

黄芪注射液联合恩替卡韦对乙型肝炎模型小鼠血清炎症因子及肝功能的影响[△]

胡雪原^{1*}, 李杏英¹, 杨勤¹, 黄立中²(1.重庆三峡医药高等专科学校中医系, 重庆 404120; 2.湖南中医药大学第一附属医院内科, 长沙 410002)

中图分类号 R512.62 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4800-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.12

摘要 目的:研究黄芪注射液联合恩替卡韦对乙型肝炎模型小鼠血清炎症因子及肝功能的影响。方法:将60只小鼠随机分为正常对照组(生理盐水)、模型组(生理盐水)、黄芪注射液组(0.5 mL/10 g)、恩替卡韦组(45 μg/kg)和联用组(0.5 mL/10 g黄芪注射液+45 μg/kg恩替卡韦),各12只。除正常对照组外,其余4组小鼠均建立乙型肝炎模型。成模后,各组小鼠ig给药,每天1次,连续4周。给药结束后,检测小鼠血清中肿瘤坏死因子α(TNF-α)、干扰素γ(IFN-γ)、白细胞介素8(IL-8)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)水平,观察各组小鼠肝组织的病理学变化。结果:与正常对照组比较,模型组小鼠血清中TNF-α、IFN-γ、IL-8、AST、ALT和TBIL水平均显著升高($P<0.05$),肝细胞呈弥散性重度脂肪变性。与模型组比较,各给药组小鼠血清中TNF-α、IFN-γ、IL-8、AST、ALT和TBIL水平均显著降低($P<0.05$),肝组织病理学变化得到不同程度改善,且联用组小鼠指标改善程度优于黄芪注射液组和恩替卡韦组($P<0.05$)。结论:黄芪注射液联合恩替卡韦有助于下调乙型肝炎模型小鼠血清中炎症因子表达、改善肝功能水平,且两药联用效果优于两药单用。

关键词 黄芪注射液;恩替卡韦;乙型肝炎;炎症因子;肝功能;小鼠

Effects of Astragali Radix Injection Combined with Entecavir on Serum Inflammatory Cytokines and Liver Function of Model Mice with Hepatitis B

HU Xueyuan¹, LI Xingying¹, YANG Qin¹, HUANG Lizhong²(1.College of TCM, Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 404120, China; 2.Dept. of Internal Medicine, the First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of Astragali radix injection combined with entecavir on serum inflammatory cytokines and liver function of model mice with hepatitis B. METHODS: 60 mice were randomly divided into normal control group (normal saline), model group (normal saline), Astragali radix injection group (0.5 mL/10 g), entecavir group (45 μg/kg) and combination group (0.5 mL/10 g Astragali radix injection+45 μg/kg entecavir), 12 in each group. Except for normal control group, mice in other 4 groups were induced for hepatitis B models. After modeling, all mice were intragastrically administrated once a

- hance cisplatin chemosensitivity in cervical cancer cells via induction of apoptosis[J]. *Life Sci*, 2013, 93(1):7-16.
- [13] Liu H, Li N, Yao L, et al. Prediction of doxorubicin sensitivity in gastric cancers based on a set of novel markers[J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(4):963-969.
- [14] Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(2):157-170.
- [15] Eker B, Meissner R, Bertsch A, et al. Label-free recognition of drug resistance via impedimetric screening of breast cancer cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3):e57423.
- [16] He Y, Ding J, Lin Y, et al. Gambogic acid alters chemosensitivity of breast cancer cells to adriamycin[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, doi: 10.1186/s12906-015-0710-8.
- [17] Wang X, Lu Y, Yang J, et al. Identification of triosephosphate isomerase as an anti-drug resistance agent in human gastric cancer cells using functional proteomic analysis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2008, 134(9):995-1003.
- [18] Fei C, Zhao Y, Guo J, et al. Senescence of bone marrow mesenchymal stromal cells is accompanied by activation of p53/p21 pathway in myelodysplastic syndromes[J]. *Eur J Haematol*, 2014, 93(6):476-486.

△ 基金项目:重庆市教委科学技术研究项目(No.KJ121802)
* 讲师, 硕士。研究方向:中西医结合临床。电话:023-58567969。
E-mail:851225755@qq.com

(收稿日期:2017-05-09 修回日期:2017-07-14)
(编辑:邹丽娟)

day, for 4 weeks. After administration, tumor necrosis factor α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), interleukin 8 (IL-8), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL) levels in serum were detected, and the pathological changes in liver tissue in each group were observed. RESULTS: Compared with normal control group, TNF- α , IFN- γ , IL-8, AST, ALT, TBIL levels in serum of mice in model group were significantly increased ($P < 0.05$); and liver cells were diffuse and severe steatosis. Compared with model group, TNF- α , IFN- γ , IL-8, AST, ALT, TBIL levels in serum of mice in each administration group were significantly decreased ($P < 0.05$), pathological changes in liver tissue were improved to varying degrees, and the index improvement degree in combination group was superior to Astragali radix injection group and entecavir group ($P < 0.05$). CONCLUSIONS: Astragali radix injection combined with entecavir helps to down-regulate the expressions of inflammatory cytokines of model mice with hepatitis B, and improve the liver function. The combination use has better effect than single use.

KEYWORDS Astragali radix injection; Entecavir; Hepatitis B; Inflammatory cytokines; Liver function; Mice

慢性乙型肝炎(简称乙肝)是指由乙肝病毒(HBV)感染导致的以肝损伤为主的全身性传染疾病,可发展为肝硬化,且随着病情的继续发展和HBV的进一步复制,则可能发展为肝癌^[1]。恩替卡韦为新一代抗HBV药,能有效抑制HBV的DNA复制^[2-3],在病毒性肝炎的临床治疗中具有重要作用。但恩替卡韦临床应用时需要考虑患者的耐受程度以及不良反应发生情况,在应用时较为受限,导致患者的临床预后结局差异性较大。因此,恩替卡韦治疗乙肝的安全性与有效性一直是临床研究热点。近年来的相关研究表明,黄芪注射液有助于改善乙肝患者临床症状,遏制、逆转患者肝纤维化病程,有学者提出采用恩替卡韦联合黄芪注射液的方案治疗乙肝,其目的是为了在保证乙肝治疗效果的同时,降低恩替卡韦的应用剂量与治疗时间,提升乙肝治疗效果以及安全性。本研究通过复制乙肝小鼠模型,探讨黄芪注射液联合恩替卡韦对模型小鼠血清中炎症因子及肝功能的影响,为两药联用治疗乙肝提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

JA1203型电子天平(上海精密科学仪器有限公司); TGL-16型高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); 6500型全自动生化分析仪(日本日立公司); SHH-W21型电热恒温水浴锅(北京市长风仪器有限公司); EVOS智能显微成像系统及配套显微镜(美国Invitrogen公司)。

1.2 药品与试剂

恩替卡韦片(中美上海施贵宝制药有限公司,批号:20151025,规格:每片0.5 mg);黄芪注射液(成都地奥九泓制药有限公司,批号:20151210,规格:10 mL/支);肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、干扰素 γ (IFN- γ)、白细胞介素8(IL-8)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBIL)试剂盒均购自深圳晶美生物工程有限公司北京分公司。

1.3 动物

清洁级C57BL/6小鼠60只,♀♂各半,4~6周龄,体质量20~25 g,购于华中科技大学实验动物中心[动

物使用合格证号:SYXK(鄂)2010-0057]。小鼠购入后于室温为(22.12±0.35)℃、相对湿度为(55.45±1.21)%的条件下饲养。

2 方法

2.1 分组与给药

将60只小鼠适应性饲养1周后,根据编号随机分为5组,分别为正常对照组、模型组、黄芪注射液组、恩替卡韦组和联用组,各12只。除正常对照组外,其余各组小鼠均参考文献[4]方法建立HBV感染模型,注射24 h后检测小鼠血清中乙肝表面抗原(Hepatitis B surface antigen, HBsAg),HBsAg>1.0 PEIU/mL提示建模成功^[5]。建模成功当天开始给药,正常对照组和模型组小鼠ig 1.5 mL/kg生理盐水;黄芪注射液组小鼠ig 0.5 mL/10 g黄芪注射液;恩替卡韦组小鼠ig 45 μ g/kg恩替卡韦;联用组小鼠ig 0.5 mL/10 g黄芪注射液+45 μ g/kg恩替卡韦^[6]。每天上午9:00-11:00给药,每天给药1次,连续4周。

2.2 标本采集、观察与指标检测

末次给药8 h后,摘小鼠眼球取血2 mL,以离心半径为3 cm、3 000 r/min离心10 min,取血清,采用酶联免疫吸附法检测血清中炎症因子(TNF- α 、IFN- γ 、IL-8)水平,采用电化学发光法检测血清中肝功能指标(AST、ALT、TBIL)水平,具体操作按照相应试剂盒说明书进行。处死小鼠,取肝组织,常规石蜡切片后,行苏木精-伊红(HE)染色,显微镜下观察小鼠肝病理学变化。

2.3 统计学方法

采用SPSS 20.0统计学软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 小鼠血清中炎症因子水平的变化

与正常对照组比较,模型组小鼠血清中TNF- α 、IFN- γ 、IL-8水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠血清中TNF- α 、IFN- γ 、IL-8水平显著降低,且联用组显著低于黄芪注射液组和恩替卡韦组,差异均具

有统计学意义($P < 0.05$),结果见表1。

表1 各组小鼠血清中TNF- α 、IFN- γ 、IL-8水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 12, \mu\text{g/L}$)

Tab 1 Determination results of TNF- α , IFN- γ , IL-8 levels in serum of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 12, \mu\text{g/L}$)

组别	TNF- α	IFN- γ	IL-8
正常对照组	41.02 \pm 6.37	0.26 \pm 0.16	32.82 \pm 5.35
模型组	212.34 \pm 25.61*	2.17 \pm 0.48*	353.47 \pm 42.63*
黄芪注射液组	110.05 \pm 14.25 [#]	1.65 \pm 0.42 [#]	174.12 \pm 22.36 [#]
恩替卡韦组	103.16 \pm 12.48 [#]	1.54 \pm 0.34 [#]	168.29 \pm 17.35 [#]
联用组	66.29 \pm 7.52 ^{#Δ}	1.06 \pm 0.25 ^{#Δ}	105.38 \pm 14.52 ^{#Δ}

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与黄芪注射液组、恩替卡韦组比较, ^{Δ} $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. Astragali radix injection group and entecavir group, ^{Δ} $P < 0.05$

3.2 小鼠血清中肝功能指标变化

与正常对照组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST、TBIL水平显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,各给药组小鼠血清中ALT、AST、TBIL水平显著降低,且联用组低于黄芪注射液组和恩替卡韦组,差异均具有统计学意义($P < 0.05$),结果见表2。

表2 各组小鼠血清中ALT、AST、TBIL水平测定结果($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Tab 2 Determination results of ALT, AST, TBIL levels in serum of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	ALT, U/L	AST, U/L	TBIL, $\mu\text{mol/L}$
正常对照组	40.48 \pm 6.36	46.63 \pm 6.51	4.74 \pm 0.68
模型组	146.02 \pm 15.95*	178.45 \pm 16.28*	22.82 \pm 3.35*
黄芪注射液组	81.05 \pm 10.14 [#]	74.12 \pm 9.36 [#]	15.85 \pm 2.32 [#]
恩替卡韦组	78.93 \pm 9.24 [#]	72.54 \pm 8.16 [#]	14.62 \pm 2.17 [#]
联用组	47.56 \pm 6.78 ^{#Δ}	51.63 \pm 6.09 ^{#Δ}	5.88 \pm 0.79 ^{#Δ}

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[#] $P < 0.05$;与黄芪注射液组、恩替卡韦组比较, ^{Δ} $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. model group, [#] $P < 0.05$; vs. Astragali radix injection group and entecavir group, ^{Δ} $P < 0.05$

3.3 小鼠肝组织病理学变化

正常对照组小鼠可见肝细胞正常,结构完整;模型组小鼠可见肝细胞呈弥漫性重度脂肪变性,出现坏死或间质性炎症病变;黄芪注射液组和恩替卡韦组小鼠可见轻度肝细胞弥漫性脂肪变性;联用组小鼠肝组织结构基本完整,与正常对照组基本相似,结果见图1。

4 讨论

HBV感染后会在患者肝组织中不断复制,引起肝组织发生慢性炎症损伤,此时机会防御性地对这种慢性炎症损伤进行主动性反复修复,引起肝窦内肝星状细胞活化,胶原在肝内不断沉积,肝内纤维组织异常增生,最终导致乙肝、肝硬化的形成^[7]。有研究显示,血清中IL-8水平的变化与乙肝、肝硬化、肝癌等的发生、发展密切相

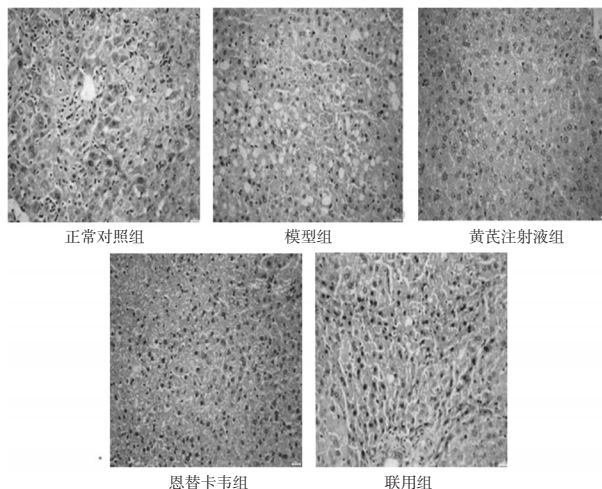


图1 各组小鼠肝组织切片图(HE染色, $\times 200$)

Fig 1 Slice of liver tissue of mice in each group (HE staining, $\times 200$)

关,病情越严重,血清中IL-8水平越高^[8]。细胞因子不平衡现象是导致炎症反应的主要原因,TNF- α 、IFN- γ 和IL-8均是重要的促炎因子,三者共同作用下可引起组织器官的损伤^[9-10]。本研究中,模型组小鼠血清中TNF- α 、IFN- γ 、IL-8水平均显著高于正常对照组,说明小鼠乙肝模型建立成功,且HBV感染后机体产生了明显的炎症反应。

恩替卡韦作为一种新型的核苷类抗病毒药,也是目前推荐的一线抗病毒治疗用药,能快速、选择性地抑制HBV的DNA复制,减轻患者肝细胞炎症,修复损伤的肝细胞^[11-12]。国内外研究报道均证实了其治疗乙肝患者的有效性^[13-14],但由于其易导致上呼吸道感染、咽喉炎等不良反应,也易造成ALT水平升高,这在一定程度上制约了其临床应用。祖国医学认为,乙肝多因湿热瘀毒侵袭所致,病在肝,累及脾、肾。湿热之毒损伤肝络,肝失疏泄则气滞,气滞至血液运行不畅而致瘀血,本为湿热之毒,贯穿慢性乙肝病程之始终,治则当标本兼治。黄芪注射液的主要成分为黄芪,黄芪具有固表敛汗、利水消肿、通调水道的功效,可增强机体抵抗力、抑制HBV病毒、诱导肿瘤细胞凋亡的功效^[6, 15-16]。本文研究中,给药后小鼠血清中TNF- α 、IFN- γ 、IL-8水平均显著降低,且联用组显著低于黄芪注射液组和恩替卡韦组,提示黄芪注射液联合恩替卡韦能有效减轻乙肝模型小鼠的炎症反应。

长期肝细胞功能损害是乙肝患者发生肝硬化的病理基础。恩替卡韦治疗后可有效改善HBeAg阳性患者肝功能^[17]。保肝降酶中药在乙肝的治疗中取得了较好的效果^[18]。黄芪为多年生草本植物,具有补气升阳、益卫固表、利水消肿及免疫调剂作用。刘淑艳等^[19]超声导入黄芪注射液后发现,乙肝患者肝功能及血清中肝纤维化指标均有改善;王迎霞等^[20]采用黄芪注射液联合甘利

欣注射液治疗后,乙肝肝纤维化患者的肝纤维化指标和肝功能均有明显改善。本研究结果显示,乙肝模型小鼠血清中肝功能指标 ALT、AST、TBIL 的水平较正常对照组均显著升高,给药后各给药组小鼠血清中上述肝功能指标水平均显著降低,且以黄芪注射液和恩替卡韦联用组效果最优。

综上所述,黄芪注射液联合恩替卡韦有助于抑制乙肝模型小鼠血清中炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-8 的表达,改善肝功能。但黄芪注射液联合恩替卡韦对乙肝的更多治疗作用机制有待进一步研究,而且由于人体与动物对药物反应能力的差异性,黄芪注射液联合恩替卡韦治疗乙肝还有待于更多的临床研究去证实。

参考文献

[1] Pollicino T, Bellingeri L, Restuccia A, et al. Hepatitis B virus (HBV) induces the expression of interleukin-8 that in turn reduces HBV sensitivity to interferon-alpha[J]. *Virology*, 2013, 444(1/2):317-328.

[2] 韩海英,黄秀香,安西全,等.恩替卡韦联合康艾注射液治疗HBV相关性中晚期肝癌患者的肝功能、凝血、血常规和HBV-DNA水平变化的临床观察[J].*安徽医药*, 2014, 18(6):1158-1159.

[3] 赵文生,李有实,靳君.复方苦参注射液恩替卡韦片对慢性乙型肝炎患者肝功能的改善作用[J].*中国中医药信息杂志*, 2013, 20(3):70-71.

[4] 袁璐. C57BL/6 小鼠乙型肝炎病毒感染模型中细胞因子研究[D].武汉:华中科技大学, 2011.

[5] 石瑶,刘凤君,周仲辉,等.恩替卡韦联合泼尼松对乙型肝炎病毒复制型小鼠体内病毒复制表达的影响[J].*中华传染病杂志*, 2016, 34(2):115-116.

[6] 王晓琳,翁孝刚,王宪华,等.黄芪多糖预防2型糖尿病大鼠肝损伤的实验研究[J].*现代生物医学进展*, 2016, 16(10):1846-1849.

[7] Chakkor A, Rouibaa F, Elaboudi S, et al. An evaluation of entecavir treatment among nucleos(t)ide-naïve Moroccan patients with chronic hepatitis B[J]. *BMJ Open Gastroenterol*, 2016, 3(1):e000081.

[8] 欧珠美朵,嘎松卓嘎,旦增.白细胞介素-10基因多态性与西藏地区慢性乙型肝炎的相关性研究[J].*山东大学学报(医学版)*, 2014, 52(S1):9、25.

[9] 张雷,戴一菲.阿德福韦酯联合还原型谷胱甘肽对代偿期乙型肝炎后肝硬化患者肝功能和炎症因子水平的影响

及其疗效分析[J].*海南医学院学报*, 2015, 21(2):194-196.

[10] Ferreira Sda C, Chacha SG, Souza FF, et al. IL-18, TNF, and IFN- γ alleles and genotypes are associated with susceptibility to chronic hepatitis B infection and severity of liver injury[J]. *J Med Virol*, 2015, 87(10):1689-1696.

[11] 赵攀,钟彦伟,徐东平. 5例应用恩替卡韦治疗的慢性HBV感染者发生HBV逆转录酶区单独A181位点突变的分析[J].*临床肝胆病杂志*, 2011, 27(3):289-291.

[12] Kim HS, Kim BK, Kim SU, et al. Association between level of fibrosis, rather than antiviral regimen, and outcomes of patients with chronic hepatitis B[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2016, 14(11):1647-1656.

[13] 夏红,周智,杨玉霞.乙型肝炎患者恩替卡韦抗病毒治疗后外周血T淋巴细胞PD-1的表达及其与HBeAg血清学的关系[J].*海南医学院学报*, 2016, 22(7):655-657.

[14] Boglione L, De Nicolo A, Cusato J, et al. Entecavir plasma concentrations are inversely related to HBV-DNA decrease in a cohort of treatment-naïve patients with chronic hepatitis B[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2016, 48(3):324-327.

[15] 郭雪红.黄芪注射液的药理作用及临床应用研究进展[J].*中国药房*, 2015, 26(21):3018-3021.

[16] 申玉梅,李文丽,王伟行.康艾注射液联合恩替卡韦治疗乙型病毒性肝炎相关性中晚期肝癌的临床疗效及安全性评价[J].*中国临床药理学杂志*, 2015, 31(24):2390-2392.

[17] Jonas MM, Chang MH, Sokal E, et al. Randomized, controlled trial of entecavir versus placebo in children with hepatitis B envelope antigen-positive chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2016, 63(2):377-387.

[18] 刘蕊洁,叶永安,江锋,等.保肝降酶中药在慢性乙型肝炎治疗中的系统评价[J].*中西医结合肝病杂志*, 2014, 24(1):54-64.

[19] 刘淑艳,杨小明,孟宪红,等.超声导入疗法治疗慢性乙型肝炎肝纤维化临床研究[J].*现代生物医学进展*, 2013, 13(25):4953-4956.

[20] 王迎霞,李庆相,张运巧,等.丹红注射液、黄芪注射液对慢性乙型肝炎肝纤维化的影响[J].*中医杂志*, 2011, 52(17):1486-1488.

(收稿日期:2017-02-22 修回日期:2017-09-30)
(编辑:林静)

《中国药房》杂志——中国科技核心期刊, 欢迎投稿、订阅