

网络出版时间: 2015-11-18 10:12:34 网络出版地址: http://www.cnki.net/KCMS/detail/34.1065.R.20151118.1012.030.html

乌药对急性酒精性肝损伤的保护作用及机制初探

谭明明^{1,2} 张泓¹, 王军伟²

摘要 目的 探讨乌药对急性酒精性肝损伤的保护作用和可能机制。方法 将40只SD大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、联苯双酯组以及乌药醇提取物组。各组分别于末次给药后测定血丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST)、超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)水平;处死大鼠后制备肝匀浆,分别检测SOD和MDA水平;HE染色法观察大鼠肝病理学变化,免疫组化法检测肝组织核因子- κ B(NF- κ B)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)表达。结果 与模型对照组比较,乌药醇提取物组大鼠血清中ALT、AST、MDA水平显著降低,血清SOD活性及肝组织SOD活性升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。乌药醇提取物组肝组织中IL-1 β 及NF- κ B、TNF- α 表达降低。结论

乌药醇提取物可提高急性酒精中毒性肝组织的SOD活性,增加抗氧化能力,并可降低肝细胞炎症因子,可能对酒精性肝损伤具有保护作用。

关键词 乌药;酒精性肝损伤;保护机制

中图分类号 R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)12-1773-04

急性酒精性肝炎指数日内大剂量饮酒导致的肝脏损伤,是严重危害公众健康的常见疾病之一,并呈逐年上升趋势^[1-2],如不加以干预及治疗,最终可致肝功能障碍甚至衰竭。近年来,对于酒精性肝病的发病机制和治疗方法研究虽取得了长足的进步,但是迄今为止仍无特效治疗方法,也没有药物可以阻止酒精性肝病的病理生理阶段。研究^[3]表明,乌药对酒精性肝损伤有明显的保护作用,无论是乌药水提物还是乌药醇提取物都可以抑制转氨酶的升高、减少丙二醛(malondialdehyde, MDA),提高超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性,但其具体作用机制并不明确。鉴于联苯双酯是目前临床及动物研究护肝药的标准药,该实验拟就乌药醇提取物对

酒精性肝损伤的干预作用与联苯双酯护肝作用相比较,进一步探讨其可能的保护机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性SD大鼠,重160~180g,40只,购自浙江省实验动物中心。

1.2 方法 动物使用前适应环境3d,然后随机分为4组,每组10只。正常对照组:以等体积的蒸馏水灌胃。模型对照组:灌胃给予56°红星二锅头7ml/kg,每日2次,灌胃的容积1ml/100g体重,连续10d造模结束。联苯双酯组联苯双酯0.0225g/kg,每日1次,灌胃容积为1ml/100g体重,连续10d。乌药醇提取物组:2g/kg,每日1次,灌胃容积为1ml/100g体重,连续10d。

1.3 标本处理 末次给药后,从大鼠腹主动脉取血制备血清,然后处死摘取肝脏制备肝匀浆。

1.4 统计学处理 采用SPSS 16.0软件进行分析,计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 乌药醇提取物对急性酒精性肝损伤模型大鼠生化指标的影响 与正常对照组比较,模型对照组大鼠血丙氨酸转氨酶(serum alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)的活性显著升高($P < 0.05$)。与模型对照组比较,联苯双酯组大鼠血清ALT、AST的含量有所降低,乌药醇提取物组大鼠血清ALT、AST含量显著降低($P < 0.05$)。见表1。

表1 乌药醇提取物对急性酒精性肝损伤模型大鼠血清酶的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常对照	64.6 ± 10.5	165.2 ± 20.0
模型对照	87.9 ± 29.0 [#]	191.1 ± 16.8 ^{##}
联苯双酯	70.3 ± 8.6 [*]	174.3 ± 12.4 [*]
乌药醇提取物	61.2 ± 10.2 ^{**}	166.9 ± 13.0 ^{**}

与模型对照组比较:^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与正常对照组比较:[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$

2.2 乌药醇提取物对氧化指标的影响 与正常对照组比较,模型对照组大鼠血清及肝组织MDA含量

2015-10-08 接收

基金项目:浙江省科技厅公益性技术应用研究计划项目(编号:2013C33222)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院急诊医学科,合肥 230022

²天台县人民医院急诊医学科,天台 317200

作者简介:谭明明,女,硕士研究生;

张泓,女,博士,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: zhanghong20070703@163.com

表2 乌药醇提取物对急性酒精性大鼠氧化指标的影响($\bar{x} \pm s$)

项目	正常对照组	模型对照组	联苯双酯组	乌药醇提取物组
肝组织 MDA (nmol/mgprot)	5.80 ± 1.04	8.61 ± 3.21 [#]	7.66 ± 3.38	7.75 ± 4.13
肝组织 SOD (U/mgprot)	194.7 ± 20.4	155.3 ± 15.0 ^{##}	169.0 ± 12.2 [*]	165.7 ± 12.8
血清 MDA (nmol/ml)	3.62 ± 0.19	4.46 ± 0.30 ^{##}	4.29 ± 1.02	3.87 ± 0.44 ^{**}
血清 SOD (U/ml)	143.5 ± 7.5	126.2 ± 6.6 ^{##}	138.4 ± 10.3 ^{**}	136.3 ± 10.4 [*]

与模型对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01; 与正常对照组比较: # P < 0.05, ## P < 0.01

升高,血清及肝组织 SOD 活性显著降低 (P < 0.05)。与模型对照组比较,乌药醇提取物组的 MDA 含量显著降低;乌药醇提取物组大鼠肝组织 SOD 含量明显升高 (P < 0.05)。见表 2。

2.3 乌药醇提取物对肝组织中白细胞介素 1β (interleukin-1β, IL-1β)、核因子-κB (nuclear factor κB, NF-κB)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor α, TNF-α) 表达的影响 显微镜下显示,正常对照组大鼠的肝细胞中可见少量黄色或棕黄色,表明大鼠肝细胞中有少量 IL-1β、NF-κB、TNF-α 表达。与正常对照组比较,模型对照组大鼠中央静脉周围及部分肝小叶内的肝细胞内存在大量的黄色/棕黄色颗粒,细胞质着色。与模型对照组比较,乌药醇提取物组大鼠肝组织中央静脉周围及肝小叶内黄色/棕黄色颗粒显著减少;提示乌药醇提取物抑制酒精刺激后肝细胞中 IL-1β、NF-κB、TNF-α 的表达。见图 1~3。

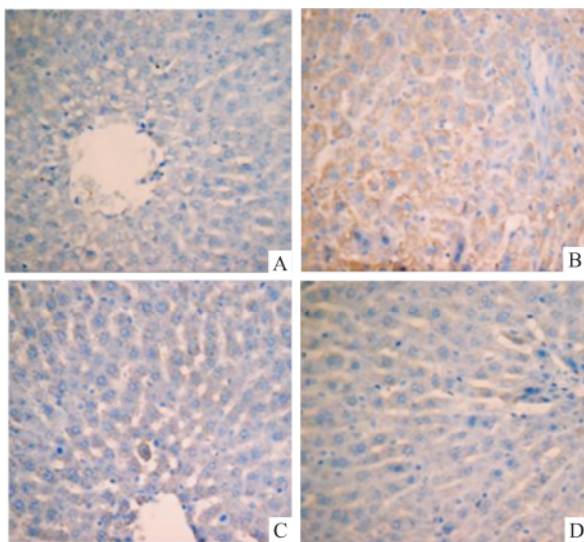


图1 肝组织中 IL-1β 的表达 HRP-DAB/H₂O₂ 染色 ×400

A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 联苯双酯组; D: 乌药醇提取物组

2.4 乌药醇提取物对肝组织形态学的影响 肉眼观察可见:正常对照组大鼠肝脏色泽正常,肝被膜有光泽,腹腔肠管之间无粘连;模型对照组大鼠肝脏色泽略变黄;乌药醇提取物组大鼠肝脏肉眼观察与正常对照组比较差异无统计学意义。光镜下可见:正常对照组肝小叶结构清晰,肝细胞索以中央静脉为

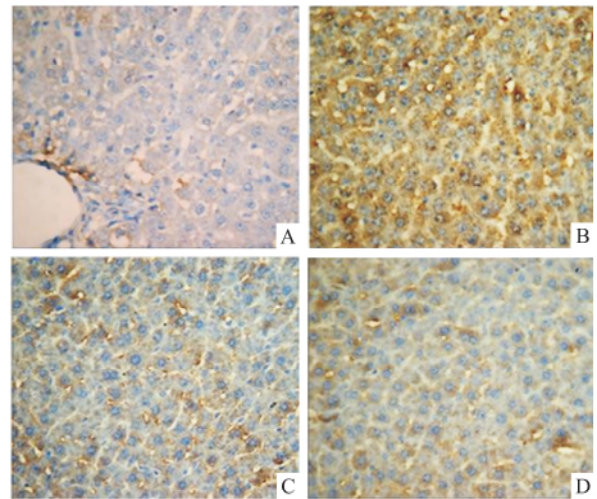


图2 肝组织中 NF-κB 的表达 HRP-DAB/H₂O₂ 染色 ×400

A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 联苯双酯组; D: 乌药醇提取物组

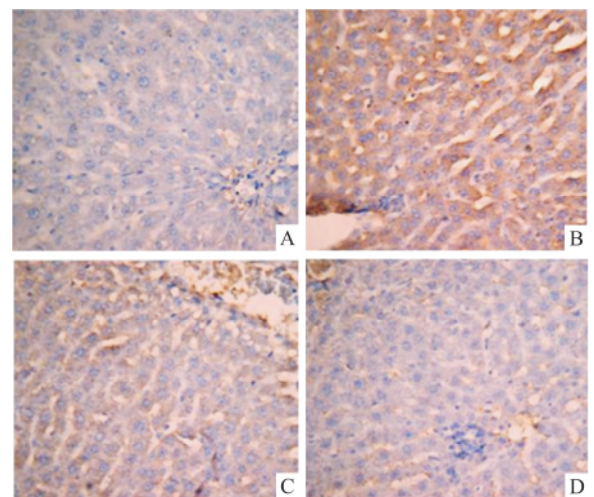


图3 肝组织中 TNF-α 的表达 HRP-DAB/H₂O₂ 染色 ×400

A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 联苯双酯组; D: 乌药醇提取物组

中心呈放射状整齐排列,肝细胞轮廓清晰,呈多边形,肝细胞无坏死,偶见炎性细胞,整个肝脏无明显病理改变;急性酒精性肝损伤模型大鼠的肝小叶界限模糊,肝小叶内可见肝细胞存在点灶状坏死,汇管区可见炎性细胞浸润,部分细胞的胞核消失,肝细胞索排列杂乱无章。与模型对照组比较,乌药醇提取物组大鼠肝小叶界限清楚,肝细胞索排列较整齐,炎症

细胞浸润及坏死程度均降低,肝组织病理改变程度明显减轻。见图4。

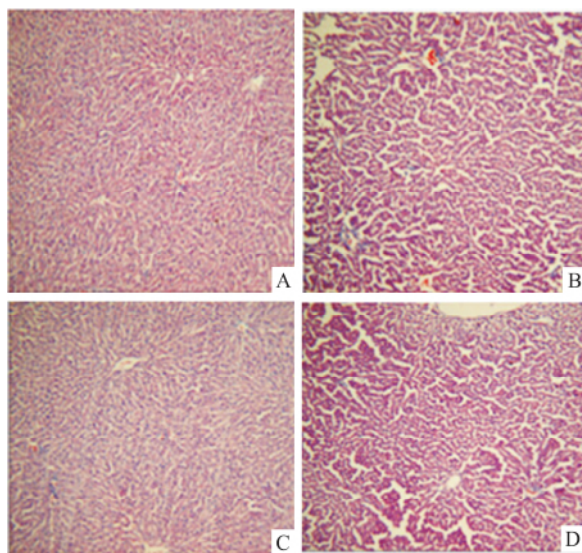


图4 肝组织病理学 HE × 100

A: 正常对照组; B: 模型对照组; C: 联苯双酯组; D: 乌药醇提取物组

3 讨论

迄今为止虽然酒精性肝病的发病机制仍不明确,但就目前所发现的发病机制中,自由基损伤机制及肠源性内毒素损伤机制近年来备受关注。

自由基损伤机制:乙醇在代谢过程中产生氧应激产物,如超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢等自由基,自由基通过与肝细胞表面大分子进行化学反应,导致脂质过氧化,最终破坏肝细胞结构和功能。SOD能有效清除自由基来保护肝细胞不受损伤。长期饮酒可使SOD活性下降,导致自由基的过度增加,从而损伤肝细胞。

肠源性内毒素损伤机制:肝脏约80%的血液供应来自门静脉,门静脉中有来自肠道的细菌代谢产物、食物抗原及环境毒素等^[4]。酒精性肝病时肠道内毒素生成增加,灭活减少,大量内毒素通过门静脉进入肝脏后,不仅直接损伤肝细胞,而且激活库弗细胞,从而释放大量有害因子。其中TNF- α 和IL-1 β 等炎症因子在酒精诱导的肝损伤中发挥着重要作用^[5]。库弗细胞受到氧化应激及细胞因子等外界刺激时,NF- κ B发生磷酸化活化,活化的NF- κ B转移到细胞核并与其调控的靶DNA上的特异位点结合,之后激活其靶基因的转录^[6],促进前炎症因子(TNF- α 和IL-1)、趋化因子(IL-8)等炎症基因及转化生长因子- β 基因的转录,从而参与酒精性肝损伤的过程^[7]。

实验通过模型对照组与正常对照组的比较显示,血清ALT、AST值均明显升高,提示造模成功;给予乌药醇提取物干预后能有效降低模型大鼠血清ALT、AST、MDA,升高模型大鼠血清SOD活性及肝组织SOD活性,提示乌药有保护急性酒精性肝损伤及抗氧化作用;同时实验中也表明,乌药醇提取物能降低肝细胞中IL-1 β 、NF- κ B、TNF- α 的表达,表明乌药还有降低炎症因子表达的作用。

从上述实验结果推断乌药可能通过以下机制对急性酒精性肝损伤起到保护作用:①抗氧化作用,即通过提高血清及肝脏内源性抗氧化物质SOD,干预酒精代谢导致的氧化应激产物ROS、MDA,从而起到保护肝脏的作用,而其细胞炎症因子降低系肝脏功能得到保护后的二级作用;②减轻肠源性内毒素作用,即通过调节肠道微生态,减轻肠道通透性,恢复肠道运动功能,从而降低肠源性内毒素血症,减轻内毒素与库弗细胞表面受体结合,进一步减少NF- κ B的激活,最终减轻炎症因子的释放而保护肝脏。其抗氧化作用系肝脏功能得到保护后的二级作用。

中医认为酒伤肝脾,聚湿生痰是酒精性肝病发病的关键因素,调理脾胃功能是治疗的重要环节。乌药作为温中散寒、理气中药,不仅可以促进胃肠蠕动,明显改善消化不良者的临床症状^[8];而且乌药对肠道微生态有较为肯定的调节作用,对各种原因引起的肠黏膜通透性增高有较好的改善作用^[9]。近年来研究^[10]表明,乌药可能是通过胆碱能受体M、肾上腺素受体 α 及 β 受体介导,对肠道实现双向调节。因此推测乌药保肝作用的最可能机理是通过其调节胃肠道功能、减轻肠源性内毒素血症,继而起到护肝的作用。

参考文献

- [1] Schwartz J M, Reinus J F. Prevalence and natural history of alcoholic liver disease [J]. Clin Liver Dis 2012, 16(4): 659-66.
- [2] Fan J G. Epidemiology of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease in China [J]. Gastroenterol Hepatol 2013, 28 Suppl 1: 11-7.
- [3] 王军伟, 陈伟民, 朱玮华. 乌药对大鼠急性酒精性肝损伤保护作用的实验研究[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2012, 7(12): 1139-41.
- [4] Gao B, Jeong W I, Tian Z. Liver: an organ with predominant innate immunity [J]. Hepatology 2008, 47(2): 729-36.
- [5] 丁晓东. 酒精性肝病肝损伤的信号通路[J]. 肝脏, 2012, 17(4): 269-71.

(下转第1780页)

The expression level of peripheral blood IL-12 and IL-17 and their correlation in patients with ankylosing spondylitis

Zhang Li¹, Wang Li², Li Jianping¹, et al

(¹Anhui Medical Genetics Center in Anhui Medical College, Hefei 230061;

²Dept of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To detect serum IL-12, IL-17 levels and their mRNA levels in AS patients and to explore the role of them in the pathogenesis of AS. **Methods** ELISA and RT-qPCR were performed to measure the levels of IL-12 and IL-17 in the serum and the mRNA in PBMCs, respectively, of 45 AS patients and 45 healthy controls. **Results** Compared with the controls, AS patients' serum IL-12, IL-17 levels were significantly elevated ($P < 0.05$); as the same, AS patient' IL-12 mRNA, IL-17 mRNA levels were significantly elevated compared with the controls ($P < 0.05$). Moreover, serum IL-12 level and IL-12 mRNA level both were positive correlated with serum IL-17 level and IL-17 mRNA level, respectively. **Conclusion** Our results indicate that in AS patient' IL-12 and IL-17 are correlated cytokine, and they may play critical roles in the pathogenesis of AS.

Key words IL-12; IL-17; ankylosing spondylitis; serum levels; mRNA levels

(上接第 1775 页)

[6] Valen G, Yan Z Q, Hansson G K. Nuclear factor kappa-B and the heart[J]. *J Am Coll Cardiol* 2001, 38(2): 307-14.

[7] Wright G, Singn I S, Hasday J D, et al. Endotoxin stress-response in cardiomyocytes: NF- κ B activation and tumor necrosis factor- α expression[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002, 282(3): H872-9.

[8] 龚时贤, 竹剑平. 乌药促进胃肠运动的临床效果观察[J]. *浙江临床医学* 2008, 10(3): 323.

[9] 好桂新, 王峥涛, 徐珞珊, 等. 乌药的化学成分及药理作用[J]. *中国野生植物资源* 1999, 18(3): 5-10.

[10] 郭建生, 聂子文, 张猛, 等. 乌药提取物对豚鼠离体回肠的影响[J]. *时珍国医国药* 2012, 23(1): 56-8.

Protective effects of linderæ on alcoholic-induced acute liver injury in SD rats

Tan Mingming^{1,2}, Zhang Hong¹, Wang Junwei²

(¹Dept of Emergency, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²Dept of Emergency, Tiantai People's Hospital, Tiantai 317200)

Abstract Objective To study the effects of linderæ on alcoholic-induced acute liver injury in SD rats. **Methods** Forty SD rats were randomly divided into normal group, model group, biphenyl double ester group and radix linderæ group. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) were detected with routine laboratory methods using an autoanalyzer. Histopathological changes were assessed by HE. The activities of superoxidodismutase (SOD) and the level of malondialdehyde (MDA) in liver homogenates were measured by spectrophotometry. The expression of interleukin-1 β (IL-1 β), nuclear factor- κ B (NF- κ B), and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the liver were analyzed by immunohistochemistry. **Results** Compared with the normal group, the levels of serum ALT, AST in rats treated with radix linderæ were significantly decreased. The activity of serum and liver tissue SOD was significantly increased. Furthermore, the levels of IL-1 β , NF- κ B and TNF- α were significantly decreased after treatment with radix linderæ ($P < 0.05$). **Conclusion** The results of our study indicate that extracts from radix linderæ alleviate alcoholic liver injury, in part maybe by improving the SOD activity of liver tissue and by increasing the antioxidant capacity. Meanwhile, the ability of linderæ to reduce proinflammatory cytokine has a direct protective effect on hepatocytes.

Key words linderæ; alcoholic-induced liver injury; protection mechanism