

【药效学评价】

何首乌肝损伤模型大鼠胆汁淤积现象及相关蛋白表达研究

井 潇^{1,2}, 吴纯启², 韩 刚², 谢丽华^{1,2}, 王茜莎¹, 杨 威^{3*}, 王全军^{2*}

1. 广东药科大学 中药学院, 广东 广州 510006

2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 抗毒药物与毒理学国家重点实验室, 国家北京药物安全评价研究中心, 北京 100850

3. 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东 广州 510006

摘要: 目的 观察经脂多糖(LPS)诱导后连续给予何首乌醇提液(AEP) 7 d 大鼠的肝损伤程度及胆汁淤积相关指标的变化。方法 将雄性 SD 大鼠随机分为 5 组: 对照组、LPS 组、LPS+对乙酰氨基酚(APAP)组、AEP 组、LPS+AEP 组, LPS、LPS+APAP、LPS+AEP 组按大鼠体质量分别尾 iv 给予 4 mg/kg LPS, 对照组与 AEP 组给予等体积生理盐水; 2 h 后 LPS+APAP 组 ig 给予 625 mg/kg APAP, AEP 组与 LPS+AEP 组 ig 给予 12 g/kg, 每天 1 次, 连续给药 7 d, 建立特异质肝损伤炎症模型。观察体质量变化, 并分别于造模后 2 h、14 h、5 d、8 d 检测血清生化中肝功能相关指标的变化, 同时收集胆汁, 计算胆汁流速与密度, 并检测胆汁中主要成分变化。进行肝脏系数及组织病理学检查, 并对胆汁淤积相关蛋白胆盐输出泵转运蛋白(BSEP)、多药耐药蛋白 2(MRP2)及多药耐药蛋白 3(MRP3)进行 Real-Time PCR 检测。结果 经过 LPS 诱导 2 d 后, LPS+AEP 组与对照组、AEP 组比较体质量明显下降, 5、8 d 肝脏系数显著增加 ($P<0.05$); 血清生化指标分析结果显示, 与对照组比较, LPS+AEP 组丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平无明显变化; 造模后 8 d 的总胆红素(TBIL)明显降低 ($P<0.05$), ALP 明显升高 ($P<0.05$); 可观察到胆汁密度和胆汁流速明显降低 ($P<0.05$), 对胆汁成分分析显示, 与对照组比较, LPS+AEP 组总胆固醇(TCHO)显著升高、TBIL 显著降低 ($P<0.05$); 病理结果显示, AEP 组出现轻微肝细胞变性, 而 LPS+AEP 组可见严重局灶坏死; 转录水平结果发现, LPS 诱导后可使得 BSEP、MRP2 在 14 h 时出现短期抑制 ($P<0.05$), 单独给予 AEP 可使 BSEP、MRP2 和 MRP3 的表达水平短时显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), 而 LPS+AEP 给药第 8 d 对大鼠肝脏 BSEP、MRP2 无显著性影响, 可使 MRP3 转录水平升高 ($P<0.05$)。结论 经 LPS 诱导的 AEP 可明显损伤大鼠肝细胞并干扰胆汁分泌功能, 引起胆汁成分相关生化指标的改变, 对 BSEP 与 MRP2 水平无显著影响, MRP3 出现代偿性升高, 提示确实存在胆汁淤积症状, 但可能是存在其他机制。

关键词: 何首乌醇提液; 胆汁淤积; 肝毒性; 实时荧光定量 PCR; 胆盐输出泵转运蛋白; 多药耐药蛋白 2; 多药耐药蛋白 3
中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)05-0612-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.05.006

Study on cholestasis and related protein expression in rats with liver injury induced by *Polygonum multiflorum*JING Xiao^{1,2}, WU Chun-qi², HAN Gang², XIE Li-hua^{1,2}, WANG Xi-sha¹, YANG Wei³, WANG Quan-jun²

1. School of Chinese Material Medica, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

2. National Beijing Center for Drug Safety Evaluation and Research, State Key Laboratory of Medical Countermeasures and Toxicology, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China

3. Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Guangzhou 510006, China

收稿日期: 2017-01-19

基金项目: 重大新药创制科技重大专项(2013ZX09302303); 重大新药创制科技重大专项(2012ZX09301003-001-008); 北京市科委基金项目(Z131100006513010)

作者简介: 井 潇, 男, 硕士研究生, 研究方向为药物毒理学。Tel: 18500521454 E-mail: jingxiao120525@163.com

*通信作者 王全军, 博士, 研究员, 研究方向为药物毒理学与药物临床前安全评价。Tel: 010-66931631 E-mail: wangquanjunbeijing@163.com
杨 威, 博士, 研究员, 研究方向为药物药理毒理。E-mail: yangwei0719@163.com

Abstract: Objective To observe the rats with liver damage induced by lipopolysaccharide (LPS) after administration of alcohol extract of *Polygonum multiflorum* (AEP) for 7 d, and study the change of related indicators of cholestasis. **Methods** Male SD rats were randomly divided into five groups: control group, LPS group, LPS + acetaminophen (APAP) group, AEP group, and LPS+AEP group. A dosage of 4 mg/kg LPS was injected to the caudal vein of rats in the LPS and the LPS+AEP groups. Two hours later, rats were administered with AEP (12 g/kg, equivalent to 22 times the dose of clinical medication) respectively for 7 d, once daily. Since the liver-injury model of inflammation was successfully established, the general conditions of rats such as body weight and clinical observation were observed. Liver function-related indicators were detected and bile was collected to determine flow rate, density and changes of major compositions 2 h, 14 h, 5 d, and 8 d after modeling. After getting the organ to body weight ratio for each rat, liver samples were treated for histopathological observation and the mRNA expression of hepatic BSEP, MRP2, and MRP3 was detected by real-time PCR. **Results** Compared with the rats in control group and AEP group, rats treated with LPS+AEP performed weight losing 2 d after modeling, and organ to body weight ratio was significantly increased on day 5 and 8. The results of liver function-related indicators showed that LPS+AEP did not change the contents of ALT and AST in serum, but increased the content of ALP ($P < 0.05$) and decreased the content of TBIL in serum ($P < 0.05$). The bile flow and density were decreased by LPS+AEP, while bile composition was obviously changed, the content of TCHO was increased and the content of TBIL was decreased ($P < 0.05$). Histopathological examination showed that a small amount of hepatocyte degeneration in AEP group was observed, but livers were damaged and grown necrosis partially in the LPS+AEP group. After 14 h, mRNA expression of BSEP and MRP2 in LPS group showed transitory inhibition, but AEP group had a significant up-regulation of mRNA expression of BSEP, MRP2, and MRP3 ($P < 0.05$). The following two time points, compared with the control group, mRNA expression of BSEP and MRP2 appeared no obvious change in LPS+AEP group, while mRNA expression of MRP3 was significantly increased on day 8 ($P < 0.05$). **Conclusion** AEP induced by LPS performs obvious hepatocyte damage, showed a certain effect on expression of bile acid synthesis and changed bile compositions and liver function-related indicators. The mRNA expression of BSEP and MRP2 was not changed significantly, while mRNA expression of MRP3 is compensatory increased, suggesting that cholestatic symptoms exist, but there may be other mechanisms.

Key words: alcohol extract of *Polygonum multiflorum*; cholestasis; hepatotoxicity; real-time PCR; BSEP; MRP2; MRP3

何首乌作为常用补益类中药, 据《本草纲目》记载, 具有“固精益肾、健筋骨、乌发”等功效。然而, 近年来国内外关于何首乌相关不良反应的报道日益增多^[1-4], 对中药安全低毒的传统认知提出了挑战。其不良反应主要涉及一些肝病体征, 如肝炎、胆汁淤积、黄疸、肝功能受损等^[5]。胆汁淤积是指胆汁生成及流动障碍, 具体可分为肝内肝细胞胆汁分泌障碍和肝外机械性梗阻^[6], 主要表现为胆汁生成障碍、胆汁水平降低, 并伴随血清胆红素(TBIL)、碱性磷酸酶(ALP)和总胆固醇(TCHO)等指标的升高。肝外型可见胆汁性坏死, 汇管区见多形核细胞浸润和胆管扩张, 无明显肝细胞损害; 而肝内型无胆汁性坏死。

临床调查发现何首乌所致肝损伤一般多为肝细胞损伤型, 以往研究多见对其肝细胞损伤的相关研究, 但一些病例也存在肝细胞及毛细管内淤胆症状^[7], 因而不能忽视何首乌可引起胆汁淤积型这一情况。然而当前对其研究面临一些问题, 一方面何首乌肝损伤机制类似特异质肝损伤, 在临床用药的不良反应率低^[8], 较难使用动物模型进行评价研究。针对

这一情况目前虽然已广泛采用基于内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的特异质肝损伤动物模型^[9], 旨在通过激活 Kupffer 细胞相关的免疫途径, 降低动物肝损伤阈值来诱导损伤, 但关于何首乌造成胆汁淤积是否能在动物体内复制未见报道; 另一方面是其发病机制尚未明确, 目前已知肝细胞膜窦面或胆管面转运体蛋白的缺失与抑制是造成胆汁淤积的一个重要原因。胆汁盐输出泵转运蛋白(BSEP)与多药耐药蛋白(MRP)同属 ABC 转运蛋白超家族成员, 参与有机阴离子转运并介导胆汁酸及胆盐的转运过程。一些药物如曲格列酮和夫西地酸等可通过抑制转运体的功能及表达诱发胆汁淤积^[10-11], 因此了解药物对以上常见转运蛋白的表达影响很有必要。

本实验采用毒性较大的何首乌醇提液(alcohol extract of *polygonum multiflorum*, AEP)^[11], 利用本课题组前期成功建立的 LPS 诱导的新型何首乌 SD 大鼠肝损伤模型^[12], 选用 LPS 联合对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)作为评价肝损伤模型成功建立的阳性药, 已有报道用 LPS 诱导较低剂量 APAP 可达到单独给予高剂量 APAP 的丙氨酸氨基

转移酶 (ALT) 水平, 即 LPS 可增强 APAP 的肝损伤^[13], 引起的肝损伤通常为肝细胞坏死。建模后着重对胆汁淤积相关生化指标及常见胆盐转运体 BSEP、MRP2、MRP3 进行检测, 探讨何首乌醇提液对这些指标的影响意义, 以期为进一步临床研究提供参考。

1 材料

1.1 药品及主要试剂

何首乌药材, 购自亳州王蜈蚣药材行, 批号 20160220, 经成都植标化纯生物技术有限公司杨俊霞鉴定为何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根; 采用冷浸法, 50%乙醇 2 次提取混合后得生药量为 3 g/mL 的 AEP, 经 HPLC 鉴定, 主要成分为二苯乙烯苷、大黄素、儿茶素等; APAP (北京曙光药业有限公司, 批号 160110); LPS (美国 Sigma 公司, 批号 L2880); RNA 提取试剂盒 (上海硕美生物科技有限公司, 批号 EK02505); 5X All-In-One RT MasterMix (美国 Abm 公司, 批号 G490); 2X KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix2 Universal (美国 Kapa Biosystems 公司, 批号 KK4601)。

1.2 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 136 只, 体质量 180~200 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号为 SCXK (京) 2012-0001。饲养于本 GLP 中心屏障设施内, 每笼 4 只, 不限饮食饮水, 本实验已通过 IACUC 审查 (编号: IACUC-2016-016)。

1.3 主要仪器

QL-902 涡旋振荡仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); XT-2000iv 自动生化分析仪 (日本 Sysmex 公司); GR300 分析天平 (日本 AND 公司); Mini Spin 离心机 (德国 Eppendorf 公司); Cfx96 荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组与肝损伤模型的建立

将 136 只雄性 SD 大鼠随机分为: 对照组、LPS 组、LPS+APAP 组、AEP 组、LPS+AEP 组, 对照组与 LPS 每组 32 只, 其余各组每组 24 只。LPS、LPS+APAP、LPS+AEP 组大鼠按体质量分别尾 iv 给予 4 mg/kg LPS, 对照组与 AEP 组给予等体积生理盐水; 2 h 后 LPS+APAP 组 ig 给予 625 mg/kg APAP, AEP 组与 LPS+AEP 组 ig 给予 12 g/kg (生药剂量, 按体表面积换算, 约为临床给药剂量的 22 倍) 的 AEP, 对照组与 LPS 组给予等体积的生理盐

水, 各组每日给药 1 次, 连续给药 7 d。

2.2 观察体质量与体征变化

给药期间每日称体质量 1 次, 根据体质量调整每次给药量, 并对动物体征及其粪便进行观察。

2.3 胆汁收集

选取造模后 2 h、15 h、5 d、8 d 时间点 (造模后 2 h 只有对照组和 LPS 组, 其他 3 个时间点均含以上 5 组), 每组各取 8 只动物在末次给药后禁食不禁水过夜, 称体质量后使用 3%戊巴比妥钠麻醉后进行仰卧固定, 打开腹腔于十二指肠处找到胆总管结扎乳头部, 使用眼科剪作“V”型切口, 插入内径 0.6 mm、外径 1 mm 的医用聚氯乙烯管并固定缝合。收集 2 h 胆汁称总质量, 精确量取 200 μ L 胆汁, 按质量/体积计算胆汁密度, 并推算出胆汁体积流速: 胆汁流速 = (总质量/密度) / 2 h。最后使用全自动生化仪检测总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、TCHO、谷氨酰转肽酶 (GGT)、总胆红素 (TBIL) 和三酰甘油 (TG) 水平。

2.4 血清生化检测及肝脏系数检测

第 8 天将以上动物进行腹主动脉取血, 3 000 r/min 离心 10 min 得到上清液, 置于全自动生化仪中测定 ALT、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、ALP、TP、ALB、TCHO、尿素氮 (BUN)、GGT、TBIL、血糖 (GLU)、TG、血肌酐 (CREA)、肌酸激酶 (CK)、 Na^+ 、 K^+ 、 Cl^- 水平。并活检取肝脏, 计算肝脏系数。

2.5 肝组织病理学检查

取适量肝脏组织, 放入 4%多聚甲醛溶液固定后, 石蜡包埋, 制成石蜡肝脏样本, 切片机切成 4 μ m 厚度, 常规脱蜡水化, 经苏木精-伊红 (HE) 染色后光镜检查。

2.6 实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测 BSEP、MRP2、MRP3 mRNA 的表达

2.6.1 引物设计 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成, 内参选用 β -actin, 引物序列见表 1。

2.6.2 提取组织样本总 RNA 取 20~40 μ g 动物肝组织样本, 应用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 具体操作见试剂盒说明书, 置于一 80 $^{\circ}\text{C}$ 保存于后续试验。

2.6.3 总 RNA 纯度与浓度的检测 使用 NaNO 2 000 紫外分光光度计, 取 1 μ L RNA 测定获得的 RNA 纯度及浓度。

2.6.4 反转录 反应体系: 5X All-In-One RT MasterMix, 4 μ L; 总 RNA, 2 μ L; 去离子水, 14 μ L。

表1 BSEP、MRP2、MRP3及 β -actin基因的引物序列
Table 1 Sequence of primers and size of product for BSEP, MRP2, MRP3, and β -actin genes

基因	引物序列	产物长度/bp
MRP2	5'-AAA CCT TAA CCG GGG ACG-3'	18
	5'-CGC TCA ACT GCC ACA ATG-3'	18
MRP3	5'-AAT TGG ATG ATA CGG ACGC-3'	19
	5'-ATT CTT CAG CAC CAA CTCGA-3'	20
BSEP	5'-ACA AAG AGG CTG CGG AAAT-3'	19
	5'-AGG CCG CAA TGA TGT TAGT-3'	19
β -Actin	5'-CGA GTA CAA CCT TCT TGC AGC-3'	21
	5'-GCC CAC GTA GGA GTC CTT C-3'	19

反应条件: 25 °C, 10 min; 42 °C 15 min; 85 °C 5 min。

2.6.5 Real-Time PCR 按照产品说明使用 2X KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix2 Universal 进行扩增, 反应体系: 2×KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix² Universal, 4 μ L; 10 μ mol/L 上游引物, 0.4 μ L; 10 μ mol/L 下游引物, 0.4 μ L; 模板 DNA, 1 μ L; 加入无 RNA 酶水至 20 μ L。扩增程序为: 95 °C 3 min; 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 循环 40 次;

收集荧光信号。反应完成后在 65~95 °C 进行溶解曲线分析, 每 5 s 升高 0.5 °C。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方程法计算。

2.7 数据分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 SPSS 19.0 进行分析。运用单因素方差分析进行方差齐性检验, 当方差齐时用 LSD 进行组间比较, 方差不齐用 Dunnett's T3 进行比较。并使用 GraphPad Prism 6 软件进行作图。

3 结果

3.1 对大鼠体质量的影响

表 2 为大鼠给药 2~8 d 体质量变化 (因 7 d 给药后禁食, 8 d 体质量均下降), AEP 组体质量逐渐增加, 与对照组比较差异不显著, 说明单纯给予 AEP 并无毒性; 而给予 LPS 的 3 组大鼠体质量从 2 d 开始, 较未给予 LPS 的两组体质量明显降低 ($P < 0.05$); LPS+APAP 组至 8 d 体质量最低, 但与对照组比较差异不显著; LPS+AEP 组从 2 d 开始体质量明显低于对照组和 AEP 组 ($P < 0.05$), 说明经过 LPS 诱导的 AEP 可出现毒性。

表2 AEP连续ig给药7d对大鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of AEP on body weight of rats in 7 d oral administration ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	体质量/g							
		给药 1 d	给药 2 d	给药 3 d	给药 4 d	给药 5 d	给药 6 d	给药 7 d	给药 8 d
对照	—	204.9±7.5	215.1±4.7	223.8±6.0	234.5±6.5	243.4±8.9	249.0±8.9	258.6±9.3	245.2±10.5
LPS	—	206.3±7.4	177.2±8.7 [*] Δ	177.4±11.2 [*] Δ	198.2±12.7 [*] Δ	211.2±13.4 [*] Δ	218.4±14.8 [*] Δ	229.9±15.9 [*] Δ	219.4±16.9 [*] Δ
LPS+APAP	0.625	201.3±7.3	176.3±4.8 [*]	175.6±6.7 [*]	187.5±10.5 [*]	200.5±7.6 [*]	201.8±6.5 [*]	207.1±9.6 [*]	198.9±10.0 [*]
AEP	12.0	203.6±4.9	210.2±4.4 [#]	219.6±5.7 [#]	231.5±7.3 [#]	239.3±6.9 [#]	235.8±15.4 [#]	250.8±8.9 [#]	238.1±8.4 [#]
LPS+AEP	12.0	207.7±4.9	177.8±4.8 [*] Δ	172.9±11.6 [*] Δ	186.6±13.9 [*] Δ	204.6±11.1 [*] Δ	210.9±9.0 [*] Δ	222.1±9.0 [*] Δ	210.5±10.0 [*] Δ

与对照组比较: ^{*} $P < 0.05$; 与 LPS+APAP 组比较: [#] $P < 0.05$; 与 AEP 组比较: $\Delta P < 0.05$

^{*} $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs LPS + APAP group; $\Delta P < 0.05$ vs AEP group

3.2 对大鼠体征的影响

给药后 12 h 发现, 给予 LPS 的 3 组大鼠均出现严重腹泻导致体质量下降、四肢无力、饮食活动减少、毛发直立无光泽, 2 d 后逐渐恢复。粪便一般为金黄色, 其中 LPS+AEP 组粪便颜色较深。

对照组与 AEP 组各时间点均未出现明显腹泻, 饮食活动正常, 毛发柔顺光泽, 对照组粪便呈金黄色, AEP 组粪便为深褐色。

3.3 对大鼠肝脏系数的影响

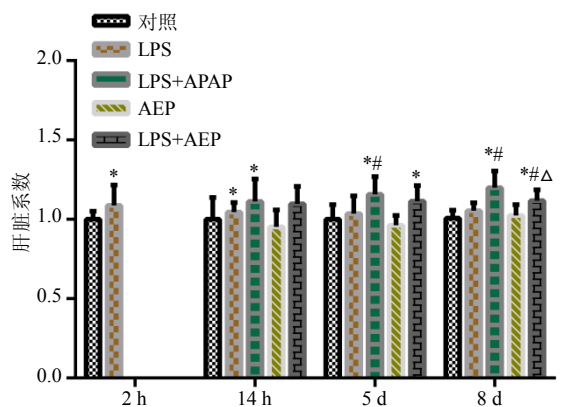
经 LPS 诱导后 2 h, LPS 组的肝脏系数与对照组比较明显升高 ($P < 0.05$) 说明 LPS 激活后可引起大

鼠肝脏肿胀; 14 h 后, AEP 组与对照组无显著性差异, 说明单纯给予 AEP 无毒性, 而 LPS+APAP 与 LPS 组与对照组比较, 肝脏系数明显升高 ($P < 0.05$); 5 d 时 LPS+APAP 与 LPS+AEP 组与对照组和 AEP 组比较, 肝脏系数升高 ($P < 0.05$), 而 LPS 较对照组肝脏系数恢复正常; 8 d 时 LPS+APAP 组与 LPS+AEP 组与对照组、AEP 组和 LPS 组比较, 肝脏系数升高 ($P < 0.05$), 同时 LPS+AEP 组与 LPS+APAP 组比较变化幅度有显著性差异 ($P < 0.05$)。说明经过 LPS 诱导的 AEP 可出现毒性, 但并没有 LPS+APAP 组严重。见图 1 (肝脏系数使用

各组与对照组比值表示)。

3.4 对大鼠胆汁流速、密度与生化指标的影响

8 d 时 LPS 和 AEP 组与对照组比较, 均无显著



与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$; 与 LPS+APAP 组比较: Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs LPS group; Δ $P < 0.05$ vs LPS + APAP group

图 1 AEP 对各组大鼠造模后 2 h、14 h、5 d 和 8 d 的肝脏系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Evolution of liver to body weight ratio in each group during experiment at 2 h, 14 h, 5 and 8 d ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

性差异, LPS+AEP 组胆汁流速与对照组、LPS 组和 AEP 组比较显著下降 ($P < 0.05$), 胆汁密度无显著性差异, 见表 3。胆汁生化分析结果显示, LPS+AEP 组大鼠胆汁中 TCHO 较对照组明显升高 ($P < 0.01$), 而 TBIL 显著降低 ($P < 0.05$), 其他指标无显著性差异, 结果见表 4。

表 3 AEP 对大鼠胆汁流速、密度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of AEP on flow velocity and density of bile in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	胆汁流速/ (mL·h ⁻¹)	胆汁密度/ (g·mL ⁻¹)
对照	—	0.88 ± 0.20	0.97 ± 0.01
LPS	—	0.87 ± 0.26	0.98 ± 0.01
LPS+APAP	0.625	0.95 ± 0.19	0.96 ± 0.03
AEP	12.0	0.86 ± 0.16	0.97 ± 0.01
LPS+AEP	12.0	0.71 ± 0.16 ^{*#Δ}	0.95 ± 0.01 [*]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$; 与 AEP 组比较: Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs LPS group; Δ $P < 0.05$ vs AEP group

表 4 AEP 对大鼠胆汁生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of AEP on bile biochemical indicators of bile in rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TP/(g·L ⁻¹)	ALB/(g·L ⁻¹)	TCHO/ (mmol·L ⁻¹)	GGT/ (U·L ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)
对照	—	2.37 ± 0.39	0.30 ± 0.28	0.32 ± 0.07	14.7 ± 5.9	4.39 ± 2.34	0.07 ± 0.01
LPS	—	2.52 ± 0.52	0.58 ± 0.15	0.47 ± 0.11	10.6 ± 1.1	2.36 ± 0.59	0.07 ± 0.02
LPS+APAP	0.625	2.14 ± 0.19	0.24 ± 0.15	0.37 ± 0.13	12.0 ± 3.2	3.01 ± 1.76	0.06 ± 0.02
AEP	12.0	2.23 ± 0.20	0.43 ± 0.19	0.35 ± 0.10	10.7 ± 2.5	2.92 ± 1.70	0.07 ± 0.01
LPS+AEP	12.0	2.50 ± 0.85	0.34 ± 0.54	0.44 ± 0.04 ^{**}	11.7 ± 4.0	1.94 ± 0.90 [*]	0.07 ± 0.02

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

3.5 对大鼠血清生化的影响

如表 5 所示, 8 d 时, LPS+APAP 组肝细胞损伤相关指标 ALT、AST 显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01); AEP 组与 LPS+AEP 组大鼠血清 ALT、AST 与对照组和 AEP 组比较无显著性差异, 说明该模型对转氨酶指标不敏感; LPS+AEP 组与 LPS 组胆汁淤积相关指标 ALP 水平较对照组显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), LPS+AEP 组 TBIL 水平较对照组显著降低 ($P < 0.05$), TCHO 和 K⁺水平较 AEP 组升高 ($P < 0.05$); 另外还可观察到 LPS 组较对照组相比 GLU 升高而 TG 降低 ($P < 0.05$), 提示可能存在肝功能异常。

3.6 组织病理学检查结果

各组肝小叶结构完整, 肝束排列整齐, 汇管区胆管未见增生扩张。对照组肝窦适中, 肝细胞及组织未见病变; LPS 组肝细胞及组织未见明显病变; LPS+APAP 组可见大面积出血坏死, 部分肝窦狭窄, 偶见胞浆疏松, 嗜酸性变等退行性改变; AEP 组部分区域出现灶性坏死及炎细胞浸润; LPS+AEP 组可见局部严重病灶坏死, 结果见图 2。

3.7 对大鼠肝脏 BSEP、MRP2 及 MRP3 的 mRNA 表达的影响

3.7.1 对大鼠肝脏 BSEP mRNA 表达的影响 如图

3 所示, 给药后 14 h, LPS、LPS+APAP、LPS+AEP 组转录水平明显受到抑制 ($P<0.05$), 推测是 LPS 对大鼠 BSEP 的抑制。而 AEP 组转录水平升高近 4

倍 ($P<0.05$ 、 0.01), 说明单独给予何首乌对大鼠 BSEP 表达有短时激活作用, 可促进胆汁酸的分泌与排泄。

表 5 AEP 连续 ig 给药 7 d 对血生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 Effect of AEP on blood biochemical indicators of rats after 7 d administration ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	ALT/ (U·L ⁻¹)	AST/ (U·L ⁻¹)	ALP/ (U·L ⁻¹)	TP (g·L ⁻¹)	ALB/ (g·L ⁻¹)	TCHO/ (mmol·L ⁻¹)	BUN/ (mmol·L ⁻¹)	GGT/ (U·L ⁻¹)
对照	—	43.1±23.6	196.5±76.7	199.1±17.6	55.3±2.8	39.6±1.7	1.82±0.41	12.5±2.2	2.43±0.53
LPS	—	48.6±18.8	215.8±60.5	234.5±18.8**	53.9±1.9	38.3±1.1	1.97±0.22	13.4±1.6	3.88±1.46
LPS+APAP	0.6	59.2±29.3*	270.8±123.0**	201.0±49.3	53.3±9.5	38.6±7.1	1.79±0.50	13.3±2.4	4.13±1.73
AEP	12.0	41.8±12.4	166.9±65.9	202.1±67.5	48.5±12.1	33.9±9.5	1.52±0.43	11.3±1.7 [#]	2.00±0.53
LPS+AEP	12.0	37.1±11.0	185.9±46.5	261.0±52.2*	55.0±3.9	38.7±2.6	2.00±0.23 [△]	12.4±2.1	3.00±0.93

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	TBIL/ (μmol·L ⁻¹)	GLU/ (mmol·L ⁻¹)	TG/ (mmol·L ⁻¹)	CREA/ (μmol·L ⁻¹)	CK/ (U·L ⁻¹)	Na ⁺ / (mmol·L ⁻¹)	K ⁺ / (mmol·L ⁻¹)	Cl ⁻ / (mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.79±0.45	4.76±0.72	0.79±0.13	17.2±3.3	2491.1±1093.9	142.3±1.7	5.30±0.79	95.2±1.4
LPS	—	1.66±0.60	6.93±2.85*	0.59±0.22 [#]	18.3±3.7	1721.4±516.1	137.1±4.5	5.26±0.65	90.3±4.0
LPS+APAP	0.6	1.77±0.23	5.17±0.72	0.98±0.50	15.0±4.5	2582.0±1461.6	132.2±19.8	5.44±0.84	88.1±13.2
AEP	12.0	1.48±0.35	5.07±2.19	0.72±0.26	14.5±4.3	1921.9±848.6	133.1±26.5	4.71±0.93	89.5±16.9
LPS+AEP	12.0	1.22±0.33 [#]	5.31±1.65	0.66±0.14	15.9±3.6	1806.6±719	141.2±1.6	5.63±0.31 [△]	93.3±2.3

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 LPS+APAP 组比较: [#] $P<0.05$; 与 AEP 组比较: [△] $P<0.05$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs LPS+APAP group; [△] $P<0.05$ vs AEP group

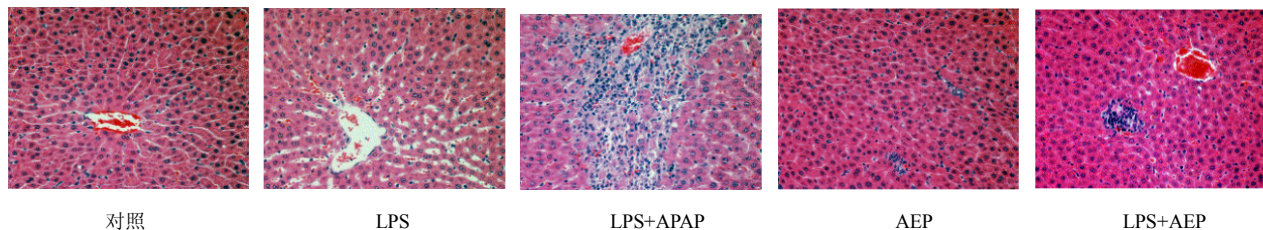
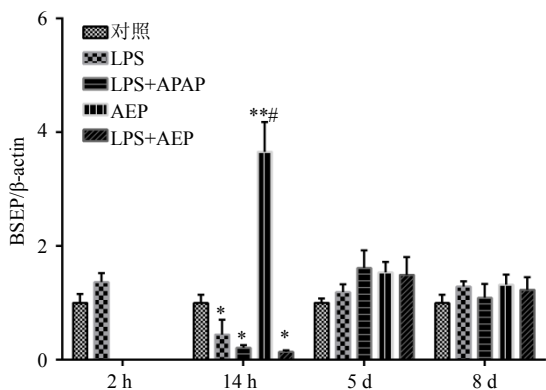


图 2 AEP 连续给药 7 d 后大鼠肝脏组织病理切片

Fig. 2 Effect of AEP on histological change of rat liver after 7 d administration



与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与 LPS 组比较: [#] $P<0.05$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs LPS group

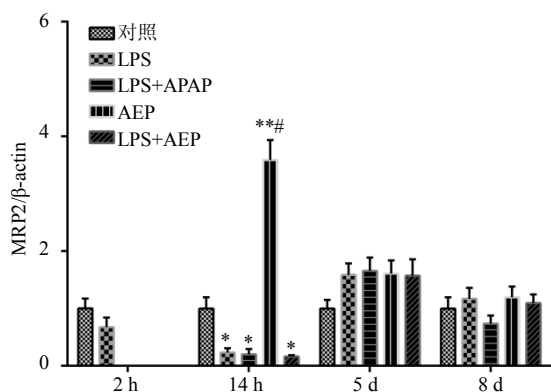
图 3 AEP 对大鼠肝脏 BSEP 转录水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 3 Effect of AEP on BSEP mRNA expression in rat liver ($\bar{x} \pm s, n=8$)

给药后 5 d, 各给药组差异不显著, 说明随时间推移, 各给药组已恢复。8 d 亦无显著性差异, 说明 LPS 诱导的何首乌肝损伤对 BSEP 无明显影响。

3.7.2 对大鼠肝脏 MRP2 mRNA 表达的影响 如图 4 所示, 与对照组比较, 给药后 14 h, LPS 组、LPS+APAP 组、LPS+AEP 组 MRP2 转录水平明显受到抑制 ($P<0.05$), 推测是 LPS 对大鼠 MRP2 的抑制; AEP 组转录水平明显升高近 4 倍 ($P<0.01$), 说明单独给予何首乌对大鼠 MRP2 表达有短时激活作用, 可促进胆汁酸的分泌与排泄。

5 d 时各给药组无显著性差异, 说明随时间推移, 各给药组已恢复。8 d 亦无显著性差异, 说明 LPS 诱导的何首乌肝损伤对 BSEP 无明显影响。但 8 d 各组转录水平有降低趋势。



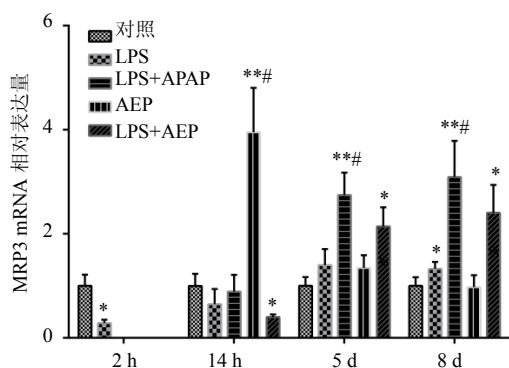
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs LPS group

图4 AEP对各时间点大鼠肝脏MRP2转录水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Effect of AEP on MRP2 mRNA expression in rat liver ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.7.3 对大鼠肝脏MRP3 mRNA表达的影响 如图5所示,给药后14 h,只有LPS+AEP组MRP3明显受到抑制($P < 0.05$),推测是LPS+AEP可增强对MRP3蛋白的抑制作用。而AEP组转录水平明显升高近4倍($P < 0.01$),说明单独给予何首乌对大鼠MRP3表达有短时激活作用,可促进胆汁酸的分泌与排泄。

14 h后,LPS+AEP组表达量逐渐升高,至5 d与对照组比较,显著升高($P < 0.05$),说明经LPS诱导的何首乌反而可增加MRP3蛋白表达;LPS组无明显变化,至8 d时,与对照组比较,明显升高



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较: # $P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs LPS group

图5 AEP对各时间点大鼠肝脏MRP3转录水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effect of AEP on MRP3 mRNA expression in rat liver ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

($P < 0.05$);而AEP组MRP3在5 d之后表达较14 h降低,恢复至对照组水平。

4 讨论

对动物体质量的观察结果显示,单纯给予AEP并不能使体质量出现明显变化,经LPS诱导后的动物体质量与对照组比较明显降低,说明LPS可激活大鼠Kupffer细胞相关的炎症免疫途径,使肝脏产生损伤^[14]。动物体征变化说明LPS诱导后12 h可出现毒性引起的腹泻,粪便颜色变化可能是由于胆汁成分改变或何首乌成分导致。肝脏系数的变化与病理结果也说明了单纯给予AEP未出现损伤,而与LPS的联合作用可出现肝肿大并产生局灶肝细胞坏死,但病理观察未发现汇管区多形核细胞浸润和胆管扩张等肝外胆汁淤积特征。胆汁密度和生化指标的变化表明,连续给药7 d后可改变大鼠胆汁成分,而血清ALP为胆汁淤积影响敏感指标,第8天给药组血清ALP升高和胆汁流速降低,提示出现胆汁淤积症状,但同样作为胆管酶的GGT无显著性差异。胆汁中TCHO升高而TBIL降低,提示AEP可影响胆汁成分的代谢和分泌。

以上结果可能与AEP影响相关胆酸盐转运体有关,其中BSEP主要转运单价和硫酸盐胆酸,能刺激胆汁酸盐依赖性胆汁流;MRP2能介导多特异性有机阴离子转运,借助谷胱甘肽形成非胆盐依赖性胆汁流;MRP3是多特异性有机溶质转运体,在正常肝组织中微弱表达,胆汁淤积时表达显著升高。对BSEP、MRP2及MRP3转录水平进行检测发现,造模后14 h,给予LPS组的BSEP与MRP2转录水平显著降低,与Zinchuk^[15]实验中LPS抑制蛋白表达结果一致。第8天MRP3水平升高,MRP3本身存在多种调控途径^[16],可在胆汁淤积时作为一种代偿机制,表达明显增加,以减轻对肝细胞和机体的损害。而第8天AEP对BSEP、MRP2转录水平无明显影响,说明何首乌并不是通过抑制转运蛋白BSEP与MRP2介导胆汁淤积,可能存在其他机制。近年来研究发现,肝脏中合成的胆汁酸是一种具有高度细胞毒性的洗涤剂分子,在肠道吸收与胆汁分泌过程中起到重要作用,而由药物引起的胆汁酸代谢失调可能是其导致胆汁淤积和炎症反应的重要诱因^[17-18]。

综上所述,LPS与AEP联合作用可出现胆汁淤积症状。LPS与APAP联合处理可见明显肝细胞损伤,但未见胆汁淤积相关指标变化。LPS诱导又可使得BSEP、MRP2在14 h时出现短期抑制,而单

纯的 AEP 可短时诱导时其表达水平增加, 长期来看, LPS 诱导的 AEP 对 BSEP、MRP2 无显著性影响, 但可使 MRP3 表达出现代偿性上调, 推测其可能通过影响胆汁酸和胆盐代谢造成胆汁分泌减少, 引起胆汁淤积症状。在肝细胞生成胆汁的过程中, 胆汁酸由胆固醇为原料进行合成, 部分以胆盐(钠盐或钾盐)的形式存在并与胆汁酸随胆汁一同排入肠内。因此后续研究可从胆汁酸代谢过程和胆汁中胆盐变化入手, 以期寻找其机制相关作用靶点。

参考文献

- [1] Banarova A, Koller T, Payer J. Toxic hepatitis induced by *Polygonum multiflorum* [J]. Vnitr Lek, 2012, 58(12): 958-962.
- [2] 陈盛君. 何首乌肝损伤不良反应信息分析及其毒性机制研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(7): 573-577.
- [3] 谢丽华, 樊星, 吴纯启, 等. 何首乌乙醇提取液对 LPS 诱导大鼠肝脏 CYP450 酶的影响 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 175-182.
- [4] 马喆, 赵珺睿, 董冉冉, 等. 基于高内涵分析技术的何首乌提取物及其主要成分肝毒性研究 [J]. 中草药, 2016, 47(22): 4021-4029.
- [5] 梅雪, 余刘勤, 陈小云, 等. 何首乌化学成分和药理作用的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(1): 122-131.
- [6] 朱云, 刘树红, 王伽伯, 等. 何首乌及其制剂导致药物性肝损伤的临床分析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(12): 1442-1447.
- [7] Elferink R O. Cholestasis [J]. Gut, 2003, 52 Suppl 2: ii42-48.
- [8] Ma X, Peng J H, Hu Y Y. Chinese herbal medicine-induced liver injury [J]. J Clin Transl Hepatol, 2014, 2(3): 170-175.
- [9] 涂灿, 蒋冰倩, 赵艳玲, 等. 何首乌炮制前后对大鼠肝脏的损伤比较及敏感指标筛选 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(4): 654-660.
- [10] Kis E, Iojă E, Nagy T, et al. Effect of membrane cholesterol on BSEP/Bsep activity: species specificity studies for substrates and inhibitors [J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37(9): 1878-1886.
- [11] Bode K A, Donner M G, Leier I, et al. Inhibition of transport across the hepatocyte canalicular membrane by the antibiotic fusidate [J]. Biochem Pharmacol, 2002, 64(1): 151-158.
- [12] 李春雨, 李晓菲, 涂灿, 等. 基于内毒素模型的首乌特异肝损伤评价 [J]. 药学学报, 2015, 50(1): 28-33.
- [13] Fan X, Wang J B, Xie L H, et al. A new animal model for *Polygonum multiflorum* Thunb-induced liver injury in rats and its potential mechanisms [J]. Toxicol Res, 2015, 4(4): 1085-1097.
- [14] Maddox J F, Amuzie C J, Li M, et al. Bacterial- and viral-induced inflammation increases sensitivity to acetaminophen hepatotoxicity [J]. Toxicol Environ Health A, 2010, 73(1): 58-73.
- [15] Li S, Wang C X, Liu N Z, et al. Anti-inflammatory effects of propofol on lipopolysaccharides-treated rat hepatic Kupffer cells [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 71(2): 845-85.
- [16] Zinchuk V, Zinchuk O, Okada T. Experimental LPS-induced cholestasis alters subcellular distribution and affects colocalization of Mrp2 and Bsep proteins: a quantitative colocalization study [J]. Microsc Res Tech, 2005, 67(2): 65-70.
- [17] Bohan A, Chen W S, Denson L A, et al. Tumor necrosis factor alpha-dependent up-regulation of Lrh-1 and Mrp3 (Abcc3) reduces liver injury in obstructive cholestasis [J]. Biol Chem, 2003, 278: 36688-36698.
- [18] Kawasaki Y, Matsubara K, Hashimoto K, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced vanishing bile duct syndrome treated with plasmapheresis [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2013, 57(5): e30-31.
- [19] Li T, Apte U. Bile Acid Metabolism and Signaling in Cholestasis, Inflammation, and Cancer [J]. Adv Pharmacol, 2015, 74: 263-302.