

【医药与卫生】

DOI: 10.14168/j.issn.1673-4939.2015.03.11

# 大鼠再生肝抗四氯化碳损伤的动态评估

吕慧明<sup>①</sup>

(辽东学院 医学院, 辽宁 丹东 118003)

**摘 要:** 肝再生是肝脏对于切除或毒性损害后的代偿反应。再生肝对于四氯化碳 (CCl<sub>4</sub>) 等肝毒剂有一定的耐受, 但不同时间点再生肝的抗损伤能力及其评估指标还不明确。本研究利用大鼠肝再生及 CCl<sub>4</sub> 损伤模型, 检测不同时间点再生肝组织内 CCl<sub>4</sub> 代谢引起的病理及生化指标变化, 观察不同时间点再生肝对 CCl<sub>4</sub> 损伤的耐受情况, 为探明肝切除、肝移植等治疗过程中肝脏抗损伤机制提供实验依据。结果表明: 肝切后 24 h 内再生肝抗损伤能力差, 随着肝脏不断的再生, 抗损伤能力逐渐增强, 至 96 h 抗损伤能力最强。因此得出结论: 再生肝在 96 h 对 CCl<sub>4</sub> 具有最强的耐受能力; 丙二醛、谷丙转氨酶、谷草转氨酶及三磷酸腺苷等含量的动态变化可以作为评估再生肝抗 CCl<sub>4</sub> 损伤能力的生化指标。

**关键词:** 再生肝; 四氯化碳; 丙二醛; 谷丙转氨酶; 谷草转氨酶; 三磷酸腺苷

**中图分类号:** R364.3   **文献标志码:** A   **文章编号:** 1673-4939 (2015) 03-0195-05

肝脏是腹腔内最大的实质性消化器官, 担负人体的重要生理功能。肝脏具有很强的再生能力, 是肝脏对于切除或毒性损害后的一种代偿反应。再生肝脏有一重要的生理特征, 即具有很强的抗损伤能力, 其机制一直是肝脏生理研究的热点。再生肝对于四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>) 等肝毒剂有一定的抗损伤能力<sup>[1,2]</sup>, 但不同时间点的再生肝, 其抗损伤能力还不十分清楚。如果能动态观察不同时间点再生肝抗损伤及其相关生理、生化指标的变化, 将有助于进一步了解再生肝的抗损伤机制。对于肝再生过程中抗损伤机制的研究, 不仅可以深入认识肝脏生理活动的规律, 揭示肝再生的调控机制, 也将为临床肝病治疗, 包括部分肝切除及肝移植等过程中再生肝的应用提供有价值的实验及理论依据。

CCl<sub>4</sub> 是一种经典的亲肝毒物。肝毒剂 CCl<sub>4</sub> 进入机体后, 在肝细胞内质网中经细胞色素 P-450 酶代谢产生自由基。自由基可与细胞内大分子发生共价结合, 使生物大分子, 尤其是酶的功能丧失, 从而出现细胞损伤。自由基可以诱导生成大量活性

氧 (ROS), ROS 与细胞膜上的不饱和脂肪酸结合, 使膜脂质过氧化产生丙二醛 (MDA), 破坏细胞膜功能。目前的研究表明, ROS 增多是 CCl<sub>4</sub> 诱导肝损伤的主要原因<sup>[3]</sup>。CCl<sub>4</sub> 损伤肝细胞, 细胞内标志性酶谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 释放入血, 血清 ALT、AST 升高能灵敏地反映肝损伤的程度。CCl<sub>4</sub> 诱导产生的 ROS 能够损坏线粒体呼吸链, 导致三磷酸腺苷 (ATP) 的生成减少<sup>[4-7]</sup>。因此, 探明再生肝抗四氯化碳损伤的动态过程, 及明确该过程中各种生化指标的动态变化对于评估再生肝的抗损伤能力具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组

健康雄性 Wistar 大鼠 91 只, 随机分为正常组 (Control)、假手术损伤组 (SO/CCl<sub>4</sub>)、肝切组 (PH) 和肝切损伤组 (PH/CCl<sub>4</sub>), 除正常组为 7 只大鼠外, 其余 3 组每组 28 只, 每个时间点 7 只, 分别于术后 24 h、48 h、72 h、96 h 进行实验。

① 收稿日期: 2015-03-02

基金项目: 辽东学院自然科学研究青年基金项目 (2014Y41)

作者简介: 吕慧明 (1979—), 女, 辽宁丹东人, 硕士, 讲师, 研究方向: 肝脏生理及病理学。

### 1.2 再生肝抗 CCl<sub>4</sub> 损伤模型制备

禁食 12 h 后, 大鼠按 Higgins 和 Anderson 方法在乙醚麻醉下行 70% 肝部分切除术, 假手术损伤组不实施肝切外, 其余操作与肝切组相同, 术后大鼠正常进食饮水。假手术损伤组和肝切损伤组分别在术后 24 h、48 h、72 h、96 h 按 5 mL/kg 体重给予 50% CCl<sub>4</sub> (1:1, CCl<sub>4</sub>: 豆油) 灌胃, 肝切组按同样剂量和方式只给豆油。

### 1.3 肝组织形态学观察

实行假手术的动物取右叶肝组织, 实行肝切的动物取再生的肝组织 10 mm × 15 mm × 15 mm 大小。分别剪掉所取肝组织的结缔组织, 然后进行 10% 中性福尔马林固定, 常规石蜡包埋。每组 5 个标本, 每个标本切 3 ~ 4 μm 厚的切片 5 张, 进行 HE 染色。

### 1.4 血清生化指标检测

不同处理组的实验动物在 CCl<sub>4</sub> 损伤 24h 后断头取血。血样装入肝素化的离心管 4℃ 离心 3 000 rpm × 15 min, 取上清。按试剂盒说明书对谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 含量进行测定。

### 1.5 肝组织丙二醛含量测定

取肝组织 0.5 g, 加入 4.5 mL PBS 缓冲液制成 10% 匀浆, 3 000 rpm 离心 15 min 后取上清。按试剂盒说明书操作测定丙二醛 (MDA) 含量。上述操作均在冰上进行。Bradford 法测定蛋白含量。

### 1.6 肝组织三磷酸腺苷 (ATP) 水平测定

取右叶肝组织 1.0 g, 加入 4 倍体积生理盐水制成 20% 匀浆, 沸水浴 5 min, 离心 3 000 rpm × 10 min, 取上清。Bradford 法测定蛋白含量。调整蛋白浓度使各组保持一致。按照 ATP 试剂盒说明书用化学发光仪测定发光强度。上述操作均在 0℃ 进行。

### 1.7 统计学分析

数据以均数 ± 标准差 (Mean ± SE) 表示, 统计学分析采用 SPSS 17.0 软件。数据采用 One-way ANOVA 进行统计分析, 组间差异的比较选用 Student Newman-keuls Comparison Tests。P < 0.05 有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝再生不同时间点 CCl<sub>4</sub> 损伤后肝组织形态学改变

显微镜下观察 HE 染色图片可见 (图 1): 肝

再生 24 h 时损伤组损伤最为严重, 肝细胞有大量的脂肪变性、气球样变和坏死, 肝小叶结构破坏, 条索状排列消失。随着肝脏的再生时间延长, CCl<sub>4</sub> 诱发的肝脏损伤程度逐渐减轻, 至 96 h 时形态已接近正常。

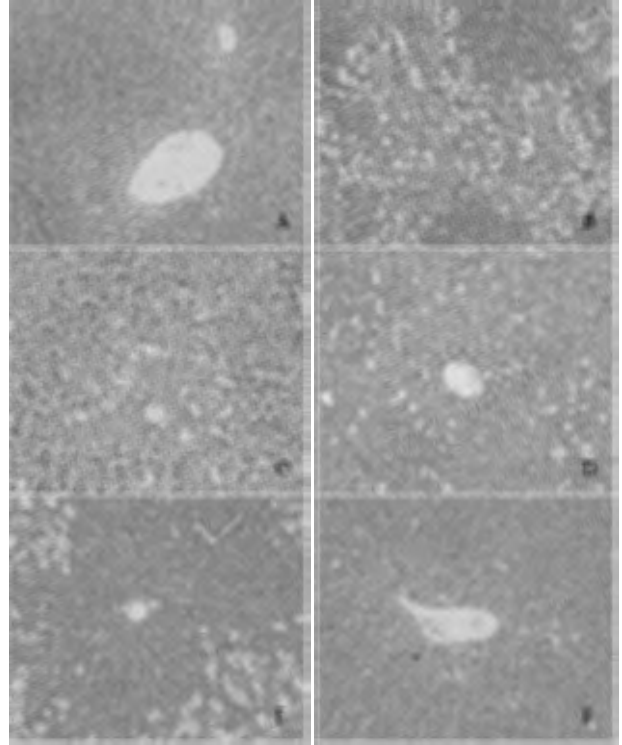


图1 CCl<sub>4</sub>染毒后再生肝组织的形态学改变(100×) (n=5)

A (正常组): 肝细胞形态正常, 中央静脉周围肝细胞索排列紧密; B (SO/CCl<sub>4</sub> 组): 假手术损伤组肝组织在中央静脉和小叶下静脉周围有肝细胞气球样变、出血、坏死及炎细胞浸润, 肝小叶结构破坏, 条索状排列消失; C (PH24h/CCl<sub>4</sub> 组): 肝组织中央静脉和小叶下静脉周围有广泛、大量的肝细胞脂肪样变、出血、坏死及炎细胞浸润, 肝小叶结构严重破坏, 条索状排列消失; D、E (PH48 h/CCl<sub>4</sub> 组、PH72 h/CCl<sub>4</sub> 组): 肝组织中央静脉和小叶下静脉周围肝细胞脂肪样变、出血、坏死及炎细胞浸润逐渐减少, 肝小叶结构逐渐恢复, 条索状排列出现; F (PH96 h/CCl<sub>4</sub> 组): 再生肝细胞小叶结构破坏较轻, 条索状排列保留, 只有轻度脂肪变性, 局部区域有炎细胞浸润, 无肝细胞坏死。

### 2.2 肝再生不同时间点 CCl<sub>4</sub> 损伤后血清转氨酶含量的改变

肝切组 (图 2、3) 肝切 24 h 后, 血清中 ALT、AST 均显著升高, 约为正常组的 10 倍; 随着肝切后肝的再生, ALT、AST 水平逐渐下降, 至肝切 96 h 时已接近于正常水平。肝切损伤组 (图 2、3) 各时间点的 ALT、AST 水平比肝切组均有所

上升,在24 h时 ALT、AST 约为假手术损伤组的3倍 ( $P < 0.001$ ),随着再生的延续,血清 ALT、AST 水平逐渐下降,至96 h时,ALT、AST 水平明显低于假手术损伤组 ( $P < 0.001$ ),也明显低于24 h 的 ALT、AST 水平 ( $P < 0.001$ )。

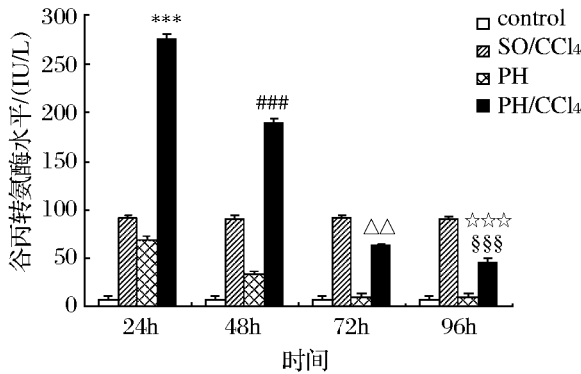


图2 CCl<sub>4</sub> 染毒后血清谷丙转氨酶 (ALT) 水平的改变 (n=5)

( $***P < 0.001$ , PH24 h/CCl<sub>4</sub> 组 vs. SO24 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $###P < 0.001$ , PH48 h/CCl<sub>4</sub> 组 vs. SO48 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $\Delta\Delta P < 0.01$ , PH72 h/CCl<sub>4</sub> 组 vs. SO72 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $§§§P < 0.001$ , PH96 h/CCl<sub>4</sub> 组 vs. SO96 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $***P < 0.001$ , PH96 h/CCl<sub>4</sub> 组 vs. PH24 h/CCl<sub>4</sub> 组)

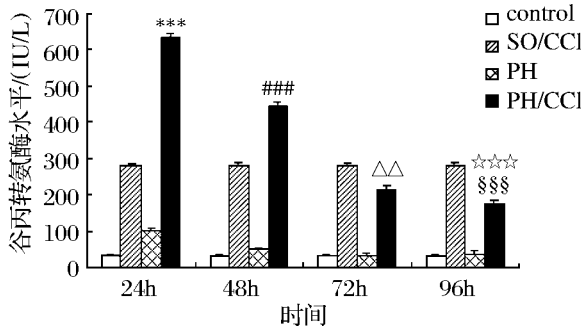


图3 CCl<sub>4</sub> 染毒后血清谷草转氨酶 (AST) 水平的改变 (n=5)

( $***P < 0.001$  vs. SO24 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $###P < 0.001$  vs. SO48 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs. SO72 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $§§§P < 0.001$  vs. SO96 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $***P < 0.001$  vs. PH24 h/CCl<sub>4</sub> 组)

### 2.3 肝再生不同时间点 CCl<sub>4</sub> 损伤后肝组织内丙二醛 (MDA) 含量的改变

MDA 测定结果如图4所示,肝切组肝切后24 h,肝组织中 MDA 含量明显增多,随着肝脏的再生,MDA 含量逐渐下降,至96 h时 MDA 含量接近于正常水平。CCl<sub>4</sub> 染毒后各时间点肝组织内的 MDA 含量均增加,24 h 的 MDA 含量明显高于假手

术损伤组 ( $P < 0.001$ );随着时间的延长肝组织中 MDA 含量逐渐降低,至96h 时肝组织中 MDA 含量低于假手术损伤组 ( $P < 0.01$ ) 和24 h ( $P < 0.001$ )。

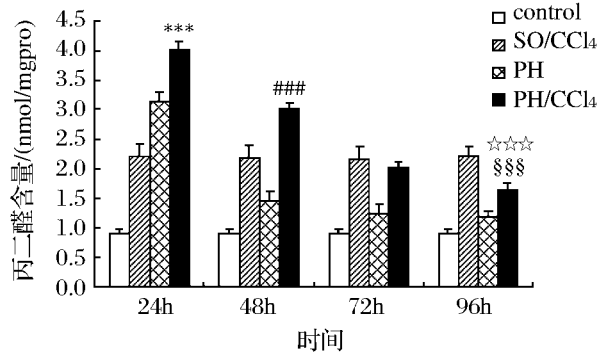


图4 CCl<sub>4</sub> 染毒后再生肝组织丙二醛 (MDA) 含量的改变 (n=5)

( $***P < 0.001$  vs. SO24 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $###P < 0.001$  vs. SO48 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $§§P < 0.01$  vs. SO96 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $***P < 0.001$  vs. PH24 h/CCl<sub>4</sub> 组)

### 2.4 肝再生不同时间点 CCl<sub>4</sub> 损伤后肝组织内 ATP 水平的改变

肝组织 ATP 测定结果 (图5) 所示,肝切组肝切后24 h 肝组织内 ATP 含量明显下降,随着肝脏的再生,肝组织内的 ATP 含量逐渐恢复,到96 h 时 ATP 含量明显高于正常组。CCl<sub>4</sub> 损伤后各时间点肝组织中 ATP 含量均明显下降,24 h 时 ATP 含量较低,与假手术损伤组相比有显著性差异 ( $P < 0.001$ ),随着肝再生,ATP 水平逐渐升高,至96h 时明显高于假手术损伤组 ( $P < 0.001$ ) 和24 h ( $P < 0.001$ )。

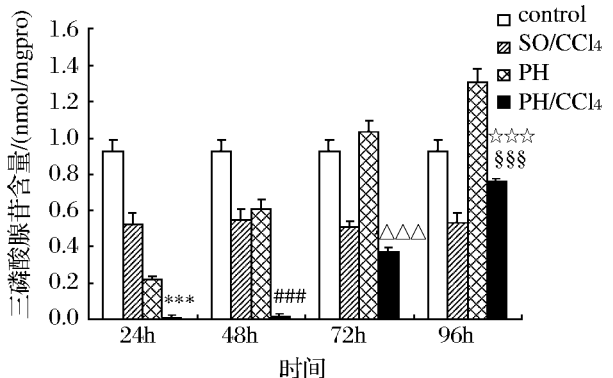


图5 CCl<sub>4</sub> 染毒后再生肝脏三磷酸腺苷 (ATP) 水平的变化 (n=5)

( $***P < 0.001$  vs. SO24 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $###P < 0.001$  vs. SO48 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$  vs. SO72 h/CCl<sub>4</sub> 组;  $§§§P < 0.001$  vs. PH24 h/CCl<sub>4</sub> 组)

< 0.001 vs. S096 h/CCl<sub>4</sub>组;\*\*\*P < 0.001 vs. PH24 h/CCl<sub>4</sub>组)

### 3 讨论

目前,肝大部切除术及肝移植仍然是治疗肝肿瘤等肝实质性疾病的主要方法<sup>[8]</sup>。在肝脏的切除过程中无法避免发生肝损伤,而当肝脏受损伤尤其是大部分切除后,肝细胞又具有很强的再生能力。CCl<sub>4</sub>是一种经典的亲肝毒物,肝再生过程中的CCl<sub>4</sub>暴露能够有效模拟再生肝的抗损伤过程。肝毒剂CCl<sub>4</sub>进入机体后,立即启动肝细胞内酶的抗CCl<sub>4</sub>代谢反应,产生大量的ROS。已有研究表明,ROS增多是CCl<sub>4</sub>诱导肝损伤的主要原因<sup>[9,10]</sup>。CCl<sub>4</sub>损伤肝细胞,细胞内标志性酶ALT、AST释放入血,血清ALT、AST升高并能灵敏地反映肝损伤的程度。形态学上主要表现为肝小叶中央区坏死和脂肪变性。

在建立的大鼠再生肝抗CCl<sub>4</sub>损伤模型中,我们观察到肝再生不同时间点CCl<sub>4</sub>损伤后,血清ALT、AST在肝再生24h时显著升高,明显高于假手术损伤组和肝再生96h时。随着肝再生时间的延长,血清ALT、AST水平逐渐下降,至96h时,明显低于假手术损伤组。HE染色显示,肝再生24h时损伤组损伤最为严重,肝细胞有大量的脂肪变性、气球样变和坏死,肝小叶结构破坏,条索状排列消失。随着肝脏的再生,肝脏损伤程度逐渐减轻,至96h时形态已接近正常,CCl<sub>4</sub>诱发的损伤改变轻微。这些都说明肝切除后随着肝脏不断的再生其损伤的程度由重到轻,形态逐渐恢复,对损伤的耐受能力逐渐提高,抗损伤的能力逐渐增强。在再生24h时抗损伤的能力较差,随着肝的再生,其抗损伤的能力逐渐增强,到再生96h时其抗损伤的能力已明显强于假手术损伤组。

由于ROS是CCl<sub>4</sub>诱导肝损伤的主要原因,因此我们检测了CCl<sub>4</sub>损伤后的各组肝组织内的ROS水平。MDA是ROS与细胞膜上多聚不饱和脂肪酸发生脂质氧化反应的产物之一,可以通过检测MDA的含量来反映脂质过氧化及氧化损伤的程度,

间接反映ROS的水平。从实验结果可知,CCl<sub>4</sub>染毒可以增加肝组织内MDA的含量,但不同时间点的再生肝由CCl<sub>4</sub>毒性作用所致的MDA含量有所不同。96h时的再生肝中MDA的含量较少,明显低于假手术损伤组和其他各时间点。从MDA的实验结果可以看出,随着肝脏不断的再生,CCl<sub>4</sub>染毒后其脂质过氧化程度由高到低,CCl<sub>4</sub>诱导的肝损伤由重到轻。线粒体呼吸链是产生ATP的主要场所,ROS导致的线粒体呼吸链复合物受损,能够抑制ATP生成<sup>[11]</sup>。因此,在本研究中我们观察到线粒体内MDA与ATP的含量呈现相反的变化趋势。

综上所述,再生肝在受到CCl<sub>4</sub>损伤时,随着时间的推移,肝组织的ROS水平由高到低,血清中ALT、AST的含量逐渐减少,而肝组织线粒体内生成的ATP逐渐增多,表明肝脏的损伤程度由重到轻,体现了不断再生的肝脏抗CCl<sub>4</sub>损伤的能力在逐渐增强,最佳耐受时间为96h。因此,探明肝损伤后再生过程中肝实质的病理改变及实时监测ALT、AST、MDA及ATP等生化指标含量的动态变化可以评估再生肝抗CCl<sub>4</sub>损伤的能力。

#### 参考文献:

- [1] LIN C Y, TSAI Z Y, CHENG I C, et al. Effects of fermented soy milk on the liver lipids under oxidative stress [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11 (46): 7355 - 7358.
- [2] COLLINS P, JONES C, CHOUDHURY S, et al. Increased expression of uncoupling protein 2 in HepG2 cells attenuates oxidative damage and apoptosis [J]. *Liver Int*, 2005, 25 (4): 880 - 887.
- [3] WAYPA G B, MARKS J D, MACK M M, et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger calcium increases during hypoxia in pulmonary arterial myocytes [J]. *Circ Res*, 2002, 91 (8): 719 - 726.
- [4] SENER G, TOKLU H Z, SEHIRLI A O, et al. Protective effects of resveratrol against acetaminophen - induced toxicity in mice [J]. *Hepatol Res*, 2006, 35 (1): 62 - 68.
- [5] DEY A, CEDERBAUM A I. Ethanol - induced oxidative stress plays a major role in the mechanisms by which etha-

- nol produces liver injury [J]. *Hepatology*, 2006, 43 (2): 63-74.
- [6] TANG X H, GAO L, GAO J, et al. Mechanisms of hepatoprotection of *Terminalia catappa* L. extract on D-Galactosamine-induced liver damage [J]. *Am J Chin Med*, 2004, 32 (4): 509-519.
- [7] OSAWA Y, NAGAKI M, BANNO Y, et al. Possible involvement of reactive oxygen species in D-galactosamine-induced sensitization against tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced hepatocyte apoptosis [J]. *J Cell Physiol*, 2001, 187 (3): 374-385.
- [8] 于生金. 乙酰肝素酶/多配体蛋白聚糖-1轴对癌细胞增殖的调控作用 [J]. *辽东学院学报: 自然科学版*, 2014, 21 (3): 162-166.
- [9] CAI Y, GONG L K, QI X M, et al. Apoptosis initiated by carbon tetrachloride in mitochondria of rat primary cultured hepatocytes [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26 (8): 969-975.
- [10] LOPZ-DIAZGUERRERO N E, LUNA-LOPEZ A, GUTIERREZ-RUIZ M C, et al. Susceptibility of DNA to oxidative stressors in young and aging mice [J]. *Life Sci*, 2005, 77 (22): 2840-2854.
- [11] WALLACE D C. Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases [J]. *Science*, 1992, 256: 628-632.

(责任编辑: 鞠衍清)

## Resistance against Carbon Tetrachloride Poisoning in Regenerating Liver of Rats: a Dynamic Evaluation

LÜ Hui-ming

(College of Medicine, Eastern Liaoning University, Dandong 118003, China)

**Abstract:** The liver has the potent capacity to regenerate. It is a compensated regeneration of liver to damage or lost liver cell mass. It is known that regenerating liver possess the protection against many hepatic toxins such as carbon tetrachloride ( $\text{CCl}_4$ ). But the self-protection against damage of regenerating liver at different time points and assessment index are unclear. The models of regenerating liver and  $\text{CCl}_4$  injury are used for detecting the liver pathology and the change of biochemical indicators due to the  $\text{CCl}_4$  injury in regenerating liver, and observing the tolerance ability of regenerating liver at different time points to  $\text{CCl}_4$  injury. This study can provide the theoretical basis for investigating the mechanism of liver anti-damage during the treatment of partial hepatectomy (PH) and liver transplant. The results demonstrate that regenerating liver possesses the weakest self-protection against damage at 24 hours after PH. By 96 hours after PH, the capacity of self-protection against is the strongest. In conclusion, regenerating liver has the strongest ability to resist  $\text{CCl}_4$  at 96 hours after PH. The dynamic changes of malondialdehyde (MDA), serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and adenosine triphosphate (ATP) can assess the ability of liver anti- $\text{CCl}_4$  injury.

**Key words:** regenerating liver;  $\text{CCl}_4$ ; ROS; ALT; AST; ATP