



中药复方降酶合剂对大鼠肝脏细胞因子调节的实验研究

近年来,许多研究表明,慢性肝炎患者尤其是慢性活动性肝炎和重型肝炎的患者,其血清和肝组织中的IL-6、IL-8和TNF- α 水平显著增高,在肝脏的免疫病理损害中起着重要的作用[1][2]。在以往的研究中,我们发现以清热祛湿解毒等中药为主的降酶合剂具有明显降低慢性肝炎患者转氨酶的作用[3]。本实验复制D-氨基半乳糖致急性肝损伤模型及利用血清药理学方法制备SD大鼠降酶合剂和联苯双酯的含药血清,观察了中药降酶合剂对血清细胞因子分泌水平,以及经内毒素(LPS)刺激体外培养的枯否细胞上清中IL-6、IL-8和TNF- α 水平的变化,旨在阐明降酶合剂保护肝脏,降低转氨酶的作用机理。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 实验动物 58只SD大鼠,体质量180~220 g,雌雄不拘(由第一军医大学实验动物中心提供)。

1.1.2 主要试剂 PRMI 1640、胎牛血清、I型胶原酶和LPS(O127:B8)均购自SIGMA公司,IL-6、IL-8和TNF- α 夹心ELISA试剂盒购自第四军医大学免疫学教研室。

1.1.3 主要仪器 Heraeus PEW-B 2.1型CO₂培养箱,德国Heraeus公司生产,80-II型离心机,上海手术器械厂生产,Leica MPS 30相差倒置显微镜,德国Leica公司生产,Bio-rad 550型酶标仪,美国伯乐公司生产。

1.1.4 药物 降酶合剂由龙胆草、猪苓、白术、泽泻、赤芍、茯苓、甘草等组成,由广东省高明市中医院制剂室生产,批号20000303。用前浓缩成每毫升含生药1 000 mg,置4℃冰箱中保存备用。

联苯双酯滴丸由广州星群药业有限公司生产,1.5 mg/丸,临用前生理盐水稀释成0.4 mg/ml,置4℃冰箱中保存。

1.2 方法

1.2.1 模型复制 SD大鼠40只,体质量180~220 g,完全随机法分为4组,每组10只。(1)正常对照组;(2)模型对照组;(3)降酶合剂组;(4)联苯双酯组。除第(1)组外,其他3组动物均同时一次性腹腔注射10%D-氨基半乳糖液(2 g/kg·b.w.),1 h后灌胃给药,以后每12 h灌胃给药1次,并于造模后第3天处死动物,眼眶放血,分离血清作有关检测。

1.2.2 含药血清的制备 SD大鼠18只,雌雄不拘,体质量200~250 g,随机分为3组。分别予以降酶合剂2 ml,联苯双酯2 ml和生理盐水2 ml灌胃,每天2次,连续7 d。最后一次灌胃(灌药前禁食不禁水12 h)1 h后,1%戊巴比妥钠(40 mg/kg·b.w.)腹腔麻醉,腹主动脉采血,3 000 r/min,离心20 min,分离血清,经56℃,30 min水浴后,0.45 μ m微孔滤膜过滤除菌,得到降酶合剂含药血清、联苯双酯含药血清和空白对照血清,于-20℃保存备用。

1.2.3 肝枯否细胞(KC)分离与培养 参照张文海[4]等介绍的方法,上述SD大鼠,1%戊巴比妥钠(40 mg/kg·b.w.)腹腔麻醉后,门静脉插管,先灌注0.02%EDTA溶液(预温至37℃),同时于近心脏处剪断下腔静

脉以使灌注液流出，洗尽肝内血液，再经门静脉体外循环灌注0.05% I型胶原酶(预温至37℃)。在灌注时应将肝上方下腔静脉用镊子夹闭，使肝脏膨胀后再放开静脉使液体流出，反复3~5次以达到充分灌注。至肝脏弹力下降后，取下肝脏，剪碎，在37℃水浴中0.05%胶原酶振荡消化10 min后过200目网，滤液倒入离心管中，以2 500 r/min离心10 min，去掉上清，加入RPMI 1640混匀，800 r/min离心2 min，此时上清中主要含有枯否细胞、内皮细胞和小淋巴细胞等。取上清再以2 500 r/min离心10 min，将沉淀以细胞培养基(基础培养基为RPMI 1640，另含15%胎牛血清、15 mmol/L HEPES、15 mmol/L L-谷胺酰胺、青霉素、链霉素各100 U/ml)充分混匀，0.5%台盼蓝染色判断活力，相差显微镜下观察形态，调整细胞浓度为 1×10^6 个/ml后，接种于24孔培养板内，置37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.2.4 加入内毒素和含药血清 细胞培养4 h后换液，去除未贴壁细胞，获得贴壁的枯否细胞。把24孔板分为5组，每组4孔，分别加入 I、空白血清，II、内毒素，III、降酶合剂含药血清，IV、降酶合剂含药血清和内毒素，V、联苯双酯含药血清和内毒素，使培养液与含药血清体积之比为3:1，内毒素的终浓度为100 ng/ml。在37℃、5%CO₂培养箱中共同孵育4 h后，吸取每组各孔培养上清液，0.45 μm微孔滤膜过滤除掉杂质，滤液于-20℃保存备用。

1.2.5 统计学处理 采用美国SPSS8.0统计软件进行完全随机的方差分析，方差分析显著时进行多重比较(SNK法)，方差不齐性时用Tampane's T2法。

2 结果

2.1 急性肝损伤实验

2.1.1 对肝功能的影响 造模后，模型组ALT明显升高；而降酶合剂组和联苯双酯组ALT水平则明显较低(表1)。

表 1 对大鼠 ALT 肝功能的影响($\bar{x} \pm s$, U/L)
Tab.1 Effect of Jiangmeiheji on rat hepatic function
(Mean \pm SD, U/L)

| Group | n | ALT |
|--------------------------|----|-----------------------|
| Control | 10 | 130.01 \pm 21.43 |
| Model | 10 | 235.47 \pm 34.39** |
| Jiangmeiheji | 10 | 175.56 \pm 19.24*** |
| Biphenyldimethylesterate | 10 | 165.49 \pm 27.55*** |

P<0.01 vs control group; *P<0.01 vs model group

2.1.2 对细胞因子的影响 随着动物的急性肝损伤，大鼠血清细胞因子水平明显升高。其中以模型组的升高最为明显，与正常对照组比较，均有显著性意义(P<0.01)(表2)。

表 2 对大鼠血清细胞因子的影响($n=10, \bar{x}\pm s, \mu\text{g/L}$)

Tab.2 Effect of Jiangmeiheji on serum cytokine in rat

($n=10, \text{Mean}\pm\text{SD}, \mu\text{g/L}$)

| Group | IL-6 | IL-8 | TNF- α |
|--------------------------|----------------------------|-------------------|--------------------|
| Control | 0.81 \pm 0.31 | 0.90 \pm 0.24 | 1.09 \pm 0.33 |
| Model | 2.62 \pm 0.76** | 5.73 \pm 2.29** | 7.50 \pm 1.69** |
| Jiangmeiheji | 1.82 \pm 0.65*** | 3.31 \pm 1.49** | 2.29 \pm 0.67** |
| Biphenyldimethylesterate | 2.71 \pm 0.58** Δ | 4.11 \pm 1.40* | 3.32 \pm 0.71*** |

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs model group;

$\Delta P<0.05$ vs Jiangmeiheji group

2.2 肝脏KC分泌细胞因子

2.2.1 枯否细胞的活性和形态 台盼蓝染色提示活细胞占95%以上, 初分离的枯否细胞在相差显微镜下为折光性很强的小圆球, 远小于肝细胞, 约4 h后, 细胞贴壁呈扁圆形, 一部分细胞已开始伸出伪足。

2.2.2 各因素对细胞因子的影响 当加入LPS之后, 培养上清中各细胞因子水平明显升高, 而在只加入降酶合剂含药血清组中, 细胞因子水平虽较空白血清对照组升高, 但没有统计学意义。同时加入LPS和降酶合剂含药血清后, 细胞因子水平与LPS组相比明显下降, 与空白血清组没有显著差异。而在同时加入联苯双酯含药血清与LPS之后, 培养上清中细胞因子水平明显高于空白对照组, 接近LPS组水平, 与降酶合剂血清加LPS组比较有显著性差异。结果见表3。

表 3 各因素对大鼠 KC 培养上清中细胞因子水平的影响

($n=6, \bar{x}\pm s, \mu\text{g/L}$)

Tab.3 Effect of factors on rat cytokine level in KC supernatant

($n=6, \text{Mean}\pm\text{SD}, \mu\text{g/L}$)

| Group | IL-6 | IL-8 | TNF- α |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Serum control | 2.28 \pm 1.83 | 3.78 \pm 2.09 | 2.13 \pm 0.83 |
| LPS | 11.11 \pm 2.03** | 10.60 \pm 0.81** | 4.73 \pm 0.45** |
| Jiangmeiheji serum | 3.99 \pm 1.51** | 4.23 \pm 2.39** Δ | 2.23 \pm 0.21** |
| Jiangmeiheji serum+LPS | 4.17 \pm 2.13** | 5.56 \pm 2.10** Δ | 2.38 \pm 1.06* |
| Biphenyldimethylesterate+LPS | 9.16 \pm 1.75*** Δ | 10.71 \pm 0.56** | 3.91 \pm 0.92** Δ |

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs serum control group; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs LPS

group; $\Delta P<0.05$ vs Jiangmeiheji serum +LPS.

3 讨论

目前已经认识到细胞因子代谢的异常是引起机体病理变化的重要因素, 现已将IL-1、IL-6、IL-8和TNF列入炎症介质的范畴, 证明它们具有强烈的致炎活性, 可引起肝组织的损害。研究表明, 慢性肝炎、重型肝炎和肝硬化患者血清IL-6水平显著增高, 其活性与肝组织炎症和坏死程度相关[5]; 慢性活动性乙型肝炎患者血清和肝组织内IL-8水平也明显增高, 并与肝脏损害指标(如ALT、胆红素等)呈正相关关系[6]。急性甲、乙型肝炎, 慢性乙型肝炎和重型肝炎患者血清和外周血单个核细胞诱生的TNF活性明显增高, 是介导肝损害的重要

炎症介质之一，与乙型肝炎类型、肝损伤程度及病毒复制有密切关系[7]。这可能与慢性肝炎患者体内持续存在肝炎病毒的感染以及肝炎病毒感染后形成的免疫复合物或肠道内革兰氏阴性细菌感染，释放的内毒素入血有关，这些因素均可以刺激单核巨噬细胞、淋巴细胞、成纤维细胞及内皮细胞等产生IL-6、IL-8和TNF。

D-氨基半乳糖是一种肝细胞毒药物，以之造成急性肝损伤，是最为常用的肝损伤动物模型。其主要作用机理为降低三磷酸腺苷，改变尿嘧啶核苷酸代谢，导致肝细胞大分子合成障碍，使肝细胞发生急性损害，引起肝脏组织的炎性细胞浸润及枯否细胞活跃增生，从而成为肝脏内大量生成TNF、IL-6及IL-8产生的基础。另一方面，肝脏急性损伤后所产生的内毒素，亦可以大量诱导细胞因子的产生。因此，通过D-氨基半乳糖损伤的动物模型，来探讨肝脏损害与细胞因子的关系，是合理可行的。本实验随着动物的急性肝损伤，细胞因子分泌水平明显增高，并与转氨酶的增高呈现出明显的正相关性。曾观察到重度慢性乙肝IL-8、TNF- α 含量明显高于轻度及中度慢性乙肝[8]，中度慢性乙肝又高于轻度慢性乙肝；肝功能指标与血清IL-8、TNF- α 浓度呈正相关，提示增高的IL-8、TNF- α 可以促进肝细胞损伤。因此可初步认为肝脏损害与细胞因子之间存在一个互为因果的关系，D-氨基半乳糖导致的肝脏促进细胞因子的释放；而大量的细胞因子又进一步加剧了肝脏的损害。

内毒素是一种炎症细胞因子的强刺激剂。本实验通过内毒素刺激体外培养的枯否细胞模型，发现降酶合剂含药血清能够显著抑制枯否细胞分泌IL-6、IL-8和TNF- α ，使它们降到正常水平附近，而联苯双酯却无此作用。在以前的研究中，我们发现以清热祛湿、活血健脾为法制剂而成的降酶合剂具有降ALT快且远期反跳率低于联苯双酯的特点[3]。结合本次试验结果，我们认为降酶合剂对肝细胞保护作用的重要机制，与其通过对机体免疫功能的调节，降低IL-6、IL-8和TNF- α 等细胞因子的产生和释放有关。

本次实验，加入单纯的含药血清后，肝脏KC细胞分泌细胞因子有一定的上升趋势，但比较缓和，与内毒素刺激后KC细胞的大量分泌有显著性差异，说明中药含药血清可能对KC细胞分泌细胞因子有双向调节作用，即在一般情况下有一定的促进分泌作用，在病理情况下则具有显著抑制作用，其机制尚待进一步的探讨。

参考文献：

- [1] 荆俊杰. 白细胞介素6在肝纤维化中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 1997, 13(4): 177-8.
- [2] 王新, 许才泼, 陈岳祥, 等. 慢性肝病患者血清肿瘤坏死因子- α 与白细胞介素-8水平关系的研究[J]. 临床肝胆病杂志, 1996, 12(2): 99-101.
- [3] 徐国良. 降酶合剂治疗慢性乙型肝炎42例疗效观察[J]. 新中医, 2000, 32(7): 21-2.
- [4] 张文海, 王金生, 张立. 大鼠枯否细胞的分离和培养方法[J]. 中国医科大学学报, 1998, 27(6): 649-50.
- [5] 陈群, 王胜春, 汤斌. 慢性肝病、肝癌患者IL-6、IL-8和TNF- α 活性测定及意义[J]. 临床肝胆病杂志, 1998, 14(3): 177-9.
- [6] 金珍婧, 李东复, 太京华, 等. 慢性肝病患者血清细胞因子变化与临床意义[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(7): 390-1.
- [7] 邵沂. 肿瘤坏死因子与乙型病毒性肝炎病情关系的探讨[J]. 临床消化病杂志, 2000, 12(3): 118-9.
- [8] 吴长健, 张燕, 王晓玲. 乙型肝炎与NO、IL-8、TNF- α 之间关系的探讨[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2000, 3(2): 511-2.

参考文献：

- [1] 荆俊杰. 白细胞介素6在肝纤维化中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 1997, 13(4): 177-8.
- [2] 王新, 许才泼, 陈岳祥, 等. 慢性肝病患者血清肿瘤坏死因子- α 与白细胞介素-8水平关系的研究[J]. 临床肝胆病杂志, 1996, 12(2): 99-101.
- [3] 徐国良. 降酶合剂治疗慢性乙型肝炎42例疗效观察[J]. 新中医, 2000, 32(7): 21-2.
- [4] 张文海, 王金生, 张立. 大鼠枯否细胞的分离和培养方法[J]. 中国医科大学学报, 1998, 27(6): 649-50.
- [5] 陈群, 王胜春, 汤斌. 慢性肝病、肝癌患者IL-6、IL-8和TNF- α 活性测定及意义[J]. 临床肝

胆并杂志, 1998, 14(3): 177-9.

[6] 金珍婧, 李东复, 太京华, 等. 慢性肝病患者血清细胞因子变化与临床意义[J]. 中国免疫学杂志, 2000, 16(7): 390-1.

[7] 邵 沂. 肿瘤坏死因子与乙型病毒性肝炎病情关系的探讨[J]. 临床消化病杂志, 2000, 12(3): 118-9.

[8] 吴长健, 张 燕, 王晓玲. 乙型肝炎与NO、IL-8、TNF- α 之间关系的探讨[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2000, 3(2): 511-2.

[回结果列表](#)