基于HMGB1-RAGE信号通路研究奥拉米特预防抗结核药物性肝损伤的作用机制Δ

何　玲*，唐　简，彭忠田#（南华大学衡阳医学院附属第一医院感染科，湖南 衡阳　421001）

中图分类号　R978.3；R575；R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2021）18-2229-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2021.18.09

摘　要　目的：初步探讨奥拉米特预防抗结核药物性肝损伤（ATB-DILI）的可能机制。方法：将60只昆明小鼠随机分为空白组、模型组、阳性对照组[甘草酸二铵60 mg/（kg·d）]和奥拉米特低、中、高剂量组[80、160、320 mg/（kg·d）]，每组10只。除空白组外，其余各组小鼠均灌胃异烟肼[75 mg/（kg·d）]+利福平[75 mg/（kg·d）]14 d以复制ATB-DILI模型。与此同时，各给药组小鼠灌胃相应药液，空白组和模型组小鼠灌胃生理盐水，给药体积均为20 mL/（kg·d），每天给药1次，连续给药14 d。每天观察并记录小鼠生长发育、精神状态、饮食等一般情况。末次给药后，计算其肝指数，以苏木精-伊红（HE）染色法观察小鼠肝组织病理学改变，采用链霉抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物（SABC）免疫组化法检测其肝组织中高速泳动族蛋白B1（HMGB1）、核因子κB（NF-κB）的阳性表达情况，采用酶联免疫吸附法检测其血清中肝功能指标水平和肝组织中晚期糖基化终末产物受体（RAGE）、肿瘤坏死因子α（TNF-α）的表达情况。结果：与空白组比较，模型组小鼠生长发育迟缓，食欲、精神等差，肝指数和血清中总胆红素、直接胆红素、丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、碱性磷酸酶（ALP）、总胆汁酸（TBA）、γ-谷氨酰转肽酶水平均显著升高（$P<0.05$）；肝小叶结构紊乱，肝细胞变性、坏死，并伴炎症细胞浸润；肝组织中HMGB1、NF-κB、RAGE、TNF-α的表达均显著增强（$P<0.05$）。与模型组比较，奥拉米特低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠的一般情况均有不同程度好转，肝指数和上述血清指标均显著降低（$P<0.05$），肝组织病理学变化均有不同程度改善，肝组织中HMGB1、NF-κB、RAGE、TNF-α的表达均显著降低（$P<0.05$），且奥拉米特高剂量组上述指标改善效果均显著优于奥拉米特低、中剂量组（$P<0.05$），ALP、TBA水平显著低于阳性对照组（$P<0.05$）。结论：奥拉米特能够预防异烟肼联合利福平所致的小鼠ATB-DILI，其机制可能与下调肝组织HMGB1和RAGE蛋白表达、抑制炎症因子分泌有关。

关键词　奥拉米特；抗结核药物性肝损伤；高速泳动族蛋白B1-晚期糖基化终末产物受体信号通路；小鼠

1475-1478.

[12] 张乃丹，蒋益萍，薛黎明，等.仙茅酚苷类成分促进成骨细胞骨形成和抑制破骨细胞骨吸收[J].第二军医大学学报，2016，37（5）：562-568.

[13] 贾天柱.中药炮制学[M].北京：中国中医药出版社，2015：177-178.

[14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典：四部 [S]. 2020年版.北京：中国医药科技出版社，2020：232.

[15] 鞠成国，林长旭，史雅红，等.仙茅酒炙工艺的优化[J].中成药，2017，39（5）：1081-1084.

[16] 吕彤彤，鞠成国，刘博男，等.仙茅盐炙工艺的优化[J].中成药，2019，41（10）：2425-2429.

[17] 艾雪，鞠成国，贾坤静，等.酒仙茅炮制工艺的正交试验优选[J].时珍国医国药，2016，27（4）：875-877.

[18] 张祺嘉钰，胡丽君，吴建华，等.响应面法优化酒炙续断微波炮制工艺[J].国际药学研究杂志，2018，45（7）：548-553.

[19] 宋艺君，郭涛，吕慧锋，等.响应面法优化甘草制款冬花微波炮制工艺[J].中国药学杂志，2020，55（22）：1853-1860.

[20] 刘芳，祝宇，魏娟，等.不同炮制法对仙茅中仙茅苷含量的影响[J].中国药师，2018，21（12）：2284-2286.

[21] HE Y，DONG X，JIA X，et al. Qualitative and quantitative analysis on chemical constituents from Curculigo orchioides using ultra high performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. J Pharm Biomed Anal，2015，102：236-245.

[22] 陈露梦，贺亚男，王芳，等.中药微波炮制技术的研究进展[J].中国中药杂志，2020，45（9）：2073-2081.

[23] 黄潇，刘婧，付小梅，等.基于CRITIC法计算权重系数的Box-Behnken响应面法优化栀子炭微波炮制工艺研究[J].中草药，2017，48（6）：1133-1138.

（收稿日期：2021-04-15　修回日期：2021-07-21）
（编辑：陈　宏）

Δ 基金项目：湖南省自然科学基金科卫联合基金项目（No.2020JJ-8098）

* 医师，硕士。研究方向：传染病学肝病。E-mail：771939061@qq.com

通信作者：主任医师，博士。研究方向：传染病学肝病。E-mail：hncspzt@163.com

Study on the Prevention Mechanism of Anti-tuberculosis Drug-induced Liver Injury with Orazamide Based on HMGB1-RAGE Signaling Pathway

HE Ling, TANG Jian, PENG Zhongtian (Dept. of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital, Hengyang Medical School, University of South China, Hunan Hengyang 421001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To preliminarily investigate the possible mechanism of orazamide to prevent anti-tuberculosis drug-induced liver injury (ATB-DILI). METHODS: A total of 60 Kunming mice were randomly divided into blank group, model group, positive control group [diammonium glycyrrhizinate 60 mg/(kg·d)], orazamide low-dose, medium-dose and high-dose groups [80, 160, 320 mg/(kg·d)], with 10 mice in each group. Except for blank group, other groups were given isoniazid [75 mg/(kg·d)]+rifampicin [75 mg/(kg·d)] for 14 days intragastrically to induce ATB-DILI model. At the same time, administration groups were given relevant medicine intragastrically, blank group and model group were given normal saline intragastrically. The administration volume was 20 mL/(kg·d), once a day, for consecutive 14 days. The general conditions of the mice were observed and recorded every day, such as growth and development, mental and diet state. After last medication, liver index was calculated, and HE staining was adopted to observe pathological changes of liver tissue of mice. The positive expression of high mobility group protein B1 (HMGB1) and NF-κB in liver tissue were detected by streptavidin biotin-peroxidase complex (SABC) immunohistochemistry. The serum levels of liver function indexes in serum, the protein expression of advanced glycation end product receptor (RAGE) and TNF-α in liver tissue were detected by ELISA. RESULTS: Compared with blank group, the growth and development of mice in the model group were slow, and their appetite and spirit were poor. The liver index, serum levels of TBIL, DBIL, ALT, AST, ALP, TBA and γ-GT were increased significantly ($P<0.05$). Structural disorder of liver lobules, degeneration and necrosis of liver cells and inflammatory cell infiltration were observed. The expression of HMGB1, NF-κB, RAGE and TNF-α in liver tissue were elevated significantly ($P<0.05$). Compared with model group, the general condition of mice were all improved to different extents in orazamide low-dose, medium-dose and high-dose groups, positive control group, while liver index and above serum indexes were all decreased significantly ($P<0.05$). The pathological changes of liver tissue were all improved to different extents, while the protein expression of HMGB1, NF-κB, RAGE and TNF-α were all decreased significantly ($P<0.05$). The improvement of above indexes in orazamide high-dose group were all significantly better than orazamide low-dose and medium-dose groups ($P<0.05$); the levels of ALP and TBA in orazamide high-dose group were significantly lower than positive control group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Orazamide can prevent ATB-DILI induced by isoniazid combined with rifampicin in mice, the mechanism of which may be associated with down-regulating the protein expression of HMGB1 and RAGE in liver tissue and inhibiting the secretion of inflammatory factors.

KEYWORDS Orazamide; Anti-tuberculosis drug-induced liver injury; HMGB1-RAGE signaling pathway; Mice

结核病是由结核分枝杆菌引起的一种多系统传染病，也是人类患病和死亡的主要感染性原因，严重影响患者的生活质量和生命安全，且近年来有抬头趋势，防控形势十分严峻，是全球性的公共卫生问题之一[1-2]。抗结核药物性肝损伤(anti-tuberculosis drug-induced liver injury，ATB-DILI)是抗结核治疗中最多见的且危害最大的不良反应，其可致部分患者不得不中止抗结核治疗，既降低了结核病治疗的效果，又增加了耐药结核病的发生风险[3]。目前，临床一线护肝药物的抗ATB-DILI机制研究有限，亟需寻找切实有效且机制明确的护肝药物。

随着分子生物学和免疫学研究在肝病领域的不断深入，有学者发现，高速泳动族蛋白B1(high mobility group box 1，HMGB1)与晚期糖基化终末产物受体(advanced glycation end product receptor，RAGE)可通过多种途径来激活促炎因子的相互作用，从而介导肝组织损伤与炎症级联反应的发生[4]。何雪等[5]研究表明，异烟肼联合利福平所致肝细胞变性坏死与氧化应激和炎症反应密切相关，过氧化物酶体增殖物激活受体γ激动剂15d-PGJ2可能通过抗氧化及抑制HMGB1表达而发挥抗ATB-DILI的作用。鉴于HMGB1及RAGE在肝脏中的广泛表达[6]，靶向HMGB1或RAGE在肝病治疗中可能具有重要的应用前景。奥拉米特(orazamide)又名阿卡明(aicamin)，是一种临床常用的护肝药物，对ATB-DILI具有一定的预防作用[7]，但其护肝机制尚未明确。本研究通过异烟肼联合利福平复制小鼠ATB-DILI模型，基于HMGB1-RAGE信号通路初步探讨奥拉米特预防ATB-DILI的作用机制，以期为阐明奥拉米特预防ATB-DILI的机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括7170A型全自动生化分析仪(日本Hitachi公司)，JY3002型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)，Motic B5型显微摄像系统、Eco-

Bino-LED型光学显微镜（麦克奥迪实业集团有限公司），HBS-1101型酶标仪（南京德铁实验设备有限公司）等。

1.2 主要药品与试剂

奥拉米特片（批号20040185，规格0.1 g）购自湖南中南制药有限责任公司；甘草酸二铵肠溶胶囊（阳性对照，批号191127110，规格50 mg）购自正大天晴药业集团股份有限公司；异烟肼片（批号1911009，规格0.1 g）购自天津力生制药股份有限公司；利福平胶囊（批号191202，规格0.15 g）购自四川制药制剂有限公司；总胆红素（TBIL）、直接胆红素（DBIL）、丙氨酸转氨酶（ALT）酶联免疫吸附测定法（ELISA）检测试剂盒（批号分别为20201212、20200512、20201112）均购自上海科华生物工程股份有限公司；天冬氨酸转氨酶（AST）、碱性磷酸酶（ALP）、γ-谷氨酰转肽酶（γ-GT）ELISA检测试剂盒（批号分别为202012114、202101007、202101001）均购自温州市维日康生物科技有限公司；总胆汁酸（TBA）ELISA检测试剂盒（批号20-1118）购自北京九强生物技术股份有限公司；伊红染料（批号20070321）购自天津市巴斯夫化工有限公司；苏木精染料（批号68110020）购自北京兰杰柯科技有限公司；RAGE、肿瘤坏死因子α（TNF-α）ELISA检测试剂盒（批号分别为K11033093、M190905-102a）均购自欣博盛生物技术有限公司；链霉抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物（SABC）试剂盒、3，3′-二氨基联苯胺（DAB）显色试剂盒、兔HMGB1多克隆抗体试剂盒、兔核因子κB（NF-κB）多克隆抗体试剂盒（批号分别为K193314A、K193328E、OG11122356、AI07066414）均购自武汉博士德生物工程有限公司；其余试剂均为分析纯，水为纯化水。

1.3 实验动物

本研究所用实验动物为4周龄雄性SPF级昆明小鼠，共60只，体质量为（20±2）g，实验动物生产许可证号为SCXK（湘）2016-0002，由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供。

2 方法

2.1 分组、造模与给药

将60只小鼠按随机数字表法分为空白组、模型组、阳性对照组[甘草酸二铵60 mg/（kg·d），以临床常用剂量按体表面积比值法换算而得]和奥拉米特低、中、高剂量组[80、160、320 mg/（kg·d），以临床常用剂量的1、2、4倍按体表面积比值法换算而得]，每组10只。除空白组外，其余各组小鼠均灌胃异烟肼[75 mg/（kg·d）]+利福平[75 mg/（kg·d）]14 d以复制ATB-DILI模型[8]；与此同时，各给药组小鼠灌胃相应药液（均以生理盐水为溶剂），空白组和模型组小鼠灌胃生理盐水，各组小鼠灌胃体积均为20 mL/（kg·d），造模和干预均每天给药1次，连续给药14 d。

2.2 小鼠一般情况观察

每天观察并记录小鼠的生长发育、饮食、精神状态、毛色改变、皮肤黏膜颜色、大小便及对外界刺激的反应等，隔日称定并记录小鼠体质量。

2.3 小鼠标本采集与肝指数计算

末次给药后，各组小鼠禁食、不禁水12 h，称定体质量后腹腔注射10%水合氯醛溶液（4 mL/kg）进行麻醉，摘眼球取血适量，以3 000 r/min离心15 min，取上层血清，于4 ℃下保存，待测。随后处死各组小鼠，取其完整肝脏并称定肝湿质量，计算肝指数（肝指数＝肝湿质量/小鼠体质量×100%）。切取各组小鼠相同部位的肝组织，固定于4%多聚甲醛溶液中，用于苏木精-伊红（HE）染色及SABC免疫组化检测；其余组织保存于－80 ℃冰箱中，用于ELISA检测。

2.4 小鼠血清中肝功能指标测定

取各组小鼠血清适量，采用ELISA法以全自动生化分析仪测定血清中TBIL、DBIL、ALT、AST、ALP、γ-GT、TBA水平，具体操作按相应试剂盒说明书进行。

2.5 小鼠肝组织病理学检查

取各组小鼠经多聚甲醛固定后的肝组织，行常规脱水、石蜡包埋后切片（约3 μm），以HE染色并置于光学显微镜下观察肝组织病理学变化情况。

2.6 小鼠肝组织中HMGB1、NF-κB蛋白表达测定

采用SABC免疫组化法进行测定。取各组小鼠经多聚甲醛固定后的肝组织，按SABC试剂盒说明书进行操作，以DAB显色后，置于光学显微镜下观察（阳性表达的细胞为棕色或棕褐色）。每张切片随机选取5个不连续视野，用Image-Pro Plus 6.0软件计算单位测量区域面积内的光密度值，用于评价阳性表达率。

2.7 小鼠肝组织中RAGE、TNF-α蛋白表达测定

取各组小鼠解冻后的肝组织200 mg，制备肝组织匀浆，按ELISA法以酶标仪测定肝组织中RAGE、TNF-α蛋白的表达水平，具体操作按相应试剂盒说明书进行。

2.8 统计学方法

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，若数据同时满足正态分布及方差齐性检验则多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用LSD-t检验；若不满足上述条件则采用Kruskal-Wallis H秩和检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 小鼠一般情况及肝湿质量、肝指数

空白组小鼠生长发育正常，食欲、精神佳，毛发浓密、色泽可，皮肤及大小便未见异常，应激反应强烈。与

空白组比较，模型组小鼠生长发育迟缓，食欲、精神差，毛发稀疏、色泽晦暗，脚掌、大小便呈橘红色，便稀，应激反应迟钝。与模型组比较，奥拉米特低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠上述情况可见不同程度好转，食欲、精神改善，脚掌、大小便颜色变浅。

末次给药后，各组小鼠的体质量比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。与空白组比较，模型组小鼠的肝湿质量及肝指数均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，奥拉米特低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠的肝湿质量及肝指数均显著降低（$P<0.05$），但组间比较差异均无统计学意义（$P>0.05$），详见表1。

表1　奥拉米特对ATB-DILI模型小鼠末次给药后体质量、肝湿质量及肝指数的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 1　Effects of orazamide on the body weight, liver wet weight and liver index of ATB-DILI model mice after last administration（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	体质量，g	肝湿质量，g	肝指数，%
空白组	38.84±2.73	1.88±0.25	4.83±0.30
模型组	39.40±1.83	2.40±0.22*	6.08±0.27*
奥拉米特低剂量组	38.02±3.98	1.94±0.27#	5.11±0.47#
奥拉米特中剂量组	37.54±3.61	2.03±0.14#	5.42±0.23#
奥拉米特高剂量组	36.63±2.80	1.87±0.21#	5.10±0.55#
阳性对照组	37.13±2.72	1.93±0.15#	5.21±0.39#

注：与空白组比较，*$P<0.05$；与模型组比较，#$P<0.05$

Note：vs. blank group，*$P<0.05$；vs. model group，#$P<0.05$

3.2　小鼠血清中肝功能指标

与空白组比较，模型组小鼠血清中TBIL、DBIL、ALT、AST、ALP、γ-GT、TBA水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，奥拉米特低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠血清中TBIL、DBIL、ALT、AST、ALP、γ-GT、TBA水平均显著降低（$P<0.05$），且奥拉米特高剂量组上述指标水平均显著低于奥拉米特低、中剂量组（$P<0.05$），ALP、TBA水平均显著低于阳性对照组（$P<0.05$）。奥拉米特低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠血清中上述指标水平均未恢复至空白组水平，详见表2。

3.3　小鼠肝组织病理学变化情况

空白组小鼠可见肝小叶结构清晰，肝索排列整齐，肝血窦结构完整，肝细胞核大而圆，居中，未见炎症细胞浸润。模型组小鼠肝索排列紊乱，肝窦结构不清，肝细胞体积增大，有气球样变，胞质疏松，并出现不同程度坏死，胞核被推向一侧，伴明显的炎症细胞浸润。与模型组比较，奥拉米特低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠肝小叶及肝细胞结构均有不同程度改善，且以奥拉米特高剂量组和阳性对照组小鼠肝组织结构与空白组最为接近，详见图1（图中箭头表示炎症细胞）。

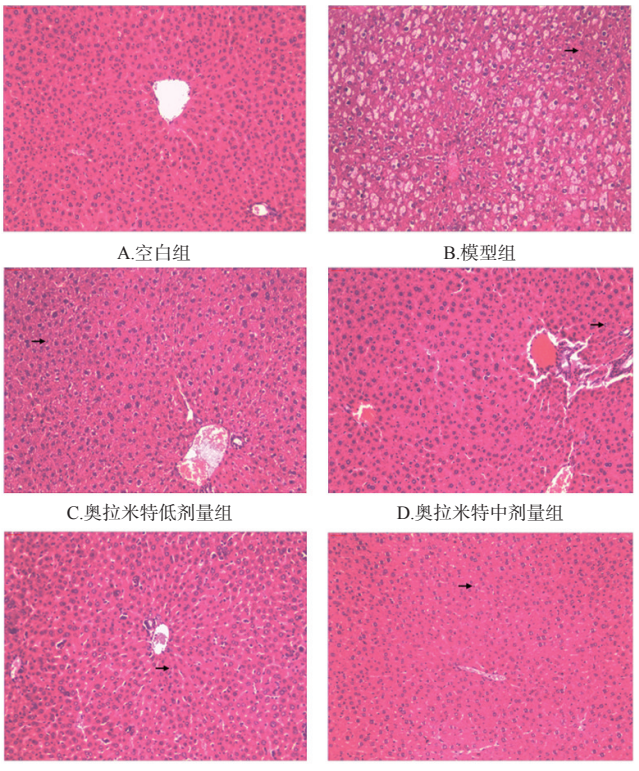


图1　奥拉米特对ATB-DILI模型小鼠肝组织病理学影响的显微图（HE染色，×200）

Fig 1　Micrographs of the effects of orazamide on liver histopathology of ATB-DILI model mice（HE staining，×200）

3.4　小鼠肝组织中HMGB1和NF-κB蛋白的表达水平

镜下，HMGB1和NF-κB蛋白在胞核和胞质中均有表达。与空白组比较，模型组小鼠肝组织中HMGB1和NF-κB蛋白均呈强阳性表达。与模型组比较，奥拉米特低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠肝组织中HMGB1和

表2　奥拉米特对ATB-DILI模型小鼠血清肝功能指标水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 2　Effects of orazamide on serum liver function indexes of ATB-DILI model mice（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	TBIL，μmol/L	DBIL，μmol/L	ALT，U/L	AST，U/L	ALP，U/L	γ-GT，U/L	TBA，μmol/L
空白组	2.79±0.75	1.58±0.44	30.88±9.68	100.66±11.38	112.20±8.88	53.00±7.89	2.62±0.23
模型组	14.34±1.45*	9.55±0.53*	95.50±9.10*	163.80±7.62*	233.60±5.06*	107.00±10.60*	9.63±0.75*
奥拉米特低剂量组	10.48±0.99*#△	7.36±0.54*#△	80.65±8.44*#△	149.11±9.11*#△	205.90±8.40*#△	87.50±9.86*#△	6.80±0.58*#△
奥拉米特中剂量组	8.85±1.40*#△	5.37±0.61*#△	67.65±4.45*#△	134.71±6.34*#△	186.90±6.31*#△	74.10±6.19*#△	5.51±0.41*#△
奥拉米特高剂量组	4.63±0.99*#	3.35±0.55*#	50.04±6.96*#	120.31±5.21*#	142.56±7.58*#	61.80±8.80*#	3.94±0.80*#
阳性对照组	3.88±1.23*#	3.64±0.34*#	54.12±5.03*#	114.55±9.51*#	178.20±7.67*#△	57.40±6.22*#	4.04±0.69*#△

注：与空白组比较，*$P<0.05$；与模型组比较，#$P<0.05$；与奥拉米特高剂量组比较，△$P<0.05$

Note：vs. blank group，*$P<0.05$；vs. model group，#$P<0.05$；vs. orazamide high-dose group，△$P<0.05$

NF-κB蛋白表达均出现不同程度降低，但均未降至空白组水平，详见图2、图3。

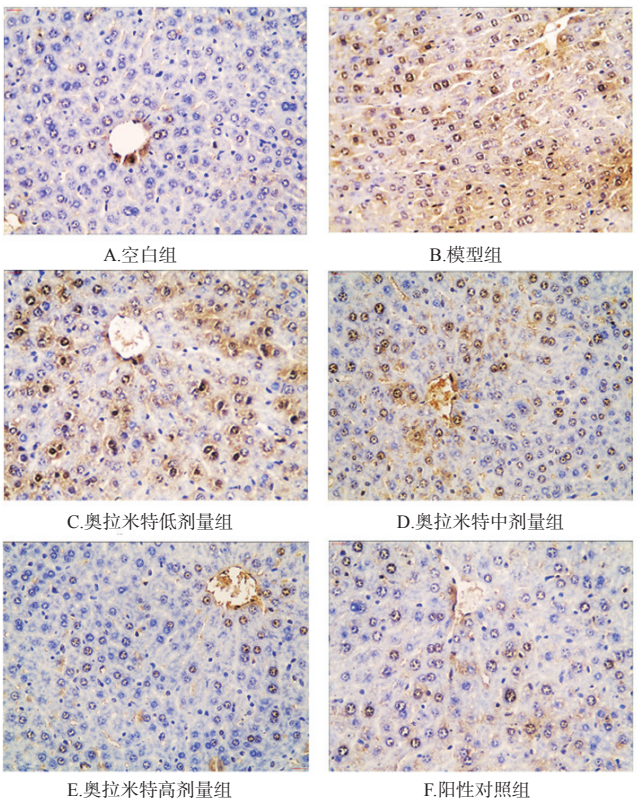


图2　奥拉米特对ATB-DILI模型小鼠肝组织中HMGB1蛋白表达影响的显微图（SABC免疫组化法，×400）

Fig 2　Micrographs of the effects of orazamide on protein expression of HMGB1 in liver tissue of ATB-DILI model mice（SABC immunohistochemistry，×400）

与空白组比较，模型组小鼠肝组织中HMGB1和NF-κB蛋白的阳性表达率均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，奥拉米特低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠肝组织中HMGB1和NF-κB蛋白的阳性表达率均显著降低（$P<0.05$），且奥拉米特高剂量组上述蛋白的阳性表达率均显著低于奥拉米特低、中剂量组（$P<0.05$），而与阳性对照组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。仅奥拉米特高剂量组和阳性对照组小鼠肝组织中HMGB1蛋白的阳性表达率与空白组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$），详见表3。

3.5　小鼠肝组织中RAGE和TNF-α蛋白的表达水平

与空白组比较，模型组小鼠肝组织中RAGE和TNF-α蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.05$）。与模型组比较，奥拉米特低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠肝组织中RAGE和TNF-α蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.05$），且奥拉米特高剂量组上述蛋白的表达水平

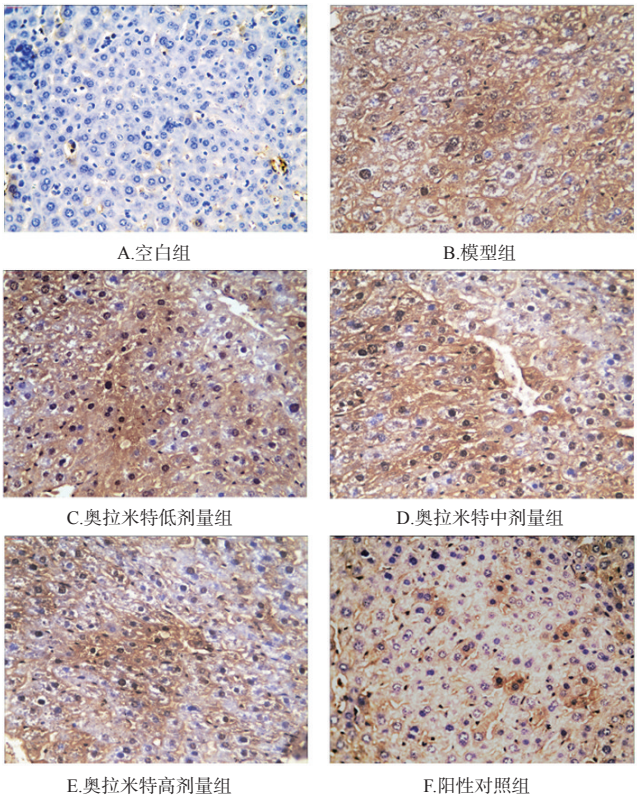


图3　奥拉米特对ATB-DILI模型小鼠肝组织中NF-κB蛋白表达影响的显微图（SABC免疫组化法，×400）

Fig 3　Micrographs of the effects of orazamide on protein expression of NF-κB in liver tissue of ATB-DILI model mice（SABC immunohistochemistry，×400）

表3　奥拉米特对ATB-DILI模型小鼠肝组织中HMGB1和NF-κB蛋白阳性表达率的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

Tab 3　Effects of orazamide on positive expression rates of HMGB1 and NF-κB protein in liver tissues of ATB-DILI model mice（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

组别	HMGB1	NF-κB
空白组	0.014 6±0.005 1	0.004 6±0.000 6
模型组	0.259 1±0.018 3*	0.494 7±0.047 3*
奥拉米特低剂量组	0.212 5±0.018 1*#△	0.366 8±0.041 6*#△
奥拉米特中剂量组	0.127 2±0.023 7*#△	0.243 4±0.028 9*#△
奥拉米特高剂量组	0.021 4±0.000 9#	0.134 1±0.029 9*#
阳性对照组	0.026 4±0.005 2#	0.102 2±0.026 0*#

注：与空白组比较，*$P<0.05$；与模型组比较，#$P<0.05$；与奥拉米特高剂量组比较，△$P<0.05$

Note：vs. blank group，*$P<0.05$；vs. model group，#$P<0.05$；vs. orazamide high-dose group，△$P<0.05$

均显著低于奥拉米特低、中剂量组（$P<0.05$），而与阳性对照组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$）。仅奥拉米特高剂量组和阳性对照组小鼠肝组织中RAGE蛋白的表达水平与空白组比较差异均无统计学意义（$P>0.05$），详见表4。

表4　奥拉米特对ATB-DILI模型小鼠肝组织中RAGE和TNF-α蛋白表达水平的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，ng/mL）

Tab 4　Effects of orazamide on protein expression of RAGE and TNF-α in liver tissues of ATB-DILI model mice（$\bar{x}\pm s$，$n=10$，ng/mL）

组别	RAGE	TNF-α
空白组	70.05±4.74	158.51±9.57
模型组	112.64±8.69*	251.58±8.18*
奥拉米特低剂量组	103.63±8.41*#△	214.07±10.48*#△
奥拉米特中剂量组	92.94±6.35*#△	199.63±6.54*#△
奥拉米特高剂量组	75.09±8.80#	166.50±7.07*#
阳性对照组	71.87±3.08#	168.15±7.39*#

注：与空白组比较，*$P<0.05$；与模型组比较，#$P<0.05$；与奥拉米特高剂量组比较，△$P<0.05$

Note：vs. blank group，*$P<0.05$；vs. model group，#$P<0.05$；vs. orazamide high-dose group，△$P<0.05$

4　讨论

据估算，全球每天约有5 000人死于结核病[9]。结核病作为危害全球人类健康的重大公共卫生问题之一，不得不引起人们的高度关注及重视。异烟肼和利福平均是一线抗结核药物，且临床常联合使用，两药单用时均有致肝损伤的副作用，联用后肝脏毒性加重[10]。李诗莹等[11]认为，氧化应激和线粒体功能障碍可能在异烟肼诱导ATB-DILI中发挥了重要作用。张一杨等[12]发现，异烟肼诱导肝细胞损伤可能与低表达沉默信息调节因子1增加NF-κB p65、白细胞介素6、TNF-α等炎症因子的释放相关。李津等[13]研究发现，当异烟肼和利福平两药联用时，利福平的肝微粒体酶诱导作用可增强异烟肼降解产物乙酰肼的肝毒性。向晓雪等[14]实验表明，两药联用时肝毒性主要来源于利福平所致的胆汁淤积。为此，本研究利用异烟肼联合利福平复制ATB-DILI模型，结果显示，与空白组比较，模型组小鼠血清中TBIL、DBIL、ALT、AST、ALP、γ-GT、TBA水平均显著升高，并伴有肝小叶结构紊乱，肝细胞变性、坏死，炎症细胞浸润等病理改变，与本课题组前期预实验结果基本一致，提示ATB-DILI模型复制成功。

奥拉米特为嘌呤及嘧啶衍生物前体，有阻止肝细胞坏死和肝纤维化的作用，并能刺激肝细胞再生，活化肝实质细胞，在改善急慢性肝损伤及调节代谢异常方面有着十分肯定的作用[7,15]，且对ATB-DILI也有一定的预防效果[6]，但其护肝机制尚未明确。近期研究表明，经具有抗氧化特性的HMGB1抑制剂甘草酸预处理或处理后，缺血再灌注肝损伤模型小鼠的肝脏炎症、中性粒细胞浸润和乙酰氨基酚所致的损伤均明显减轻[16－17]。为深入认识奥拉米特在ATB-DILI中的作用机制，从而提供早期防治的新思路，本研究按照临床成人剂量的1、2、4倍设置奥拉米特低、中、高剂量组，以临床常用护肝药物甘草酸制剂（甘草酸二铵肠溶胶囊）为对照药物设置阳性对照组。结果显示，低、中、高剂量奥拉米特和甘草酸二铵均可以显著降低ATB-DILI模型小鼠的肝指数，改善其肝功能指标，减轻其肝细胞损伤和炎症细胞浸润。这说明奥拉米特能够预防ATB-DILI。

HMGB1是一种广泛存在于真核细胞核内且含量极丰富的DNA结合蛋白，在核内参与DNA复制、重塑和DNA修复等过程，当细胞应激或死亡时，其可以迁移到细胞质中或释放至细胞外。近年来，HMGB1作为一种常见的损伤相关模式分子，发挥着启动和促进炎症反应、加重组织损伤的作用[18]。有研究发现，在ALT或国际标准化比值（INR）正常的患者中，临床可通过HMGB1早期识别进展性肝损伤，该蛋白作为未来的一种新型生物标志物具有较高的预测效能[19－20]。RAGE是最早发现的且高亲和的HMGB1受体，两者结合后可以通过NF-κB抑制蛋白、p38丝裂原活化蛋白激酶等炎症信号通路活化NF-κB，NF-κB激活后可诱导并促进TNF-α、白细胞介素1β等多种炎症因子的表达，而这些炎症因子又可作为激动剂再反向作用于NF-κB，从而形成了NF-κB正反馈环，放大炎症级联反应，形成炎症瀑布效应，从而形成持续的、扩大的、强化的炎症免疫反应，加重机体组织的损伤[21－22]。当机体细胞处于稳态时，HMGB1主要存在于细胞核，而NF-κB存在于细胞质中；当遇到外界刺激时，两者表达上调并出现“转位”现象[22]。本研究SABC免疫组化结果显示，空白组小鼠肝细胞内HMGB1和NF-κB呈微量表达，模型组小鼠肝细胞胞核和胞质中HMGB1和NF-κB的表达均明显增强，说明机体处于炎症反应状态。与模型组比较，奥拉米特低、中、高剂量组和阳性对照组小鼠肝组织中HMGB1、RAGE、NF-κB、TNF-α蛋白的表达均显著降低，提示奥拉米特对异烟肼联合利福平所致ATB-DILI有预防作用，其机制可能与下调肝组织中HMGB1和RAGE蛋白的表达、抑制炎症因子的分泌有关，可能与阳性对照药物的作用机制相同。此外，本研究还发现奥拉米特高剂量组小鼠肝组织中HMGB1和RAGE蛋白的表达水平恢复至空白组水平，但NF-κB和TNF-α蛋白的表达水平未达到空白组水平，说明可能存在其他炎症通路激活NF-κB介导的下游级联炎症反应，具体原因有待进一步探讨。

综上所述，奥拉米特能够预防异烟肼联合利福平所致的小鼠ATB-DILI，其机制可能与下调肝组织中HMGB1和RAGE蛋白表达、抑制炎症因子分泌有关。

参考文献

[1]　徐彩红，赵雁林.从《2020年全球结核病报告》看我国结核病防治工作[J].中华传染病杂志，2021，39（7）：392-

397.
[2] 甄瑞霞.抗结核病药物的研究进展[J].中国城乡企业卫生,2021,36(7):25-27.
[3] 中华医学会结核病学分会.抗结核药物性肝损伤诊治指南:2019年版[J].中华结核和呼吸杂志,2019,42(5):343-356.
[4] ARRIAZU E,GE X,LEUNG T M,et al. Signalling via the osteopontin and high mobility group box-1 axis drives the fibrogenic response to liver injury[J]. Gut,2017,66(6):1123-1137.
[5] 何雪,宋育林,王莉,等.激活PPARγ抑制异烟肼与利福平合用致大鼠肝损伤及HMGB1水平上调[J].中国组织化学与细胞化学杂志,2017,26(2):129-133.
[6] GASKELL H,GE X D,NIETO N. High-mobility group box-1 and liver disease[J]. Hepatol Commun,2018,2(9):1005-1020.
[7] 林忠惠,李学玲,陈芬,等.奥拉米特在抗结核治疗中的护肝作用研究[J].实用心脑肺血管病杂志,2013,21(7):85-86.
[8] 杨淑艳,钟秀宏,王爽,等.异烟肼和利福平联用致小鼠肝损伤实验模型的建立[J].中国药房,2011,22(33):3104-3105.
[9] 高丹丹.抗结核药物的研究进展[J].齐齐哈尔医学院学报,2020,41(7):882-885.
[10] 王新华,何红梅,张延霞,等.利福霉素钠与异烟肼合用对小鼠肝脏毒性的实验研究[J].中国药房,2007,18(25):1935-1937.
[11] 李诗莹,黄卫锋,胡秋慧.药物性肝损伤与Nrf2信号通路之关系的研究[J/OL].中国现代医学杂志,2021:1-7[2021-01-26]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/43.1225.r.20210115.0934.002.html.
[12] 张一杨,李莹淑,李金凤,等.SIRT1通过降低NF-κB p65表达减轻异烟肼致人肝细胞损伤的研究[J].中国现代医学杂志,2018,28(22):7-12.
[13] 李津,林文锋,潘燕玉,等.水飞蓟宾对抗结核药物所致肝功能损害的保护作用[J].中华肝脏病杂志,2010,18(5):385-386.
[14] 向晓雪,艾佳晨,赵科,等.利福平和异烟肼致小鼠肝损伤模型的特征研究[J].中国药理学通报,2019,35(4):586-590.
[15] 湖南医药工业研究所三室301组.抗肝炎药阿卡明的合成[J].医药工业,1974(4):4-7.
[16] HUEBENER P,PRADERE J P,HERNANDEZ C,et al. The HMGB1/RAGE axis triggers neutrophil-mediated injury amplification following necrosis[J]. J Clin Invest,2015,125(2):539-550.
[17] WANG X,SUN R,WEI H,et al. High-mobility group box 1(HMGB1)-toll-like receptor(TLR)4-interleukin(IL)-23-IL-17A interaction of γδT cells with macrophages[J]. Hepatology,2013,57(1):373-384.
[18] 刘贵军,李全,于雷.富硒姬松茸对小鼠急性酒精性肝炎的保护作用及其机制[J].中医药信息,2016,33(5):15-19.
[19] DANIEL J A,ROSALIND E J,JAMES W D,et al. Molecular forms of HMGB1 and keratin-18 as mechanistic biomarkers for mode of cell death and prognosis during clinical acetaminophen hepatotoxicity[J]. J Hepatol,2012,56(5):1070-1079.
[20] DANIEL J A,JAMES W D,PHILIP S L,et al. Mechanistic biomarkers provide early and sensitive detection of acetaminophen-induced acute liver injury at first presentation to hospital[J]. Hepatology,2013,58(2):777-787.
[21] DE LUCCA F,WATANABE M,SERRANO S,et al. Activation of RNA-dependent protein kinase and nuclear factor-κB by regulatory RNA from lipopolysaccharide-stimulated macrophages:implications for cytokine production[J]. Eur J Pharmacol,2002,450(1):85-89.
[22] 李晓理. HMGB1-RAGE信号通路在利福平诱导的小鼠肝损伤模型中的作用及其可能机制的研究[D].合肥:安徽医科大学,2018.

(收稿日期:2021-04-14 修回日期:2021-08-08)
(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅