

中药清肝排毒饮对刀豆蛋白 A 所致小鼠免疫性肝损伤的保护作用

李常青, 刘丽丽, 朱宇同, 赵昉, 陈诗慧

李常青, 刘丽丽, 朱宇同, 赵昉, 陈诗慧, 广州中医药大学热带医学研究所
广东省广州市 510405

李常青, 男, 1965-09-28 生, 湖南省华容县人, 汉族, 1996 年广州中医药大学
博士研究生毕业, 副主任医师, 主要从事病毒性疾病治疗的临床与实验研究工作。
广东省科技计划资助项目, No. 2004B33001017

通讯作者: 李常青, 510405, 广东省广州市, 广州中医药大学热带医学研究所。
gzlxh2002@163.com

电话: 020-36585461 传真: 020-86373516

收稿日期: 2005-03-31 接受日期: 2005-04-09

Protective effects of Qingganpaiduyin against hepatic immune injury induced by concanavalin A in mice

Chang-Qing Li, Li-Li Liu, Yu-Tong Zhu, Fang Zhao, Shi-Hui Chen

Chang-Qing Li, Li-Li Liu, Yu-Tong Zhu, Fang Zhao, Shi-Hui Chen, Institute of Tropical Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China
Supported by the Scientific and Technological Plan Foundation of Guangdong Province, No.2004B33001017

Correspondence to: Dr. Chang-Qing Li, Institute of Tropical Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, Guangdong Province, China. gzlxh2002@163.com

Received: 2005-03-31 Accepted: 2005-04-09

Abstract

AIM: To investigate the protective effects of Qingganpaiduyin (QGPDY) against hepatic immune injury induced by concanavalin A (Con A).

METHODS: Forty NIH mice were randomly divided into 5 groups: normal control group (group A), model group (group B), high dosage group of QGPDY (group C), low dosage group of QGPDY (group D) and bifendate group (group E). Except the mice in group A, those in other groups were injected with Con A (20 mg/kg) via the tail vein at the 1st day of experiment. The mice in Group C and D were administered with QGPDY at a dose of 40 g/kg and 20 g/kg respectively. The mice in Group E were administered with bifendate by gastric perfusion (150 mg/kg). All the drugs were given once daily for 3 days consecutively. At the last time, when drugs were administered for 4 hours, the mice were injected with Con A once again at the same dosage. Blood sample were collected at the 8th hour after Con A administration for determining the activity of aminotransferase (ALT), the concentrations of interferon-gamma (IFN- γ) and

tumor necrosis factor alpha (TNF- α). Histopathological examination for liver tissue was also performed.

RESULTS: The activity of ALT, the concentrations of IFN- γ and TNF- α in group C were obviously lower than those of group B (ALT: $1\ 314.8 \pm 831.3$ vs $2\ 373.3 \pm 957.9$ nkat/L, $t = 2.36$, $P = 0.03$; IFN- γ : 34.0 ± 14.4 vs 49.6 ± 19.0 ng/L, $t = 2.20$, $P = 0.04$; TNF- α : 56.3 ± 6.0 vs 114.5 ± 8.4 ng/L, $t = 15.90$, $P = 0.00$), but no significant difference as compared with group E ($P > 0.05$ for ALT, IFN- γ and TNF- α respectively). Hepatic histopathological changes were alleviated in group C.

CONCLUSION: QGPDY has a good protective effects against hepatic immune injury induced by Con A by suppressing the activation of the T-lymphocytes and reducing the release of IFN- γ and TNF- α .

Key Words: Qingganpaiduyin; Concanavalin A; Liver injury; Interferon-gamma; Tumor necrosis factor alpha

Li CQ, Liu LL, Zhu YT, Zhao F, Chen SH. Protective effects of Qingganpaiduyin against hepatic immune injury induced by concanavalin A in mice. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(11):1283-1286

摘要

目的: 探讨中药清肝排毒饮对刀豆蛋白A(Con A)所致免疫性肝损伤的保护作用。

方法: 40 只 NIH 小鼠随机分为 5 组, 分别为正常对照组, 模型组、清肝排毒饮大剂量组、小剂量组和联苯双酯治疗组。除正常对照组外, 其他组于实验首日 iv Con A 20 mg/kg 后, 清肝排毒饮大剂量组、小剂量组和联苯双酯组均灌胃口服, 每天 1 次, 连续 3 d, 末次给药后 4 h, 再次 iv Con A 20 mg/kg, 8 h 后检测血浆 ALT 活性、IFN- γ 和 TNF- α 含量, 观察肝组织病理学变化。

结果: 清肝排毒饮大剂量组小鼠 ALT 活性、IFN- γ 和 TNF- α 含量均明显低于模型组 (ALT: $1\ 314.8 \pm 831.3$ vs $2\ 373.3 \pm 957.9$ nkat/L, $t = 2.36$, $P = 0.03$; IFN- γ : 34.0 ± 14.4 vs 49.6 ± 19.0 ng/L, $t = 2.20$, $P = 0.04$; TNF- α : 56.3 ± 6.0 vs 114.5 ± 8.4 ng/L, $t = 15.90$, $P = 0.00$), 但与联苯双酯组比较, 差异无显著性意义 (P 均 > 0.05); 清肝排毒饮大剂量组肝脏病理改变明显减轻。

结论: 清肝排毒饮对Con A所致小鼠免疫性肝损伤具有较好的保护作用, 抑制T淋巴细胞活化和IFN- γ , TNF- α 的释放是其主要的的作用机制。

关键词: 清肝排毒饮; 刀豆蛋白 A; 肝损伤; 干扰素 γ ; 肿瘤坏死因子 α

李常青, 刘丽娟, 朱宇同, 赵昉, 陈诗慧. 中药清肝排毒饮对刀豆蛋白 A 所致小鼠免疫性肝损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2005;13(11):1283-1286 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1283.asp>

0 引言

乙型肝炎病毒持续感染是导致乙型肝炎慢性化、肝硬化和原发性肝癌的重要因素. 目前认为乙型肝炎病毒并不直接损害肝细胞, 而是通过宿主免疫应答引起肝细胞损伤, 出现相应的临床表现. 清肝排毒饮是由柴胡、连翘、大青叶、芍药等组成的中药复方制剂, 具有清热解毒、疏肝利胆作用, 主要用于慢性乙型肝炎的治疗. 为探讨该复方对免疫性肝损伤的保护作用效果, 我们以NIH小鼠为实验对象, 对刀豆蛋白 A (Con A) 所致免疫性肝损伤模型进行治疗, 观察作用效果并探讨其作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 NIH小鼠, δ , 体质量18-22 g, 广东省医学实验动物中心提供, 刀豆蛋白 A 为美国华盛顿生物药品公司产品; 清肝排毒饮中的组方药材柴胡, 连翘, 大青叶, 芍药和甘草购自广州中医药大学第一附属医院, 经水提浓缩至相当于生药量40 g/L; 联苯双酯滴丸, 北京协和药厂生产, 每丸含联苯双酯7.5 mg. 谷丙转氨酶检测试剂盒购自上海申索试剂有限公司, 小鼠IFN- γ 和TNF- α 定量检测试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司, 752型紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂), Bio-Tek ELX8000自动酶标仪(Bio-Tek instrument INC), Olympus CK40-F200显微镜(Olympus Optical Co.Ltd).

1.2 方法 造模方法参照文献[1], NIH小鼠40只随机分为5组, 每组8只, 分别为正常对照组、模型组、清肝排毒饮大剂量组、小剂量组(40 g/kg, 20 g/kg, 分别相当于10倍、5倍临床用药剂量)和联苯双酯(150 mg/kg)治疗组, 除正常对照组外, 其余小鼠于实验首日上午尾iv Con A 20 mg/kg, 并于第1, 2, 3 d下午各给药1次, 清肝排毒饮大剂量组、小剂量组和联苯双酯组均灌胃口服, 末次给药后4 h, 模型组和各给药组小鼠一次性静脉注射 Con A 20 mg/kg, 禁食, 不禁水, 8 h后摘小鼠眼球取血, 离心分离血浆; 取肝左叶组织, 40 g/L 甲醛溶液固定, 石蜡包埋切片, 常规HE染色后行光镜病理观察. 血浆ALT活

性检测采用赖氏法, 按试剂盒说明操作, 用752型紫外分光光度计于波长505 nm处检测吸光值, 制定标准曲线, 换算成ALT值. 血浆IFN- γ 和TNF- α 定量测定采用双抗体夹心ABC-ELISA法, 按试剂盒说明操作, 用Bio-Tek ELX8000自动酶标仪于波长490 nm处检测吸光值, 制定标准曲线, 换算成IFN- γ 和TNF- α 定量值.

统计学处理 采用SPSS 10.0软件包进行统计分析, 多组计量资料分析采用One way ANOVA, 多重比较采用LSD.

2 结果

2.1 血浆ALT, IFN- γ 和TNF- α 模型组小鼠ALT活性、IFN- γ 和TNF- α 含量较正常对照组明显升高, 二者比较差异有显著性意义($t = 5.19, 3.63, 16.91, P < 0.01$, 表1). 清肝排毒饮大剂量组小鼠ALT活性、IFN- γ 和TNF- α 含量均明显低于模型组, 差异有显著性意义($t = 2.36, 2.20, 15.90, P < 0.05, 0.01$). 清肝排毒饮大剂量组与联苯双酯组比较, 小鼠ALT活性、IFN- γ 和TNF- α 含量的差异无显著性意义($t = 0.62, 1.10, 0.64, P > 0.05$).

表1 清肝排毒饮对Con A所致免疫肝损伤小鼠血浆ALT、IFN- γ 和TNF- α 的影响(mean \pm SD, $n = 8$)

分组	ALT(nkat/L)	IFN- γ (ng/L)	TNF- α (ng/L)
正常组	589.6 \pm 166.2	25.3 \pm 1.7	62.4 \pm 2.2
模型组	2373.3 \pm 957.9 ^d	49.6 \pm 19.0 ^d	114.5 \pm 8.4 ^d
清肝排毒饮			
大剂量	1314.8 \pm 831.3 ^a	34.0 \pm 14.4 ^a	56.3 \pm 6.0 ^b
小剂量	1683.7 \pm 934.4	44.9 \pm 15.9	67.8 \pm 3.2 ^b
联苯双酯	1044.0 \pm 920.7 ^b	27.5 \pm 8.4 ^b	58.5 \pm 7.9 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs模型组; ^d $P < 0.01$ vs正常组.

2.2 肝组织病理学观察 光镜下见正常组肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝窦未见异常. 模型组全部小鼠肝组织均出现明显病变, 小叶内大多数肝细胞肿胀, 细胞质疏松化, 可见凋亡小体、有的呈气球样变, 可见明显的点状坏死和灶性坏死, 坏死灶可见大量炎性细胞浸润; 汇管区淋巴细胞和单核细胞炎性浸润尤为明显, 肝窦内可见红细胞瘀积. 清肝排毒饮大剂量组和联苯双酯组部分肝组织可见散在点状坏死和灶性坏死, 肝细胞损伤程度明显减轻, 炎性细胞浸润显著减少(图1A-D).

3 讨论

Con A是一种可活化T细胞的有丝分裂原, ConA诱导

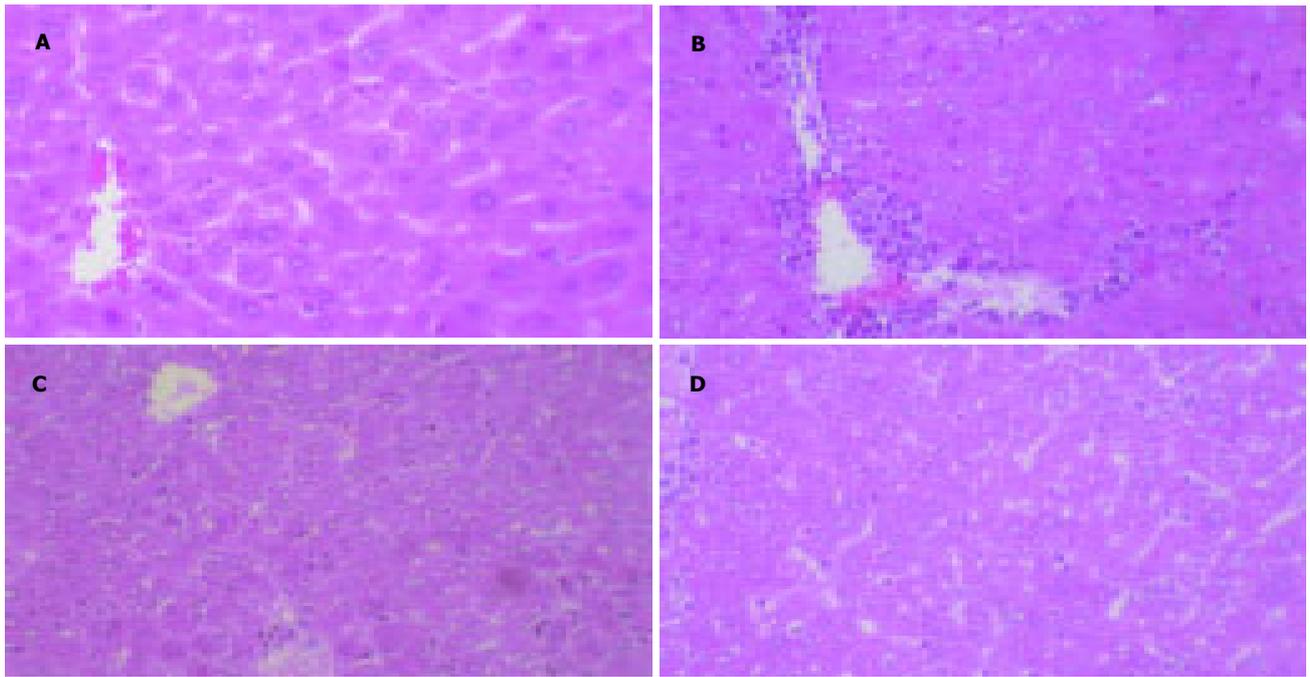


图1 小鼠 Con A 免疫性肝炎 HE $\times 200$. A: 正常; B: 模型; C: 清肝排毒饮大剂量; D: 联苯双酯.

的小鼠免疫性肝损伤模型, 与其他中毒性肝损伤模型如四氯化碳模型、D-氨基半乳糖模型相比, 被认为更适合研究人类病毒性肝炎和自身免疫性肝病的病理机制和进行抗肝损伤的药物筛选^[2-23]. 辅助性T细胞(T_H 细胞)和巨噬细胞是该动物模型的效应细胞, ConA活化 T_H 细胞后刺激 T_H 细胞和巨噬细胞共同产生过量的IFN- γ 和TNF- α 等细胞因子, 已证实TNF- α 为细胞因子网络中介导肝损伤的终末递质, 他既是肝细胞凋亡的正性触发因子, 且直接损伤血管内皮细胞, 亦可活化中性粒细胞促进其趋化聚集于肝脏, 释放蛋白酶或氧自由基引起肝细胞凋亡或坏死^[24-25]. 细胞因子IFN- γ 、TNF- α 是引起急性肝损伤的重要炎症递质^[26-27], T淋巴细胞活化后产生的IFN- γ 是巨噬细胞的重要激活剂, 对促进肝内Kupffer细胞参与炎症反应和刺激巨噬细胞分泌TNF- α 起重要作用^[28], 研究表明, 预先给予抗-IFN- γ , 或抗-TNF- α , 均可完全阻断ConA诱发的小鼠肝损伤^[29-30].

本研究结果显示, 3 d内两次静脉注射Con A 20 mg/Kg, 模型组小鼠血浆ALT活性升高, IFN- γ 、TNF- α 含量增加;病理学检查发现, Con A组小鼠肝组织汇管区内大量炎性细胞浸润, 且有点状和灶性坏死. 该结果再次证实T淋巴细胞活化导致IFN- γ 分泌增加及刺激巨噬细胞释放过多TNF- α 是Con A性肝损伤的主要病理机制.

本研究结果显示, 清肝排毒饮大剂量组对Con A诱发的小鼠急性免疫性肝损伤模型, 具有明显的保护作用, 表现为谷丙转氨酶活性降低、肝组织病理变化减轻;清肝排毒饮大剂量治疗组小鼠血浆IFN- γ 和

TNF- α 含量明显低于模型组($P < 0.05$), 表明清肝排毒饮可通过抑制T淋巴细胞活化和IFN- γ 、TNF- α 的释放发挥抗肝损伤作用;清肝排毒饮对小鼠ALT活性、TNF- α 和IFN- γ 含量的影响, 呈现明显的量效关系, 该结果为清肝排毒饮的进一步开发和临床应用提供了依据.

4 参考文献

- 李向阳, 邝幸华, 周映云, 杨子峰, 张奉学, 朱宇同. 叶下珠复方制剂对刀豆蛋白A所致小鼠肝损伤的保护作用. 中华癌症姑息医学杂志 2002;1:19-25
- Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by Concanavalin A. *J Clin Invest* 1992;90:196-203
- 张修礼, 曲建慧. 小鼠 ConA 性肝损伤模型. 世界华人消化杂志 2001;9:571-574
- 于岩岩, 斯崇文, 郎振为, 田秀兰, 何群, 薛海鹏. 肿瘤坏死因子 α 在病毒性肝炎肝坏死中的作用. 中华内科杂志 1996;35:28-31
- 王新, 陈岳祥, 许才斌, 赵国宁, 黄裕新, 王庆莉. 肿瘤坏死因子 α 与人肝纤维化关系的研究. 华人消化杂志 1998;6:106-108
- Knolle PA, Gerken G, Loser E, Dienes HP, Gantner F, Tiegs G, Meyer zum Buschenfelde KH, Lohse AW. Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in Concanavalin A-induced hepatic injury in mice. *Hepatology* 1996;24:824-829
- 徐学刚, 张美稀, 董惠芳, 杨协珍, 金树根, 陈建杰, 王灵台. 肝病患者血清肿瘤坏死因子 α 水平变化. 世界华人消化杂志 2003;11:856-858
- 周俊英, 赵彩彦, 甄真, 冯忠军. 病毒性肝炎肝硬化与血清IL-1 β 及干扰素 γ 的关系. 世界华人消化杂志 2001;9:100-101
- Rehermann B. Intrahepatic T cells in hepatitis B: viral control versus liver cell injury. *J Exp Med* 2000;191:1263-1268
- 张亚兵, 李之清, 张赤志. 蛇葡萄根对ConA诱导小鼠肝损伤的防护作用. 中西医结合肝病杂志 2000;19:26-27
- 高立芬, 孙文生, 刘君炎, 张利宁, 曹英林, 马春红. 刀豆蛋白A活化小鼠巨噬细胞机理的初步探讨. 基础医学与临床 2003;23:661-665
- 曲建慧, 韩絮琳, 万谟彬. 细胞间黏附分子-1在刀豆蛋白A诱导小鼠急性肝损害中的表达. 中华急诊医学杂志 2002;11:10-12
- 李小刚, 王天才, 唐望先, 李绍白, 张文英, 杜荔簪. 抗Tac单克隆抗体对ConA诱导小鼠实验性肝损伤的影响. 上海免疫学杂志 1996;16:203-205

- 14 伍思琪, 姚冬生, 陈伟强, 陈一岳. 假密环菌多糖Y-HW抗ConA诱导小鼠实验性肝损伤的形态学研究. 解剖学研究 1999;21:20-21
- 15 赵彩彦, 冯忠军, 周俊英, 甄真, 刘金星. 病毒性肝炎患者Th1和Th2细胞因子的变化. 河北医科大学学报 2001;22:360-361
- 16 李小刚, 王天才, 唐望先, 李绍白. 肿瘤坏死因子在刀豆蛋白A诱导的肝损伤中的作用. 湖北省卫生职工医学院学报 1999;1:1-4
- 17 张修礼, 秦一中, 韩絮琳, 万谟彬, 权启镇, 孙自勤, 王要军, 江学良, 李文波. 环孢菌素A阻断刀豆蛋白A诱发昆明小鼠肝损伤的研究. 解放军医学杂志 2001;26:507-508
- 18 张美稀, 章晓鹰, 金树根, 董惠芳, 陈建杰, 王灵台. 肝病患者外周血CD28+T细胞亚群变化. 世界华人消化杂志 2000;8:1432-1433
- 19 黄炳贺, 姚冬生, 陈伟强, 陈一岳. 假密环菌活性物对ConA诱导的小鼠TNF- α 和IFN- γ 蛋白产物表达的影响. 实用医学杂志 1998;14:531-532
- 20 于岩岩, 斯崇文, 田秀兰, 何群, 薛海鹏. 多种细胞因子单独及协同作用对肝坏死影响的实验研究. 中华医学杂志 1996;76:258-260
- 21 向明, 孙汉清, 裘军, 张进芳, 郝长江. IFN- γ 受体Ig融合蛋白对ConA诱导小鼠肝损伤的保护作用. 上海免疫学杂志 2001;21:337-339
- 22 李常青, 刘丽丽, 莫传伟, 黄玲. 苦参碱对ConA性肝损伤小鼠IFN释放及肝组织病理改变的影响. 世界华人消化杂志 2005;13:640-643
- 23 李小刚, 王天才, 李绍白, 唐望先. 地塞米松对刀豆蛋白A引起肝损伤小鼠的保护作用. 基础医学与临床 1998;18:45-46
- 24 Gantner F, Leist M, Lohse AW, Germann PG, Tiegs G. Concanavalin A-induced T-cell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. *Hepatology* 1995;21:190-198
- 25 李影奕, 梁刚, 李富君, 董尚武, 孙贵范, 李冰, 戴国钧. 氟化物对人多形核白细胞SOD活力变化的影响. 中国地方病学杂志 2001;20:81-83
- 26 王剑虹, 吴建波. 肝硬化患者的细胞免疫状态研究. 世界华人消化杂志 2000;8:1178-1180
- 27 Kusters S, Gantner F, Kunstle G, Tiegs G. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by Concanavalin A. *Gastroenterology* 1996;111:462-471
- 28 骆抗先. 乙型肝炎基础和临床. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1997:118-123
- 29 Mizuhara H, Uno M, Seki Y, Yamashita M, Yamaoka M, Ogawa T, Kaneda K, Fujii T, Senoh H, Fujiwara H. Critical involvement of interferon gamma in the pathogenesis of T-cell activation-associated hepatitis and regulatory mechanisms of interleukin-6 for the manifestations of hepatitis. *Hepatology* 1996;23:1608-1615
- 30 李小刚, 王天才, 李绍白, 唐望先. 抗TNF- α 单抗对刀豆蛋白A诱导急性肝损伤的保护作用. 同济医科大学学报 2000;29:513-514

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志入编《中文核心期刊要目总览》 2004年版内科学类的核心期刊

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 依据文献计量学的原理和方法, 经过研究人员对相关文献的检索、计算和分析, 并通过学科专家评审, 世界华人消化杂志被确定为内科学类的核心期刊, 编入《中文核心期刊要目总览》2004年版(第四版). 本版核心期刊研究, 被列为“2001年国家社会科学基金项目”. 该书定于2004-07由北京大学出版社出版.

该书已于1992, 1996, 2000年出版过三版, 在社会引起了较大反响、图书情报界、学术界、出版界和科研管理部门对该项研究成果都给予了较高评价, 普遍认为他适应社会需要, 为国内外图书情报部门对中文学术期刊的评估和选购提供了参考依据, 促进了中文期刊编辑和出版质量的提高, 已成为具有一定权威性的参考工具书. 为了及时反映中文期刊发展变化的新情况, 《中文核心期刊要目总览》2004年版编委会, 开展了新一版核心期刊的研究工作, 课题组认真总结了前三版的研究经验, 对核心期刊评价的基础理论、评价方法(定量评价指标体系、核心期刊的学科划分、核心期刊数量)、评价软件、核心期刊的作用与影响等问题进行了深入研究, 在此基础上, 进一步改进评价方法, 使之更加科学合理, 力求使评价结果能更准确地揭示中文期刊的实际情况. 本版核心期刊定量评价, 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等7个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库达51种, 统计文献量达到943万余篇次(1999-2001年), 涉及期刊1万2千种. 本版还加大了专家评审力度, 1873位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1800种核心期刊, 分属七大编75个学科类目. 该书由各学科核心期刊表、核心期刊简介、专业期刊一览表等几部分组成, 不仅可以查询学科核心期刊, 还可以检索正在出版的学科专业期刊, 是图书情报、新闻出版、科研成果管理等部门和期刊读者的不可或缺的参考工具书.

该书由北京大学图书馆和北京高校图书馆期刊工作研究会合编, 北京大学图书馆戴龙基馆长和蔡蓉华研究馆员任主编, 北京高校图书馆期刊工作研究会成员馆、中国科学院文献中心、中国社会科学院文献中心、中国人民大学书报资料中心等相关部门的百余名专家和期刊工作参加了研究.(世界胃肠病学杂志 2004-05-05)