

· 论著 ·

# 红花注射液对内毒素性急性肝损伤大鼠肝细胞凋亡的影响

祝 晨<sup>1</sup>, 黄小民<sup>2</sup>

(1. 浙江中医药大学, 浙江 杭州 310006; 2. 浙江省中医院急诊科, 浙江 杭州 310006)

**【摘要】** 目的 观察红花注射液对内毒素性急性肝损伤大鼠肝细胞凋亡的影响。方法 以腹腔注射内毒素脂多糖+D-氨基半乳糖胺(LPS+D-GalN)诱导建立大鼠急性肝损伤模型,以制模前0.5 h尾静脉注射红花注射液进行干预,并设还原型谷胱甘肽(TAD)为阳性对照组;分别于6、24和48 h取腹腔静脉血和肝组织,用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)含量;用苏木素-伊红(HE)染色观察肝组织病理学变化,原位末端缺口标记法(TUNEL)检测肝细胞凋亡情况。结果 模型组各时间点大鼠血清ALT、AST水平和肝细胞凋亡指数均显著升高( $P$ 均 $<0.01$ )。红花干预组、TAD组各时间点大鼠肝组织病理学损伤程度明显轻于模型组;血清ALT、AST水平及肝细胞凋亡指数不同程度明显下降( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),但红花干预组与TAD组间比较差异均无统计学意义。结论 红花注射液对内毒素性急性肝损伤有较好的保护作用,其机制可能与抑制肝组织细胞凋亡有关。

**【关键词】** 红花注射液; 内毒素; 肝细胞凋亡; 保护作用

中图分类号:R285.5;R256.4 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2009.02.008

**Effect of safflower injection (红花注射液) on hepatocyte apoptosis in rats with acute hepatic injury induced by endotoxin** ZHU Chen \*, HUANG Xiao-min. \* Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang, China

Corresponding author: HUANG Xiao-min, Email: mxh251770@yahoo.com

**【Abstract】** Objective To study the effect of safflower injection (SI, 红花注射液) on hepatocyte apoptosis in rats with acute hepatic injury (AHI) induced by endotoxin. Methods The rat model of AHI was induced by intra-peritoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) plus D-galactosamine (D-GalN). Half an hour before the injection of LPS plus D-GalN, SI was injected into a tail vein as the treatment measure for one group of rats, and another group being treated with reduced glutathione (TAD) was as the positive control. The blood was collected from the abdominal vein and liver tissue samples were obtained at 6, 24 and 48 hours respectively. The contents of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were examined by an entire automatic biochemistry instrument, the hepatic pathological changes were observed with hematoxylin-eosin (HE) stain, and hepatocyte apoptosis was detected with in terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) assay. Results Compared with the control group, serum levels of ALT and AST and the expression of apoptosis in rats of the model group were significantly elevated at 6, 24 and 48 hours time points (all  $P < 0.01$ ). Compared with the model group, treatment with either SI or TAD could obviously improve the pathological changes, reduce serum levels of ALT and AST and the expression of hepatocyte apoptosis at 6, 24 and 48 hours time points ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). There was no statistical significance between groups SI and TAD. Conclusion It is shown that SI has a promising protective effect on rats with AHI caused by LPS plus D-GalN, and its mechanism is probably related to the inhibition of liver tissue cell apoptosis.

**【Key words】** safflower injection; endotoxin; hepatic cell apoptosis; protective effect

在内毒素引起的器官功能损伤和多器官功能障碍综合征(MODS)过程中,肝脏既是清除内毒素的主要器官,同时也是内毒素血症时受损最早、最明显

的靶器官之一<sup>[1]</sup>。目前认为是机体过度炎症反应导致肝细胞损伤的结果<sup>[2]</sup>。而肝细胞凋亡在这一过程中起了重要的作用<sup>[3]</sup>。本实验中通过小剂量腹腔注射脂多糖(LPS)+D-氨基半乳糖胺(D-GalN)造成大鼠急性肝损伤模型,观察大鼠肝细胞凋亡的表达变化,探讨红花注射液对急性肝损伤大鼠肝脏的保护作用,报告如下。

基金项目:浙江省中医药科技项目(2007ZA009)

通信作者:黄小民,Email:mxh251770@yahoo.com

作者简介:祝 晨(1985-),女(汉族),浙江省人,硕士研究生,

Email:xiaogougouchen@163.com.

1 材料与方法

1.1 动物分组及给药方法:健康雄性 Wistar 大鼠 80 只,体重(200±20)g,由浙江中医药大学实验动物中心提供。按随机数字表法分为 4 组:①模型组(n=24);LPS 50 μg/kg+D-GalN 300 mg/kg 用 1 ml 生理盐水溶解后腹腔注射。②红花干预组(n=24);于制模前 0.5 h 经尾静脉注射红花注射液 2.5 ml/kg(每 10 ml 含生药 5 g,雅安三九药业有限公司生产,批号:071101)。③还原型谷胱甘肽(TAD)组(n=24);于制模前 0.5 h 静脉注射 TAD 108 mg/kg(意大利福斯卡玛生化制药公司生产,批号:37016/37003)。④对照组(n=8);于相应制模时间点腹腔注射 1 ml 生理盐水。各组分别于制模后 6、24 和 48 h 随机取 8 只动物,用戊巴比妥腹腔注射麻醉,取腹腔静脉血,分离血清,-20℃保存待用。取肝左叶小块组织,以中性甲醛水溶液固定,备检。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 血清生化指标测定和肝组织病理学观察:使用全自动生化分析仪测定各组血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平。肝左叶以中性甲醛水溶液固定,石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下进行组织病理学观察。

1.2.2 肝细胞凋亡检测:采用原位末端刻度标记法(TUNEL)检测细胞凋亡,操作按试剂盒说明进行。计算 5 个高倍视野(×400)下的凋亡细胞数,凋亡指数(AI)以凋亡细胞/100 个细胞×100%表示。

1.3 统计学方法:采用 SPSS 13.0 软件进行分析,结果均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用单因素方差分析和 *q* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织病理学观察

2.1.1 肉眼观察:对照组肝脏形态正常,被膜光滑、完整、色泽红润、质地柔软。模型组 24 h 和 48 h 肝脏明显肿胀,略显苍白,表面见散在点、片状出血点,质地偏韧;48 h 肝脏表面颗粒粗大,片状出血减少,更显苍白。其余各组各时间点接近对照组。

2.1.2 光镜下观察:对照组肝结构完整、清晰,肝小叶正常,无中性粒细胞浸润,无肝细胞变性、坏死。模型组 6 h 可见炎细胞浸润和点、片状坏死;24 h 可见肝细胞肿胀、边界模糊,有大片状坏死和大量炎细胞浸润;48 h 肝小叶结构紊乱,肝细胞坏死更加明显,弥漫性炎细胞浸润。红花干预组及 TAD 组肝细胞坏死和炎细胞浸润减少,肝细胞水肿减轻,肝小叶结构接近对照组肝组织。

2.2 血生化检测结果(表 1):模型组 6 h 血清 ALT、AST 开始增高,24 h 达峰值,48 h 仍处于高水平,各时间点测定值均显著高于对照组(*P*均<0.01);红花干预组及 TAD 组血清 ALT、AST 在 6 h 处于较高水平,24 h、48 h 逐渐下降,虽高于对照组,但明显低于模型组(*P*<0.05 或 *P*<0.01),但两组间比较差异无统计学意义(*P*均>0.05)。

表 1 各组大鼠血清 ALT、AST 及肝细胞凋亡情况比较( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	ALT(U/L)		
	6 h	24 h	48 h
模型组	225.19±49.80 <sup>b</sup>	2 338.47±739.67 <sup>b</sup>	324.25±34.91 <sup>b</sup>
红花干预组	138.53±59.49 <sup>bc</sup>	115.88±30.81 <sup>bd</sup>	35.32±6.76 <sup>cd</sup>
TAD 组	108.63±16.74 <sup>bc</sup>	83.18±46.72 <sup>cd</sup>	32.51±4.09 <sup>cd</sup>
组别	AST(U/L)		
	6 h	24 h	48 h
模型组	340.37±34.76 <sup>b</sup>	3 279.05±997.62 <sup>b</sup>	659.57±82.34 <sup>b</sup>
红花干预组	240.78±25.38 <sup>bd</sup>	236.71±48.30 <sup>bd</sup>	126.94±24.66 <sup>cd</sup>
TAD 组	250.80±18.48 <sup>bd</sup>	237.16±67.57 <sup>bd</sup>	124.81±22.31 <sup>cd</sup>
组别	AI(%)		
	6 h	24 h	48 h
模型组	4.37±0.52 <sup>b</sup>	4.61±1.18 <sup>b</sup>	2.36±0.25 <sup>b</sup>
红花干预组	2.63±0.60 <sup>bd</sup>	1.32±0.47 <sup>bd</sup>	1.22±0.21 <sup>bd</sup>
TAD 组	2.61±0.78 <sup>bd</sup>	1.22±0.22 <sup>bd</sup>	1.26±0.98 <sup>bd</sup>

注:对照组 ALT 为(27.03±1.60)U/L,AST 为(97.34±5.13)U/L,AI 为(0.28±0.24)%;与对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.05,<sup>b</sup>*P*<0.01;与模型组比较,<sup>c</sup>*P*<0.05,<sup>d</sup>*P*<0.01

2.3 肝细胞凋亡结果(表 1;彩色插页图 1):肝凋亡细胞分布在肝小叶内、汇管区和中央静脉周围,胞核呈棕黄色,凋亡小体也呈阳性着色。对照组大鼠肝组织内无或仅见 1~2 个凋亡细胞。模型组及治疗组大鼠肝细胞 AI 均较对照组明显升高(*P*均<0.01);模型组 6 h 及 24 h 肝组织内可见较多的凋亡细胞,48 h 有所减少。红花干预组及 TAD 组各时间点肝细胞 AI 均较模型组明显减少(*P*均<0.01),尤以 24 h 减少为明显,但两组间比较差异无统计学意义(*P*均>0.05)。

3 讨论

已有研究证实,各种诱因导致的肝损伤,其发病机制均与肝细胞凋亡密切相关<sup>[4-6]</sup>。急性肝损伤不仅存在肝细胞坏死,也存在肝细胞的凋亡<sup>[7-8]</sup>,且细胞凋亡是急性肝损伤更为重要的肝细胞死亡形式<sup>[9]</sup>。所以对细胞凋亡机制的研究能够较深刻地揭示内毒素急性肝损伤、肝衰竭的本质和规律。

本研究中采用 LPS+D-GalN 诱导的急性肝损

伤大鼠模型<sup>[10]</sup>,其机制为 D-GalN 抑制肝细胞核转录,导致肝细胞对炎症介质与细胞因子的敏感性增加,而内毒素增加导致肝库普弗细胞活化,分泌大量肝细胞炎症介质与细胞因子,导致肝细胞凋亡、坏死<sup>[11-12]</sup>。研究显示,LPS 在 6 h 内即造成了 D-GalN 致敏大鼠发生急性肝损伤、肝衰竭,模型组大鼠血清 ALT、AST 在 6 h 开始增高;24 h 进入疾病进程的高峰期,血生化指标 ALT、AST 达峰值,肝内炎症细胞浸润、出血和肝细胞的坏死显著增多;48 h 损伤仍处于较高水平。

TUNEL 对细胞凋亡检测具有较好的敏感性和特异性。本实验中采用 TUNEL 检测肝组织细胞凋亡,发现模型组各时间点 AI 明显增高,进一步表明细胞凋亡在急性肝损伤中起一定作用。动态观察发现,凋亡在时间上是短暂的,继而发生肝细胞坏死,这两个过程存在着密切的关系,提示肝细胞凋亡是肝衰竭的一个早期过程。

红花是传统的中草药,祖国医学认为红花具有活血通经、祛瘀止痛的作用。红花注射液由红花提取精制而成,其主要含有查耳酮类、漆树黄酮、桑叶素、槲皮素、杨梅素等成分。研究表明,红花具有抗氧化、抗凝、防止血栓形成、抗炎症因子、抗氧自由基和扩张血管作用<sup>[13]</sup>。但红花对内毒素性肝损伤的作用则未见报道。本实验显示,在内毒素性急性肝损伤模型建立过程中应用红花注射液及 TAD 进行干预,两组大鼠的肝脏炎症程度均较模型组明显降低,血清 ALT、AST 含量均明显下降,表明红花注射液对内毒素性急性肝损伤大鼠具有较好的保护作用,且于 24 h 和 48 h 作用显著,与保肝药 TAD 效果相当。同时,红花干预组大鼠肝组织细胞凋亡较模型组明显受抑,我们推测红花抗急性肝损伤的作用可能是通过调节大鼠肝组织细胞凋亡水平的途径来实现的,这可能与其抗氧化、清除氧自由基等作用有关,但具体机制仍有待于进一步研究。

综上所述,在治疗内毒素性急性肝损伤方面,红花注射液与 TAD 有相似的疗效,有望成为治疗急性肝损伤药物中的有效选择之一。

参考文献

- [1] 蒋建新,姚咏明,郑江,等. 细菌内毒素基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社,2004:272-285.
- [2] 徐正婕,范建高,王国良,等. 小剂量内毒素导致非酒精性脂肪性肝炎大鼠急性肝功能衰竭[J]. 中华肝脏病杂志,2004,12(4):244-245.
- [3] Togo S, Kubota T, Matsuo K, et al. Mechanism of liver failure after hepatectomy[J]. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 2004, 105(10):658-663.
- [4] 温韬,任锋,刘焱,等. 急性肝损伤大鼠肝脏 Fas 和 FasL 的表达及其意义[J]. 中国危重病急救医学,2006,18(7):417-420.
- [5] Agarwal K, Czaja AJ, Donaldson PT. A functional Fas promoter polymorphism is associated with a severe phenotype in type 1 autoimmune hepatitis characterized by early development of cirrhosis[J]. Tissue Antigens, 2007, 69(3):227-235.
- [6] Schattenberg JM, Galle PR, Schuchmann M. Apoptosis in liver disease[J]. Liver Int, 2006, 26(8):904-911.
- [7] Riordan SM, Williams R. Mechanisms of hepatocyte injury, multiorgan failure, and prognostic criteria in acute liver failure[J]. Semin Liver Dis, 2003, 23(3):203-215.
- [8] 高峰,陈嘉薇,韩伟,等. 暴发性肝功能衰竭小鼠模型的建立及其治疗研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,2006,13(6):361-363.
- [9] Kasahara I, Saitoh K, Nakamura K. Apoptosis in acute hepatic failure; histopathological study of human liver tissue using the tunel method and immunohistochemistry[J]. J Med Dent Sci, 2000, 47(3):167-175.
- [10] 刘亮明,邓欢,张吉翔,等. 内毒素性肝损伤实验动物模型的建立[J]. 世界华人消化杂志,2006,14(1):12-18.
- [11] Thirunavukkarasu C, Uemura T, Wang LF, et al. Normal rat hepatic stellate cells respond to endotoxin in LBP-independent manner to produce inhibitor(s) of DNA synthesis in hepatocytes[J]. J Cell Physiol, 2005, 204(2):654-665.
- [12] Liu D, Li C, Chen Y, et al. Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide[J]. J Biol Chem, 2004, 279(46):48434-48442.
- [13] 万春平,包照日格图,却翎,等. 红花的研究进展[J]. 时珍国医国药,2007,18(11):2854-2855.

(收稿日期:2008-10-10 修回日期:2008-11-30)

(本文编辑:李银平)

• 消息 •

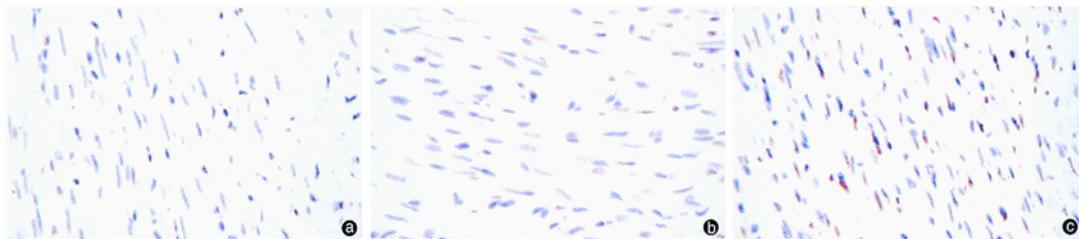
科技部中国科技信息研究所万方数据 2008 年《中国期刊引证报告》(扩刊版)

——中国医学类期刊影响因子前 20 位排序表

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	影响因子	排位
中国中西医结合杂志	1.245	1	中成药	0.774	8	世界科学技术	0.678	15
中国中西医结合急救杂志	1.101	2	中国中医药科技	0.772	9	——中医药现代化		
中国中药杂志	1.052	3	中华中医药杂志	0.718	10	上海中医药杂志	0.667	16
中西医结合学报	0.997	4	上海针灸杂志	0.710	11	中药药理与临床	0.641	17
国际中医中药杂志	0.894	5	针刺研究	0.708	12	中药材	0.639	18
中草药	0.814	6	中国现代中药	0.690	13	中医杂志	0.602	19
中国针灸	0.797	7	浙江中医杂志	0.688	14	中西医结合肝病杂志	0.588	20

## 参附注射液对糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注期间 磷脂酰肌醇 3 激酶表达的影响

(正文见69页)

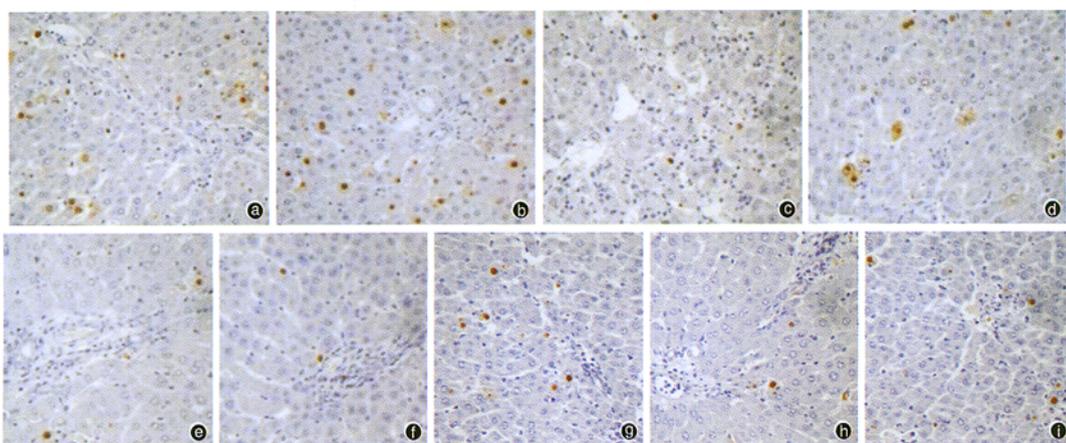


①: sham组; ②: I/R组; ③: SF组

图1 镜下观察各组DM大鼠I/R损伤后心肌组织PI-3K的表达情况(免疫组化, ×400)

## 红花注射液对内毒素性急性肝损伤大鼠肝细胞凋亡的影响

(正文见85页)

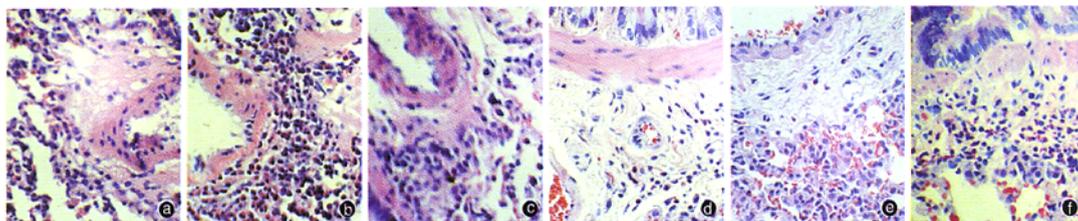


①-③: 模型组 6、24、48 h; ④-⑥: 红花干预组 6、24、48 h; ⑦-⑨: TAD组 6、24、48 h

图1 各组大鼠肝组织细胞凋亡检测结果(TUNEL, ×100)

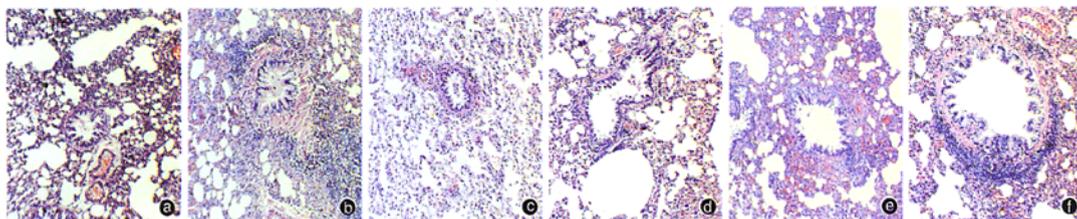
## 温阳益气平喘方对支气管哮喘大鼠组织病理学的影响 及 Th1/Th2 失衡的调节作用

(正文见88页)



①: 正常对照组; ②: 模型组; ③: 温阳益气平喘高剂量组; ④: 温阳益气平喘低剂量组; ⑤: 氨茶碱组; ⑥: 桂龙咳嗽宁组

图1 各组大鼠肺组织嗜酸性粒细胞图像(HE, ×400)



①: 正常对照组; ②: 模型组; ③: 温阳益气平喘高剂量组; ④: 温阳益气平喘低剂量组; ⑤: 氨茶碱组; ⑥: 桂龙咳嗽宁组

图2 各组大鼠肺组织支气管图像(HE, ×100)