消化系统疾病 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000992

探讨血红素加氧酶-1在利福平致肝氧化应激损伤中的作用

马 磊[1],陈 欢[1],许婉婷[2],徐 涛[2],严琴慧[2],陈倩竹[1],蒋师放[1],姜 蓉[3],李龙江[1]
(1. 重庆医科大学基础医学院病理生理学教研室;2. 重庆医科大学儿科学院;
3. 重庆医科大学干细胞与组织工程研究室,重庆 400016)

【摘 要】**目的**:研究血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1,HO-1)在利福平(Rifampicin,RFP)致肝氧化应激损伤发病机制中的作用。**方法**:(1)体内实验:将 Balb/c 小鼠随机分为 3 组,每组 8 只。分别为生理盐水(normal saline,NS)对照组、DMSO 溶剂对照组、RFP 模型组(200 mg/kg),连续灌胃 15 d。检测小鼠血清中总胆红素(total bilirubin,TB)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST),肝匀浆中丙二醛(malondialdehyde,MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GSH-Px)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)的水平。并采用 HE 染色观察各组病理形态的改变,Western blot 法测定各组 HO-1 蛋白的表达。(2)体外实验:不同浓度(10、50 100 μmol/L)RFP 处理 HepG2 细胞 24、48、72 h,CCK-8 检测细胞增殖,取细胞上清液测 ALT、AST,提取处理后细胞蛋白通过 Western blot 法测定各组 HO-1 蛋白的表达,检测细胞中 MDA、SOD、GSH-Px 的水平。**结果**:体内实验:RFP 模型组与 DMSO 溶剂对照组、NS 对照组相比,TB(F=64.002,P=0.000)、AST(F=37.046,P=0.000)、ALT(F=64.706,P=0.000)、MDA(F=10.777,P=0.001)明显升高,GSH-Px(F=40.962,P=0.000)、SOD(F=83.165,P=0.000)明显降低;肉眼观察,可见 RFP 模型组小鼠肝脏黄染,肝脏及胆囊肿大,病理切片示 RFP 模型组小鼠肝脏中央静脉周围肝细胞呈水样变性。体外实验:CCK-8 结果表明 RFP 对 HepG2 细胞毒性作用呈时间剂量依赖性;RFP 组细胞 AST、ALT、MDA 明显升高,而 GSH-Px、SOD 明显降低。Western blot 检测发现 RFP 作用下 HepG2 细胞与小鼠肝组织内 HO-1 表达明显增高。**结论**:RFP 可通过氧化应激引起肝损伤,而 HO-1 的表达升高与疾病的发生发展相关。

【关键词】利福平;血红素加氧酶-1;药物性肝损伤
【中图分类号】R99 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-01-06

Role of heme oxygenase-1 in liver oxidative stress injury induced by rifampicin

Ma Lei[1], Chen Huan[1], Xu Wanting[2], Xu Tao[2], Yan Qinhui[2], Chen Qianzhu[1], Jiang Shifang[1], Jiang Rong[3], Li Longjiang[1]
(1. Teaching and Research Section of Pathophysiology, Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering; 2. Children's Hospital of Chongqing Medical University; 3. Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***: To study the role of the heme oxygenase-1 (HO-1) in rifampicin (RFP) induced liver oxidative stress injury. ***Methods***: (1)*In vivo* experiments: Balb/c mice were randomly divided into three groups (n=8), including normal saline (NS) control group, DMSO control group, rifampicin (RFP) model group (200 mg/kg), respectively. Levels of serum total bilirubin (TB), alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) of mice liver homogenates were determined after gavage for 15 days. Pathological morphology changes were observed with HE staining and the expression of HO-1 protein was measured by Western blot. (2)*In vitro* experiments: different concentrations (10 μmol/L, 50 μmol/L, 100 μmol/L) of rifampicin were implemented in HepG2 cells for 24, 48, 72 h, respectively. Proliferation of cells was tested by CCK-8 Kit, and the levels of ALT, AST in supernatant and MDA, SOD and GSH-Px in cell extracted proteins were determined. The expression of HO-1 protein was examined via Western blot. ***Results***: Compared with DMSO control group and NS control group, rifampin group showed a significantly higher levels of total bilirubin (F=64.002, P=0.000), AST (F=37.046, P=0.000), ALT (F=64.706, P=0.000), MDA (F=

作者介绍:马 磊,Email:124990587@qq.com,
研究方向:药物性肝损伤。
通信作者:李龙江,Email:lljlyy2003@163.com。
基金项目:重庆医科大学 2014 年创新实验重点资助项目(编号:20140T);重庆医科大学基础医学院中青年师资培养资助项目。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160601.1550.008.html (2016-06-01)

10.777, P=0.001), as well as a notable decrease of GSH-Px (F=40.962, P=0.000), SOD (F=83.165, P=0.000). Furthermore, the jaundice, hepatomegaly and hydropic degeneration of hepatocytes surrounding the central vein could be found in RFP group. CCK-8 detection showed that cytotoxicity induced by rifampicin was in a time and concentration dependant manner in HepG2 cell line. The levels of AST, ALT, MDA were elevated significantly, on the contrary, the activity of GSH-Px, SOD were decreased in RFP groups. At last, the HO-1 expression was significantly upregulated in rifampicin treated group via Western blot analysis *in vitro* and *in vivo*. ***Conclusion***: RFP could induce oxidative stress injury in liver, and the upregulation of HO-1 expression is correlated with development of the liver injury.

【Key words】Rifampicin; heme oxygenase-1 (HO-1); drug-induced liver injury

利福平（Rifampicin, RFP）是世界卫生组织推荐的、不可替代的一线抗结核药，但具有肝毒性。单用时，1%左右患者出现肝损害；合用异烟肼（Isoniazid, INH）时，肝脏毒性发生的机率明显增加，可达2.6%，有时甚至发生急性肝衰竭危及生命[1-3]。然而，RFP 引起肝损伤 机制尚不清楚。

有研究证实，氧化应激损伤是 RFP 合用 INH致肝毒性的重要机制。RFP 可诱导细胞色素 P450 活性加强，增加 INH 代谢产物生成，从而消耗肝细胞内的谷胱甘肽（glutathione, GSH），最终导致细胞死亡[4]。但是，RFP 本身可否引起氧化应激损伤，还不得而知。

大量研究表明，血红素加氧酶-1（heme oxygenase-1, HO-1）能保护氧化应激状态下的细胞，是机体抗氧化应激损伤之防御系统中的重要分子[5]。同时，作为血红素分解代谢的限速酶，它也参与胆红素代谢的调控[6]。因此，HO-1 很可能是 RFP 肝毒性发病机制中的重要分子。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

RFP（美国 sigma 公司，纯度≥97%）；兔抗 HO-1 多克隆抗体（美国 protein tech 公司）；丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase, ALT）、天门冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase, AST）和总胆红素（total bilirubin, TB）检测试剂盒（南京建成生物工程研究所）；CCK-8、谷胱甘肽过氧化物酶（glutathione peroxidase, GSH-Px）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase, SOD）和丙二醛（malondialdehyde, MDA）检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司）；HepG2 细胞株为本研究室冻存，标准胎牛血清、DMEM 培养基（Hyclone 公司）；甲醇、过硫酸铵、胰蛋白酶、氯化钠等常规试剂均由本研究室提供。

1.2 动物分组与处理

SPF 级雄性 Balb/c 小鼠，体质量 18~22 g，共 24 只，购于重庆医科大学实验动物中心[实验动物生产许可证号：SCXK（渝）2012-0002，实验动物使用许可证号：SYXK（渝）2012-0001]。

实验前，称取适量 RFP 溶于 DMSO，再加入适量生理盐水稀释浓度至 200 mg/kg（DMSO 与 NS 比例为 1:9），需避光处理。小鼠随机分为 3 组，每组 8 只，分别为 NS 对照组、DMSO 溶剂对照组、RFP 模型组（200 mg/kg）。每组空腹灌胃 1 次/d，灌胃 1 h 后给予食物和水自由饮食，连续 15 d。末次给药后禁饮禁食 6 h，内眦静脉取血，静置 30 min 后于 4 ℃低温离心机以 3 000 r/min 离心 10 min，分离血清用于生化检测，-70 ℃保存。用颈椎脱臼法处死小鼠，取部分肝脏组织经生理盐水清洗后 4%多聚甲醛固定，用于病理切片形态学观察，其余肝脏组织经生理盐水清洗后于-70 ℃冷冻保存。

1.3 生化指标检测

用赖氏法检测小鼠血清和细胞上清中 ALT、AST 活性，用咖啡因检测法检测小鼠血清 TB 含量，具体方法参照试剂盒说明书。

1.4 氧化指标检测

SOD 活力测定采用黄嘌呤氧化酶法，GSH-Px 测定采用比色法，MDA 测定采用硫代巴比妥酸法，蛋白质的测定采用双缩脲法。以上各指标测定参照试剂盒说明书进行。

1.5 肝组织病理学检查

4%多聚甲醛固定后，进行组织脱水-石蜡包埋-HE 染色，制备好病理切片，在显微镜下观察肝脏组织病理形态学变化并采集图片。

1.6 细胞培养

采用含 10%标准胎牛血清的 DMEM 培养液，于 37 ℃、5%CO_2 的培养箱中培养 HepG2 细胞株，每隔 48 h 换液 1次，待细胞生长至状态良好，铺满至 80%瓶壁时以 1:3 的比例传代。

1.7 CCK-8 检测细胞增殖活性

取对数生长期细胞，消化离心后制成细胞悬液，细胞计数调整浓度，取 100 μl 分别接种于 96 孔板（5×10^3 个/孔）。

培养 24 h 后，实验组中加入用 DMEM 配制的 RFP 工作液 10 μl/孔，终浓度分别为 10、50、100 μmol/L，各 5 孔；细胞对照组加入无药的 DMEM 培养基，10 μl/孔×5 孔；溶剂对照组加入含DMSO 的 DMEM 培养基 10 μl/孔×5 孔（DMSO 与培养基比例为 1:1 000），另设无细胞空白对照组 5 孔，于 5%CO_2 的培养箱分别孵育 24、48、72 h（每 24 h 沿孔壁小心吸出孔内培养液，换入新培养基和相应药物）。吸出每孔内培养液，加入 100 μl 无血清 DMEM，再加入 CCK-8 工作液 10 μl/孔，继续培养 4 h，振摇 10 s，酶标仪 450 nm 处测定各孔吸光度（absorbance，A）值。

细胞增殖抑制率(%)=($A_{细胞对照孔}-A_{空白孔}$)-($A_{实验孔}-A_{空白孔}$)/($A_{细胞对照孔}-A_{空白孔}$)×100%

1.8 Western blot 检测 RFP 对小鼠肝组织和 HepG2 细胞内 HO-1 蛋白的影响

肝脏组织匀浆，蛋白质样品制备；HepG2 细胞用不同浓度 RFP（10、50、100 μmol/L）处理 24、48、72 h 后分别提取其总蛋白，测定蛋白浓度，免疫印迹法检测 HO-1 蛋白表达水平，采用 Quantity One 凝胶成像系统进行图像分析。

1.9 统计分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析，计量资料均采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，采用单因素方差分析及重复测量方差分析，组间两两比较采用 LSD-t 检验，如果数据不满足方差齐性则选用非参数检验 Dunnett's T3。均采用双侧检验，检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 小鼠血清 AST、ALT 活性

小鼠 AST（F=37.046，P=0.000）、ALT（F=64.706，P=0.000）3 组间存在统计学差异。RFP 模型组 AST 活性较 DMSO 溶剂对照组（P=0.000）和 NS 对照组（P=0.000）明显升高，DMSO 溶剂对照组与 NS 对照组间比较无统计学意义（P=0.758）；RFP 模型组 ALT 活性较 DMSO 溶剂对照组（P=0.000）和 NS 对照组（P=0.000）明显升高，DMSO 溶剂对照组与 NS 对照组间比较无统计学意义（P=0.905），提示 RFP 连续灌胃可致肝损伤，结果见表 1。

表 1 RFP 对小鼠 AST、ALT 活性的影响（$\bar{x}\pm s$，n=8）

Tab.1 Effects of rifampicin on plasma AST and ALT levels（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	AST（U/L）	ALT（U/L）
NS 对照组	189.74 ± 29.12	290.37 ± 42.89
DMSO溶剂对照组	194.84 ± 25.72	286.31 ± 65.77
RFP模型组	314.08 ± 41.21	620.15 ± 86.30
F 值	37.046	64.706
P 值	0.000	0.000

2.2 小鼠血清 TB 含量

小鼠血清 TB 含量（F=64.002，P=0.000）3 组间存在统计学差异。RFP 模型组较 DMSO 溶剂对照组（P=0.000）和 NS 对照组（P=0.000）TB 含量明显增高，DMSO 溶剂对照组与 NS对照组间比较无统计学意义（P=0.670），结果见表 2。

表 2 RFP 对小鼠血清 TB 含量的影响（$\bar{x}\pm s$，n=8）

Tab.2 Effects of rifampicin on serum TB levels（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	TB（μmol/L）
NS 对照组	1.19 ± 0.32
DMSO溶剂对照组	1.02 ± 0.35
RFP模型组	3.92 ± 0.87
F 值	64.002
P 值	0.000

2.3 RFP 对小鼠肝组织 GSH-Px、SOD、MDA 水平的影响

连续灌胃 15 d 后，3 组间 GSH-Px（F=40.962，P=0.000）、SOD（F=79.091，P=0.000）、MDA（F=12.445，P=0.000）结果存在统计学差异。RFP 模型组小鼠肝组织中 GSH-Px 较 NS 对照组（P=0.000）和 DMSO 溶剂对照组（P=0.000）明显下降，DMSO 溶剂对照组与 NS 对照组间比较无统计学意义（P=0.226）；RFP 模型组小鼠肝组织中 SOD 较 NS 对照组（P=0.000）和 DMSO 溶剂对照组（P=0.000）明显下降，DMSO 溶剂对照组与 NS 对照组间比较无统计学意义（P=0.265）；RFP 模型组小鼠肝组织中 MDA 较 NS 对照组（P=0.000）和 DMSO 溶剂对照组（P=0.000）明显下降，DMSO 溶剂对照组与 NS 对照组间比较无统计学意义（P=0.840），结果见表 3。

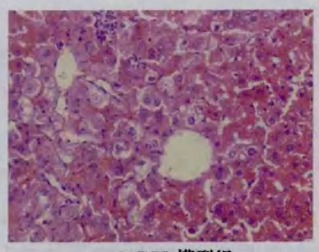
表 3 RFP 对小鼠肝组织 GSH-Px、SOD、MDA 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=8）

Tab.3 Effects of rifampicin on hepatic GSH-Px,SOD,MDA levels（$\bar{x}\pm s$，n=8）

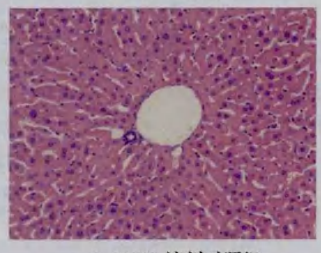
组别	GSH-Px（U/mg pro）	SOD（U/mg pro）	MDA（μmol/mg pro）
NS对照组	1.21 ± 0.21	14.40 ± 2.06	10.74 ± 2.17
DMSO溶剂对照组	1.32 ± 0.17	13.49 ± 1.64	11.09 ± 1.93
RFP模型组	0.59 ± 0.11	5.31 ± 0.79	18.43 ± 5.28
F 值	40.962	79.091	12.445
P 值	0.000	0.000	0.000

2.4 小鼠肝脏组织病理形态学变化

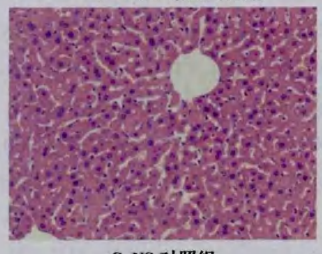
连续灌胃 15 d RFP（200 mg/kg）后，小鼠肝脏黄染，肝脏及胆囊肿大，肝脏表面均匀密布白色小颗粒，质脆。经 HE 染色，镜下可见 RFP 模型组小鼠肝小叶结构被破坏，肝细胞呈水样变，伴有脂肪样变，有少量炎症细胞浸润；DMSO 溶剂对照组与 NS 对照组小鼠肝小叶结构清晰，肝细胞轮廓清楚，以中央静脉为中心向四周呈放射状排列，细胞核圆大，位于细胞中心（图 1）。



A. RFP 模型组



B. DMSO 溶剂对照组



C. NS 对照组

图 1 肝脏组织病理学变化（HE 染色，200×）

Fig.1 Pathological changes of liver（HE staining，200×）

2.5 RFP 对 HepG2 细胞增殖抑制效应

随 RFP 浓度的增加和作用时间的延长，其对 HepG2 细胞的增殖抑制率逐渐增加，呈时间—剂量效应，结果见表 4。

各个时间点间细胞增殖抑制率差异有统计学意义（F=2 192.704，P=0.000）；时间和剂量有交互作用（F=86.144，P=0.000），说明随 RFP 浓度的增加和作用时间的延长，其对 HepG2 细胞的增殖抑制率逐渐增加，呈时间-剂量效应；不同分组间方差分析显示，实验组与对照组间细胞增殖抑制率有统计学差异（F=110.535，P=0.000）。

2.6 细胞上清液中 AST、ALT 活性

各个时间点间细胞上清液中 AST（F=3 082.657，P=0.000），ALT（F=136.334，P=0.000）活性差异有统计学意义；时间和剂量有交互作用 AST（F=804.252，P=0.000）、ALT（F=27.991，P=0.000）说明随 RFP 浓度的增加和作用时间的延长，其对 HepG2 细胞的损伤程度逐渐增加，呈时间-剂量效应；不同分组间方差分析显示，实验组与对照组间细胞上清液中 AST（F=3 410.158，P=0.000）、ALT（F=446.558，P=0.000）活性有统计学差异，结果见表 5。

2.7 细胞蛋白中 GSH-Px、SOD、MDA 的表达

各个时间点间细胞中 GSH-Px（F=210.274，P=0.000）、SOD（F=51.063，P=0.000）、MDA（F=1 782.453，P=0.000）活性差异有统计学意义；时间和剂量有交互作用 GSH-Px（F=40.125，P=0.000）、SOD（F=17.751，P=0.000）、MDA（F=267.300，P=0.000）说明随 RFP 浓度的增加和作用时间的延长，其对 HepG2 细胞的氧化损伤程度逐渐增加，呈时间-剂量效应；不同分组间方差分析显示，实验组与对照组间细胞中 GSH-Px（F=1 076.102，P=0.000）、SOD（F=540.707，P=0.000）、MDA（F=667.028，P=0.000）活性有统计学差异，结果见表 6。

2.8 Western blot 检测 HO-1 蛋白的表达

2.8.1 小鼠肝组织中 HO-1 表达情况 3 组间 HO-1 蛋白表达量存在统计学差异（F=113.286，P=0.000）NS 正常组与DMSO 溶剂对照组小鼠肝组织中 HO-1 蛋白表达量较少，无统计学差异（P=0.867），RFP（200 mg/kg）连续灌胃 15 d 后小鼠肝组织中 HO-1 蛋白的表达较 NS 对照组（P=0.000）和 DMSO 溶剂对照组（P=0.000）明显升高（图 2，表 7）。

表 4 RFP 对 HepG2 细胞增殖抑制效应（$\bar{x}\pm s$，n=5）

Tab.4 Inhibitory effects of HepG2 cells treated by RFP（$\bar{x}\pm s$，n=5）

组别	24 h		48 h		72 h	
	A值	增殖抑制率（%）	A值	增殖抑制率（%）	A值	增殖抑制率（%）
细胞对照组	0.505±0.016	–	0.715±0.008	–	1.137±0.021	–
DMSO 溶剂对照组	0.495±0.007	4.63	0.704±0.021	2.6	1.121±0.017	1.85
10 μmol/L RFP 组	0.493±0.004	5.95	0.689±0.025	6.23	1.055±0.012	9.84
50 μmol/L RFP 组	0.484±0.019	9.95	0.666±0.008	11.69	0.946±0.046	22.84
100 μmol/L RFP 组	0.479±0.004	12.44	0.613±0.020	24.22	0.712±0.040	50.93

表 5 RFP 对 HepG2 细胞 AST、ALT 活性的影响（$\bar{x}\pm s$，n=5）

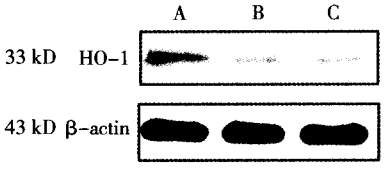
Tab.5 Effects of rifampicin on HepG2 cells AST and ALT levels（$\bar{x}\pm s$，n=5）

组别	24 h		48 h		72 h	
	AST（U/L）	ALT（U/L）	AST（U/L）	ALT（U/L）	AST（U/L）值	ALT（U/L）
细胞对照组	6.86±0.61	5.98±0.29	6.27±0.32	5.44±0.53	7.02±0.48	5.75±0.77
DMSO 溶剂对照组	6.97±0.53	5.79±0.72	7.35±1.92	5.54±0.71	6.30±0.24	5.95±0.39
10 μmol/L RFP 组	9.81±0.55	11.28±1.03	12.14±0.61	19.80±0.76	25.47±0.43	40.39±3.98
50 μmol/L RFP 组	13.97±0.54	16.73±0.71	24.56±0.56	37.97±3.45	40.32±0.06	77.13±5.05
100 μmol/L RFP 组	23.62±0.71	27.40±0.57	50.46±3.04	81.54±6.18	88.17±2.22	86.91±8.33

表 6 RFP 对 HepG2 细胞 GSH-Px、SOD、MDA 水平的影响（$\bar{x}\pm s$，n=5）

Tab.6 Effects of rifampicin on HepG2 cells GSH-Px,SOD,MDA levels（$\bar{x}\pm s$，n=5）

组别	24 h			48 h			72 h		
	GSH-Px (U/mg pro)	SOD (U/mg pro)	MDA (μmol/mg pro)	GSH-Px (U/mg pro)	SOD (U/mg pro)	MDA (μmol/mg pro)	GSH-Px (U/mg pro)	SOD (U/mg pro)	MDA (μmol/mg pro)
细胞对照组	9.20±0.11	14.77±1.20	8.48±0.42	9.21±0.17	15.25±0.49	8.46±0.34	9.20±0.18	15.37±0.99	8.28±0.48
DMSO 溶剂对照组	9.00±0.20	14.19±1.06	8.31±0.23	8.94±0.20	14.99±0.59	8.39±0.38	9.21±0.17	14.89±1.48	8.67±0.34
10 μmol/L RFP 组	7.42±0.28	14.84±1.29	8.35±0.36	6.34±0.11	13.57±0.80	12.69±0.65	3.43±0.47	8.72±0.58	20.45±0.83
50 μmol/L RFP 组	4.64±0.29	7.90±0.93	8.70±0.40	4.32±0.36	5.14±0.45	14.32±0.64	3.18±0.25	5.52±0.71	27.02±1.30
100 μmol/L RFP 组	3.59±0.50	6.95±0.97	9.07±0.13	3.16±0.45	4.38±0.51	20.74±0.89	1.48±0.29	3.83±0.72	33.32±1.38



A：RFP 模型组；B：DMSO 溶剂对照组；C：NS 对照组

图 2 肝脏 HO-1 表达

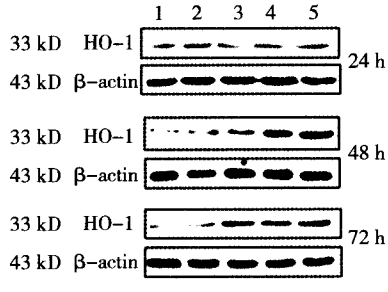
Fig.2 Expression of HO-1 in liver

表 7 HO-1 在各组中的相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.7 Relative expression of HO-1（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	HO-1/β-actin
NS 对照组	0.01±0.00
DMSO 溶剂对照组	0.01±0.00
RFP 模型组	0.26±0.04
F 值	113.286
P 值	0.000

2.8.2 处理后 HepG2 细胞蛋白中 HO-1 表达情况 RFP 不同浓度处理 HepG2 细胞后提取细胞总蛋白，免疫印迹法检测 HO-1 蛋白在 HepG2 细胞中的表达情况。结果表明各个时间点间细胞中 HO-1 蛋白含量（F=186.135，P=0.000）差异有统计学意义；时间和剂量有交互作用（F=44.537，P=0.000），说明随 RFP 浓度的增加和作用时间的延长，其对 HepG2 细胞的氧化损伤程度逐渐增加，呈时间-剂量效应；不同分组间方差分析显示，实验组与对照组间细胞中 HO-1 蛋白含量（F=171.999，P=0.000）差异有统计学差异（图 3，表 8）。



1：细胞对照组；2：DMSO 溶剂对照组；3：10 μmol/LRFP 组；4：50 μmol/LRFP 组；5：100 μmol/LRFP 组

图 3 HepG2 细胞中 HO-1 表达

Fig.3 Expression of HO-1 in HepG2 Cells

表 8 HO-1 在各组中的相对表达量（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.8 Relative expression of HO-1（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	24 h	48 h	72 h
细胞对照组	0.16±0.03	0.14±0.01	0.14±0.01
DMSO 溶剂对照组	0.15±0.01	0.17±0.01	0.14±0.02
10 μmol/L RFP 组	0.15±0.01	0.34±0.02	0.72±0.11
50 μmol/L RFP 组	0.15±0.05	0.70±0.09	0.75±0.07
100 μmol/L RFP 组	0.24±0.04	0.87±0.11	0.78±0.04

3 讨 论

目前，抗结核药物诱导的肝细胞氧化应激损伤主要关注于异烟肼，它的代谢产物诱导大量活性氧的产生，导致脂质过氧化，损伤细胞膜，引起肝细胞死亡[7]。然而，RFP 是否也具有类似效应，尚需研究予以证实。

本实验通过对小鼠连续 15 d 灌胃给 RFP（200 mg/kg）[8-9]，然后取材进行一系列分析，观察 RFP 引起的小鼠肝脏损伤及相关氧化应激指标的变化。结果显示，RFP 模型组小鼠 ALT、AST 较对照组明显升高，同时病理结果提示 RFP 模型组小鼠肝小叶结构被破坏，肝细胞呈水样变，证实长时间高剂量服用 RFP 可引起肝损伤。

机体具有完备的抗氧化应激损伤防御系统，GSH-Px 和 SOD 是其中非常重要的 2 个酶分子。GSH-Px 是一种重要的过氧化物分解酶，广泛存在于机体细胞内，它能将有毒的过氧化物转化为无毒的羟基化合物，从而保护细胞膜的结构及功能免受过氧化物的攻击。SOD 广泛分布于各种生物体内，也是重要的抗氧化酶，具有较强的自由基清除能力。本研究发现，体内和体外实验结果均表明模型组的 GSH-Px 和 SOD 较对照组明显降低，其中体外实验结果显示 GSH-Px、SOD 值与 RFP 作用时间和剂量呈负相关，说明浓度越高，作用时间越长其抗氧化

损伤效应越弱。与之相反，作为膜脂质过氧化最重要产物之一的 MDA，体内实验中模型组数值明显高于对照组；细胞实验结果也提示 MDA 值与药物作用时间和剂量呈正相关，说明在 RFP 作用下，机体和细胞产生大量活性氧，产生了脂质过氧化反应，导致了细胞的损伤。由此，本研究结果从细胞和动物两个水平，氧化应激损伤增强和防御机制削弱两个方面证实 RFP 可诱导肝细胞的氧化应激损伤。

血红素加氧酶（heme oxygenase，HO）是血红素降解的限速酶，它能代谢血红素为胆绿素、一氧化碳、游离的二价铁离子，胆绿素还原则生成胆红素[10]。HO 有 3 种同工酶，即 HO-1、HO-2、HO-3。HO-1 为诱导产生，是一种最广泛存在的抗氧化防御酶。当细胞和组织处于应激状态时（如氧化应激、热应激、重金属、内毒素等），HO-1 可作为保护性蛋白被诱导，以防御各种损伤因子对机体细胞的伤害[11-13]。HO-1 的抗氧化损伤效应主要与其代谢产物一氧化碳、游离的二价铁离子诱导的铁蛋白和胆红素密切相关。胆红素，曾被认为是有毒性的代谢产物。现在，大量研究表明，血中胆红素适度升高可降低多种疾病的死亡率，如呼吸系统疾病、肾脏疾病、心血管疾病、糖尿病、代谢综合征等[14-16]。这种多器官的保护作用在于胆红素具有强的抗氧化、抗炎、补体抑制以及降脂等功能[17-20]。本实验 Western blot 结果提示，在体内实验中，RFP 模型组小鼠肝组织中 HO-1 蛋白较对照组明显增高；体外实验，RFP 对 HepG2 细胞作用 48 h 和 72 h 后，HO-1 蛋白表达亦高于 NS 对照组和溶剂对照组。同时，通过检查血中胆红素，发现模型组胆红素含量明显上升。这说明 RFP 引起肝细胞的氧化应激损伤后，可诱导 HO-1表达增高。HO-1 大量表达后，可催化血红素生成胆红素，使血浆中胆红素浓度上升，从而提高机体的抗氧化能力。

综上所述，RFP 可诱导氧化应激致肝损伤，而调控胆红素代谢的限速酶 HO-1 在其中扮演着重要的角色，但其详细机制尚需进一步探讨。

参 考 文 献

[1] Agal S, Baijal R, Pramanik S, et al. Monitoring and management of antituberculosis drug induced hepatotoxicity[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2005, 20(11): 1745-1752.

[2] Shang P, Xia Y, Liu F, et al. Incidence, clinical features and impact on anti-tuberculosis treatment of anti-tuberculosis drug induced liver injury(ATLI) in China[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21836.

[3] Steele MA, Burk RF, DesPrez RM. Toxic hepatitis with isoniazid and rifampin. A meta-analysis[J]. Chest, 1991, 99(2): 465-471.

[4] Chowdhury A, Santra A, Bhattacharjee K, et al. Mitochondrial oxidative stress and permeability transition in isoniazid and rifampicin induced liver injury in mice[J]. J Hepatol, 2006, 45(1): 117-126.

[5] 朱子夫，马 莉. HO-1 抗氧化损伤的研究进展[J]. 医学综述，2010, 8(16): 2266-2270.

[6] Lyoumi S, Lefebvre T, Karim Z, et al. PXR-ALAS1: a key regulatory pathway in liver toxicity induced by isoniazid-rifampicin antituberculosis treatment[J]. Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 2013, 37(5): 439-441.

[7] Lian Y, Zhao J, Xu P, et al. Protective effects of metallothionein on isoniazid and rifampicin induced hepatotoxicity in mice[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72058.

[8] Chen X, Zhang C, Wang H, et al. Altered integrity and decreased expression of hepatocyte tight junctions in rifampicin-induced cholestasis in mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 240(1): 26-36.

[9] 黄家惠，陈 熙，张 程，等. 利福平诱导小鼠脂肪肝实验模型的研究[J]. 安徽医科大学学报，2015, 50(7): 937-941.

[10] Kikuchi G, Yoshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and heme degradation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 338(1): 558-567.

[11] Pae HO, Son Y, Kim NH, et al. Role of heme oxygenase in preserving vascular bioactive NO[J]. Nitric Oxide, 2010, 23(4): 251-257.

[12] Pae HO, Kim EC, Chung HT. Integrative survival response evoked by heme oxygenase-1 and heme metabolites[J]. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition, 2008, 42(3): 197-203.

[13] Meng D, Wang X, Chang Q, et al. Arsenic promotes angiogenesis in vitro via a hemoxygenase-1-dependent mechanism[J]. Toxicol Appl Pharamacol, 2010, 244(3): 291-299.

[14] Horsfall LJ, Rait G, Walters K, et al. Serum bilirubin and risk of respiratory disease and death[J]. JAMA, 2011, 305(7): 691 - 697.

[15] Huang SS, Huang PH, Wu TC, et al. Association of serum bilirubin with contrast-induced nephropathy and future cardiovascular events in patients undergoing coronary intervention[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42594.

[16] Libor V. The role of bilirubin in diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases[J]. Frontiers in Pharmacology, 2012(3): 55.

[17] Vitek L, Jirsa M, Brodanova M, et al. Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels[J]. Atherosclerosis, 2002, 160(2): 449-456.

[18] Jameel NM, Frey BM, Frey FJ, et al. Inhibition of secretory phospholipase A2 enzyme by bilirubin: a new role as endogenous anti-inflammatory molecule[J]. Mol Cell Biochem, 2005, 276(1-2): 219-225.

[19] Basiglio CL, Arriaga SM, Pelusa F, et al. Complement activation and disease: protective effects of hyperbilirubinaemia[J]. Clin Sci, 2010, 118(2): 99-113.

[20] Bulmer AC, Verkade HJ, Wagner KH. Bilirubin and beyond: a review of lipid status in Gilbert's syndrome and its relevance to cardiovascular disease protection[J]. Prog Lipid Res, 2012, 52(2): 193-205.

（责任编辑：冉明会）