

束缚应激对 D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导小鼠肝损伤的保护作用

卢静^{1,2}, 李梦², 陈柏安², 孙泉², 翟亚南², 王晶晶², 孟霞², 郑世军¹

(1. 中国农业大学, 北京 100094, 2. 首都医科大学实验动物部, 北京 100069)

【摘要】 目的 探讨束缚应激对 D-氨基半乳糖联合脂多糖(D - galactosamine and lipopolysaccharide combination, D + L)诱导的小鼠肝损伤的保护作用。方法 正常 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组(con)、应激对照组(str)、模型组(D + L)、束缚应激组(D + L + str)。con 组小鼠常规饲养;str 组小鼠给予定时定量的束缚应激;D + L 组小鼠腹腔注射 D-氨基半乳糖和脂多糖的混合溶液, 1 次/2 天;D + L + str 组小鼠腹腔注射等量 D + L 混合液后, 给予与 str 组相同的束缚应激。第 8 周, 各组小鼠取血检测血清 AST、ALT, 肝脏固定后 HE 及 Masson 染色观察小鼠肝脏结构、细胞形态及纤维化程度。结果 第 8 周 D + L + str 组与 D + L 组小鼠相比, 血清 ALT 和 AST 显著降低($P < 0.01$), AST/ALT 显著增高($P < 0.01$); HE 及 Masson 染色显示, D + L 组小鼠肝小叶结构紊乱, 出现结节性增生及大量上皮细胞核浓缩、溶解、坏死, 枯否氏细胞浸润, 而 D + L + str 组未见明显病理变化; 纤维化程度评分显示, D + L + str 组与 D + L 组小鼠相比, 病理评分与纤维染色吸光度值均显著降低($P < 0.05$)。结论 束缚应激对 D + L 诱导的小鼠肝损伤具有一定保护作用。

【关键词】 束缚应激; D-氨基半乳糖联合脂多糖; 肝损伤; BALB/c 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0089-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.016

Protective effect of restraint stress on mouse liver injury induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide

LU Jing^{1,2}, LI Meng², CHEN Bai-an², SUN Quan², ZHAI Ya-nan², WANG Jing-jing², MENG Xia², ZHENG Shi-jun¹

(1. China Agricultural University, Beijing 100094, China; 2. Capital Medical University, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of restraint stress on liver injury in mice induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide (D + L). **Methods** Normal BALB/c (B/c) mice were randomly divided into normal control, stress control, D + L group, and D + L + stress group. The mice of normal control group were bred routinely. The stress group was given stress regularly and quantitatively. Mice in the D + L group were injected intraperitoneally with mixed solution of D-galactosamine and lipopolysaccharide at final concentration of 30 mg/mL and 2 μ g/mL, respectively, once every two days. The D + L + stress group was given equal stress as stress group after injection of D-galactosamine and lipopolysaccharide mixed solution. Eight weeks later, blood samples were collected to test serum aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), liver tissue samples from all animals were collected to evaluate the degree of liver fibrosis by HE and Masson staining. **Results** At the 8th week, the ALT and AST values in the D + L + stress group were significantly reduced ($P < 0.01$) and AST/ALT value was significantly increased ($P < 0.01$) compared with that in the D + L group. For HE and Masson staining, disordered structure of hepatic lobules, nodular hyperplasia, and necrosis of epithelial cells were present in animals of the D + L group. However, no obvious pathological changes were observed in the D + L + stress group. For fibrosis scores, the fibrosis grade in the D + L + stress group was significantly decreased than that of the D + L group ($P < 0.05$). **Conclusions** Constraint stress presents protective effect on D-galactosamine and lipopolysaccharide induced liver injury in mice.

【作者简介】 卢静, 副教授, 首都医科大学实验动物部主任。E-mail: lujing@ccmu.edu.cn

【通讯作者】 郑世军, 教授, 中国农业大学动物医学院, E-mail: sjzheng@cau.edu.cn

【Key words】 Constraint stress; D-galactosamine; Lipopolysaccharide; Hepatic injury; BALB/c mice

应激是机体受到刺激后产生的非特异性适应性反应,是一种生理和心理对环境的抵抗状态,以维护机体的稳定。人类在生活、工作中,经常处于无法控制的拥挤和紧张状态,对动物进行定时和较低强度的束缚能够较好地模拟人类的这种状态。此外,束缚应激还可以模拟宇航员在宇宙飞行中的应激变化。本实验采用特定的束缚工具,对 D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导的小鼠肝损伤模型给予短暂的束缚刺激,通过检测 ALT、AST 和病理染色观察束缚应激对肝损伤的影响,对肝病治疗有一定参考价值,同时对重症肝病患者认识疾病、配合治疗等有积极的指导作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 48 只,雄性,体重 18 ~ 20 g,购于北京维通利华实验动物科学技术有限公司 [SCXK(京)2012-0001],在首都医科大学实验动物部屏障环境 [SYXK(京)2010-0020] 饲养。所有实验操作程序均经过首都医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号为 2011-X-90)。

1.2 实验试剂

D-氨基半乳糖(Nanjing Boyuan Pharmatech Co., Ltd, 20100521);脂多糖(美国 Sigma 公司, L2880, 10 mg); α -SMA 免疫组化试剂盒(Abgent, CA92121)。

1.3 动物分组与模型制备

将 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组(con, 12 只)、应激对照组(str, 12 只)、模型组(D + L, 12 只)、束缚应激组(D + L + str, 12 只)。①con 组给以正常饮食,饲养 8 周;②str 组将小鼠装入特制的束缚应激离心管(选择 50 mL 离心管,直径比小鼠腹围宽松,但又使其不能转身。在冻存管底和冻存管上钻孔,以便动物呼吸和散热,冻存管盖部钻一孔,使动物尾部能自由活动。),每次 30 min, 1 次/2 天,连续 8 周;③D + L 组腹腔注射 D + L 注射液(1800 mg D-氨基半乳糖加入 54 mL 生理盐水后,加入 6 mL 浓度为 20 μ g/mL 脂多糖,配置成 30 mg/mL D-氨基半乳糖和 2 μ g/mL 脂多糖的混合溶液),10 μ L/g, 1 次/2 天,连续注射 8 周;④D + L + str 组同 D + L 组等时等量给予 D + L 混合溶液后,同 str 组给予束缚应激,连续 8 周。

1.4 样本处理

实验第 8 周,各组小鼠腹腔注射 10% 水合氯醛

麻醉(0.35 mL/100 g);麻醉后,眼眶动静脉采血法采血;采血后,离心取血清(3000 g/min, 10 min);采血后,颈椎脱臼处死并摘取肝脏;剪取肝脏最大叶 1/3,置于 4% 甲醛溶液中固定,常规方法脱水、透明、包埋后制成蜡块并切片备用。

1.5 AST、ALT 检测

日立 7180 全自动血生化仪检测 AST、ALT 血清浓度。

1.6 肝脏组织石蜡切片 HE 染色及 Masson 染色

将肝脏组织石蜡切片进行水化处理(Leica AutoStainer XL 自动染色仪),分别使用常规法进行 HE 染色处理及 Masson 染色试剂盒进行 Masson 染色处理,中性树胶封片后使用 Nikon 数字显微照相机拍摄照片。

1.7 肝纤维化程度评判

(1)采用盲评法,HE 染色切片,50 μ m 倍光镜下,每组随机选取 5 个视野进行评分。标准如下:“-”无成纤维细胞增生,计 0 分;“+”汇管区扩大,有少量成纤维细胞增生,计 1 分;“++”汇管区成纤维细胞增生并向小叶内延伸,呈较窄较短的纤维素条,计 2 分;“+++”汇管区成纤维细胞大量增生并向小叶内明显延伸,形成纤维隔伴有小叶结构紊乱,计 3 分。

(2)Masson 染色半定量分析,Masson 染色切片,50 μ m 倍光镜下,使用 Nikon 数字显微照相机进行吸光度测量,每组随机选取 6 个视野。

1.8 肝组织 α -SMA 免疫组化法检测吸光度值

组织切片水化后,常规免疫组化法染色,50 μ m 倍光镜下,使用 Nikon 数字显微照相机进行吸光度测量,每组随机选取 6 个视野。

1.9 数据统计方法

数据以平均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示,实验结果用 SPSS 13.0 软件进行处理,各组数据采用单因素方差分析,并作两两比较, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 实验结果

2.1 血清 ALT、AST 变化

如表 1 示:第 8 周模型组小鼠 ALT 浓度与正常对照组相比极显著增加($P = 0.007$);与模型组比较,束缚应激组小鼠 ALT 显著降低($P = 0.014$)。

表 1 第 8 周 BALB/c 小鼠血清 ALT、AST 浓度 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 BALB/c mouse serum levels of ALT and AST at

8 th week			
组别 Groups	N	ALT(IU/L)	AST(IU/L)
正常对照组 Control	5	28.20 ± 3.95	83.44 ± 15.88
应激对照组 Stress	5	28.72 ± 1.99	89.10 ± 16.51
模型组 (D + L)	7	68.04 ± 47.33 ** $\Delta\Delta$	122.29 ± 82.70
束缚应激组 D + L + Stress	6	34.17 ± 6.30 \blacklozenge	111.48 ± 22.56

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$;与应激对照组比较, $\Delta\Delta P < 0.01$;与模型组比较, $\blacklozenge P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, compared with the control group; $\Delta\Delta P < 0.01$, compared with the stress group; $\blacklozenge P < 0.05$, compared with the D + L group.

2.2 病理学观察

HE 染色显示(见图 1,彩插 15):第 8 周时,正常组小鼠肝组织结构清晰完整,上皮细胞呈多边形,排列整齐有序,细胞质与细胞核分染清晰,细胞质呈红色,细胞核呈蓝色,结构完整;应激对照组与正常组比较,结构清晰,排列有序,未见明显异常;在 100 μm 倍镜下可以看见,D + L 组小鼠肝小叶结构明显紊乱,结节性增生出现较多,该结节性增生区域 50 μm 倍镜下可见肝细胞细胞核出现大量浓缩,甚至溶解、坏死,坏死细胞被枯否氏细胞浸润,对坏死细胞进行吞噬;D + L + stress 组未见明显病理变化,10 倍镜下未见结节性增生,40 倍镜下未见肝上皮细胞坏死及枯否氏细胞浸润,与正常组比较无明显异常。

Masson 染色显示(见图 2,彩插 15):第 8 周时,100 μm 倍镜下正常对照组肝细胞间可见少量淡蓝色素状染色;应激对照组与正常对照组比较,未见明显差异;D + L 组肝小叶出现大量条索状呈结节样深色蓝染,50 μm 倍镜下可见结节样深色蓝染主要出现在肝上皮细胞大量变性坏死区域;与 D + L 组相比,D + L + stress 组蓝染区域明显减少,10 倍镜下可见散在淡蓝染色,但无明显结节样蓝染,40 倍镜下可见淡蓝染色部位集中在肝上皮细胞细胞质中。

2.3 肝纤维化程度评价

第 8 周 HE 染色纤维化程度评判(如图 3 所示):与对照组比较,D + L 组纤维化评分极显著升高($P = 0.000$);与 D + L 组比较,D + L + str 组纤维化评分显著降低($P = 0.011$)。

第 8 周 Masson 染色胶原吸光度统计(如图 4 所示):与 con 组比较,D + L 组胶原吸光度极显著升高($P = 0.000$);与 D + L 组比较,D + L + str 组胶原吸光度极显著降低($P = 0.000$)。

2.4 肝组织 α -SMA 免疫组化染色。

第 8 周 α -SMA 免疫组化染色如图 5(彩插 15)

所示:与 D + L 组比较,D + L + stress 组 α -SMA 阳性颗粒吸光度值极显著降低($P = 0.000$)(见图 6)。

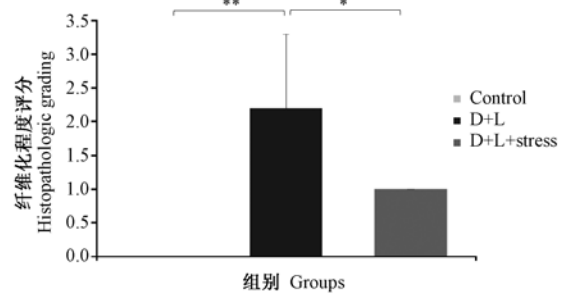


图 3 肝组织病理评分

Fig. 3 Histopathologic grading of the mouse liver tissues

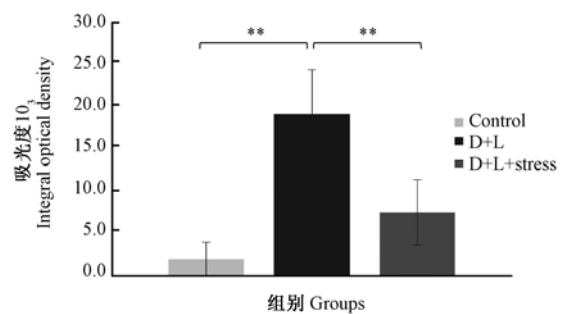


图 4 BALB/c 小鼠肝组织 Masson 染色胶原吸光度

Fig. 4 Integral optical density of collagen in the BALB/c mouse liver tissues. Masson staining.

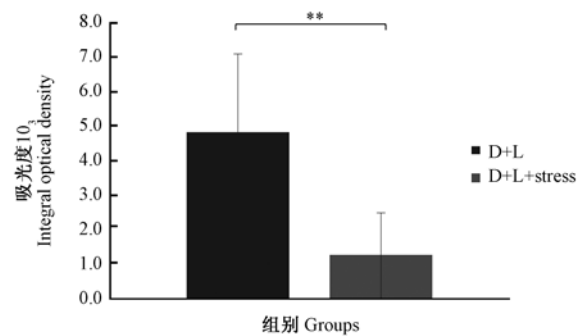


图 6 B/c 小鼠肝组织 α -SMA 免疫组化吸光度

Fig. 6 Integral optical density of α -SMA positively stained by IHC in the B/c mouse liver tissues

3 讨论

本实验结果显示,与 D + L 组小鼠相比,8 周时 D + L + stress 组小鼠血清 ALT 显著降低,同时 HE 染色显示 D + L + stress 组小鼠肝脏未见明显病理变化。Masson 染色显示 D + L + stress 组小鼠肝脏胶原及 α -SMA 吸光度值明显低于 D + L 组小鼠。

由此可见,适当束缚应激能够缓解慢性肝损伤,

同时降低胶原在肝上皮细胞间质中的堆积,减轻肝纤维化程度。孙燕等^[1]的实验研究结果揭示,急、慢性束缚应激均可显著增加内脏敏感性,并且应激时主要表现为对非伤害性机械扩张的内脏敏感性增高,两者具有相似性。

研究发现,在肝纤维化形成过程中,肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSC)激活是中心环节,而 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)是 HSC 活化的标志物。肝损伤导致 HSC 增殖,并由静止状态激活,转变为表达 α -SMA 的肌成纤维细胞,肌成纤维细胞大量合成如 I 型胶原、III 型胶原、纤维连接蛋白等多种细胞外基质,导致肝纤维化的发生^[2-4]。反之,抑制 HSC 的活化(α -SMA 表达降低),就能显著抑制纤维化进程,减少胶原纤维堆积^[5]。

本实验结果显示:与 D+L 组小鼠相比,8 周时 D+L+stress 组小鼠胶原纤维的吸光度值显著降低,同时 α -SMA 的表达量亦显著减少。表明,束缚应激很有可能是通过抑制 HSC 的活化,从而起到抑制肝纤维化的作用。然而,束缚应激对肝脏影响的研究较少^[6-8],一般认为束缚应激是通过下丘脑-垂体-肾上腺轴,再加上自主神经系统、传出的下丘脑-肾上腺髓质-肾上腺素和下丘脑-肝脏交感神经干-去甲肾上腺素轴,依次释放糖皮质激素和儿茶酚胺类递质对肝脏产生影响^[9]。究竟束缚应激是否是通过糖皮质激素和儿茶酚胺类递质对 HSC 的活化产生影响还不清楚,仍需进一步研究。

以往研究显示,束缚应激具有明显的加剧肝损伤的作用,其表现为应激后血清 ALT 浓度显著升高。Sree 等^[10]发现,CCl₄ 造模后附加 2.5 h 高强度完全束缚应激,其血清 ALT 浓度与单纯 CCl₄ 造模相比,显著增高,提示束缚应激具有明显的加剧 CCl₄ 致肝损伤作用。而本研究的结果显示适当程度的束缚应激能够减轻 D+L 诱导的小鼠肝损伤,经 HE 染色和 Masson 染色可见束缚应激可减轻小鼠肝细胞的损伤和肝纤维化的形成,生化检测结果显示束缚应激可显著降低肝损伤小鼠血清 AST 和 ALT 水平。造成这些差异可能有如下主要原因:①采用的束缚应激方式和强度不同。Sree 等^[10]发现,束缚应激造成的肝损伤具有明确的时效性,束缚应激小于 2.5 h 时,肝损伤不明显,而一旦大于这个时间点,束缚应激导致的肝损伤则爆发式的增长。因而之前的束缚应激持续时间一般都大于 2.5 h,有的研究更长达 18 h^[11]。而本实验采取的是低时间强度的束缚应激(0.5 h),大大小于以往研究。②采用的动物模型不同。本研究中应用常规的化学性肝损

伤小鼠模型。Sree D、Abraham 等^[12]的研究应用的是其他类型的动物模型,因此不同的动物模型对束缚应激的反应和敏感性都会不同。③束缚应激对不同类型的肝损伤作用可能不同。④束缚应激对肝脏的作用与肝脏的状态相关。在本研究中束缚应激对肝损伤具有显著的缓解作用,但对处于健康状态的正常肝脏无明显作用。

本研究结果提示,适当的束缚应激对肝损伤具有缓解作用,为将来研发非创伤性方法治疗肝脏疾病提供了新的思路。

(本文图 1,2,5 见彩插 15)。

参 考 文 献

- [1] 孙燕. 束缚应激对大鼠内脏感觉影响的研究 [D]. [博士学位论文] 华中科技大学同济医学院研究生部, 2006.
- [2] 黄艳, 黄成, 李俊. 肝纤维化病程中 Kupffer 细胞分泌的细胞因子对肝星状细胞活化增殖、凋亡的调控 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(1): 9-13.
- [3] Ramadori G, Veit T, Schwogler S, et al. Expression of the gene of the alpha-smooth muscle-actin isoform in rat liver and in rat fat-storing (ITO) cells [J]. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1990, 59: 349-357.
- [4] Enzan H, Himeno H, Iwamura S, et al. Immunohistochemical identification of Ito cells and their myofibroblastic transformation in adult human liver [J]. Virchows Arch, 1994, 424: 249-256.
- [5] Ebrahimkhani MR, Oakley F, Murphy LB, et al. Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-HT(2)B receptor in chronic liver disease [J]. Nat Med, 2011, 17(12): 1668-1673.
- [6] 田菲. 慢性束缚应激致肝损伤及影响空间学习记忆能力的实验研究 [D]. 第四军医大学, 2011.
- [7] 任冰稳. 束缚应激对大鼠代谢和多脏器 PPARs 表达的影响及吡格列酮的干预作用 [D]. 中国人民解放军军医进修学院, 2010.
- [8] 商潇南. 束缚应激对挤压致伤大鼠肝、肺、肾脏器损害的影响 [D]. 河北医科大学, 2012.
- [9] 赵歆, 陈家旭, 杨建新, 等. 疏肝中药复方对慢性束缚应激大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴的调节 [J]. 实验动物科学与管理, 2003, (02): 6-12.
- [10] Sree D, Panuganti, Farah D. et al. Enhanced xenobiotic-induced hepatotoxicity and Kupffer cell activation by restraint-induced stress [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 318: 26-34.
- [11] Bao L, Abe K, Tsang P, et al. Bilberry extract protect restraint stress-induced liver damage through attenuating mitochondrial dysfunction [J]. Fitoterapia, 2010, 81: 1094-1101.
- [12] Abraham G, Gottschalk J, Ungemach FR. Evidence for ototopical glucocorticoid-induced decrease in hypothalamic-pituitary-adrenal axis response and liver function [J]. Endocrinology, 2005, 146(7): 3163-3171.

[收稿日期] 2014-05-19