

北豆根致大鼠肝损伤血清酶生物标志物的早期变化及联合检测

乔靖怡^{1,2} 金若敏¹ 姚广涛¹ 陈华英¹ 徐婷婷¹

(1 上海中医药大学药物安全评价研究中心, 上海, 201203; 2 河南中医学院科研实验中心, 郑州, 450008)

摘要 目的:探讨总胆汁酸(TBA)、 α -谷胱甘肽S转移酶(α -GST)等血清酶生物标志物对北豆根致大鼠肝损伤早期诊断的应用价值。方法:Wistar大鼠随机分为对照组和北豆根低、高剂量组(22.5、45 g·kg⁻¹),每组18只。给药组每日灌胃给药1次,连续21 d,对照组灌服等体积蒸馏水。分别于给药7 d、14 d、21 d处理动物,每组6只,收集血清,采用全自动生化仪测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TB)以及TBA的水平,采用酶联免疫法(ELISA)测定血清 α -GST、嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、鸟氨酸氨基甲酰转移酶(OCT)和精氨酸酶I(Arg I)的水平;计算大鼠的肝脏指数及观察肝组织病理学变化;应用Logistic回归和ROC曲线评价上述指标对北豆根致大鼠肝损伤早期诊断的意义。结果:与同时点对照组相比,高剂量组给药14 d ALP升高($P < 0.05$),14 d、21 d ALT和肝脏指数升高($P < 0.05$),组内有2/6肝组织出现肝细胞点状坏死、小灶性肝细胞坏死和炎症细胞浸润;北豆根低剂量组肝脏指数于给药21 d升高($P < 0.01$)。北豆根高剂量组给药7 d、14 d、21 d血清 α -GST、PNP和Arg I升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),OCT 14 d、21 d升高($P < 0.01$),TBA 14 d升高($P < 0.05$)。动物血清中ALT、AST、 α -GST、PNP和Arg I各项的ROC曲线下面积(AUC)分别为0.787、0.483、0.957、0.948和0.934。其中ALT和AST联合检测的AUC为0.809, α -GST、Arg I及与PNP联合检测的AUC为1.000,均高于各指标单项检测的AUC。结论:血清 α -GST、PNP和Arg I可作为北豆根致肝损伤早期的生物标志物,且联合检测在北豆根致肝损伤早期有较高的诊断价值。

关键词 北豆根;肝损伤;血清酶生物标志物;联合检测

Early Change and Determination of Serum Enzyme Biomarkers in Rats with Liver Injury Induced by Rhizoma Menisperm

Qiao Jingyi^{1,2}, Jin Ruomin¹, Yao Guangtao¹, Chen Huaying¹, Xu Tingting¹

(1 Research Center for Drug Safety Evaluation, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2 Scientific Research Experiment Center, Henan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China)

Abstract Objective: To evaluate the application value of serum enzyme biomarkers of total bile acid (TBA), α -glutathione-S-transferase (α -GST) etc for the early diagnosis of liver injury induced by Rhizoma Menisperm (RM) in rats. **Methods:** Wistar rats were randomly divided into control group and RM low dose group (22.5 g·kg⁻¹) and high dose (45 g·kg⁻¹) group (n = 18). RM 22.5 and 45 g·kg⁻¹ groups were treated with RM decoction by intragastrical administration, while the control group was given distilled water of the same volume once a day for 21 consecutive days. Blood was collected respectively 7, 14, 21 days after RM administration. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin (TB) and TBA were measured by using automatic biochemical analyzer. The concentration of α -GST, purine nucleoside phosphorlyase (PNP), ornithine carbamyl transferase (OCT) and arginase I (Arg I) were detected with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Liver weight was measured and the pathological changes of liver tissue were observed. Logistic regression and ROC curve were applied to analyze the data of above indexes for evaluating the early diagnostic value of liver injury induced by RM. **Results:** Compared with that in the control group at the same time point, on day 14 the level of ALP was elevated ($P < 0.05$) and the level of ALT and liver weight index were increased ($P < 0.05$) and some spotty and focal necrosis, inflammatory cell infiltration in the liver tissue were demonstrated on day 14 and 21 in RM high dose group. The liver weight index was increased in RM low dose group ($P < 0.01$). The levels of α -GST, PNP and OCT were elevated on day 7, 14 and 21 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and OCT increased on day 14 and 21, TBA increased only on day 14 in RM high dose group. The areas under the ROC curve (AUC) for serum ALT, AST, α -GST, PNP and Arg I were 0.787, 0.483, 0.957, 0.948 and 0.934 respectively. The AUC of the combined examination of ALT and AST was 0.809. The AUC of the combined examination of α -GST, Arg I and the AUC of the combined examination of α -GST, Arg I and PNP

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(编号:2009CB522807);国家科技重大专项(编号:2011ZX09301-009)

作者简介:乔靖怡,女,博士,主要从事中药药理学及毒理学研究,E-mail:qiaojingyi618@126.com

通信作者:金若敏(1948—),女,研究员,博士生导师,主要从事中药新药研发及其安全性评价研究,Tel:(021)51322401,E-mail:rmj801@126.com

were the same of 1.000, higher than the AUC of single index examination. **Conclusion:** α -GST, PNP and Arg I may be used as the biomarkers at the early stage of hepatic injury induced by RM. The combined examination has a higher value for the early liver injury diagnosis.

Key Words Rhizoma Menisperm; Liver injury; Serum enzyme biomarkers; Combined examination

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.02.009

目前临床上常规检测肝功能指标主要有血清丙氨酸氨基转移酶(amine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)等,但已有报道认为上述指标在肝损伤临床检测中其灵敏性和组织特异性方面有一定的局限性^[1-2]。近年来国内外研究发现作为潜在的肝毒性生物标志物如总胆汁酸(total bile acid, TBA)、 α -谷胱甘肽 S 转移酶(α -glutathione-S-transferase, α -GST)、嘌呤核苷磷酸化酶(purine nucleoside phosphorylase, PNP)和精氨酸酶 I (arginase I, Arg I)等在肝组织中特异性高,肝损伤时其灵敏度高于传统指标 ALT 和 AST^[3-5]。因此,探寻中药肝毒性生物标志物,早期评价中药的肝脏毒性具有重要意义。中药北豆根为防己科植物蝙蝠葛 *Menispermum dauricum* DC. 的干燥根茎。有小毒。性味苦寒,具有清热解暑,祛风止痛的功效^[6]。北豆根在临床上应用广泛,但文献报道也可导致多种不良反应,主要是肠道反应,少数患者服药后可出现恶心、腹痛、腹泻及 ALT 升高^[7]。本研究对中药北豆根致大鼠肝损伤血清酶生物标志物变化特征与常规血液生化指标、肝组织病理学变化进行比较分析,应用 ROC 曲线的方法来评价酶学指标联合检测诊断肝损伤的价值,为北豆根临床安全用药、早期监测肝损伤提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 药物 北豆根(*Rhizoma Menisperm*, 以下简称 RM), 产地: 黑龙江, 批号 120608, 购于安徽亳州市永刚饮片厂有限公司。经上海中医药大学中药学院李西林副教授鉴定为防己科植物蝙蝠葛(*Menispermum dauricum* DC.) 的干燥根茎。采用高效液相色谱法对北豆根药材及其水煎液中的蝙蝠葛碱进行含量测定, 作为北豆根药材及其水煎液的质量控制。北豆根药材中蝙蝠葛碱含量为 0.39%, 北豆根水煎液中蝙蝠葛碱含量为 0.46 mg · mL⁻¹。药液的制备: 称取一定量北豆根药材, 加 5 倍量水浸泡 1h, 先武火煮沸, 再文火煮 0.5 h, 趁热过滤, 再加入 3 倍量水, 先武火煮沸, 再文火煮 0.5 h, 趁热过滤, 合并 2 次药液浓缩至 4.5 g(生药) · mL⁻¹, 4 °C 冷藏, 备用。

1.2 主要试剂与仪器 ALT 检测试剂盒, R1, 批号:

J133, R2, 批号: L129; AST 检测试剂盒, R1, 批号: L134, R2, 批号: L129; 碱性磷酸酶(ALP)检测试剂盒, R1, 批号: J128, R2, 批号: H128; 总胆红素(TB)检测试剂盒, R1, 批号: DK326, R2, 批号: DK327; 均由日本世诺临床诊断制品株式会社生产。TBA 检测试剂盒, 批号: 120614; 由烟台澳斯邦生物工程有限公司生产。 α -GST、嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)、鸟氨酸氨基甲酰转移酶(OCT)和 Arg I 酶联免疫分析(ELISA)试剂盒, 批号: 201212; 均由 R&D system 生产, 购自基尔顿生物科技(上海)有限公司。日立 7080 全自动生化分析仪, 日本日和贸易有限公司; 2-16K 冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; 318-Microplate Reader 酶标仪, 上海三科仪器有限公司。

1.3 动物 Wistar 大鼠, 雌雄各半, 54 只, 体重 100 ~ 120 g, 由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供, 许可证号: SCXK(沪)2007-0005。动物在上海中医药大学实验动物中心 SPF 级饲养室饲养。

1.4 实验方法 取大鼠 54 只随机分为 3 组, 每组 18 只, 雌雄各半, 分别为对照组、北豆根低剂量组和高剂量组(以下简称为 L-RM, H-RM)。给药组分别灌服 22.5 g/kg, 45 g/kg 北豆根水煎液, 对照组灌服等体积蒸馏水 10 mL/kg。每日 1 次, 连续给药 21 d。各组分别于 7 d、14 d、21 d 处理动物 6 只, 称量大鼠体重, 以 25 % 乌拉坦溶液 1 g/kg 麻醉动物, 腹主动脉取血, 4 °C 5000 r/min 离心 15 min, 取血清。观察指标及检测方法: 1) 血清生化指标检测, 采用全自动生化仪测定血清肝功能 ALT、AST、ALP 和 TB 的水平。2) 肝脏指数和组织病理学检查, 摘取肝脏, 称重并计算肝脏指数。另取肝左叶固定于中性福尔马林溶液中, HE 染色进行组织病理学检查。3) 血清酶生物标志物检测, 采用全自动生化仪测定血清总胆汁酸(TBA)的水平。采用 ELISA 测定血清中 α -GST、PNP、OCT 和 Arg I 的水平。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 试验数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较采用单因素方差法, 组间两两比较方差齐性时用 LSD 方法分析, 方差不齐时用 Dunnett's 方法分析。应用 Logistic 回归筛选变量并建立概率预测模型, 对生成

的预测变量及单项指标进行 ROC 曲线分析。

2 结果

2.1 北豆根对大鼠生化指标的影响 与同时时间点对照组相比,北豆根低剂量组各项生化指标无明显变化;高剂量组 ALT、ALP 于给药 14 d 起升高($P<0.05$),并呈现一定的时-量-效关系。见表 1。

表 1 北豆根对大鼠血清生化指标的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)

时间(d)	组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	TB ($\mu\text{mol/L}$)
7	对照	52.00 $\pm$ 10.55	150.00 $\pm$ 21.32	558.50 $\pm$ 185.04	0.53 $\pm$ 0.47
	L-RM	54.50 $\pm$ 9.73	145.33 $\pm$ 11.94	519.33 $\pm$ 262.36	0.51 $\pm$ 0.36
	H-RM	58.00 $\pm$ 8.97	147.50 $\pm$ 21.53	535.00 $\pm$ 228.49	0.36 $\pm$ 0.10
14	对照	56.00 $\pm$ 6.51	237.17 $\pm$ 27.66	487.83 $\pm$ 181.60	0.57 $\pm$ 0.10
	L-RM	55.67 $\pm$ 8.26	240.50 $\pm$ 44.58	672.17 $\pm$ 233.45	1.73 $\pm$ 0.80
	H-RM	67.50 $\pm$ 9.67 $\triangle$	251.83 $\pm$ 28.98	736.83 $\pm$ 167.94 $\ast$	0.85 $\pm$ 0.48
21	对照	54.67 $\pm$ 6.92	334.67 $\pm$ 51.72	460.17 $\pm$ 172.31	0.43 $\pm$ 0.31
	L-RM	49.50 $\pm$ 10.54	317.33 $\pm$ 50.35	612.83 $\pm$ 268.75	0.67 $\pm$ 0.25
	H-RM	65.83 $\pm$ 6.31 $\ast$	304.33 $\pm$ 77.12	677.50 $\pm$ 107.32	0.71 $\pm$ 0.28

注:与对照组比较, $\ast P<0.05$, $\ast\ast P<0.01$;与 L-RM 组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$ 。

2.2 北豆根对大鼠肝脏指数和组织病理学的影响 与同时时间点对照组相比,北豆根低剂量组肝脏指数于给药 21 d 升高($P<0.01$),高剂量组肝脏指数于给药 14 d 起升高($P<0.05$),并呈现一定的时-量-效关系,见表 2。光镜下观察,北豆根低剂量组动物的肝脏组织未见明显异常改变,高剂量组动物的肝脏组织在 21 d 有 2/6 的动物肝细胞出现点状坏死、小灶性肝细胞坏死和炎症细胞浸润,见图 1。

表 2 北豆根对大鼠肝脏指数的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)

时间(d)	组别	剂量(g/kg)	肝脏指数(g/100g 体重)
7	对照	-	3.49 $\pm$ 0.14
	L-RM	22.5	3.53 $\pm$ 0.10
	H-RM	45	3.56 $\pm$ 0.15
14	对照	-	3.15 $\pm$ 0.24
	L-RM	22.5	3.37 $\pm$ 0.13
	H-RM	45	3.42 $\pm$ 0.17 $\ast$
21	对照	-	2.95 $\pm$ 0.16
	L-RM	22.5	3.22 $\pm$ 0.13 $\ast\ast$
	H-RM	45	3.20 $\pm$ 0.14 $\ast$

注:与对照组比较, $\ast P<0.05$, $\ast\ast P<0.01$;与 L-RM 组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$ 。

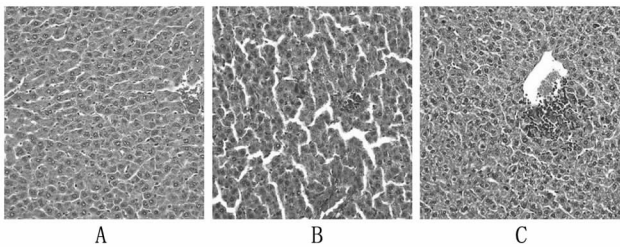


图 1 北豆根对大鼠肝脏组织病理学的影响(HE 染色 $\times 200$)
A:对照组,B:14 d 北豆根高剂量组,C:21 d 北豆根高剂量组

2.3 北豆根对大鼠血清酶生物标志物的影响 与同时时间点对照组相比,北豆根低剂量组 TBA、 α -GST、PNP、OCT 和 Arg I 无显著差异,高剂量组 α -GST、PNP 和 Arg I 于给药 7 d 起升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$),OCT 于给药 14 d 起升高($P<0.01$),TBA 于给药 14 d 升高($P<0.05$),呈现一定的时-量-效关系。见表 3。

表 3 北豆根对大鼠血清酶生物标志物的影响($\bar{x}\pm s,n=6$)

指标	组别	时间(d)		
		7	14	21
TBA ($\mu\text{mol/L}$)	对照	36.47 $\pm$ 14.37	33.48 $\pm$ 16.37	40.58 $\pm$ 30.83
	L-RM	47.42 $\pm$ 21.33	36.07 $\pm$ 13.27	46.33 $\pm$ 30.37
	H-RM	28.67 $\pm$ 19.12	72.92 $\pm$ 35.69 $\ast\ast$	78.62 $\pm$ 43.41
α -GST (mIU/L)	对照	1129.21 $\pm$ 202.72	1116.76 $\pm$ 151.88	1050.43 $\pm$ 214.82
	L-RM	1291.21 $\pm$ 184.39	1253.34 $\pm$ 172.41	1454.93 $\pm$ 253.25
	H-RM	1528.95 $\pm$ 140.01 $\ast\ast$	1430.15 $\pm$ 166.57 $\ast$	1556.47 $\pm$ 108.95 $\ast\ast$
PNP (U/L)	对照	74.25 $\pm$ 13.96	82.21 $\pm$ 10.51	74.46 $\pm$ 15.51
	L-RM	74.61 $\pm$ 20.47	96.27 $\pm$ 13.50	97.81 $\pm$ 17.31
	H-RM	96.04 $\pm$ 17.27 $\ast\triangle$	118.67 $\pm$ 13.31 $\ast\ast$	125.96 $\pm$ 15.59 $\ast\ast$
OCT (U/L)	对照	5.82 $\pm$ 0.98	5.12 $\pm$ 0.73	5.10 $\pm$ 0.91
	L-RM	6.61 $\pm$ 0.99	6.59 $\pm$ 1.19	6.41 $\pm$ 1.32
	H-RM	6.65 $\pm$ 0.98	7.68 $\pm$ 0.68 $\ast\ast$	8.50 $\pm$ 1.17 $\ast\ast\triangle\triangle$
ArgI (U/L)	对照	6.44 $\pm$ 0.79	8.33 $\pm$ 1.92	6.20 $\pm$ 1.06
	L-RM	7.18 $\pm$ 0.87	8.01 $\pm$ 1.13	7.84 $\pm$ 1.56
	H-RM	8.75 $\pm$ 0.78 $\ast\ast\triangle\triangle$	12.03 $\pm$ 0.50 $\ast\ast\triangle\triangle$	10.67 $\pm$ 1.26 $\ast\ast\triangle\triangle$

注:与对照组比较, $\ast P<0.05$, $\ast\ast P<0.01$;与 L-RM 组比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$ 。

2.4 血清 α -GST、PNP、Arg I 与 ALT 和 AST 单项检测 早于 ALT 和 AST 变化的酶学指标有 α -GST、PNP 和 Arg I,因此选取对照组及北豆根高剂量组动物血清 ALT、AST、 α -GST、PNP 和 Arg I 检测结果为检验变量,以组别为状态变量,定义对照组为组别 0,定义肝损伤剂量北豆根组为组别 1,作 ROC 曲线分析。各单项指标检测诊断肝损伤时,ALT 和 AST 的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.787 和 0.483; α -GST、PNP 和 Arg I 各项的 ROC 曲线下面积(AUC)分别为 0.957、0.948 和 0.934。其中以 α -GST、PNP 和 Arg I 的 ROC 曲线的 AUC 较高,与经典指标 ALT 和 AST 相比,具有较高的敏感性和特异性。见表 4。

表 4 血清 ALT、AST、 α -GST、PNP 和 Arg I 单项检测的 ROC 曲线分析

指标	AUC	敏感性	特异性
ALT	0.787	0.778	0.667
AST	0.483	0.667	0.389
α -GST	0.957	0.944	0.889
PNP	0.948	0.889	0.944
Arg I	0.934	1.000	0.722

2.5 相关性分析及联合检测 北豆根致大鼠肝损伤中 α -GST、PNP 和 Arg I 与 ALT 相关性显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$); α -GST、PNP 和 Arg I 之间两两相

关($P<0.01$)。见表 5。在单项检测 ROC 曲线分析的基础上,选取 AUC >0.9 的 3 项指标 α -GST、PNP 和 Arg I 的检测结果,经 Logistic 回归分析,得出肝损伤模型的概率预测模型,生成各检测样本的预测变量。以此方法,将 α -GST、PNP 和 Arg I 检测结果随机组合后进行 Logistic 回归分析,再将预测变量作 ROC 曲线分析。其中 α -GST 和 Arg I 以及 α -GST、PNP 和 Arg I 联合检测,经 Logistic 回归分析模型预测变量的 ROC 曲线的 AUC 均为 1.000,这在所有组合中 ROC 曲线的 AUC 最高,且高于经典指标 ALT 和 AST 组合(AUC 为 0.809)。由此表明指标 α -GST、PNP 和 Arg I 联合检测均优于各指标单项检测。见图 2、表 6。

表 5 北豆根致大鼠肝损伤中 ALT 和 AST 与血清酶生物标志物相关性分析

指标	评价指标	ALT	AST	α -GST	PNP	Arg I
ALT	Person	1	0.252	0.341 *	0.447 **	0.533 **
	显著性		0.138	0.042	0.006	0.001
AST	Person	0.252	1	0.017	0.195	0.048
	显著性	0.138		0.921	0.254	0.780
α -GST	Person	0.341 *	0.017	1	0.710 **	0.509 **
	显著性	0.042	0.921		0.000	0.002
PNP	Person	0.447 **	0.195	0.710 **	1	0.674 **
	显著性	0.006	0.254	0.000		0.000
Arg I	Person	0.533 **	0.048	0.509 **	0.674 **	1
	显著性	0.001	0.780	0.002	0.000	

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3 讨论

近年来,随着中药在临床的应用日益广泛,有关中药肝毒性的报道日益增多,据统计,占临床药物性肝损伤的 4.8% ~ 32.6%^[8],中药所致的肝损伤在社会和中医药界得到广泛关注。有时新药在临床前或临床研究阶段未发现肝毒性,而在新药上市后撤市。因此,为了提高临床前药物安全评价的效率,并为药物上市后监测提供早期临床安全评价指标,需要探索更加敏感早期的生物标志物来评价潜在的肝损伤以降低风险。

中药北豆根的临床应用广泛,除治咽喉肿痛外,还用于肠炎痢疾、风湿疼痛、扁桃体炎、慢性气管炎、高血压、心率失常等。本品一般用量为 3 ~ 6 g,不良反应多因长期或大剂量应用导致。课题组前期研究显示,北豆根中的成分蝙蝠葛碱 100 g · mL⁻¹能显著降低人正常肝细胞的活力,能显著升高肝细胞培养上清液中的 AST、ALP、LDH 含量,提示蝙蝠葛碱对肝细胞具有一定的毒性作用^[9]。由于北豆根在临床上以汤剂口服为主,故本实验采用连续灌胃北豆根水煎液给药方法。结果表明,多次给予大剂量北豆根水煎液可致大鼠肝损伤,表现为血清 ALT、ALP 明显升高、2/6 动物肝脏组织病理学有所改变,且具有一定的时-量-效关系。

有文献报道,大鼠在分别给予 α -萘异硫氰酸酯(ANIT)、溴化苯(BrB)和硫代乙酰胺(TAA)三种物质造成的明显的肝毒性模型中, α -GST 升高的程度要高于 ALT、AST^[10]。在半乳糖胺致大鼠肝毒性模型和内毒素所致大鼠肝毒性模型中,大鼠血清 PNP 的升高出现的时间均早于 ALT^[11-12]。OCT 在急性病毒性肝炎、肝性脑病时显著升高,与 ALT、AST、 γ -谷氨酰胺转移酶(γ -glutamyl transferase activity, GGT)呈正相关,在酒精性肝炎、药物性肝炎时轻度升高^[13]。此外,Arg I 是一种催化精氨酸生成鸟氨酸和尿素的水解酶,对氨起解毒作用。主要位于肝脏的胞浆内,参与肝脏的尿素循环。有报道在硫代乙酰胺诱导的急性和慢性肝损伤实验中,血清中 Arg I 升高的时间早于 ALT、AST 的变化,且升高的程度也大于 ALT、AST^[14]。

结合文献报道以及预实验结果,在北豆根致大鼠肝损伤实验中,首先,筛选肝损伤的早期敏感指标。结果显示,与对照组相比,北豆根高剂量组中血清 α -GST、PNP 和 Arg I 于给药 7 d 起就有明显升高,均早于传统生化指标 ALT、ALP 及肝脏指数和肝组织病理学的变化。血清 TBA、OCT 指标的变化与传统指标 ALT 的变化基本一致。因此,提示由北豆根致大鼠肝损伤血清酶指标 α -GST、PNP 和 Arg I 可作为肝损伤的早期敏感指标;随着给药时间延长,血液生化及肝组

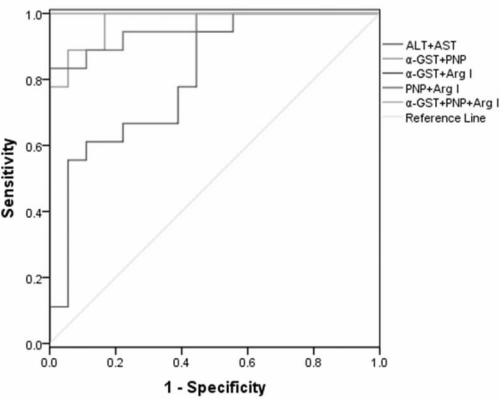


图 2 血清 α -GST、PNP 和 Arg I 联合检测及 ALT 和 AST 联合的 ROC 曲线

表 6 血清 α -GST、PNP 和 Arg I 联合检测及 ALT 和 AST 联合的 ROC 曲线分析

指标	AUC	敏感性	特异性
ALT + AST	0.809	0.556	0.944
α -GST + PNP	0.975	0.889	0.944
α -GST + Arg I	1.000	1.000	1.000
PNP + Arg I	0.957	0.833	1.000
α -GST + PNP + Arg I	1.000	1.000	1.000

织病理学的变化也反映了北豆根致大鼠肝损伤。血清 α -GST 与谷胱甘肽代谢相关,指标的升高与机体存在氧化损伤而调节氧化与抗氧化平衡有关,PNP 与嘌呤核苷酸代谢相关,指标的升高与肝窦内皮细胞膜发生破坏有关,Arg I 是肝脏合成尿素的重要酶类,这些单个血清酶的升高可提示肝脏的损伤。由于不同指标反映了肝不同受损部位或损伤途径,若联合检测几种酶学指标可以提高诊断的准确性。本实验采用 ROC 曲线综合评价酶学指标单项检测和联合检测对肝损伤早期诊断的价值。

ROC 曲线分析将敏感性和特异性结合,可以用于评价诊断试验的准确性^[15]。该方法在国内外临床医学中有广泛的应用,有关肝肾损伤的综合评价已有文献报道^[16-18]。单项检测的 ROC 曲线分析显示 α -GST、PNP 和 Arg I 的 AUC > 0.9 有更好的诊断价值,且早于传统指标 ALT 升高,将这 3 项酶学指标所得数据与传统指标 ALT 和 AST 进行相关性分析和 ROC 曲线联合检测,可明显提高其诊断肝损伤的敏感性和特异性。结果显示,通过 α -GST、PNP 和 Arg I 不同组合的联合检测比较,其中指标 α -GST 和 Arg I 2 项指标联合检测及与 PNP 联合检测效能等同,均极大地提高了诊断肝损伤的敏感性和特异性(ROC 曲线的 AUC 均为 1.000),且高于传统肝功能指标 ALT 和 AST 联合检测效能(AUC 为 0.809)。综合分析,提示血清 α -GST、PNP 和 Arg I 联合检测可在临床上更加早期敏感地监测北豆根引起的肝毒性。

参考文献

- [1] Kumar M, Sarin SK, Hissar S, et al. Virologic and histologic features of chronic hepatitis B virus - infected asymptomatic patients with persistently normal ALT[J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(5): 1376 - 1384.
- [2] Nathwani RA, Pais S, Reynolds TB, et al. Serum alanine aminotransferase in skeletal muscle diseases[J]. *Hepatology*, 2005, 41(2): 380 - 382.
- [3] Shimada T, Nakanishi T, Toyama A, et al. Potential implications for monitoring serum bile acid profiles in circulation with serum proteome for carbon tetrachloride - induced liver injury / regeneration model in mice[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(9): 4490 - 4500.
- [4] Ozer J, Ratner M, Shaw M, et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity[J]. *Toxicology*, 2008, 245(3): 194 - 205.
- [5] 耿兴超, 沈连忠, 李波, 等. 肝毒性生物标志物研究进展[J]. *中国药理学杂志*, 2011, 46(10): 721 - 725.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2010 年版一部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 65 - 66.
- [7] 童晓东. 山豆根与北豆根的药用比较[J]. *国医论坛*, 2002, 17(6): 41 - 42.
- [8] 刘平, 袁继丽, 倪力强, 等. 重视中药的肝损伤问题[J]. *中国新药与临床杂志*, 2007, 26(5): 388 - 392.
- [9] 周倩, 金若敏, 姚广涛, 等. 蝙蝠葛碱体外肝肾细胞毒性的初步研究[J]. *中国药物警戒*, 2012, (10): 580 - 583.
- [10] Giffen PS, Pick CR, Price MA, et al. Alpha - glutathione S - transferase in the assessment of hepatotoxicity——its diagnostic utility in comparison with other recognized markers in the Wistar Han rat[J]. *Toxicol Pathol*, 2002, 30(3): 365 - 72.
- [11] Ohuchi T, Tada K, Akamitsu K. Endogenous ET - 1 contributes to liver injury induced by galactosamine and endotoxin in isolated perfused rat liver[J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(6 Pt 1): G997 - 1003.
- [12] Mochida S, Arai M, Ohno A, et al. Deranged blood coagulation equilibrium as a factor of massive liver necrosis following endotoxin administration in partially hepatectomized rats[J]. *Hepatology*, 1999, 29(5): 1532 - 1540.
- [13] 张一兵, 王霞, 张淑琴, 等. 鸟氨酸氨基甲酰转移酶速率法测定及其在肝病中的诊断意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2010, 26(1): 60 - 62.
- [14] Murayama H, Ikemoto M, Fukuda Y, et al. Advantage of serum type - I arginase and ornithine carbamoyltransferase in the evaluation of acute and chronic liver damage induced by thioacetamide in rats[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 375(1 - 2): 63 - 68.
- [15] 林卫虹, 廖伟娇, 郑君德, 等. Logistic 回归和 ROC 曲线综合评价 CEA、NSE 和 CYFRA21 - 1 对肺癌的诊断价值[J]. *热带医学杂志*, 2011, 11(2): 185 - 188.
- [16] 乔靖怡, 周璐, 金若敏, 等. 四氯化碳致大鼠肝损伤早期血清总胆汁酸、 α -谷胱甘肽 S 转移酶、嘌呤核苷磷酸化酶和鸟氨酸氨基甲酰转移酶的变化[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(4): 650 - 656.
- [17] Alemayehu D, Zou KH. Applications of ROC analysis in medical research: recent developments and future directions[J]. *Acad Radiol*, 2012, 9(12): 1457 - 1464.
- [18] 申俊, 刘妍, 张金晓. 尿中肾损伤分子 1 水平升高对大鼠早期肾损伤的预测作用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26(2): 212 - 218.

(2014 - 01 - 06 收稿 责任编辑: 洪志强)