

联合低剂量口服和腹腔注射硫代乙酰胺诱导大鼠肝硬化及二十二碳六烯酸的抑制作用

胡昇庠¹,武正山²,吴晓峰^{2*}

(¹南京市浦口区中心医院普通外科,江苏 南京 211800;²南京医科大学第一附属医院肝脏外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:采用联合应用低剂量口服和腹腔注射硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA),优化大鼠肝硬化建模方法,并观察二十二碳六烯酸(DHA)抑制肝纤维化的作用。方法:100只雄性SD大鼠随机分为5组:对照组、口服组、腹腔注射组、联合低剂量口服和腹腔注射组及DHA治疗联合组。观察大鼠肝硬化形成率;硬化结节形成及病理观察假小叶形成情况;检测大鼠肝功能指标谷丙氨酸转氨酶(ALT)、内毒素,测定肝组织匀浆过氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)。结果:口服TAA肝硬化模型组诱导16周后死亡2只(死亡率约为10%),假小叶的形成率约为85%,癌变1只(癌变率约为5%)。腹腔注射组诱导10周后死亡5只(死亡率约为25%),假小叶的形成率约为75%。联合组10周后死亡1只(死亡率约为5%),假小叶的形成率约为90%。联合组毒性反应稍小。3组TAA诱导肝硬化模型大鼠ALT水平及内毒素明显高于正常对照组,而3组TAA肝硬化模型诱导组内未见明显差异。治疗组ALT水平及内毒素明显低于3组TAA肝硬化模型诱导组。治疗组MDA水平明显低于3组TAA肝硬化模型诱导组,SOD水平高于3组TAA肝硬化模型诱导组。结论:肝硬化诱导过程中联合低剂量口服和腹腔注射TAA可成功诱导大鼠肝硬化,DHA可改善联合低剂量口服和腹腔注射TAA诱导肝硬化大鼠的肝功能,抑制肝硬化。

[关键词] 硫代乙酰胺;肝硬化;大鼠;二十二碳六烯酸

[中图分类号] R575.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)09-1243-04

doi:10.7655/NYDXBNS20130913

Inhibitory effects of docosahexaenoic acid on liver cirrhosis induced by combined low-dose oral and intraperitoneally injected thioacetamide method in rat

Hu Shengyang¹, Wu Zhengshan², Wu Xiaofeng^{2*}

(¹Department of General Surgery, Central Hospital of Nanjing Pukou District, Nanjing 211800; ²Department of Hepatic Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To induce liver cirrhosis by combined low-dose oral and intraperitoneally injected thioacetamide method, and further investigate the inhibitory effects of docosahexaenoic acid on liver cirrhosis in rat. **Methods:** One hundred male SD rats were divided into five groups: control group, oral group, intraperitoneally injected group, combined group and treatment group with DHA. Formation rate of liver cirrhosis was observed. Cirrhosis nodule and pathological observation of pseudolobule formation was performed. We detected liver function indexes including alanine aminotransferase (ALT), endotoxin determination, liver homogenates superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). **Results:** The toxicity of the combined group is slightly lighter. The mortality in the oral group was 10% (2/20) and cirrhosis rate was 85% (17/20) with one carcinogenesis. Ten weeks after the intraperitoneally injection, the mortality in the oral group was 25% (5/20) and cirrhosis rate was 75% (15/20). In contrast, the mortality in the combined group was 5% (1/20) and cirrhosis rate was 90% (18/20). ALT level and endotoxin of three groups with TAA treatment were significantly higher than those of the normal control group, while there was no significant difference among the three groups with TAA treatment. Furthermore, ALT level and endotoxin of rats treated with DHA were lower than those of three groups with TAA treatment. MDA level of the DHA treatment group was significantly lower than that of the three TAA induced cirrhosis groups, while SOD were significantly higher. **Conclusion:** Combined low-dose oral and intraperitoneally injection of TAA method successfully induced cirrhosis. DHA inhibited liver cirrhosis induced by combined low-dose oral and intraperitoneally injected

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助(30901442)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:13913928386@163.com

thioacetamide method in rat.

[Key words] thioacetamide; liver cirrhosis; rat; docosahexaenoic acid

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(9): 1243-1246]

肝硬化是临床常见的弥漫性肝损害,病理组织学特征为肝小叶结构破坏和假小叶形成。建立一个类似于人类肝硬化的动物模型是进行药物干预肝硬化研究不可缺少的环节。硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)给药的途径、浓度和剂量的不同,可导致诱导肝硬化的时间、成模率和死亡率较大差异。本研究采用联合低剂量口服和腹腔注射硫代乙酰胺诱导大鼠肝硬化模型,在建立理想的肝硬化实验模型的基础上观察二十二碳六烯酸(DHA)抑制肝纤维化的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

纯系清洁级 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 100 只, 雄性, 体重 190~250 g, 由中国科学院上海实验动物中心提供, 在动物实验中心按标准方法饲养。所有大鼠在 23~25℃, 湿度为 55%~65% 环境中自由饮水, 颗粒饲料喂养, 在实验室适应 1 周后开始实验。硫代乙酰胺(TAA, Sigma-aldrich 公司, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 模型分组与处理

将动物随机分为 5 组: 对照组(20 只): 正常饮水, 每周腹腔注射生理盐水 2 次。口服组(20 只): 用传统的口服诱导方法进行诱导, 200 mg/L 的 TAA 饮用水诱导 16 周时间。腹腔注射组(20 只): 用腹腔注射诱导方法进行诱导, 腹腔注射 TAA 200 mg/kg, 每周 2 次, 持续 10 周。联合组(20 只): 用 100 mg/L 的 TAA 饮水持续 10 周, 期间辅以腹腔注射 150 mg/kg, 每周 2 次, 持续 10 周。每 1~2 d 更换 1 次诱导用饮用水, 每次注射 TAA 溶液均为新鲜配制, 以保证饮用水的新鲜和药物浓度的稳定。DHA 治疗联合组(20 只, 简称治疗组): 联合低剂量口服和腹腔注射组成功诱导肝硬化后在饲料中添加 DHA(100 mg/d), 为了保证大鼠每天能摄入规定量的 DHA, 每天喂食前放入少量混有 DHA 的饲料, 待饲料吃完后再放入其他普通饲料。

1.2.2 大体观察

在 TAA 诱导肝硬化模型后, 观察大鼠一般情况及对外界的反应, 记录大鼠的死亡情况及死亡时间。

在 TAA 诱导完成后及 4 周后大鼠于禁食后乙醚麻醉, 观察肝脏的大体变化及作组织切片观察, 采集肝组织, 无菌、无热源条件下腹主动脉取血。治疗组在饲料中添加 DHA 4 周后采集肝组织和血液检测。

1.2.3 组织病理学检查

肉眼观察肝脏的颜色、质地及肝硬化结节形成情况。大鼠肝组织石蜡切片, 切片做 HE 染色, 镜下观察病理组织变化, 包括肝细胞的变性坏死情况, 炎性细胞浸润, 纤维间隔及假小叶的形成等病理变化。以肝脏肉眼观察到硬化结节形成及镜下假小叶形成为肝硬化模型诱导成功。

1.2.4 实验室检查

取腹主动脉血分别测定血浆丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、内毒素(endotoxin); ALT 用连续监测法检测(全自动生化分析仪), 血清内毒素检测采用鲎试剂法。

1.2.5 肝组织匀浆过氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)测定

采用南京建成生物工程公司 SOD、MDA 测定试剂盒按照说明书进行 SOD 活性、MDA 含量的测定。肝组织匀浆上清液中蛋白含量用双缩脲法测定。

1.3 统计学方法

所有资料 SPSS12.0 软件统计, 计数资料采用 χ^2 检验进行比较, 计量资料比较采用方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

正常对照组 SD 大鼠状态良好, 生长正常, 毛发有光泽, 食量及大便正常, 脊柱两侧肌肉层丰满。TAA 诱导肝硬化组在诱导过程中, 大部分大鼠出现不同程度的竖毛, 精神萎靡, 活动减少, 食欲不振, 反应迟钝, 鼠毛粗糙缺乏光泽, 溏泻, 脊柱两侧肌肉层逐渐消失等毒性反应表现。联合组大鼠的毒性反应较口服组和腹腔注射组的反应稍轻。治疗组毒性反应较治疗前好转。

2.2 肝硬化形成率及死亡率情况

对照组 SD 大鼠 10 周肝脏未见明显异常。口服 TAA 肝硬化模型诱导 16 周后死亡 2 只(死亡率约

为 10%),假小叶的形成率为 85%,癌变 1 只(癌变率为 5%)。腹腔注射组诱导 10 周后死亡 5 只(死亡率为 25%),假小叶的形成率约为 75%。联合组 10 周后死亡 1 只(死亡率为 5%),假小叶的形成率为 90%。

2.3 ALT 及内毒素检测结果

3 组 TAA 肝硬化模型诱导组 ALT 水平及内毒素明显高于正常对照组,而 3 组 TAA 肝硬化模型诱导组内未见差异有统计学意义。治疗组 ALT 水平及内毒素明显低于 3 组 TAA 诱导组肝硬化 ($P < 0.05$,表 1)。

表 1 五组 ALT 和内毒素结果比较

Table 1 Comparison of ALT and endotoxin between five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT(U/L)	内毒素(EU/ml)
对照组	10	28.9 ± 4.83	0.328 ± 0.081
口服组	9	97.9 ± 4.83*	0.932 ± 0.483*
腹腔注射组	8	108.8 ± 12.31*	0.830 ± 0.0631*
联合组	10	112.1 ± 14.78*	0.882 ± 0.0758*
治疗组	20	61.5 ± 6.27#	0.568 ± 0.072#

与对照组比较,* $P < 0.05$;与口服组、腹腔注射组、联合组比较,# $P < 0.05$ 。

2.4 肝组织匀浆中 SOD 及 MDA 的变化

3 组 TAA 肝硬化模型诱导组 MDA 水平明显高于正常对照组,SOD 活性明显降低,而 3 组 TAA

肝硬化模型诱导组内 SOD 及 MDA 水平未见差异有统计学意义。治疗组 MDA 水平明显低于 3 组 TAA 肝硬化模型诱导组,SOD 水平高于 3 组 ($P < 0.05$,表 2)。

表 2 五组 SOD 和 MDA 结果比较

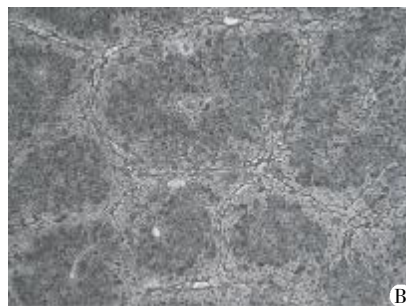
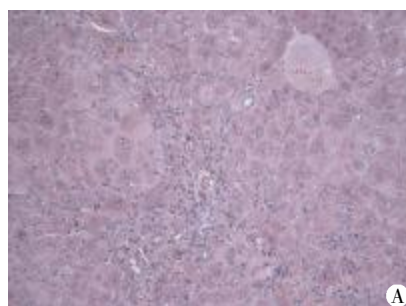
Table 2 Comparison of SOD and MDA between five groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD(U/mgprot)	MDA(nmol/mgprot)
对照组	10	92.3 ± 12.38	1.68 ± 0.32
口服组	9	52.1 ± 7.27*	2.96 ± 0.32*
腹腔注射组	8	47.1 ± 8.47*	2.71 ± 0.28*
联合组	10	55.2 ± 4.92*	3.11 ± 0.42*
治疗组	20	83.2 ± 6.93#	2.03 ± 0.26#

与对照组比较,* $P < 0.05$;与口服组、腹腔注射组、联合组比较,# $P < 0.05$ 。

2.5 组织学变化

对照组大鼠肝脏颜色质地正常,表面光滑无结节,肝小叶结构完整,肝细胞索排列整齐,细胞大小一致,以中央静脉为中心呈放射状,肝窦无狭窄,小叶及汇管区无炎性细胞浸润,细胞核清晰。TAA 肝硬化模型诱导组大鼠肝表面粗糙伴有广泛的弥漫性结节形成。光镜下观察到纤维间隔明显增生,肝小叶结构紊乱,肝内假小叶广泛形成(图 1)。治疗组弥漫性结节形成及假小叶较对照组好转。



A:HE 染色提示假小叶形成;B:Masson 染色提示包绕假小叶的纤维组织主要由胶原纤维构成。

图 1 TAA 诱导肝硬化模型大鼠肝细胞病理学结果($\times 200$)

Figure 1 Pathological results of liver cells of liver cirrhosis rats induced by injection of TAA method($\times 200$)

3 讨论

TAA 诱导的动物肝硬化模型和人类肝硬化血流动力学、形态学及生化代谢的改变最相似,成功率高不易逆转,是一种经典的肝硬化模型。TAA 对肝硬化的发生具有启动和促进作用,其机制是 TAA 影响蛋白合成及肝细胞中酶的代谢诱导慢性肝损伤,从而引起纤维组织在局部沉积,其形成的动物模型与

人肝硬化相似^[1]。与另外一种常用的诱导肝硬化药物四氯化碳(CCl_4)相比,TAA 诱导的肝硬化模型在停药后肝硬化程度可保持稳定,在停药后肝硬化程度不会减退,因此 TAA 从诱导的肝硬化更为理想^[2]。

TAA 可经口服、皮下或腹腔内注射等途径诱导实验动物肝硬化。口服主要经饮用水给予 TAA,具有简便、无创、肝内药物浓度高于外周血中药物浓度,损害相对较轻,但是诱导周期长达 4~6 个月,而

且肝细胞容易癌变^[3-4]。采用腹腔注射诱导肝硬化较口服易于控制大鼠 TAA 的用量,差异小,有较好的重复性和可控性,而且诱导时间短,只需 8~10 周,可减少肝细胞癌变的可能,然而腹腔内注射诱导死亡率高,成模率较低。如何缩短诱导肝硬化的周期,提高肝硬化大鼠的成模率,降低死亡率,一直是肝硬化动物实验研究的重要课题。有国内学者报道效仿 CCl₄ 诱导肝硬化中采用根据诱导过程中大鼠体重的变化调整 TAA 用量的个体化策略,可以减少诱导肝硬化的大鼠死亡率,提高成功率^[5-6]。但是该方法操作繁琐,工作量加大,不利于批量复制肝硬化模型。

本研究联合低剂量口服和腹腔注射 TAA 诱导肝硬化大鼠毒性反应较传统的口服和腹腔注射组的反应小,死亡率降低,诱导肝硬化成功的大鼠肝功能损害指标 ALT 和传统的口服组及腹腔注射组相似,而且在传统腹腔注射诱导肝硬化的周期内诱导肝硬化的成功率较高。本实验通过联合低剂量口服和腹腔注射 TAA 诱导大鼠肝硬化模型,两种方法取长补短,解决了周期过长和大鼠在诱导过程中死亡的问题,从而建立一种更稳定的肝硬化模型。临床肝病多伴有肠源性内毒素血症,使用 TAA 诱导肝硬化后引起大鼠血清内毒素含量明显高于对照组,可能因为肝硬化继发引起的肠源性内毒素血症。本文检测了造模成功后肝硬化大鼠血液内毒素含量,发现口服组、腹腔注射组、联合组 TAA 诱导的肝硬化大鼠血液内毒素含量高于对照组,说明内毒素血症可成为大鼠肝硬化造模成功的指标之一。

DHA 是一种对人体非常重要的多不饱和脂肪酸,属于 Omega-3 不饱和脂肪酸家族中的重要成员。DHA 是神经系统细胞生长及维持的一种主要元素。最近有研究显示 DHA 抑制非酒精性脂肪性肝炎(NASH)相关的肝脏损伤或纤维化。其机制为 DHA 调控核因子-(NF) κ B 可以减轻炎症和纤维化、调节 NADPH 氧化酶亚基改善氧化应激^[7]。在 LPS 诱导的肝损伤模型中,应用含有 DHA 的鱼油可以通过抑制 TLR4 和 NOD 信号转导通路而改善肝脏炎症^[8]。本研究表明 DHA 治疗组 ALT 水平及内毒

素明显低于 3 组 TAA 诱导肝硬化组,提示 DHA 抑制联合低剂量口服和腹腔注射 TAA 诱导大鼠肝硬化。DHA 治疗组 MDA 水平明显低于 3 组 TAA 肝硬化模型诱导组,SOD 水平高于 3 组。但是其确切机制尚待进一步研究。本研究提示肝硬化患者可口服 DHA 改善肝脏炎症和纤维化,可成为肝硬化潜在的治疗策略。

[参考文献]

- [1] Waters NJ, Waterfield CJ, Farrant RD, et al. Metabonomic deconvolution of embedded toxicity: application to thioacetamide hepato- and nephrotoxicity [J]. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18(4): 639-654
- [2] Olsen AL, Sackey BK, Marcinkiewicz C, et al. Fibronectin extra domain-A promotes hepatic stellate cell motility but not differentiation into myofibroblasts [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(4): 928-937
- [3] Mangipudy RS, Chanda S, Mehendale HM. Tissue repair response as a function of dose in thioacetamide hepatotoxicity [J]. *Environ. Health Perspect*, 1995, 103(3): 260-267
- [4] 杭菁, 胡建群, 王剑翔, 等. 超声造影对肝硬化定量诊断的实验研究 [J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2008, 28(4): 527-529
- [5] 张谊, 张启瑜, 廖毅, 等. 硫代乙酰胺剂量个体化诱导大鼠肝硬化门脉高压模型 [J]. *肝胆胰外科杂志*, 2007, 19(3): 164-167
- [6] 李向农. 体重监测下硫代乙酰胺诱导豚鼠肝纤维化模型 [J]. *中华普通外科杂志*, 2004, 19(4): 239-241
- [7] Depner CM, Philbrick KA, Jump DB. Docosahexaenoic acid attenuates hepatic inflammation, oxidative stress, and fibrosis without decreasing hepatosteatosis in a Ldlr^{-/-} Mouse Model of western Diet-Induced nonalcoholic steatohepatitis [J]. *J Nutr*, 2013, 143(3): 315-323
- [8] Chen F, Liu Y, Zhu H, et al. Fish oil attenuates liver injury caused by LPS in weaned pigs associated with inhibition of TLR4 and nucleotide-binding oligomerization domain protein signaling pathways [J]. *Innate Immun.*, 2013, [Epub ahead of print]

[收稿日期] 2013-03-17