

保肝解毒颗粒对雷公藤多苷所致急性肝损伤小鼠 白介素18及细胞凋亡的影响

彭 勃 禄保平 苗明三 杨晓娜 许家艳

(河南中医学院肝病研究所, 河南省郑州市金水路1号 450008)

[摘要] **目的** 探讨药物性肝损伤的发病机理及保肝解毒颗粒的作用机制。**方法** 60只小鼠随机分为6组, 分别以相应剂量药物灌胃5天, 再以雷公藤多苷灌胃造模, 检测小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、血清门冬氨酸氨基转移酶(AST)和白介素18(IL-18)水平及肝细胞凋亡情况。**结果** 模型组 IL-18明显升高, 肝细胞凋亡严重; 保肝解毒颗粒可有效降低 ALT、AST 和 IL-18水平, 并使肝细胞凋亡程度明显减轻。**结论** 雷公藤多苷所致的急性肝损伤与 IL-18和肝细胞凋亡密切相关; 保肝解毒颗粒可通过降低 IL-18水平、抑制肝细胞凋亡等起到防治肝脏损害的作用。

[关键词] 肝疾病; 中医药疗法; 细胞凋亡; 保肝解毒颗粒

Effects of Baogan Jiedu Granules on IL-18 and Apoptosis in Acute Liver Injury Mice Induced by Tripterygium Wilfordii Polyglycoside

PENG Bo, LU Bao-ping, MIAO Ming-san, et al.

(Institute of Hepatic Diseases, Henan College of TCM, Zhengzhou 450008)

ABSTRACT **Objective** To explore the pathogenesis of drug-induced liver injury and the therapeutic mechanism of Baogan Jiedu Granules. **Methods** Totally 60 mice were randomly divided into 6 groups. They were treated with intragastrical perfusion of corresponding doses of drugs for 5 days, respectively and then were modeled by intragastrical perfusion of Tripterygium Wilfordii Polyglycoside. Serum ALT, AST and IL-18 levels and apoptosis of hepatic cells were detected. **Results** IL-18 level in model group increased obviously with severe apoptosis of hepatic cells. Baogan Jiedu Granules could effectively decrease ALT, AST activities and IL-18 level with apoptosis of hepatic cells obviously improved. **Conclusion** Leigongteng Duodai-induced acute liver injury is closely correlated with IL-18 and apoptosis of hepatic cells. Baogan Jiedu Granules has therapeutic effect for liver injury through decreasing IL-18 level and inhibiting apoptosis of hepatic cells.

Key Words Hepatic diseases; TCM therapy; Apoptosis; Baogan Jiedu Granules

药物性肝损伤(DILI)是指由于药物或/和其代谢产物的毒性作用, 或机体对药物产生过敏反应而引起的肝脏损害。其发生机制尚不十分明了, 临床亦缺乏有效的治疗方法。本课题组在既往工作的基础上^[1,2], 应用中药提取物雷公藤多苷片灌胃造成小鼠急性 DILI 模型, 并运用中药保肝解毒颗粒进行干预治疗, 观察其对小鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、血清门冬氨酸氨基转移酶(AST)和白介素18(IL-18)及肝细胞凋亡等方面的影响, 进一步阐明了 DILI 的发病机理及保肝解毒颗粒的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

昆明种小鼠60只, 体重18~22g, 雌雄各半, 购自河南省实验动物中心, 许可证号: 410115。以普通鼠饲料喂养于河南中医学院动物实验中心, 鼠饲料购自河南省实验动物中心, 许可证号: 4104041。

1.2 药物与试剂

保肝解毒颗粒由芦荟、刺蒺藜、大枣等组成, 每袋

5.0g(相当于生药52.5g), 由河南中医学院第一附属医院制剂室制备, 批号: 20041220; 雷公藤多苷片由上海复旦复华药业有限公司生产, 批号: 040303; 甘利欣胶囊由江苏正大天晴药业股份有限公司生产, 批号: 040801; ALT、AST 试剂盒, 批号: 050122, 南京建成生物工程研究所提供; 小鼠 IL-18定量酶联免疫检测试剂盒, 美国进口分装; 细胞凋亡检测试剂盒, 武汉博士德生物工程有限公司提供, 批号: 200412。

1.3 主要仪器

JY 601电子天平, 上海民桥精密科学仪器有限公司生产; LD4-2型离心机, 北京医用离心机厂生产; DZKW 型电子恒温水浴锅, 北京市永光明医疗仪器厂生产; WKY 型微量可调移液器, 上海求精生化试剂仪器有限公司生产; SABA PM 4000全自动生化分析仪, 北京贝斯特公司生产; UV-2000分光光度计, 尤尼柯(上海)仪器有限公司生产。

2 方法

2.1 分组与给药方法

昆明种小鼠60只, 随机分为雷公藤多苷模型组(模型组), 保肝解毒颗粒大、中、小剂量组(大剂量组、中剂

量组、小剂量组), 甘利欣组和空白组, 每组10只。造模前大、中、小剂量组分别以保肝解毒颗粒(以所相当的生药量计) 大剂量21.6 g/kg, 中剂量10.8g/kg, 小剂量5.4g/kg, 按0.2ml/10g 灌胃, 甘利欣组以甘利欣0.075g/kg, 按0.2ml/10g 灌胃, 模型组及空白组分别给以等体积的生理盐水灌胃, 每日1次, 连续5天。第5次灌胃后除空白组外其他5组小鼠均禁食12小时, 以雷公藤多苷按270mg/kg 的剂量配制成混悬液, 按0.2ml/10g 灌胃1次造模, 处死前分别禁食(不禁水) 16小时。

2.2 标本制备与检测

小鼠造模18小时后摘眼球取血, 3000转/分钟离心, 制备血清。ALT、AST 检测采用 SABA PM 4000全自动生化分析仪, 血清 IL-18采用 ELISA 法测定, 肝细胞凋亡采用 TUNEL 法(TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术) 检测。

2.3 统计学方法

应用 SPSS 11.5统计软件对实验资料进行统计分析, 计数资料采用单因素方差分析, 计量资料采用 Ridit 分析。

3 结果

3.1 保肝解毒颗粒对雷公藤多苷所致急性 DILI 小鼠 ALT、AST 和 IL-18的影响

表1示, 模型组小鼠血清 ALT、AST 明显升高, 与空白组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。甘利欣组及保肝解毒颗粒各剂量组均可有效降低血清 ALT、AST, 与模型组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。保肝解毒颗粒各剂量组与甘利欣组血清 ALT、AST 降低的效果相当, 差异无显著性意义($P>0.05$)。

模型组小鼠血清 IL-18水平明显升高, 与空白组比较差异有显著性意义($P<0.05$)。保肝解毒颗粒中、小剂量组可使 IL-18水平明显降低, 与模型组比较差异有显著性意义($P<0.05$), 甘利欣组及保肝解毒大剂量组 IL-18水平变化不明显, 与模型组比较差异无显著性意义($P>0.05$)。

表1 保肝解毒颗粒对雷公藤多苷所致急性 DILI 小鼠 ALT、AST 的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	鼠数	剂量(g/kg)	ALT(U/L)	AST(U/L)	IL-18(pg/ml)
空 白 组	10	等体积	32.30±7.76*	37.10±6.05*	23.96±4.07*
模 型 组	10	等体积	98.30±13.01	96.30±13.86	34.36±6.26
甘利欣组	10	0.075	65.70±12.74*	47.80±11.05*	30.06±9.97
大剂量组	10	21.6	53.10±12.91*	45.50±9.59*	29.67±6.47
中剂量组	10	10.8	61.50±12.41*	46.60±8.47*	24.32±5.84*
小剂量组	10	5.4	61.20±10.16*	53.50±10.95*	23.65±6.83*

3.2 保肝解毒颗粒对雷公藤多苷所致急性 DILI 小鼠肝细胞凋亡的影响

根据同一视野中观察到的凋亡小体数目的多少, 共分为四级。- :肝细胞中无凋亡小体者; + :在肝细胞同一个视野中观察到1个凋亡小体者; ++ :在肝细胞同一个视野中观察到2~4个凋亡小体者; +++ :在肝细胞同一个视野中观察到5个以上(含5个) 凋亡小体者。通过对雷公藤多苷所致急性 DILI 实验各组小鼠肝细胞进行观察, 测得凋亡小体的统计结果。表2示, 空白组小鼠肝细胞凋亡程度轻微; 模型组小鼠肝细胞凋亡程度严重, 经 Ridit 分析, 与空白组比较差异有显著性意义($P<0.05$); 保肝解毒颗粒各剂量及甘利欣组小鼠肝细胞凋亡程度均有所减轻, 其中尤以大、中剂量组和甘利欣组效果最佳, 经 Ridit 分析, 与模型组比较差异有显著性意义($P<0.05$), 而与空白组比较差异无显著性意义($P>0.05$)。小剂量组与模型组比较差异无显著性意义($P>0.05$), 与空白组比较差异亦无显著性意义($P>0.05$), 说明其肝细胞变性程度较轻。

表2 各组肝细胞凋亡小体观察结果(只)

组 别	鼠数	-	+	++	+++
空 白 组	10	9	1	0	0
模 型 组	10	0	1	2	7
甘利欣组	10	10	0	0	0
大剂量组	10	10	0	0	0
中剂量组	10	10	0	0	0
小剂量组	10	2	1	7	0

4 讨论

IL-18诱导产生的多种细胞因子均与肝损害有关^[3,4], 且能增强 FasL 的表达^[5], 而 Fas-FasL 系统与某些肝损害也密切相关^[6]。细胞凋亡则是指细胞按自身程序主动死亡的过程。当肝细胞受损时, FasL/Fas 抗体、TNF α TGF β 、INF γ 等被激活, 通过与靶细胞上的受体结合, 引起凋亡的发生。肝细胞通常表达受体 CD95(APO-1/Fas), 当它被其配体 Fas 激活或通过交叉反应与抗 Fas 抗体结合即可诱导凋亡产生^[7]。抑制

肝细胞凋亡可以达到保护肝细胞的作用。

本课题在既往研究的基础上,再次应用中药提取物雷公藤多苷片灌胃建立小鼠急性 DILI 模型,经肝功能检测、普通病理观察和电镜下细胞超微结构观察,小鼠血清 ALT、AST 明显升高,肝细胞广泛损伤,细胞超微结构显著变化,说明造模成功。研究结果显示,模型组小鼠血清 IL-18 水平明显升高,说明雷公藤多苷所致的 DILI 与 IL-18 有一定关系。而保肝解毒颗粒可使血清 IL-18 水平明显降低,说明保肝解毒颗粒可能通过有效降低模型小鼠血清 IL-18 水平,减少相关因子的产生,影响 FasL 的表达,而起到减低肝脏损害的作用。本课题研究还证实,雷公藤多苷可使小鼠肝细胞出现显著凋亡,说明其所致的 DILI 与其能够诱导肝细胞发生凋亡有关。而保肝解毒颗粒可使小鼠肝细胞凋亡程度不同程度地减轻,说明保肝解毒颗粒可对雷公藤多苷诱导的小鼠肝细胞凋亡产生抑制作用。

保肝解毒颗粒是课题组在多年实践中总结出来的防治 DILI 行之有效的经验方药,全方寒温并用,苦甘齐进,泻补兼施,药仅三味,少而精当,针对 DILI 湿热毒邪蕴结、肝(胆)脾(胃)不和的基本病机,共奏清热燥湿、凉肝解毒、疏肝理气、健脾和胃之功,俾毒邪去,湿热除,肝气舒,脾胃和,则诸症自解。

本研究显示,保肝解毒颗粒可通过降低雷公藤多苷所致的急性 DILI 小鼠血清 IL-18 水平、抑制肝细胞凋亡等环节,起到有效预防 DILI 的作用。实验结果进

一步阐明了 DILI 的发病机理和中药保肝解毒颗粒的作用机制,为临床防治本病和新药保肝解毒颗粒的开发奠定了良好基础。

参考文献

- [1]彭勃,苗明三,王宇亮.雷公藤多甙片致小鼠急性肝损伤的初步探讨.中国中药杂志,2003,28(11):1067~1070.
- [2]彭勃,苗明三,王宇亮.保肝解毒胶囊对雷公藤多甙片所致小鼠急性肝损伤保护作用的实验研究.河南中医学院学报,2004,19(2):18~20.
- [3]Trautwein C, Rakemann T, Brenner DA, et al. Concanavalin A-induced liver damage: activation of intracellular pathways triggered by tumor necrosis factor in mice. Gastroenterology, 1998, 114(5): 1035~1045.
- [4]Fiorucci S, Santucci L, Antonelli E, et al. NO-aspirin protects from T cell-mediated liver injury by inhibiting caspase-dependent processing of Th1-like cytokine. Gastroenterology, 2000, 118(2): 404~421.
- [5]Dao T, Ohashi K, Kayano T, et al. Interferon-gamma-inducing factor, a novel cytokine, enhances Fas ligand-mediated cytotoxicity of murine T helper 1 cells. Cell Immunol, 1996, 173(2): 230~235.
- [6]Galle PR, Hofmann WJ, Walczak H, et al. Involvement of the CD95(APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. J Exp Med, 1995, 182(5): 1223~1230.
- [7]Wajant H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. Science, 2002, 296(5573): 1635~1636.

(收稿日期:2005-11-22;修回日期:2006-01-04)

(上接第168页)

损伤的继发性病理损害,损伤神经功能,出现运动、语言、感觉、智能障碍。而 NSLS 补气养血、益脑开窍、祛瘀通络、调节大脑机能,且方中的人参皂甙 Rg1 可对神经细胞抑制高浓度谷氨酸介导升钙效应,阻断钙离子的过量内流^[7];人参中的 Rb1、Rg1 有抑制过氧化作用,直接清除氧自由基,还可诱导抗氧化酶消除自由基^[7]。在动物实验中,NSLS 可显著增加脑血流量,改善脑缺血的诸多指标,有效改善脑血管循环。

NSLS 的功效为养血补血,方中当归养血化瘀、补气活血,与人参、川芎配伍,使气血互补、互用、互生。现代药物分析,当归对脑缺氧、脑缺血后再灌注脑组织脂质过氧化物增高有明显的抑制作用^[8]。实验表明,当归有改善脑循环作用,能明显增强以脑缺氧为主的缺氧耐受力。NSLS 在动物实验中明显增加脑供血、减低脑血管阻力,能够使大鼠大脑中动脉结扎所诱发的脑梗死面积显著减少。

参考文献

- [1]王锐.急性脑损伤后继发性脑肿胀和脑水肿发生机制的实验研究.中国创伤杂志,1998,14(4):200~202.
- [2]张志文.中枢性心房钠尿肽对创伤性脑水肿影响的实验研究.第四军医大学学报,1994,15(3):200~202.
- [3]严薇瑾.大鼠局灶性脑缺血模型的研究.中华神经精神科杂志,1988,21(1):3~5.
- [4]陈奇.中药药理研究方法学.北京:人民卫生出版社,1994:168.
- [5]曾贵云.维替新拉亭对犬和猫脑血流、血管阻力及血压的影响.中国药理学报,1991,12(5):471~474.
- [6]江基尧,朱诚.现代脑损伤.上海:上海科技文献出版社,1995:19.
- [7]中国医学科学院药物研究所.中草药现代研究.北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1996:439~440,451~453.
- [8]康健,郭力弓.中药现代研究与临床应用.北京:学苑出版社,1994:287.

(收稿日期:2006-04-07;修回日期:2006-06-19)