

## ◇论著◇

钙拮抗剂对小鼠迟发型变态反应性肝损伤的影响<sup>\*</sup>

曹劲松 陆朝华 徐 强

(中国药科大学中药药理学教研室, 南京 210009)

中国图书分类号 R 392.3; R 575.1; R 593.1; R 975.5

文献标识码 A 文章编号 1001-1978(1999)02-0124-04

**摘要** 目的 研究 2,4,6-三硝基氯苯(picryl chloride, PCI)致迟发型变态(DTH)反应 PCI-DTH 诱导肝损伤过程中  $\text{Ca}^{2+}$  的参与机制及钙拮抗剂的影响。方法 将 PCI 导致的 DTH 反应导入肝脏诱发肝损伤, 原子吸收分光光度法测定损伤后不同时间肝组织  $\text{Ca}^{2+}$  含量, 攻击前 1 h 及后 8 h 2 次口服给予  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  钙拮抗剂硝苯吡啶或维拉帕米, 观察血清谷丙转氨酶(ALT)水平及肝组织  $\text{Ca}^{2+}$  含量与对照组的差异。结果 PCI 肝穿刺攻击后 6 h 肝组织  $\text{Ca}^{2+}$  含量开始上升, 18 h 达峰值, 36 h 恢复正常; 钙拮抗剂在保护肝损伤的同时降低了血清 ALT 水平, 且两者呈线性相关。结论  $\text{Ca}^{2+}$  参与了该肝损伤过程, 钙拮抗剂的降钙作用与其对该肝损伤的保护作用相关。

**关键词** 2,4,6-三硝基氯苯; 迟发型变态反应; 肝损伤; 钙; 钙拮抗剂; 硝苯吡啶; 维拉帕米

许多研究表明, 细胞钙稳态与细胞损伤或死亡之间有密切关系, 比如在  $\text{CCl}_4$ 、氯仿、醋氨酚等引起的肝组织损伤、肝细胞坏死的过程中, 肝小叶中央坏死范围与肝组织  $\text{Ca}^{2+}$  含量有关, 钙拮抗剂维拉帕米、硝苯吡啶和氯丙嗪可使肝细胞  $\text{Ca}^{2+}$  含量降低, 肝小叶中央坏死范围减小<sup>[1]</sup>;  $\text{CCl}_4$ 、半乳糖胺等引起的体外培养肝细胞死亡依赖于培养液中的  $\text{Ca}^{2+}$  浓度<sup>[2]</sup>; 醋氨酚引起的早期肝细胞凋亡也与核内钙积聚有关<sup>[3]</sup>; 因此有人认为细胞内钙超载可能是细胞死亡的最后通路<sup>[4]</sup>。

为模拟临床肝炎发病的细胞免疫病理机制, 我们的前期研究建立了由典型的细胞免疫反应——迟发型变态反应所导致的肝损伤动物模型<sup>[5~10]</sup>, 并已经证明肝损伤局部浸润的非实质细胞通过其表面表达的淋巴细胞功能相关抗原 1(LFA-1) 与肝细胞表

面表达的细胞间粘附分子 1(ICAM-1) 的相互作用而杀伤肝细胞<sup>[9]</sup>。联系到  $\text{Ca}^{2+}$  在肝细胞损伤过程中的重要意义, 为进一步探讨引起本模型肝组织或细胞损伤的机制, 特别是  $\text{Ca}^{2+}$  的参与机制, 我们进行了以下实验。

## 1 材料和方法

**1.1 动物** ICR 小鼠, ♀♂各半, 体重 18~22 g, 由中国药科大学实验动物中心提供, 正常饲料, 自由饮水, 饲于  $(21 \pm 2)^\circ\text{C}$  恒温环境。

**1.2 药品与试剂** 2,4,6-三硝基氯苯(picryl chloride, PCI), 东京化成工业株式会社, 批号: FID01; 盐酸维拉帕米(verapamil hydrochloride), 上海黄河利亚制药有限公司, 批号: 960101; 硝苯地平(nifedipine), 南京第二制药厂, 批号: 960702;  $\text{Ca}^{2+}$  标准品, Aldrich; ALT 测定试剂盒, 中外合资南京普医试剂公司, 批号: 960912。

## 1.3 实验方法

**1.3.1 PCI-DTH 致肝损伤模型的制备** 取小鼠, 刮去腹部毛, 以  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PCI 乙醇溶液  $100 \mu\text{l}$  涂腹致敏, d 5 同样 2 次致敏, d 10 以  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  PCI 橄榄油溶液肝穿刺攻击, 攻击前(0 h)或攻击后不同时间处死小鼠, 分离血清测 ALT 水平, 摘取肝组织供测  $\text{Ca}^{2+}$  含量。

**1.3.2 给药及剂量** 给药组小鼠于攻击前 1 h 及后 8 h 2 次灌胃给予  $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  硝苯吡啶或维拉帕米, 2 种药物均以蒸馏水为溶媒, 超声振荡溶解制成混悬液, 对照组灌胃等量蒸馏水。

**1.3.3 肝组织  $\text{Ca}^{2+}$  含量测定** 取一定量的肝组织, 按 1:4 (W/V) 比例加入三蒸水, 以玻璃匀浆器匀浆, 按 1:1 (V/V) 的比例加入浓盐酸, 于  $130^\circ\text{C}$  加盖水解 3 h, 再脱盖水解 1.5 h, 水解液用少许活性炭脱色过滤, 三蒸水定容, 然后用  $1.5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的氧化镧稀释, 用岛津 AA-670 原子吸收分光光度计测定待测样品中  $\text{Ca}^{2+}$  的浓度。

**1.3.4 ALT 测定** 以赖氏法按试剂盒说明书进行。

**1.4 统计处理** 全部实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间用 Student's *t* 检验表示两组间差异, 相关系数检验

1998-07-24 收稿

<sup>\*</sup> 国家教育部跨世纪优秀人才培养计划基金资助项目、江苏省青蓝工程跨世纪学术带头人基金资助项目

作者简介: 曹劲松, 男, 27 岁, 博士生;

徐 强, 男, 39 岁, 教授, 博士生导师

也采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 PCI-DTH 致肝损伤血清 ALT 及肝组织 $Ca^{2+}$ 含量的时程变化

按上述 1.3.1 项下制作 PCI-DTH 肝损伤模型, 分别于肝穿刺攻击前(0 h) 或攻击后 6、12、18、24、36 h 取血清测定 ALT 水平, 取肝脏测定肝组织  $Ca^{2+}$  含量。结果见图 1。PCI 肝穿刺攻击后, 肝组织  $Ca^{2+}$  含量 6 h 开始上升, 18 h 达峰值, 24 h 后下降, 36 h 基本恢复至正常水平。同时, 血清 ALT 水平也显示了同样的变化趋势, 但其上升在时间上略滞后于肝组织  $Ca^{2+}$  含量的升高。

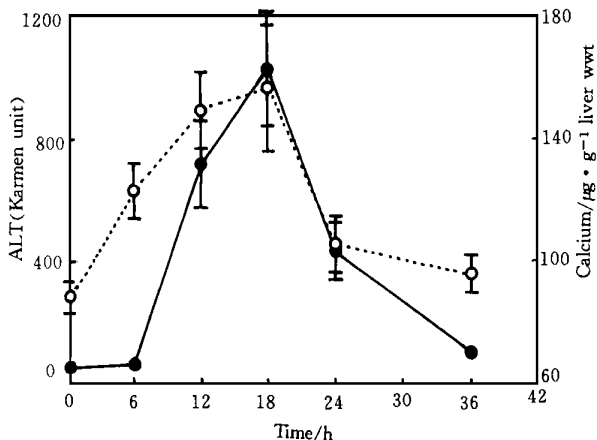


Fig 1 Time course of serum ALT activities and liver  $Ca^{2+}$  levels in PCL-DTH liver injury mice  
● —: ALT; —○—: Calcium

2.2 钙拮抗剂硝苯吡啶、维拉帕米对肝损伤小鼠血清 ALT 及肝组织  $Ca^{2+}$  含量的影响 给药及剂量见 1.3.2 项下。诱发肝损伤后 18 h, 断头放血处死各组动物, 分别测定血清 ALT 及肝组织  $Ca^{2+}$  含量, 结果见图 2。对照组小鼠血清 ALT 水平及肝组织

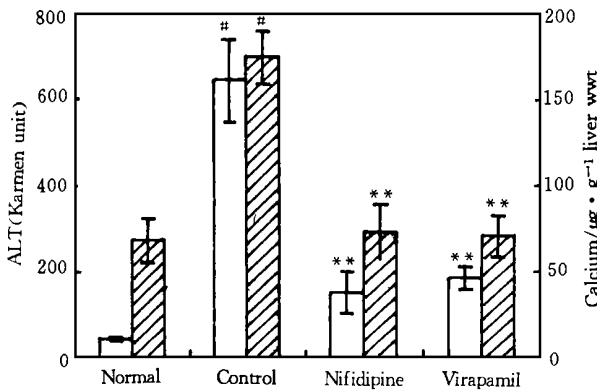


Fig 2 The effects of nifedipine and verapamil on serum ALT and liver  $Ca^{2+}$  levels in PCL-DTH liver injury mice  
□: ALT; ■: Calcium; #*P* < 0.01 vs normal; \*\**P* < 0.01 vs control

$Ca^{2+}$  含量较正常组升高, 与对照组相比, 硝苯吡啶及维拉帕米均降低了血清 ALT 水平及肝组织  $Ca^{2+}$  含量(*P* < 0.01)。

2.3 小鼠诱发肝损伤 18 h 后, 血清 ALT 与肝组织  $Ca^{2+}$  含量的相关分析 将对照组及钙拮抗剂治疗组中每只动物的血清 ALT 水平与肝组织  $Ca^{2+}$  含量进行相关分析, 结果如图 3 所示, 小鼠诱发肝损伤 18 h 后, 血清 ALT 水平与肝组织  $Ca^{2+}$  含量呈直线相关关系(*r* = 0.872, *n* = 24, *P* < 0.01)。

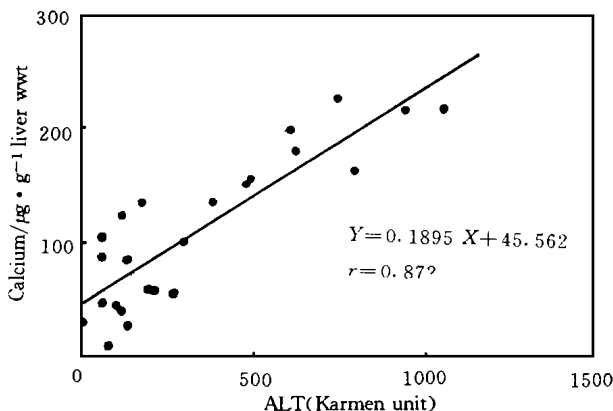


Fig 3 The linear correlation analysis between serum ALT and liver levels in control and calcium blocking agents created mice 18 h after the elicitation of PCH-DTH liver injury(*n* = 24)

## 3 讨论

在正常生理状态下, 肝细胞外液  $Ca^{2+}$  浓度为  $1.3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 细胞内液为  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 维持这种肝细胞内外约  $1 \times 10^5$  倍浓度梯度即钙稳态对细胞的生存极为重要<sup>[11]</sup>, 且主要依赖胞质膜 ATP 依赖性钙泵及胞内内质网与线粒体钙库摄取和释放钙来实现。一旦钙稳态失调,  $Ca^{2+}$  能激活膜关联的磷脂酶, 使膜磷脂变性, 引起膜损伤, 或激活  $Ca^{2+}$ -ATP 酶, 导致能量储备耗竭, 引起肝细胞损伤等。

在本研究中, PCI 肝穿刺攻击后, 肝组织  $Ca^{2+}$  含量升高, 肝细胞损伤(血清 ALT 上升), 给予钙拮抗剂治疗则对该肝损伤具有保护作用, 同时也降低了肝组织  $Ca^{2+}$  含量的上升。

关于肝组织  $Ca^{2+}$  含量升高与肝细胞损伤的关系, 有两种可能的机制。一种是  $Ca^{2+}$  含量的上升是细胞损伤的原因之一, 也就是说, PCI 肝穿刺后, 肝脏局部发生的细胞免疫反应, 其效应细胞或释放的细胞因子可破坏肝细胞的钙稳态, 导致肝细胞内  $Ca^{2+}$  含量上升, 从而引起膜损伤, 胞质酶外泄; 另一种是这些效应细胞或细胞因子是引起肝组织损伤的初始原因, 其后果是细胞膜受损,  $Ca^{2+}$  大量进入细胞内, 肝组织  $Ca^{2+}$  含量上升。从肝组织  $Ca^{2+}$  含量

上升及肝细胞损伤的时程关系来看,肝组织内  $Ca^{2+}$  积聚早于细胞损伤,从钙拮抗剂治疗效果来看,早期给予钙拮抗剂起到了较好的保护作用,这两点都比较支持第一种机制。另一方面,细胞膜一旦受损,胞外高浓度的  $Ca^{2+}$  就会顺着巨大的电化学梯度进入胞内,从而加重肝损伤或使损伤不可逆,这可能就是图 3 所示的肝损伤与  $Ca^{2+}$  含量显著线性相关的原因。

尽管钙拮抗剂保护肝损伤的详细机制尚不清楚了,但本研究发现的这种保护作用为  $Ca^{2+}$  参与 PCI-DTH 肝损伤提供了佐证,由图 2 及图 3 可推测,钙拮抗剂阻滞了早期  $Ca^{2+}$  的内流,减轻了肝细胞的  $Ca^{2+}$  积聚,减轻了膜损伤,降低了血清 ALT 水平。这种肝损伤与  $Ca^{2+}$  的关系十分相似于许多器官的缺血与再灌注损伤与  $Ca^{2+}$  的关系,心、脑、肝、肾等器官经一段时间缺血后恢复血液灌注会导致严重的不可逆性细胞损伤,缺血本身并不引起组织  $Ca^{2+}$  的升高,但随后的再灌注却伴随着大量的  $Ca^{2+}$  超载,导致细胞死亡<sup>[12]</sup>,钙拮抗剂可通过减少  $Ca^{2+}$  内流而减轻  $Ca^{2+}$  积聚及相关的细胞损伤<sup>[12,13]</sup>。目前我们正在对其保护肝损伤的详细机制作进一步的研究。

参考文献

- 1 Landon EJ, Naukam RJ, Rama-Sastry BV. Effects of calcium channel blocking agents on calcium and centrilobular necrosis in the liver of rats treated with hepatotoxic agents. *Biochem Pharmacol*, 1986; 35(4): 697 ~ 705
- 2 Schanne FA. Galactosamine-induced cell death in primary cultures of rat hepatocytes. *Am J Pathol*, 1980; 100(1): 25 ~ 36
- 3 Wei Shen, Kamendulis LM, Bay SD *et al.* Acetaminophen-in-

duced cytotoxicity in mouse hepatocytes; correlation of nuclear  $Ca^{2+}$  accumulation and early DNA fragmentation with cell death. *Toxicology and Applied pharmacology*, 1991; 111: 242 ~ 54

- 4 Schanne FA, Agnes BK, Young EE *et al.* Calcium dependence of toxic death: a final common pathway. *Science*, 1979; 206: 700 ~ 3
- 5 Xu Q, Wang R, Jiang J *et al.* Liver injury model in mice induced by a cellular immunologic mechanism-induced liver injury to picryl chloride and phenotype of effector cell. *Cell Immunol*, 1996; 167: 38 ~ 43
- 6 Xu Q, Wu FH, Zhang BL *et al.* One shot delayed-type hypersensitivity reaction in the mouse liver causes a sustained liver injury to picryl chloride. *Life Sci*, 1997; 60: 2417 ~ 25
- 7 Xu Q, Lu JF, Wang R *et al.* Liver injury model induced in mice by a cellular immunologic mechanism—study for use in immunopharmacological evaluations. *Pharmacol Res*, 1997; 35: 273 ~ 8
- 8 Xu Q, Yuan KW, Lu JF *et al.* A new strategy for regulating the immunological liver injury—effectiveness of DTH-inhibiting agents on DTH-induced liver injury to picryl chloride. *Pharmacol Res*, 1997; 36: 401 ~ 9
- 9 Xu Q, Jiang JY, Cao JS *et al.* LFA-1/ICAM-1 interaction is essentially involved in the pathogenesis of delayed-type hypersensitivity induced liver injury to picryl chloride. *Life Sci*, 1998; 62: 1281 ~ 92
- 10 Xu Q, Wu FH, Jiang JY *et al.* Role of  $CD_4^+$  and  $CD_8^+$  T cells in regulating the chronic development of liver injury induced by delayed-type hypersensitivity to picryl chloride. *Int Archs Allergy Immun*, 1998; 116: 154 ~ 61
- 11 Thomas CE, Reed DJ. Current status of calcium in hepatocellular injury. *Hepatology*, 1989; 10(3): 375 ~ 84
- 12 Nayler WG, Ferrari R, Williams A. Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium. *Am J Cardiol*, 1980; 46(2): 242 ~ 8
- 13 Clark RE, Christlieb IY, Henry PD. Nifedipine: a myocardial protective agent. *Am J Cardiol*, 1979; 44(5): 825 ~ 31

## Effect of calcium channel blocking agents on the PCI-DTH liver injury induced by delayed-type hypersensitivity in mice

CAO Jin-Song, LU Zhao-Hua, XU Qiang

(Dept of Pharmacology for Chinese Materia Medica, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009)

**ABSTRACT** **AIM** To examine the roles of calcium and calcium channel blockers on the liver injury induced by delayed-type hypersensitivity to picryl chloride (PCI-DTH). **METHOD** The liver injury was induced by delayed-type hypersensitivity to picryl chloride (PCI). The calcium content in liver and ALT in serum were measured in a regular interval after the elicitation of liver injury. The calcium blocker

was administered 1 h prior to and 8 h after the elicitation. **RESULTS** Liver calcium content increased at 6 h after PCI injection, reached its peak at 18 h, and decreased to normal level at 36 h. Serum ALT activity showed a similar change but with an about 6 h delay. Both nifedipine and verapamil significantly inhibited the elevation of serum ALT activity in parallel with the decrease of calcium content in liver. A good

# 大鼠残余肾间质成肌纤维细胞激活与 L-精氨酸的肾脏致纤维化作用\*

刘必成 John Haylor<sup>1</sup> El Nahas AM

(南京铁道医学院附属医院肾脏科, 南京 210009)

中国图书分类号 R 341.7; R 692; R 977.4

文献标识码 A 文章编号 1001-1978(1999)02-0127-05

**摘要** 目的 研究 L-精氨酸(L-arg)对 5/6 肾大部切除大鼠(SNx)肾小管、间质 $\alpha$  SMA 表达的影响及其与细胞外基质合成、肾功能的关系。方法 实验分 4 组: sham; sham+L-arg; SNx; SNx+L-arg。大鼠于术后即由饮水中给予  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  L-arg。1 mon 后, 大鼠处死, 肾组织经免疫组化半定量分析肾小管间质 $\alpha$  SMA 以及 collagen III, collagen IV, fibronectin 的表达程度。用 Masson Trichrome 染色切片来判断肾小管、间质损害程度。结果 L-arg 明显增加 SNx 大鼠肾小管、间质 $\alpha$  SMA 及 collagen III, collagen IV, fibronectin 表达, $\alpha$  SAM 表达程度与上述细胞外基质成分之间呈显著的正相关( $P$  分别 $< 0.01$ )。更为重要的是 $\alpha$  SMA 表达程度尚与肌酐清除率呈负相关( $P < 0.01$ ), 而与肾小管、间质损害程度呈正相关( $P < 0.01$ )。结论 L-arg 可能激活 SNx 大鼠肾小管、间质成肌纤维细胞(MFB), 并促进肾脏纤维化。

**关键词** L-精氨酸; 成肌纤维细胞; 肾脏纤维化

各种慢性肾脏病变进展为终末期肾衰的实质是由于肾组织的纤维化(fibrosis)和硬化(scarring)。近年研究揭示, 小管间质性损害程度对肾功能的影响较肾小球损害更具有预后价值<sup>[1]</sup>。成肌纤维细胞(myofibroblast, MFB)是由肾脏固有细胞异化而

来的一种兼具平滑肌细胞和成纤维细胞特性的过渡性组织细胞, 它与组织炎症时肉芽肿形成、疤痕收缩有着密切关系<sup>[2]</sup>。近年在动物实验模型及临床慢性肾小球疾病患者肾活检组织中均已证实肾组织 MFB 标记性细胞骨架蛋白 $\alpha$  平滑肌肌动蛋白( $\alpha$  smooth muscle actin,  $\alpha$  SMA)表达程度是判断慢性进展性肾病预后的可靠指标<sup>[3]</sup>。由于 NO 的发现, 晚近人们对 L-精氨酸在慢性肾衰发生中的作用产生很大兴趣, 本文在国内外首先报道 L-精氨酸(L-arginine, L-arg)对 5/6 肾大部切除(Subtotal nephrectomy, SNx)大鼠肾间质 $\alpha$  SMA 表达的影响, 并分析其与肾间质细胞外基质成分(extracellular matrix components, ECM)中胶原(collagen III IV)纤维连结蛋白(fibronectin, Fn)表达以及肾功能的关系。

## 1 材料和方法

**1.1 实验动物及分组** 成年 $\hat{\sigma}$  Wistar 大鼠, 6~8 wk 龄, 体重 200~250 g (由 University of Sheffield 提供)。大鼠分笼饲养于  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 45% 湿度,  $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$  光照环境下, 自由饮水、进食(食物中含蛋白质 18.3%、L-arg 1.14%, Cambridge, UK)。实验共分 4 组, 每组 5 只: ①假手术(sham)组; ②SNx 组; ③Sham+L-arg 组; ④SNx+L-arg 组。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 肾大部切除手术采用一期法** 先切除右肾, 随后结扎左肾上下两极并切除之, 注意免伤两侧肾上腺。切除之肾组织称重。以右肾重量减去所切除的左肾组织重量来间接估算残余肾重量, 并算出切除率。本实验组肾脏平均切除率为 65%。假手术组只暴露双侧肾脏, 但不作手术切除。大鼠清醒后即经饮水给予  $10\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  L-arg(Sigma), 对照组给予自来水。实验持续 30 d 后处死大鼠, 取出肾脏称重, 并固定于  $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  Formalcalcium (pH 7.4)

1997-12-31 收稿, 1998-03-12 修回

\*本研究得到英国 Northern General Hospital 的课题资助, 作者同时感谢国际肾病协会对本研究工作的支持, 本文被 1998 年美国肾病年会录用

<sup>1</sup>Sheffield Kidney Institute, Northern General Hospital, University of Sheffield, Sheffield UK

作者简介: 刘必成, 男, 34 岁, 硕士, 副主任医师, 1995 及 1997 年度国际肾病学会研究员;

El Nahas AM, 英国谢菲尔德肾脏研究所教授, *Experimental Nephrology* 杂志副主编, *Kidney Int.*、*欧洲 Nephrol Dialy. Transplant* 等杂志编委

correlation was observed between the liver calcium contents and the serum ALT levels. **CONCLUSION**

Calcium may play a role in the pathogenesis of PCI-DTH liver injury. Calcium channel blockers may be

used for the regulation of the liver injury.

**KEY WORDS** picryl chloride (PCI); delayed-type hypersensitivity (DTH); liver injury; calcium; calcium channel blocker; nifedipine; velapamil