

酒精致大鼠肝损伤早期血清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, 高达, 朱正望
(河南中医药大学, 郑州 450046)

[摘要] **目的:**研究酒精性肝损伤的生物标志物谷氨酸脱氢酶(GLDH), α -谷胱甘肽-S-转移酶(α -GST),嘌呤核苷酸磷酸化酶(PNP),精氨酸酶 1(Arg1)的动态变化,明确这些指标联合检测是否可以作为酒精性肝损伤早诊断生物标志物。**方法:**Wistar 大鼠 48 只,随机分为正常组和模型组 2 组,每组 24 只,雌雄各半。每日禁食但不禁水 7 h 后,模型组灌胃 50% 乙醇/10 mg·kg⁻¹,正常组灌服同样体积的生理盐水;1 h 后按前用量重复灌胃 50% 乙醇 1 次,正常组灌服同体积生理盐水,连续造模和给药 6 d,造成急性酒精性肝损伤模型。在第 2,3,4,6 天末次酒精灌胃 3 h 后,分别随机取 2 组大鼠每组 6 只雌雄各半,共 12 只,处死各组动物,测定天门冬氨酸氨基转移酶(AST),丙氨酸氨基转移酶(ALT),碱性磷酸酶(ALP),胆红素(TBIL),GLDH, α -GST,PNP,Arg1 水平。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠 ALT,AST,ALP,TBIL,GLDH,PNP, α -GST,Arg1 水平差异显著($P < 0.01$),表明酒精性肝损伤模型已成功建立。模型组大鼠 GLDH,PNP, α -GST,Arg1 比 ALT,AST 水平升高时间早,幅度大。**结论:**GLDH,PNP, α -GST,Arg1 较传统肝功能检测有较强的灵敏性,可以作为酒精性肝损伤早期检测生物标志物。

[关键词] 肝损伤;酒精;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)02-0129-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190223

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181105.1048.001.html>

[网络出版时间] 2018-11-06 09:01

Changes of Serum Biomarkers levels in Early Stage of Alcohol-induced Liver Injury in Rats

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the dynamic changes of the biomarkers of alcoholic liver injury, including glutamate dehydrogenase (GLDH), α -glutathione-S-transferase (α -GST), purine nucleotide phosphorylase (PNP), and arginine enzyme 1 (Arg1), and clarify whether these indexes can be used as early diagnostic biomarkers for alcoholic liver injury. **Method:** 48 Wistar rats were randomly divided into a blank group and a model group, 24 rats in each group, half male and half female. After fasting but except water for 7 h, 50% ethanol/10 mL·kg⁻¹ was given to the model group by intragastric administration and the same volume of normal saline was administered to the blank group. After 1 h, 50% ethanol was again given for once by intragastric administration according to the previous dosage. In the blank group, the same volume of normal saline was administered. After modeling and administration for 6 d, acute alcoholic liver injury model was established. 3 h after the last intragastric administration of alcohol at day 2, 3, 4, 6, six rats (half male and half female) in each group were randomly selected. All the animals were sacrificed to determine the aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), bilirubin (TBIL), GLDH, α -GST, PNP, and Arg1 levels. **Result:** As compared with the blank group, the levels of ALT, AST, ALP, TBIL, GLDH, PNP,

[收稿日期] 20180721(003)

[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);河南中医学属省属高校基本科研业务费专项项目(2014KYYWF-ZZCX3-10);河南中医学属科技创新团队项目(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

α -GST and Arg1 in the model group were significantly different ($P < 0.01$), indicating that the alcoholic liver injury model was successfully established. In the model group, GLDH, PNP, α -GST and Arg1 levels were increased earlier and more significantly than ALT and AST levels. **Conclusion:** GLDH, PNP, α -GST and Arg1 can be used as biomarkers for early detection of alcoholic liver injury.

[**Key words**] acute liver injury; alcohol; early biomarkers; change law

酒精性肝损伤是指长期或在短期内大量饮酒,过量的酒精在肝脏中经过一系列的反应可导致肝细胞线粒体的损伤等氧化应激损伤,使脂肪大量蓄积于肝脏之中,造成肝脏损伤的一种疾病^[1]。中医学认为,饮酒过度会伤脾、败胃、损肝,致湿热内蕴,熏蒸肝胆,痰浊凝聚,阻塞气机,久之,气滞、血瘀、痰浊、湿热蕴结,或积于胁下,或结于腹中,而成“酒积”“酒癖”之证。

目前酒精已成为我国导致肝损伤的第二大因素^[2],酒精性肝病也已成为慢性肝病中的一个主要病种^[3]。因此对酒精性肝损伤进行早诊断、早干预就显得尤为重要。目前临床诊断所采用的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),其特异性、灵敏度并不能满足临床早诊断的需求^[4]。探索更加敏感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,国内外对此也有一定的文献报道,但仍需较多的实验验证。目前,建立酒精灌胃动物模型也已经在国内大量的运用^[5]。笔者通过前期实验研究发现谷氨酸脱氢酶(GLDH), α -谷胱甘肽-S-转移酶(α -GST),嘌呤核苷酸磷酸化酶(PNP),精氨酸酶 1(Arg1)作为新型的标志物对酒精性肝损伤有较好的灵敏性,在此基础上,本研究通过建立酒精性肝损伤模型,对这些新型的生物标志物和传统的生物标志物(ALT,AST)在肝损伤早期进行动态测定、比较,验证这些新型的早期生物标志物的灵敏性,为酒精性肝损伤早诊断和早干预提供依据。

1 材料

1.1 动物 Wistar 大鼠 48 只,体质量 180~200 g,SPF 级,雌雄各半,购于山东济南朋悦实验有限公司,动物合格证编号 37009200002627;实验动物使用许可证号 SYXK(豫)2015-0005。喂养于河南中医药大学实验动物中心,温度 20~25℃,相对湿度 40%~70%,昼夜明暗交替时间 12 h。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 试剂及配制 ALT,AST,总胆红素(TBIL),碱性磷酸酶(ALP)试剂盒(上海复星长征医学科学有

限公司,批号分别为 D1507053, D1507073, D1507013, D1506073); α -GST, GLDH, PNP, Arg1(苏州卡尔文生物科技有限公司,批号均为 20160810);无水乙醇(郑州派尼试剂厂,批号 20160512);配制 50%乙醇溶液 1 350 mL,取无水乙醇 675 mL 加纯水补至 1 350 mL。配制 10%水合氯醛,称取水合氯醛 15 g 加入 0.9%生理盐水至 150 mL。

1.3 仪器 AU400 型全自动生化分析仪(日本奥林巴斯公司),Cgtation3 CYT3 MFUDG 型酶标仪(美国伯腾仪器有限公司),UV-2000 型紫外-可见分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司),TGL-16G 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),YP1201N 型电子天平(上海舜宇恒平科学仪器有限公司),DZKW-4 型电子恒温水浴锅(北京中兴伟业仪器有限公司),可调式移液枪(上海雷勃分析仪器有限公司),Leica DMI4000B 型智能倒置荧光显微镜(德国徕卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组 把 48 只大鼠随机分为 2 组,雌雄各半,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;模型组给予乙醇制备肝损伤模型。

2.2 模型制备 每日禁食不禁水 7 h 后,模型组按 10 mg·kg⁻¹灌胃 50%乙醇,正常组灌服同体积生理盐水;1 h 后按前用量重复灌胃 50%乙醇 1 次,正常组灌服同体积生理盐水,连续造模和给药 6 d,建立急性酒精性肝损伤模型^[5]。

2.3 样本采集 在第 2,3,4,6 天这 4 个时间段的末次酒精灌胃 3 h 后分别随机取 2 组大鼠每组 6 只雌雄各半,共 12 只,称量大鼠体质量,以 10%水合氯醛按 3 mL·kg⁻¹麻醉动物,腹主动脉取血,静置 1~2 h 后离心(3 500 r·min⁻¹, 10 min)分离血清,用于生化指标的测定。

2.4 指标检测

2.4.1 血清肝功能 ALP,AST,ALT,TBIL 的水平检测 采用全自动生化仪测定血清肝功能 ALP,AST,ALT,TBIL 的水平。

2.4.2 ELISA 检测 PNP, GLDH, Arg1, α -GST 水平

采用 ELISA 法检测 GLDH, PNP, α -GST, Arg1 水平,所有步骤严格按照试剂盒说明书进行。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计学软件处理实验数据,计量资料应用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析进行比较,方差齐用 LSD 方法分析,若方差不齐采用 Dunnett's T3 分析,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肝功能血清 ALT,AST 水平的动态变化 与正常组比较,模型组大鼠的 ALT,ALP 水平在 2,3,4,6 d 时显著升高 ($P < 0.01$),提示

ALT,ALP 水平各个时间点的值随着时间的推移而增加,6 d 的值为最大值,在 2 d 时,模型组大约分别是正常组的 1.3,1.5 倍。与正常组比较,模型大鼠的 AST,TBIL 水平在 3,4,6 d 时显著升高 ($P < 0.01$),其余时间各组无显著的统计学意义,提示 AST,TBIL 的水平在造模 2 d 时的变化不显著,之后随着时间的推移而不断升高,在第 6 天时到为这 4 个时间点的最大值。造模 2 d 后 TBIL 水平的变化不显著,2 d 后随着时间的推移而增加,6 d 到达最高点,在 2 d 时,模型组大约是正常组的 1.4 倍。见表 1。

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

组别	时间/d	ALT	AST	TBIL	ALP
正常	2	38.82 \pm 4.72	88.06 \pm 12.20	0.47 \pm 0.20	192.87 \pm 24.60
模型		50.14 \pm 6.65 ²⁾	101.15 \pm 10.27	0.64 \pm 0.18	283.85 \pm 47.57 ²⁾
正常	3	47.38 \pm 17.58	93.19 \pm 11.40	0.41 \pm 0.14	212.39 \pm 15.25
模型		100.29 \pm 13.30 ²⁾	330.25 \pm 29.63 ²⁾	2.49 \pm 0.43 ²⁾	369.31 \pm 40.57 ²⁾
正常	4	37.95 \pm 14.08	87.11 \pm 10.97	0.68 \pm 0.36	213.30 \pm 11.98
模型		180.33 \pm 10.65 ²⁾	387.62 \pm 57.73 ²⁾	3.22 \pm 0.67 ²⁾	391.78 \pm 25.24 ²⁾
正常	6	37.55 \pm 9.00	86.57 \pm 12.54	0.39 \pm 0.10	213.00 \pm 15.94
模型		200.83 \pm 26.63 ²⁾	471.59 \pm 40.27 ²⁾	5.25 \pm 0.40 ²⁾	475.31 \pm 25.10 ²⁾

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

3.2 肝损伤模型大鼠血清生物标志物 Arg1, α -GST,PNP,GLDH 水平的动态变化 与正常组比较,模型组大鼠的 Arg1, α -GST,PNP,GLDH 水平在 2,3,4,6 d 时显著升高 ($P < 0.01$);提示 Arg1 水平各个时间点的值随着时间的推移而增加,6 d 的值为最大值,在 2 d 时模型组大致是正常组的 1.7 倍; α -GST 在第 3 天时为这 4 个时间点的最大值,在 2 d

时模型组大致是正常组的 1.9 倍;PNP 水平在 2 d 时即有较为显著的变化,在 3 d 时的大鼠值略微有下降,之后 2 个时间点的值逐渐增高,6 d 的值为最大值,在 2 d 时模型组大致是正常组的 1.6 倍。GLDH 同样在 2 d 时就有较为显著的变化,之后 3 个时间点数值在逐渐下降,在 2 d 时模型组大致是正常组的 2 倍。见表 2。

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

组别	时间/d	Arg1	α -GST	PNP	GLDH
正常	2	5.65 \pm 0.20	8.97 \pm 0.30	49.63 \pm 1.75	3.29 \pm 0.22
模型		9.68 \pm 2.57 ²⁾	16.88 \pm 2.52 ²⁾	80.52 \pm 3.75 ²⁾	6.52 \pm 0.62 ²⁾
正常	3	5.71 \pm 0.21	9.40 \pm 0.42	51.28 \pm 2.30	3.71 \pm 0.21
模型		11.42 \pm 2.57 ²⁾	19.08 \pm 1.40 ²⁾	79.45 \pm 5.10 ²⁾	6.40 \pm 0.83 ²⁾
正常	4	5.38 \pm 0.13	9.09 \pm 0.34	53.35 \pm 2.30	3.54 \pm 0.84
模型		12.33 \pm 2.86 ²⁾	18.77 \pm 3.75 ²⁾	88.55 \pm 4.68 ²⁾	5.45 \pm 0.40 ²⁾
正常	6	5.84 \pm 0.35	9.60 \pm 0.35	57.72 \pm 1.43	3.22 \pm 0.34
模型		13.65 \pm 2.25 ²⁾	18.54 \pm 1.88 ²⁾	94.54 \pm 6.48 ²⁾	5.51 \pm 0.63 ²⁾

3 讨论

过量饮酒易损伤人们的身体健康,会造成胃溃疡、肝损伤等各种疾病,严重者还可引起死亡^[6]。有研究表明,2010 年全球因过量饮酒导致酒精性肝硬化而死亡的人数占全部肝硬化死亡的 48%^[7]。酒精性肝损伤的发病机制是一个复杂的过程,肝毒性潜在生物标志物存在种属、组织分布、半衰期等差异,因此使用多个特异性、灵敏性高的生物标志物进行联合评价,对酒精性肝损伤的早期诊断有重要帮助。

ALT 主要分布在肝脏的肝细胞浆中,当肝脏受损时,ALT 被释放进入血液中,使血清 ALT 升高^[8],因此血清中的 ALT 升高程度可以反映肝细胞的损伤程度。AST 主要贮藏于线粒体中,当肝脏损伤严重时 AST 被释放于血液中,可以使血清 AST 升高^[9]。乙醇在其代谢中会破坏线粒体,导致 AST 升高^[10]。因此,临床上常通过血清 ALT,AST 来判定肝损伤。然而对于有些情况,虽然 ALT,AST 有升高但不是由肝损伤引起的,如骨骼肌损伤时血清中 ALT^[11]同样升高,而且这些指标对于肝脏早期的改变并不十分敏感,只有当肝细胞发生实质性损伤后才会显著升高^[12]。TBIL 包括结合胆红素和非结合胆红素 2 种,这 2 种胆红素的来源与所经途径不同,所引起疾病也有一定的差异^[13]。ALP 主要存在于肝脏、肾脏、小肠、骨骼及胎盘中。而血清中的 ALP 大部分来自于肝脏及骨骼,所以 ALP 不能单独作为诊断肝损伤的指标,其对于肝损伤不具备特异性。同时 ALP 主要反映各种肝内、肝外胆管阻塞性的疾病,例肝内胆汁淤积时,ALP 可明显升高^[14],但若为肝细胞病变时 ALP 升高幅度较小。因此通过检测 TBIL 的变化对诊断肝损伤不具有特异性和稳定性。因此寻找和验证新的能更早反映肝损伤的指标成为临床诊断的迫切需求。

目前已发现一些早期肝损伤的标志物^[15]。PNP 作为补救嘌呤途径中的一种关键酶可以催化分解得到相对应的 L-脱氧核糖磷酸盐及相应的基团。PNP 主要存在于肝细胞、枯否细胞、内皮细胞的细胞质中,当这些细胞坏死后被释放到肝血窦中^[16],与 ALT 相比可以更加敏锐的反应肝脏的损伤。GLDH 作为一种线粒体酶,在肝脏和肾脏中都有分布,但是主要以肝脏分布为多。赵元明^[17]临床研究发现,当肝细胞受损致线粒体损伤时,GLDH 的升高幅度大于传统的生物标志物 ALT 及 AST,可以作为肝细胞损伤的特异性指标。同时有研究表明,GLDH 的半

衰期为 16 h,比 ALT 的敏锐度高,可以作为十分有前景的肝毒性生物标志物^[18]。Arg1 作为合成尿素的重要酶,多分布在肝脏中,其敏锐度高于 ALT,AST,可以作为潜在的肝细胞损伤的生物标志物^[19]。 α -GST 大多存在于肝小叶中心细胞,相对分子质量较小,当细胞损伤时,和其它相比更容易透过损伤的细胞膜,因此 α -GST 对肝脏的损伤更加的敏感;而且 α -GST 在红细胞中不表达,同时不受溶血的影响,其检测结果相比更加的准确。其肝脏损伤外的其他因素如肌肉坏死等不能使 α -GST 升高^[20]。

随着我国经济水平的快速发展,人们生活水平的提高、饮食结构的改变,由酒精造成的肝损伤也越来越多,严重威胁着大众的身体健。现代医学对酒精性肝损伤的治疗存在着一定的局限性^[21]。越来越多的研究表明,中药对酒精性肝损伤有着较好的疗效。中药可以多途径的降低肝损伤,在防止酒精性肝损伤方面发挥着相当重要的作用^[22]。找到更加灵敏的生物标志物,早发现、早干预酒精性肝损伤,降低酒精对肝脏损害是目前迫切需要做的。

经本实验的数据分析可知,在给予大鼠酒精灌胃建立肝损伤模型后,与传统的测试指标相比,模型组大鼠的 Arg1, GLDH, PNP, α -GST 这几个指标和正常组相比在 2 d 时就有了较大幅度的升高,有较强的灵敏度,表明其对早期诊断酒精性肝损伤有较高的价值。

[参考文献]

- [1] 邱萍,李相,孔德松,等. 酒精性肝病发病机制研究的新进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(2): 160-163.
- [2] 王咪娜,徐士勋,林锦璇,等. 鳖甲寡肽 I-C-F-6 对乙醇诱导的小鼠慢性肝损伤的实验研究[J]. 天津中医药, 2015, 32(1): 26-29.
- [3] WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. Hepatology, 2014, 60(6): 2099-2108.
- [4] 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.
- [5] 柴玮杰,孙建飞,王明秋,等. 大鼠亚急性酒精性肝损伤模型的建立[J]. 实验动物科学, 2018, 35(2): 47-51.
- [6] 陶施民,卢贤欢,郭雅娟,等. 葛根枳椇子栀子胶囊解酒护肝功效研究[J]. 中医药导报, 2018, 24(10): 19-22, 27.
- [7] Rehm J, Samokhvalov A V, Shield K D. Global burden of alcoholic liver diseases[J]. J Hepatol, 2013, 59(1): 160-168.

- [8] 吕圭源,陈素红,张丽丹,等. 铁皮石斛对小鼠慢性酒精性肝损伤模型血清 2 种转氨酶及胆固醇的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):192-193.
- [9] 徐博,吴畏难,李传甲,等. 萱草花总黄酮对小鼠急性酒精性肝损伤保护作用及机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(23):139-143.
- [10] 张艳芳,黄晶. 酒精性肝纤维化的血清标志物研究进展[J]. 临床肝胆病杂志,2018,34(3):623-626.
- [11] Shabaneh A I, Tamimi H A, McDonald R. Elevated alanine aminotransferase levels associated with polymyositis; can this be due to muscle injury? [J]. J Clin Rheumatol,2008,14(6):363-364.
- [12] Amacher D E, Schomaker S J, Aubrecht J, et al. Development of blood biomarkers for drug induced liver injury: an evaluation of their potential for risk assessment and diagnostic[J]. Mol Diagn Ther, 2013,17(6):343-354.
- [13] 李飞,陆伦根. 肝功能异常的评估以及相关肝病的诊断思路[J]. 胃肠病学,2018,23(5):305-308.
- [14] Raoul Poupon. Liver alkaline phosphatase: a missing link between cholelithiasis and biliary inflammation [J]. Hepatology,2015,61(6):2080-2090.
- [15] Ozer J, Ratner M, Shaw M, et al. Schomaker S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity [J]. Toxicology,2008,245(3):194-205.
- [16] YAMAMOTO T, KIKKAWA R, YAMADA H, et al. Investigation of proteomic biomarkers *in vivo* hepatotoxicity study of rat liver: toxicity differentiation in hepatotoxicants [J]. J Toxicol Sci,2006,31(1):49-60.
- [17] 赵元明. 血清谷氨酸脱氢酶活性检测在肝胆疾病中的临床价值[J]. 检验医学,2013,28(2):163-165.
- [18] 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.
- [19] 耿兴超,沈连忠,李波,等. 肝毒性生物标志物研究进展[J]. 中国药学杂志,2011,46(10):721-725.
- [20] 刘晓娜,刘密凤,贾栗,等. 药源性肝损伤潜在血清生物标志物的研究进展[J]. 首都医科大学学报,2014,35(4):511-515.
- [21] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南[J]. 中国肝脏病杂志:电子版,2010,2(4):49-53.
- [22] 李洪亮,张秋芳,郑雪皎,等. 中药抗肝氧化应激的研究进展[J]. 医药导报,2013,32(12):1608-1612.

[责任编辑 周冰冰]