

## · 早期肝损伤动物模型生物标志物变化规律研究专题 ·

[编者按] 目前肝损伤是临床治疗难点,复发性大、发病率高,易发展为肝硬化、肝衰竭等,严重危害人体健康。急性肝损伤是肝脏疾病初始环节、共同途径,及早发现肝脏损伤,对早期急性肝损伤进行干预是治疗肝损伤的重要手段。临床诊断肝损伤指标主要有丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),总胆红素(TBIL),碱性磷酸酶(ALP)等对于微弱的毒性改变并不敏感、特异性弱,不能检测到早期肝损伤,因此探索更加敏感、特异性更强的早期新型生物标志物来评价肝损伤已成为近年的研究热点。本研究通过复制四氯化碳( $\text{CCl}_4$ )化学性肝损伤、对乙酰氨基酚药物性肝损伤、酒精性肝损伤模型,证明血清谷氨酸脱氢酶(GLDH),嘌呤核苷酸磷酸化酶(PNP), $\alpha$ -谷胱甘肽-S-转移酶( $\alpha$ -GST),精氨酸酶1(Arg1)对于及早发现肝损伤灵敏性更强,为肝损伤的早期诊断提供依据。研究急性肝损伤生物标志物对肝损伤的早期诊断、预防及治疗肝脏疾病有重大意义。

# 对乙酰氨基酚致大鼠肝损伤早期生物标志物水平的变化规律

朱平生, 焦炎杰, 付双楠, 苗明三\*, 孟玉, 朱正望, 高达  
(河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] 目的:通过比较对乙酰氨基酚(APAP)致肝损伤模型大鼠传统生物标志物丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸氨基转移酶(AST),碱性磷酸酶(ALP),总胆红素(TBIL)和潜在生物标志物谷氨酸脱氢酶(GLDH),嘌呤核苷酸磷酸化酶(PNP), $\alpha$ -谷胱甘肽-S-转移酶( $\alpha$ -GST),精氨酸酶1(Arg1)的变化来判断GLDH,PNP, $\alpha$ -GST,Arg1是否可以作为检测药物性肝损伤的早期生物标志物。方法:48只大鼠随机分为2组,分为正常组、模型组,每组24只,雌雄各半。给予模型组灌胃 $1\ 250\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  APAP溶液复制药物性肝损伤的模型,在给予APAP后3,6,12,24 h,每个时间点每组随机取6只大鼠(雌雄各半),检测血清ALT,AST,ALP,TBIL,GLDH,PNP, $\alpha$ -GST,Arg1水平及肝组织匀浆GLDH,PNP, $\alpha$ -GST,Arg1水平;苏木素-伊红(HE)染色检查肝组织病理学变化。结果:与正常组比较,模型组大鼠血清和肝组织匀浆的ALT,AST,ALP,TBIL,GLDH,PNP, $\alpha$ -GST,Arg1水平均明显升高( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),表明APAP致药物性肝损伤模型复制成功。模型组大鼠血清和肝组织的GLDH,PNP, $\alpha$ -GST,Arg1水平比ALT,AST水平升高时间早,幅度大。结论:GLDH,PNP, $\alpha$ -GST,Arg1较传统肝功能检测指标具有较好的灵敏性,可以作为早期检测药物性肝损伤的生物标志物。

[关键词] 对乙酰氨基酚;肝损伤;早期生物标志物;变化规律

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2019)02-0118-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190221

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181024.1552.009.html>

[网络出版时间] 2018-10-26 10:17

## Dynamic Changes of Biomarker Levels in Early Stage of Acetaminophen-induced Liver Injury

ZHU Ping-sheng, JIAO Yan-jie, FU Shuang-nan, MIAO Ming-san\*, MENG Yu, ZHU Zheng-wang, GAO Da  
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[Abstract] **Objective:** To determine whether glutathione dehydrogenase (GLDH), purine nucleotide

[收稿日期] 20180721(001)

[基金项目] 河南省科技创新人才计划-杰出青年项目(154100510020);河南省高校科技创新团队支持计划项目(16IRTSTHN023);河南中医学科学院省属高校基本科研业务费专项项目(2014KYYWF-ZZCX3-10);河南中医学科学院科技创新团队项目(2015XCXTD01)

[第一作者] 朱平生,博士,教授,从事中医药防治肝胆病方向研究,Tel:0371-86565097,E-mail:zhupingsheng@126.com

[通信作者] \*苗明三,博士,教授,从事中药药理学教学与研究,Tel:0371-65962546,E-mail:miaomingsan@126.com

phosphorylase (PNP),  $\alpha$ -glutathione-S-transferase ( $\alpha$ -GST), and arginase 1 (Arg1) can be used as the early biomarkers of drug-induced liver injury by comparing the changes of traditional biomarkers alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (TBIL) and potential biomarkers GLDH, PNP,  $\alpha$ -GST and Arg1 in acetaminophen (APAP) -induced liver injury model rats. **Method:** The 48 rats were randomly divided into two groups: blank group and model group. 24 rats in each group, half male and half female. The model group received 1 250 mg·kg<sup>-1</sup> APAP solution by intragastric administration to establish the drug-induced liver injury. 6 rats (half male and half female) were randomly selected from each group at 3, 6, 12 and 24 h after APAP was given to the model group, to detect the levels of ALT, AST, ALP, TBIL, GLDH, PNP,  $\alpha$ -GST, Arg1 in serum and levels of GLDH, PNP,  $\alpha$ -GST, Arg1 in liver tissue homogenate at each time point. Histopathological changes of liver tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Result:** As compared with the blank group, the levels of ALT, AST, ALP, TBIL, GLDH, PNP,  $\alpha$ -GST and Arg1 in serum and liver homogenates were significantly increased in model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), indicating that the APAP-induced liver injury model was successfully replicated. GLDH, PNP,  $\alpha$ -GST and Arg1 levels in serum and liver tissues of rats in the model group were increased earlier and more significantly than ALT and AST levels. **Conclusion:** GLDH, PNP,  $\alpha$ -GST and Arg1 can be used as biomarkers for early detection of drug-induced liver injury.

[**Key words**] acetaminophen; drug-induced liver injury; early biomarker; change law

肝脏是人体重要的脏器,有着强大的代谢功能和解毒功能,进入人体的大部分药物都要经过肝脏的代谢、转化,然而那些在代谢的过程中能产生有毒或致癌的物质会对肝脏造成损伤<sup>[1]</sup>。一些化学药物、生物制剂等可诱发肝功异常,肝细胞损伤、坏死等,从而形成药物性肝损伤<sup>[2]</sup>。目前发现,国内、外造成药物性肝损伤的药物有很大的不同。国外有研究表明,药物性肝损伤每年的发病率为 0.01% ~ 0.15%<sup>[3]</sup>。其中引起药物性肝损伤的药物多为抗菌类药品<sup>[4]</sup>。在我国,随着时代的发展,人们越来越多的关注自己的身体健康,由药物造成的肝损伤也越来越多<sup>[5]</sup>。我国引起药物性肝损伤的以抗结核药、抗微生物用药和解热镇痛用药为多<sup>[6]</sup>。药物的毒性大小与用药的剂量及用药的周期都成正比<sup>[7]</sup>。

对乙酰氨基酚(APAP)是引起药物性肝损伤最常见的药物,在过量注射 APAP 后的 6 ~ 12 h 内丙氨酸氨基转移酶(ALT)会到达高峰,经常被用作药物性肝损伤的模式<sup>[8]</sup>。APAP 作为解热镇痛的一类药物,服用过量或者长时间的服用可使体内蓄积大量的 APAP,生成较多的毒性物质 *N*-乙酰对苯醌亚胺(NAPQI),为使其失去活性,大量的消耗体内的生长激素促分泌素(GHS),使肝细胞得不到保护进而引发肝损伤<sup>[9]</sup>,甚至出现肝衰竭<sup>[10]</sup>。然而目前 ALT,天冬氨酸氨基转移酶(AST)作为临床诊断的检测指标已无法满足人们对于药物性肝损伤早期诊

断的要求<sup>[11]</sup>。

近年来,一些潜在的生物标志物被报道。但由于单个生物标志物并不能完全反映肝脏损伤。使用多个灵敏度高且特异性、重复性好的生物标志物进行联合评价,才能有望显著提高早期诊断的灵敏性和准确性。笔者前期的研究发现谷氨酸脱氢酶(GLDH),嘌呤核苷酸磷酸化酶(PNP), $\alpha$ -谷胱甘肽-S-转移酶( $\alpha$ -GST),精氨酸酶 1(Arg1)有较好的灵敏性。因此,本研究进一步观察 GLDH, PNP,  $\alpha$ -GST, Arg1 在肝损伤早期的动态变化,并与 AST, ALT 进行比较,验证 GLDH, PNP,  $\alpha$ -GST, Arg1 联合检验对于药物性肝损伤早期诊断的价值,为采用药食同源中药早期干预此类肝损伤提供依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级, Wistar 大鼠 48 只,雌雄各半,体质量 180 ~ 200 g,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供,实验动物使用许可证号 SYXK(豫)2015-0005。饲养于河南中医药大学实验动物中心,动物合格证编号 37009200002824。适应性喂养后用于实验。本实验获得河南中医药大学实验动物伦理委员会批准。

**1.2 药物与试剂** APAP 片(上海强生制药有限公司,批号 20160302);ALT,AST,碱性磷酸酶(ALP),总胆红素(TBIL)试剂盒(上海复星长征医学科学有限公司,批号分别为 D1507053, D1507073, D1506073, D1507013);GLDH, PNP,  $\alpha$ -GST, Arg-1 酶

联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (天津市致远化学式制剂有限公司, 批号均为 E20160701A); 水合氯醛 (天津市致远化学试剂有限公司, 批号 20160510); 苏木素-伊红 (HE) 染液 (贝索企业有限公司, 批号 BA4025)。

**1.3 仪器** Cytation3 型细胞成像酶标仪 (美国伯腾公司), AU400 型全自动生化分析仪 (日本奥林巴斯公司), GL-16G 型台式离心机 (上海安亭科学仪器厂), UV-2000 型紫外可见分光光度计 [尤尼柯 (上海) 仪器有限公司], YP1201N 型电子天平 [舜宇恒平 (上海) 科学仪器有限公司], DZKW-4 型电子恒温水浴锅 (北京中兴伟业仪器有限公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 48 只大鼠随机分为 2 组, 每组 24 只, 分别为正常组、模型组。正常组大鼠给予正常饲养, 不做特殊处理; 模型组给予 APAP 制备肝损伤模型<sup>[8]</sup>。

**2.2 给药方法** 2 组每日灌胃给予相同体积的蒸馏水 1 周, 在末次喂养 1 h 后, 给模型组大鼠灌胃 APAP 溶液 1 250 mg·kg<sup>-1</sup>, 造成急性药物性肝损伤模型。

**2.3 样本采集** 在给予模型组大鼠 APAP 后的 3, 6, 12, 24 h, 每个时间点每组随机取 6 只雌雄各半大鼠, 共 12 只, 处理 2 组动物, 称量大鼠体质量, 用 10% 水合氯醛以 3 mL·kg<sup>-1</sup> 麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 4 ℃, 4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取血清, -80 ℃ 冻存, 用于常规生化检测。收集完血清后, 摘取肝脏, 取肝右叶加 0.9% 氯化钠溶液制成 10% 肝组织匀浆, 3 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min, 取上清液备用。另取肝脏左叶固定于 10% 的甲醛溶液, 以备之后 HE 染色进行肝组织病理学检查。

## 2.4 指标检测

**2.4.1 ALT, AST, TBIL, ALP 的水平检测** 采用全

自动生化仪测定血清肝功能 ALT, AST, TBIL, ALP 的水平。

**2.4.2 ELISA 检测 GLDH, PNP, α-GST, Arg1 水平** 采用 ELISA 试剂盒检测血清中 GLDH, PNP, α-GST, Arg1 水平, 步骤严格按照说明书进行。

**2.4.3 HE 染色观察肝组织病理学变化** 将固定后的肝组织, 依次经过脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋后在石蜡切片机上进行连续切片, 切片厚度为 5 μm, 贴片后烘干。将烘干的切片依次二甲苯脱蜡 10 min; 100% I, 100% II, 95%, 80%, 70% 乙醇脱水, 自来水冲洗 2 min; 苏木素 3 min, 自来水冲洗 1 min, 盐酸乙醇分化, 自来水冲洗 1 min, 氨水反蓝, 自来水冲洗 1 min, 伊红染色, 自来水冲洗 1 min, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光镜下观察肝组织结构变化, 并拍照。

**2.5 统计学方法** 采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 组与组之间的比较用单因素方差分析表示, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 肝损伤模型大鼠血清 ALT, AST, ALP, TBIL 水平动态变化** 与正常组比较, 模型组大鼠的血清 ALT, AST 水平差异在 3 h 时无显著的统计学意义; 在 6, 12, 24 h 时均有明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); ALT 在 24 h 时模型组值大约达到正常组的 4 倍。AST 在 24 h 时模型组的值大约为正常组的 2 倍。与正常组比较, 模型大鼠血清 ALP 在 3, 6, 12, 24 h 均有明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 在 3 h 时, 模型组的值大约为正常组的 1.5 倍, 到 24 h, 模型组已约达到正常组的 2.2 倍。与正常组比较, 模型大鼠血清 TBIL 在 3 h 上无显著的差异, 在 6, 12, 24 h 时均有显著升高 ( $P < 0.01$ ), 到 24 h 时, 模型组的值大概为正常组的 10 倍。见表 1。

表 1 APAP 致肝损伤模型大鼠血清 ALT, AST, ALP, TBIL 水平的动态变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 1 Dynamic changes of serum ALT, AST, ALP and TBIL levels in APAP-induced liver injury model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	时间/h	ALT/U·L <sup>-1</sup>	AST/U·L <sup>-1</sup>	ALP/U·L <sup>-1</sup>	TBIL/μmol·L <sup>-1</sup>
正常	3	26.52 ± 5.06	84.50 ± 8.07	195.28 ± 24.91	0.50 ± 0.22
模型		27.98 ± 3.85	107.33 ± 29.06	287.40 ± 48.16 <sup>1)</sup>	0.72 ± 0.23
正常	6	23.48 ± 3.22	84.83 ± 6.05	215.05 ± 15.44	0.40 ± 0.18
模型		39.93 ± 5.01 <sup>2)</sup>	109.33 ± 12.44 <sup>1)</sup>	373.93 ± 41.07 <sup>2)</sup>	2.98 ± 0.53 <sup>2)</sup>
正常	12	26.93 ± 4.47	79.33 ± 7.74	215.97 ± 12.13	0.75 ± 0.45
模型		77.43 ± 13.90 <sup>2)</sup>	134.33 ± 21.57 <sup>2)</sup>	396.68 ± 25.56 <sup>2)</sup>	3.92 ± 0.84 <sup>2)</sup>
正常	24	31.80 ± 5.12	93.67 ± 27.31	215.67 ± 16.14	0.60 ± 0.15
模型		134.67 ± 18.36 <sup>2)</sup>	171.33 ± 15.77 <sup>2)</sup>	481.25 ± 25.41 <sup>2)</sup>	6.47 ± 0.50 <sup>2)</sup>

注: 与同时间正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2, 3 同)。

### 3.2 肝损伤模型大鼠早期生物标志物检测指标的动态变化

**3.2.1 肝损伤模型大鼠血清 Arg1, GLDH,  $\alpha$ -GST, PNP 水平的动态变化** 与正常组比较,模型组大鼠的血清 Arg1 水平在 3, 6, 12, 24 h 明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 6, 12 h 下降, 12 h 时又有所上升。在 3 h 时,模型组的值约是正常组 3 倍, 24 h 时,模型组的值约是正常组的 2 倍。与正常组比较,模型组大鼠血清 GLDH 水平在 3, 6, 12, 24 h 时显著升高 ( $P < 0.01$ ); 3 h 与正常组相比明显上升, 6, 12, 12 h 下降。在 3 h 时,模型组的值大概为正常组的 2 倍; 在 24 h,模型组的值约为正常组的 1.5 倍。与正常

组比较,模型组大鼠的血清  $\alpha$ -GST 水平在 3, 6, 12, 24 h 时明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ); 3 h 与正常组相比明显上升, 6 h 下降, 12 h 又有所上升, 在 24 h 时下降。在 3 h,模型组的值大约为正常组的 2 倍; 在 24 h,模型组的值大约为正常组的 1.5 倍。与正常组比较,模型组大鼠血清 PNP 水平在 3, 6, 12, 24 h 上显著升高 ( $P < 0.01$ ); 提示 APAP 能使模型大鼠的血清 PNP 在 3 h 与正常组相比明显上升, 6 h 稍有下降, 12 h 又有所上升, 在 24 h 时下降为 4 个时间点最小值。在 3 h,模型组的值大约为正常组的 7 倍; 在 24 h,模型组的值大约为正常组的 3 倍。见表 2。

表 2 APAP 致肝损伤模型大鼠血清 Arg1, GLDH,  $\alpha$ -GST, PNP 水平的动态变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	时间/h	Arg1	GLDH	$\alpha$ -GST	PNP
正常	3	4.23 $\pm$ 0.38	3.30 $\pm$ 0.24	9.07 $\pm$ 0.50	3.87 $\pm$ 0.27
模型		11.69 $\pm$ 0.78 <sup>2)</sup>	7.29 $\pm$ 0.73 <sup>2)</sup>	20.38 $\pm$ 2.55 <sup>2)</sup>	28.70 $\pm$ 3.91 <sup>2)</sup>
正常	6	3.95 $\pm$ 0.41	3.52 $\pm$ 0.17	10.18 $\pm$ 0.46	5.03 $\pm$ 0.40
模型		10.25 $\pm$ 0.57 <sup>2)</sup>	7.15 $\pm$ 0.98 <sup>2)</sup>	19.06 $\pm$ 2.64 <sup>1)</sup>	27.70 $\pm$ 6.56 <sup>2)</sup>
正常	12	4.92 $\pm$ 0.45	3.88 $\pm$ 0.34	11.05 $\pm$ 0.28	6.82 $\pm$ 0.56
模型		10.07 $\pm$ 1.02 <sup>2)</sup>	6.02 $\pm$ 0.47 <sup>2)</sup>	21.33 $\pm$ 1.70 <sup>2)</sup>	29.55 $\pm$ 8.54 <sup>2)</sup>
正常	24	5.60 $\pm$ 0.54	4.02 $\pm$ 0.21	12.13 $\pm$ 0.40	7.88 $\pm$ 0.52
模型		11.39 $\pm$ 3.87 <sup>1)</sup>	6.10 $\pm$ 0.74 <sup>2)</sup>	18.69 $\pm$ 2.47 <sup>2)</sup>	21.93 $\pm$ 1.85 <sup>2)</sup>

**3.2.2 肝损伤模型大鼠肝匀浆 Arg1, GLDH,  $\alpha$ -GST, PNP 水平的动态变化** 与正常组比较,模型组大鼠肝组织匀浆 Arg1 水平在 3, 6, 12, 24 h 时均有明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),提示 APAP 能使模型大鼠的肝组织匀浆 Arg1 在 3 h 与正常组相比明显上升, 6 h 下降, 12 h 又有所上升, 在 24 h 时又下降, 在 3 h 时模型组的值约为正常组的 3 倍; 在 24 h,模型组的值大约为正常组的 2 倍。与正常组比较,模型大鼠肝组织匀浆 GLDH 水平在 3, 6, 12, 24 h 时均显著升高 ( $P < 0.01$ ),提示 APAP 能使模型大鼠的肝组织匀浆 GLDH 在 3 h 与正常组相比明显上升, 6 h 下降, 12 h 下降, 在 24 h 时下降较明显,为 4 个时间点里最低值, 在 3 h 时模型组的值大约为正常组的 6 倍, 在 24 h 时模型组的值大约为正常组的 3 倍。与正常组比较,模型组大鼠肝组织匀浆  $\alpha$ -GST 水平在 3, 6, 12, 24 h 时均明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),提示 APAP 能使模型大鼠的肝组织匀浆  $\alpha$ -GST 在 3 h 与正常组相比明显上升, 6, 12 h 均下降, 24 h 有所上升, 在 3 h 时

模型组的值大约为正常组的 3 倍, 在 24 h 时模型组的值大约为正常组的 2 倍。与正常组比较,模型组大鼠肝组织匀浆 PNP 水平在 3, 6, 12 h 上显著升高 ( $P < 0.01$ ),其差异在 24 h 上无显著的统计学意义,提示 APAP 能使模型大鼠的 PNP 肝组织匀浆在 3 h 与正常组相比明显上升, 6 h 下降, 12 h 有所上升, 24 h 大幅下降, 在 3 h 时模型组的值大约为正常组的 7 倍, 在 24 h 时模型组的值大约为正常组的 3 倍。见表 3。

**3.3 大鼠肝组织病理学观察** 光镜下观察可见正常组大鼠肝组织结构正常,肝索排列有序呈放射状,肝细胞核清晰,肝细胞未见变性及坏死。3 h 模型组出现少量空泡样变性, 6 h 模型组空泡样变性增多,并伴有炎性细胞浸润, 12 h 模型组空泡样变性细胞较 6 h 增多,并有明显的炎性细胞浸润, 24 h 模型组空泡样变性更为显著,肝细胞坏死明显,肝索排列紊乱并且炎性因子大量聚集。见图 1。

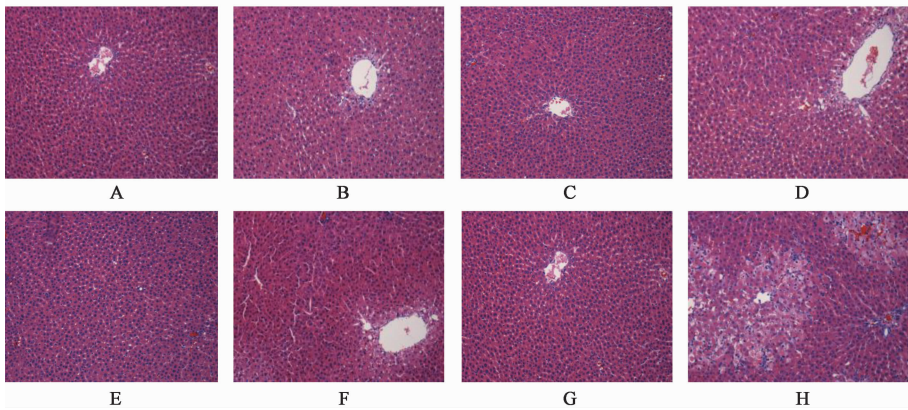
### 4 讨论

据统计,药物性肝损伤已经在全世界死亡原因中

表 3 APAP 致肝损伤模型大鼠肝组织匀浆 Arg1, GLDH,  $\alpha$ -GST, PNP 水平的动态变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Dynamic changes of Arg1, GLDH,  $\alpha$ -GST, PNP levels in liver homogenate of APAP-induced liver injury model rats ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ ) U·L<sup>-1</sup>

组别	时间/h	Arg1	GLDH	$\alpha$ -GST	PNP
正常	3	3.87 $\pm$ 0.22	1.53 $\pm$ 0.16	6.47 $\pm$ 0.38	4.20 $\pm$ 0.30
模型		11.60 $\pm$ 1.25 <sup>2)</sup>	8.90 $\pm$ 1.08 <sup>2)</sup>	17.82 $\pm$ 2.50 <sup>2)</sup>	27.82 $\pm$ 1.59 <sup>2)</sup>
正常	6	3.95 $\pm$ 0.19	1.83 $\pm$ 0.21	7.08 $\pm$ 0.23	5.07 $\pm$ 0.60
模型		9.78 $\pm$ 1.65 <sup>2)</sup>	7.85 $\pm$ 1.02 <sup>2)</sup>	15.03 $\pm$ 1.49 <sup>2)</sup>	27.24 $\pm$ 6.09 <sup>2)</sup>
正常	12	3.85 $\pm$ 0.19	1.75 $\pm$ 0.10	7.92 $\pm$ 0.23	6.92 $\pm$ 0.78
模型		10.82 $\pm$ 1.63 <sup>2)</sup>	7.80 $\pm$ 0.74 <sup>2)</sup>	14.00 $\pm$ 2.97 <sup>1)</sup>	28.39 $\pm$ 2.47 <sup>2)</sup>
正常	24	4.20 $\pm$ 0.26	1.67 $\pm$ 0.16	8.87 $\pm$ 0.38	8.13 $\pm$ 0.31
模型		8.97 $\pm$ 2.67 <sup>1)</sup>	4.53 $\pm$ 0.28 <sup>2)</sup>	14.67 $\pm$ 1.74 <sup>2)</sup>	21.14 $\pm$ 15.73



A. 3 h 正常组; B. 3 h 模型组; C. 6 h 正常组; D. 6 h 模型组; E. 12 h 正常组; F. 12 h 模型组; G. 24 h 正常组; H. 24 h 模型组

图 1 各时间点大鼠肝组织病理结构的变化 (HE,  $\times 200$ )

Fig. 1 Changes of pathological structure of liver tissue at each time point (HE,  $\times 200$ )

排名第 5<sup>[12]</sup>。然而到目前为止仍没有较好的药物或其他治疗方案可以很好的阻止急性药物性肝损伤到慢性药物性肝损伤的发展<sup>[13]</sup>。目前, 诊断药物性肝损伤仍以基本肝功能的 ALT, ALP, AST, TBIL 等检查项目为主, 血清氨基转移酶一直被作为是诊断肝损伤的敏感指标。然而这些指标存在一定的局限性, 在临床诊断中不能达到足够的灵敏度和特异度<sup>[14]</sup>。这就需要其他的生物标志物来弥补这一不足。本实验通过对血清及肝组织匀浆的 GLDH,  $\alpha$ -GST, Arg1, PNP 和 ALT, AST, ALP, TBIL 的比较来确定药物性肝损伤的早期生物指标。

血清 ALT, AST, ALP 和 TBIL 一直是临床、研究中肝损伤最常用的生化标志物。ALT 虽然一直被作为肝损伤的黄金指标, 但也存在着一定的不足, 需要其他指标的补充<sup>[15]</sup>。AST 的敏感性较 ALT 低, 然而可以当 ALT 的良好补充。ALP 对胆汁淤积比较敏感, 常用来作为胆汁淤积的诊断指标, 对于其他的仍需要与 AST, ALT 等指标结合<sup>[16]</sup>。肝细胞内生物活性与代谢酶的诱导作用决定了 TBIL 在循环血液中的浓度, 因此 TBIL 可反映肝功能的状况, 而不是肝

损伤的程度。这些指标主要用于肝损伤发生后的诊断检测, 对于早期肝损伤的预测较差<sup>[17]</sup>。

GLDH 是一种主要存在于肝脏的线粒体酶, 正常人体内的 GLDH 水平较为稳定, 一般不受年龄和性别的影响, 当肝损伤或肝细胞坏死时, 血液中的 GLDH 升高及线粒体功能受损, 线粒体膜受到破坏<sup>[18]</sup>。GLDH 的半衰期为 16 h 左右, 其灵敏性高于 ALT, 可以作为肝毒性的早期标志物研究<sup>[19]</sup>。

$\alpha$ -GST 是谷胱甘肽结合反应的关键酶, 主要分布在肝小叶中心细胞, 对肝代谢区的损伤反应十分灵敏<sup>[20]</sup>。当肝细胞发生病变、损伤时  $\alpha$ -GST 也会发生一定的变化, 当服用过量的 APAP 时  $\alpha$ -GST 会异常增高。

PNP 大多位于肝细胞等的细胞质中, 正常情况下多检测不到, 只有当肝脏坏死时才会在血液中检测出来<sup>[21]</sup>。

Arg1 主要分布在肝脏中, 是肝脏中的一种催化反应酶, 可以催化水解 L-精氨酸从而生成尿素和鸟氨酸<sup>[11]</sup>。有研究表明 Arg1 在肝损伤中有较高的灵敏度, 尤其在检验胆管损伤这一方面的敏感度

最高<sup>[22]</sup>。

有研究表明,使用 APAP 对小鼠单次大剂量灌胃可使 ALT,AST 在 1~3 h 有所升高,在给予 APAP 3 h 后会向肾小管肝细胞发生退变,而在灌胃的 6 h 和 12 h,尤其在 24 h 时可以发现高剂量 APAP 的小鼠肝细胞明显坏死<sup>[23]</sup>。

在本实验中,肝功能检测项目在 3 h 时除 ALP 的模型组值是正常组的 1.5 倍,有一定的变化外,与正常组比较,3 h 模型组 ALT,AST,TBIL 无明显变化。而 Arg1,GLDH, $\alpha$ -GST,PNP 在 3 h 就已经有了较大的改变;且 GLDH,PNP, $\alpha$ -GST,Arg1 较 ALT,AST,ALP,TBIL 升高的时间早,幅度大。同时 Arg1,GLDH, $\alpha$ -GST,PNP 这 4 个指标与传统的指标相比对肝脏的损伤有着较高的灵敏性,可以作为检测药物性肝损伤早期的生物标志物。

#### [参考文献]

[1] Bale S S, Verneti L, Senutovitch N, et al. In vitro platforms for evaluating liver toxicity[J]. *Exp Biol Med* (Maywood), 2014, 239(9): 1180-1191.

[2] 王海珍,李秀惠. 药物性肝损伤发病机制研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2018, 34(4): 883-887.

[3] Rangnekar A S, Fontana R J. An update on drug induced liver injury[J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*, 2011, 57(2): 213-229.

[4] Zyoud S H, Awang R, Sulaiman S A. Reliability of the reported ingested dose of acetaminophen for predicting the risk of toxicity in acetaminophen overdose patients [J]. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 2012, 21(2): 207-213.

[5] Sobhonslidsuk A, Poovorawan K, Soonthornworasiri N, et al. The incidence, presentation, outcomes, risk of mortality and economic data of drug-induced liver injury from a national database in Thailand; a population-base study[J]. *BMC Gastroenterol*, 2016, 16(1): 135.

[6] 姚飞,汪燕燕. 综合分析药物性肝损伤 9355 例[J]. *安徽医药*, 2011, 15(10): 1312-1314.

[7] 徐男,时海燕,李晓宇,等. 何首乌制剂不良反应研究进展与成因分析[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(4): 208-214.

[8] 明雅南,李春敏,张静怡,等. 对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤和肝衰竭模型中线粒体基因组转录改变[J]. *肝脏*, 2016, 21(6): 447-451.

[9] Knockaert L, Descatoire V, Vadrot N, et al. Mitochondrial CYP2E1 is sufficient to mediate oxidative

stress and cytotoxicity induced by ethanol and acetaminophen[J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(2): 475-484.

[10] WANG X, SUN R, WEI H, et al. High-mobility group box 1 (HMGB1)-toll-like receptor (TLR)4-interleukin (IL)-23-IL-17A axis in drug-induced damage-associated lethal hepatitis: interaction of  $\gamma\delta$  T cells with macrophages[J]. *Hepatology*, 2013, 57(1): 373-384.

[11] 刘小茜,吴文晓,耿兴超,等. 药物性肝损伤生物标志物研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2018, 27(1): 47-52.

[12] 顾立强,马冰洁,孟夏,等. 中药肝毒性及肝脏保护作用的研究方法进展[J]. *中国药物警戒*, 2013, 10(7): 408-410.

[13] 黄昂,梁庆升,孙颖,等. 慢性药物性肝损伤的诊治研究进展[J]. *传染病信息*, 2018, 31(2): 105-107.

[14] 邵珍,邓中平. 药物性肝损伤新型生物标志物的研究进展[J]. *药学服务与研究*, 2017, 17(5): 321-325.

[15] 孔明,戴菁,孙旖,等. 药物性肝损伤生物标志物研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(3): 290-293.

[16] 高绪聪,柴振海,张宗鹏. 药物性肝损伤的生物标志物及其评价的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(5): 692-696.

[17] 贺蕾艳,郭瑶雪,李春,等. 药物性肝损伤生物标志物研究进展[J]. *药学学报*, 2015, 50(8): 959-965.

[18] 孙颖,谢欢,王春红,等. 特异质型药物性肝损伤病因评估及生物标志物的研究进展[J]. *传染病信息*, 2017, 30(4): 203-208.

[19] 曾瑾,唐绍微,刘云华,等. 苍耳子对正常大鼠重复给药的肝毒性效应及其机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2018, 34(2): 79-82.

[20] Muller P Y, Dieterle F. Tissue-specific, non-invasive toxicity biomarkers: translation from preclinical safety assessment to clinical safety monitoring[J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2009, 5(9): 1023-1038.

[21] 侯衍豹,黄妍,马莉,等. 肝毒性生物标志物研究进展[J]. *药物评价研究*, 2017, 40(12): 1804-1810.

[22] Bailey W J, Holder D, Patel H, et al. A performance evaluation of three drug-induced liver injury biomarkers in the rat: alpha-glutathione S-transferase, arginase 1, and 4-hydroxyphenyl-pyruvate dioxygenase [J]. *Toxicol Sci*, 2012, 130(2): 229-244.

[23] YANG X, Greenhaw J, Ali A, et al. Changes in mouse liver protein glutathionylation after acetaminophen exposure[J]. *J Pharmacol Exp Therap*, 2012, 340(2): 360-368.

[责任编辑 周冰冰]