中药复方降酶合剂对大鼠肝脏细胞因子调节的实验研究

刘 立[1]袁麦合昌[2]袁徐国良[2]袁杨运高[1]袁程镇西[2]袁陈先明[1]渊第一军医大学中医系袁广东 广州 510515曰广东省高明市中医院袁广东 高明 528500冤

摘要:目的 研究中药复方制剂降酶合剂对 D-氨基半乳糖所致动物急性肝损伤的保护作用袁和对内毒素(LPS)刺激后肝枯否细胞渊KC冤分泌 IL-6尧IL-8 和 TNF-琢的调节作用遥方法 复制大鼠 D-氨基半乳糖致急性肝损伤模型袁制备 SD 大鼠降酶合剂和联苯双酯的含药血清袁以 LPS 和含药血清刺激 SD 大鼠体外培养 KC袁采用 ELISA 夹心法检测 IL-6尧IL-8 和 TNF-琢水平遥结果 D-氨基半乳糖所致急性肝损伤模型转氨酶和细胞因子分泌水平明显增高袁中药降酶合剂可以降低转氨酶和调节细胞因子分泌水平遥培养细胞在加入 LPS 刺激后袁上清中 IL-6尧IL-8 和 TNF-琢浓度明显高于对照组渊P<0.01冤遥而在加入降酶合剂后袁上清中的 IL-6尧IL-8 和 TNF-琢水平明显下降渊P<0.01冤遥结论 降酶合剂降低 ALT 的作用可能与其通过对机体免疫功能的调节袁降低 IL-6尧IL-8 和 TNF-琢等细胞因子的产生有着密切的关系遥

关键词:降酶合剂曰枯否细胞曰细胞因子曰D-氨基半乳糖
中图分类号院R289.5曰Q291 文献标识码院A 文章编号院1000-2588渊2001冤05-0345-03

粤蹦躁躁躁

室生产袁批号20000303遥用前浓缩成每毫升含生药1000mg袁置4 益冰箱中保存备用遥

联苯双酯滴丸由广州星群药业有限公司生产袁1.5mg/ 丸袁临用前生理盐水稀释成0.4mg/ml袁置4 益冰箱中保存遥

1.2 方法

1.2.1 模型复制 SD大鼠40只袁体质量180~220g袁完全随机法分为4组袁每组10只遥渊冤正常对照组曰渊冤模型对照组曰渊冤降酶合剂组曰渊冤联苯双酯组遥除第 渊冤组外袁其他3组动物均同时一次性腹腔注射10%D-氨基半乳糖液渊g/kg窑b.w.冤袁h后灌胃给药袁以后每12h灌胃给药1次袁并于造模后第3天处死动物袁眼眶放血袁分离血清作有关检测遥

1.2.2 含药血清的制备 SD大鼠18只袁雌雄不拘袁体质量200~250g袁随机分为3组遥分别予以降酶合剂2ml袁联苯双酯2ml和生理盐水2ml灌胃袁每天2次袁连续7d遥最后一次灌胃渊灌药前禁食不禁水12h冤袁1h后袁%戊巴比妥钠渊0mg/kg窑b.w.冤腹腔麻醉袁腹主动脉采血袁000r/min, 离心20min袁分离血清袁经56 益袁0min水浴后袁.45 滋m微孔滤膜过滤除菌袁得到降酶合剂含药血清尧联苯双酯含药血清和空白对照血清袁于原0 益保存备用遥

1.2.3 肝枯否细胞渊KC冤分离与培养 参照张文海噰等介绍的方法袁上述SD大鼠袁%戊巴比妥钠渊0mg/kg窑b.w.冤腹腔麻醉后袁门静脉插管袁先灌注0.02% EDTA溶液渊顺温至37 益冤袁同时于近心脏处剪断下腔静脉以使灌注液流出袁先尽肝内血液袁再经门静脉体外循环灌注0.05%Ⅰ型胶原酶渊顺温至37 益冤遥在灌注时应将肝上方下腔静脉用镊子夹闭袁使肝脏膨胀后再放开静脉使液体流出袁反复3~5次以达到充分灌注遥至肝脏弹力下降后袁取下肝脏袁剪碎袁在37 益水浴中0.05%胶原酶振荡消化10 min后过200目网袁滤液倒入离心管中袁以2500r/min离心10min袁去掉上清袁加入RPMI1640混匀袁00r/min离心2min袁此时上清中主要含有枯否细胞尧内皮细胞和小淋巴细胞等遥取上清再以2500r/min离心10min袁弃沉淀以细胞培养基渊基础培养基为RPMI1640袁另含15%胎牛血清尧5mmol/LHEPES尧5mmol/LL-谷胺酰胺尧青霉素尧链霉素各100 U/ml冤充分混匀袁.5%台盼蓝染色判断活力袁相差显微镜下观察形态袁调整细胞浓度为1伊10^6个/ml后袁接种于24孔培养板内袁置37 益尧5%CO_2培养箱中培养遥

1.2.4 加入内毒素和含药血清 细胞培养4 h后换液袁去除未贴壁细胞袁获得贴壁的枯否细胞遥把24孔板分为5组袁每组4孔袁分别加入Ⅰ尧空白血清袁Ⅱ尧内毒素袁Ⅲ尧降酶合剂含药血清袁Ⅳ尧降酶合剂含药血清和内毒素袁Ⅴ尧联苯双酯含药血清和内毒素袁使培养液与含药血清体积之比为3院袁内毒素的终浓度为100 ng/ml遥在37 益尧%CO_2培养箱中共同孵育4 h后袁吸取每组各孔培养上清液袁.45 滋m微孔滤膜过滤除掉杂质袁滤液于原0 益保存备用遥

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袁方差分析显著时进行多重比较渊NK法冤袁方差不齐性时用Tambane爷s T2法遥

2 结果

2.1 急性肝损伤实验

2.1.1 对肝功能的影响 造模后袁模型组ALT明显升高曰而降酶合剂组和联苯双酯组ALT水平则明显较低渊表1冤遥

表1 对大鼠ALT肝功能的影响(雪依袁U/L)

[illegible]

Group	灶	ALT
Control	10	130.01依1.43
Model	10	235.47依4.39**
Jiangmeiheji	10	175.56依9.24**##
Biphenyldimethylesterate	10	165.49依7.55**##

**孕0.01增噰ontrolgroup;##孕0.01增噰modelgroup

2.1.2 对细胞因子的影响 随着动物的急性肝损伤袁大鼠血清细胞因子水平明显升高遥其中以模型组的升高最为明显袁与正常对照组比较袁均有显著性意义渊P<0.01)渊表2冤遥

表2 对大鼠血清细胞因子的影响(灶=10, 雪依袁滋g/L雪

[illegible]

Group	IL-6	IL-8	TNF-琢
Control	0.81依0.31	0.90依0.24	1.09依0.33
Model	2.62依0.76**	5.73依2.29**	7.50依2.69**
Jiangmeiheji	1.82依0.65**#	3.31依1.49*#	2.29依0.67*##
Biphenyldimethylesterate	2.71依0.58**△	4.11依1.40*	3.32依0.71**##

*孕0.05,**孕0.01增噰ontrolgroup;#孕0.05, ##孕0.01增噰modelgroup; △孕0.05增噰iangmeihejigroup

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%以上袁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袁远小于肝细胞袁约4 h后袁细胞贴壁呈扁圆形袁一部分细胞已开始伸出伪足遥

2.2.2 各因素对细胞因子的影响 当加入LPS之后袁培养上清中各细胞因子水平明显升高袁而在只加入降酶合剂含药血清组中袁细胞因子水平虽较空白血清对照组升高袁但没有统计学意义遥同时加入LPS和降酶

合剂含药血清后袁细胞因子水平与 LPS 组相比明显下降袁与空白血清组没有显著差异遥而在同时加入联苯双酯含药血清与 LPS 之后袁培养上清中细胞因子水平明显高于空白对照组袁接近 LPS 组水平袁与降酶合剂血清加 LPS 组比较有显著性差异遥结果见表 3遥

表 3 各因素对大鼠 KC 培养上清中细胞因子水平的影响

渊x±s, 单位:ng/L冤

Group	IL-6	IL-8	TNF-琢
Serumcontrol	2.28依.83	3.78依.09	2.13依.83
LPS	11.11依.03**	10.60依.81**	4.73依.45**
Jiangmeihejiserum	3.99依.51##	4.23依.39##△	2.23依.21##
Jiangmeihejiserum+LPS	4.17依.13##	5.56依.10#△	2.38依.06#
Biphenyldimethylesterate+LPS	9.16依.75**△	10.71依.56**	3.91依.92*△

*P<0.05,**P<0.01 增渊serumcontrolgroup;#P<0.05,##P<0.01 增渊LPS group;△P<0.05 增渊jiangmeihejiserum+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袁现已将 IL-1尧IL-6尧IL-8 和 TNF 列入炎症介质的范畴袁证明它们具有强烈的致炎活性袁可引起肝组织的损害遥研究表明袁慢性肝炎尧重型肝炎和肝硬化患者血清 IL-6 水平显著增高袁其活性与肝组织炎症和坏死程度相关噪曰慢性活动性乙型肝炎患者血清和肝组织内 IL-8 水平也明显增高袁并与肝脏损害指标渊如 ALT尧胆红素等冤是正相关关系噪遥急性甲尧乙型肝炎袁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 活性明显增高袁是介导肝损害的重要炎症介质之一袁与乙型肝炎类型尧肝损伤程度及病毒复制有密切关系噪遥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袁释放的内毒素入血有关袁这些因素均可以刺激单核巨噬细胞尧淋巴细胞尧或纤维细胞及内皮细胞等产生 IL-6尧IL-8 和 TNF遥

D- 氨基半乳糖是一种肝细胞毒药物袁以之造成急性肝损伤袁是最为常用的肝损伤动物模型遥其主要作用机理为降低三磷酸腺苷袁改变尿嘧啶核苷酸代谢袁导致肝细胞大分子合成障碍袁使肝细胞发生急性损害袁引起肝脏组织的炎性细胞侵润及枯否细胞活跃增生袁从而成为肝脏内大量生成 TNF尧IL-6 及 IL-8 产生的基础遥另一方面袁肝脏急性损伤后所产生的内毒素袁亦可以大量诱导细胞因子的产生遥因此袁通过 D- 氨基半乳糖损伤的动物模型袁来探讨肝脏损害与细胞因子的关系袁是合理可行的遥本实验随着动物的急性肝损伤袁细胞因子分泌水平明显增高袁并与转氨酶的增高呈现出明显的正相关性遥曾观察到重度慢性乙肝 IL-8尧TNF-琢含量明显高于轻度及中度慢性乙肝噪袁中度慢性乙肝又高于轻度慢性乙肝曰肝功能指标与血清 IL-8尧TNF-琢浓度呈正相关袁提示增高的 IL-8尧TNF-琢可以促进肝细胞损伤遥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袁D- 氨基半乳糖导致的肝脏促进细胞因子的释放曰而大量的细胞因子又进一步加剧了肝脏的损害遥

内毒素是一种炎症细胞因子的强刺激剂遥本实验通过内毒素刺激体外培养的枯否细胞模型袁发现降酶合剂含药血清能够显著抑制枯否细胞分泌 IL-6尧IL-8 和 TNF-琢袁使它们降到正常水平附近袁而联苯双酯却无此作用遥在以前的研究中袁我们发现以清热祛湿尧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噪遥结合本次试验结果袁我们认为降酶合剂对肝细胞保护作用的重要机制袁与其通过对机体免疫功能的调节袁降低 IL-6尧IL-8 和 TNF-琢等细胞因子的产生和释放有关遥

本次实验袁加入单纯的含药血清后袁肝脏 KC 细胞分泌细胞因子有一定的上升趋势袁但比较缓和袁与内毒素刺激后 KC 细胞的大量分泌有显著性差异袁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袁即在一般情况下有一定的促进分泌作用袁在病理情况下则具有显著抑制作用袁其机制尚待进一步的探讨遥

参考文献院

噪 荆俊杰. 白细胞介素 6 在肝纤维化中的作用噪曰临床肝胆病杂志,1997,13渊冤:177-8.

噪 王 新, 许才泼, 陈岳祥, 等. 慢性肝病患者血清肿瘤坏死因子 -琢与白细胞介素 -8 水平关系的研究噪曰 临床肝胆病杂志, 1996, 12渊冤:99-101.

噪 徐国良. 降酶合剂治疗慢性乙型肝炎 42 例疗效观察噪曰新中医, 2000,32渊冤:21-2.

噪 张文海, 王金生, 张 立. 大鼠枯否细胞的分离和培养方法噪曰中国医科大学学报,1998,27渊冤:549-50.

噪 陈 群, 王胜春, 汤 斌. 慢性肝病尧肝癌患者 IL-6尧IL-8 和 TNF-a 活性测定及意义噪曰临床肝胆并杂志,1998,14渊冤:177-9.

噪 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噪曰中国免疫学杂志,2000,16渊冤:390-1.

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

噪 吴长健, 张 燕, 王晓玲. 乙型肝炎与 NO尧IL-8尧TNF-琢之间关系的探讨噪曰中国煤炭工业医学杂志,2000, 3渊冤:511-2.