

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)07-0621-03

醛固酮受体拮抗剂对大鼠肝纤维化的影响

贾 彪¹, 苌新明¹, 龚 均²(西安交通大学: ¹第一医院消化内科 陕西 西安 710061, ²第二医院消化内科 陕西 西安 710004)

Effect of aldosterone receptor antagonist on hepatic fibrosis of rats

JIA Ai¹, CHANG Xin-Ming¹, GONG Jun²Xi'an Jiaotong University: ¹Department of Gastroenterology, First Hospital, Xi'an 710061, China, ²Department of Gastroenterology, Second Hospital, Xi'an 710004, China

【Abstract】 AIM: To investigate the effect of aldosterone receptor antagonist on the synthesis of collagen and the activation of hepatic stellate cells in rats. **METHODS:** Ninety SD rats were randomly divided into 3 groups: control group ($n = 8$) were fed normal food and injected with peanut oil, sc; liver fibrosis model group ($n = 42$) were induced by 400 mL/L CCl₄, 3 mL/kg peanut oil, sc, twice a week and fed maize powder combined with high-fat and high-protein diet; spironolactone preventing group ($n = 40$) were given 100 mg/kg spironolactone, besides, the methods of making models were the same as those of the model group. Blood was taken from eyes and the levels of HA, LN, PC III and CIV were examined. Liver tissues were stained with HE and VG. Tissue morphological change was examined with light microscopy. The degree of hepatic fibrosis was assessed by an image analyze system. Moreover, the expression of α -SMA in hepatic tissue was detected with immunohistochemical methods. **RESULTS:** The levels of HA, LN, PC III and CIV in spironolactone group were greatly lower than those in model group ($P < 0.05$). Histological observation indicated that the grade of fibrosis and the area of collagen in rats of the model group were significantly higher than those of the spironolactone group ($P < 0.05$); The expression of α -smooth muscle actin in hepatic tissue in spironolactone group was significantly lower than that of the model group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** Spironolactone can inhibit the formation of liver fibrosis in rats. Spironolactone may prevent the formation of hepatic fibrosis through inhibiting the activation of hepatic stellate cells.

【Keywords】 spironolactone; liver cirrhosis; hepatic stellate cell; α -smooth muscle actin

【摘要】目的: 探讨醛固酮受体拮抗剂螺内酯对肝纤维化大鼠肝星状细胞活化及胶原合成的影响。方法: 用 CCl₄ 花生油、高脂和低蛋白复合因素制造大鼠肝纤维化模型。90 只 SD 大鼠随机分为 3 组。对照组 8 只: 单纯花生油 sc, 正常饮食; 模型组 42 只: 400 mL/L CCl₄ 花生油 3 mL/kg, sc 2 次/wk, 饲以单纯玉米粉并高脂、高胆固醇饮食造模; 螺内酯预防组 40 只: 造模的同时予以螺内酯 100 mg/kg 灌胃 1 次。眼球采血检测血中透明质酸(HA), III 型前胶原(PC III), IV 型胶原(CIV) 和层粘蛋白(LN)含量, 肝组织 HE, VG 染色, 光镜下观察组织学改变, 图像分析仪测量胶原面积, 免疫组化法观察螺内酯对肝脏平滑肌动蛋白(α -SMA)表达的影响。结果: 螺内酯组 HA, PC III, CIV, LN 水平较模型组明显降低($P < 0.05$); 光镜下模型组肝纤维组织增生分级及胶原面积均大于螺内酯组($P < 0.05$); 螺内酯组 α -SMA 在肝组织中的表达较模型组明显减少($P < 0.05$)。结论: 螺内酯可减轻大鼠肝纤维化的形成, 其机制可能通过抑制肝星状细胞的活化, 起到预防肝纤维化的作用。

【关键词】 螺内酯; 肝硬化; 肝星状细胞; 平滑肌动蛋白

【中图分类号】 R575.2 **【文献标识码】** A

0 引言

醛固酮合成的前体为脱氧皮质酮, 其合成的关键酶, 醛固酮合成酶编码基因为 CYP II B2。心脏、血管、肺脏、肝脏均表达醛固酮合成所需基因 CYP II B2, 合成醛固酮^[1]。实验证明, 肝脏 HSC 和肺脏 II 型肺泡细胞可表达 CYP II B2 mRNA^[2]。近年研究发现, 醛固酮尚参与器官纤维化的形成, 而其受体拮抗剂螺内酯可以抑制心肌^[3]、血管^[4]、肾脏^[5]等的胶原合成。我们观察螺内酯对肝纤维化大鼠肝星状细胞活化及胶原合成的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级雄性 SD 大鼠 90 只, 购自上海 B-K 公司, 体质量 200 ~ 265(平均 230)g。螺内酯(螺内酯片, spironolactone): 江苏黄海制药厂; HA, LN, PC III, CIV 放射免疫试剂盒: 北京北方免疫试剂研究所; α -SMA mAb 购自福建迈新生物技术开发公司。

1.2 方法 大鼠试验前自由喂养 1 wk, 随机分为 3 组 ①正常对照组(8 只): 正常饮食饮水, sc 花生油,

收稿日期 2005-07-15; 接受日期 2005-12-22

作者简介: 贾 彪, 博士生(导师龚 均), 主治医师。Tel: (029)

82335826 Email: jiaai0129@yahoo.com.cn

量同模型组 ②肝纤维化模型组(42只):按《中药药理实验方法学》用复合因素造模,实验1 d皮下注射400 mL/L CCl₄花生油溶液5 mL/kg,以后每隔3 d注射1次3 mL/kg。以795 g/kg单纯玉米粉、200 g/kg猪油及5 g/kg胆固醇配成混合饲料,自来水为唯一饮料饲养动物 ③螺内酯预防组(40只)造模方法同上,螺内酯每日100 mg/kg灌胃。各组每周称体质量1次以调节CCl₄用量及螺内酯给药量。8 wk末处死大鼠。取肝右叶小块组织用40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,切片。断头处死前行眼球采血3000 r/min离心15~20 min,取血清-20℃备检。放免法测定血清HA, LN, PCⅢ, CIV;肝组织切片分别行HE染色和VG染色。VG染色根据汇管区血管周围红染区厚度,将肝纤维化分为0~Ⅲ级:0级<5 μm;Ⅰ级5~10 μm;Ⅱ级10~15 μm;Ⅲ级>15 μm。每张切片随机选取3个视野,记录其病理分级,取其平均值作为该动物肝脏的病理分级。胶原面密度计算应用CMIAS真彩色医学图象分析系统进行图象分析,根据胶原占视野中肝脏的面积比间接估计胶原含量,每张切片随机选5个视野(其中汇管区占2个),分别计算其面

密度(面密度=胶原面积/肝组织视野面积×100%),取其平均值。应用免疫组化法观察肝脏平滑肌动蛋白(α-SMA),以PBS替代一抗作空白对照,正常血清替代二抗作替代对照,结果均为阴性,棕黄色为阳性染色。

统计学处理:采用SPSS统计软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数间比较采用方差分析及SNK法,经检验各组各指标间方差齐同。

2 结果

在实验过程中,模型组和螺内酯组分别有10只和8只大鼠死亡,正常对照组大鼠无死亡,发育良好,活泼好动。模型组动物精神差,活动少,发育迟缓,皮毛松弛,毛色黯淡,厌食,消瘦,体重明显减轻。螺内酯组动物健康状况相对较好,皮毛柔顺有光泽。

2.1 血清学指标 与正常组相比,螺内酯组和模型组PCⅢ, HA, CIV, LN明显升高($P < 0.01$)。与模型组相比,螺内酯组中上述指标明显降低($P < 0.05$,表1)。

2.2 肝脏病理变化 模型组肝组织表面光亮度下降,

表1 肝纤维化大鼠血清Ⅲ型前胶原、Ⅳ型胶原、透明质酸、层粘蛋白及胶原含量 (μg/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ⅲ型前胶原	Ⅳ型胶原	透明质酸	层粘蛋白	胶原面密度	平滑肌动蛋白
正常对照	8	27.8±4.5	8.6±1.5	205.4±68.6	40.1±4.1	0.69±0.32	0.63±0.23
模型对照	42	46.4±3.8 ^b	18.7±2.8 ^b	615.2±80.5 ^b	96.9±5.4 ^b	9.47±0.87 ^b	11.21±0.97 ^b
螺内酯预防	40	41.3±3.3 ^{ab}	15.8±2.2 ^{ab}	536.6±60.0 ^{ab}	86.53±4.8 ^{ab}	7.16±0.73 ^{ab}	8.45±0.86 ^{ab}

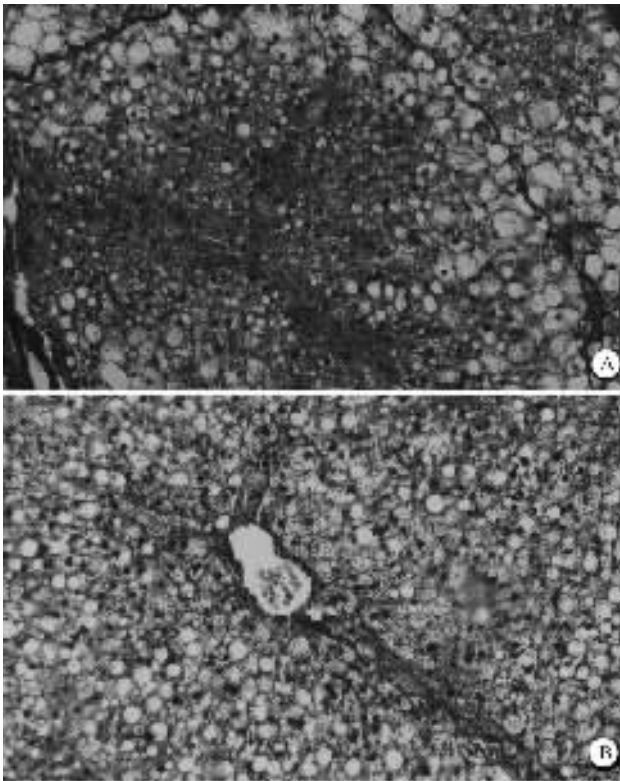
^a $P < 0.05$ vs 模型组, ^b $P < 0.01$ vs 正常对照组。

颜色暗红且边缘不规、质脆、体积缩小、肝表面可见针尖大小颗粒。螺内酯预防组肝脏体积大致正常、柔软、呈花斑状、未见颗粒。模型组肝小叶结构破坏,肝细胞变性、坏死明显,大部分假小叶形成,并炎细胞浸润位于结缔组织区域(图1A)纤维化3级。而螺内酯组肝小叶结构基本正常,肝细胞变性明显,轻度坏死、结缔组织增生及炎细胞浸润,胶原呈带状增生(图1B)纤维化2级或1级,其胶原面密度小于模型组($P < 0.05$,表1)。

2.3 α-SMA免疫组化分析 在正常对照组α-SMA只表达于小动脉及小静脉,胆管无表达。模型组α-SMA主要表达于汇管及纤维区间隔,呈长椭圆形或梭形,随肝纤维化发展,表达逐渐增强。螺内酯组在汇管及纤维区间隔少量表达,较模型组明显减轻($P < 0.05$,表1)。

3 讨论

本结果表明,螺内酯组大鼠一般情况较好,死亡率较低。肝纤维化早期,模型组主要以变性为主,肝细胞坏死及纤维增生较轻,炎细胞浸润较轻;螺内酯组水肿、脂变均较模型组轻。但后期模型组肝细胞水肿、脂变反倒减轻,主要表现为肝细胞坏死、小叶结构破坏、炎细胞浸润及纤维组织增生显著,纤维分隔包绕,并可见假小叶形成。而螺内酯组仍以变性为主,肝小叶结构尚存,肝细胞坏死、炎细胞浸润及纤维组织增生均较模型组明显减轻,说明螺内酯有稳定肝细胞膜、减轻炎症及抑制纤维组织增生的作用。HSC是肝脏细胞外基质的主要产生细胞。α-SMA表达是HSC的激活的一个重要特征,而HSC的激活是肝纤维化形成的共同通路^[6]。活化的HSC是ECM生成的主要来源,可分泌Ⅰ,Ⅲ,Ⅳ型胶原、LN、纤维连接蛋白、HA等多种ECM成分^[7]。我们发现,螺内酯组PCⅢ, CIV, HA, LN及较造模组明显减少,免疫组化



A 模型组; B 螺内酯预防组.

图1 大鼠造模8 wk 肝组织病理学 VG ×100

观察到螺内酯组 α -SMA 表达较模型组明显减少,提示螺内酯可减轻肝组织胶原合成,其机制可能通过抑制肝星状细胞的活化,阻断 ECM 合成的自分泌放大

过程,起到预防肝纤维化的作用.但不清楚螺内酯是通过直接作用还是通过抑制细胞因子而间接抑制了 HSC 的活化,则需进一步研究.

【参考文献】

- [1] Allan D, Struthers, Thomas M, et al. Review of aldosterone and angiotensin II-induced target organ damage and prevention [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(4): 663-670.
- [2] Yao JF, Yao XX, Fang HM, et al. Effects of aldosterone and spironolactone on the proliferation and collagen synthesis of hepatic stellate cells in rats [J]. *Zhonghua Yixue Zazhi*, 2003, 83(20): 1823-1825.
- [3] Mottram PM, Haluska B, Leano R, et al. Effect of aldosterone antagonism on myocardial dysfunction in hypertensive patients with diastolic heart failure [J]. *Circulation* 2004, 110(5) 558-565.
- [4] Nehme JA, Lacolley P, Labat C, et al. Spironolactone improves carotid artery fibrosis and distensibility in rat post-ischaemic heart failure [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2005, 39(3) 511-519.
- [5] Trachtman H, Weiser AC, Valderrama E, et al. Prevention of renal fibrosis by spironolactone in mice with complete unilateral ureteral obstruction [J]. *J Urol*, 2004, 172(4 Pt 2) 1590-1594.
- [6] 王卫卫, 杨希山, 李旭, 等. 洛沙坦对肝纤维化大鼠 Ang II 型受体的表达及胶原形成的影响 [J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(13): 1175-1178.
- [7] 梁君蓉, 王新, 吴开春. COX-2 抑制剂对成纤维细胞的增殖和细胞外基质产生的影响 [J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(9): 811-814.

编辑 潘伯荣

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)07-0623-01

垂体后叶素治疗非肾小球性血尿 32 例

石鹏, 赵武林, 付宇, 傅忠国, 张颖
(解放军 451 医院肾内科 陕西 西安 710054)

【关键词】垂体后叶素; 血尿

【中图分类号】R322.6⁺¹ 【文献标识码】B

1 临床资料 2003-01/2005-08 用垂体后叶素治疗非肾小球性血尿患者 32(男 18 女 14)例, 年龄 15~75(平均 42)岁, 其中胡桃夹综合征 5 例, 多囊肾 10 例, 肾肿瘤 6 例, 膀胱癌 6 例, 前列腺癌 5 例, 膀胱癌内镜术后 6 例, 均排除全身出血性疾病, 均为肉眼血尿, 镜检红细胞卅, 正型红细胞占 90% 以上, 用止血敏、止血芳酸、立止血 6 d 以上均无效. 用垂体后叶素 24 U 加 50 g/L 葡萄糖 250 mL 静滴, 1 次/d 3 d 为 1 疗程,

收稿日期 2005-12-05; 接受日期 2005-12-20

作者简介: 石鹏, 硕士, 主治医师. Tel (029)84734118 Email:

shipeng@sina.com

连续 2 疗程观察疗效. 显效(肉眼血尿消失, 镜检 RBC 3/HP 以下)19 例; 有效(肉眼血尿消失, 镜检 RBC 3/HP 以上)10 例; 无效 3 例, 总有效率 96.3%. 我们应用中有 4 例出现胸闷, 5 例出现腹痛, 经减慢滴速及含服硝酸甘油后迅速缓解, 未影响治疗, 未见心律失常, 高血压脑病等严重不良反应.

2 讨论 部分非肾小球性血尿用止血药常未能奏效, 我们应用垂体后叶素治疗泌尿系出血性病征, 取得了很好的疗效. 垂体后叶素止血的可能机制是收缩小动脉血管, 使局部血流减少^[1], 有利于血小板聚集、有利于止血药发挥止血作用, 从而达到止血目的. 垂体后叶素治疗消化系统出血常有胸闷、腹痛等副作用报道^[2]. 我们用本药治疗非肾小球性血尿疗效好, 未见明显毒副作用, 值得临床推广.

【参考文献】

- [1] 叶任高, 陆再英. 内科学 [M]. 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 484.
- [2] 朱发祥, 朱敬山, 陈润芝. 垂体后叶素联合硝酸甘油疗效与善肯定疗法治食管静脉破裂出血的比较观察 [J]. *中华腹部疾病杂志*, 2004, 4(3): 180-181.

编辑 潘伯荣