

析因设计筛选异烟肼利福平合用致小鼠肝损害的实验方案

薛洪源, 侯艳宁, 刘会臣(白求恩国际和平医院, 石家庄 050082)

摘要:目的 利用析因设计, 筛选利福平(RFP)与异烟肼(INH)合用致小鼠肝损伤的最佳实验方法。方法 采用不同的时间(A)、顺序(B)、剂量(C)给药, 分别测定ALT的活性, 肝匀浆中GSH及MDA的含量。结果 影响两药合用致小鼠肝损害程度的因素依次为: 给药剂量、时间和顺序(C > A > B); 最佳给药方法为同时给药10天, RFP与INH均为 $100\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。结论 应用析因设计筛选异烟肼利福平合用致小鼠肝损害的实验方案, 能较全面地反映各因素水平对实验的影响, 方法可行。
关键词: 利福平; 异烟肼; 药物相互作用; 肝毒性; 析因实验

Selection the test method for hepatotoxicity induced by isoniazid and rifampicin in combination by factorial

experimental design

XUE Hong-yuan, HOU Yan-ning, LIU Hui-chen(*Bethune International Peace Hospital, Shijiazhuang 050082, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To select the best test method for hepatotoxicity induced by isoniazid (INH) plus rifampicin (RFP) on mice using factorial experimental design. **METHOD** INH and RFP were given in different times, sequence, dosages. The serum level of ALT, the hepatic contents of MDA and GSH were measured. **RESULTS** The factors of influencing the degree of hepatotoxicity on mice in proper order are: dosages, times, sequence. The best experimental method is giving RFP and INH at the same time, for 10 days, RFP and INH are all $100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. **CONCLUSION** Applying factorial design to select the best test method can overall reflect the factors and levels which influence the indexes of the test, the factorial experimental design is feasible.

KEY WORDS: factorial experimental design; rifampicin; isoniazid; hepatotoxicity; drug interactions

利福平(rifampicin, RFP)和异烟肼(isoniazid, INH)是目前常用的一线抗结核药,但二者合用肝毒性增高。为了探讨二者合用肝毒性发生的机理,需要建立两药联用致小鼠肝损伤的实验模型,因此本实验采用析因设计,通过不同的给药时间(A)、给药顺序(B)、给药剂量(C)对小鼠血清谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)的活性、肝匀浆中丙二醛(malondialdehyde, MDA)及谷胱甘肽(glutathion, GSH)的含量的影响,来筛选致小鼠肝损伤的最佳实验方法,以期为进一步研究两药合用致肝毒性的机理及防治对策提供实验依据。

1 实验材料

1.1 动物

昆明种小鼠 48 只, ♀ ♂ 各半, 体重 $(19.2 \pm 1.7)\text{g}$, 购自河北医科大学实验动物中心, 动物合格证号为: 医动字第 04056 号。

1.2 药品试剂

异烟肼(天津市河北制药厂, 批号: 20000133), 利福平(浙江医药有限公司, 批号: 20010404); 5, 5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)为美国 Sigma 产品; 赖氏法试剂盒(保定长城临床试剂公司, 批号: 20010317); 丙二醛测定试剂盒(南京建成生物工程研究所, 批号: 20001115); 其他试剂均用国产分析纯。

1.3 仪器

756MC 型可见-紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂); DIAX900 型电动细胞匀浆机(德国 Heidolph); GL-16G-II 型冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂); BP110S 型电子天平(德国 Sartorius)。

2 实验方法

表 2 析因实验(2×2×3)结果表

Tab 2 Experiments and results of (2×2×3)factorial design

分组	实验号	GSH (nmol · g ⁻¹ Liver)		ALT (U · L ⁻¹)		MDA (10nmol · g ⁻¹ Liver)	
		1	2	1	2	1	2
1	A ₁ B ₁ C ₁	8.68	8.49	19.44	16.96	7.81	7.89
2	A ₁ B ₁ C ₂	7.65	7.57	26.87	33.81	10.44	10.70
3	A ₁ B ₁ C ₃	6.58	7.13	24.89	81.90	10.53	13.42

2.1 给药方法

选用析因设计 2×2×3 因素水平给药(见表 1)。将小鼠随机分为 12 组, ig 给药, 每组 4 只小鼠。1~6 组给药 6d, 其中 1~3 组前 3d 给 RFP, 后 3d 加入 INH, 4~6 组 RFP/INH 同时给药; 7~12 组给药 10d, 其中 7~9 组前 5d 给 RFP, 后 5d 加入 INH, 10~12 组 RFP/INH 同时给药(见表 2)。全部动物末次给药后禁食 12h。分别于第 7、11 天称重, 眼眶取血, 剖腹取肝, 洗净、揩干、称重, 制备肝匀浆, 各指标测定时, 每 2 只取平均数。

表 1 析因实验(2×2×3)因素水平表

Tab 1 The factorial design(2×2×3)factors and levels

水平	给药时间(A)	给药顺序(B)	给药剂量(C) (kg ⁻¹ · d ⁻¹)
1	6d	先后	RFP50mg + INH50mg
2	10d	同时	RFP 50mg + INH100mg
3			RFP100mg + INH100mg

2.2 血清谷丙转氨酶(ALT)活性测定

按赖氏法试剂盒说明操作。

2.3 肝匀浆丙二醛(MDA)含量测定

按试剂盒说明测定 MDA 含量。

2.4 肝匀浆谷胱甘肽(GSH)含量测定

采用改良的 Ellman 法, 并参照文献进行改进^[1,2]。

3 实验结果

3.1 由析因实验结果和极差 R 大小可以看出(见表 2、表 3), 各因素对降低 GSH 含量影响顺序为 A > C > B, 对 ALT 活性升高影响顺序为 C > A > B, 对 MDA 含量升高影响顺序为 C > A > B; 最佳实验方案是 A₂B₂C₃, 同时给药 10d, RFP 和 INH 剂量均为 $100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

分组	实验号	GSH		ALT		MDA	
		(nmol · g ⁻¹ Liver)		(U · L ⁻¹)		(10nmol · g ⁻¹ Liver)	
4	A ₁ B ₂ C ₁	6.51	6.40	28.86	12.49	10.84	10.36
5	A ₁ B ₂ C ₂	5.88	5.26	23.90	28.36	13.13	14.82
6	A ₁ B ₂ C ₃	6.10	5.29	29.85	84.88	14.46	18.55
7	A ₂ B ₁ C ₁	6.69	5.15	26.87	31.83	10.41	14.05
8	A ₂ B ₁ C ₂	5.40	4.96	40.26	32.33	15.14	18.92
9	A ₂ B ₁ C ₃	4.56	4.30	41.25	87.36	19.59	20.41
10	A ₂ B ₂ C ₁	5.33	5.70	34.31	41.75	11.80	18.03
11	A ₂ B ₂ C ₂	4.34	5.37	43.73	36.29	22.46	22.95
12	A ₂ B ₂ C ₃	4.38	3.82	66.04	73.48	24.10	25.08

表 3 析因实验(2×2×3)极差分析表

Tab 3 Analysis of range for the factorial design

	GSH			ALT			MDA		
	(nmol · g ⁻¹ Liver)			(U · L ⁻¹)			(10nmol · g ⁻¹ Liver)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
I	81.54	77.16	52.95	412.21	463.77	212.51	142.95	159.31	91.19
II	60.00	64.38	46.43	555.50	503.94	265.55	222.94	206.58	128.56
III			42.16			489.65			146.14
I j	13.59	12.86	13.24	68.70	77.30	53.13	23.83	26.55	22.80
II j	10.00	10.73	11.61	92.58	83.99	66.39	37.16	34.43	32.14
III j			10.54			122.41			36.54
R	3.59	2.13	2.70	23.88	6.69	69.28	13.33	7.88	13.74

表 4 析因实验(2×2×3)方差分析表

Tab 4 Analysis of variance for the factorial design

方差来源		ΣX	C	ΣX ²	SS 总	SS i	ν	MS	F
GSH	A	141.54	834.73	874.83	40.10	19.33	1	19.33	84.04 ¹⁾
	B					6.81	1	6.81	29.61 ¹⁾
	C					7.38	2	3.69	16.04 ¹⁾
	A × B					3.04	1	3.04	13.22 ¹⁾
	A × C					0.20	2	0.10	0.43
	B × C					0.31	2	0.16	0.70
	A × B × C					0.26	2	0.13	0.57
	误差					2.77	12	0.23	
	ALT	A	967.71	39019.28	49962.51	10943.23	855.50	1	855.50
B						67.23	1	67.23	0.18
C						5410.03	2	2705.02	7.21 ¹⁾
A × B						40.64	1	40.64	0.11
A × C						19.04	2	9.52	0.03
B × C						39.51	2	19.78	0.05
A × B × C						11.13	2	5.57	0.01
误差						4500.15	12	375.01	
MDA		A	365.89	5578.15	6206.35	628.21	266.60	1	266.60
	B					93.10	1	93.10	23.16 ¹⁾
	C					196.88	2	98.44	24.49 ¹⁾
	A × B					0.85	1	0.85	0.21
	A × C					16.33	2	8.17	2.03
	B × C					4.48	2	2.24	0.56
	A × B × C					1.74	2	0.87	0.22
	误差					48.23	12	4.02	

注: ¹⁾P < 0.01,

3.2 析因实验方差分析结果显示(见表4), A、B、C三因素对GSH、MDA含量的影响均有统计学意义(P < 0.01); C因素对ALT活性影响有统计学意义(P < 0.01); A、B二因素的交互作用只对GSH有统计学意义(P < 0.01)。

4 讨论

由实验结果可见, 给药时间(因素A)对肝匀浆中GSH和MDA含量影响最大, 肝细胞内GSH中的巯基可与有毒的亲核物质结合, 自行或经谷胱甘肽过氧化酶催化还原过氧化

脂质,抵抗自由基造成的损伤,但通过长时间给药,RFP 诱导 P450 酶,使 INH 有毒代谢物蓄积过多,肝细胞内 GSH 耗竭,细胞自身的解毒功能受到影响,脂质过氧化作用加强,其产物 MDA 可使含游离 NH_2 的蛋白质、磷脂发生交联,限制膜胆固醇从脂质双层向外侧移动交换,从而使膜胆固醇含量增多,导致膜流动性下降,引起细胞代谢及功能障碍,测试 MDA、GSH 的量,可反映机体内脂质过氧化的程度,及细胞自身抗氧化作用的强弱,从而反映肝细胞损伤的程度;另外,给药顺序(因素 B)影响了因素 A,显示出二者交互作用对 GSH 含量影响的显著性。给药剂量(因素 C)对血清 ALT 活性影响非常显著,这是因为正常情况下,ALT 主要存在于组织细胞中,只有极少量释放入血中,当大剂量 RFP 和 INH 引起肝细胞损伤时,细胞内的酶大量释放入血液,使血液中该酶的活性增高,通过测定 ALT 活性的大小,可直接反映肝脏受损的程度。给药顺序(因素 B)的两水平对各指标的影响差别不大,说明在给药初期 INH 肝毒性表现不明显,在 RFP 较长时间诱导肝药酶后,INH 的肝毒性才有明显的表现,但因素 B 对 GSH 和 MDA 含量影响仍有显著意义。

本实验以析因设计来筛选 INH、RFP 合用致肝损伤的最佳实验方案是 $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}_3$,即同时给药 10d,剂量均为 $100\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。王建刚等人^[3]采用 ip 给药方法致 RFP 与 INH 小鼠肝损伤,但本实验考虑应选择与人一致的服药方法,故

在 ig 给药前后各禁食 2h,以减少胃肠道的影响;据文献报道^[3]及预实验,在给予 RFP 与 INH 均为 $(150 \sim 200) \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 时出现小鼠死亡现象,故选择给药剂量为 $(50 \sim 100) \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

综上所述,析因设计是多因素多水平全面实验的一种分析方法,既准确可靠,又能较全面地分析各因素水平及其交互作用对实验指标的影响;极差大小反映了该因素水平变化时实验指标的变化幅度,极差越大,该因素对指标的影响越大,就越重要;方差分析显示出各因素及交互作用对指标影响是否具有统计学意义;交互作用是两种因素相互影响,而起一种协同或拮抗作用,本实验中交互作用大都无统计学意义,可以将其和与误差相合并,简化计算过程。

参考文献

- [1] 陈重阳,唐祖年,梁荣感. 青蒿琥酯对正常及肝脏毒物中毒小鼠肝脏谷胱甘肽含量的影响[J]. 中国药理学通报,1993,9(1):52.
- [2] 张平,孟宪钧. 分光光度法测定大鼠不同组织还原型谷胱甘肽含量[J]. 中华实验外科杂志,1989,6(3):141.
- [3] 王建刚,王淑英,赵建龙,等. 利福平增加异烟肝毒性的机制探讨. 洛阳医学学报,1999,17(1):11.

收稿日期:2003-08-23