

- 10131-10143.
- [6] Poulin B, Butcher A, McWilliams P, et al. The M3-muscarinic receptor regulates learning and memory in a receptor phosphorylation/arrestin-dependent manner[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(20): 9440-9445.
- [7] Angelucci F, Mathé AA, Aloe L. Neurotrophic factors and CNS disorders: findings in rodent models of depression and schizophrenia[J]. Pro Brain Res, 2004, 146(3): 151-165.
- (收稿日期: 2012-02-19)
(本文编辑: 钮丽霞)

解毒护肝饮药物血清对异烟肼致 HepG2 坏死和凋亡的干预

杨铂 刘靛雯 王小利 袁成民 安勇

【摘要】 目的 观察解毒护肝饮药物血清对异烟肼致人肝癌细胞株 (human hepatocellular carcinoma cell lines, HepG2) 病变的干预, 并分析其机制。**方法** 制备解毒护肝饮和甘草酸二铵的药物血清, 建立异烟肼致 HepG2 细胞损伤模型, 以解毒护肝饮和甘草酸二铵药物血清加入 HepG2 培养液, 观察对 HepG2 坏死和凋亡的干预, 以及对 HepG2 Fas/FasL 表达的影响, 以评价解毒护肝饮的疗效机制。**结果** 解毒护肝饮药物血清对异烟肼致 HepG2 损伤有明显抑制作用, 可以减少 HepG2 细胞凋亡和坏死, 并减少其 Fas/FasL 表达, 效果优于甘草酸二铵胶囊组。**结论** 以清热利湿解毒兼养阴化痰为治法的解毒护肝饮有确切的减少异烟肼致 HepG2 坏死和凋亡的作用, 其抗细胞凋亡作用与减少 HepG2 的 Fas/FasL 的表达有关。

【关键词】 解毒护肝饮; 药物性肝炎; 异烟肼; 药物血清; 凋亡; 人肝癌细胞株; 体外培养; Fas/FasL

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.04.007

Effect of Jiedu Hupan Decoction containing serum on the death and apoptosis of HepG2 which were damaged by isoniazid YANG Bo, LIU Jing-wen, WANG Xiao-li, et al. Liver Disease Units, Ji'nan Infectious Hospital, Ji'nan 250021, China

Corresponding author: AN Yong, E-mail: an-yong666@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of Jiedu Hupan Decoction containing serum on HepG2 damaged by isoniazid, and reveal the mechanism of it. **Methods** Establish iv vitro HepG2 cell damaged by isoniazid culture experiment model. The serum was collected from the rats using Jiedu Hupan Decoction and Gancaosuaneran and incubated with the HepG2 model. After 24 hours, observe the death and apoptosis of HepG2. And the expressions of Fas/FasL were measured by flow cytometry. **Results** Culture experiment model of iv vitro HepG2 cell damaged by isoniazid was established successfully. Jiedu Hupan Decoction containing serum significantly inhibited apoptosis and necrosis of the HepG2 cells and the expression of Fas/FasL. The curative effect of this is better than control group which were given Gancaosuaneran decoction containing serum. **Conclusion** Jiedu Hupan Decoction according to qingre lishi jiedu can evidently reduce the hepatitis by decrease the expression of the factor associated with apoptosis. So it can improve the syndromes and experimental index of hepatitis induced by anti-tubercular drug.

基金项目: 财政部、国家中医药管理局 2009 年中医药行业科研专项 (200907001-1)

作者单位: 250021 济南市传染病医院 (杨铂、刘靛雯、袁成民、安勇); 济南护理职业学院 (王小利)

作者简介: 杨铂 (1979-), 硕士, 主治医师。研究方向: 中西医结合肝病传染病的防治。E-mail: optyb@sina.com

通讯作者: 安勇 (1967-), 硕士, 主任医师。研究方向: 中西医结合肝病传染病的防治。E-mail: an-yong666@163.com

文献标引格式:

杨铂, 刘靛雯, 王小利, 等. 解毒护肝饮药物血清对异烟肼致 HepG2 坏死和凋亡的干预 [J]. 环球中医药, 2012, 5 (4): 259-262.

【Key words】 Jiedu Huguang Decoction; Drug hepatitis; Isoniazid; Drug containing serum; Apoptosis; HepG2; *In vitro*; Fas/FasL

中医药对于抗结核药引起的药物性肝炎有较好临床疗效,但是由于体外实验研究模型不稳定,深入的疗效机制研究少见。本实验建立了异烟肼致人肝癌细胞株(human hepatocellular carcinoma cell lines, HepG2)细胞坏死和凋亡的细胞模型,制备解毒护肝饮药物血清干预,旨在发现其抗肝细胞损伤的疗效并分析其形成机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

RPMI1640 培养液(美国 GBCO 公司);小牛血清(美国 GBCO 公司);流式细胞仪(双激光、六色)[美国 BD 公司(FACS Canto)];FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit(BD Biosciences);FITC CD95 (20 μ l/test)及溶血素(BD 公司);PE anti-human CD95 Ligand(5 μ l/test)(eBioscience 公司);异烟肼注射液(天津金耀氨基酸有限公司,批号:0809162,规格:100 mg/2 ml);HepG2 细胞株(山东省医学科学院孟红教授赠)。

1.2 药物血清的制备

1.2.1 动物 雄性 wistar 大鼠 15 只,山东大学实验动物中心提供,(200 \pm 20)g,许可证号:SCXK(鲁)20090001,NO:0009272。环境:山东省中医药研究院动物实验中心,SPF 级,许可证号:SYXK(鲁)20050052。

1.2.2 药物 茵陈 30 g、生甘草 15 g、赤芍 15 g、大黄 6 g、栀子 10 g、生地黄 10 g、枸杞 15 g、郁金 10 g、白茅根 15 g、白术 15 g、砂仁 9 g。上述药物水煎浓缩混匀后配制成 100 ml 水混悬液,充分混匀后给药。相当于临床等效量的倍数计算:按人与大鼠体表面积换算法计算大鼠一日临床等效量^[1]:150 g(成人一日量) \times 0.09/kg=13.5 g/kg。甘草酸二铵胶囊:同样计算方法,临床一日等效量 150 mg \times 0.09/kg=13.5 mg/kg。

1.2.3 方法 随机分为正常组、甘草酸二铵胶囊组、中药组,每组 5 只,分别给予蒸馏水和上述含甘草酸二铵及中药的混悬液。灌胃给药,连续 7 天,末次灌胃 90 分钟后,离心收集血清,56 $^{\circ}$ C 灭活 30 分钟,经 0.22 μ m 滤器抽滤除菌后-70 $^{\circ}$ C 保存,备用。

1.3 细胞培养及给药方法

以 HepG2 细胞为研究对象。参考 Schwab CE 的方法^[2],取对数生长期 HepG2 细胞接种 6 孔板,

每孔 1×10^5 细胞,放入 CO₂ 培养箱培养 24 小时。24 小时后,吸去培养液,实验共分为空白组、模型组、甘草酸二铵胶囊组,解毒护肝饮中药组(简称中药组)。后两组培养液用 RPMI1640 基础培养液配制含甘草酸二铵胶囊和中药 10% 浓度的鼠血清;空白组和模型组为 RPMI1640 基础培养液配制的 10% 正常鼠血清。选择并配制异烟肼浓度为 4 mg/ml,接种于除空白组外其他组细胞。培养 24 小时后,记录各组细胞不同程度的病变效应并分别收集细胞用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 显微镜下观察细胞不同程度的病变效应

1.4.2 凋亡检测 收集的细胞用 PBS 洗 2 次, $1 \times$ 结合缓冲液重悬 1×10^6 细胞。取 100 μ l (1×10^5 细胞)加入到绝对计数管。加 5 μ l FITC AnnexinV 和 5 μ l PI。轻轻涡旋细胞,室温孵育 15 分钟。加 400 μ l $1 \times$ 结合缓冲液,待检,1 小时内上机检测。

1.4.3 Fas/FasL(CD95/CD95 Ligand)检测 收集培养 24 小时的 HepG2 细胞,PBS 洗两次,PBS 重悬细胞。取 100 μ l (1×10^6) 细胞加入到绝对计数管。加 20 μ l FITC CD95 和 5 μ l PE anti-human CD95 Ligand。轻轻涡旋细胞,室温避光孵育 15 ~ 30 分钟。加 2 ml PBS,1000 转/分离心。弃上清,加入 500 μ l 鞘液,待检。

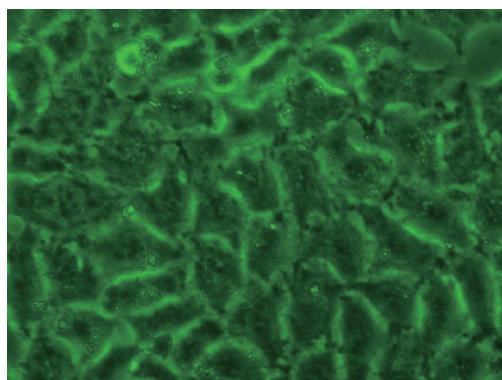
2 结果

2.1 显微镜下观察各组 HepG2 细胞病变情况

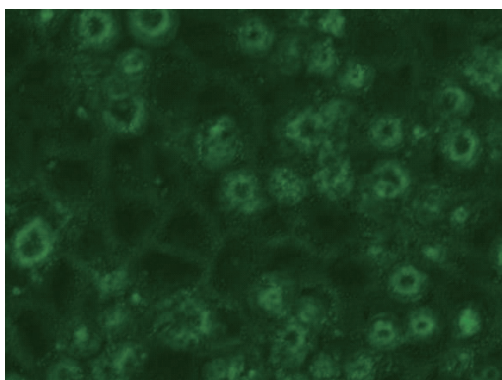
与空白组细胞相比,模型组细胞发生肿胀变性、细胞脱落死亡的情况严重,中药组和甘草酸二铵胶囊组都相对较轻,中药组细胞损伤情况略优于甘草酸二铵胶囊组。见图 1。

2.2 各组 HepG2 细胞凋亡和坏死情况

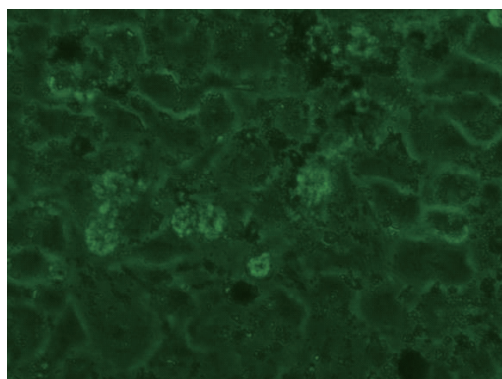
Annexin V/PI 染色中 AnnexinV+ 为早期凋亡,PI+ 为坏死,AnnexinV+/PI+ 为坏死或晚期凋亡,以上各项相加为细胞总死亡率。模型组细胞的死亡率最高,达 36.9%,甘草酸二铵胶囊组和中药组死亡率明显下降,分别为 18.4% 和 14.4%,中药组略优于甘草酸二铵胶囊组。模型组细胞凋亡率达 18.1%,甘草酸二铵胶囊组和中药组凋亡率明显下降,分别为 4.1% 和 3.2%,中药组同样优于甘草酸二铵胶囊组。见表 1。



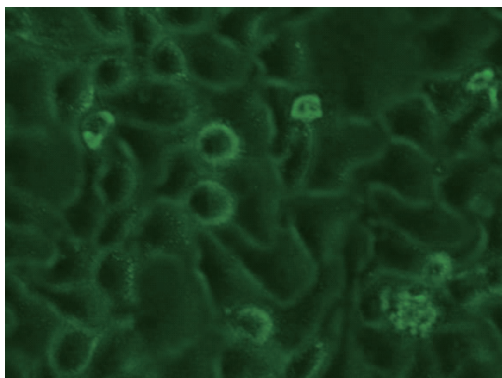
空白组 10 20



模型组 10 20



甘草酸二铵组 10 20



中药组 10 20

图 1 HepG2 细胞显微镜下病变效应

表 1 Annexin/PI 染色率(%)

组别	PI+	Annexin+/PI+	Annexin+	合计
空白组	0.9	4.5	2.7	8.1
模型组	6.9	11.9	18.1	36.9
甘草酸二铵胶囊组	7.6	6.7	4.1	18.4
中药组	8.1	3.1	3.2	14.4

2.3 Fas/FasL 表达率

与空白组相比,模型组的 Fas/FasL 染色率明显增加,分别为 11.6% 和 22.1%,甘草酸二铵胶囊组和中药组相应数值明显减小,中药组表达率尤其更低,分别为 6.7% 和 8.2%。提示解毒护肝饮可以降低 Fas 和 FasL 的表达。见表 2。

表 2 Fas/FasL 染色率(%)

组别	Fas	FasL
空白组	3.6	4.5
模型组	11.6	22.1
甘草酸二铵胶囊组	8.6	13.3
中药组	6.7	8.2

3 讨论

N-乙酰基转移酶是异烟肼肝内代谢的关键酶,根据其代谢效率分为快乙酰化和慢乙酰化两种类型,而慢乙酰化者使异烟肼在体内的代谢中产物得以蓄积,这些产物正是导致异烟肼肝毒性的主要物质。Cho HJ^[3]、Huang YS^[4]等观察发现慢乙酰化者发生异烟肼肝损伤的风险为快乙酰化者的 3.8 倍,慢乙酰化者发生肝损伤时转氨酶水平更高,认为乙酰转移酶的快慢分型是可以用来预测抗结核药介导的肝毒性损伤的有效手段。而既往国内文献报道的异烟肼肝损伤模型多以动物或者原代人肝细胞为研究对象,由于很难保证其种属一致及确定为慢乙酰化基因的肝细胞株,其重复性差。正如沈冲等^[5]指出由于异烟肼代谢有关的细胞色素 P450 酶个体差异和种属差异都较大,因此以不同的动物模型^[6,7]为肝毒性评价体系的试验中得出的实验结论存在很大不确定性。本实验中应用的 HepG2 是一个肝肿瘤细胞系,可以用于评价肝细胞毒性的研究^[8,9]。用 HepG2 来评价异烟肼造成的肝损伤的理论依据在于 HepG2 是慢乙酰化肝细胞^[10]。本试验建立了稳定的异烟肼致 HepG2 损伤模型,为进一步的研究提供了研究平台。

文献标引格式:

杨铂,刘靓雯,王小利,等. 解毒护肝饮药物血清对异烟肼致HepG2坏死和凋亡的干预[J]. 环球中医药,2012,5(4): 259-262.

抗结核药引起肝损伤在中医辨证体系中有自身的特点。首先本病以癆病为基础,癆病病理性质的特点为阴虚火旺,正如《丹溪心法·癆瘵》所言“癆瘵主乎阴虚”。因此本病的发生首先有一个阴虚火旺的病理基础。其次,药毒直接伤肝,这种药源性病因不属于传统中药,但现代医学研究表明抗结核药物可直接在肝内转化为肝毒物质损伤肝脏。中医理论认为肝体即肝脏器官本身的物质基础^[11],肝体阴用阳,肝体受损不足引起肝用不达。一方面,不能正常疏泄气机,引起气郁,木郁则化火、成瘵;另一方面,肝不助脾胃运化进而产生湿、痰。最终形成湿热痰瘀互结、肝阴不足的复杂证候。本方重用茵陈、生甘草为君药,解毒清热利湿;臣以生地、枸杞滋阴柔肝以补肝体,栀子、大黄增强君药清热利湿解毒的功效,与茵陈合用构成茵陈蒿汤,为清利肝胆湿热之名方,郁金疏肝利胆助肝用;佐以白茅根清热利湿退黄使邪有出路,利水而不伤阴,白术、砂仁健脾助运,防肝病之传变,也防止方中苦寒之品伤及脾胃,赤芍凉血活血除肝经瘀热。《张氏医通》指出:“诸黄虽多湿热,经脉久病,不无瘀血阻滞也。”故在辨证论治的基础上重用凉血活血之品,方中大黄、赤芍、郁金均有活血化瘀之力,合用以助利胆退黄。甘味药有和、缓之用,本方多用甘味之药,方中生地、枸杞、甘草、白茅根都为甘味之品,可以缓和药物毒之毒性,同时为避免甘味药过于滋腻“生中满”,选用砂仁、白术健脾化湿增强脾胃运化之力。全方攻补兼施,共奏补肝体助肝用,清热解毒祛湿化瘀之用。

Fas 和 FasL 是介导细胞凋亡的一对膜蛋白,两者结合后通过结合胞内的死亡受体 FADD/MORT1 或 DAXX,进而激活 Capase 8^[12]或 Jnk 通路引起表达 Fas 的细胞凋亡。在多种肝病中可发现其介导的肝细胞凋亡。本实验发现伴随着凋亡率的增加,HepG2 细胞中 Fas/FasL 的表达增高,提示 Fas/FasL 活化参与了在异烟肼致 HepG2 的凋亡过程。解毒护肝饮药物血清可以减少异烟肼引起的 HepG2 坏死和凋亡,同时减少了 Fas/FasL 的表达,进一步研

究发现抑制 HepG2 凋亡作用与其减少 Fas/FasL 的表达可能有关。

参 考 文 献

- [1] 宋卫国. 柴芪调脂口服液对高血脂大鼠模型的影响[J]. 时珍国医药, 2009, 20(7): 1755-1756.
- [2] Schwab CE, Tuschl H. In vitro studies on the toxicity of isoniazid in different cell lines[J]. Hum Exp Toxicol, 2003, 22(11): 607-615.
- [3] Cho HJ, Koh WJ, Ryu YJ, et al. Genetic polymorphisms of NAT2 and CYP2E1 associated with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity in Korean patients with pulmonary tuberculosis[J]. Tuberculosis (Edinb), 2007, 87(6): 551-556.
- [4] Huang YS, Chern HD, Su WJ, et al. Polymorphism of the N-acetyltransferase 2 gene as a susceptibility risk factor for antituberculosis drug-induced hepatitis[J]. Hepatology, 2002, 35(4): 883-889.
- [5] 沈冲, 徐小梅, 孟琴, 等. 原代肝细胞体外培养用于利福平和异烟肼肝毒性的研究[J]. 中国药科大学学报, 2005, 36(3): 250-253.
- [6] Sarich TC, ZHOU T, Adams SP, et al. A model of isoniazid-induced hepatotoxicity in rabbits[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 1995, 34(2): 109-116.
- [7] Nicod L, Viollon C, Regnier A, et al. Rifampicin and isoniazid increase acetaminophen and isoniazid cytotoxicity in human HepG2 hepatoma cells[J]. Hum Exp Toxicol, 1997, 16(1): 28-34.
- [8] Neuman MG, Koren G, Tiribelli C. In vitro assessment of ethanol-induced hepatotoxicity on HepG2 cell line[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 197(2): 932-941.
- [9] Shear NH, Malkiewicz IM, Klein D, et al. Acetaminophen-induced toxicity to human epidermoid celil line A431 and hepatoblastoma cell line HegG2 in vitro, is diminished by silymarin[J]. Skin Pharmacol, 1995, 8(6): 279-291.
- [10] Coroneos E, Sim E. Arylamine N-acetyltransferase activity in hum-an cultures cell lines[J]. Biochem J, 1993, 294(Pt 2): 481-486.
- [11] 尹常健. 肝病用药十讲[M]. 北京: 中国中医药出版社, 1998: 66-187.
- [12] 魏家臣. Fas/FasL 介导凋亡细胞机制及其病理生理意义[J]. 国外医学外科学分册, 2003, 30(1): 21-23.

(收稿日期: 2012-02-13)

(本文编辑: 刘群)