

依达拉奉对肝损伤模型小鼠的肝保护作用研究

黄学桂*, 包 旻, 赵冰封(安徽省妇幼保健院药学部, 合肥 230001)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)13-1785-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.13.17

摘要 目的:研究依达拉奉对对乙酰氨基酚致肝损伤模型小鼠的保护作用。方法:取小鼠随机分为正常对照(生理盐水)组、模型(生理盐水)组、阳性对照(联苯双酯 150 mg/kg)组和依达拉奉高、中、低剂量(10、5、2.5 mg/kg)组,每组10只,尾iv给予相应药物,连续14 d。末次给药后除正常对照组外,其余各组小鼠ip给予对乙酰氨基酚0.3 g/kg复制肝损伤模型。复制模型16 h后,各组小鼠眼球取血检测血清中谷氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、白细胞介素2(IL-2)、IL-6水平;处死小鼠后取肝组织,检测其中脂质过氧化物(LPO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平并观察其病理学变化。结果:与正常对照组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST、IL-6水平增加,IL-2含量降低,肝组织中LPO和MDA含量增加,SOD活性降低,差异均具有统计学意义($P<0.01$)。与模型组比较,依达拉奉高、中、低剂量组小鼠血清中ALT活性降低;依达拉奉高、中剂量组小鼠血清中IL-2含量增加,AST活性和IL-6含量降低,肝组织中LPO和MDA含量降低,SOD活性增强,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,依达拉奉高、中剂量组小鼠肝细胞变性、炎性细胞浸润减少,坏死程度显著减轻。结论:依达拉奉对对乙酰氨基酚致肝损伤模型小鼠有明显的保护作用,其机制可能与抗氧化及增强免疫有关。

关键词 依达拉奉;对乙酰氨基酚;肝损伤;机制;小鼠

Study on the Protective Effects of Edaravone on Model Mice with Liver Injury

HUANG Xue-gui, BAO Min, ZHAO Bing-feng (Dept. of Pharmacy, Anhui Women and Child Health Care Hospital, Hefei 230001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the protective effects of edaravone on model mice with liver injury induced by paracetamol. METHODS: Mice were randomly divided into normal control group (normal saline), model group (normal saline), positive control group (bifendate 150 mg/kg) and edaravone high-dose, medium-dose and low-dose groups (10, 5 and 2.5 mg/kg), 10 for each. They were given corresponding drugs in tail for 14 d, iv. After the last administration, except for normal control group, mice in other groups were given paracetamol 0.3 g/kg to reproduce the models of liver injury, ip. After reproducing models for 16 h, the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), interleukin-2 (IL-2) and IL-6 in all groups were determined by eyeball blood. Liver tissue was collected after executed, the levels of lipid peroxide (LPO), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were determined and the pathological changes were observed. RESULTS: Compared with normal control group, the levels of ALT, AST and IL-6 in model group were increased, the content of IL-2 were decrease, the contents of LPO and MDA in liver tissue were increased and the activities of SOD was decreased, with significant difference ($P<0.01$). Compared with model group, the activities of ALT in serum of mice in edaravone high-dose, medium-dose and low-dose groups were decrease, the content of IL-2 in serum of mice in edaravone high-dose and medium-dose groups were increased, the activities of AST and content of IL-6 was decreased; the contents of LPO and MDA in liver tissue were decrease and the activities of SOD was increased, with significant difference ($P<0.05$). Compared with model group, the liver cells' degeneration and inflammatory cell infiltration of mice in edaravone high-dose and medium-dose groups were decrease and the necrosis degree was obviously relieved. CONCLUSIONS: Edaravone has obvious prospective effects on the model mice with liver injury induced by paracetamol. The mechanism may be related to antioxidation and immunomodulation.

KEYWORDS Edaravone; Paracetamol; Liver injury; Mechanism; Mice

- ing myocardial infarction[J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 167 (7):1 550.
- [12] HL, Liu C, de Couto G, et al. Curcumin prevents and reverses murine cardiac hypertrophy[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(3):879.
- [13] Chen J, Tung CH, Allport JR, et al. Near-infrared fluorescent imaging of matrix metalloproteinase activity after

- myocardial infarction[J]. *Circulation*, 2005, 111(14):1 800.
- [14] Yao QH, Wang DQ, Cui CC. Curcumin ameliorates left ventricular function in rabbits with pressure overload: inhibition of the remodeling of the left ventricular collagen network associated with suppression of myocardial tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase-2 expression[J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(2):198.

* 副主任药师, 硕士。研究方向: 临床药学。E-mail: hxc730618@sina.com

(收稿日期: 2014-06-09 修回日期: 2014-08-15)
(编辑: 张 静)

依达拉奉的化学名为3-甲基-1-苯基-2-吡唑啉-5-酮,静脉给药可清除大脑内具有高度细胞毒性的羟自由基,具有良好的脑保护作用。因此,该药临床上广泛用于脑缺血性病变急性期治疗。近年来研究已证实,依达拉奉可通过增加超氧化物歧化酶(SOD)活性,提高对氧自由基的清除能力,还可有效地保护心肌缺血、肾脏缺血、肺缺血等损伤^[1-3]。但其对急性肝损伤的作用尚未见相关文献报道。本文拟通过对乙酰氨基酚(又名醋氨酚)复制小鼠急性肝损伤模型,研究依达拉奉对急性药源性肝损伤模型小鼠的肝保护作用,探讨其作用机制,以期为进一步拓宽依达拉奉的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

BX41型显微镜(日本岛津公司);TDL-60B型低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

对乙酰氨基酚片(中美天津史克制药有限公司,批号:14080267,规格:每片0.5g);联苯双酯滴丸(浙江万邦药业有限公司,批号:A02140712,规格:每丸1.5mg);依达拉奉注射液(国药集团国瑞制药有限公司,批号:1403016,规格:20ml:30mg);脂质过氧化物(LPO)检测试剂盒(广州威佳科技有限公司,批号:20130805);丙二醛(MDA)检测试剂盒(批号:20140520)、SOD检测试剂盒(批号:20140216)、谷氨酸氨基转移酶(ALT)检测试剂盒(批号:20140506)、天冬氨酸氨基转移酶(批号:20131210)检测试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品;白细胞介素2(IL-2)、IL-6酶联免疫吸附实验(ELISA)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:EK0458,EK0481)。

1.3 动物

昆明种小鼠,60只,普通级,♂,体质量(20±2)g,由安徽医科大学实验动物中心提供,使用合格证号为SCXK(皖)2011-002。小鼠分笼饲养于日照12h、室温18~25℃、相对湿度45%~55%、通风良好的环境中,进食普通颗粒饲料,自由饮水。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药

取小鼠随机分为正常对照(生理盐水)组、模型(生理盐水)组、阳性对照(联苯双酯150mg/kg^[4])组和依达拉奉高、中、低剂量(10、5、2.5mg/kg,按预实验设定)组,每组10只,按体质量iv给予相应药物,每日1次,连续14d。末次给药后除正常对照组ip给予生理盐水外,其余各组小鼠ip给予对乙酰氨基酚0.3g/kg复制肝损伤模型。

2.2 生化指标检测

复制模型16h后,各组小鼠眼球取血,按试剂盒操作说明书检测各组小鼠血清中ALT、AST活性与IL-2、IL-6含量。各组小鼠取血后,颈椎脱臼处死,取肝脏,冰浴中制备10%肝组织匀浆,3500r/min(离心半径:6cm)离心15min,取上清液按试剂盒操作说明书检测各组小鼠肝组织中LPO、MDA、SOD水平。

2.3 病理学变化

取各组小鼠肝组织,采用BX41型显微镜观察肝组织病理学变化。

2.4 数据处理

应用SPSS 13.0软件进行统计分析。各组数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 血清中ALT、AST活性变化

与正常对照组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST活性增强,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,依达拉奉高、中、低剂量组和阳性对照组小鼠血清中ALT活性均降低,依达拉奉高、中剂量组和阳性对照组小鼠血清中AST活性均降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠血清中ALT、AST活性比较见表1。

表1 各组小鼠血清中ALT、AST活性比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 1 Comparison of the activities of ALT and AST in serum of mice in all groups($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	ALT,U/L	AST,U/L
正常对照组		30.2±5.2	42.5±6.4
模型组		162.3±11.9*	136.9±14.8*
阳性对照组	150	58.7±13.8 [#]	84.6±8.5 [#]
依达拉奉低剂量组	2.5	83.7±14.7 [#]	126.4±6.8
依达拉奉中剂量组	5	74.5±16.3 [#]	105.8±8.7 [#]
依达拉奉高剂量组	10	61.6±15.2 [#]	78.9±8.1 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

3.2 血清中IL-2、IL-6含量变化

与正常对照组比较,模型组小鼠血清中IL-2含量降低,IL-6含量增加,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,依达拉奉高、中剂量组和阳性对照组小鼠血清中IL-2含量增加,IL-6含量降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠血清中IL-2、IL-6含量比较见表2。

表2 各组小鼠血清中IL-2、IL-6含量比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 2 Comparison of the contents of IL-2 and IL-6 in serum of mice in all groups($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量,mg/kg	IL-2,pg/ml	IL-6,pg/ml
正常对照组		283.10±21.21	208.27±22.02
模型组		210.03±13.18*	339.65±31.48*
阳性对照组	150	370.22±14.54 [#]	209.30±15.41 [#]
依达拉奉低剂量组	2.5	248.60±21.12	290.28±16.25
依达拉奉中剂量组	5	322.11±20.25 [#]	245.02±19.57 [#]
依达拉奉高剂量组	10	381.29±29.12 [#]	213.19±21.32 [#]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$

Note: vs. normal control group, * $P < 0.01$; vs. model group, [#] $P < 0.05$

3.3 肝组织中LPO、MDA、SOD水平变化

与正常对照组比较,模型组小鼠肝组织中LPO、MDA含量增加,SOD活性降低,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,依达拉奉高、中剂量组和阳性对照组小鼠肝组织中LPO、MDA含量降低,SOD活性增强,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。各组小鼠肝组织中LPO、MDA、SOD水平比较见表3。

3.4 肝组织病理学变化

表3 各组小鼠肝组织中LPO、MDA、SOD水平比较($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Tab 3 Comparison of the levels of LPO, MDA and SOD in liver tissue of mice in all groups($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量,mg/kg	LPO,nmol/L	MDA,nmol/L	SOD,U/mg
正常对照组		3.62±0.21	3.26±0.32	25.08±0.85
模型组		9.23±0.69*	7.98±1.18*	14.88±1.45*
阳性对照组	150	4.07±0.28 [#]	3.55±0.45 [#]	22.14±0.97 [#]
依达拉奉低剂量组	2.5	8.7±0.47	7.24±0.86	16.04±1.16
依达拉奉中剂量组	5	6.94±0.45 [#]	5.48±0.51 [#]	19.25±1.28 [#]
依达拉奉高剂量组	10	5.26±0.44 [#]	4.19±0.57 [#]	21.18±0.13 [#]

注:与正常对照组比较,* $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$

Note: vs. normal control group, * $P<0.01$; vs. model group, [#] $P<0.05$

正常对照组小鼠肝小叶结构正常、形态完整,肝小叶内及汇管区无炎细胞浸润。模型组小鼠肝小叶结构紊乱不清,汇管区纤维化及慢性炎细胞浸润。依达拉奉低剂量组小鼠肝细胞呈现不同程度的水肿变性,依达拉奉中、高剂量组小鼠肝细胞变性、炎性细胞浸润减少,坏死程度显著减轻。各组小鼠肝组织病理学图片见图1。

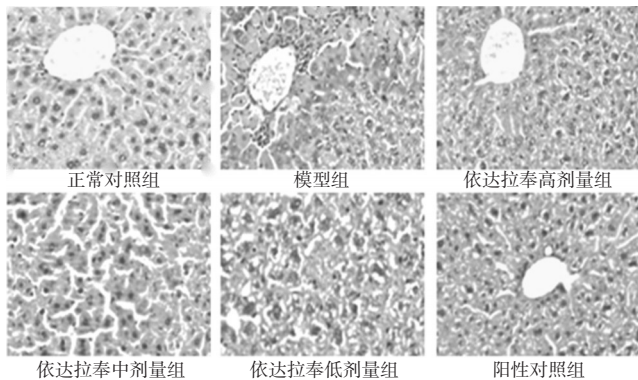


图1 各组小鼠肝组织病理学图片(HE,×100)

Fig 1 Pathological pictures of liver tissue of mice in all groups(HE,×100)

4 讨论

对乙酰氨基酚复制肝损伤模型是药物性肝损伤的经典模型。有研究发现,对乙酰氨基酚可增强小鼠肝细胞膜脂质过氧化而引起细胞损伤^[9]。血清的ALT和AST是反映肝细胞受损的重要指标,本研究结果显示,依达拉奉高、中剂量组小鼠血清中ALT、AST活性明显降低,与文献报道一致^[6],表明依达拉奉对小鼠的药物性肝损伤具有保护作用。

IL-2主要由辅助性T细胞产生,具有通过降低炎症介质水平而减轻其对细胞损伤程度的作用^[7]。IL-6是一种是参与免疫反应、炎症和一系列病理生理过程的重要刺激因子,其作用主要是通过干扰血管内凝血机制影响肝微循环,加重对肝细

胞的损伤^[8-9]。本研究结果显示,依达拉奉高、中剂量可明显增加肝损伤模型小鼠血清中IL-2含量、降低IL-6含量,表明其对肝损伤有保护作用。

LPO是体内自由基相互作用的产物,其可严重破坏肝细胞膜结构,导致肝细胞的肿胀坏死,肝损伤程度与LPO的含量呈正相关性^[5]。本研究结果显示,依达拉奉高、中剂量能明显降低肝损伤模型小鼠肝组织中LPO含量。

依达拉奉对小鼠肝组织中SOD活性有显著增强作用,表明依达拉奉可诱导SOD的表达,提高机体清除自由基的活性。MDA是脂质过氧化的最终产物,其水平反映了组织过氧化的损伤程度^[10]。本研究结果显示,经对乙酰氨基酚复制模型,小鼠肝组织中MDA含量增加、SOD活性降低,给予依达拉奉后,小鼠肝组织中MDA含量降低、SOD活性增强,表明依达拉奉可通过稳定肝细胞膜正常结构、清除体内自由基、促进组织修复、抑制脂质过氧化而减轻肝损伤。

综上所述,依达拉奉对对乙酰氨基酚致肝损伤模型小鼠有明显的保护作用,其机制可能与抗氧化及增强免疫有关。

参考文献

- [1] 席海龙,郑泽琪,施国祥.依达拉奉注射液对兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J].江西医学院学报,2009,49(8):6.
- [2] 张舸,徐秋萍,黄海英,等.依达拉奉对大鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用[J].浙江大学学报:医学版,2008,37(3):308.
- [3] 刘进.依达拉奉治疗原发性肾病综合征的疗效观察[J].中国药师,2006,9(2):117.
- [4] 黄玉霞.三七总皂苷对急性化学性肝损伤小鼠的保护作用[J].山西中医学院学报,2014,15(3):11.
- [5] 谢斌,俞大军,程绍民,等.加味小柴胡汤对醋氨酚所致肝损伤的保护作用[J].时珍国医国药,2008,19(1):130.
- [6] 石臣磊,秦华东,石铁锋,等.依达拉奉对大鼠肝I/R损伤的保护作用[J].中国普通外科杂志,2010,19(1):28.
- [7] 翟志敏. IL-2对免疫激活和免疫耐受的双向调节作用[J].中国药理学通报,2013,29(3):319.
- [8] 毕涉,高骥援.炎症与抗炎药物[M].北京:人民卫生出版社,1993:294.
- [9] 潘爱珍,易伟民,余晓娟,等.人参总皂苷对脾虚模型大鼠的保护作用研究[J].中国药房,2013,24(39):3682.
- [10] 李晓冬,李俊,李荣,等.橙皮苷对刀豆蛋白A致小鼠免疫性肝损伤的保护作用[J].安徽医科大学学报,2010,45(3):350.

(收稿日期:2015-01-23 修回日期:2015-03-10)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅