

- 研究[J]. 广东药学院学报, 2005, 21(3): 290-291, 294.
- [4] 黎敬波, 葛金文. 胃溃疡胃实寒、实热证模型大鼠经穴辐射热、pH 值、氧分压的检测研究[J]. 湖南中医学院学报, 1998, 18(3): 56-57.
- [5] 聂子文, 郭建生, 陈君, 等. 乌药提取物对胃实寒模型大鼠cAMP, cGMP, GAS, MTL 水平的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 162-165.
- [6] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 1122.
- [7] 李仪奎. “四气”实质的本质属性问题探讨[J]. 时珍国医国药, 1993, 4(3): 4-6.
- [8] Siggins GH, Haffer JH, Bloom FE. Cyclic adenosine monophosphate: possible mediator for norepinephrine effects on cerebellar purkinje cells [J]. Science, 1969, 165: 1018.
- [9] 郭宏伟, 邓家刚, 郑作文, 等. 平性药对 LPS 所致淤热互结证大鼠微循环的影响[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 838-839.
- (编辑: 宋威)

吴茱萸致大鼠和小鼠肝损伤血清酶生物标志物变化的研究

周璐, 徐婷婷, 金若敏, 乔靖怡, 姚广涛(上海中医药大学药物安全评价研究中心, 上海 201203)

摘要: 目的 探索酶学生物标志物精氨酸酶 I (Arginase I, Arg I)、 α -谷胱甘肽 S 转移酶(α -glutathione-S-transferase, α -GST)、谷胱苷肽脱氢酶(Glutamic dehydrogenase, GLDH)和嘌呤核苷磷酸酶(purine nucleoside phosphorlyase, PNP) 作为吴茱萸致肝损伤早期敏感指标的可能性。方法 取 KM 小鼠, 随机分为正常组和吴茱萸组, 吴茱萸组连续 28 d 灌胃给予吴茱萸 $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 正常组灌服等体积蒸馏水; 取 Wistar 大鼠, 随机分为正常组和吴茱萸组, 吴茱萸组连续 28 d 灌胃给予吴茱萸 $20 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 正常组灌服等体积蒸馏水, 各组均于给药后不同时间点取血及肝组织。全自动生化分析仪检测动物血清生化指标: 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和总胆红素(TB)含量, ELISA 法检测血清中 Arg I、 α -GST、GLDH 和 PNP 的含量。HE 染色, 光镜观察肝组织病理形态学变化。结果 小鼠实验中, 与同时间点对照组相比, 吴茱萸组 ALT 于给药 21 d 和 28 d 显著性升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 肝组织形态学检查仅见个别小鼠的肝细胞坏死。吴茱萸组血清生物标志物 Arg I、 α -GST 和 PNP 于 7 d 起明显升高, GLDH 于 14 d 起明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 均持续至 28 d。大鼠实验中, 与同时间点正常组比较, 吴茱萸组常规生化指标均无明显变化, 肝组织形态学检查仅极少数动物见肝细胞坏死, 吴茱萸组血清生物标志物 Arg I、GLDH 和 PNP 于 7 d 起明显升高, α -GST 于 14 d 起明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 均持续至 28 d。结论 血清 Arg I、 α -GST、GLDH 和 PNP 可作为吴茱萸致肝损伤的早期敏感酶学生物标志物。

关键词: 吴茱萸; 大鼠; 小鼠; 肝损伤; 生物标志物

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)04-0418-06

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.008

Research on Changes of Serum Enzyme Biomarkers in Mice and Rats with Liver Injury Caused by Fructus Euodiae

ZHOU Lu, XU Tingting, JIN Ruomin, QIAO Jingyi, YAO Guangtao (Drug Safety Evaluation Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

收稿日期: 2014-02-14

作者简介: 周璐, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理毒理学。Email: zhoulu4310@163.com。通讯作者: 金若敏, 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药新药及其安全性评价。Email: rmj801@126.com。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2009CB522807); 国家科技重大专项项目 (2009ZX09502-002); 国家科技重大专项课题 (2011ZX09301-009)。

Abstract: Objective To investigate the possibility of taking serum enzyme biomarkers of arginase I (Arg I), α -glutathione-S-transferase (α -GST), glutamic dehydrogenase (GLDH) and purine nucleoside phosphorlyase (PNP) as the early sensitive indexes of liver injury caused by the decoction of Fructus Euodiae. **Methods** KM mice were randomly divided into Fructus Euodiae group and normal control group, which were administrated respectively with Euodiae Fructus decoction at the dose of 30g crude drug/kg daily or equal volume of distilled water by gavage for consecutive 28 days. At the same time, Wistar rats were also randomly divided into Fructus Euodiae group and normal control group, which were administrated respectively with Euodiae Fructus decoction at the dose of 20 g crude drug/kg daily or equal volume of distilled water by gavage for consecutive 28 days. Blood samples and liver tissue were taken from the mice and rats at different time points. The activities of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and the concentration of total bilirubin (TB) were determined by automatic biochemical analyzer. The contents of serum Arg-1, α -GST, GLDH and PNP were detected by ELISA. Liver tissue was stained by HE, and then the hepatic pathological changes were observed under light microscope. **Results** In mice experiment, the activity of ALT was significantly increased on day 21 and 28 ($P < 0.01$ compared with that in the control group) in Fructus Euodiae group. Histological examination showed that few mice developed into focal liver cell necrosis. The contents of serum Arg-1, α -GST and PNP were increased obviously from day 7 and the content of serum GLDH was increased obviously from day 14 in Fructus Euodiae group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the changes of Arg-1, α -GST, GLDH and PNP continued till day 28. In rat experiment, the activities of ALT, AST and the concentration of TB showed no obvious changes. Focal liver cell necrosis could be observed occasionally in the liver tissue. The contents of serum Arg-1, GLDH and PNP were increased obviously from day 7 and the content of serum α -GST was increased obviously from day 14 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) till day 28 in Fructus Euodiae group. **Conclusion** Serum Arg I, α -GST, GLDH and PNP might be used as the early sensitive biomarkers of the liver injury caused by Euodiae Fructus.

Keywords: Fructus Euodiae; Rats; Mice; Liver injury; Biomarkers

吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 的干燥近成熟果实, 其性味辛、苦, 热, 有小毒, 用途广泛^[1]。临床上曾有报道患者服用过量吴茱萸后, 出现腹痛、呕吐等不良反应^[2-3], 近年来, 有研究显示吴茱萸可引起大、小鼠肝毒性^[4-6]。本研究观察了吴茱萸致小鼠和大鼠肝损伤中血清生物标志物, 如: 精氨酸酶 I (Arginase I, Arg I)、 α -谷胱甘肽 S 转移酶 (α -glutathione-S-transferase, α -GST) 等的变化, 并与常规血液生化指标、肝组织病理学的改变进行了比较研究, 探讨生物标志物作为吴茱萸致肝损伤的早期指标, 为早期监测吴茱萸致肝损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物 KM 小鼠, 清洁级, 16~18 g, 合格证号: SCXK(沪)2010-0002; Wistar 大鼠, 清洁级, 100~

120 g, 动物合格证号: SCXK(沪)2008-0016, 均由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 雌雄各半, 动物饲养期间自由饮水、摄食, 室温 20℃~25℃, 湿度 40%~70%。

1.2 药物 吴茱萸, 四川新荷花中药饮片有限公司提供, 产地江西, 批号: 1008295。经本校李西林教授鉴定为芸香科植物吴茱萸 *Euodia rutaecarpa* (Juss.) Benth. 干燥近成熟果实。参照 2010 版《中国药典》吴茱萸的含量测定方法, 检测得药材中吴茱萸的碱和吴茱萸次碱总量为 6%, 柠檬苦素总量为 28%, 符合《中国药典》标准。取吴茱萸, 加 10 倍量蒸馏水浸泡 2 h, 水煎 2 次, 每次先以武火煮沸, 再以文火煮 30 min, 纱布过滤, 合并 2 次滤液, 浓缩至含生药量为 2 g·mL⁻¹, 4℃保存, 临用前以蒸馏水配制所需浓度。

1.3 试剂 丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 试剂盒, R1 批

号: J922, R2 批号: J917; 天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 试剂盒, R1 批号: L923, R2 批号: J93; 总胆红素 (TB) 试剂盒, R1 批号: KM674, R2 批号: KH308, 以上生化试剂均购自上海日和贸易有限公司。 α -GST、Arg I、GLDH 和 PNP ELISA 试剂盒, 批号: 201207, 均购自上海达为科生物科技有限公司。

1.4 仪器 日立 7080 全自动生化分析仪, 日本 HITACHI 公司; 318C 酶标仪, 上海三科仪器有限公司; BX51 正置显微镜, 日本奥林巴斯光学株式会社。

1.5 分组及给药 取小鼠 100 只, 随机分为正常组、吴茱萸组, 每组 50 只, 雌雄各半。给药组给予吴茱萸 $30 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 正常组给予等体积蒸馏水 $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 灌胃给药, 每天 1 次, 连续 28 d, 各组分别于给药后 3, 7, 14, 21, 28 d 处死 10 只动物, 雌雄各半。小鼠摘眼球取血。取肝组织放于 10% 福尔马林中固定, HE 染色, 光学显微镜下观察组织形态。

取大鼠 16 只, 随机分为正常组、吴茱萸组, 每组 8 只, 雌雄各半。给药组给予吴茱萸 $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 正常组给予等体积蒸馏水 $20 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$, 灌胃给药, 每天 1 次, 连续 28 d, 各组分别于给药后 3, 7, 14, 21, 28 d 大鼠眼眦后静脉丛取血, 28 d 时动物腹主动脉取血, 取肝组织放于 10% 福尔马林中固定, HE 染色, 光学显微镜下观察组织形态。

1.6 血液生化指标的检测 动物血液以 $5000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 分离血清。采用生化分析仪检测生化指标 ALT、AST、TB 含量; 采用酶联免疫吸附测定 ELISA 法, 检测血清中 α -GST、Arg I、GLDH 和 PNP 的含量。

1.7 肝组织形态学的检查 对肝组织形态进行病理分级、积分。分级标准^[7]: (-) 肝组织结构正常; (+) 肝小叶结构尚正常, 但有明显的混浊肿胀、气球样变或脂肪变性, 散在点状坏死; (++) 肝小叶结构不清, 有明显的灶状坏死, 伴有炎症细胞浸润; (+++) 肝小叶结构不清、有明显的片状坏死, 伴有炎症细胞浸润; (+++++) 肝小叶中央存在弥漫性坏死细胞, 层次较多, 并伴有炎症细胞浸润; 上述分级分别记为 0~4 分。

1.8 统计学处理方法 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示数据结果。两组间比较采用 *t* 检验, 等级资料进行秩转换的非

参数检验, 以 *Radit* 分析比较两组间病理损伤程度的差异。

2 结果

2.1 吴茱萸致小鼠肝损伤

2.1.1 对血清生化指标的影响 与同时间点正常组比较, 吴茱萸组血清 ALT 在 21、28 d 时均显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), AST、TB 无明显变化, 见表 1。

表 1 吴茱萸对小鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effect of Fructus Euodiae on serum biochemical indicators in mice

| 组别 | 时间/d | 剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | ALT/ $\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$ | AST/ $\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$ | TB/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|------|------|-----------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| 正常组 | 3 | - | 34.00 ± 9.72 | 136.50 ± 27.99 | 3.56 ± 0.27 |
| 吴茱萸组 | 30 | | 31.58 ± 10.98 | 131.75 ± 34.10 | 3.04 ± 0.17 |
| 正常组 | 7 | - | 30.33 ± 10.56 | 128.83 ± 37.77 | 3.43 ± 0.28 |
| 吴茱萸组 | 30 | | 44.50 ± 20.19 | 131.33 ± 37.38 | 3.03 ± 0.21 |
| 正常组 | 14 | - | 29.25 ± 8.99 | 108.00 ± 16.19 | 0.52 ± 0.22 |
| 吴茱萸组 | 30 | | 40.73 ± 16.26 | 130.00 ± 25.3 | 0.06 ± 0.17 |
| 正常组 | 21 | - | 23.33 ± 3.65 | 107.92 ± 9.76 | 1.01 ± 0.51 |
| 吴茱萸组 | 30 | | $46.27 \pm 20.93^{**}$ | 123.82 ± 24.71 | 0.50 ± 0.46 |
| 正常组 | 28 | - | 30.00 ± 13.20 | 114.27 ± 29.92 | 0.97 ± 0.47 |
| 吴茱萸组 | 30 | | $60.90 \pm 48.04^*$ | 130.70 ± 54.00 | 0.54 ± 0.36 |

注: 与同时间点正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.1.2 对肝组织形态学的影响 与正常组比较, 28 d 吴茱萸组有极个别小鼠出现肝细胞多发小灶性坏死。见表 2。

表 2 吴茱萸 28 d 对小鼠肝脏组织形态学的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 2 Effect of Fructus Euodiae on the liver histopathology on day 28 in mice

| 组别 | 剂量/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 病变程度 | | | | | 合计 |
|------|-----------------------------------|------|---|----|-----|------|----|
| | | - | + | ++ | +++ | ++++ | |
| 正常组 | - | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 |
| 吴茱萸组 | 30 | 8 | 2 | 0 | 0 | 0 | 10 |

2.1.3 对血清生物标志物的影响 与正常组比较, 吴茱萸组血清 PNP、 α -GST 和 Arg I 于 7 d 起明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 血清 GLDH 于 14 d 明显升高 ($P < 0.01$), 各指标均持续至 28 d, 见表 3。

2.2 吴茱萸致大鼠肝损伤

2.2.1 对血清生化指标的影响 与正常组比较, 在给药期间, 吴茱萸对大鼠血清 ALT、AST 和 TB 均无明显影响, 仅见 AST 在 14、28 d 时略有变化, 见表 4。

2.2.2 对肝组织形态学的影响 正常组大鼠肝细胞未见明显变性坏死, 吴茱萸组给药后 28 d 极个别大鼠

表 3 吴茱萸对小鼠血清 α -GST、PNP、Arg I 和 GLDH 的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Effect of Fructus Euodiae on the contents of serum α -GST, PNP, Arg I and GLDH in mice

| 组别 | 时间/d | 剂量/g·kg ⁻¹ | α -GST/mIU·L ⁻¹ | PNP/U·L ⁻¹ | Arg I/U·L ⁻¹ | GLDH/U·L ⁻¹ |
|------|------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| 正常组 | 3 | - | 208.81 ± 14.81 | 15.02 ± 1.49 | 3.45 ± 0.2 | 0.78 ± 0.07 |
| 吴茱萸组 | 30 | | 216.74 ± 19.91 | 16.62 ± 1.89 | 3.60 ± 0.22 | 0.82 ± 0.171 |
| 正常组 | 7 | - | 199.11 ± 12.66 | 15.17 ± 1.81 | 3.45 ± 0.22 | 0.77 ± 0.057 |
| 吴茱萸组 | 30 | | 239.25 ± 18.31** | 17.23 ± 1.32* | 4.40 ± 0.19** | 0.83 ± 0.093 |
| 正常组 | 14 | - | 204.68 ± 24.18 | 15.17 ± 1.50 | 3.28 ± 0.13 | 0.79 ± 0.069 |
| 吴茱萸组 | 30 | | 249.94 ± 15.3** | 20.72 ± 0.96** | 4.60 ± 0.33** | 0.93 ± 0.067** |
| 正常组 | 21 | - | 202.81 ± 16.84 | 16.35 ± 1.97 | 3.21 ± 0.29 | 0.81 ± 0.059 |
| 吴茱萸组 | 30 | | 264.57 ± 20.21** | 23.1 ± 1.59** | 5.61 ± 0.40** | 1.07 ± 0.057** |
| 正常组 | 28 | - | 201.31 ± 10.32 | 14.91 ± 1.59 | 3.21 ± 0.18 | 0.79 ± 0.056 |
| 吴茱萸组 | 30 | | 291.72 ± 16.36** | 23.92 ± 1.59** | 5.79 ± 0.29** | 1.11 ± 0.06** |

注: 与同时段正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表 4 吴茱萸对大鼠血清生化指标的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Effect of Fructus Euodiae on serum biochemical indicators in rats

| 组别 | 时间/d | 剂量/g·kg ⁻¹ | ALT/U·L ⁻¹ | AST/U·L ⁻¹ | TB/ μ mol·L ⁻¹ |
|------|------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|
| 正常组 | 1 | - | 49.33 ± 3.78 | 123.00 ± 18.74 | 0.43 ± 0.20 |
| 吴茱萸组 | 20 | | 48.50 ± 11.67 | 128.67 ± 30.09 | 0.34 ± 0.21 |
| 正常组 | 7 | - | 54.88 ± 8.08 | 217.63 ± 27.9 | 0.55 ± 0.18 |
| 吴茱萸组 | 20 | | 38.50 ± 3.85 | 211.88 ± 19.53 | 0.28 ± 0.29 |
| 正常组 | 14 | - | 56.50 ± 9.43 | 163.13 ± 31.39 | 0.68 ± 0.20 |
| 吴茱萸组 | 20 | | 35.63 ± 5.07 | 146.00 ± 14.48* | 0.72 ± 0.36 |
| 正常组 | 21 | - | 55.88 ± 8.61 | 199.00 ± 35.1 | 0.57 ± 0.33 |
| 吴茱萸组 | 20 | | 35.75 ± 3.81 | 222.00 ± 44.23 | 1.07 ± 0.29 |
| 正常组 | 28 | - | 49.50 ± 4.21 | 204.13 ± 42.02 | 0.85 ± 0.47 |
| 吴茱萸组 | 20 | | 30.25 ± 3.69 | 152.75 ± 11.82* | 1.05 ± 0.10 |

注: 与同时点正常组比较, * $P < 0.05$ 。

出现一定程度的肝细胞坏死和炎症细胞浸润现象, 见表 5。

表 5 吴茱萸 28 d 对大鼠肝脏组织形态学的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 Effect of Fructus Euodiae on the liver histopathology on day 28 in rats

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 病变程度 | | | | | 合计 |
|------|-----------------------|------|---|----|-----|------|----|
| | | - | + | ++ | +++ | ++++ | |
| 正常组 | - | 8 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 |
| 吴茱萸组 | 20 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 8 |

2.2.3 对大鼠血清生物标志物的影响 与正常组比较, 吴茱萸组血清 PNP、Arg I 和 GLDH 于 7 d 起明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 血清 α -GST 于 14 d 起明显升高 ($P < 0.05$), 各指标均持续至 28 d, 见表 6。

表 6 吴茱萸对大鼠血清 α -GST、PNP、Arg I 和 GLDH 的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 6 Effect of Fructus Euodiae on the contents of serum α -GST, PNP, Arg I and GLDH in rats

| 组别 | 时间/d | 剂量/g·kg ⁻¹ | α -GST/mIU·L ⁻¹ | PNP/U·L ⁻¹ | Arg I/U·L ⁻¹ | GLDH/U·L ⁻¹ |
|------|------|-----------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------|------------------------|
| 正常组 | 1 | - | 315.69 ± 24.33 | 26.56 ± 2.24 | 3.28 ± 0.15 | 1.24 ± 0.063 |
| 吴茱萸组 | 20 | | 327.19 ± 21.23 | 27.82 ± 0.66 | 3.25 ± 0.11 | 1.17 ± 0.067 |
| 正常组 | 7 | - | 325.21 ± 8.63 | 26.52 ± 1.64 | 3.20 ± 0.14 | 1.21 ± 0.051 |
| 吴茱萸组 | 20 | | 339.26 ± 13.97 | 28.64 ± 1.12* | 3.37 ± 0.09* | 1.31 ± 0.057** |
| 正常组 | 14 | - | 326.31 ± 32.33 | 25.96 ± 1.65 | 3.26 ± 0.11 | 1.21 ± 0.044 |
| 吴茱萸组 | 20 | | 355.14 ± 27.29* | 27.92 ± 1.65 | 3.58 ± 0.15** | 1.36 ± 0.05** |
| 正常组 | 21 | - | 324.09 ± 22.57 | 26.33 ± 1.84 | 3.19 ± 0.15 | 1.21 ± 0.044 |
| 吴茱萸组 | 20 | | 357.67 ± 23.88* | 28.46 ± 1.52 | 3.72 ± 0.11** | 1.42 ± 0.062** |
| 正常组 | 28 | - | 330.94 ± 18.07 | 26.47 ± 1.32 | 3.27 ± 0.16 | 1.22 ± 0.062 |
| 吴茱萸组 | 20 | | 363.15 ± 22.44* | 30.46 ± 1.5** | 3.81 ± 0.16* | 1.43 ± 0.053** |

注: 与同时点正常组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

目前, 肝功能的评价指标 ALT、AST 及 TB 在临床诊断中具有较高的灵敏度, 但也有研究显示这些指标在敏感性、特异性方面存在一定的缺陷, 如 ALT、AST, 在骨骼肌中均有分布, 当骨骼肌受损时, 血清 ALT、AST 水平也会升高, 会产生假阳性肝损伤的结果^[8-11]。国外有文献^[12]报道 PNP、 α -GST、GLDH 和 Arg I 等酶学指标在临床或者动物实验中比常规肝功能指标表现出更大的敏感性, 提示可以作为肝损伤的早期生物标志物。

在哺乳动物中, PNP 主要位于血管内皮细胞和肝细胞的细胞质中, 在肝脏坏死时释放到肝血窦中。研究发现, 大鼠给予半乳糖胺后能引起血清 PNP 增加^[13], 大鼠给予内毒素引起细胞坏死实验中, 血清 PNP 升高出现的时间要早于 ALT^[14]。Arg I 以肝脏分布最多, 其他依次为心、脾、脑、肌肉等。Arg I 主要位于肝细胞核和微粒体中, 当这些位点受到损伤时, 血清中 Arg I 的活性迅速上升, 故其肝脏特异性要高于常规的血清生化指标^[15-16]。 α -GST 功能是参与肝脏的解毒, 当肝细胞受损时很容易透过细胞膜入血, 而 ALT、AST 主要分布在肝门静脉周围, 因此, 与 ALT、AST 比较, 能够较早被检测到。此外, 由于 α -GST 在肝脏中分布均匀, 当肝小叶中心细胞出现损伤、坏死, ALT、AST 无明显改变时, α -GST 已有升高的变化^[17-19]。GLDH 是细胞线粒体酶, 主要分布在肝脏、肠、心等, 以肝脏分布最多。GLDH 在肝脏中主要分布在肝小叶的中心部, 在中央静脉周

围的肝细胞中活性最高,是周边细胞的1.8倍。肝窦状隙供给路线的末端是缺氧的高危地带,如果血流受阻,肝细胞损伤是最先发生部位,因此,GLDH可作为肝细胞损伤的主要标志物^[20]。

前期实验表明,大剂量吴茱萸($50\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)能引起小鼠肝损伤,表现为ALT、AST升高,肝组织病理学改变^[5]。本课题组从探寻肝损伤的早期指标为出发点,选用吴茱萸致轻度肝损伤的剂量进行实验,结果表明,小鼠28d的生化指标中ALT明显升高的动物占40%,组织病理学变化的占20%,表明 $30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 吴茱萸能致小鼠轻度肝损伤。而采用与小鼠近似等效剂量时,吴茱萸致大鼠肝损伤程度没有小鼠的严重。

在此基础上,通过筛选不同的肝损伤酶学生物标志物后发现,与对应时间点的正常组比较,吴茱萸组大、小鼠的Arg I和PNP均于第7天起明显升高,尽管小鼠 α -GST升高时间早于大鼠,而GLDH升高时间晚于大鼠,显示出虽有动物种属差异,但均早于常规生化与病理学变化,提示与常规生化指标ALT、AST和病理学变化相比,血清 α -GST、Arg I、GLDH和PNP 4项指标的变化具有敏感性和早期性。

实验表明,不同种属动物存在一定的差异,两者在剂量上表现差异,而在毒性表现及主要指标上仍是相同的反应,这种现象与对乙酰氨基酚毒性对小鼠敏感,对大鼠相对不敏感的结果一致^[21-22],临床上对乙酰氨基酚引起的肝损伤是其主要不良反应之一。因此,本实验结果提示,临床大剂量使用吴茱萸应注意对肝脏的影响。中药复方是由多味中药组成,药物在毒性方面也有可能产生潜在的毒性叠加而使毒性加强。本实验采用早期生物标志物检测的方法,能在较短的时间发现药物的毒性,适应国际新药研发的新趋势,有利于降低研发风险。在临床上,检测上述生物标志物指标,同时结合常规生化指标,可早期监测和诊断吴茱萸引起的潜在肝损伤,为临床安全用药提供实验依据。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 160.
- [2] 蔡雪映, 孟楠, 杨冰. 服用吴茱萸过量致中毒1例分析[J]. 北京中医, 2006, 25(3): 171-172.
- [3] 吴春林. 附子配伍吴茱萸致中毒1例[J]. 山西中医, 1996, 12(2): 27-28.
- [4] 黄伟, 赵燕, 孙蓉. 吴茱萸不同组分对小鼠急性毒性试验比较研究[J]. 中国药物警戒, 2010, 7(3): 129-134.
- [5] 周绮, 张茜, 金若敏. 吴茱萸致小鼠肝毒性时效、量效关系研究[J]. 中国实验方剂学, 2011, 17(9): 232-235.
- [6] 李莉, 赵军宁, 鄢良春, 等. 吴茱萸水提取物对大鼠的长期毒性试验[J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 93-96.
- [7] 何桂霞, 李玲, 肖锦仁, 等. 藤茶总黄酮对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 湖南中医学院学报, 2004, 24(4): 7.
- [8] Kumar M, Sarin SK, Hissar S, et al. Virologic and histologic features of chronic hepatitis B virus-infected asymptomatic patients with persistently normal ALT[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(5): 1376-1384.
- [9] Halkes S, van den Berg A, Hoekstra M, et al. Transaminase and alkaline phosphatase activity in the serum of burn patients treated with highly purified tannic acid[J]. *Burns*, 2002, 28(5): 449-453.
- [10] Malinoski FJ. Strenuous exercise simulating hepatic injury during vaccine trials[J]. *Vaccine*, 1992, 10(1): 39-42.
- [11] Miyazaki M, Rosenblum JS, Kasahara Y, et al. Determination of enzymatic source of alanine amino transferase activity in serum from dogs with liver injury[J]. *Pharmacol Toxicol Methods*, 2009, 60(3): 307-315.
- [12] Nelson DR, Lim HL, Oliver D, et al. alpha-Glutathione S-transferase as a marker of hepatocellular damage in chronic hepatitis C virus infection[J]. *Am J Clin Pathol*, 1995, 104(2): 193-198.
- [13] Ohuchi T, Tada K, Akamatsu K. Endogenous ET-1 contributes to liver injury induced by galactosamine and endotoxin in isolated perfused rat liver [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(6): G997-1003.
- [14] Misram K, Khannaa K, Sharna R, et al. Serum malatedehydrogenase (MDH) in portal hypertension: its value as a diagnostic and prognostic indicator[J]. *Indian J Med Sci*, 1991, 45(2): 31-34.
- [15] Murayama H, Ikemoto M, Fukuda Y, et al. Advantage of serum type-I arginase and ornithine carbamoyltransferase in the evaluation of acute and chronic liver damage induced by thioacetamide in rats[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 375(1/2): 63-68.
- [16] Ashamiss F, Wierzbicki Z, Chrzanowska A, et al. Clinical significance of arginase after liver transplantation[J]. *Ann Transplant*, 2004, 9(3): 58-60.
- [17] Ray DC, Robbins AG, Howie AF, et al. Effect of spinal anaesthesia on plasma concentrations of glutathione S-transferase[J]. *Br J Anaesth*, 2002, 88(2): 285-287.
- [18] Giffen PS, Pick CR, Price MA, et al. Alpha-glutathione S-transferase in the assessment of hepatotoxicity--its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat[J]. *Toxicol Pathol*, 2002, 30(3): 365-372.
- [19] Chouk é r A, Martignoni A, Schauer RJ, et al. Alpha-glutathione S-transferase as an early marker of hepatic ischemia/reperfusion injury after liver resection[J]. *World J Surg*, 2005, 29(4): 528-534.

- [20] O'Brien J, Slaughter R, Polleysr, et al. Advantages of glutamate dehydrogenase as a blood biomarker of acute hepatic injury in rats[J]. *Lab Anim*, 2002, 36(3): 313-321.
- [21] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1348.
- [22] Liu J, Sato C, Marumo F. Characterization of the acetaminophen-glutathione conjugation reaction by liver microsomes: species difference in the effects of acetone[J]. *Toxicol Lett*, 1991, 56(3): 269-274.

(编辑: 宋威)

黄芩苷对 AcLDL+LPS 诱导的与动脉粥样硬化相关巨噬细胞凋亡的影响

彭锐¹, 吴伟¹, 余榕键², 林梓浩², 古淑芳², 吴辉¹, 李荣¹(1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东广州 510405; 2. 广州中医药大学, 广东广州 510006)

摘要: **目的** 从 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK) 信号通路研究黄芩苷对乙酰化低密度脂蛋白 (acetylate low-density lipoprotein, AcLDL) 联合脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的与动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 相关巨噬细胞凋亡的影响。**方法** 收集小鼠腹腔巨噬细胞 RAW 264.7 进行体外培养, 以 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 AcLDL 及 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 LPS 诱导巨噬细胞凋亡作为模型组, 用黄芩苷低、中、高剂量组 (120, 240, 480 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 进行干预, Annexin-V 和 PI 双染后用流式细胞仪检测细胞凋亡, Western-blot 技术检测 JNK 蛋白表达及实时荧光定量 PCR 技术检测 JNK mRNA 表达。**结果** AcLDL 对照组、LPS 对照组、AcLDL+LPS 模型组与正常组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), Ac-LDL+LPS 模型组细胞凋亡率明显高于正常组。黄芩苷中、高剂量组细胞凋亡率明显高于 AcLDL+LPS 模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。AcLDL+LPS 联合干预较 AcLDL 或 LPS 单独干预引起的磷酸化 JNK 高, 随着黄芩苷干预剂量的增高, 磷酸化 JNK 表达有升高的趋势。**结论** 脂多糖和乙酰化低密度脂蛋白双重打击是诱导巨噬细胞凋亡的重要原因, JNK 信号通路参与这一过程。黄芩苷可能通过增强磷酸化 JNK 表达来促进脂多糖和乙酰化低密度脂蛋白诱导的巨噬细胞早期凋亡, 从而拮抗早期动脉粥样硬化的病理进程。

关键词: 乙酰化低密度脂蛋白; 脂多糖; JNK; 巨噬细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)04-0423-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.04.009

Effect of Baicalin on AcLDL+LPS-induced Macrophages Apoptosis Associated with Atherosclerosis

PENG Rui¹, WU Wei¹, YU Rongjian², LIN Zihao², GU Shufang², WU Hui¹, LI Rong¹(1. The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China; 2. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Objective To study the effect of baicalin on macrophages apoptosis associated with atherosclerosis (AS) induced by acetylated low-density lipoprotein (AcLDL) and lipopolysaccharide (LPS) from the JNK signaling pathway.

Methods Macrophages were harvested from the peritonea of mice, and then 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of AcLDL and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of LPS were used for inducing macrophages apoptosis. After intervention with 120, 240, and 480 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of baicalin, Western blot and quantitative RT-PCR were used to determine the expression of JNK, and the apoptotic rate of macrophages was detected with flow cytometry (FCM) after the staining of Annexin-V and PI. **Results** The apoptotic

收稿日期: 2014-01-13

作者简介: 彭锐, 男, 主治医师, 研究方向: 动脉粥样硬化的发生机理。Email: tcmalex@hotmail.com。

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (s2012010008193)。