

## 暴发性肝功能衰竭小鼠模型的建立及其治疗研究

高峰<sup>1</sup>, 陈嘉薇<sup>1</sup>, 韩伟<sup>2</sup>, 杨宝山<sup>2</sup>, 马英骥<sup>2</sup>

(1. 上海市第一人民医院病理科, 上海 200080; 2. 哈尔滨医科大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

**【摘要】** 目的: 建立暴发性肝功能衰竭(FLF)小鼠模型并探讨复方甘草酸苷(SNMC)的保护作用及可能的作用机制。方法: 采用 D-氨基半乳糖(D-Galn)和脂多糖(LPS)一次性腹腔注射构建 FLF 小鼠模型。利用光镜、电镜观察小鼠肝损伤情况; 应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)检测肝细胞原位凋亡情况; 应用免疫组化法分别检测肝组织中细胞色素 C 和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)的表达。结果: D-Galn 加 LPS 可成功构建 FLF 小鼠模型。光镜及电镜可见肝细胞大量凋亡, 且凋亡情况随治疗时间的延长明显改善。TUNEL 检测结果表明, 随着 SNMC 治疗时间的延长, 凋亡指数逐渐降低。细胞色素 C 和 caspase-3 在模型组细胞阳性表达明显增加, 随 SNMC 治疗时间延长表达逐渐减少。结论: 利用 D-Galn 和 LPS 可以构建理想的 FLF 小鼠模型。SNMC 能有效抑制小鼠 FLF 模型中的肝细胞凋亡。SNMC 可能通过稳定线粒体膜抑制细胞色素 C 释放及其随后 caspase-3 活化, 从而阻断肝细胞凋亡的进行。

**【关键词】** 复方甘草酸苷; D-氨基半乳糖; 脂多糖; 肝功能衰竭, 暴发性; 动物模型

中图分类号: R256.4; R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1008-9691(2006)06-0361-04

**Establishment of reduplicated model of fulminant liver failure and research on its treatment** GAO Feng<sup>1</sup>, CHEN Jia-wei<sup>1</sup>, HAN Wei<sup>2</sup>, YANG Bao-shan<sup>2</sup>, MA Ying-ji<sup>2</sup>. 1. Department of Pathology, the First People's Hospital, Shanghai 200080, China; 2. the First Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang, China

**【Abstract】** **Objective:** To reduplicate the models of fulminant liver failure (FLF) of mice and investigate the protective effect of stronger neo-minophagen C (SNMC) on FLF. **Methods:** D-galactosamine (D-Galn) and lipopolysaccharide (LPS) were injected into the abdominal cavity of mice once to establish experimental model of FLF. The damage of liver was detected by light microscope and electron microscope. The hepatocyte apoptosis in-situ was estimated by terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL). Cytochrome C (CYC) and caspase-3 in liver tissues were determined by immuno histochemistry. **Results:** D-Galn and LPS could be used to reduplicate the models of FLF. In the model, a lot of hepatocyte apoptosis was estimated by light microscope and electron microscope, and improved with prolongation of the therapeutic time. TUNEL assay revealed that the apoptosis index was gradually decreased after the prolongation of the therapeutic time of SNMC. The cellular positive expressions of CYC and caspase-3 were strong in the model group, and they were decreased with prolongations of SNMC therapeutic time in the treatment group. **Conclusion:** D-Galn and LPS can be used to establish a perfect model of FLF. SNMC can effectively inhibit the hepatocyte apoptosis in the models of FLF. Its inhibitions of the release of CYC and the activation of caspase-3 are possibly by stabilizing the membrane of mitochondria inhibiting release of CYC and activation of caspase-3, thus the progress of hepatocyte apoptosis can be prevented.

**【Key words】** stronger neo-minophagen C; D-galactosamine; lipopolysaccharide; fulminant liver failure; animal model

暴发性肝功能衰竭(FLF)是一种由各种因素导致的急性或亚急性大块肝细胞坏死,临床上以引起凝血酶原时间显著延长及肝性脑病为其特征。研究证实,肝细胞的异常凋亡在重型肝炎发病中起重要作用<sup>[1,2]</sup>。以甘草酸为主要成分的复方甘草酸苷(SNMC)具有抗炎及免疫调节等作用。临床经验证

实,SNMC 具有明确的肝细胞保护作用,但其保护机制尚未十分明确。目前对重症肝炎发病机制的研究多集中于 Fas/FasL 以及肿瘤坏死因子(TNF)等所介导的肝细胞凋亡,而对线粒体中细胞色素 C 在肝细胞异常凋亡中所起的作用方面却少有报道。本实验中通过建立小鼠 FLF 模型,探讨线粒体及细胞色素 C 在重型肝炎发病机制中的作用及 SNMC 抑制肝细胞凋亡的可能机制。

作者简介: 高峰(1972~),男(汉族),河北滦县人,医学硕士,讲师,主治医师(Email: gaof891@yahoo.com.cn)。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物:**10~12 周龄昆明种小鼠 70 只,雌雄各半,体重 20~22 g,由哈尔滨医科大学第一临床医学院动物实验中心提供。

**1.2 实验材料:**D-氨基半乳糖(D-Galn)、细菌脂多糖(LPS)均购自 Sigma 公司;SNMC 由日本美能发源制药公司提供;兔抗小鼠天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)单克隆抗体(单抗)购自 Sigma 公司;抗细胞色素 C 抗体、免疫组化染色试剂盒和末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。

**1.3 实验动物分组及处理:**采用随机数字表法将小鼠分为正常对照组(7 只)、模型组(15 只)和 SNMC 保护组(48 只)3 组。正常对照组腹腔注射生理盐水 0.2 ml;模型组采用一次性腹腔注射 D-Galn 1 000 mg/kg + LPS 100  $\mu$ g/kg 制备小鼠 FLF 模型,其肝组织病理学变化相当于重型肝炎肝组织的病理特征;SNMC 保护组同时经腹腔注射 SNMC 1 ml/kg,每日 2 次。正常对照组小鼠注射后 6、9 和 12 h,1、3、5 和 7 d 分别断颈处死;模型组小鼠于用药后 6、9 和 12 h 分别断颈处死,每个时间点 5 只;SNMC 保护组小鼠于用药后 9 h、12 h 及 1、3、5 和 7 d 分别断颈处死,每个时间点 8 只。打开腹腔,摘取肝左叶,切取肝组织 3 块,1 块用体积分数为 2.5% 的戊二醛固定,用于电镜分析;剩余 2 块用体积分数为 4% 的多聚甲醛固定,石蜡包埋、切片备检。

**1.4 TUNEL 原位肝细胞凋亡检测:**石蜡切片,常规脱蜡、水化,用细胞凋亡检测试剂盒检测肝细胞凋亡情况,最后常规 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染,中性树胶封固。计算凋亡指数并判定肝细胞凋亡程度,每组各时间点观察 2 张切片,每张切片分析 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,计数凋亡细胞百分比的均数为凋亡指数<sup>[3]</sup>。细胞核无棕褐色染色为阴性;细胞核呈棕褐色染色为阳性。

**1.5 细胞色素 C 及 caspase-3 检测:**石蜡切片,常规脱蜡、水化,用免疫组化试剂盒检测细胞色素 C 及 caspase-3。Caspase-3 抗体稀释 1:100,抗细胞色素 C 抗体稀释 1:100。最后常规 DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封固。细胞胞浆呈棕黄色染色为阳性。

**1.6 统计学处理:**数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 光镜观察:**正常对照组肝组织切片苏木素-伊红(HE)染色显示,肝小叶结构清晰,肝细胞索呈放射状排列,肝血窦清晰。模型组 6 h 显示肝细胞水肿明显,可见少量凋亡小体及点灶坏死;9 h 肝细胞凋亡及坏死更为显著;12 h 肝组织坏死范围明显增大,肝小叶结构破坏超过整个切片的 2/3,肝细胞索崩解,大量肝细胞凋亡(彩色插页图 1)。SNMC 保护组 9 h 肝细胞水肿伴脂肪变性;12 h 可见周围肝细胞索紊乱,细胞核染色质边集,出现灶状坏死,肝窦内可见多个凋亡小体,细胞胞浆呈深红色,细胞核浓缩、崩解,少量肝小叶结构破坏,损伤程度较模型组明显减轻,以后肝组织逐渐修复;3 d 肝小叶结构基本恢复正常,肝细胞轻度水肿,肝窦内皮细胞增生,可见少量散在肝细胞凋亡和点灶坏死(彩色插页图 2)。

**2.2 电镜观察:**正常对照组可见肝细胞板排列整齐,肝细胞核仁明显,细胞内膜结构丰富。模型组 6 h 可见肝细胞核缩小,染色质边集核膜下可见新月体形成,线粒体肿胀,质膜和细胞内膜结构明显紊乱(彩色插页图 3)。SNMC 保护组 9 h 细胞核浓缩的染色质紧靠核膜下,粗面内质网扩张脱颗粒;1 d 肝细胞膜结构基本接近正常,细胞核膜下有轻度的染色质边集,线粒体嵴清晰可见(彩色插页图 4);7 d 后基本同正常对照组。

**2.3 肝细胞凋亡检测(表 1):**凋亡的肝细胞细胞核或细胞胞浆呈棕褐色着色,凋亡小体也呈阳性着色。正常对照组未见凋亡细胞;模型组肝组织可见较多凋亡细胞,多分布于坏死区及汇管区周围;SNMC 保护组随着治疗时间的延长,凋亡细胞逐渐减少,且染色逐渐减弱。

表 1 各组各时间点肝细胞凋亡检测及凋亡指数比较( $\bar{x}\pm s$ )

Table 1 Comparison of apoptosis index and apoptosis detection of hepatocyte in each group at different time points( $\bar{x}\pm s$ )		
组别	动物数(只)	凋亡指数(%)
正常对照组	7	0
模型组 6 h	5	13.20 $\pm$ 2.58
9 h	5	26.40 $\pm$ 3.76
12 h	5	40.30 $\pm$ 4.63
SNMC 保护组 9 h	8	12.30 $\pm$ 4.45 <sup>#</sup>
12 h	8	23.40 $\pm$ 3.37 <sup>*</sup>
1 d	8	18.60 $\pm$ 4.67 <sup>*</sup>
3 d	8	11.80 $\pm$ 3.54 <sup>*</sup>
5 d	8	7.10 $\pm$ 2.78 <sup>*</sup>
7 d	8	3.20 $\pm$ 1.73 <sup>*</sup>

注:与模型组 9 h 比较;<sup>#</sup> $P<0.01$ ;与模型组 12 h 比较;<sup>\*</sup> $P<0.01$

**2.4 肝组织细胞色素 C 及 caspase - 3 检测:**正常对照组有少量细胞色素 C 及 caspase - 3 表达,且散在分布。模型组 9 h 大部分肝细胞胞浆中呈强阳性表达,多分布在坏死区及汇管区(彩色插页图 5)。SNMC 保护组 9 h 随治疗时间的延长,细胞色素 C 及 caspase - 3 的表达均逐渐减弱和减少(彩色插页图 6)。

### 3 讨论

本实验中用 LPS 加 D - Galn 成功复制类似人类 FLF 小鼠模型,为 FLF 的研究及治疗提供了理想的实验材料。

重型肝炎发病的根本原因是肝细胞大量死亡致肝功能衰竭,肝细胞死亡在病理学上可分为坏死和凋亡两种形式<sup>[4]</sup>;TNF -  $\alpha$ 、白细胞介素 - 2(IL - 2)及 IL - 8 等在重型肝炎患者肝细胞损伤、坏死中起重要作用<sup>[5,6]</sup>;而线粒体和细胞色素 C 在细胞凋亡机制中的作用越来越引起人们的重视<sup>[7]</sup>,线粒体跨膜电位与线粒体通透性改变在细胞凋亡过程中起重要作用<sup>[8]</sup>。线粒体内包含一些与细胞凋亡有密切关系的物质,如细胞色素 C、凋亡诱导因子(AIF)和活性氧自由基(ROS)等,在凋亡信号刺激下,线粒体膜通透性增加,由此产生一系列关键性变化,包括细胞色素 C 释放,线粒体跨膜电位下降,细胞内氧化还原状态改变,Bcl 基因家族成员介入等<sup>[9]</sup>,其中细胞色素 C 释放被认为是凋亡过程中的关键事件<sup>[10]</sup>。细胞色素 C 自线粒体释放后与 Apaf - 1 及 caspase - 9 共同组成了凋亡体,又称“诱导死亡信号复合体”(DISC),当 Apaf - 1 与细胞色素 C、dATP、ATP 结合后便可经募集区活化 caspase - 9,再作用于其下游的靶 caspase - 3 酶原,活化的 caspase - 3 作为效应因子作用于不同的靶细胞,经蛋白水解作用导致细胞凋亡<sup>[11,12]</sup>。

SNMC 是甘草的皂甙成分,由甘草次酸和 2 个分子的葡萄糖醛酸组成,1958 年曾被日本学者用于慢性肝炎患者的治疗,此后一直作为护肝药物应用于临床。SNMC 具有保护肝细胞膜、抗炎、免疫调节、类激素样作用等药理作用,最近日本学者发现,SNMC 还具有抗细胞凋亡作用<sup>[1]</sup>,但其确切机制尚未完全阐明。本实验通过建立小鼠 FLF 模型,并应用 SNMC 进行体内肝细胞保护。TUNEL 检测证实,SNMC 保护组随着治疗时间的延长,凋亡指数明显下降;电镜下观察模型组肝细胞呈现核缩小、染色质边集等典型凋亡的形态学变化,而治疗组随治

疗时间的延长而明显改善。说明 SNMC 能有效抑制肝细胞凋亡。

细胞色素 C 具有双重功能,除参与电子传递外,在细胞凋亡启动中还作为一个凋亡起始因子,起重要作用。细胞色素 C 移位到胞浆可引起 caspase 级联反应,并最终活化 caspase - 3,导致肝细胞凋亡。小鼠肝组织的免疫组化染色可见模型组细胞色素 C 及 caspase - 3 均大量表达,而 SNMC 保护组随着时间的推移,细胞色素 C 及 caspase - 3 表达逐渐减少,说明 caspase - 3 的表达与细胞色素 C 密切相关,可能受释放至胞浆中的细胞色素 C 调控。同时,推测 SNMC 可能通过稳定线粒体膜抑制细胞色素 C 释放及其随后 caspase - 3 的活化,从而阻断肝细胞凋亡的进行。但其如何稳定线粒体膜、阻止细胞色素 C 释放,还有待于进一步研究。

综上所述,我们认为 SNMC 能有效抑制小鼠 FLF 模型中的肝细胞凋亡,而且通过本实验可以推断重型肝炎的发病机制可能与线粒体途径的肝细胞异常凋亡有关。

### 参考文献:

- [1]汪俊韬,于少军,肖炜.复方甘草甜素在肝病领域的临床应用[J]. 中国药房,2002,13:500 - 502.
- [2]向晓星,王国俊,蔡雄.暴发型肝炎肝细胞凋亡的阻断治疗研究[J]. 肝脏,2001,6:64 - 65.
- [3]Kondo T, Suda T, Fukuyama H, et al. Essential roles of the Fas ligand in the development of hepatitis [J]. Nat Med, 1997, 3: 409 - 413.
- [4]周再生,叶晴,吴素红,等.不同类型非生物人工肝治疗重型乙型肝炎疗效观察[J]. 中国危重病急救医学,2005,17:45.
- [5]郑伟强,龙尧,张武英,等.重型乙型肝炎患者血清白细胞介素-8 的检测及其临床意义[J]. 中国危重病急救医学,1999,11:297 - 299.
- [6]张定凤.重型肝炎的发病机理[J]. 中华肝脏病杂志,2000,8:307.
- [7]Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis [J]. Science, 1998, 281:1309 - 1312.
- [8]Mingnotte B, Vayssiere J L. Mitochondria and apoptosis [J]. Eur J Biochem, 1998, 252:1 - 15.
- [9]庞涛,陈婉蓉.线粒体与细胞凋亡的研究进展[J]. 卫生毒理学杂志,2003,17:122 - 125.
- [10]Finkel E. The mitochondrion: is it central to apoptosis [J]? Science, 2001, 292:624 - 626.
- [11]Saikumar P, Dong Z, Mikhailov V, et al. Apoptosis definition, mechanism, and relevance to disease [J]. Am J Med, 1999, 107: 489 - 506.
- [12]Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1999, 15:269 - 290.

(收稿日期:2006 - 02 - 26 修回日期:2006 - 09 - 16)

(本文编辑:李银平)

## 黄芪对兔内毒素性急性肺损伤的保护作用

(正文见348页)

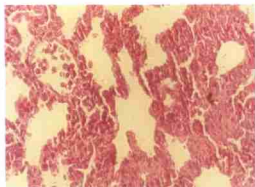


图1 对照组肺组织病理学改变 (HE, x200)  
Figure 1 Pathology changes of lung tissue in control group (HE, x200)

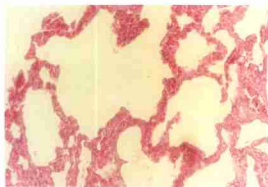


图2 黄芪组肺组织病理学改变 (HE, x200)  
Figure 2 Pathology changes of lung tissue in radix astragalii group (HE, x200)

## 暴发性肝功能衰竭小鼠模型的建立及其治疗研究

(正文见361页)

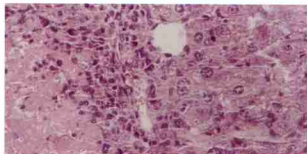


图3 光镜下模型组12 h 肝组织病理改变 (HE, x200)  
Figure 1 Pathology changes of liver tissue at 12 hours in model group under light microscope (HE, x200)

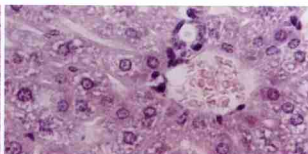


图2 光镜下SNMC保护组3 d 肝组织病理改变 (HE, x400)  
Figure 2 Pathology changes of liver tissue on 3 days in SNMC group under light microscope (HE, x400)

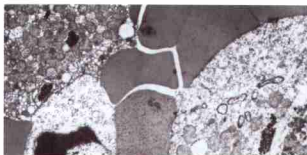


图3 电镜下模型组6 h 肝组织病理改变 (锇酸, x5000)  
Figure 3 Pathology changes of liver tissue at 6 hours in model group under electron microscope (osmic acid, x5000)

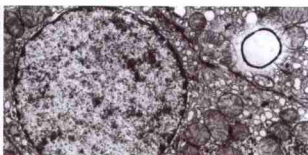


图4 电镜下SNMC保护组1 d 肝组织病理改变 (锇酸, x8000)  
Figure 4 Pathology changes of liver tissue on 1 day in SNMC group under electron microscope (osmic acid, x8000)

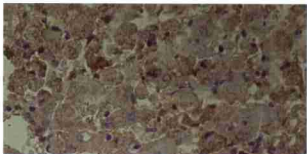


图5 模型组9 h 肝组织细胞色素C及 caspase-3表达 (免疫组化, x400)  
Figure 5 Expression of cytochrome C and caspase-3 of liver tissue at 9 hours in model group (immunohistochemistry, x400)

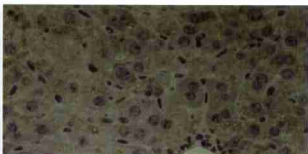


图6 SNMC保护组9 h 肝组织细胞色素C及 caspase-3表达 (免疫组化, x400)  
Figure 6 Expression of cytochrome C and caspase-3 of liver tissue at 9 hours in SNMC group (immunohistochemistry, x400)