

# COX-2在对乙酰氨基酚致大鼠药物性肝损伤中的作用

伍百贺<sup>1,2</sup>, 詹俊<sup>1</sup>, 陈美竹<sup>3</sup>, 张蕾<sup>1</sup> (1. 中山大学附属第二医院 消化科, 广州 510120; 2. 中山大学附属第五医院 消化科, 珠海 519000; 3. 中山大学附属第五医院, 珠海 519000)

**摘要:** 目的 探讨COX-2在对乙酰氨基酚致大鼠药物性肝损伤中的作用。方法 选择40只SD大鼠随机分成对照组、塞来昔布对照组(A组)、对乙酰氨基酚组(B组)、对乙酰氨基酚+塞来昔布组(C组), 每组10只。单次给药, 24小时后采集血液测定ALT、AST、ALP、TBA等生化指标, 之后处死大鼠, 取其肝脏组织行病理学检查, 应用免疫组织化学染色方法检测COX-2的表达。结果 B组肝损伤明显, C组肝损伤较B组严重。对照组大鼠肝脏组织未见COX-2的阳性表达; B组有7例COX-2表达呈阳性, 阳性率为70.0%; C组仅有1例COX-2表达呈阳性, 阳性率为11.1%。结论 COX-2在对乙酰氨基酚所致大鼠急性肝损伤肝组织中表达明显升高, 阻断COX-2后, 肝损伤加重。COX-2表达增高可能是机体对抗对乙酰氨基酚所致大鼠急性肝损伤的一种保护性机制。

**关键词:** 药物性肝损伤; 环氧合酶-2; 氨基酚类

## Protective effects of COX-2 on acetaminophen-induced liver injury in rats

WU Bai-he<sup>1,2</sup>, ZHAN Jun<sup>1</sup>, CHEN Mei-zhu<sup>3</sup>, ZHANG Lei<sup>1</sup> (1. Department of Gastroenterology, Sun Yat-Sen Memorial Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510120, China; 2. Department of Gastroenterology, The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhuhai 519000, China; 3. The Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Zhuhai 519000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the role of COX-2 in acetaminophen-induced liver injury in rats. **Methods** Total of 40 male SD rats were randomly divided into 4 groups: control group, celecoxib treated group (group A), acetaminophen treated group (group B), and acetaminophen combined with celecoxib treated group (group C). Each group was comprised of 10 rats and each rat was given a single dose of appropriate drug. After 24 hours, blood was collected to perform a serum biochemical test of liver function, and liver tissue was harvested for pathological examination and COX-2 expression. **Results** There was obvious liver damage in group B, and liver injury of group C was aggravated by COX-2 inhibition than group B. There was no expression of COX-2 in hepatic tissue in control group. Positive COX-2 expression were observed in 7 rats of group B, with the rate of 70.0% and only one rat in group C, with the rate of 11.1%. **Conclusions** Intensity of COX-2 expression increased in group B and liver damage were aggravated after COX-2 blocking-up in the presence of COX-2-selective inhibitors. Induction of COX-2 expression may be a protective mechanism against acute liver injury induced by acetaminophen.

**Key words:** Drug-induced liver injury; Cyclooxygenase-2; Aminophenols

药物性肝损伤(drug induced liver injury, DILI)是指由药物本身和(或)其代谢产物引起

的肝脏损害。据文献报道, 药物性肝损害约占药物不良反应的7%、住院黄疸患者的2%以及30%的暴发性肝衰竭, 且发病率持续上升, 其中急性肝损伤是药物性肝病最常见的发病形式, 约占报告病例数的90%以上<sup>[1,2]</sup>。国际医学科学组织理事会

基金项目: 广东省自然科学基金(2009B030801142)

通讯作者: 詹俊 Email: zjds663@163.com

(CIOMS)<sup>[3]</sup>将急性药物性肝损伤分为3型,①肝细胞损伤型:  $ALT > 2 ULN$ 或 $R \geq 5$  ( $R = ALT$ 为正常值的倍数/ $ALP$ 为正常值的倍数);②胆汁淤积型:  $ALP > 2 ULN$ 或 $R \leq 2$ ;③混合型:  $ALT$ 和 $ALP$ 均 $> 2 ULN$ 且 $2 < R < 5$ 。已有相关文献报道,确定对乙酰氨基酚可致肝损伤及其引起药物性肝损伤表现出急性肝细胞型肝损伤的临床特点<sup>[4]</sup>。环氧合酶-2 (Cyclooxygenase-2, COX-2) 又称前列腺素合成酶,是前列腺素合成过程中的限速酶,正常情况下在大部分组织中不表达或极低表达,在细胞受到各种刺激的情况下可诱导表达,在炎症及组织损伤、肿瘤的发生发展过程中表达增加<sup>[5-7]</sup>,而目前COX-2在药物性肝损伤中的表达及作用则知之较少。塞来昔布是选择性COX-2抑制剂,能阻断花生四烯酸转化为PGD<sub>2</sub>、PGI<sub>2</sub>和TXA<sub>2</sub>等。本研究应用对乙酰氨基酚复制急性肝细胞型肝损伤的动物模型,通过测定COX-2在阻断前后肝组织中的表达状况,结合肝脏生物化学及病理学检查,探讨COX-2在药物性肝损伤中的作用。

## 1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂、仪器 SPF级SD大鼠40只,体重180~230 g,由中山大学实验动物中心提供。对乙酰氨基酚由广州白云山光华制药股份有限公司提供,塞来昔布胶囊购自辉瑞制药有限公司;羊抗鼠COX-2多克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,Envision免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术开发公司。

1.2 模型制备与标本收集 选择40只SD大鼠随机分为A、B、C及对照组,每组10只。对照组给予自由进食饮水;A组给予20 mg/kg的塞来昔布灌胃;B组给予3 g/kg的对乙酰氨基酚溶液(40℃生理盐水配制)灌胃;C组给予3 g/kg对乙酰氨基酚溶液灌胃,同时给予20 mg/kg塞来昔布灌胃。各组均为单次给药,24小时后取血分离血清并处死大鼠,取肝组织于福尔马林中固定、组织修切、石蜡包埋、常规切片。

1.3 肝脏生化指标测定 取血分离血清,用全自动生化分析仪测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性

磷酸酶(ALP)、总胆汁酸(TBA)。以对照组的ALP、ALT平均数为正常值,计算B组R值,  $R = ALT$ 正常值的倍数/ $ALP$ 为正常值的倍数。

1.4 肝脏组织病理学检查 HE染色观察肝脏形态学改变。

1.5 COX-2表达的检测 肝组织石蜡切片常规脱蜡水化,经微波抗原修复,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>阻断内源性过氧化物酶活性,滴加一抗(COX-2工作浓度为1:100),阴性对照以PBS代替一抗,37℃孵育1小时,滴加Envision复合物(即用型),室温孵育30分钟,DAB显色,苏木素复染,中性树胶封片。文献<sup>[5]</sup>提示COX-2免疫组化阳性反应为黄-棕褐色颗粒,主要定位于胞浆,综合阳性细胞所占的比率及染色强度,采用双盲法观察切片,半定量积分法判断结果。

1.6 判定标准 ①阳性细胞数 $\leq 5\%$ 为0分,6%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分, $> 75\%$ 为4分;②阳性强度:无色为0分,淡黄色为1分,黄色为2分,棕黄色为3分。将①、②两者积分相乘,0分为阴性(-),1~4分为弱阳性(+),5~8分为阳性(++),9~12分为强阳性(+++)。由两位病理科专业医师独立评分,若两位医师结果相差3分则重新判定。

1.6 统计学处理 应用SPSS 11.5统计软件,计量资料两组间比较采用 $t$ 检验,多组间比较用方差分析,方差齐时两两比较用LSD- $t$ 检验,方差不齐用Games-Howell;计数资料采用 $\chi^2$ 检验或Fisher确切概率法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠肝功能相关检测结果 实验过程中,C组有1只大鼠因灌胃误入气管死亡,其余大鼠均存活。A组大鼠血清ALT、AST、ALP、TBA水平与对照组比较,差异无统计学意义。B组上述指标均较对照组显著升高,其中 $ALT > 3 ULN$ ,而 $ALP < 2 ULN$ ,  $R = 2.62 \pm 0.37$ ;阻断COX-2后,C组ALT、AST等较B组明显升高, $P < 0.05$ ,见表1。

2.2 各组大鼠肝脏组织病理学检查结果 A组及对照组的大鼠肝组织完好,肝索呈放射状排列整齐,肝细胞形态正常。B组可见肝实质细胞点状坏

死，个别可见灶性坏死，肝索排列紊乱，部分肝细胞肿胀，小叶内和汇管区有较多炎性细胞浸润。C组病理改变与B组大致类似，但肝细胞水肿明显。

2.3 COX-2在各组大鼠中的表达情况 对照组及A组大鼠肝脏未见COX-2的阳性表达；COX-2在B组大鼠肝组织中表达较对照组明显升高， $P < 0.01$ ；使用COX-2抑制剂后，C组大鼠肝组织中COX-2表达较B组明显降低， $P < 0.05$ ，见表2。COX-2阳性表达呈黄-棕黄色，主要定位于细胞浆中，多见于肝小叶中央静脉周围的肝细胞，见图1、2、3。

3 讨论

由于目前药物性肝损伤尚无特异性诊断指标，且大多缺乏肝脏组织学检查的证据，肝功能的监测主要依赖肝脏生化指标的检测<sup>[3]</sup>，而AST、ALT的升高主要反映肝实质细胞的损害<sup>[8]</sup>。本实验结果显示，B组血清ALT、AST活性明显高于对照组，提示对乙酰氨基酚过量可引起肝细胞的炎性反应及肝细胞破坏。其中ALT  $> 3$  ULN、ALP  $< 2$  ULN符合急性肝细胞型肝损伤的临床分类，其病理学检查亦符合急性肝细胞型肝损伤的病理表现<sup>[9]</sup>，提示成功复制了急性肝细胞型肝损伤的动物模型。

药物性肝损伤的确切发病机制尚不清楚，其发生涉及细胞器损伤、细胞凋亡、细胞坏死、离子平衡破坏及一系列免疫反应激活过程，各种机制之间并非独立存在，而是相互之间有着密切的

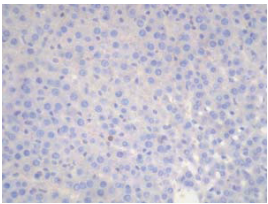


图 1 COX-2在对照组大鼠中的表达  
(Envision染色法，呈阴性，200×)

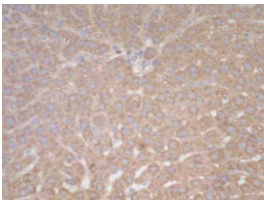


图 2 COX-2在B组大鼠中的表达  
(Envision染色法，呈阳性，200×)

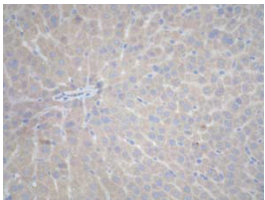


图 3 COX-2在C组大鼠中的表达  
(Envision染色法，呈弱阳性，200×)

联系。目前认为过量对乙酰氨基酚引起肝损伤的机制可能与其在代谢过程中形成大量的N-乙酰-对苯醌亚胺（NAPQI）耗竭谷胱甘肽导致肝实质细胞的坏死和凋亡，激活巨噬细胞等炎性细胞释放潜在具有破坏作用的炎性调节因子，如NO、

表 1 大鼠肝功能相关检测结果 ( $\bar{x} \pm s$ )

	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	TBA ( $\mu\text{mol/L}$ )
A组 (n = 10)	27.20 $\pm$ 4.96 <sup>a</sup>	121.60 $\pm$ 26.76 <sup>a</sup>	108.00 $\pm$ 26.80 <sup>a</sup>	10.66 $\pm$ 4.27 <sup>a</sup>
B组 (n = 10)	97.30 $\pm$ 14.69 <sup>b</sup>	319.50 $\pm$ 50.93 <sup>b</sup>	171.00 $\pm$ 26.97 <sup>b</sup>	15.77 $\pm$ 3.39 <sup>b</sup>
C组 (n = 9)	115.11 $\pm$ 15.13 <sup>bc</sup>	392.33 $\pm$ 38.35 <sup>bc</sup>	253.67 $\pm$ 49.73 <sup>bc</sup>	23.97 $\pm$ 5.65 <sup>bc</sup>
对照组 (n = 10)	25.30 $\pm$ 4.47	114.70 $\pm$ 28.43	115.50 $\pm$ 21.32	11.99 $\pm$ 3.50

注：<sup>a</sup>与对照组相比较 $P > 0.05$ ；<sup>b</sup>与对照组相比较 $P < 0.05$ ；<sup>c</sup>与B组相比较 $P < 0.05$

表 2 COX-2在各组大鼠中的表达情况

	COX-2表达强度 (例)				阳性例数	阳性率 (%)
	-	+	++	+++		
A组 (n = 10)	10	0	0	0	0	0
B组 (n = 10)	3	4	3	0	7	70.0 <sup>a</sup>
C组 (n = 9)	8	1	0	0	1	11.1 <sup>bc</sup>
对照组 (n = 10)	10	0	0	0	0	0

注：<sup>a</sup>与对照组比较， $P < 0.01$ ；<sup>b</sup>与对照组比较， $P > 0.05$ ；<sup>c</sup>与B组比较， $P < 0.05$

TNF- $\alpha$ 及超氧化物阴离子等有关<sup>[10]</sup>。

COX-2是一种诱导酶,在正常情况下表达非常有限,而在细胞受到各种刺激的情况下可诱导表达,如脂多糖、细胞内毒素、干扰素、TNF- $\alpha$ 、IL-1、上皮生长因子、血小板源性生长因子等可刺激COX-2的产生<sup>[6]</sup>。本实验发现,正常大鼠肝组织中COX-2呈不表达或极低表达,而在B组大鼠肝组织中表达明显升高,阳性率为70% ( $P < 0.01$ ),提示在对乙酰氨基酚所致的急性肝损伤过程中,血清转氨酶水平增高,肝组织的炎性改变可刺激COX-2表达并具有一定影响。而有关肝损伤中COX-2的活化究竟是保护作用还是加重损伤尚存在争议。Bhave等<sup>[11]</sup>研究发现,在CCl<sub>4</sub>诱导的急性肝损伤大鼠模型中,使用选择性COX-2抑制剂后,肝损伤加重、病死率增加,认为急性肝损伤后诱导COX-2表达,可能是机体对抗损伤的一种保护性机制。Mayoral等<sup>[12]</sup>发现,含有LIVhCOX-2融合基因的转基因小鼠在内毒素(LPS)/D-氨基半乳糖(D-Gal)及刀豆蛋白A(Con A)诱导的急性肝损伤模型中,COX-2表达增高,其衍生的PGs可降低LPS/D-Gal或Con A致肝损伤的敏感性,在肝损伤后表达更高水平的抗凋亡蛋白如Bcl-2,以及部分涉及细胞存活的蛋白如Akt、AMP激酶等,减少细胞坏死。亦有学者认为,在大鼠酒精性肝病模型中,COX-2表达的下调可使肝脏炎症减轻<sup>[13]</sup>。

本实验发现,在对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤模型中,COX-2表达明显升高,使用选择性COX-2抑制剂后,C组COX-2表达较B组明显减低(阳性率为11.1%,  $P < 0.05$ ),其血清ALT、AST、ALP、TBA等指标较B组明显增高( $P < 0.05$ ),即肝损伤加重,提示COX-2表达增高可能是机体对抗对乙酰氨基酚所致急性肝损伤的一种保护性机制,与Bhave等<sup>[14]</sup>报道COX-2在对乙酰氨基酚诱导的急性肝损伤模型中的作用一致。COX-2衍生的PGs可能是对乙酰氨基酚致肝损伤后重要的内源性应激信号,在肝损伤中具有保护作用,COX-2及其衍生物可能通过降低对乙酰氨基

酚致肝损伤的敏感性、抑制细胞凋亡坏死等途径,对肝脏起保护作用。

#### 参考文献

- [1] Rangnekar AS, Fontana RJ. An update on drug induced liver injury[J]. *Minerva Gastroenterol Dietol*,2011,57:213-229.
- [2] Chitturi S, Farrell G. Drug-induced liver disease. Schiff ER, Sorrell MF, Maddrey WC, editors. Schiff's diseases of the liver[M]. 9th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.2002.1059-1128.
- [3] Beneshiou C. Criteria of drug-induced liver disorders Report of an international consensus meeting[J]. *J Hepatol*,1990,11:272-276.
- [4] Ajith TA, Hema U, Aswathy MS. Zingiber officinale Roscoe prevents acetaminophen-induced acute hepatotoxicity by enhancing hepatic antioxidant status[J]. *Food Chem Toxicol*,2007,45:2267-2272.
- [5] Jeong SW, Jang JY, Lee SH, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 is associated with the progression to cirrhosis[J]. *Korean J Intern Med*,2010,25:364-371.
- [6] Yu Y, Gong R, Mu Y, et al. Hepatitis B virus induces a novel inflammation network involving three inflammatory factors, IL-29, IL-8, and cyclooxygenase-2[J]. *J Immunol*,2011,187:4844-4860.
- [7] Llorente Izquierdo C, Mayoral R, Flores JM, et al. Transgenic mice expressing cyclooxygenase-2 in hepatocytes reveal a minor contribution of this enzyme to chemical hepatocarcinogenesis[J]. *Am J Pathol*,2011,178:1361-1373.
- [8] Dufour DR, Lott JA, Nolte FS, et al. Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I Performance characteristics of laboratory tests[J]. *Clin Chem*,2000,46:2027-2049.
- [9] Navarro VJ, Senior JR. Drug-related hepatotoxicity[J]. *N Engl J Med*,2006,354:731-739.
- [10] Park K, Williams DP, Naisbitt DJ, et al. Investigation of toxic metabolites during drug development[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2005,207:425-434.
- [11] Bhave VS, Donthamsetty S, Latendresse JR, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 aggravates secretory phospholipase A2-mediated progression of acute liver injury[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2008,228:239-246.
- [12] Mayoral R, Mollá B, Flores JM, et al. Constitutive expression of cyclo-oxygenase 2 transgene in hepatocytes protects against liver injury[J]. *Biochem J*,2008,416:337-346.
- [13] Yi H, Wang X, Miao JY, et al. Protective effect of selective cyclooxygenase-2 inhibitor on alcohol-induced liver injury in rats[J]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi*,2003,11:663-666.
- [14] Bhave VS, Donthamsetty S, Latendresse JR, et al. Secretory phospholipase A2-mediated progression of hepatotoxicity initiated by acetaminophen is exacerbated in the absence of hepatic COX-2[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2011,25:173-180.

收稿日期: 2011-11-07