肝纤维化作用机制目前尚不清楚。

本实验主要研究 CK2 在 DMN 和 BDL 实验性大鼠肝纤维化模型中的表达变化,并观察苦参碱衍生物 MASM 抗肝纤维化治疗后 CK2 的表达变化,研究 CK2 与肝纤维化的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 苦参碱衍生物(MASM)由第二军医大学药学院有机化学教研室合成,纯度>98%;二甲基亚硝胺(DMN)购自天津生物技术研究所; α -平滑肌肌动蛋白多克隆抗体(α -SMA)购自 Sigma 公司;蛋白激酶 CK2 多克隆抗体购自 Sigma 公司。SABC 免疫组化试剂盒和 DAB 试剂盒购自武汉博士德公司。

1.1.2 实验动物 雄性 SD 大鼠,清洁级,体重

150~200 g,购于中国科学院上海动物实验中心。

1.2 方法

1.2.1 DMN 损伤肝纤维化模型 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组及 MASM 治疗组。于大鼠腹腔注射 DMN (10 μ g/kg),每周注射 3 次,共注射 5 周,制备 DMN 诱导的大鼠肝纤维化模型^[13]。MASM 治疗组大鼠于 DMN 注射第 5 周起,每天灌胃给予 MASM 50 mg/kg,治疗 3 周后处死。空白对照组和模型组则灌胃给予等体积的生理盐水。

1.2.2 BDL 损伤肝纤维化模型 SD 大鼠分为假手术组、模型组及 MASM 治疗组。于大鼠腹腔注射 35 mg/kg 水合氯醛溶液麻醉,开腹后分离胆总管并结扎切断,制备 BDL 诱导的肝纤维化模型^[13]。假手术组大鼠麻醉后开腹分离胆总管,不结扎胆总管,直接关腹。MASM 治疗组大鼠于术后第 4 天起,每天灌胃给予 50 mg/kg 的 MASM 药物治疗,给药 3 周后处死。空白对照组和模型组则灌胃给予等体积的生理盐水。

1.2.3 组织样品的收集 给药 3 周后,于大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,分离肝组织,于中性甲醛中固定,制作石蜡切片。观察纤维化进程中 CK2 表达变化,DMN 模型组和空白对照组分别在造模后 1、2、3、4 周处死大鼠,分离肝组织,制备石蜡切片。

1.2.4 苏木精-伊红染色、天狼星红和 Masson 胶原染色 参照文献^[13],采用苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin, HE)进行病理分析,天狼星红(sirius red)和 Masson 胶原染色判定肝纤维化程度。

1.2.5 免疫组织化学方法检测 CK2 和 α -SMA 表达 采用 SABC 染色方法(DAB 显色)^[13],即大鼠肝组织石蜡切片,加 1:20 正常山羊血清封闭后,再加 CK2 抗体或 α -SMA 抗体及生物素化兔抗山羊 IgG 二抗以及 SABC-POD 溶液,最后滴加 DAB 显色,常规树脂封片,光镜下观察 CK2 和 α -SMA 的表达变化,并拍照。

2 结果

2.1 DMN 和 BDL 诱导的纤维化大鼠肝组织中 CK2 的蛋白表达水平变化 DMN 造模 5 周和 BDL 造模 3 周后,天狼星红染色,肝脏大量表达胶原,表明成功制备肝纤维化模型。通过免疫组织化学法检测纤维化肝组织中 CK2 α 表达水平的变化。结果发现 CK2 α 主要表达于肝星状细胞内;与对照组相比,DMN 及 BDL 模型组的肝组织中 CK2 α 的表达水平均有显著上调,提示 CK2 表达水平与肝纤维化的形成有关(图 1)。

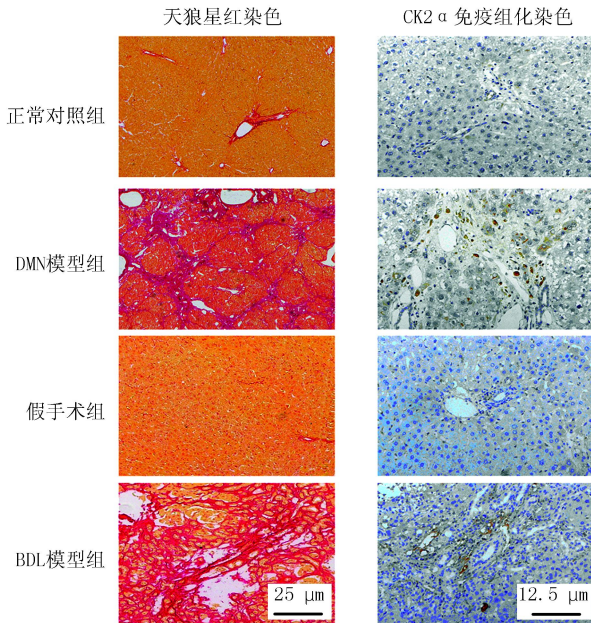


图1 DMN和BDL模型大鼠纤维化肝脏
CK2 α 蛋白表达水平变化

2.2 DMN 纤维化模型大鼠肝纤维化进程中 CK2 α 的蛋白表达水平变化 SD 大鼠腹腔注射 DMN 制备纤维化模型。在造模不同时间段,应用 α -SMA 和 CK2 α 抗体,采用免疫组织化学染色方法,检测不同时期纤维化肝组织中 α -SMA 和 CK2 α 的蛋白表达水平变化。结果显示,DMN 纤维化模型第 1~4 周, α -SMA 表达逐渐增加,表明肝纤维化程度不断加剧;与此相对应,随着肝纤维化程度的不断加剧,尤其是肝纤维化第 3、第 4 周,CK2 α 在纤维化组织中的表达明显增多(图 2)。提示 CK2 表达水平与肝纤维化呈正相关关系。

2.3 MASM 药物治疗后 DMN 及 BDL 纤维化模型中 CK2 的蛋白表达水平变化(图 3) DMN 和 BDL 肝纤维化大鼠,灌胃给予 MASM 治疗,采用 HE、天狼星红和 Masson 染色研究 MASM 抗肝纤维化作用,免疫组织化学方法观察 MASM 治疗对 CK2 α 表达的影响。结果发现 MASM (50 mg/kg) 能明显抑制 DMN 和 BDL 诱导的肝纤维化,HE

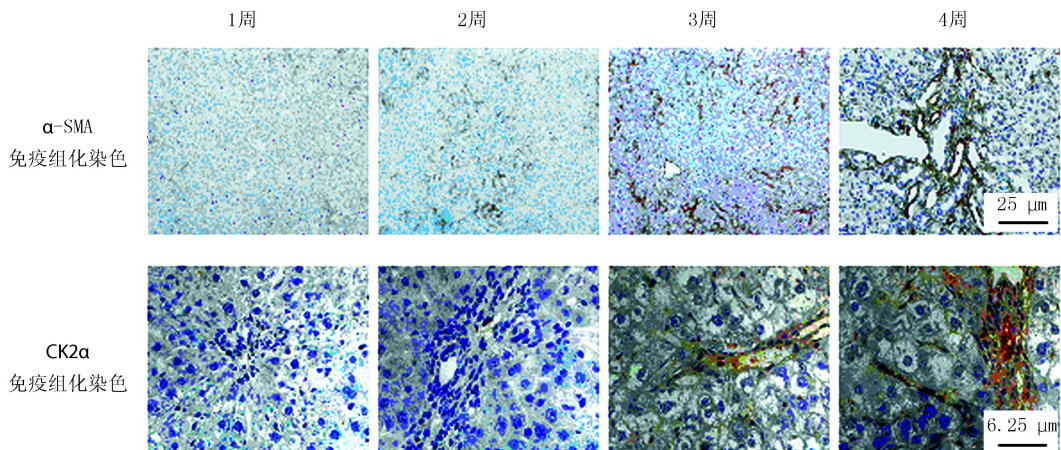


图2 DMN 注射不同时间大鼠肝组织 α -SMA 和 CK2 α 表达水平变化

染色显示 MASM 治疗组肝脏炎症浸润明显减少,天狼星红和 Masson 染色显示,MASM 治疗组胶原明显减少,同时,免疫组织化学显示 CK2 α 的表达水平显著下调。

3 讨论

肝纤维化及其终末期肝硬化目前仍是危害人类健康的重大问题。近年来研究肝纤维化的发病机制已取得重要进展,人们普遍接受肝星状细胞及其活化后转化的肌成纤维细胞(myofibroblast)是产生 ECM 的中心细胞,也发现纤维化过程同时伴随着大量激酶的活化和信号通路的激活^[1-3]。但是,肝纤维化的发病机制仍不完全清楚,临床上肝纤维化的治疗缺

乏有效的药物。本研究中采用 DMN 和 BDL 制备实验性大鼠肝纤维化模型,观察蛋白激酶 CK2 在肝纤维化进程中的表达变化以及苦参碱衍生物 MASM 抗肝纤维化治疗后 CK2 的表达变化,以寻找调控肝纤维化的关键性蛋白,期望发现新型抗肝纤维化药物靶点。

本研究发现,DMN 和 BDL 诱导的大鼠纤维化肝组织中 CK2 α 蛋白表达水平显著上调,而且随着肝纤维化的加重,肝脏组织中 CK2 α 的表达水平逐渐升高,表明 CK2 与肝纤维化的发展进程密切相关。此外,我们还应用具有抗肝纤维化活性的苦参碱衍生物 MASM,从另一个侧面研究 CK2 与肝纤维化的关系。结果发现 MASM 能显著抑制肝纤维

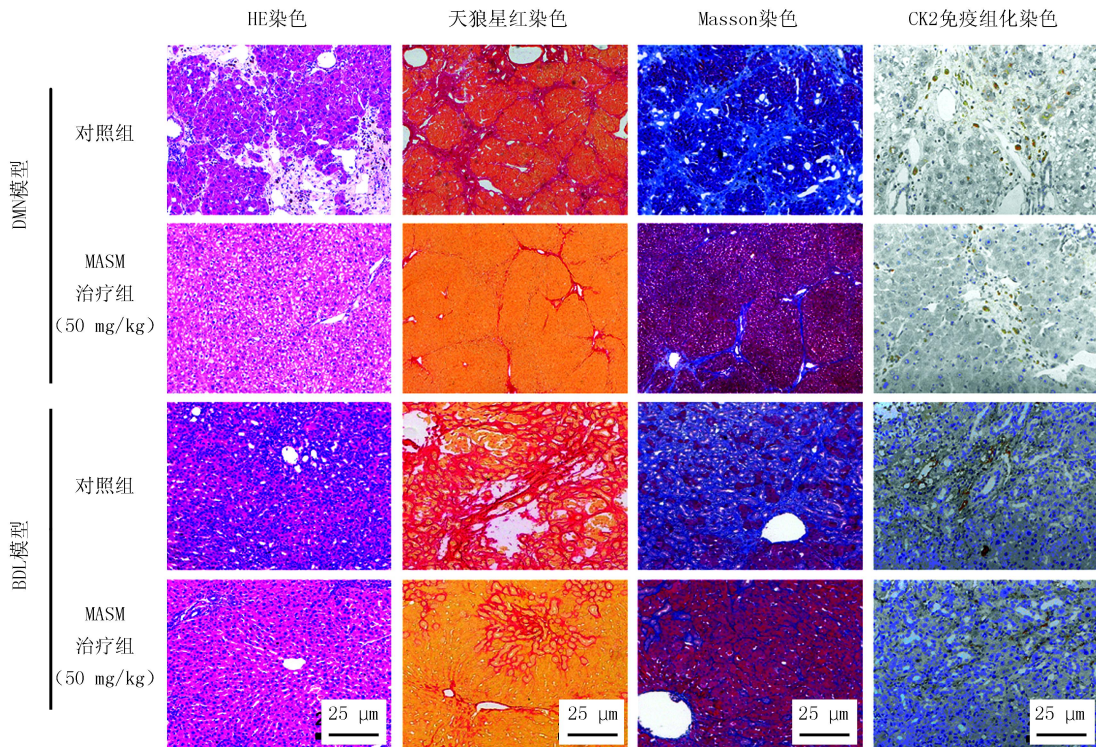


图 3 MASM 抑制 DMN 和 BDL 诱导的肝纤维化模型及下调 CK2 α 蛋白表达

化,伴随纤维化肝组织 CK2 α 蛋白表达水平的下降,进一步说明 CK2 与肝纤维化有关。当然,CK2 与肝纤维化的关系仍然需要更多的实验证据予以确证。

蛋白激酶 CK2 在细胞生长、增殖、凋亡和癌变等过程中发挥重要作用。肝纤维化发生、发展过程中,肝星状细胞大量增殖并大量合成胶原蛋白。此外,我们在前期研究中发现 MASM 能显著抑制肝星状细胞增殖。因此,主要表达于肝星状细胞的 CK2 α 在纤维化肝组织表达水平增加是否与肝星状细胞大量增殖有关,尚待进一步从功能上研究明确 CK2 与肝星状细胞增殖和胶原合成的关系。目前许多不同作用模式的小分子 CK2 抑制剂已经面世^[7]。应用特异性 CK2 抑制剂研究其抗肝纤维化作用,可以进一步明确 CK2 与肝纤维化之间的关系。相信随着研究的深入,CK2 可能成为肝纤维化的治疗新靶点。

【参考文献】

[1] Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011, 25(2):195-206.
[2] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Gastroenterology, 2008, 134(6):1655-1669.
[3] Rippe RA, Brenner DA. From quiescence to activation: gene

regulation in hepatic stellate cells [J]. Gastroenterology, 2004, 127(4):1260-1262.
[4] Cozza G, Bortolato A, Moro S. How druggable is protein kinase CK2? [J]. Med Res Rev, 2010, 30(3):419-62.
[5] Wang D, Westerheide SD, Hanson JL, et al. Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of ReIA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II [J]. J Biol Chem, 2000, 275(42):32592-32597.
[6] Rodriguez FA, Contreras C, Bolanos-Garcia V, et al. Protein kinase CK2 as an ectokinase: the role of the regulatory CK2 beta subunit [J]. Proc Natl Acad Sci(USA), 2008, 105(15):5693-5698.
[7] Prudent R, Cochet C. New protein kinase CK2 inhibitors: jumping out of the catalytic box [J]. Chem Biol, 2009, 16(2):112-120.
[8] Shi D, Zhang J, Qiu L, et al. Matrine inhibits infiltration of the inflammatory gr1(hi) monocyte subset in injured mouse liver through inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 [J]. Evid Based Compl Alternat Med, 2013, 2013:580673.
[9] Wang W, You RL, Qin WJ, et al. Anti-tumor activities of active ingredients in compound Kushen injection [J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36(6):676-679.
[10] Yang Y, Xiu J, Zhang X, et al. Antiviral effect of matrine against human enterovirus 71 [J]. Molecules, 2012, 17(9):10370-10376.
[11] Zhang JP, Zhang M, Zhou JP, et al. Antifibrotic effects of matrine on in vitro and in vivo models of liver fibrosis in rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2001, 22(2):183-186.

· 个案报道 ·

静脉滴注环磷腺苷葡胺注射液致过敏反应 1 例

王 萍, 沈 洁, 孔飞飞, 郭良君 (解放军 98 医院, 浙江 湖州 313000)

[关键词] 环磷腺苷葡胺; 静脉滴注; 寒战; 过敏反应

[中图分类号] R972.1

[文献标志码] B

[文章编号] 1006-0111(2015)06-0575-01

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.06.026

1 病例资料

患者,男,74岁。因“车祸致伤左膝疼痛、活动障碍2h余”于2013年12月12日急诊入院,既往无食物、药物过敏史。查体:体温36.5℃,脉搏80次/min,呼吸16次/min,血压120/75 mmHg。急诊X片示:左髌骨粉碎性骨折,关节面台阶形成,骨折端分离移位约1.5 cm。诊断为:髌骨骨折,左髌骨粉碎性骨折,左膝关节复合体损伤。当日予以止血、补液等对症支持治疗。12月13日遵医嘱予以环磷腺苷葡胺注射液(山东潍坊制药有限公司,规格:5 ml:90 mg,批号:130605)+0.9%氯化钠注射液500 ml静脉滴注。2 min后,患者出现浑身发抖、寒战,立即停药,予以地塞米松磷酸钠注射液5 mg,静脉注射,15 min后症状好转。12月14日再次使用环磷腺苷葡胺注射液组输液,3 min后再次出现发抖、寒战症状,经停药、地塞米松磷酸钠注射液静脉注射后好转。

2 讨论

环磷腺苷葡胺为非洋地黄类强心剂,用于治疗心力衰竭、心肌炎、病窦综合征、冠心病及心肌病,也

可用于心律失常的辅助治疗^[1]。本例患者无以上明确适应证,因髌骨骨折而给予环磷腺苷葡胺注射液的处方缺乏用药指征,属于不合理用药。患者既往无药物过敏史,仅入院当天使用氯诺昔康止痛治疗,此后2 d,2次使用本品2~3 min后即出现寒战、发抖,停药后好转。继续使用其他药物未再出现类似不适。过敏症状的出现与使用本品有较强的时间相关性,基本确定为环磷腺苷葡胺所致的过敏反应。

环磷腺苷葡胺的不良反应较为少见,说明书提示偶见心悸、心慌、头晕等症状。文献有出现皮疹、瘙痒、过敏性休克等报道^[2-4]。临床应用时应注意滴速不可太快,用量150 ml以上时,滴注时间不能少于90 min。如遇患者感到心悸、心慌,应停止使用,停药后症状一般可自行消失。同时建议临床医师使用本品时应严格遵循说明书规定,不得无循证依据超说明书使用,以免造成安全隐患。

【参考文献】

- [1] 吕 蒙.环磷腺苷葡胺治疗慢性充血性心力衰竭的临床研究[J].实用药物与临床,2013,16(1):39-40.
- [2] 宋爱丽,刘 君.环磷腺苷葡胺注射液致过敏性休克1例[J].药物流行病学杂志,2012,21(10):487.
- [3] 孔飞飞,郭良君,谭兴起,等.静滴环磷腺苷葡胺注射液致寒战1例[J].药物流行病学杂志,2011,20(11):612.
- [4] 韦又嘉.注射用环磷腺苷葡胺致严重过敏反应1例[J].中国药物警戒,2013,10(8):511.

[收稿日期] 2014-11-29 [修回日期] 2015-06-04

[本文编辑] 李睿旻

[作者简介] 王 萍,本科,药师.Tel:(0572)3269778

[通讯作者] 孔飞飞,主管药师.Tel:13738241418;E-mail:kongfeifei2009@sohu.com

(上接第521页)

- [12] Hu H, Wang S, Zhang C, et al. Synthesis and *in vitro* inhibitory activity of matrine derivatives towards pro-inflammatory cytokines [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20(24):7537-7539.
- [13] Xu WH, Hu HG, Tian Y, et al. Bioactive compound reveals a novel function for ribosomal protein S5 in hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis [J]. *Hepatology*, 2014, 60(2): 648-660.
- [14] Xu Y, Peng Z, Ji W, et al. A novel matrine derivative

WM130 inhibits activation of hepatic stellate cells and attenuates dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:203978.

- [15] Qian L, Liu Y, Xu Y, et al. Matrine derivative WM130 inhibits hepatocellular carcinoma by suppressing EGFR/ERK/MMP-2 and PTEN/AKT signaling pathways [J]. *Cancer Lett*, 2015, 368(1):126-134.

[收稿日期] 2015-06-10 [修回日期] 2015-10-11

[本文编辑] 李睿旻