

基于免疫调控的六味五灵片对何首乌致大鼠特异质肝损伤的防治作用

贺兰芝^{1,2}, 孟雅坤^{2,3}, 张振芳², 韩延忠², 王亚², 伍珊娜^{2,3}, 孙小茗², 肖小河^{2*}, 王伽伯^{2*}, 柏兆方^{2*}

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208

2. 解放军第三〇二医院全军中医药研究所, 北京 100039

3. 江西中医药大学药学院, 江西 南昌 330004

摘要: 目的 基于内毒素脂多糖(LPS)模型,探讨六味五灵片对何首乌致大鼠特异质肝损伤的防治作用。方法 将80只SD大鼠随机分为对照组, LPS(2.8 mg/kg)组, 单独何首乌(生药2.16 g/kg)组, LPS(2.8 mg/kg)+何首乌(生药2.16 g/kg)组, LPS(2.8 mg/kg)+何首乌(生药2.16 g/kg)+六味五灵片低、中、高剂量(0.4、0.8、1.6 g/kg)组及LPS(2.8 mg/kg)+何首乌(生药2.16 g/kg)+阳性药联苯双酯(2 mg/kg)组。按组别分别ig给予相应剂量的六味五灵片和联苯双酯,每日1次,连续给药2 d,第3天除对照组和LPS组ig等量蒸馏水外,按组别分别ig给予何首乌醇提物,3 h后按组别尾iv LPS,给予LPS 7 h后戊巴比妥钠麻醉大鼠,下腔静脉取血并采集肝组织标本。比色法检测血浆中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST),HE染色观察肝组织病理学变化, TUNEL检测分析肝细胞凋亡, ELISA法检测血浆中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、 γ 干扰素(IFN- γ)水平,免疫组化染色观察肝组织核转录因子- κ B (NF- κ B) p65的表达。结果 六味五灵片能明显降低何首乌诱导的特异质肝损伤大鼠血浆中ALT和AST水平($P<0.05$),减轻肝组织病理损伤和肝细胞凋亡,明显抑制NF- κ B p65的表达($P<0.05$),同时明显降低血浆中TNF- α 等炎症因子水平($P<0.05$ 、 0.01)。结论 六味五灵片可通过抑制NF- κ B信号通路,减轻炎症反应,防治何首乌诱发的特异质肝损伤。

关键词: 六味五灵片; 何首乌; 特异质肝损伤; 脂多糖; 核转录因子- κ B信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)01-0136-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.01.019

Protective effect of Liuweiwuling Tablets on idiosyncratic liver injury induced by *Polygonum multiflorum* in rats based on immunomodulation

HE Lan-zhi^{1,2}, MENG Ya-kun^{2,3}, ZHANG Zhen-fang², HAN Yan-zhong², WANG Ya², Wu Shan-na^{2,3},
SUN Xiao-ming², XIAO Xiao-he², WANG Jia-bo², BAI Zhao-fang²

1. School of Pharmacy, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. China Military Institute of Chinese Medicine, 302 Military Hospital, Beijing 100039, China

3. School of Pharmacy, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

Abstract: Objective To investigate the protective effect of Liuweiwuling Tablets of *Polygonum multiflorum* (PM)-induced idiosyncratic hepatotoxicity. **Methods** Eighty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group, LPS group, PM group, LPS + PM group, LPS + PM + Liuweiwuling Tablets low, medium, and high dose (0.4, 0.8, and 1.6 g/kg) groups, and LPS + PM + positive drug Biphenyl group (2 mg/kg). All groups were orally given Liuweiwuling Tablets and Biphenyl once daily for consecutive 2 d according to the different dosages. On day 3, except the normal group and LPS group oral administration of distilled water, all groups were given PM (crude drug 2.16 g/kg), 3 h after the group by the tail vein injection LPS (2.8 mg/kg) according to the different dosage; After 7 h, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital, and the inferior vena cava was used to collect blood and liver tissue samples were collected. HE staining was used to observe the pathological changes of liver tissue, and the contents of ALT, AST,

收稿日期: 2016-08-22

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(81503350); 国家“重大新药创制”科技重大专项课题(2015ZX09501-004-001-008); 国家公益性行业科研专项课题(201507004-04); 2015年度国家中医临床研究基地业务建设第二批科研专项(JDZX2015188); 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地开放研究基金资助项目

作者简介: 贺兰芝, 硕士。Tel: (010)66933325 E-mail: m15874252210@163.com

***通信作者** 肖小河, 研究员, 主要从事临床中药学研究。Tel: (010)66933322 E-mail: pharmacy302@126.com

柏兆方, 助理研究员, 主要从事中药药理学研究。Tel: (010)66933325 E-mail: baizf2008@126.com

王伽伯, 副研究员, 主要从事临床中药学研究。Tel: (010)66933323 E-mail: wjb0128@126.com

TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IFN- γ in rat plasma were determined. TUNEL assay analyzed hepatocyte apoptosis, and immunohistochemical staining was performed to detect the liver tissue expression activity of NF- κ B p65. **Results** Liuweiwuling Tablets could decrease ALT and AST levels of PM-induced idiosyncratic liver injury rat plasma, reduce liver pathological injury and hepatocyte apoptosis, inhibit the expression of NF- κ B p65, and decrease plasma TNF- α and other inflammatory cytokines. **Conclusion** Liuweiwuling Tablets can reduce inflammation through the inhibition of NF- κ B signaling pathway, and prevent of PM induced idiosyncratic liver injury.

Key words: Liuweiwuling Tablets; *Polygonum multiflorum* Thunb.; idiosyncratic diathesis liver injury; LPS; NF- κ B signaling pathway

何首乌为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的块根, 是临床常用的传统无毒补益类中药。但近年来何首乌及其相关制剂肝损伤事件频发, 使其成为中药安全问题研究热点和难点^[1-4]。尽管何首乌致肝损伤病例报道较多, 但考虑到服用何首乌人群巨大, 其发生率相对较低, 结合在正常动物安全性评价中表现出的肝损伤不强的特点, 考虑何首乌所致的肝损伤可能为特异质肝损伤^[5-6]。已有大量文献报道证实, 联合使用无毒剂量的脂多糖 (LPS) 与一些药物共同作用, 可以产生类似临床特异质肝损伤反应。如临床发现有特异质肝损伤的曲伐沙星在 LPS 模型上表现出肝损伤, 而临床上没有特异质肝损伤的左氧氟沙星在 LPS 模型上则不能表现出肝损伤^[7], 证明 LPS 模型可以很好地评价临床药物特异质肝损伤。且 H₂ 受体阻断剂的例子也证明 LPS 模型的应用价值, 临床发现有特异质肝损伤的雷尼替丁在 LPS 模型上表现出损伤, 而临床上没有特异质肝损伤的法莫替丁在 LPS 模型上则不能表现出肝损伤^[8]。Deng 等^[9]报道 LPS 与双氯芬酸联合使用是通过激活免疫系统诱导的肝损伤, 因此 LPS 模型可以作为研究特异质肝损伤的有效方法之一。本课题组前期结合临床研究并采用广泛认可的低剂量内毒素—LPS 诱导的药物特异质肝损伤评价模型阐明了其免疫炎症特异质肝损伤属性^[10-12]。

六味五灵片是临床常用保肝复方中药, 由五味子、女贞子、连翘、莪术、苣荬菜、灵芝孢子粉组成。主要功效为滋肾养肝、活血解毒, 在治疗乙型病毒性肝炎、酒精性肝炎及肝硬化等方面均有较好疗效^[12-13]。已有临床及实验研究表明^[14-16], 六味五灵片对药物性肝损伤有较好的防治效果。但关于其对何首乌致肝损伤的防治作用尚未见报道, 因此, 本研究采用 LPS 诱导的免疫炎症特异质肝损伤模型, 探讨六味五灵片对何首乌致大鼠特异质肝损伤的防治作用。

1 材料

1.1 药品与试剂

何首乌饮片 (北京绿野药业有限公司, 批号

13101701); LPS、戊巴比妥钠 (Sigma 公司, 批号分别为 *E. coli* 055: B5 #044M4004v、57-33-1); 六味五灵片 (山东世博金都药业有限公司, 批号 151202); 联苯双酯 (北京协和药厂, 批号 15040201); 丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号分别为 20160512、20160512); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、 γ 干扰素 (IFN- γ) ELISA 试剂盒 (USCN, 批号分别为 SEA133Ra、SEA563Ra、SEA079Ra、SEA049Ra)。p65 (Cell Signaling Technology, 批号 8242S), 二抗 (Cell Signaling Technology, 批号 7074S), 其他所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器

SynergyH2 全功能微孔板检测仪 (美国 BioTek); Leica 2016 石蜡切片机 (上海莱卡仪器有限公司); 爱华 KPJ-1A 生物组织摊片烤片机 (天津天利航空有限公司); Nikon E200 光学显微镜。

1.3 实验动物

健康雄性 SD 大鼠, SPF 级, 6~8 周龄, 体重 (180 $\pm$ 20) g, 购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心, 合格证号 SCXK- (军) 2012-0004。分笼饲养于解放军第三〇二医院动物实验中心, 自由进食及饮水, 室温 (25 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 湿度 60%~80%, 人工光照约 12 h/12 h 明暗周期, 并定期消毒。

2 方法

2.1 何首乌提取物的制备

基于本课题组前期实验, 50%乙醇冷浸提取何首乌的肝细胞毒性最强^[17], 故本实验采用 50%乙醇冷浸制备何首乌提取物。称取适量生何首乌饮片, 加 8 倍量的 50%乙醇冷浸提取, 共提取 2 次, 每次 48 h, 合并提取液, 减压浓缩回收乙醇, 真空干燥得粗提物^[10-11], 临用前用去离子水配制成相应浓度 (按生药量配制)。

2.2 动物分组及给药

将 80 只 SD 大鼠随机分为对照组, LPS 组 (2.8

mg/kg), 单独何首乌组(生药 2.16 g/kg), LPS (2.8 mg/kg) + 何首乌(生药 2.16 g/kg) 组, LPS (2.8 mg/kg) + 何首乌(生药 2.16 g/kg) + 六味五灵片低、中、高剂量(0.4、0.8、1.6 g/kg) 组及 LPS (2.8 mg/kg) + 何首乌(生药 2.16 g/kg) + 阳性药联苯双酯(2 mg/kg) 组。LPS + 何首乌 + 六味五灵片组和 LPS + 何首乌 + 联苯双酯组分别 ig 给予相应剂量的六味五灵片或联苯双酯, 每日 1 次, 连续给药 2 d, 第 3 天单独何首乌组, LPS + 何首乌组, LPS + 何首乌 + 六味五灵片组和 LPS + 何首乌 + 联苯双酯组 ig 给予何首乌(生药 2.16 g/kg), 3 h 后除对照组及单独何首乌组外, 其余组均尾 iv LPS (2.8 mg/kg)。

2.3 标本采集

大鼠尾 iv 给予 LPS 7 h 后, 采用 1%戊巴比妥钠 ip 麻醉, 下腔静脉取血, 3 500 r/min 离心 10 min, 取血浆, 并采集肝脏标本。

2.4 肝脏病理学检查

取大鼠肝组织 1.5 cm × 1 cm × 0.5 cm, 10%甲醛固定, 常规病理切片, HE 染色, 光镜下观察。

2.5 血浆指标检测

采集大鼠血浆, 采用试剂盒(酶标仪法)检测肝功能指标 ALT、AST; ELISA 法测定炎症因子 TNF-α、IL-1β、IL-6、IFN-γ 的水平。

2.6 TUNEL 标记法检测肝细胞凋亡

采用 TUNEL 检测分析肝细胞凋亡情况, 具体操作参照试剂盒说明书进行, 以细胞核固缩呈不规则形、被染成棕褐色或分解碎裂成数块为阳性细胞。光镜下在每张玻片上随机选择 5 个视野, 观察各组肝凋亡细胞比例以确定凋亡率。

2.7 肝组织中 NF-κB p65 蛋白表达检测

肝组织石蜡切片常规脱蜡至水, 用高温进行抗原修复, 3%过氧化氢灭活内源性酶后, 5% BSA 封闭 20 min, 一抗 4 °C 过夜孵育, 次日滴加偶联二抗, 室温 30 min 后 DAB 显色, 苏木精复染, 透化, 封片, 显微镜观察。阳性表达为细胞核内出现棕黄色颗粒。各组均在显微镜 200 倍视野下随机拍摄 5 张图片, 用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件, 得到积分光密度值。

2.8 统计学分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料采用单因素方差分析 (ANOVA)。

3 结果

3.1 动物一般情况观察

大鼠给予何首乌醇提物后, 1~3 h 内出现轻微腹泻现象, 尿液颜色加深; 尾 iv LPS 后, 出现排便增多现象; 其中 LPS + 何首乌组大鼠出现大便稀溏, LPS + 何首乌 + 六味五灵片各剂量组大鼠排便量略有增加, 大便质地改变不明显, 尿液颜色趋于正常。

3.2 血浆转氨酶水平比较

实验结果显示, 与对照组比较, LPS 组及单独何首乌组大鼠血浆 ALT 和 AST 水平均无显著变化 ($P > 0.05$); 而 LPS + 何首乌组的 ALT 和 AST 水平均明显升高 ($P < 0.05$), 表明内毒素特异质肝损伤模型制备成功。与 LPS + 何首乌组比较, LPS + 何首乌 + 六味五灵片各剂量组和 LPS + 何首乌 + 联苯双酯组大鼠血浆中 ALT 和 AST 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 且 LPS + 何首乌 + 六味五灵片组呈剂量依赖性, 提示六味五灵片能减轻 LPS 联合何首乌致特异质肝损伤, 见表 1。

表 1 各组大鼠血浆 ALT 和 AST 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Comparison on ALT and AST in plasma of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·mL ⁻¹)	AST/(U·mL ⁻¹)
对照	—	9.75 ± 1.02	17.51 ± 1.09
LPS	2.8	11.37 ± 1.98	19.36 ± 2.53
单独何首乌	2 160	10.16 ± 1.20	18.64 ± 2.35
LPS + 何首乌	2.8 + 2 160	27.93 ± 3.22*	40.22 ± 4.00*
LPS + 何首乌 + 六味五灵片	2.8 + 2 160 + 400	20.22 ± 2.37 [#]	25.36 ± 3.15 [#]
	2.8 + 2 160 + 800	16.72 ± 1.88 [#]	20.60 ± 2.55 [#]
	2.8 + 2 160 + 1 600	11.34 ± 1.29 ^{##}	18.41 ± 2.21 ^{##}
LPS + 何首乌 + 联苯双酯	2.8 + 2 160 + 2	13.44 ± 1.67 [#]	21.75 ± 2.52 [#]

与 LPS 组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS + 何首乌组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

[#] $P < 0.05$ vs LPS group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs LPS + *P. multiflorum* group

3.3 肝组织病理学检查结果

HE 染色结果显示, 与对照组相比, 单独何首乌组大鼠肝组织无明显病理学改变; LPS 组大鼠肝组织有轻度的炎症细胞浸润, 未见肝细胞有明显病理学改变; 而 LPS+何首乌组可见中央静脉扩张(黑箭头), 胆管增生(绿箭头), 内膜脱落(黄箭头), 中央静脉周围发生空泡变性; 与 LPS+何首乌组相比, LPS+何首乌+六味五灵片各剂量组和 LPS+何首乌+联苯双酯组能明显减轻上述肝组织病理学损伤, 肝细胞结构完整, 排列整齐。提示六味五

灵片可明显改善 LPS 联合何首乌引起的肝组织损伤, 见图 1。

3.4 肝凋亡细胞 TUNEL 检测结果

TUNEL 检测结果显示, 对照组和单独何首乌组肝细胞无明显细胞凋亡, LPS+何首乌组肝细胞凋亡明显, 而 LPS+何首乌+六味五灵片各剂量组和 LPS+何首乌+联苯双酯组凋亡的细胞较 LPS+何首乌组显著减少, 其中 LPS 组偶有凋亡细胞的分布, 提示六味五灵片可抑制 LPS 联合何首乌引起的肝细胞凋亡, 见图 2 和表 2。

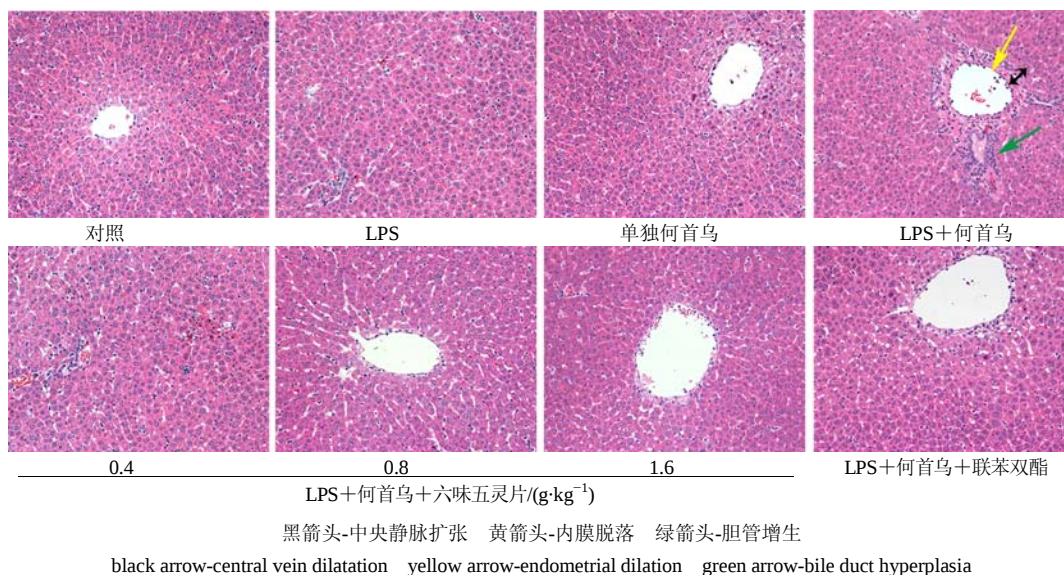


图 1 六味五灵片对何首乌致肝损伤大鼠肝组织病理学变化的影响

Fig. 1 Effect of LWWL on histologic change of hepatic tissue of rats with liver injury induced by *P. multiflorum*

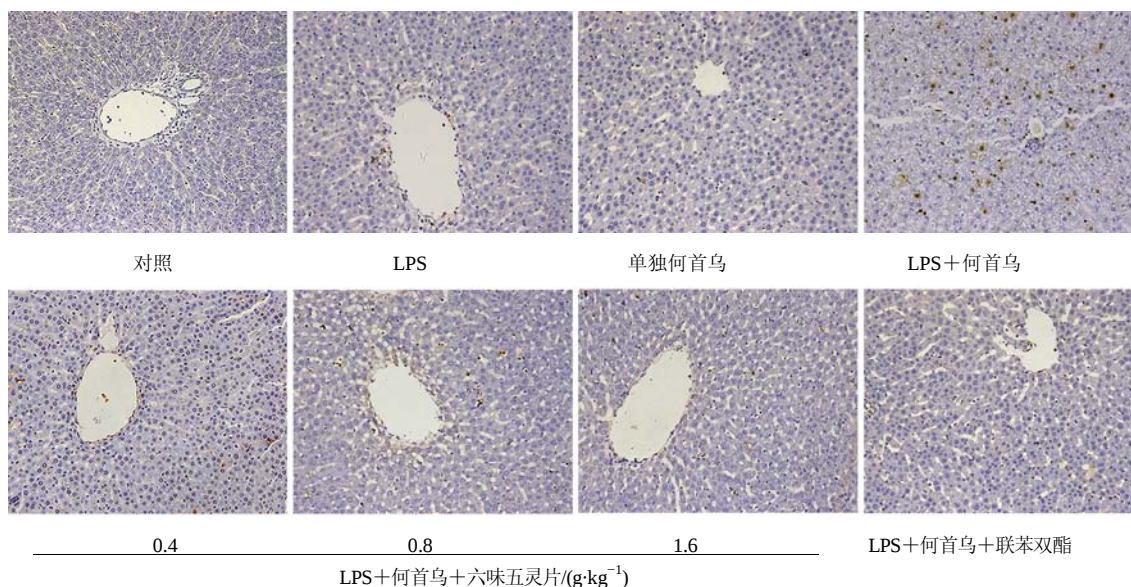


图 2 六味五灵片对何首乌致肝损伤大鼠肝细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of Liuweiwuling Tablets on hepatocytes apoptosis of rats with liver injury induced by *P. multiflorum*

表 2 六味五灵片对何首乌致肝损伤大鼠肝细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 2 Effects of Liuweiwuling Tablets on hepatocyte apoptosis in rats with liver injury induced by *P. multiflorum* ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	凋亡率/%
对照	—	1.48±0.23
LPS	2.8	2.30±0.83
单独何首乌	2 160	1.73±0.31
LPS+何首乌	2.8+2 160	22.46±3.23**
LPS+何首乌+六味五灵片	2.8+2 160+400	17.18±2.16 [#]
	2.8+2 160+800	9.49±1.63 [#]
	2.8+2 160+1 600	2.37±1.04 ^{###}
LPS+何首乌+联苯双酯	2.8+2 160+2	9.87±1.67 [#]

与 LPS 组比较: ** $P < 0.01$; 与 LPS+何首乌组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ ^{**} $P < 0.01$ vs LPS group; [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ vs LPS + *P. multiflorum* group表 3 六味五灵片对何首乌致肝损伤大鼠血浆中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 IFN- γ 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effect of Liuweiwuling Tablets on levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IFN- γ in plasma of rats with liver injury induced by *P. multiflorum* ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IFN- γ /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	22.48±2.57	52.35±4.59	9.06±1.45	27.52±3.42
LPS	2.8	32.25±4.36 [▲]	93.04±12.32 [▲]	16.83±3.31 [▲]	81.29±7.99 [▲]
单独何首乌	2 160	26.64±2.67	58.76±4.69	10.14±2.15	32.20±6.96
LPS+何首乌	2.8+2 160	92.92±9.45*	187.14±18.48*	29.01±3.99*	137.27±12.83*
LPS+何首乌+六味五灵片	2.8+2 160+400	66.13±6.82 [#]	74.16±15.52 [#]	18.53±3.42 [#]	94.74±9.56 [#]
	2.8+2 160+800	47.25±4.51 [#]	64.54±14.11 [#]	14.59±3.51 [#]	68.01±6.50 [#]
	2.8+2 160+1 600	27.84±2.89 ^{###}	53.75±11.51 ^{###}	11.44±3.42 [#]	44.70±4.42 ^{###}
LPS+何首乌+联苯双酯	2.8+2 160+2	33.63±3.21 ^{###}	64.21±12.78 ^{###}	18.84±3.87 [#]	47.54±4.63 ^{###}

与对照组比较: [▲] $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS+何首乌组比较: [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ [▲] $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.01$ vs LPS group; [#] $P < 0.05$ ^{###} $P < 0.01$ vs LPS + *P. multiflorum* group3.6 肝组织中 NF- κ B p65 表达的检测结果

免疫组化检测结果显示,单独何首乌组肝组织中 NF- κ B p65 的表达与对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$), LPS+何首乌组肝组织中 NF- κ B p65 的表达明显高于对照组和 LPS 组 ($P < 0.05$),而 LPS+何首乌+六味五灵片各剂量组较 LPS+何首乌组 NF- κ B p65 的表达明显降低 ($P < 0.05$),表明六味五灵片能明显抑制 NF- κ B p65 的表达,见图 3 和 4。

4 讨论

何首乌是传统补益类中药,但近年来肝损伤事件频发,引起国内外药品监管部门和研究机构的高度重视。本课题组前期研究证实何首乌肝损伤为特异质肝损伤^[10-11],本实验采用内毒素模型对何首乌的肝毒性作用进行了评价,结果显示,单独给药何首乌(生药 2.16 g/kg)和 LPS (2.8 mg/kg)未见肝

3.5 血浆中 TNF- α 、IL-1 β 等炎症因子水平的检测结果

ELISA 法测定各组大鼠血浆中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 及 IFN- γ 水平,单独何首乌组与对照组比较各细胞因子无显著性差异 ($P > 0.05$);与对照组相比, LPS 组各细胞因子均明显升高 ($P < 0.05$);与 LPS 组相比, LPS+何首乌组血浆中炎症因子水平均明显升高 ($P < 0.05$);与 LPS+何首乌组相比, LPS+何首乌+六味五灵片各剂量组和 LPS+何首乌+联苯双酯组各炎症因子水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01),且六味五灵片呈剂量依赖性。结果提示六味五灵片可抑制 LPS 联合何首乌引起的免疫炎症反应,见表 3。

损伤现象;而在 LPS 特异质肝损伤模型上,生药剂量 2.16 g/kg 何首乌即可造成实验大鼠肝功能损伤,说明内毒素模型可用于何首乌特异质肝损伤评价。因此,本研究基于 LPS 特异质肝损伤模型,探讨六味五灵片对何首乌致特异质肝损伤的防治作用。

既往研究表明,六味五灵片可安全有效地防治药物性肝损伤,发挥保肝护肝作用^[14]。刘明^[15]研究证实六味五灵片能有效防治抗结核药物(异烟肼、利福平、吡嗪酰胺等,其中异烟肼可致特异质肝损伤)诱导的肝损伤;Lei 等^[16]研究提示六味五灵片能有效防治对乙酰氨基酚诱导的肝损伤。但关于其何首乌致特异质肝损伤的防治作用尚未见报道,因此,本研究采用 LPS 诱导的免疫炎症特异质肝损伤模型,探讨六味五灵片对何首乌致大鼠特异质肝损伤的防治作用。

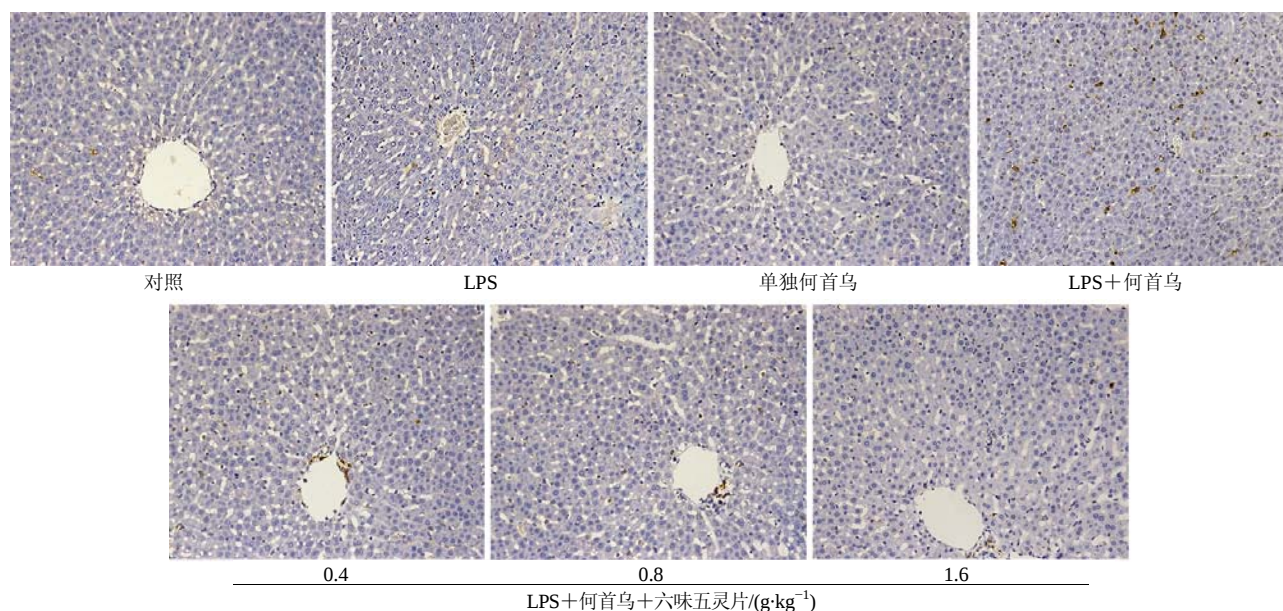
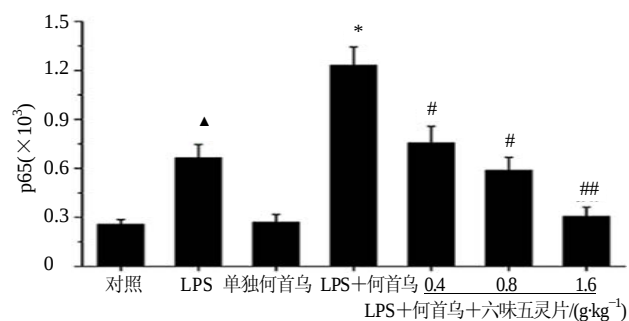


图 3 各组肝组织内 p65 表达的免疫组化检测

Fig. 3 Effect of Liuweiwuling Tablets on expression of p65 in liver tissue of rats detected with immunohistochemistry staining



对照组比较: ▲ $P < 0.05$; 与 LPS 组比较: * $P < 0.05$; 与 LPS+何首乌组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$
▲ $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.01$ vs LPS group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs LPS + *P. multiflorum* group

图 4 六味五灵片对何首乌致肝损伤大鼠肝组织内 p65 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 4 Effect of Liuweiwuling Tablets on expression of p65 in liver tissue of rats with liver injury induced by *P. multiflorum* ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

内毒素是革兰阴性菌细胞壁的一种成分,是重要的致炎因子。NF- κ B 是内毒素信号转导途径下游一个重要的转录因子,通常以二聚体形式存在于多种细胞质中。炎症刺激物所致 NF- κ B 活化的经典途径依赖 I κ B 激酶 β (I κ B kinase- β , IKK β) 活化,降解 NF- κ B 抑制蛋白 (inhibitor kappa B, I κ B),致使 NF- κ B 活化入核,对众多免疫炎症基因发挥关键性的调控作用^[18-19]。刘添等^[20]研究表明,六味五灵片对 LPS 联合 D-氨基半乳糖 (GalN) 所致的肝损伤也有较好的防护作用。

本研究在内毒素特异质肝损伤模型评价基础上,探讨六味五灵片对何首乌诱导的特异质肝损伤的防治作用。实验结果显示,六味五灵片能明显降低肝损伤大鼠血浆中 ALT 和 AST 水平,减少大鼠肝组织炎症细胞浸润及肝细胞的凋亡,提示六味五灵片具有抑制肝损伤的作用;此外,六味五灵片还可抑制 NF- κ B p65,进而降低 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等相关免疫炎症因子的水平,表明六味五灵片能减轻免疫炎症反应。

综上所述,六味五灵片对何首乌诱导的免疫炎症特异质肝损伤有防治作用,但其具体临床疗效还有待进一步验证。

参考文献

- [1] 王涛,王佳颖,周植星,等.何首乌水提物大鼠连续灌胃给药 28 d 肝毒性研究——胆汁淤积相关性分析[J].中国中药杂志,2012,37(10): 1445-1450.
- [2] 常青,赵海娟,李春,等.制首乌联合定量运动对大鼠肝脏微循环及肝功能的影响[J].中国药物警戒,2014(11): 193-197.
- [3] 童瑞敏.何首乌及其制剂致药物性肝损伤 20 例分析[J].山东中医杂志,2015,34(12): 928-929.
- [4] Navarro V J, Senior J R. Drug-related hepatotoxicity [J]. *New Engl J Med*, 2006, 354(7): 731-739.
- [5] Lee W M. Drug-induced hepatotoxicity [J]. *New Engl J Med*, 2003, 349(5): 474-485.
- [6] Waring J F, Liguori M J, Luyendyk J P, et al. Microarray analysis of lipopolysaccharide potentiation of

- trovafloxacin induced liver injury in rats suggests a role for proinflammatory chemokines and neutrophils [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 16: 1080-1087.
- [7] Luyendyk J P, Lehman-McKeeman L D, Nelson D M, et al. Coagulation-dependent gene expression and liver injury in rats given lipopolysaccharide with ranitidine but not with famotidine [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 317: 635-643.
- [8] Deng X, Stachlewitz R F, Liguori M J, et al. Modest inflammation enhances diclofenac hepatotoxicity in rats: role of neutrophils and bacterial translocation [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006, 319: 1191-1199.
- [9] 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.
- [10] 李春雨, 李晓菲, 涂灿, 等. 基于内毒素模型的何首乌特异质肝损伤评价 [J]. 药学报, 2015, 50(1): 28-33.
- [11] 李晓菲, 李娜, 涂灿, 等. 基于内毒素特异质模型的生首乌与制首乌肝毒性比较研究 [J]. 中草药, 2015, 46(10): 1481-1486.
- [12] Han J, Su S H, Wang C P, et al. The clinical study of Liuwei Wuling tablet on chronic hepatitis B with chronic liver damage [J]. *Chin J Integr Trad West Med Liver Dis*, 2007, 17(5): 266-267.
- [13] 辛绍杰, 韩晋, 丁晋彪, 等. 六味五灵片治疗慢性乙型肝炎多中心随机对照研究 [J]. 中西医结合肝病杂志, 2009, 19(1): 7-9.
- [14] 魏兆勇, 褚廷广. 六味五灵片对肺结核化疗所致药物性肝损伤防治作用临床观察 [J]. 实用肝脏病杂志, 2011, 14(4): 299-300.
- [15] 刘明. 六味五灵片预防抗结核药物致肝损伤的疗效观察 [J]. 中国肝病杂志, 2012, 4(1): 26-28.
- [16] Lei Y C, Li W, Luo P. Liuweiwuling tablets attenuate acetaminophen-induced acute liver injury and promote liver regeneration in mice [J]. *World J Gastroenterol*: WJG, 2015, 21(26): 8089.
- [17] 吕旻, 王伽伯, 嵇扬, 等. 提取溶剂对何首乌肝细胞毒性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(20): 268-272.
- [18] Beier J I, McClain C J. Mechanisms and cell signaling in alcoholic liver disease [J]. *Biol Chem*, 2010, 391(11): 1249.
- [19] Ding J, Song D, Ye X, et al. A pivotal role of endothelial-specific NF-kappa B signaling in the pathogenesis of septic shock and septic vascular dysfunction [J]. *Immunology*, 2009, 183(6): 4031-4038.
- [20] 刘添, 周建平, 李绍旦. 六味五灵片对 LPS 联合 GalN 所致肝损伤的防护作用机制研究 [J]. 北京中医药, 2014, 33(3): 226-228.