doi:10.11659/jjssx.01E017040

·基础研究·

# 不同剂量利福平致小鼠肝损伤特点的研究

张 刚,陈 磊,陈 静,柴 进,汤旭东,陈文生 (第三军医大学西南医院全军消化病研究所,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 观察连续2周给予不同剂量利福平(RIF)引起小鼠肝损伤的现象及特点。**方法** 给予24只小鼠不同剂量的利福平(0、100、200、400 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$),连续灌胃2周,设为对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组4组(每组6只),末次给药后6 h取材,收集小鼠血液和肝组织样品进行血清学检测并观察小鼠肝病理改变。**结果** 所有小鼠实验期均未死亡。高剂量组和对照组比较TBA、DBIL、TBIL均有升高,ALT、AST、ALP无明显变化。中剂量组和对照组比较TBA、DBIL有升高,TBIL、ALT、AST、ALP无明显变化。低剂量组和对照组比较TBA、DBIL、TBIL、ALT、AST、ALP均无明显变化。各实验组小鼠肝均发生明显病理改变;HE染色显示肝细胞水肿、羽毛样变性与脂肪变性,并伴有大量炎性细胞浸润,个别可见散在的胆汁淤积;随着利福平浓度的增大,肝病理改变越明显。电镜照片示各实验组肝组织电镜照片可见肝细胞包浆中充满大量的脂肪滴,部分毛细胆管轻微扩张、其内可见不同电子密度的不规则状胆汁样物质,也是随利福平浓度的增大肝病理改变越明显。**结论** 连续2周给予不同剂量的利福平均可引起小鼠肝损伤,主要表现为肝细胞脂肪变性、炎性细胞浸润和散在胆汁淤积,利福平对小鼠肝的损伤呈浓度依赖性,但其机制有待进一步研究。

[关键词] 利福平;肝损伤;胆汁淤积;小鼠;抗结核药物;肝毒性

[中图分类号] R361;R595;R52 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-01-25

## Research on characteristics of liver injury induced by rifampicin in mice

ZHANG Gang, CHEN Lei, CHEN Jing, CHAI Jin, TANG Xu-dong, CHEN Wen-sheng (Institute of Gastroenterology Cholestasis Liver Disease Center, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To observe the symptom and characteristics of liver injury induced by different dosage of long-term administration of rifampicin(RIF) in mice. **Methods** Twenty-four healthy female ICR mice were randomly divided into 4 groups(6 mice in each group): control group, low dosage group, medium dosage group and high dosage group. The four groups were treated with 0, 100, 200, 400 mg·kg$^{-1}$·d$^{-1}$ RIF respectively for 2 weeks. Mice blood and liver tissue samples were collected at 6 hours after the last administration for serological test and liver histological observation. **Results** No mice died before execution. The TBA, DBIL and TBIL of high dosage group all increased compared with the control group, but the ALT, AST and ALP showed no obvious change. The TBA and DBIL of medium dosage group increased compared with the control group, while the TBIL, ALT, AST and ALP showed no obvious change. In the low dosage group, there was no obvious change in terms of TBA, DBIL, TBIL, ALT, AST, and ALP compared with the control group. Obvious pathological change occured in the liver of mice in all the experimental groups. HE staining showed edema and feather steatosis in liver cells, accompanied by a large number of inflammatory cells infiltration and a few sporadic cholestasis. With the increasing of RIF dosage, the liver pathological change became more obviously. In the experimental group, electron microscope showed that there were a lot of fat droplets in the liver cells wrapped slurry, and part of the capillary bile duct were slightly expanded with different electron density and irregular shape of bile sample material inside. The pathologic changes get more obvious with the increase of the concentration of rifampicin as well. **Conclusion** RIF could induce liver injury after 2 weeks' treatment at different dosages, mainly pathological changes included liver cell steatosis, inflammatory cell infiltration, and cholestasis. Rifampicin induced liver injury in a concentration-dependent manner. However, the mechanism of rifampicin-induced liver injury in mice needs further study.

**Keywords**: rifampicin; liver injury; cholestasis; mice; antituberculosis drugs; hepatotoxicity

近年来结核病发病率在全球范围内呈急剧增加的趋势,病死率居各类传染病之首,我国是全球结核病高发国家之一[1-2]。结核病患者在抗结核化学药物治疗中出现肝功能异常的发病率为2%~28%[3-5],占抗结核药不良反应的首位,出现严重肝损伤者占1%~2%[6-7],但引起肝毒性的机制尚未明确。因此,预防和减少抗结核药所致的肝损伤一直是临床急需解决的问题。利福平(rifampicin, RIF)是利福霉素类半合成抗生素,能抑细菌DNA转录合成RNA,可用于治疗结核病、肠球菌感染等,是目前最主要的抗结核药物之一,

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81470850)

[通信作者] 陈文生,E-mail:wenshengchen@hotmail.com

也是我国急性药物性肝损伤的重要病因。利福平具有肝毒性,长期服用可导致药物性肝损伤,由于其肝毒性严重影响其临床应用[8-11]。利福平引起肝损伤的发生率约为2%[12]。目前对于RIF致肝毒性的发生机理仍不明确,亦无证据表明利福平在肝代谢过程中产生毒性产物[13]。本文通过连续2周给予小鼠不同剂量的利福平,观察利福平是否致小鼠肝损伤,以及给予不同剂量的利福平后小鼠肝损伤的特点,为进一步探讨利福平致肝损伤的机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物、试剂与仪器

24只清洁剂ICR小鼠,6~8周龄,雌性,28~30 g,购于第三军医大学实验动物中心。实验动物适应性喂养,自由进食标准饲料,12 h光照和12 h黑暗的昼夜节律,恒温,20~25 ℃,湿度(50±5)%。适应性喂养7 d后给药。

利福平和羟甲基纤维素钠购自sigma公司;使用的其他试剂与仪器有:甲醛、无水乙醇、盐酸乙醇、光学树脂、二甲苯、4%戊二醛、锇酸、丙酮(成都科龙),苏木精、伊红(碧云天)。液氮罐(成都金凤液氮容器有限公司),-20 ℃冰箱(广东美的公司),-80 ℃冰箱(SANYO公司),Sorvall ST16R台式低温高速离心机(Thermo Scientific公司),BS200s电子天平(sartorius公司,德国),Sim-Fi2y制冰机(SANYO公司,日本),涡旋混匀仪(宁波新芝公司),移液器(10 μL、20 μL、200 μL)(Biohit公司),移液器(1 mL、5 mL)(北京大龙公司),XW-80A型涡旋器(上海医大仪器厂),高压蒸汽消毒锅(DSX-280A型)(上海申安医疗器械厂),恒温磁力搅拌器(HWCB-2型)(温州市医疗电器厂),无RNA酶EP管、吸头、离心管(Axygen公司),灌胃针,空针(1 mL、10 mL、50 mL);石蜡切片机、BX-41显微镜(Olympus,日本),光学显微镜照相系统(Olympus,日本)超薄切片机、JEM-1400plus电镜(日本电子)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物处理方法 健康雌性ICR小鼠随机分成4组,每组6只。对照组:等容积的羟甲基纤维素钠水溶液;低剂量组:RIF 100 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$;中剂量组:RIF 200 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$;高剂量组:RIF 400 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$。定时空腹灌胃,每天1次,连续2周,末次给药后禁食6 h取材,收集血清用于生化检测,取肝组织用于生化检测和病理检查。

1.2.2 血清肝生化指标检测 第三军医大学西南医院检验科全自动生化分析仪测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)和结合胆红素(DBIL)、总胆汁酸(TBA)。

1.2.3 肝组织病理检查 小鼠肝组织HE染色:①将贴好的切片脱水后放入二甲苯中20 min,依次通过100%、95%、80%、70%的乙醇脱蜡,然后蒸馏水洗涤,各3 min;②苏木精液染色10 min,自来水冲洗5 min;③1%盐酸乙醇分色3 s;④自来水冲洗40 min,显微镜下见细胞核蓝色,细胞质和结缔组织无色为宜;⑤通过蒸馏水,依次通过50%、70%、80%、95%的乙醇脱水,每次3 min;⑥伊红溶液染色2 min;⑦95%乙醇分色2 min;⑧100%乙醇脱水2 min,二甲苯透明20 min;⑨滴中性树胶封片。于光学显微镜下观察肝组织病理改变。

小鼠肝组织电镜标本制作:小鼠肝组织取出后切成0.1 $cm^3$,置于4%戊二醛溶液中,4 ℃冰箱中固定2 h,经0.1 mol/L PBS(pH7.2)冲洗3次,然后用锇酸($OSO_4$)在4 ℃条件下染色2 h。经50%、70%、90%的乙醇,90%乙醇与90%丙酮混合物及100%丙酮溶液中逐渐脱水浸透后在100%树脂中孵育。将孵育好的组织按照常规电镜包埋法用树脂包埋。每一块随机切取1张60 nm厚的超薄切片。在JEM-1400 plus透射电镜下观察,每张切片放大12 000倍后拍照。

### 1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件进行统计学分析,两组间的比较采用$t$检验,多组间的比较采用单因素方差分析,$P<0.05$为差异有统计学意义,$P<0.01$为差异具有极显著性统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 对小鼠外貌、精神状态的影响

对照组小鼠毛光泽、脚掌、尾部未见黄染,大小便正常,精神状态好;与对照组相比,各实验组小鼠皮毛光泽差,脚掌及尾部可见明显橘黄染,大小便呈橘红色,精神状态差。

### 2.2 对小鼠肝生化指标的影响

对照组、实验组均无小鼠死亡。小鼠的各项肝生化指标(表1),高剂量组和对照组比较TBA、DBIL、TBIL均有升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),ALT、AST、ALP无明显变化。中剂量组和对照组比较TBA、DBIL有升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),TBIL、ALT、AST、ALP无明显变化。低剂量组和对照组比较TBA、DBIL、TBIL、ALT、AST、ALP均无明显变化。

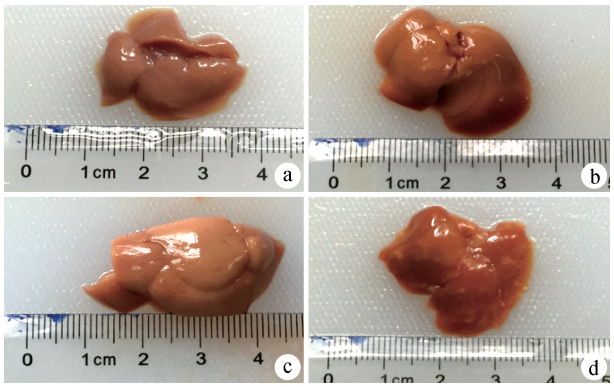
表 1 对小鼠血清肝生化指标影响的剂量效应关系

| 组别 | ALT(U/L) | AST(U/L) | ALP(U/L) | TB(U/L) | DB(U/L) | TBA(μmol/L) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 对照组 | 41.81 ±4.24 | 176.10 ±16.55 | 128.28 ±28.53 | 12.80 ±2.22 | 3.01 ±0.67 | 5.54 ±1.26 |
| 低剂量组 | 45.01 ±4.88 | 172.71 ±26.41 | 153.88 ±31.69 | 12.10 ±2.47 | 4.87 ±1.09 | 5.46 ±1.19 |
| 中剂量组 | 49.34 ±10.87 | 179.15 ±7.35 | 148.38 ±18.47 | 16.35 ±1.74 | 10.78 ±0.74 * | 13.52 ±4.44 * |
| 高剂量组 | 46.37 ±8.19 | 174.89 ±20.35 | 147.47 ±22.39 | 40.86 ±3.37 * | 20.69 ±5.27 * | 20.82 ±10.04 * |

*:与对照组比较,$P<0.05$

### 2.3 对小鼠肝大体形态的影响

肉眼下对照组小鼠肝外观正常,颜色红润,被膜光滑、有弹性,边缘锐利,质地柔软(图 1a)。实验组小鼠肝稍黄染,边缘稍钝,质地基本柔软,可见局部有白色病灶,可能为肝组织局部坏死,利福平浓度越高越明显(图 1b、c、d)。

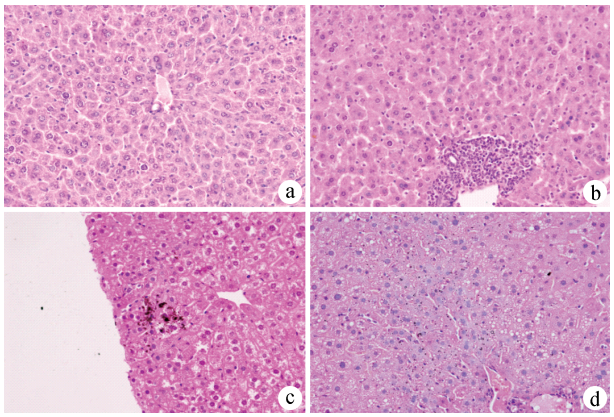



a:对照组;b:低剂量组;c:中剂量组;d:高剂量组

图 1 小鼠肝组织大体图片观察

### 2.4 对小鼠肝病理学的影响

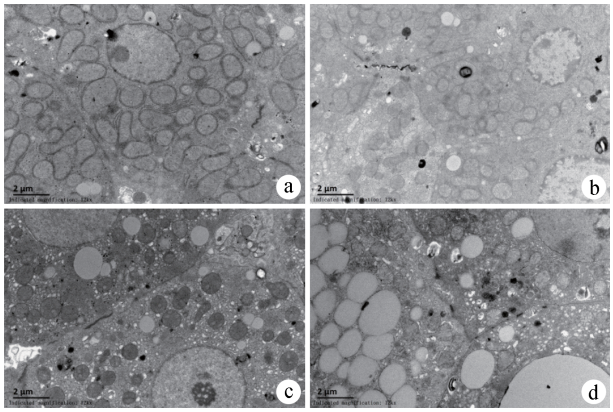
光镜下肝组织病理观察:对照组肝组织肝小叶清晰可见,肝细胞索排列整齐,中央静脉、汇管区结构正常,肝实质细胞未见病变(图 2a)。各实验组:小鼠肝细胞排列紊乱,肝细胞肿胀,可见不同程度的肝细胞脂肪变性,肝窦狭窄,病变以肝小叶中央静脉为中心,波及大部分肝组织,局部炎性细胞浸润明显(图 2b、c),其中以高剂量组表现最为明显(图 2d)。




a:对照组;b:低剂量组;c:中剂量组;d:高剂量组

图 2 小鼠肝组织切片 HE 染色光镜观察(HE ×400)

电镜下肝组织病理观察:对照组电镜下可见大而圆的细胞核,和均匀分布的染色质,线粒体嵴清晰,细胞内含发达的粗面和光面内质网,可见较多的糖原颗粒以及少量的溶酶体和脂滴(图 3a)。各实验组:电镜下可见细胞质中可见大量的脂肪滴,随利福平浓度增高脂肪滴明显增多,部分线粒体肿胀、内质网断裂、毛细胆管扩张及管腔内充满不同电子密度的不规则状胆汁样物质(图 3b、c、d)。




a:对照组;b:低剂量组;c:中剂量组;d:高剂量组

图 3 小鼠肝组织切片电镜观察(2 μm ×12 000)

## 3 讨论

抗结核药物引起肝损害一直是比较普遍且棘手的临床问题,抗结核药物引起的肝损害是药物性肝损害最常见的原因之一[14],药物是肝损害的重要病因之一。药物引起肝病的机制因药而异,非常复杂,大多数情况下尚不清楚。有些药物具有直接的毒性作用,由其引起的肝损害一般可以预见,而且损害与药物剂量有关,且为某些药物所特有;另一些药物仅偶尔在敏感的个体引起肝损伤,而且与剂量无关,发生与否也难以预测。这种在敏感个体发生的反应常被称为过敏反应,但作为一种真正的变态反应,证据并不充分,所以最好称为特异体质反应。药物的直接毒性和特异体质反应之间的区别并不如以前想象的那样清楚,例如有些以前被认为对易感者是过敏原的药物,却能通过其毒性中间产物直接损伤细胞膜。目前,药物性肝损害的分类并不完全令人满意,但大多数急性病例仍可分为:肝细胞型、胆汁淤积型(有或无炎症)和混合型。

有些药物能引起包括肿瘤在内的慢性肝损害。药物诱导的溶血可引起非结合性高胆红素血症而发生轻度黄疸,但无真正的肝损伤,因而肝功能试验正常。一般认为后面两种都主要为胆汁淤积所导致。利福平作为最重要的抗结核药物,其肝毒性是制约其临床应用甚至抗结核效果的最重要的因素。利福平是广泛使用的一线抗结核药,其最常见的不良反应为肝毒性[15],临床上有关利福平肝毒性的研究主要是流行病学的随访,迄今为止利福平肝损伤的发病机制仍未阐明。利福平可导致以胆汁淤积为主的肝损伤[16],利福平作为肝药酶强诱导剂之一,与其他具有一定肝毒性的药物合用,可使发生致命性肝毒性的危险明显增加[17]。目前对于利福平致肝损伤的病理环节尚未明确,对利福平引起肝细胞损伤的特点报道的文献并不多。本研究采取灌胃的方法予以小鼠不同剂量的利福平[18],结果显示,与对照组比较,连续 2 周给予不同剂量的利福平,低剂量组小鼠肝生化指标变化不明显,原因可能与肝细胞虽然出现损伤,还未到达一定的程度,故代表细胞膜和细胞器损伤的酶谱变化不明显,也可能与肝具有较强修复损伤的能力有关。与对照组比较,中剂量组、高剂量组 TBA、DBIL、TBIL 均有升高,其他肝生化指标变化不明显,说明可能利福平的剂量越大对小鼠肝细胞的损害越严重。利福平对小鼠肝细胞的损害表现出浓度依耐性,因为本研究样本量较小,可能呈现出一些差异,因此,需更大样本量进行进一步的研究。

小鼠肝组织学方面的改变,HE 染色显示肝细胞水肿、羽毛样变性与脂肪变性,并伴有大量炎性细胞浸润,个别可见散在的胆汁淤积。给予利福平相同的时间,随利福平浓度的增大肝病理改变越明显。电镜照片示各实验组肝组织电镜照片可见肝细胞胞浆中充满大量的脂肪滴,部分毛细胆管轻微扩张、其内可见胆汁淤积,部分线粒体肿胀、内质网断裂,也是随利福平浓度的增大肝病理改变越明显,说明利福平可以引起小鼠肝细胞损伤,主要表现为小鼠肝细胞脂肪变性,大量炎性细胞,部分线粒体肿胀,内质网断裂以及散在的胆汁淤积;并且这种利福平引起的小鼠肝损害的程度可能和利福平的浓度相关。

结合肝组织光镜下和电镜下表现,以及肝酶谱变化不明显,考虑利福平可引起肝细胞和胆管上皮的结构变化同时伴有胆汁排泌功能的障碍。利福平灌胃小鼠 2 周为什么小鼠肝组织会发生脂肪变性、炎性细胞浸润、部分线粒体肿胀,内质网断裂以及散在的胆汁淤积,以及这种肝细胞损害、凋亡与胆汁淤积发生的先后顺序和因果关系,具体机制有待进一步研究。

## [参考文献]


[1] Cheng MH. Ministerial meeting agrees plan for tuberculosis control[J]. Lancet,2009,373(9672):1328.

[2] Crunch time for tuberculosis control[J]. Lancet,2009,373(9670):1145. doi:10.1016/S0140-6736(09)60662-0.

[3] Dossing M,Wilcke JT,Askgaard DS,et al. Liver injury during antituberculosis treatment:an 11-year study[J]. Tuber Lung Dis,1996,77(4):335-340.

[4] Yee D,Valiquette C,Pelletier M,et al. Incidence of serious side effects from first-line antituberculosis drugs among patients treated for active tuberculosis[J]. Am J Respir Crit Care Med,2003,167(11):1472-1477. doi:10.1164/rccm.200206-626OC.

[5] Tostmann A,Boeree MJ,Aarnoutse RE,et al. Antituberculosis drug-induced hepatotoxicity:concise up-to-date review[J]. J Gastroenterol Hepatol,2008,23(2):192-202. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.05207.x.

[6] Tost JR,Vidal R,Cayla J,et al. Severe hepatotoxicity due to anti-tuberculosis drugs in Spain[J]. Int J Tubercul Lung Dis,2005,9(5):534-540.

[7] Huang YS. Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and the susceptibility to antituberculosis drug-induced liver injury[J]. Exp Opin Drug Metab Toxicol,2007,3(1):1-8. doi:10.1517/17425255.3.1.1.

[8] 段自嗥. 异烟肼和利福平肝脏毒性研究进展[J]. 现代医学,2013,41(6):430-433. doi:10.3969/j.jssn.1671-7562.2013.06.022.

[9] 安慧茹,吴雪琼. 抗结核药物性肝损害研究进展[J]. 中国抗生素杂志,2010,35(10):727-733.

[10] 张志华,吴红海,薛 改,等. 异烟肼和利福平合用及异烟肼代谢物对人肝细胞的毒性作用[J]. 中国医药学院杂志,2010,30(8):632-635.

[11] Thongraung W,Sittidach M,Khwansuwan P,et al. Evaluation of the physicians' approach to the diagnosis and treatment of patients with antituberculosis drug-induced hepatotoxicity[J]. J Eval Clin Pract,2012,18(6):1119-1125. doi:10.1111/j.1365-2753.2011.01706.x.

[12] Villarino ME,Ridzon R,Weismuller PC,et al. Rifampin preventive therapy for tuberculosis infection:experience with 157 adolescents[J]. Am J Respir Crit Care Med,1997,155(5):1735-1738. doi:10.1164/ajrccm.155.5.9154885.

[13] Westphal JF,Vetter D,Brogard JM. Hepatic side-effects of antibiotics[J]. J Antimicrob Chemother,1994,33(3):387-401.

[14] 许建明. 全国多中心急性药物性肝损伤住院病例调研分析[J]. 中华消化杂志,2007,27(7):439-442.

[15] 贾 忠,吴 晶,马建军,等. 一线抗结核药物肝损害的研究现状[J]. 中国防痨杂志,2013,35(6):468-471.

[16] 曹云海,陈 熙,张 程,等. 利福平对小鼠肝细胞胆汁酸转运体 Bsep 和 Mrp2 表达与定位的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(12):1581-1586.

[17] Hou XY,Jing J,Hong-Liang LI,et al. Valproic acid suppresses SIRT1 inducing hepatotoxicity[J]. Chinese Pharmacological Bulletin,2015,31(1):31-34.

[18] 徐 娟,陈 熙,张 程,等. 利福平致小鼠肝内胆汁淤积的实验模型[J]. 安徽医科大学学报,2010,45(1):34-38.


(编辑:左艳芳)