· 实验研究 ·

奇士乐对免疫性肝损伤小鼠的保护作用*

姜　辉[1,2]　吴芙蓉[1]　夏伦祝[2]　陈纪军[3]　李　俊[1△]

中图分类号:R285.5　文献标志码:A　文章编号:1004-745X(2010)06-0990-03

【摘要】 **目的** 研究奇士乐对卡介苗联合脂多糖所致免疫性肝损伤小鼠的保护作用。**方法** 采用卡介苗 2.5mg 静脉注射致敏小鼠，第 10 日给予脂多糖 7.5μg 静脉注射，复制小鼠免疫性肝损伤模型，连续给药 10d。分光光度法测定血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬酸氨基转移酶(AST)含量；HE 染色法观测小鼠肝脏病理学变化；免疫组化技术观察肝组织肿瘤坏死因子(TNF-α)的表达情况。**结果** 奇士乐能降低免疫性肝损伤小鼠脾脏、肝脏指数和血清中 ALT、AST 的含量；减轻肝组织病理损伤程度；抑制肝脏中 TNF-α 的表达。**结论** 奇士乐对免疫性肝损伤小鼠具有保护作用。

【关键词】 免疫性肝损伤　肿瘤坏死因子　奇士乐

Protective Effects of *Qishile* on Immunological Liver Injury Mice

JIANG Hui[1,2], *WU Fu-rong*[1], *XIA Lun-zhu*[2], *et al*

1 *College of Pharmacy, Anhui Medical University* (*Hefei* 230032)

2 *The First Affiliated Hospital of Anhui University of Traditional Chinese Medicine* (*Hefei* 230031)

3 *Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences* (*Kunming* 650204)

【**Abstract**】 **Objective:** To study the protective effect of *Qishile* on immunological liver injury mice. **Methods:** Models were induced by injection of BCG and LPS in tail vein. After being given drug for 10 days, the ALT and the AST were assayed by spectrophotometry. The histopathologic changes of the hepatic tissues were observed by the HE stained method. The expressions of the TNF-α in hepatic tissues were determined by the immunohistochemistry method. **Results:** The spleen index, the spleen index, the ALT level and the AST level were decreased by *Qishile*. Moreover, the degree of the liver injury and the expression of the TNF-α were also inhibited by *Qishile*. **Conclusion:** *Qishile* is a significantly protective drug in immunological liver injury mice.

【**Key words**】 Immunological liver injury; Tumor necrosis factor; *Qishile*

奇士乐为中药复方制剂，主要含有人参、黄芪等 6 味药物，其有效成分可通过抑制人免疫缺陷病毒 (HIV)、促进 T 淋巴细胞转化、增加特异性细胞免疫功能等多环节、多途径对艾滋病患者发挥作用[1]。在前期研究的基础上[2]，为了进一步考察奇士乐对机体免疫功能的影响，本实验采用卡介苗联合脂多糖制备小鼠免疫性肝损伤模型，以观察奇士乐对其保护作用。

1　材料与方法

1.1　*试药*　奇士乐 (中国科学院昆明植物研究所提供)，呈淡黄色粉末状，以 0.5% CMC-Na 配成混悬液，临用前超声助悬；联苯双酯(BP)，北京协和药厂；医用卡介苗(BCG)，卫生部上海生物制品研究所；脂多糖 (LPS)，美国 Sigma 公司；AST、ALT 试剂盒，南京建成生物工程研究所；兔抗鼠 TNF-α 单克隆抗体、DAB 显色试剂，武汉博士德生物工程有限公司。

1.2　*动物*　昆明种小鼠，体质量(20.00±2.00)g，雄性，由安徽医科大学实验动物中心提供(皖动准字号 02 号)。动物饲养于无毒塑料盒中，每盒 5 只，每日更换垫料 1 次，自由摄食和饮水，保持室内温度 18～22℃，相对湿度 40%～60%，自然光照。

1.3　*仪器*　JT12001 电子天平，上海精天电子仪器厂；GL20A 全自动高速冷冻离心机，湖南仪器仪表总厂离心机厂；722S 分光光度计，上海精密科学仪器有限公司；XDS-1B 电子显微镜，重庆光电仪器总公司。

1.4　*模型制备*[3]　将小鼠随机分为正常组、模型组及奇士乐高(1800mg/kg)、中(900mg/kg)、低(450mg/kg)剂量组、阳性药物组(Bp150mg/kg)，每组 15 只。造模第 1 日除正常组外，其余各组小鼠尾部静脉注射 BCG 2.5mg/0.2mL(约含 5×10^7 个活菌数) 并灌胃相应药物，正常组及模型组灌胃等量溶剂，连续 10d。第 10 日，除正常组灌胃等量溶剂外，其余各组每只小鼠静脉注射 LPS 7.5μg/0.2mL。注射后禁食 16h，自小鼠后眼眶静脉丛采血，颈椎脱臼处死小鼠，称取脾脏、肝脏质量计算脏器指数。

1.5　*血清天门冬酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)含量测定*　常规方法分离血清，按试剂盒说明进行操作。

1.6　*肝脏病理学检查及分级*[4]　取肝右叶相同部位，大小约

1 安徽医科大学药学院(合肥 230032)

2 安徽中医学院第一附属医院(合肥 230031)

3 中国科学院昆明植物研究所(昆明 650204)

* 国家科技部"十五"重大科技专项(863)资助项目(No. 2004AA2Z3322)

△通信作者

1cm × 1cm × 0.5cm 的肝组织小块，置入 10% 甲醛溶液中固定，HE 染色，光镜下观察肝组织损伤程度，并进行病理组织学损伤程度分级："－"为未见明显病理损伤；"＋"为部分肝组织浊肿伴有散在的点状坏死，汇管区少许炎性细胞浸润；"＋＋"为肝细胞浊肿，有点状坏死及小灶性坏死，可见散在的肉芽肿形成，汇管区有大量炎性细胞浸润；"＋＋＋"为肝细胞浊肿并伴有片状坏死，肉芽肿形成，汇管区及周围有大量炎性细胞浸润。

1.7 免疫组化测定肝脏肿瘤坏死因子－α(TNF－α)的表达[5] 采用柠檬酸钠缓冲液热抗原修复，S－P 法免疫组织化学染色，用 DAB/H_2O_2 显色，苏木精复染。具体操作按试剂盒说明书，加 TNF－α一抗，用已知阳性切片作为阳性对照，用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.8 统计学处理 计量资料以（$\bar{x} \pm s$）表示，采用方差分析及秩和检验。

2 结 果

2.1 奇士乐对小鼠脏器指数的影响 见表 1。与正常组比较，模型组小鼠肝脏、脾脏明显肿大；与模型组比较，奇士乐中、高剂量组均能明显降低免疫性肝损伤小鼠的肝脏、脾脏指数。

表 1 各组小鼠脏器指数比较（mg/10g，$\bar{x} \pm s$）

组 别	n	脾脏指数	肝脏指数
正常组	10	49.84 ± 12.20	571.95 ± 114.86
模型组	10	102.77 ± 42.18*	703.91 ± 87.75*
奇士乐低剂量组	10	73.36 ± 14.23	648.99 ± 69.30
奇士乐中剂量组	10	66.93 ± 13.70△	625.37 ± 72.80△
奇士乐高剂量组	10	61.19 ± 14.23△△	619.75 ± 66.45△
阳性药物组	10	57.62 ± 57.62△△	590.58 ± 77.65△△

与正常组比较，* $P < 0.01$；与模型组比较，△ $P < 0.05$，△△ $P < 0.01$。下同

2.2 奇士乐对小鼠血清中 ALT、AST 水平的影响 见表 2。与正常组比较，模型组小鼠血清 ALT、AST 水平明显升高；与模型组比较，奇士乐中、高剂量组均能明显降低免疫性肝损伤小鼠血清 ALT、AST 水平。

表 2 各组对小鼠血清 ALT、AST 水平比较（U/L，$\bar{x} \pm s$）

组 别	n	ALT	AST
正常组	10	33.43 ± 13.86	38.12 ± 14.52
模型组	10	80.62 ± 24.93*	102.18 ± 27.15*
奇士乐低剂量组	10	63.62 ± 16.42	85.47 ± 26.43
奇士乐中剂量组	10	60.62 ± 13.71△	79.88 ± 17.89△
奇士乐高剂量组	10	54.62 ± 22.52△	77.71 ± 18.16△
阳性药物组	10	51.29 ± 21.94△	68.77 ± 15.85△△

2.3 各组小鼠肝脏组织病理学变化比较 见图 1，表 3。光镜下观察，正常组小鼠肝小叶结构清晰，以中央静脉为中心，周围是放射状排列的肝索、肝血窦；模型组动物肝小叶损伤，肝细胞浊肿，正常结构消失，汇管区及周围有大量炎性细胞浸润；阳性药物组可见轻度灶性坏死及肝细胞轻度浊肿；奇士乐高剂量组可明显减轻肝脏炎症细胞浸润和坏死程度。模型组与正常组、阳性药物组与模型组、奇士乐高、中剂量组与模型组比较，肝组织病理学分级差异均有统计学意义；阳性药物组与奇士乐各剂量组比较，差异无统计学意义。说明奇士乐对免疫性肝损伤小鼠有一定的保护作用。

2.4 各组小鼠肝组织中 TNF－α 表达比较 见图 2。正常对照组肝组织中 TNF－α 轻度表达。模型组中动物肝脏 TNF－α 呈强表达，主要表达在坏死区周围的肝细胞的胞核、胞膜中，呈棕黄色。与模型组比较，奇士乐高剂量组小鼠肝脏中 TNF－α 表达强度明显减弱，阳性面积减小，提示奇士乐可抑制免疫性肝损伤小鼠肝脏 TNF－α 的表达。

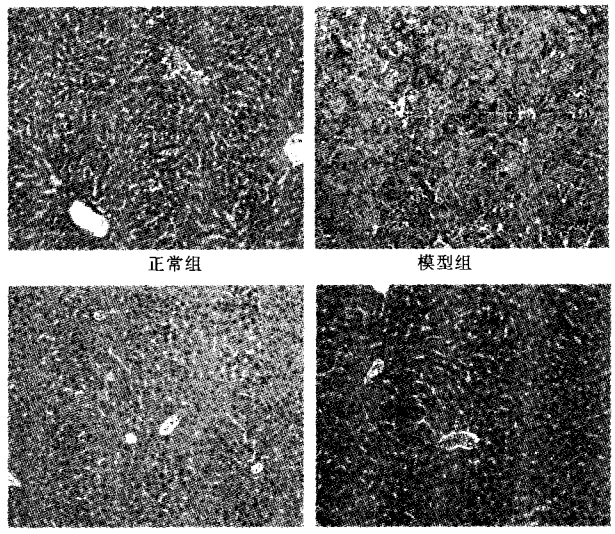

图 1 各组小鼠肝脏组织病理学变化（×100）

表 3 各组肝组织病理学分级比较（n）

组 别	n	病理学分级			
		0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
正常组	8	8	0	0	0△
模型组	8	0	1	2	5
奇士乐低剂量组	8	0	2	4	2△
奇士乐中剂量组	8	0	2	5	1△
奇士乐高剂量组	8	1	6	1	0△
阳性药物组	8	2	4	2	0△

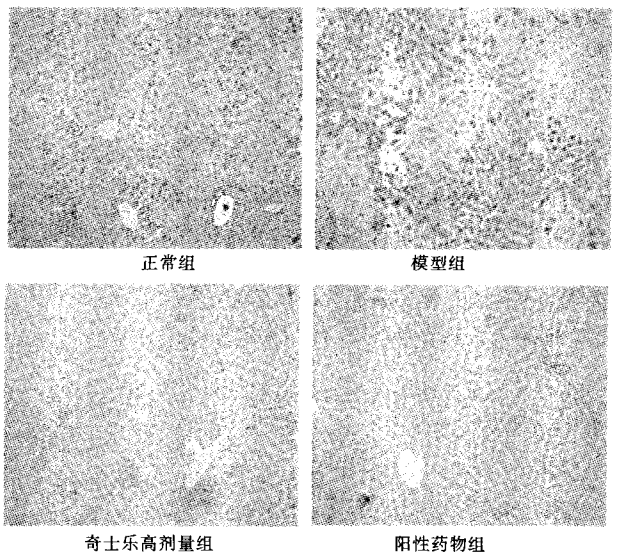

图 2 各组小鼠肝组织中 TNF－α 表达（×100）

3 讨 论

研究认为免疫功能紊乱在肝损伤过程中起重要作用，肝炎

与免疫功能密切相关。BCG 可使多核中性粒细胞或巨噬细胞聚集于肝，继后用低剂量 LPS 攻击，激发多核粒细胞或巨噬细胞，在致炎因子 TNF、IL－1、IL－8 等的作用下被激活致敏，释放对肝细胞有毒性作用的可溶性因子，造成免疫性肝损伤[6]。因此，用 BCG 联合 LPS 诱导小鼠产生免疫性肝损伤的动物模型是研究临床肝炎发病和治疗的较理想的模型，为药理研究中常用的方法[7]。

在肝内 ALT 主要分布于细胞浆内，AST 则主要分布于细胞浆和线粒体中。当肝脏出现脏器组织损伤或破坏、坏死时，酶从细胞内逸出进入血液，故血清中 ALT、AST 活性明显增高。因此 ALT 联合 AST 是肝炎活动的重要标志[8]。本实验结果表明，奇士乐能降低免疫性肝损伤小鼠血清中 ALT、AST 水平，且其各治疗组均可明显减轻肝脏炎症细胞浸润和坏死程度。提示奇士乐对 BCG + LPS 诱导的免疫性肝损伤小鼠有一定的保护。

在肝损伤过程中，TNF－α 是由肝枯否细胞释放的主要细胞因子，是细胞网络中介导肝损伤的终末递质，在肝损伤过程中起着重要作用[9~10]。有研究表明[11,12]，TNF－α 的产生受 NF－κB 的调控，而其释放增加又促进 IκB 的磷酸化，使 NF－κB 激活，延续炎症反应的复杂环路调节，导致最初的炎症信号不断放大。同时，TNF－α 作为肝损伤的第一介质，其出现将引起 NO、IL－1、IL－6、IL－8、SIL－2R 等的产生，并且 IL－1 等亦有增强 TNF－α 的肝损伤作用，即使少量 TNF 存在，宿主也可发生组织损伤。本实验结果表明奇士乐可抑制免疫性肝损伤小鼠肝脏 TNF－α 表达，可能与其发挥保护作用有关。

参 考 文 献

[1] 田春洪，张震．治疗 HIV/AIDS 中药的用药规律探讨[J]．云南中医中药杂志，2005，26(6)：13～14.

[2] 姜辉，李俊，胡成穆，等．奇士乐对佐剂性关节炎大鼠的免疫调节作用[J]．安徽医科大学学报，2007，42(3)：119～122.

[3] 徐叔云，卞如濂，陈修．药理实验方法学[M]．北京：人民卫生出版社，2002：1346～1350.

[4] 冯天保，田广俊，李华，等．福建叶下珠抗小鼠免疫性肝损伤的实验研究[J]．中药新药与临床药理，2005，16(5)：343～345.

[5] 崔东来，马骊，鲍启德，等．抑制 NF－κB 活性可减轻 CCl4 诱导的小鼠急性肝损伤[J]．河北医科大学学报，2006，27(2)：92～94.

[6] 熊筱娟，肖小华，徐丽英．乌索酸对小鼠急性免疫性肝损伤的影响[J]．中成药，2005，27(11)：1352～1354.

[7] Yajima T, Nishimura H, Saito K, et al. Overexpression of Interleukin－15 increases susceptibility to lipopolysaccharide－induced liver injury in mice primed with mycobacterium bovis bacillus Calmette－guerin [J]. Infect Immun, 2004, 72(7): 3855～3862.

[8] 沈洪，朱路佳，薛洁，等．生姜油不同部位对小鼠急性肝损伤保护作用的比较[J]．中成药，2008，30(9)：8～10.

[9] 李万平，肖顺汉，陈美娟，等．肝毒清颗粒对大鼠急性肝损伤保护作用研究[J]．中成药，2005，27(7)：806～808.

[10] 胡宗礼，黄晓萍，胡军，等．虎杖方剂对 CCl_4 致肝损伤大鼠 TNF－α 及细胞凋亡的影响[J]．中成药，2005，27(11)：1293～1295.

[11] Liu DF, Wei W, Song LH, et al. Up regulation of TNF－alpha and IL－6 mRNA in mouse liver induced by bacille Calmette－Guerin p lus lipopolysaccharide[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27(4)：460～468.

[12] Tukov FF, Luyendyk JP, Ganey PE, et al. The role of tumor necrosis factor alpha in lipopolysaccharide / ranitidine－induced inflammatory liver injury[J]. Toxicol Sci, 2007, 100(1): 267～280.

（收稿日期 2009－10－27）

· 临床报道 ·

中药保留灌肠治疗急性胰腺炎 30 例

诸孟娟

中图分类号：R576　文献标志码：B　文章编号：1004－745X(2010)06－0992－02

【摘要】 目的 观察中药保留灌肠治疗急性胰腺炎(AP)的临床疗效。**方法** 将 60 例 AP 患者随机分为治疗组与对照组各 30 例，均给与常规西医治疗，治疗组在此基础上加用中药保留灌肠治疗；比较两组发热、腹痛改善时间以及平均住院天数。**结果** 治疗组较对照组明显缩短发热、腹痛的时间以及住院日期。**结论** 中药保留灌肠联合西医治疗急性胰腺炎疗效显著。

【关键词】 急性胰腺炎　中药保留灌肠

我院消化科近年采用中药保留灌肠结联和西医治疗急性胰腺炎(AP)30 例，其中重症急性胰腺炎(SAP)3 例，并与单纯西医治疗对比。现将结果报告如下。

1　资料与方法

1.1　临床资料　选取 2006 年 10 月－2008 年 10 月我院消化科住院 AP 患者 60 例，其中 SAP 5 例，男性 38 例，女性 22 例；胆囊炎、胆石症 28 例；高脂血症、肥胖 12 例；酗酒、暴饮暴食 15 例；特发性 5 例；其中 2 次以上发病者 6 例。随机分为治疗组与对照组各 30 例。两组年龄、性别、病情严重程度等差异无显著性（$P > 0.05$），具有可比性。

1.2　治疗方法　两组均予常规西医治疗措施，包括禁食、胃肠减压、补液、维持水/电解质、酸碱平衡、应用抗生素控制感染、抑制胰酶活性、抑制胰腺分泌、质子泵抑制剂、营养支持等治疗。治疗组加用中药保留灌肠，基础方为生大黄 20g(后下)，芒硝 20g，黄芩 10g，厚朴 10g，丹参 20g，桃仁 10g，赤芍 10g，丹皮

江苏省常州市武进中医医院(武进 213161)

(下转第 995 页)