

• 论著 •

水飞蓟宾对急性肝损伤中肝细胞胀亡的影响及其机制

李荣萍, 任成山, 赵晓宴

(第三军医大学新桥医院消化内科, 重庆 400037)

【摘要】 目的: 探讨水飞蓟宾(SIL)在急性肝损伤中对肝细胞胀亡的影响及其机制。方法: 用 D-氨基半乳糖(D-GalN)诱导大鼠急性肝损伤模型, 用 SIL 进行干预, 于不同时间点检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)活性及肝组织核转录因子- κ B(NF- κ B)活性, 观察肝组织病理及肝细胞胀亡情况, 并计算胀亡指数(OI)。结果: SIL 能明显降低急性肝损伤模型大鼠血清 ALT、AST 活性(P 均 <0.05), 抑制 NF- κ B 活性($P<0.05$), 镜下显示肝组织损伤减轻程度, 减少肝细胞胀亡, 降低 OI(P 均 <0.05)。结论: SIL 可减少 D-GalN 所致大鼠肝细胞胀亡, 其机制可能与抑制 NF- κ B 活性有关。

【关键词】 D-氨基半乳糖; 水飞蓟宾; 肝损伤, 急性; 核转录因子- κ B; 胀亡; 肝细胞

中图分类号: R256.4; R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)04-0202-05

Effects of silibinin on oncosis in acute hepatic injury and its mechanism LI Rong-ping, REN Cheng-shan, ZHAO Xiao-yan. Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, Sichuan, China

Corresponding author: REN Cheng-shan (Email: renchengsh@sina.com)

【Abstract】 **Objective:** To explore the effects of silibinin on oncosis in D-galactosamine (D-GalN) induced acute hepatic injury and its mechanism. **Methods:** D-GalN was used to induce acute hepatic injury model in rats. Before and after 500 mg/kg of silibinin was given, at different time points, the activities of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) in serum, and nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity in liver tissue were measured. Liver pathological changes were observed by light microscope and transmission electron microscope (TEM). The oncosis of hepatocyte was also detected by TEM and oncosis index (OI) was calculated. **Results:** Silibinin could reduce the activities of ALT and AST in serum, NF- κ B activity and OI obviously (all $P<0.05$), and relieve the oncosis of liver tissues, while the degeneration of liver tissue was relieved under microscope in rats with acute hepatic injury (all $P<0.05$). **Conclusion:** Silibinin may reduce the oncosis of hepatocytes in D-GalN induced acute hepatic injury in rats and its mechanism may be related to the inhibition of NF- κ B activity.

【Key words】 D-galactosamine; silibinin; acute hepatic injury; nuclear factor- κ B; oncosis; hepatocyte

水飞蓟宾(silibinin, SIL)是水飞蓟素中最主要的生物活性成分, 具有清除自由基、抗脂质过氧化、抑制 5-脂氧合酶、保护肝细胞膜、促进损伤肝细胞合成 DNA 及结构蛋白等作用, 同时还具有免疫调节、抗肝纤维化、抗肿瘤及降血脂等广泛的药理学效应^[1,2]。近年研究表明, SIL 对多种肝细胞损伤动物模型及酒精性肝硬化患者均有保护作用^[3,4]。但有关 SIL 对肝细胞胀亡的影响研究较少。本实验中通过 D-氨基半乳糖(D-GalN)建立大鼠急性肝损伤模型, 初步探讨 SIL 在急性肝损伤中对肝细胞胀亡的影响及其机制。

基金项目: 全军医学科研“十五”计划重点课题(01Z074)

通讯作者: 任成山(Email: renchengsh@sina.com)

作者简介: 李荣萍(1974-), 女(汉族), 云南陆良人, 硕士研究生, 主治医师。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: D-GalN 购自重庆医科大学化学教研室(批号: 940404), 实验前用生理盐水配成体积分数为 10% 的溶液, 用 1 mol/L NaOH 调整 pH 至 7.2~7.4; SIL($C_{25}H_{22}O_{10} \cdot H_2O$)为中国药品生物制品检定所提供, 相对分子质量为 500.23; 核转录因子- κ B(NF- κ B)p65 单克隆抗体(单抗)购自 Santa 公司, SP-9001 试剂盒购自北京中杉试剂公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物模型制备: 60 只健康 SD 大鼠购于第三军医大学实验动物中心, 体重 200~300 g, 雌雄各半, 按随机数字表法分成对照组($n=12$)、模型组($n=24$)和 SIL 干预组($n=24$)。适应性喂养 1 周, SIL 干预组予 SIL 500 mg/kg 连续灌胃 7 d^[5,6], 再与模型组同时给予 D-GalN 100 mg/kg 腹腔注

射^[7],对照组给予等体积生理盐水腹腔注射。

1.2.2 血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的检测:分别于腹腔注射 D-GalN 后 4、8、12、16、20 和 24 h 取对照组 2 只、模型组 4 只、SIL 干预组 4 只大鼠,以复合氯醛麻醉,摘除眼球取血 2~3 ml,4℃ 离心取血清,日立-7110 型全自动生化分析仪(第三军医大学新桥医院检验科提供)检测血清 ALT 和 AST 水平。

1.2.3 肝组织的留取及病理学观察:断头处死大鼠,立即留取新鲜肝组织约 1 mm³,迅速放入体积分数为 2.5% 的戊二醛固定液中,送电镜中心检测,利用透射电镜观察肝细胞胀亡情况并计算胀亡指数(oncosis index, OI)。另外取部分肝组织,于体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋、脱水,4 μm 切片。部分切片常规苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肝细胞病理形态学改变;部分切片进行免疫组化检测。

1.2.4 免疫组化染色:按照免疫组化染色试剂盒 SP-9001 操作说明书进行,应用 NF-κB p65 单抗作为一抗,该抗体与 NF-κB 的亚单位 p65 区域结合,在正常情况下此区域被 NF-κB 抑制蛋白(IκB)所覆盖。当 IκB 释放后,抗 NF-κB p65 单抗才能结合,因此该抗体能够在原位识别活化的 NF-κB。3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,复染,封片。光镜下观察、照片、进行图像分析。用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作为空白对照。结果判定:阳性细胞为细胞核或细胞浆呈棕黄色染色。采用 Imageproplus 图像分析系统分析阳性细胞在参照系中所占相对面积百分比。

1.2.5 细胞胀亡的检测:利用透射电镜技术观察胀亡细胞,随机计数 1 000 个肝细胞中的胀亡细胞数,即为 OI^[8]。

1.3 统计学方法:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 12.0 统计分析软件,组间均数比较用方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有

统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况比较:注射 D-GalN 20 h 后模型组有 2 只大鼠死亡,死亡率为 8.3%,对照组、SIL 干预组未见大鼠死亡。模型组大鼠较对照组大鼠毛发失去光泽,食欲不振、精神萎靡、嗜睡、易激惹,体重无明显改变。

2.2 血清 ALT、AST 检测(表 1):注射 D-GalN 4 h 后,模型组大鼠血清 ALT、AST 较对照组明显升高,两者差异有显著性(P 均 < 0.05),且 ALT、AST 水平随时间逐渐上升,20 h 达到高峰。SIL 干预组较对照组同时间点均有不同程度增高,但较模型组明显降低(P 均 < 0.05)。

2.3 组织病理学特征

2.3.1 肉眼观察:①对照组大鼠肝脏色泽红润,形态大小正常,未见淤血、坏死;②模型组大鼠肝脏不同时间点均有不同程度的淤血、坏死,其损伤程度随致伤时间延长而加重,以 20~24 h 损伤最为严重,表现为肝脏弥漫性大片状淤血、坏死;③SIL 干预组也存在不同程度损伤,但其损伤程度较同时间点模型组明显减轻。

2.3.2 光镜病理结果:HE 染色发现:①对照组肝组织结构清晰、小叶完整,细胞形态、结构正常,未见浆细胞及中性粒细胞浸润;②模型组大鼠肝组织结构紊乱,界板消失,细胞肿胀,胞浆呈空泡化、气球样变,泡沫破裂,胞浆外溢,有不同程度的坏死及炎性细胞浸润,随时间的延长病变不断加重,受累细胞增多,以 20~24 h 病变最为严重(彩色插页图 1A, 1B);③SIL 干预组大鼠肝组织病理变化与模型组相似,也随时间延长不断加重,但同时间点比较,损伤较模型组明显减轻(彩色插页图 1C, 1D)。

2.3.3 电镜结果:①对照组肝细胞核膜结构清晰、完整,核内常染色质多,异染色质少,位于核周,其粗面内质网丰富,呈层状排列,许多核糖核蛋白体附着于膜上,线粒体数量较多,呈圆形或长圆形,结构完

表 1 各组不同时间点血清 ALT 和 AST 活性比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of activities of ALT and AST in serum at different time points in each group($\bar{x} \pm s$) U/L

组别	动物数(只)	指标	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
对照组	12	ALT	32.00±2.83	34.50±6.36	28.50±2.12	31.00±4.24	32.50±3.54	30.50±4.95
	12	AST	64.00±1.41	84.00±11.31	61.50±9.19	44.50±3.54	50.50±19.09	43.50±6.36
模型组	24	ALT	127.30±23.44*	136.30±17.90*	358.75±24.76*	1 499.25±378.42*	1 544.50±336.62*	1 182.00±354.18*
	24	AST	501.70±8.02*	540.00±46.36*	611.50±57.32*	1 883.50±336.58*	2 341.25±433.01*	1 421.00±379.30*
SIL 干预组	24	ALT	55.67±8.02#	69.30±17.00#	104.75±15.52#	392.00±42.31#	450.75±52.70#	344.00±53.01#
	24	AST	156.70±9.07#	204.70±23.75#	302.75±14.01#	689.00±81.67#	900.75±118.06#	660.25±120.10#

注:与对照组比较:* $P < 0.05$;与模型组比较:# $P < 0.05$

整,嵴丰富,基质均匀,呈中等电子密度,细胞质内有大量 α 糖原颗粒;②模型组致伤后 4 h 肝细胞开始出现变化,随时间延长肝细胞病变逐渐加重,OI 值升高,主要变化为肝细胞肿胀,胞浆空泡化,线粒体、内质网、核肿胀,基质电子密度增高, α 糖原颗粒明显减少,后期线粒体嵴数量减少,部分细胞胞膜起疱,结构崩解,胞浆外溢,核融解性空斑,染色质边集,核膜完整性破坏,即细胞胀亡样改变(彩色插页图 2A~2C);③SIL 干预组肝细胞病变程度与模型组相似,但同时间点比较损伤明显减轻,OI 值降低(彩色插页图 2D)。

2.4 肝组织 NF- κ B 的表达(彩色插页图 3):①正常肝细胞不表达 NF- κ B,或仅少量表达于细胞浆内;②致伤后 NF- κ B 表达迅速增加,并于 4 h 时达高峰,胞浆、胞核均有表达,后随时间延长表达逐渐下降,24 h 时接近正常;③SIL 干预肝细胞阳性表达程度较模型组明显下降($P < 0.05$)。各组不同时间点 NF- κ B 阳性细胞在参照系中所占相对面积百分比见表 2。

2.5 细胞胀亡的检测:透射电镜下发现模型组在致伤 4 h 后即出现细胞肿胀(彩色插页图 2),随时间延长 OI 值不断升高;SIL 干预组与模型组平行比较,OI 值明显下降(P 均 < 0.05);模型组和 SIL 干预组各时间点 OI 比较见表 3。

3 讨论

细胞死亡是细胞分裂增殖的另一面,一些疾病(如肿瘤)需要用一定的方式促进细胞死亡,而另一些疾病(如炎症、心力衰竭、动脉粥样硬化等)则需要阻止细胞死亡。在各种急、慢性肝病中,细胞死亡占有重要地位。目前研究认为,细胞胀亡是细胞死亡的主要方式之一。

细胞胀亡主要形态学特点为细胞肿胀,体积增

大,胞浆空泡化,胞浆内出现致密颗粒,内质网肿胀,线粒体早期可出现致密化,后期肿胀,絮状改变或出现高致密颗粒,嵴破坏;细胞肿胀波及胞核,核内染色质分散,凝集在核膜、核仁周围,有时聚集成团块。胞膜起疱是胀亡早期事件,随之胞膜通透性增加,胞膜崩解,胞内容物外溢,引起明显炎症反应^[9]。胀亡的发生是一种胞膜性事件,膜通透性变化是决定胀亡的关键^[10]。其主要原因是由于在自由基的作用下,细胞内钙离子及 ATP 缺乏,导致细胞膜的通透性增加,外水内流,使细胞肿胀。同时,线粒体渗透性改变,细胞浆膜破坏,引起胞浆及内容物肿胀,最终导致细胞胀亡的发生^[11]。

NF- κ B 是细胞中的一个重要转录因子,它是由多肽链 p65 和 p50 两个亚基形成的二聚体,包括 p50 同源二聚体, p65 同源二聚体及 p50-p65 异源二聚体,其中 p50-p65 异源二聚体发挥生理作用。在生理条件下, NF- κ B 的 p65 亚基与 I κ B 结合覆盖 p50 蛋白的核定位信号,使 NF- κ B 与 I κ B 形成复合体留在细胞质中,当细胞受到外界因素刺激时, NF- κ B 与 I κ B 分离, NF- κ B 进入细胞核内,其亚基形成环状结构与 DNA 接触,启动许多基因如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1)等的转录。其调控的基因产物如 TNF- α 在肝脏主要由激活的枯否细胞产生,并作为一个关键因子参与各种肝脏疾病的发生与发展^[12]。有资料显示,在实验性肝损伤时, TNF 等细胞因子均可以刺激肝脏产生大量一氧化氮(NO),而过量的 NO 是致肝损伤的重要介质^[13]。

SIL 具有抗脂质过氧化反应、清除自由基、抑制 5-脂氧合酶、维持细胞膜稳定性、促进肝细胞再生及降血脂作用,同时,有报道显示 SIL 能维持小鼠肝细胞微粒体及线粒体膜流动性^[14],临床主要用

表 2 各组 NF- κ B 阳性细胞在参照系中所占相对面积百分比($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Percentage of area of NF- κ B positive cells in each group($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
对照组	12	(2.27 \pm 0.18)%	(2.19 \pm 0.40)%	(2.09 \pm 0.59)%	(2.09 \pm 0.31)%	(1.96 \pm 0.25)%	(2.55 \pm 1.24)%
模型组	24	(38.36 \pm 4.75)%*	(21.13 \pm 1.82)%*	(12.48 \pm 0.81)%*	(8.62 \pm 1.63)%*	(5.83 \pm 0.67)%*	(4.10 \pm 1.15)%
SIL 干预组	24	(21.44 \pm 5.60)%#	(15.79 \pm 1.83)%#	(9.51 \pm 0.73)%#	(6.91 \pm 1.09)%	(4.53 \pm 1.24)%	(2.63 \pm 0.61)%

注:与对照组比较:* $P < 0.05$;与模型组比较:# $P < 0.05$

表 3 模型组和 SIL 干预组各时间点 OI 比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of OI between model group and SIL pretreated group at different time points($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	4 h	8 h	12 h	16 h	20 h	24 h
模型组	24	(0.019 2 \pm 0.003 6)%*	(0.024 4 \pm 0.003 0)%*	(0.033 2 \pm 0.005 7)%*	(0.039 2 \pm 0.007 8)%*	(0.057 7 \pm 0.008 3)%*	(0.080 2 \pm 0.008 1)%*
SIL 干预组	24	(0.011 5 \pm 0.001 3)%	(0.015 4 \pm 0.002 5)%	(0.017 5 \pm 0.004 2)%	(0.021 0 \pm 0.003 2)%	(0.025 4 \pm 0.004 6)%	(0.040 9 \pm 0.006 0)%

注:与 SIL 干预组比较:* $P < 0.05$

于治疗中毒性及酒精相关性肝病。在本研究中,应用 D-GalN 致伤大鼠后,随时间延长,大鼠血清肝酶不断升高, NF- κ B 活性增强, 胀亡细胞不断增多, OI 值升高。血清 ALT、AST 升高是肝实质严重损害的必然结果, 尤其是肝细胞变性、死亡, 线粒体肿胀、退变及内质网扩张, 无疑将直接影响肝细胞的正常功能^[15]。经 SIL 干预, 血清肝酶明显下降, NF- κ B 活性降低, 肝细胞 OI 降低。表明 SIL 可降低 NF- κ B 活性、减少细胞胀亡。结合 D-GalN 致伤机制分析, 当 D-GalN 作用于肝组织时, 肝细胞受到刺激, NF- κ B 与 I κ B 分离, NF- κ B 进入细胞核内, 启动许多基因的转录, 产生直接、间接毒性作用, 使细胞内钙离子及 ATP 缺乏, 细胞膜的通透性增加, 外水内流, 细胞肿胀, 线粒体的渗透性发生改变, 细胞浆膜破坏, 胞浆及内容物肿胀, 导致细胞胀亡。而 SIL 则通过其广泛的药理学效应, 减轻 D-GalN 对肝细胞的刺激, 保护肝细胞膜、维持肝细胞微粒体及线粒体的膜流动性、促进肝细胞修复, 从而抑制 NF- κ B 的活性, 减少肝细胞胀亡。

参考文献:

- [1] 于乐进, 顾长海. 利加隆及其药理学效应研究进展[J]. 国外医药合成药生化药制剂分册, 2000, 21: 201-203.
- [2] 杨晋, 刘雅敏, 刘延泽. 水飞蓟素药理学研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2004, 16: 185-187.
- [3] 谭海荣, 吴谦, 潘竞镛. 水飞蓟宾对抗大鼠酒精性脂肪肝作用及机制[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9: 803-806.

- [4] 任孟军, 左国庆, 何松. 水飞蓟宾对人肝癌细胞株 Hep G2 增殖的影响及其机制研究[J]. 重庆医学, 2005, 34: 369-372.
- [5] 贾俊清, 程钢, 陈正跃, 等. 水飞蓟宾-磷脂酰胆碱复合物对小鼠急性肝损伤保护作用的量效关系[J]. 新乡医学院学报, 2003, 20: 234-236.
- [6] 陈正跃, 吴子钊, 张光军. 水飞蓟宾-磷脂酰胆碱复合物的急性毒性研究[J]. 新乡医学院学报, 2002, 19: 352-354.
- [7] 贾因棠, 王守义. 肿瘤坏死因子及磷脂酶 A₂ 在实验性急性肝衰竭中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 1997, 13: 500-503.
- [8] 李向阳, 赵高峰, 僧静靖, 等. 结直肠腺瘤组织中细胞胀亡与血管内皮生长因子的关系[J]. 实用癌症杂志, 2004, 19: 262-264.
- [9] 任成山, 钱桂生. 细胞凋亡和胀亡及其与多器官功能障碍综合征关系的研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17: 247-250.
- [10] Hein S, Arnon E, Kostin S, et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart: structural deterioration and compensatory mechanisms [J]. Circulation, 2003, 107: 984-991.
- [11] Gujral J S, Farhood A, Jaeschke H. Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, 190: 37-46.
- [12] Watanabe T, Jono H, Han J, et al. Synergistic activation of NF- κ B by nontypeable Haemophilus influenzae and tumor necrosis factor- α [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101: 3563-3568.
- [13] 邢卉春, 赵龙凤, 王守义. 山莨菪碱对大鼠急性肝损伤的保护作用及其机制[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 11: 658-660.
- [14] 吴东方, 彭仁秀, 叶丽萍. 水飞蓟素对小鼠肝细胞微粒体及线粒体膜流动性的影响[J]. 中国中药杂志, 2003, 9: 870-872.
- [15] 周萍, 黄宏, 陈林. 烧伤后大鼠肝脏的病理形态学变化与肝功能的关系[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 201-203.

(收稿日期: 2005-11-03 修回日期: 2006-04-07)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎订阅 2006 年《中国中西医结合急救杂志》

《中国中西医结合急救杂志》系中国中西医结合学会主办、天津市天和医院承办的全国性科技期刊(为中国中西医结合学会系列杂志之一, 由《中西医结合实用临床急救》杂志更名), 是我国中西医结合急救医学界权威性学术期刊, 已进入国内外多家权威性检索系统。本刊为双月刊, 64 页, 国际通用 16 开大版本, 80 克双胶纸印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2006 年的订阅手续, 邮发代号: 6-93, 定价: 每期 6.9 元, 全年 41.4 元。

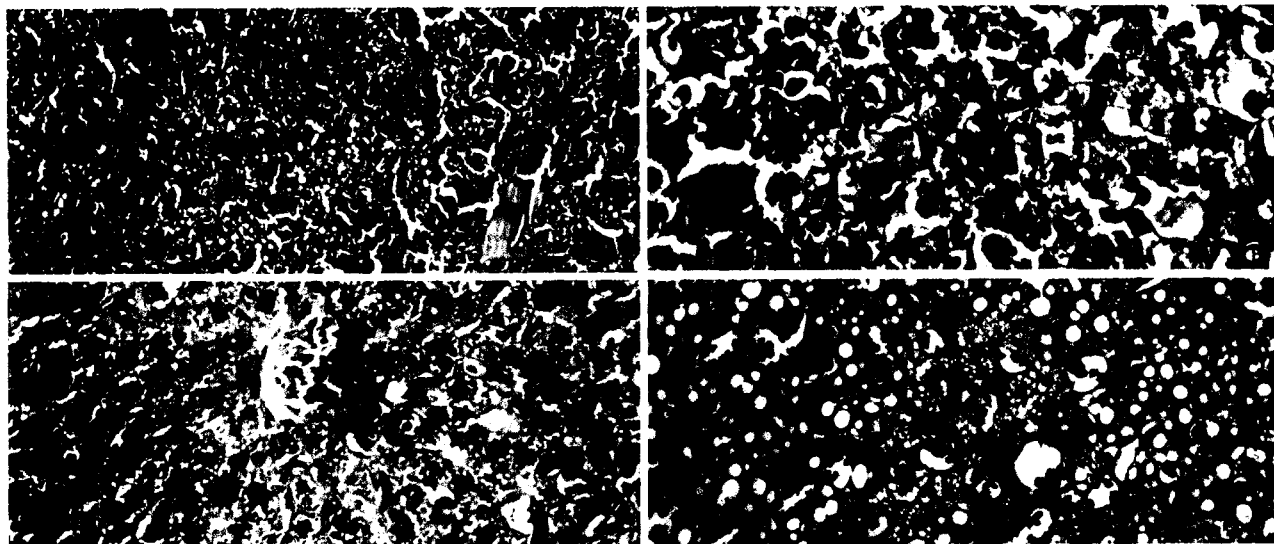
《中国中西医结合急救杂志》已经进入美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统(China Info)”、“中文科技期刊数据库”、“em120.com 危重病急救在线”以及国家中医药管理局“中国传统医药信息网”(http://www.Medicine China.com)。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议, 并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清, 不同意者论文可不投本刊。

《中国中西医结合急救杂志》开设有述评、专题讨论、博士论坛、论著、研究报告、经验交流、病例报告、治则·方剂·针灸、基层园地、临床病理(病例)讨论、消息、读者·作者·编者等栏目, 欢迎广大作者踊跃投稿。同时, 本刊倡导学术争鸣, 对所投稿件将予以重视, 优先考虑。

(本刊编辑部)

水飞蓟宾对急性肝损伤中肝细胞胀亡的影响及其机制

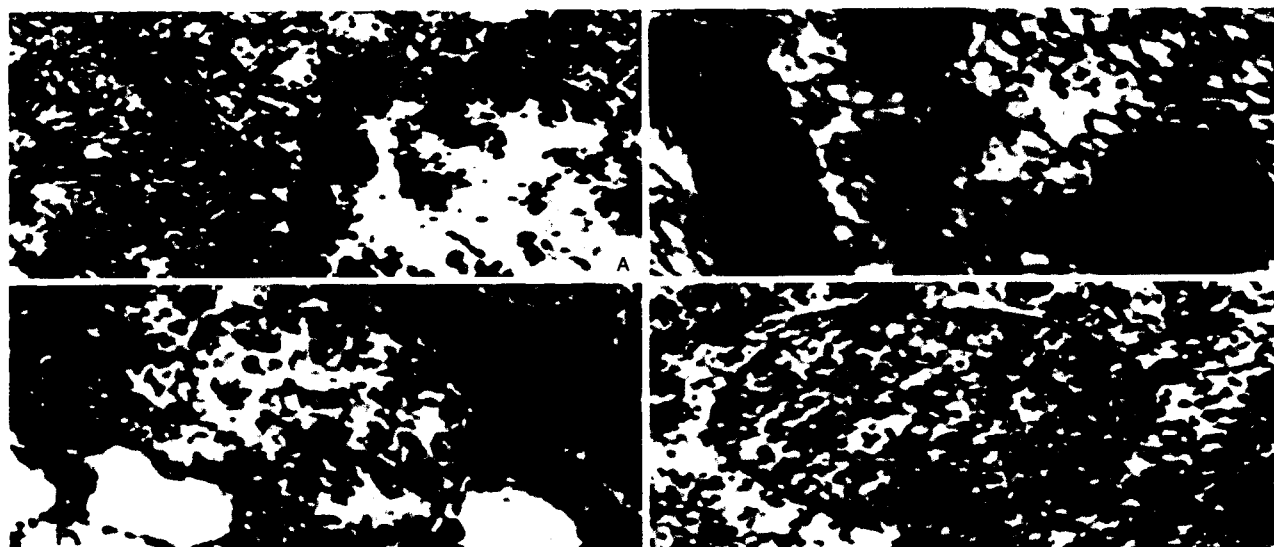
(正文见202页)



A: 模型组给药后12 h($\times 100$); B: 模型组给药后24 h($\times 400$)
C: SIL干预组给药后12 h($\times 400$); D: SIL干预组给药后24 h($\times 400$)

图1 光镜下大鼠肝组织病理学改变(HE)

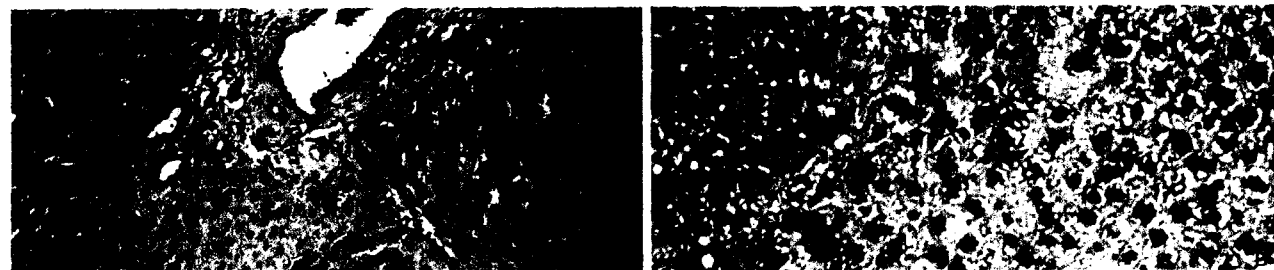
Figure 1 Pathological changes in liver tissue of rats under light microscope(HE)



A: 模型组肝细胞胀亡($\times 10\ 000$); B: 模型组线粒体变化($\times 34\ 000$);
C: 模型组细胞核变化($\times 4\ 200$); D: SIL干预组($\times 4\ 200$)

图2 电镜下大鼠肝细胞超微结构改变

Figure 2 Changes in ultrastructure of hepatocyte of rats under electron-microscopy



A: SIL干预组($\times 100$); B: 模型组($\times 400$)

图3 给药后4 h NF- κ B在肝组织中的表达(免疫组化)

Figure 3 Expression of NF- κ B in liver tissue after 4 hours treatment(immunohistochemistry)