

· 论著 ·

五子衍宗复方总多糖对慢性酒精中毒大鼠肝脏的保护作用

陈 迁¹, 陈孟莉¹, 叶兆波² (1. 中国人民解放军总医院临床药理研究室, 北京 100853; 2. 香港中文大学中医学院, 香港)

[摘要] 目的 在前期研究工作的基础上,对具有肝脏保护作用的中药五子衍宗复方(WZ)进行进一步的分离,考察WZ复方提取物中总多糖(TPC)对慢性酒精中毒大鼠肝脏的保护作用并探讨其可能的作用机制。方法 本实验采用改良的Lieber-DeCarli液体酒精饲料喂养致慢性酒精性肝损伤大鼠模型,应用TPC治疗,观察血清生化指标和病理学改变,考察对肝脏氧化应激、脂质过氧化指标和细胞因子TNF- α 水平及TNF- α mRNA表达影响。结果 TPC能够显著降低升高的肝脏指数和血清ALT、AST水平,减轻肝脏组织病理学改变;减轻肝脏脂质过氧化,显著恢复GSH含量和SOD活性,从蛋白和基因水平抑制长期酒精诱导所致的细胞因子TNF- α 过度表达。结论 TPC对慢性酒精大鼠肝脏具有显著的保护作用,其肝脏保护作用可能与其抗氧化应激,抑制炎症细胞因子TNF- α 表达和含量有关。

[关键词] 五子衍宗丸;多糖;氧化应激;肿瘤坏死因子- α

[中图分类号] R931.6 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)01-0025-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.01.006

Protective effect of total polysaccharides in Wuzi-Yanzong pill on chronic alcohol-induced injury in Rat

CHEN Qian¹, CHEN Meng-li¹, YE Zhao-bo² (1. Department of clinical pharmacology research, General Hospital of PLA, Beijing 100853 China; 2. College of traditional Chinese medicine, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protect effect and mechanism of total polysaccharides (TPC) isolated from 50% ethanol extract of Wuzi-Yanzong pill (WZ) against chronic alcohol-induced injury in Rat. **Methods** The effect of TPC on chronic ethanol hepatotoxicity was investigated in modified Lieber-DeCarli rat model. Hepatocellular damage indicator (Serum ALT, AST) and histopathological examination of liver in rat were evaluated. MDA content, SOD activity and GSH content in liver were measured. TNF- α content and TNF- α mRNA expression were determined. **Results** TPC protected against chronic ethanol-induced hepatotoxicity in rat, as evidenced by decreased plasma transaminases activities and signally improve the liver pathological changes induced by alcohol. TPC significantly inhibited the increase of MDA content, improved SOD activity and prevented GSH depletion. TPC significantly alleviated hepatic TNF- α production and decreased the expression of TNF- α mRNA. **Conclusion** TPC possessed potent hepatoprotective activities in chronic alcohol-induced injury rat model. The suppressive effect of TPC on chronic alcohol induced liver injury might be attributed to the antioxidant action and suppress TNF- α expression at protein and gene level.

[Key words] Wuzi-Yanzong pill; polysaccharides; oxidative stress; TNF- α

酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD)是指由于酒精摄入过量而导致的肝脏损害等一系列病变,2006年由中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组制定的《酒精性肝病诊疗指南》,酒精性肝病可分为轻型、酒精性脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化5种类型。在我国,由于生活水平提高,国民生活方式改变,酗酒者不断增多,酒精性肝病的发病率和严重程度都呈上升趋势,

酒精已成为继病毒性肝炎后导致肝损害的第二大病因^[1]。最新研究表明^[2],酒精性肝病发病率占其他肝病住院患者的比例由2.4%上升到6.1%,且患者肝脏损伤严重。我国酒精性肝病患者肝脏损伤严重,其中酒精性肝炎患者占28.8%,酒精性肝硬化患者占37.4%。在欧美国家ALD是肝纤维化最常见的病因,也是十大常见死因之一。

ALD的治疗措施主要是:戒酒、改善营养、治疗肝损伤、防治并发存在的其他肝病、阻止或逆转肝纤维化的进展、促进肝再生、减少并发症、提高生活质量、终末期肝病进行肝移植等措施。治疗ALD药物现用于临床的有抗氧化剂维生素E、还原型谷胱甘肽、水飞蓟素等。抗纤维化药物秋水仙碱和不饱和卵磷脂,

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81041030)。

[作者简介] 陈 迁(1968-),男,硕士研究生,助理研究员。Tel: 01066939557。

[通讯作者] 陈孟莉。Tel: 01066937187, E-mail: hellolily301@ hot-mail.com.

以及丙基硫氧嘧啶、S-腺苷蛋氨酸。这些药物对 ALD 疗效各项研究报道差别较大。目前还没有一种药物在多项随机对照试验中显示能显著改善患者的生存率。另外,对于严重的酒精性肝炎,糖皮质激素治疗可能是最有效的,但严重的不良反应不可避免。ALD 致病机制和治疗现状使我们认识到单一靶点治疗是不能针对酒精性肝损伤这一疾病复杂性。由此我们不得不提出中医药治疗复杂性疾病的优势。

五子衍宗丸(WuZi YanZongWan, WZ)始载于唐代,由五味药材(枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子)配伍组成^[3]。本研究在 WZ 复方前期对于五子衍宗醇提物研究工作^[4,5]的基础上,采用改良的 Lieber-DeCarli 液体酒精饲料喂养大鼠模型^[6],给与 WZ 醇提物中总多糖成分治疗,通过对其疗效观察、对氧化应激、脂质过氧化指标和细胞因子肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平和 mRNA 表达的影响,以探讨其可能涉及的作用机制,同时也为寻找 WZ 复方中能够治疗酒精性肝病的中药制剂奠定基础。

1 材料

1.1 实验动物 雌性 Wistar 大鼠,体重 150 ~ 180 g,由香港中文大学实验动物中心提供。本研究的动物实验过程得到香港中文大学动物实验伦理委员会的批准。

1.2 药材 5 种中药材分别为枸杞子、菟丝子、覆盆子、五味子、车前子,均购于广州致信药业有限公司(GMP 认证)。5 种中药材经香港中文大学中医学院宗玉英主任药师鉴定,符合 2005 版《中国药典》各药材项下要求。

1.3 化学试剂 改良的 Lieber-DeCarli 液体酒精饲料和对照饲料(美国 Lieber-DeCarli 公司);TNF- α 试剂盒(美国 Biosource 公司);石油醚、乙醇、正丁醇、丙酮(美国 Sigma 公司,AR 级)。

2 方法

2.1 WZ 总多糖提取物的制备 5 种中药材分别粉碎,然后按比例混合,经石油醚 2 次回流,回收石油醚。药渣经 50% 乙醇回流提取 3 次,回收乙醇,所得浸膏用水溶解,再用正丁醇萃取,回收正丁醇层,干燥,得到黄色干燥固体物(TFS)。水层浓缩后与药渣水提取浓缩液混合,用 95% 乙醇低温沉淀 24h 后过滤,所得沉淀物用丙酮洗涤、干燥得到粗总多糖(TPC,总多糖含量 26 mg/g 生药材),用于本实验的大鼠体内活性研究。

2.2 动物分组给药 50 只大鼠被随机分为对照组

(10 只,给与 Lieber-DeCarli 液体对照饲料,)、酒精液体饲料喂养组(40 只,给与改良的 Lieber-DeCarli 液体酒精饲料),饲料配方见表 1。液体饲料喂养 28 d 后,酒精液体饲料喂养组被分为 4 组,分别蒸馏水、WZ 总多糖高(250 mg/kg)、中(125 mg/kg)、低(50 mg/kg)3 个剂量组连续治疗 14 d。

表 1 液体饲料成分

成分	对照饲料(g/L)	酒精饲料(g/L)
酪蛋白(100 Mesh)	41.4	41.4
L-胱氨酸	0.5	0.5
DL-甲硫氨酸	0.3	0.3
玉米油	39.6	39.6
麦芽糖	115.2	25.6
纤维素	10.0	10.0
混合盐	8.75	8.75
混合维生素	2.5	2.5
胆碱	0.53	0.53
黄原胶	3	3
酒精	0	51.42

2.3 肝脏功能血清学测定 治疗 7 d 后,所有大鼠眼球取血,静置离心,分离得血清测定 ALT、AST、总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)。

2.4 肝脏指数、生化指标测定与病理切片观察 颈椎脱臼处死大鼠,取肝脏称重,计算脏器指数(肝重/小鼠体重)。4℃ 缓冲液制备 20% 肝匀浆,检测肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)含量。取各组大鼠肝右叶同一部位组织,以 10% 甲醛固定,石蜡包埋,制成切片,HE 染色,光镜下观察肝细胞形态学变化。

2.6 肝脏 TNF- α 因子测定 肝匀浆离心后,取上清液用于 TNF- α 浓度测定。其测定方法严格按照 TNF- α ELISA 试剂盒中提供的方法进行。

2.7 Real-time PCR 测定肝脏 TNF- α mRNA 表达 按照 TRIZOL 操作说明分别提取各组动物肝脏总 RNA,紫外分光光度计定量后,1.5 μ g 总 RNA 应用 cDNA Reverse Transcription 试剂盒(Applied biosystem Company, California, USA)行逆转录反应。在 StepOnePlus™ Real-Time PCR System 上应用 TaqMan® Gene Expression Assays 试剂盒进行 Real-time PCR 扩增。TNF- α mRNA 表达通过与内参照 β -actin 的比值 Δ Ct 表示。

2.8 数据处理 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用统计学 SPSS13.0 软件处理,组间比较用 *t* 检。*P* < 0.05 为有显著性差异。

3 结果

3.1 TPC 对慢性酒精中毒大鼠肝脏指数的影响 与对照组相比,模型组肝脏指数显著升高;TPC 中剂

量组和高剂量组均能显著降低慢性酒精损伤所致的肝脏指数升高($P < 0.01$),见表2。

表2 TPC对慢性酒精中毒大鼠肝脏指数的影响
($n = 8 \sim 10, \bar{x} \pm s$)

组别	肝脏指数(%)
对照组(10)	2.93 ± 0.53
模型组(8)	5.25 ± 1.32 ¹⁾
TPC低剂量组(8)	4.57 ± 0.37
TPC中剂量组(10)	3.75 ± 0.56 ²⁾
TPC高剂量组(10)	3.19 ± 0.50 ²⁾

¹⁾ $P < 0.01$,与对照组相比;²⁾ $P < 0.01$,与模型组相比。

3.2 TPC对慢性酒精中毒大鼠肝功指标的影响

与对照组相比,模型组大鼠AST、ALT均显著升高;在3个不同剂量组中,TPC高剂量组和中剂量组AST水平均呈显著下降,与模型组相比具有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$),对于ALT水平,只有TCP高剂量组显著降低由于慢性酒精中毒所致的ALT升高($P < 0.05$),见表3。

表3 TPC对慢性酒精中毒大鼠肝功能ALT,AST影响
($n = 8 \sim 10, \bar{x} \pm s$)

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)
对照组(10)	105.4 ± 17.6	50.2 ± 12.9
模型组(8)	166.4 ± 21.7 ¹⁾	89.7 ± 17.2 ¹⁾
TPC低剂量组(8)	150.6 ± 14.9	92.5 ± 16.5
TPC中剂量组(10)	126.5 ± 19.5 ²⁾	87.5 ± 9.5
TPC高剂量组(10)	110.2 ± 20.5 ³⁾	60.5 ± 9.1 ²⁾

¹⁾ $P < 0.01$,与对照组相比;²⁾ $P < 0.05$,与模型组相比;³⁾ $P < 0.01$,与模型组相比。

3.3 TPC对慢性酒精中毒大鼠肝脏组织光镜观察

饲料对照组大鼠肝组织切片H&E染色未见明显异常。模型组肝组织切片均可见肝细胞增大,胞浆疏松,为脂肪变性的肝细胞呈弥漫性地分布于各个肝小叶。主要为小泡性脂肪变性为主的混合性脂肪变性,肝细胞脂肪变性程度较重。肝小叶内和汇管区有以大量单个核细胞为主的炎性细胞浸润。TPC不同剂量组肝脏病理有不同程度的改善,轻度至中度脂肪变为主,脂肪变性程度较轻,肝内脂肪滴减少,散在分布。细胞核位于细胞中央,炎症细胞浸润减轻,见图1。

3.4 TPC对慢性酒精中毒大鼠肝脏脂质水平的影响

与对照组相比,模型组大鼠TG、TC均显著升高($P < 0.01$);TPC高剂量组能显著降低由于慢性酒精中毒所致的TG升高($P < 0.01$)。在3个不同剂量组中,TPC高剂量组和中剂量组TC水平均呈显著下降,与模型组相比具有显著性差异($P < 0.01$, $P < 0.05$),见表4。

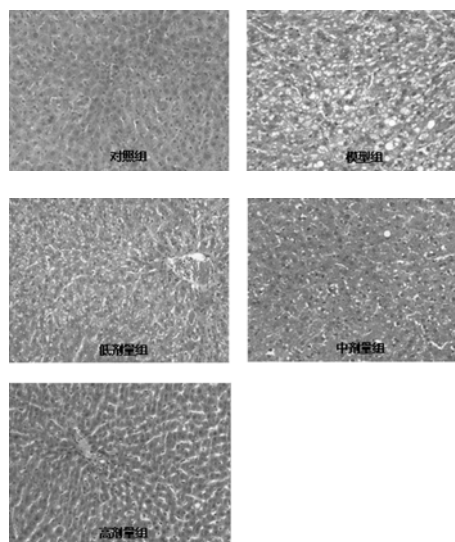


图1 TPC对慢性酒精中毒大鼠肝脏病理变化的影响
(H&E 200 X)

表4 TPC对肝脏脂质影响(mmol/L, $n = 8 \sim 10, \bar{x} \pm s$)

组别	TG	TC
对照组(10)	0.87 ± 0.38	2.53 ± 1.21
模型组(8)	1.45 ± 0.59 ¹⁾	4.85 ± 0.76 ¹⁾
TPC低剂量组(8)	1.35 ± 0.29	3.45 ± 0.91
TPC中剂量组(10)	1.45 ± 0.57	3.32 ± 0.83 ²⁾
TPC高剂量组(10)	1.16 ± 0.44 ³⁾	3.16 ± 0.85 ³⁾

¹⁾ $P < 0.01$,与对照组相比;²⁾ $P < 0.01$,与模型组相比;³⁾ $P < 0.01$,与模型组相比。

3.5 TPC对慢性酒精中毒大鼠肝脏脂质过氧化损伤的影响

由表4所示,与对照组相比,慢性酒精中毒大鼠肝脏MDA水平显著升高,SOD和GSH水平显著降低,在统计学上均有显著性差异($P < 0.01$)。在TPC3个不同剂量组中,大鼠肝脏MDA含量均被降低,与模型组相比具有显著性差异($P < 0.01$)。在TPC3个不同剂量组中,大鼠肝脏SOD含量均被TPC升高,与模型组相比呈现显著性差异($P < 0.01$)。关于大鼠肝脏GSH水平,只有TPC高剂量组能显著升高由于慢性酒精中毒所致的GSH降低($P < 0.01$),见表5。

表5 TPC对肝脏SOD、GSH、MDA的影响
($n = 8 \sim 10, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD (U/mg prot)	GSH (mmol/mg prot)	MDA (mg/mg prot)
对照组(10)	217.25 ± 28.61	19.33 ± 1.66	0.12 ± 0.02
模型组(8)	165.89 ± 19.12 ¹⁾	10.81 ± 1.98 ¹⁾	0.35 ± 0.01 ¹⁾
TPC低剂量组(8)	179.64 ± 15.97 ²⁾	9.97 ± 2.67	0.27 ± 0.01 ²⁾
TPC中剂量组(10)	182.27 ± 23.59 ²⁾	11.50 ± 2.49	0.22 ± 0.04 ²⁾
TPC高剂量组(10)	187.49 ± 19.46 ²⁾	16.40 ± 1.87 ²⁾	0.18 ± 0.05 ²⁾

¹⁾ $P < 0.01$,与对照组相比;²⁾ $P < 0.01$,与模型组相比。

3.6 TPC对慢性酒精中毒大鼠肝脏 TNF- α 浓度及 mRNA 表达影响 图 2(A) 结果所示,慢性酒精中毒大鼠肝脏 TNF- α mRNA 表达也显著升高,与对照组相比具有极显著性差异($P < 0.001$)。在经 TPC 治疗组中,中剂量组和高剂量组的 TNF- α mRNA 表达被显著降低,与模型组相比具有显著性差异($P <$

0.001)。由图 2(B) 结果所示,与对照组相比,慢性酒精中毒大鼠肝脏 TNF- α 水平显著升高,在统计学上均有极显著性差异($P < 0.001$)。在 TPC 3 个不同剂量组中,中剂量和高剂量组大鼠肝脏 TNF- α 含量均被降低,与模型组相比具有显著性差异($P < 0.01$)。

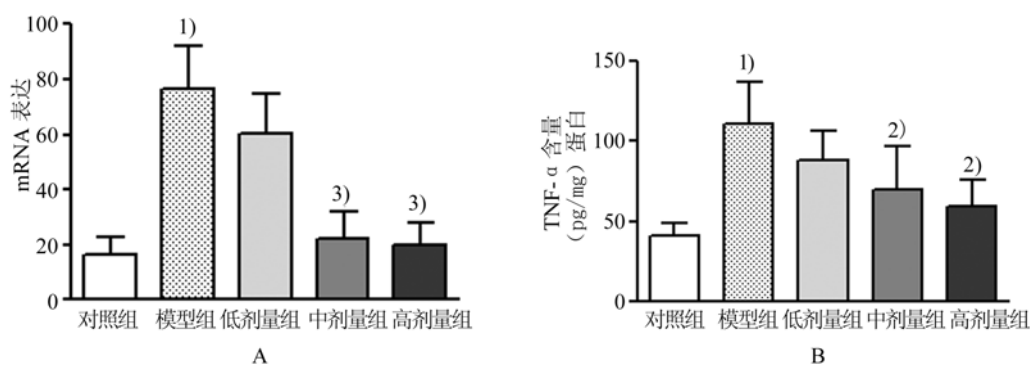


图 2 TPC 对肝脏 TNF- α 浓度及 mRNA 表达影响

1) $P < 0.01$, 与对照组相比; 2) $P < 0.01$, 与模型组相比; 3) $P < 0.001$, 与模型组相比。

4 讨论

酒精性肝病是致病因素单一,但发病机制较为复杂的慢性肝脏损害性病变。与酒精及其代谢产物对肝脏的毒性、氧化应激、免疫介导、内毒素、遗传多态性、细胞凋亡等多种因素相关^[7]。其中氧化应激损伤和细胞因子倍受关注。本研究在是前期对五子衍宗丸提取物能够提高酒精性肝损伤大鼠的生存率、改善细胞线粒体功能的基础上,对五子衍宗丸提取物中总多糖对慢性酒精中毒大鼠肝脏保护作用进行研究。

实验结果表明慢性酒精中毒可致大鼠血清 AST, ALT 升高, 肝脏 TC、TG 蓄积以及肝细胞肿胀、脂肪变性和炎性浸润。反映了慢性酒精中毒大鼠肝脏生化和病理学改变。TPC 中、高剂量组能够显著降低升高的肝脏指数和 ALT、AST 水平,减轻肝脏组织病理学改变,从而对大鼠肝脏具有保护作用。

酒精诱导的氧化应激是慢性酒精性肝损伤发病机制之一^[8]。在长期的酒精的作用下,氧化反应产物 ROS 增加和抗氧化剂屏障(例如抗氧化酶系中超氧化物歧化酶 SOD 和非酶抗氧化剂 GSH 等)缺失从而引起的酒精性肝损伤。生理状态下,机体产生的氧自由基与抗氧化防御系统处于动态平衡。长期过量饮酒,机体产生大量氧自由基,抗氧化剂、抗氧化酶被大量消耗用于清除氧自由基,

致使氧化与抗氧化失衡,机体抗氧化防御系统受到破坏,造成 ROS 堆积,进而诱导肝脏损伤。本研究结果所示,长期慢性酒精中毒大鼠肝脏脂质过氧化产物 MDA 显著增加,非酶抗氧化剂 GSH 含量和抗氧化物酶 SOD 活性均显著降低。TPC 可以抑制 Lieber-DeCarli 液体酒精饲养所致的慢性酒精中毒大鼠氧化应激,表现为显著减轻肝脏脂质过氧化,同时显著恢复 GSH 含量和 SOD 活性。由此推测,TPC 具有的对慢性酒精性肝损伤的保护作用与其抗氧化应激能力,保护抗氧化防御系统有关。

TNF- α 是重要的促炎因子,主要是由巨噬细胞和单核细胞产生。其可促进炎症反应,诱导巨噬细胞产生细胞因子,从而引起凋亡和坏死。在酒精性肝损害时, TNF- α 主要是由肝脏内的巨噬细胞-Kupffer 细胞产生。研究表明^[9,10], ALD 患者中 TNF- α 的表达增加,且 ALD 血清 TNF- α 水平和肝功能以及临床预后密切相关。在临床上,应用抗 TNF- α 抗体(Infliximab) 单独或与激素联用均可改善酒精性肝炎患者血清生化指标且安全性良好^[11-13],从而进一步证实了 TNF- α 在 ALD 中的重要作用。TNF- α 是酒精相关性肝脏炎症反应发病机制的最后通路得到普遍认同。本研究表明,长期慢性酒精可致大鼠肝脏 TNF- α 含量和 TNF- α mRNA 表达水平显著升高。TPC 可以从蛋白和基因水平抑制长期酒精诱导所致的细胞因子 TNF- α 过度表达,进而减轻肝细胞损伤。

(下转第 31 页)

12.0、24.0 h 取静脉血 5 ml,置肝素化试管中,离心,分离血浆^[4]。按“2.1”项下方法操作,测定血浆中盐酸氨溴索的浓度,平均药时曲线见图 2,主要药代动力学参数见表 2。

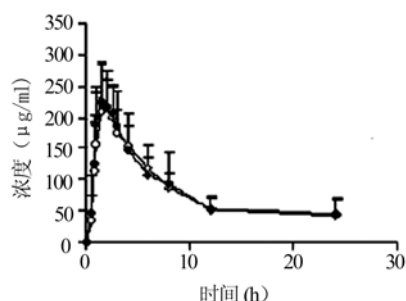


图 2 口服两种制剂的平均药-时曲线
—◇—试验制剂;—◆—参比制剂

表 2 单剂量口服两种片剂的药代动力学参数

参数	受试制剂	参比制剂	90% 置信区间
$t_{1/2}$ (h)	6.33 ± 1.61	6.57 ± 2.24	
C_{max} (ng/ml)	242.6 ± 46.7	236.3 ± 57.4	97.1% ~ 111.8%
t_{max} (h)	2.04 ± 1.50	2.00 ± 0.90	
AUC_{0-t} (ngoh/ml)	1 951 ± 533	1 986 ± 505	91.2% ~ 104.9%
$AUC_{0-\infty}$ (ngoh/ml)	2 122 ± 527	2 199 ± 634	90.2% ~ 105.1%

(上接第 28 页)

5 结论

综上所述,TPC 对慢性酒精大鼠肝脏具有显著的保护作用,其肝脏保护作用可能与其抗氧化应激,抑制炎症细胞因子 TNF- α 表达和含量有关。

【参考文献】

- [1] 庄 辉. ALD 的流行病学[J]. 中华肝病杂志, 2003, 11: 698.
- [2] 全国酒精性肝病调查协作组. 全国酒精性肝病的多中心调查分析[J]. 中华消化杂志 2007; 27: 231.
- [3] 中国药典[M]. 2005 版 1 部. 2005: 364.
- [4] Chen ML, Tsai SH, Ip SP, *et al.* Long-term treatment with a “Yang-Invigorating” Chinese herbal formula, WuZi-YanZong-Wan, reduces mortality and liver oxidative damage in chronic alcohol-Intoxicated rats[J]. Rejuv Res, 2010, 13: 459.
- [5] Chen ML, Ip SP, Tsai SH, *et al.* Biochemical mechanism of Wu-Zi-Yan-Zong-Wan, a traditional Chinese herbal formula, against alcohol-induced oxidative damage in CYP2E1 cDNA-transfected HepG2 (E47) cells[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 128: 116.
- [6] Ronis MJ, Hakkak R, Korourian S, *et al.* Alcoholic liver disease

3 讨论

盐酸氨溴索体内浓度低,本测定采用液-液萃取的方法用乙醚提取血浆样品,再用 0.01 mol/L 盐酸反提回水相,可以减少人血浆内源性杂质的干扰。因样品吸附作用很强,在试验中易造成峰拖尾,出峰时间长,故于流动相中加入四氢呋喃以改善峰形,减少出峰时间。本方法灵敏,专属性强,能满足盐酸氨溴索的含量测定及体内药动力学研究的需要。

【参考文献】

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知:化学药和生物制品卷[M]. 北京:人民卫生出版社,2005:242.
- [2] NobilisM, Pastera J, SvobodaD, *et al.* High-performance liquid chromatography determination of ambroxol in human plasma[J]. J Chromatogr, 1992, 581: 251.
- [3] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J]. 药物分析杂志, 1996, 16(5): 343.
- [4] 戈升荣,安富荣,曹惠明,等. 高效液相色谱法测定人血浆中盐酸氨溴索浓度[J]. 中国药房, 2004, 15(1): 37.

[收稿日期]2011-10-26

[修回日期]2011-12-25

in rats fed ethanol as part of oral or intragastric low-carbohydrate liquid diets[J]. Exp Biol Med 2004; 229: 351.

- [7] Albano E. New concepts in the pathogenesis of alcoholic liver disease[J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol 2008; 2: 749.
- [8] Artele GE. Oxidants and antioxidants in chronic alcoholic liver disease[J]. Gastroenterology, 2003, 124: 778.
- [9] Hanck C, Rossol S, Bocker U, *et al.* Presence of plasma endotoxin is correlated with tumour necrosis factor receptor levels and disease activity in alcoholic cirrhosis[J]. Alcohol Alcoholism, 1998, 33: 606.
- [10] Tilg H, Wilmer A, Vogel W, *et al.* Serum levels of cytokines in chronic liver diseases[J]. Gastroenterology, 1992, 103: 264.
- [11] Tilg H, Jalan R, Kaser A, *et al.* Anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis[J]. J Hepatol, 2003, 38: 419.
- [12] Menon K, Stadheim L, Kamath P, *et al.* Safety and tolerability of etanercept in patients with alcoholic hepatitis[J]. Am J Gastroenterol, 2004, 99: 255.
- [13] Spahr L, Rubbia-Brandt L, Frossard J, *et al.* Combination of steroids with infliximab or placebo in severe alcoholic hepatitis: a randomized controlled pilot study[J]. J Hepatol, 2002, 37: 448.

[收稿日期]2011-08-11

[修回日期]2011-10-14