

中药及其提取物阻抑脂多糖/半乳糖胺诱导的急性肝衰竭的研究进展

刘艳民¹, 张金良², 曾辉^{3,4}, 王宪波¹ (1.首都医科大学附属北京地坛医院 中西医结合中心, 北京 100015; 2.武警云南省总队医院 中医科, 昆明 650111; 3.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 4.新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015)

急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)是指既往无慢性肝病的患者突然出现大量肝细胞凋亡、坏死, 肝功能显著异常, 在短期内(8周)迅速进展至肝性脑病的一种可逆性综合征^[1]。近年来, 肝移植的开展使急性肝衰竭的整体生存率明显升高(超过60%)^[2], 但因肝脏供体不足、严重并发症及高额医疗费用等因素, 我国急性肝衰竭的病死率仍居高不下, 寻找有效的治疗药物及药物作用靶点已成为肝病研究的重要方向。小剂量LPS联合D-GalN诱导建立的急性肝衰竭动物模型是筛选保肝药物的理想动物模型^[3]。该模型以热毒血瘀证为主^[4], 符合临床急性肝衰竭的最主要病机——热毒炽盛和瘀血阻络^[5-7], 因而清热解毒、凉血活血类中药可能是治疗急性肝衰竭的有效中药的主体^[8], 其他功效的中药作为必要的补充。近几年, 国内外文献报道了多种在LPS/D-GalN模型中有治疗作用的中药或提取物, 现就结合该模型的致病机理分别阐述其阻抑急性肝衰竭的研究进展情况。

1 LPS/D-GalN诱导产生炎症因子的机制和作用于此环节的中药或提取物

1.1 LPS/D-GalN诱导炎症因子产生的机制 LPS是革兰阴性细菌细胞壁外膜的成分, 由类脂A、核心多糖和O-特异性侧链三部分组成, 其中类脂A为LPS的“毒力中心”。在循环中, LPS与单核巨噬细胞(在肝脏主要为Kupffer细胞)表面的LPS受体即Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)结合^[9], 后者发生寡聚化并进一步激活下游的核转录因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)转导通路, NF- κ B转位入细胞核调控靶基因的表达。NF- κ B是一种广泛存在于多种细胞中有多向调节作用的核转录因子。静息状态下, NF- κ B与其抑制性蛋白(inhibitory protein of NF- κ B, I κ B)以无活性的三聚体形式存在于细胞浆中。细胞受刺激后, I κ B被磷酸化和泛素化后经蛋白酶体途径降解。磷酸化的NF- κ B被释放并转位入细胞核并通过与多种基因的启动子和增强子序列位点特异性结合, 启动和调控免疫应答、炎症反应、

细胞生长分化和凋亡相关的众多基因的转录。如编码炎症因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)的基因, 编码抑炎因子白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)的基因^[10,11], 以及编码抗凋亡蛋白如c-FLIP、cIAP等基因^[12]。NF- κ B是把双刃剑, 在非实质细胞促进炎症、纤维化及肝细胞癌的发生, 在肝细胞具有抗凋亡的作用^[13]。

D-GalN是肝细胞特异性化学毒剂, 可与三磷酸尿嘧啶核苷(UTP)不可逆结合而造成UTP耗竭, 使依赖UTP的核酸、糖蛋白、糖脂等物质合成受到抑制, 进一步导致细胞器受损、细胞膜和细胞器膜损害、Ca²⁺内流, 从而造成肝细胞损伤。单独应用D-GalN不会引起动物死亡, 但是其能使LPS的炎症效应增加约10⁴倍以上^[14], 因此小剂量LPS联合D-GalN即可造成肝细胞广泛凋亡坏死而引起急性肝衰竭^[15]。

Kupffer细胞释放的炎症因子TNF- α 对机体造成的损伤大大超过LPS的直接损伤, TNF- α 可直接活化胱冬肽酶-8依赖的凋亡通路而促发肝细胞凋亡, 也可造成炎症细胞浸润, 浸润的炎细胞可进一步造成肝细胞损伤, 形成恶性循环, 最终导致肝衰竭。故TNF- α 是LPS/D-GalN诱导急性肝衰竭的中心环节。

减少炎症因子(尤其是TNF- α)的产生、降低机体对TNF- α 的敏感性、促进抑炎因子的产生是药物阻断LPS/D-GalN急性肝衰竭的可能途径。

1.2 主要作用于LPS/D-GalN诱导炎症因子产生环节的中药或提取物 清热解毒祛湿类中药黄芩、虎杖、狗肝菜的活性成分, 理气类中药陈皮的活性成分以及补益类中药刺五加的提取物和活性成分主要通过抑制单核巨噬细胞产生TNF- α 而阻抑LPS/D-GalN所致的急性肝衰竭。

黄芩为唇形科植物黄芩的干燥根, 味苦, 性寒, 归肺、心、肝、胆、大肠经, 功能清热泻火, 燥湿解毒, 止血, 安胎, 主治肺热咳嗽, 肝火头痛, 湿热黄疸等; 自《神农本草

经》就有“主治诸热，黄疸”的记载，是治疗急性黄疸型肝炎的常用传统中药。其主要活性成分之一黄芩苷可通过上调血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1)的表达并增强其活性而抑制单核巨噬系统NF- κ B信号通路并减少TNF- α 的产生，从而阻抑LPS/D-GalN所致的急性肝衰竭^[16]。虎杖为蓼科植物虎杖的根茎及根，味苦、酸，性微寒，归肝、胆经，功能活血散瘀、祛风通络、清热利湿、解毒，主治湿热黄疸等^[17]。虎杖的活性成分虎杖甙通过抑制NF- κ B信号通路降低TNF- α 的产生而阻抑LPS/D-GalN诱导的急性衰竭^[18]。狗肝菜为爵床科植物狗肝菜的全草，味甘、微苦，性寒，归心、肝、肺经，有清热、凉血、利湿、解毒之功，主治热病发斑，吐衄，便血，尿血等^[19]，其清热、凉血、利湿、解毒的功效符合急性肝衰竭的病理病机。狗肝菜多糖^[20]可通过降低血清炎症因子TNF- α 、IL-1 β 和一氧化氮(nitric oxide, NO)减轻炎症和氧化损伤，从而抑制LPS/D-GalN诱导的肝衰竭，是临床中医药治疗急性肝衰竭药物选择的拓展点之一。

陈皮味辛、苦，性温，归脾、胃、肺经，其功能理气降逆、调节开胃、燥湿化痰。陈皮提取的活性成分川陈皮素可抑制TNF- α 和NO的产生以及下调肝诱导性一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) mRNA的表达而减轻炎症和氧化损伤，从而抑制LPS/D-GalN诱导的肝损伤^[21]。

刺五加为五加科植物刺五加的根和茎，性温，味辛、微苦，入脾、肾、心经，功能补肾强腰，益气安神，活血通络^[17]。刺五加既往主要用于神经衰弱及心脑血管疾病等，近期研究表明，刺五加甲醇提取物及刺五加酸均能通过减少TNF- α 的分泌抑制LPS/D-GalN所致的急性肝衰竭^[22,23]。

2 TNF- α -TNFR I 下游信号转导通路及作用于此环节的中药及其提取物

2.1 TNF- α -TNFR I 下游信号转导通路 在肝细胞膜表面，TNF- α 与其I型受体(TNFR I)结合，通过一系列衔接分子活化下游的3条信号转导通路，即NF- κ B通路、丝裂原活化的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)通路、含胱冬肽酶(cysteine aspartic acid specific protease, caspase)通路。

(1)NF- κ B通路：肝细胞受TNF- α 刺激后活化NF- κ B通路，能够引起抗凋亡蛋白的表达。

(2)胱冬肽酶信号通路：胱冬肽酶是一组存在于细胞质中具有类似结构的凋亡相关蛋白酶。现已确定至少存在11种。其中胱冬肽酶-2、胱冬肽酶-8、胱冬肽酶-9、胱冬肽酶-10参与凋亡的起始，胱冬肽酶-3、胱冬肽酶-6、胱冬肽酶-7参与凋亡的执行。TNF- α 刺激细胞引起胱冬肽酶-8发生同源活化并裂解^[24]，继而直接激活胱冬肽酶-3导致细胞凋亡，或者通过线粒体途径间接诱导凋亡，即裂解Bid为有活性的tBid，后者易位入线粒体，使线粒体释放细胞色素C(Cytochrome C, Cyt C)、凋亡蛋白及诱导活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)的产生。Cyt C一旦释放到细胞浆则可激活胱冬肽酶级联反应通路，介导细胞凋亡。ROS可以反过来增强

线粒体释放Cyt C，进一步促进细胞凋亡。

(3)MAPK通路：MAPKs是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，有主要3个家族：细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-jun氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK)和p38MAPK。ERK参与细胞的增殖、分化及调节细胞功能。JNK和p38MAPK主要参与细胞的应激反应和凋亡。TNF- α 刺激细胞后激活JNK和p38MAPK信号转导通路，过度活化的JNK使线粒体释放Cyt C导致细胞凋亡^[25]，活化的p38MAPK进入细胞核影响靶基因转录，最终导致细胞因子产生或凋亡^[26]。

活化NF- κ B抗凋亡通路、抑制MAPK或胱冬肽酶促凋亡通路是药物抑制肝细胞凋亡的途径。

2.2 阻抑TNF- α 诱导肝细胞凋亡的中药或提取物 八角莲、万年青及补血草的提取物主要是通过抗肝细胞凋亡而阻抑LPS/D-GalN诱导的急性肝衰竭。

八角莲为小蘗科八角莲、六角莲和川八角莲的根及根茎，以鬼臼之名始载于《神农本草经》，有“逐邪，解百毒”等功效。《圣济总录》有生鬼臼治“黑黄”的记载。八角莲味苦、辛，性凉，有毒，归肺、肝经，功能化痰散结，祛瘀止痛，清热解毒^[17]。研究^[27]表明，八角莲主要活性成分依托泊苷不影响血浆TNF- α 水平和肝TNFR mRNA表达，但可降低胱冬肽酶-3的活性及上调抗凋亡蛋白Bcl-xL的表达，从而阻抑LPS/D-GalN诱导的急性肝衰竭。万年青为百合科万年青属植物的根及根茎，味苦、微甘，性寒，有小毒，归肺、心经，功能清热解毒，强心利尿，凉血止血^[17]。万年青总皂苷可通过减少氧化应激、抑制胱冬肽酶-3的活性和低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)的表达而阻抑LPS/D-GalN诱导的急性肝衰竭^[28]。两者功效符合急性肝衰竭热毒炽盛和瘀血阻络的主要病机，如合理利用也是临床中医药治疗急性肝衰竭药物选择的拓展点之一。

补血草为白花丹科补血草的根，味咸，性凉，功用补血、止血、益脾、健胃^[19]。补血草的水提取物能有效抑制LPS/D-GalN诱导的急性肝衰竭，其机理可能是保护线粒体，抑制肝细胞凋亡作用^[29]。

桦木酸广泛存在于白桦等多种植物的树皮中，传统中药如酸枣仁、蜂胶、花粉、柿蒂、大枣中也含有桦木酸成分。桦木酸可通过上调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达以及谷胱甘肽和过氧化氢酶的水平来保护LPS/D-GalN诱导的急性肝衰竭小鼠^[30]。

3 对TNF- α 上下游通路均有影响的中药或提取物

清热解毒祛湿类中药垂盆草、龙胆草、黄芩、栀子均为治疗湿热黄疸的临床常用药，其本身或提取物既可减少炎症因子的产生又可抑制肝细胞凋亡，即对TNF- α 上下游通路均有影响。此外栀子酸还可提高肝细胞抗氧化活性。补益类药物红景天的活性成分红景天甙主要通过抗氧化活性发挥保肝作用。

垂盆草系景天科植物垂盆草的全草，性甘、淡、微酸，性凉，归肝、肺、大肠经，临床中常用于治疗湿热黄疸及各类肝炎。垂盆草可降低TLR4的转录，抑制Kupffer细

胞分泌TNF- α 而减轻炎症损伤,抑制MAPK(JNK、ERK和p38)的活化而减少肝细胞凋亡,从而抑制LPS/D-GalN诱导的急性肝衰竭^[31]。龙胆草为龙胆属植物的根和根茎,味苦,性寒,归肝、胆经,《景岳全书》、《得配本草》、《本经疏证》、《本草新编》等均有治疗黄疸的记载,龙胆草的活性成分龙胆苦苷通过抑制MAPK以及胱冬肽酶-8促凋亡通路而实现阻抑LPS/D-GalN诱导的急性肝衰竭。龙胆苦苷可通过减少TNF- α 的产生而减轻炎症损伤,更重要的是其可通过抑制线粒体途径而抑制胱冬肽酶通路以及抑制JNK/ERK通路^[32]。黄芩的另一主要活性成分黄芩素通过多种机制减轻LPS/D-GalN所致急性肝损伤,如减少血清TNF- α 、NO及iNOS水平减轻炎症损伤,激活肝细胞内NF- κ B通路上调抗凋亡蛋白c-FLIP, XIAP和cIAP2蛋白表达,抑制JNK信号通路等^[33]。栀子为茜草科植物栀子的果实,味苦,性寒,归心、肝、肺、胃、三焦经。自唐·甄权《药性论》有“解五种黄疸”记载开始,历代治疗各种黄疸的经验屡见不鲜,是临床常用保肝、抗炎、退黄的传统药物。栀子的活性成分栀子酸通过上调抗凋亡蛋白Bcl-x(L)的表达、下调促凋亡蛋白Bax的表达以及抑制胱冬肽酶-8信号通路而发挥抗肝细胞凋亡作用;通过上调HO-1的蛋白表达而提高抗氧化作用;通过降低血清IL-6而发挥抗感染作用,提高抗氧化防御系统和减弱凋亡信号通路是其主要机制^[34]。

红景天提取的红景天苷具有显著的抗氧化活性,可改善被LPS/D-GalN耗竭的谷胱甘肽及提高抗氧化酶的活性,降低肝组织HIF-1 α 的表达以及减少血清NO的水平,从而减少肝细胞凋亡坏死,此外也可降低血清TNF- α ^[35]。

栀子、垂盆草、龙胆苦苷、黄芩素对诱导急性肝衰竭的核心致病因子TNF- α 的上、下游通路产生影响是其治疗急性肝衰竭的重要机制,这印证了中药通过多靶点、多途径而发挥治疗作用。黄芩活性成分黄芩素和黄芩甙均可阻抑LPS/D-GalN所致的急性肝衰竭,这体现了中药通过多成分发挥其治疗作用。

综上所述,目前临床上缺乏公认、有效、稳定的治疗急性肝衰竭药物,上述中药或提取物可有效阻抑LPS/D-GalN诱导的急性肝衰竭且作用机制明确,为治疗急性肝衰竭的新药研发提供了新的方向,也为临床中药应用开拓思路。急性肝衰竭的最主要病机为热毒炽盛和瘀血阻络,因而具有或部分具有清解湿热、清热解毒、凉血止血功效的黄芩、万年青、栀子、虎杖、龙胆草、垂盆草、狗肝菜、八角莲、补血草等寒凉之性的中药是治疗急性肝衰竭的主体,具有补益作用的刺五加、红景天、大枣等和理气的陈皮作为有效的补充,防止寒凉之药碍胃伤中。狗肝菜、八角莲、万年青、补血草可作为非传统治疗肝衰竭有效中药的补充和拓展。

参考文献

- [1] Canbay A, Tacke F, Hadem J, et al. Acute liver failure: a life-threatening disease[J]. Dtsch Arztebl Int, 2011, 108: 714-720.
- [2] Lee WM. Acute liver failure[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2012, 33: 36-45.

- [3] Rahman TM, Hodgson HJ. Animal models of acute hepatic failure[J]. Int J Exp Pathol, 2000, 81: 145-157.
- [4] 张金良, 曾辉, 王宪波. 急性肝衰竭模型中医证型探讨[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31: 659-662.
- [5] 刘平. 现代中医肝病病学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 239.
- [6] 钱英. 中医药治疗重型肝炎的现状与思考[J]. 中西医结合肝病杂志, 2002, 12: 129-130.
- [7] 陈卫平, 刘涛. 热瘀相搏是重型肝炎病理变化的关键探析[J]. 中医药学刊, 2003, 21: 1240-1241.
- [8] 朱平, 杨进. 论清热解毒是治疗热毒血瘀证的重要治法[J]. 中国医药学报, 2002, 17: 171-173.
- [9] Takeda K, Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors[J]. J Dermatol Sci, 2004, 34: 73-82.
- [10] Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway[J]. Cytokine, 2008, 42: 145-151.
- [11] Rossol M, Heine H, Meusch U, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages[J]. Crit Rev Immunol, 2011, 31: 379-446.
- [12] Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappa B[J]. Genes Dev, 2004, 18: 2195-2224.
- [13] Luedde T, Schwabe RF. NF-kappaB in the liver--linking injury, fibrosis and hepatocellular carcinoma[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 8: 108-118.
- [14] Dejager L, Libert C. Tumor necrosis factor alpha mediates the lethal hepatotoxic effects of poly (I : C) in D-galactosamine-sensitized mice[J]. Cytokine, 2008, 42: 55-61.
- [15] Silverstein R. D-galactosamine lethality model: scope and limitations[J]. J Endotoxin Res, 2004, 10: 147-162.
- [16] Wan JY, Gong X, Zhang L, et al. Protective effect of baicalin against lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced liver injury in mice by up-regulation of heme oxygenase-1[J]. Eur J Pharmacol, 2008, 587: 302-308.
- [17] 国家中医药管理局《中华本草》编委会. 中华本草精选本[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998.
- [18] Wu MJ, Gong X, Jiang R, et al. Polydatin protects against lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure in D-galactosamine-sensitized mice[J]. Int J Immunopathol Pharmacol, 2012, 25: 923-934.
- [19] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 第2版. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [20] 张小玲, 肖胜军, 容明智, 等. 狗肝菜多糖减轻D-氨基半乳糖与脂多糖诱导的大鼠急性肝损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26: 952-955.
- [21] Akachi T, Shiina Y, Ohishi Y, et al. Hepatoprotective effects of flavonoids from shekwasha (Citrus depressa) against D-galactosamine-induced liver injury in rats [J]. J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo), 2010, 56: 60-67.
- [22] Lin QY, Jin LJ, Cao ZH, et al. Protective effect of Acanthopanax senticosus extract against endotoxic shock in mice [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 118: 495-502.
- [23] Nan JX, Jin XJ, Lian LH, et al. A diterpenoid acanthoic acid from Acanthopanax koreanum protects against D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure in mice[J]. Biol

- Pharm Bull,2008,31:738-742.
- [24] Kaufmann T, Jost PJ, Pellegrini M, et al. Fatal hepatitis mediated by tumor necrosis factor TNF alpha requires caspase-8 and involves the BH3-only proteins Bid and Bim[J]. Immunity,2009,30:56-66.
- [25] Wullaert A, Heyninc K, Beyaert R. Mechanisms of crosstalk between TNF-induced NF-kappa B and JNK activation in hepatocytes[J]. Biochem Pharmacol,2006,72:1090-1101.
- [26] Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling[J]. Biochem J,2010,429:403-417.
- [27] Nakama T, Hirono S, Moriuchi A, et al. Etoposide prevents apoptosis in mouse liver with D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced fulminant hepatic failure resulting in reduction of lethality[J]. Hepatology,2001,33:1441-1450.
- [28] Ying-Wan, Wu YL, Feng XC, et al. The protective effects of total saponins from *Ornithogalum saundersiae* (Liliaceae) on acute hepatic failure induced by lipopolysaccharide and D-galactosamine in mice[J]. J Ethnopharmacol,2010,132:450-455.
- [29] 汤新慧, 高静, 陈瑾, 等. 中华补血草根提取物对D-GalN/LPS肝损伤的防护作用[J]. 时珍国医国药,2008,19:1888-1890.
- [30] Zheng ZW, Song SZ, Wu YL, et al. Betulinic acid prevention of d-galactosamine/lipopolysaccharide liver toxicity is triggered by activation of Bcl-2 and antioxidant mechanisms[J]. J Pharm Pharmacol,2011,63:572-578.
- [31] Lian LH, Jin X, Wu YL, et al. Hepatoprotective effects of *Sedum sarmentosum* on D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure [J]. J Pharmacol Sci,2010,114:147-157.
- [32] Lian LH, Wu YL, Wan Y, et al. Anti-apoptotic activity of gentiopicroside in D-galactosamine/lipopolysaccharide-induced murine fulminant hepatic failure[J]. Chem Biol Interact,2010,188:127-133.
- [33] Wu YL, Lian LH, Wan Y, et al. Baicalein inhibits nuclear factor-kappaB and apoptosis via c-FLIP and MAPK in D-GalN/LPS induced acute liver failure in murine models[J]. Chem Biol Interact,2010,188:526-534.
- [34] Kim SJ, Kim KM, Park J, et al. Geniposidic acid protects against d-galactosamine and lipopolysaccharide-induced hepatic failure in mice[J]. J Ethnopharmacol,2013,146:271-277.
- [35] Wu YL, Lian LH, Jiang YZ, et al. Hepatoprotective effects of salidroside on fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in mice[J]. J Pharm Pharmacol,2009,61:1375-1382.

收稿日期: 2013-01-15

· 消息 ·

本刊对来稿中表格的要求

文内表格的设置应有助于简洁、明了、直观地表达结果。若表中的内容简单,仅少数几个统计数字,用简洁文字可表达清楚的,可删去表格,选用文字描述;若文字叙述冗长繁琐,而用表格表达便于理解,则建议作者选用表格。表、图、文字描述三者之间应无重复。

表格设计的基本原则是重点突出、简单明了,主谓分明、层次清楚,结构完整、有自明性。自明性即只看表,不阅读正文,即可理解统计或对比的意义。

表格一律采用三线表,即以表顶线、表头线、表底线3条横线为基本线条构架的表。每个表均应有序号和表题,居中排印在表的上方。表的序号一律用阿拉伯数字。全文只有一个表时,表序号为“表1”。表题说明表的内容,应简明扼要,突出中心。

表头由主语横标目和谓语纵标目组成,表明表格内的项目。所谓主语、谓语,是根据表格所要表达的内容划分的。被研究的事物主要标志,或者说是分组标志,一般作为主语;而各类统计指标,一般作为谓语。主语一般安排在表的左侧,谓语一般安排在表的右侧。尽量避免主谓语倒置,影响表格的表达效果。

本刊编辑部