

DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2022-04-001

姜黄素对抗结核药物致肝损伤的抑制作用^①

曾 峥^{1②}, 张可锋², 李 波², 钟明利^{2③}

(1. 桂林医学院附属医院, 广西 桂林 541001; 2. 桂林医学院药物研究所, 广西 桂林 541199)

摘要 目的:探究姜黄素对抗结核药物致肝损伤(ATLI)的抑制作用。方法:随机将小鼠分为6组,正常组,模型组,姜黄素高、中、低剂量组,阳性对照水飞蓟素组。模型组和各给药组采用异烟肼和利福平灌胃造模,1次/d。8周后,取肝组织标本进行病理组织学检查;采集血样本检测血清谷丙氨酸转氨酶(ALT)、门冬氨酸转氨酶(AST)、丙二醛(MDA)、碱性磷酸酶(AKP)、总胆汁酸(TBA)以及总胆红素(TBIL);ELISA法检测肝组织匀浆上清液中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)和白介素-6(IL-6)的含量;Western blot检测TLR4,Myd88和NF- κ B的表达。结果:姜黄素可明显减轻抗结核药物致小鼠的肝组织损害;姜黄素组ALT、AST、MDA、AKP活性降低,TBIL、TBA含量下降,TNF- α 、IL-1 β 和IL-6水平降低,TLR4、Myd88、NF- κ B蛋白表达下调($P < 0.05$)。结论:姜黄素能够有效减轻抗结核药物所致的小鼠肝损伤,其作用机理可能与其抗炎和抑制TLR4/Myd88/NF- κ B信号通路相关。

关键词: 姜黄素;抗结核药物;药物性肝损伤;TLR4/Myd88/NF- κ B信号通路

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1008-2409(2022)04-0001-05

Inhibitory effect of curcumin on antituberculous drugs induced liver injury^①

ZENG Zheng^{1②}, ZHANG Kefeng², LI Bo², ZHONG Mingli^{2③}. (1. The Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001; 2. Institute of pharmacology, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effect of curcumin on anti-tuberculosis drugs induced liver injury(ATLI). Methods: The mice were randomized into six groups: normal group, model group, curcumin high-dose, medium-dose and low-dose groups, and positive control silymarin group. Model group and each medication administration group were given isoniazid and rifampicin intragastric model, once a day. Liver tissue samples were collected for histopathological examination after eight weeks; blood samples were collected to detect serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde(MDA), alkaline phosphatase(AKP), total bile acid(TBA) and total bilirubin(TBIL); ELISA was used to detect the content of tumor necrosis factor α (TNF- α) in supernatant of liver tissue

① 基金项目:国家自然科学基金项目(81660104);广西自然科学基金项目(2020JJB140061);桂医中青年教职工科研能力提升项目(2018glmcy067);广西高校中青年教师基础能力提升项目(2017KY0483)。

② 作者简介:曾峥(1986—),女,广西桂林人,2014年首都医科大学药理学硕士毕业,现任桂林医学院附属医院主管药师。研究方向:肝病药理学。

③ 通信作者:钟明利,E-mail:121328684@qq.com。

homogenate, interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin 6 (IL-6); and Western blot was used to detect the protein expression of TLR4, Myd88 and NF- κ B in liver tissues. Results: Anti-tuberculosis drugs induced liver injury in mice can be significantly alleviated by curcumin, inhibit the activities of ALT, AST, MDA, AKP in curcumin group; content of TBIL and TBA was decreased; levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 were decreased too; and expressions of TLR4, Myd88 and NF- κ B protein were down-regulated ($P < 0.05$). Conclusion: Curcumin can effectively relieve ATLI, whose action mechanism may be related to anti-inflammatory and the regulation of TLR4/Myd88/NF- κ B pathway.

Keywords: curcumin; antituberculous drugs; drug-induced liver injury; TLR4/Myd88/NF- κ B signal pathway

异烟肼和利福平是世卫组织 (WHO) 在标准抗结核治疗方案中所推荐的一线抗结核药物^[1], 两药联用具有协同杀死细胞内、外结核杆菌的效果, 且耐药性降低, 但同时不可避免加重了对肝脏的毒性。如何防治抗结核药物致肝损伤已成为抗结核过程中亟待解决的问题。姜黄素 (curcumin) 属于多酚类化合物, 已被广泛应用于食品添加剂, 且姜黄素没有明显的毒副作用^[2]。姜黄素的临床作用有利胆、抗氧化、抗炎, 清除体内自由基, 降血脂、抗病毒和抗肿瘤等, 广泛用于治疗黄疸及其他功能性紊乱^[3]。研究表明姜黄素对四氯化碳肝损伤、慢性酒精性肝损伤、肝纤维化、非酒精性脂肪性肝炎等肝病具有保护作用^[4-6], 而对抗结核药物致肝损伤 (anti-tuberculosis drugs induced liver injury, ATLI) 的研究尚未见报道。因此, 本研究探讨姜黄素对抗结核药物异烟肼和利福平致肝损伤的生物学作用。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

AUW220D 型电子天平 (岛津公司, 日本); Epoch 型全波长酶标仪 (BioTek 公司, 美国); FRESCO-21 (赛默飞世尔科技公司, 美国); 恒温孵育器 (杭州米欧, 中国); BX51 型光学显微镜 (奥林巴斯公司, 日本); 蛋白凝胶电泳仪 (伯乐, 美国); 化学发光成像系统 (杭州申花科技, 中国)。

异烟肼片购于杭州民生药业有限公司 (批号: 1702004); 利福平胶囊购于广东华南药业集团有限公司 (批号: 161101); 姜黄素购于桂林莱科生物科技有限公司 (纯度 $\geq 99.0\%$, 批号: LKB2019015); ALT、

AST、MDA、TBIL、AKP 和 TBA 生化检测试剂盒均购于南京建成公司; IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 检测 ELISA 试剂盒购于武汉 Elabscience 公司; 抗体 TLR4、Myd88、NF- κ B 和内参 β -actin 购于美国 Proteintech 公司; 其他试剂耗材均从国内相应公司获得。

1.2 实验动物

48 只 SPF 级昆明小鼠, 8 周龄, 雄性, 重量 18 ~ 20 g, 来源于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 合格证: SCXK(湘)2019-0004。

1.3 造模和给药

正常组小鼠除外, 模型组和各给药组小鼠采用利福平 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 和异烟肼 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃, 1 次/d, 连续 8 周灌胃造模。本实验采取造模和药物干预同时进行, 高剂量组, 姜黄素剂量 $400 \text{ mg} / \text{kg} \cdot \text{d}^{-1}$, 中剂量组 $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 低剂量组 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 阳性对照组, 水飞蓟素剂量 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; 灌胃体积为 5 ml/kg , 1 次/d, 连续 8 周, 正常组与模型组灌等体积蒸馏水。第 8 周最后 1 d 禁食不禁水, 18 h 后, 采用水合氯醛麻醉, 采集小鼠血液和肝脏组织。

1.4 肝组织病理形态学观察

采集小鼠同部位肝脏组织固定 48 h, 然后进行石蜡包埋, 切成厚度约 $4 \mu\text{m}$ 的组织石蜡片, 通过烤片、脱蜡和 HE 染色、封片, 最后在显微镜下进行组织病理学观察。

1.5 肝损伤相关生化指标检测

将收集分离到的血清, 在多功能酶标仪上严格按照试剂盒操作说明书检测血清中 ALT、AST、MDA、AKP、TBIL 和 TBA 活性或含量。

1.6 肝组织中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平测定

将小鼠同部位的肝组织 100 mg, 加生理盐水 1 ml, 置于玻璃匀浆器中低温匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 环境, 4 000 r/min, 离心 10 min, 分离匀浆上清液备用。按照 ELISA 操作说明检测 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6。

1.7 Western blot 检测 TLR4、Myd88、NF- κ B 蛋白表达

称取小鼠同部位肝组织约 50 mg 置于 1.5 ml 无酶离心管中, 添加预冷的 RIPA 裂解液 1 ml, 置于自动研磨仪中研磨; 将匀浆液进行高速冷冻离心 10 min, BCA 法检测蛋白浓度, 然后定量蛋白样品; 蛋白样品置 95 $^{\circ}\text{C}$ 水浴变性, 电泳分离, 再以 200 mA 恒流将蛋白转印到 NC 膜上; 封闭 2 h, TBST 缓冲液洗膜, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行一抗孵育过夜: TLR4 (1 : 500), Myd88 (1 : 1 000), NF- κ B (1 : 1 000), β -actin (1 : 2 000); 洗膜后加入二抗 (1 : 4 000), 常温孵育约

1.5 h, 洗膜, 最后用 ECL 化学发光液发光; 采集图像, Image J 软件进行图像分析。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝组织病理形态学

正常组小鼠肝细胞的大小及形态正常、排列均匀、肝小叶结构完整。模型组损伤严重, 出现不同程度水肿, 肝小叶结构被破坏, 小叶内和汇管区出现点状、灶性坏死。这些病变提示利福平和异烟肼已造成小鼠肝损伤。姜黄素中剂量、高剂量组以及水飞蓟素组的肝细胞坏死程度较模型组有明显改善, 肝小叶结构基本正常, 肝细胞索状排列较为整齐, 细胞肿胀程度减轻, 姜黄素能减轻 ATLI。

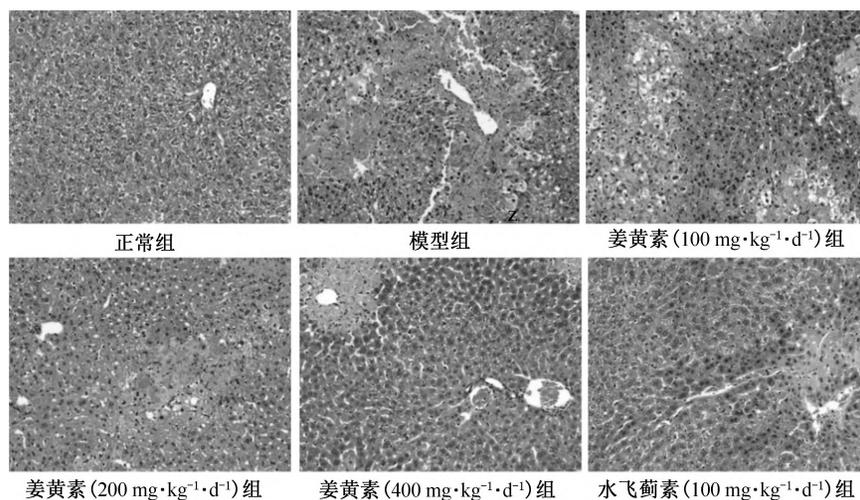


图1 小鼠肝组织病理形态学分析(HE染色, $\times 200$)

2.2 血清 ALT、AST 和 MDA 的活性

模型组 ALT、AST 活性明显升高, MDA 水平降低 ($P < 0.01$), 而姜黄素组 ALT、AST 和 MDA 呈明显剂量依赖性降低, 见表 1。

表1 小鼠血清 ALT、AST 和 MDA 的活性分析 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	MDA(nmol/L)
正常组	15.81 \pm 3.34	36.83 \pm 4.87	2.35 \pm 0.36

续表

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	MDA(nmol/L)
模型组	47.64 \pm 8.90**	112.69 \pm 23.16**	7.95 \pm 1.12**
低剂量组	33.41 \pm 3.95##	81.54 \pm 18.05###	5.89 \pm 0.89#
中剂量组	27.82 \pm 5.54###	61.96 \pm 7.27###	4.27 \pm 0.76###
高剂量组	21.59 \pm 6.13###	55.54 \pm 6.28###	3.72 \pm 0.53###
水飞蓟素组	25.59 \pm 4.59###	59.54 \pm 7.15###	3.57 \pm 0.72###

与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$

2.3 血清 AKP、TBA 和 TBIL 含量

模型组 AKP、TBA 和 TBIL 含量明显升高 ($P < 0.05$)；姜黄素各剂量组 AKP、TBA 和 TBIL 含量低于模型组 ($P < 0.05$)，呈剂量效应关系，见表 2。

表 2 血清 AKP、TBA 和 TBIL 含量分析 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	AKR (金氏单位/100 ml)	TBA ($\mu\text{mol/L}$)	TBIL ($\mu\text{mol/L}$)
正常组	12.19±2.36	25.63±1.04	4.45±1.84
模型组	36.59±5.71**	84.45±3.51**	36.14±5.83**
低剂量组	28.89±4.64#	65.62±8.28##	24.09±3.11#
中剂量组	22.27±3.66###	53.00±6.23###	16.71±3.05###
高剂量组	18.12±3.34###	41.12±5.81###	11.66±2.31###
水飞蓟素组	20.27±3.66###	55.00±6.62###	12.53±2.45###

与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

2.4 小鼠肝组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平

模型组 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的水平高于正常组 ($P < 0.01$)；而姜黄素组中的水平较模型组明显下降 ($P < 0.05$)，见表 3。

表 3 小鼠肝组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平分析 ($n = 8, \bar{x} \pm s, \text{pg/ml}$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常组	19.53±5.84	13.71±2.32	19.61±2.15
模型组	83.86±11.62**	60.25±5.25**	124.85±16.32**
低剂量组	52.09±9.49###	46.73±4.91#	93.25±13.39#
中剂量组	45.19±7.65###	38.22±4.18###	62.10±7.58###
高剂量组	33.59±5.97###	26.26±3.73###	43.13±5.81###
水飞蓟素组	38.23±4.22###	27.51±3.81###	39.25±4.59###

与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

2.5 小鼠肝组织 TLR4、Myd88 和 NF- κ B 蛋白表达

模型组 TLR4、Myd88 和 NF- κ B 的表达较正常对照组显著增加 ($P < 0.01$)，而姜黄素组 TLR4、Myd88

和 NF- κ B 的表达较模型组明显下调 ($P < 0.05$)，见图 2、表 4。

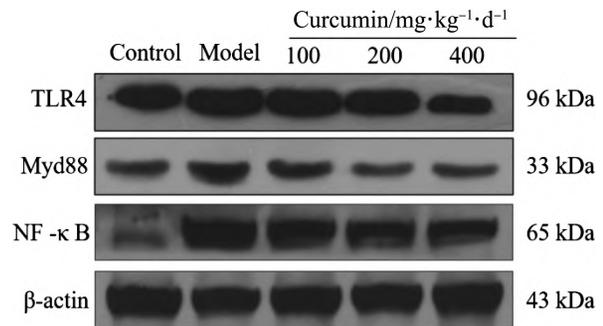


图 2 Western blot 检测小鼠肝组织中 TLR4、Myd88 和 NF- κ B 蛋白表达

表 4 小鼠肝组织 TLR4、Myd88 和 NF- κ B 蛋白表达分析 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	TLR4/ β -actin	Myd88/ β -actin	NF- κ B/ β -actin
正常组	0.76±0.07	0.45±0.09	0.23±0.06
模型组	1.09±0.15**	0.89±0.11**	1.29±0.12**
低剂量组	0.93±0.11	0.80±0.09	0.88±0.09#
中剂量组	0.90±0.06#	0.62±0.12#	0.82±0.10#
高剂量组	0.72±0.08###	0.59±0.06###	0.67±0.08###

与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$

3 讨论

临床上用于判断肝功能的常用指标为 ALT、AST、TBIL 和 TBA，其中 ALT 和 AST 水平可判断肝细胞受损程度，而 TBIL 和 TBA 主要反映肝脏的分泌、排泄以及其解毒功能^[7]。血清 TBA 的水平可反映肝细胞受损程度与肝功能，是对肝脏的分泌、合成、损害状态均有评估作用的血清学指标。AKP 在肝脏受损时其体内水平快速升高，在蛋白去磷酸化和机体代谢调控过程中起重要作用，由于体内肝细胞脂质过氧化代谢产物主要为 MDA，其可直接反映肝细胞氧化应激和过氧化程度^[8]。肝脏中的巨噬细胞受到刺激后可分泌大量的 TNF- α ，TNF- α 能引起其他促炎因子级联放大效应，最终导致炎症发生和肝损伤^[9]。研究表明导致肝损伤发生的重要原因之

一为 TNF- α 的过量分泌^[10]。本实验结果显示,抗结核药物所致小鼠肝损伤指标血清 AST、ALT、MDA、AKP、TBIL 和 TBA,经姜黄素干预后均明显降低,说明姜黄素对抗结核药物诱导的小鼠肝损伤有良好的抑制作用;相关炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平也明显下降,肝组织炎症坏死程度较模型组减轻,说明姜黄素可通过抗炎途径抑制抗结核药物所致小鼠的肝损伤作用。

TLR4 是非特异性免疫(天然免疫)的关键受体之一,在特异性/非特异性免疫之间具有连接作用,在体内感染、损伤和炎症之间起桥梁作用^[11]。MyD88 和 NF- κ B 是 TLRs 信号通路和下游通路中的关键蛋白,另外,NF- κ B 具有转录功能,是免疫、炎症因子和炎症递质调节的枢纽^[12-13],激活 NF- κ B 是 TLRs/MyD88 通路的关键^[14-15]。本实验发现 ATLI 小鼠经姜黄素干预后,肝组织中 TLR4、Myd88 和 NF- κ B 蛋白表达明显下调。

以上研究结果表明姜黄素可抑制抗结核药物所引起的药物性肝损伤,其作用机理可能与抗炎和调控 TLR4/Myd88/NF- κ B 信号通路有关。

参考文献:

- [1] 韦媛媛,杨帆,汤杰,等.抗结核药物的研究进展[J].中国药科大学学报,2020,51(2):231-239.
- [2] 程振田,袁祥萍,戴晓莉,等.姜黄素在动物体内的安全性研究[J].临床医药文献电子杂志,2020,7(36):3-4.
- [3] 孙永,彭明利.姜黄素及其衍生物在肝脏相关疾病中防治作用的研究进展[J].药学学报,2014,49(11):1483-1490.
- [4] 隋菱,郑静彬,蔡国弟,等.姜黄素对四氯化碳诱导大鼠急性肝损伤的保护作用[J].中国现代应用药学,2017,34(11):1517-1521.
- [5] 徐容容,王华,舒志成,等.姜黄素对小鼠急性酒精肝损伤的保护作用[J].饮料工业,2018,21(5):10-12.
- [6] 刘俊平,范竹萍,李海,等.姜黄素对非酒精性脂肪性肝炎的氧化和抗氧化调节作用[J].中华传染病杂志,2018,36(3):139-134.
- [7] 宋培放,潘秋莎,杨凌.药物性肝损伤生物标志物[J].世界中医药.2020,15(23):3553-3560.
- [8] 贾书花,王东,张宏峰,等.当归多糖治疗小鼠乙醇性肝损伤中丙二醛、超氧化物歧化酶及谷胱甘肽过氧化物酶的变化及意义[J].解剖学杂志.2017,40(4):382-385.
- [9] TIEGS G, WOLTER G, WENDEL A. Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine /endotoxin-induced hepatitis in mice[J]. Biochem Pharmacol, 1989, 38(4):627-631.
- [10] 谭丽娟,徐沛演,李俐.血清 IL-6、TNF- α 检测对药物性肝损伤严重程度的预测价值研究[J].中国当代医药,2021,28(10):71-74.
- [11] TAKEDA K, AKIRA S. Roles of Toll-like receptors in innate immune responses[J]. Genes Cells, 2001, 6(9):33-742.
- [12] DUNNE A, O'NEILL L A. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense[J]. Sci STKE, 2003(171):re3. doi:10.1126/stke.2003.171.re3.
- [13] COIMBRA R, MELBOSTAD H, LOOMIS W, et al. LPS-induced acute lung injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition; effects on proinflammatory mediators, metalloproteinases, NF-kappaB, and ICAM-1 expression[J]. J Trauma, 2006, 60(1):15-25.
- [14] MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, JANEWAY C A JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity[J]. Nature, 1997, 388(6640):394-397.
- [15] ADEREM A, ULEVITCH R J. Toll like receptors in the induction of the innate immune response[J]. Nature, 2000, 406(6797):782-787.

[收稿日期:2022-06-20]

[责任编辑:向秋 英文编辑:阳雨君]