

• 基础论著 •

外源性硫化氢对大鼠肝纤维化胶原合成和凋亡调节蛋白 Bcl-2 及 Bax 表达的影响

吴林 郑永平 李秀芬 郭俊雄 孔晓霞

【摘要】 目的 探讨外源性硫化氢(H₂S)对四氯化碳(CCl₄)诱导的肝纤维化大鼠的胶原合成和凋亡调节蛋白Bcl-2及Bax的影响。方法 将80只SD大鼠随机分为正常对照组、模型对照组、低剂量硫化氢(NaHS)组和高剂量NaHS组。处死大鼠后用HE染色及Van Gieson染色观察胶原合成、肝纤维化程度并分级, TUNEL染色了解肝细胞凋亡并以免疫组化法检测细胞凋亡指标Bcl-2及Bax。结果 模型对照组大鼠肝胶原合成活跃, 肝纤维化程度均达到III~IV期, Bax在第6周末表达达最高峰, 而Bcl-2则在第8周末表达达高峰, 高剂量和低剂量NaHS组肝胶原合成减少, 且肝纤维化程度明显减轻, 多处于I~II期($P<0.01$), 肝细胞凋亡减少, Bcl-2及Bax的表达下降, 与模型对照组比较差异均有统计学意义($P<0.01$); 并且各指标在高剂量NaHS组与低剂量NaHS组比较差异亦有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。此外, 至第8周末, 高剂量NaHS组部分指标已接近正常。结论 外源性H₂S可以减少CCl₄诱导的大鼠肝纤维化胶原合成, 减轻肝纤维化程度, 下调凋亡调节蛋白Bcl-2及Bax的表达, 发挥重要的抗大鼠肝纤维化作用, 且与剂量呈正相关。

【关键词】 硫化氢; 肝硬化; 大鼠; Bcl-2; Bax

Influence of exogenous hydrogen sulfide on collagen synthesis and expression of Bcl-2 and Bax in rats with hepatic fibrosis Wu Lin, Zheng Yongping, Li Xiufen, Guo Junxiong, Kong Xiaoxia. Department of Digestive System, Central Hospital of Shantou, Shantou 515031, China
Corresponding author: Wu Lin, Email: wlin68@163.com

【Abstract】 Objective To detect the influence of exogenous hydrogen sulfide(H₂S) on collagen synthesis and expression of Bcl-2 and Bax in rats with hepatic fibrosis. **Methods** 80 SD rats were randomly divided into four groups: a normal control group, a model control group, a low-dose sodium hydrosulfide (NaHS, 14.4 μmol/kg) group and a high-dose NaHS (36.0 μmol/kg) group. After the experiment, HE stain and Van Gieson stain were used to detect the degree of collagen synthesis and the grade of liver fibrosis, TUNEL stain was used to detect the degree of liver cell apoptosis and immunohistochemistry was used to detect the expression of Bcl-2 and Bax in liver tissue. **Results** Compared with the model control group, the collagen synthesis decreased ($P<0.01$), the degree of liver fibrosis lessened ($P<0.01$) and most of them were graded in I or II, liver cell apoptosis reduced ($P<0.01$), and the expression of Bcl-2 and Bax decreased ($P<0.01$) in the NaHS groups. In addition, there were also statistical significance between high dose NaHS group and low dose NaHS group ($P<0.01$ or $P<0.05$). What's more, some of the results of 8th week were near normal. **Conclusion** Exogenous hydrogen sulfide can effectively inhibit the development of experimental hepatic fibrosis by decreasing the collagen synthesis, reducing the liver cell apoptosis and decreasing the expression of Bcl-2 and Bax in a positive dosage-dependent manner.

【Key words】 Hydrogen sulfide; Liver cirrhosis; Rats; Bcl-2; Bax

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2014.17.015

基金项目: 广东省医学科研基金立项课题 (A2010585)

作者单位: 515031 广东省, 汕头市中心医院消化内科 (吴林、郑永平、郭俊雄), 妇产科 (孔晓霞); 深圳市第二人民医院消化内科 (李秀芬)

通讯作者: 吴林, Email: wlin68@163.com

肝纤维化是多种慢性肝病共同的组织学改变,它不仅是肝炎向肝硬化发展的必经之路,而且贯穿于肝硬化的始终。大量研究证实肝纤维化早期是可逆的。 H_2S 被认为是继NO和CO之后的第三类气体信号分子^[1-2],其在神经系统、心血管系统、内分泌系统等的重要作用已被一一揭示,但关于 H_2S 在消化系统尤其是在肝纤维化方面的作用研究尚处于起步阶段。本实验通过研究不同剂量的 H_2S 供体NaHS对肝纤维化大鼠的影响,了解外源性 H_2S 对肝纤维化的作用,并为 H_2S 与肝纤维化胶原合成和细胞凋亡相关性的进一步研究提供理论依据。

材料与方 法

一、实验动物

SD大鼠:80只,4~5周龄,雌雄各半,重量约200~220g/只,购自广东省实验动物中心。饲养于汕头大学医学院无特定病原体级动物实验室,所用饲料、饮水、笼具及垫料均经高压灭菌。

二、药品和试剂

CCl_4 购自汕头光华化学厂; NaHS 购自美国Sigma公司; TUNEL 试剂盒为德国宝灵曼公司产品,购自武汉博士德生物工程公司; Bcl-2 及 Bax 单克隆抗体购于美国 SantaCruz 公司, SABC 试剂盒购自武汉博士德生物工程公司。

三、实验方法

1. 动物分组及模型制备:将80只SD大鼠随机抽出20只为正常对照组,余60只为处理组。正常对照组:皮下注射生理盐水0.3 ml/100 g体重,每隔3 d 1次,共4周,以普通饲料及饮用水喂养。处理组:皮下注射30% CCl_4 花生油溶液0.3 ml/100 g体重,每隔3 d一次,共4周,以高脂低蛋白食物(玉米面为饲料,加0.5%胆固醇及20%猪油)喂养,30%酒精作为唯一饮料,共4周,造模过程死亡2只。4周后将处理组随机分为模型对照组、低剂量NaHS组和高剂量NaHS组,每组19或20只。第5周始NaHS组分别给予不同剂量NaHS腹腔注射(低剂量组14.4 $\mu\text{mol/kg}$,高剂量组36.0 $\mu\text{mol/kg}$),隔天一次,对照组相应予生理盐水1 ml腹腔注射。至第6周末随机处死各组10只大鼠。余大鼠按上述措施继续处理及饲养,至第8周末处死所有剩余大鼠。所有大鼠按常规饲养条件[室温(22±2)℃,湿度(55±5)%,光照(12 h/d)]喂养,自由摄食及饮水。

2. 肝脏病理学检测:取肝右叶同一部位,10%甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,常规脱蜡,行HE及Van Gieson染色,光镜下观察肝组织炎症及纤维组织增生状况,每张切片随机观察10个视野。胶原纤维定量测定:采用Van Gieson染色标本,放大400倍,于标本四角和中央位置选取5个视野,测定每一视野中胶原纤维含量,以纤维占视野面积的百分比表示,取其平均值。根据肝组织病理标准分期,将肝纤维化分为0~IV期:0期:无肝纤维化;I期:汇管区纤维化扩大,局部窦周及小叶内纤维化;II期:汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构保留;III期:纤维间隔伴小叶结构紊乱,无肝硬化;IV期:早期肝硬化。

3. 细胞凋亡原位检测:采用TUNEL法,以不加末端脱氧核酸转移酶(TdT)作为阴性对照,严格按试剂盒说明进行操作。光镜下观察,胞核染成棕黄色者为阳性细胞,每张片观察至少5个高倍视野(400倍),以平均每100个细胞核中含凋亡细胞的个数作为凋亡指数。

4. 细胞凋亡指标Bcl-2、Bax的检测:采用免疫组织化学法(SABC法)检测各组大鼠肝组织Bcl-2、Bax的表达情况,严格按试剂盒说明进行操作。光镜下观察Bcl-2及Bax的表达情况,其中胞质或胞浆染成棕黄色者为阳性细胞。每张片观察至少5个高倍视野(400倍),计算阳性细胞个数及其所占的百分比。

四、统计学分析

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用SPSS 15.0 统计分析软件,采用单因素方差分析(ANOVA)对多组数据进行均数比较,进一步做组间比较采用t检验,相关性分析采用Pearson相关分析法,各组肝纤维化病理分级采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、一般状况

肝纤维化大鼠毛色暗淡、精神萎靡,进食、进水减少,易受惊,体重增长缓慢;注射NaHS后大鼠精神状态渐好转,食欲恢复,且随着时间的推移大鼠状态越来越好。造模过程大鼠死亡2只,不影响实验过程及统计分析。NaHS注射过程中未发生大鼠死亡,说明14.4 $\mu\text{mol/kg}$ 及36.0 $\mu\text{mol/kg}$ 的NaHS注射剂量为安全剂量。

二、外源性 H₂S 对肝脏病理改变的影响

正常对照组肝小叶完整、肝索排列整齐，结构完整，未见肝纤维化；模型对照组大鼠肝索排列紊乱，汇管区炎性细胞、坏死细胞增多，汇管区和小叶内出现局限性的纤维化，同时胶原纤维向肝实质延伸，部分区域出现纤维纵隔，肝小叶结构破坏，甚至有假小叶形成；第6周末及第8周末模型对照组与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)；与模型组比较，NaHS组变性坏死肝细胞减少，胶原合成减少，结缔组织轻度增生，肝纤维化程度减轻，并且大多处于 I、II 期，未见假小叶形成 ($P<0.01$)。与第6周末比较，第8周末模型对照组肝纤维化更显著 ($P<0.01$)，而NaHS组在减轻胶原合成及肝纤维化程度方面效果更优 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$) (表1, 2, 图1, 2)。

表1 各组大鼠肝组织纤维化程度比较 (第6周末)

组别	鼠数	肝纤维化的分期(只)				
		0期	I期	II期	III期	IV期
正常对照组	10	10	0	0	0	0
模型对照组	10	0	0	0	8	2
低剂量 NaHS 组	10	0	2	7	1	0
高剂量 NaHS 组	10	0	4	6	0	0

注：秩和检验分析结果，模型对照组、高、低剂量 NaHS 组与正常对照组比较， $P<0.01$ ；高、低剂量 NaHS 组与模型对照组比较， $P<0.01$

表2 各组大鼠肝组织肝纤维化程度比较 (第8周末)

组别	鼠数	肝纤维化的分期(只)				
		0期	I期	II期	III期	IV期
正常对照组	10	10	0	0	0	0
模型对照组	10	0	0	0	3	7
低剂量 NaHS 组	10	0	5	5	0	0
高剂量 NaHS 组	10	0	9	1	0	0

注：秩和检验分析结果，模型对照组、高、低剂量 NaHS 组与正常对照组比较， $P<0.01$ ；高、低剂量 NaHS 组与模型对照组比较， $P<0.01$ ；高剂量 NaHS 组与低剂量组比较， $P<0.05$

此外：第8周末与第6周末比较：模型对照组： $P<0.01$ ，低剂量 NaHS 组比较： $P<0.05$ ，高剂量

NaHS 组比较： $P<0.01$ 。

三、外源性 H₂S 对肝细胞凋亡的影响

模型对照组及NaHS组肝组织的凋亡细胞主要分布在肝实质中，胞核呈棕黄色。正常对照组肝组织中亦偶见凋亡细胞。第6周末，模型对照组光镜下可见肝细胞广泛凋亡，与正常对照组及NaHS组比较差异有统计学意义 ($P<0.01$)，高剂量NaHS组与低剂量NaHS组比较差异亦有统计学意义 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)；第8周末，模型对照组肝细胞凋亡数目较第6周末减少 ($P<0.01$)，与正常对照组及NaHS组比较差异有著统计学意义 ($P<0.01$)，高剂量NaHS组与低剂量NaHS组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$) (表3, 4)。

四、外源性H₂S对Bcl-2、Bax表达的影响(图3~6)

Bcl-2、Bax在正常大鼠肝细胞浆、肝窦中呈低水平表达。在模型对照组，Bcl-2主要表达在汇管区、肝窦、纤维间隔及肝细胞膜，中央静脉及肝细胞浆内亦有少量表达；而Bax主要表达于肝细胞浆、肝窦、纤维间隔及中央静脉。第6周末及第8周末，与正常对照组比较，模型对照组Bcl-2、Bax的表达明显升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，高、低剂量NaHS组Bcl-2、Bax的表达下降 ($P<0.01$)；与低剂量NaHS组比较，高剂量NaHS组在降低Bcl-2、Bax表达方面效果更显著 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。在第8周末，高剂量NaHS组的Bax/Bcl-2及凋亡指数已接近正常 ($P>0.05$)，且Bax/Bcl-2与凋亡指数呈正相关 ($r=0.414, P<0.05$) (表3, 4)。

此外：第8周末与第6周末比较：模型对照组： $P<0.01$ ，低剂量与高剂量NaHS组：Bcl-2比较： $P<0.05$ ，余各指标比较： $P<0.01$ 。

讨 论

研究发现^[3]，肝脏是体内H₂S生成的主要部位，可能对维持循环血液中H₂S浓度起重要作用。

表3 各组大鼠 Bcl-2、Bax 的表达及凋亡指数比较 ($\bar{x} \pm s$) (第6周末)

组别	鼠数	Bcl-2(%)	Bax(%)	Bax/Bcl-2	凋亡指数(%)
正常对照组	10	4.68±0.89	3.09±0.54	0.66±0.21	3.14±1.25
模型对照组	10	15.64±4.13	23.58±7.28	1.52±0.44	38.61±14.27
低剂量 NaHS 组	10	11.38±2.96 ^a	13.78±4.44 ^a	1.22±0.30 ^a	24.94±10.31 ^b
高剂量 NaHS 组	10	8.78±2.65	9.34±2.91	1.07±0.34	15.33±9.02

注：模型对照组、高、低剂量 NaHS 组与正常对照组比较， $P<0.01$ ；高、低剂量 NaHS 组与模型对照组比较， $P<0.01$ ；与高剂量 NaHS 组比较，^a $P<0.05$ ，^b $P<0.01$

表4 各组大鼠 Bcl-2、Bax 的表达及凋亡指数比较 ($\bar{x} \pm s$) (第8周末)

组别	鼠数	Bcl-2(%)	Bax(%)	Bax/Bcl-2	凋亡指数(%)
正常对照组	10	4.11±0.92	2.75±0.48	0.67±0.30	3.24±1.42
模型对照组	9	19.65±5.32 ^a	18.92±6.04 ^a	0.97±0.28 ^a	21.66±9.14 ^a
低剂量 NaHS 组	9	9.36±2.96 ^a	7.19±2.64 ^a	0.77±0.15 ^b	9.26±3.01 ^a
高剂量 NaHS 组	10	6.51±2.65 ^b	4.53±1.07 ^b	0.70±0.31	4.66±1.87

注:与正常对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 高、低剂量NaHS组与模型对照组比较, $P < 0.01$; 高剂量NaHS组与低剂量NaHS组比较, $P < 0.05$

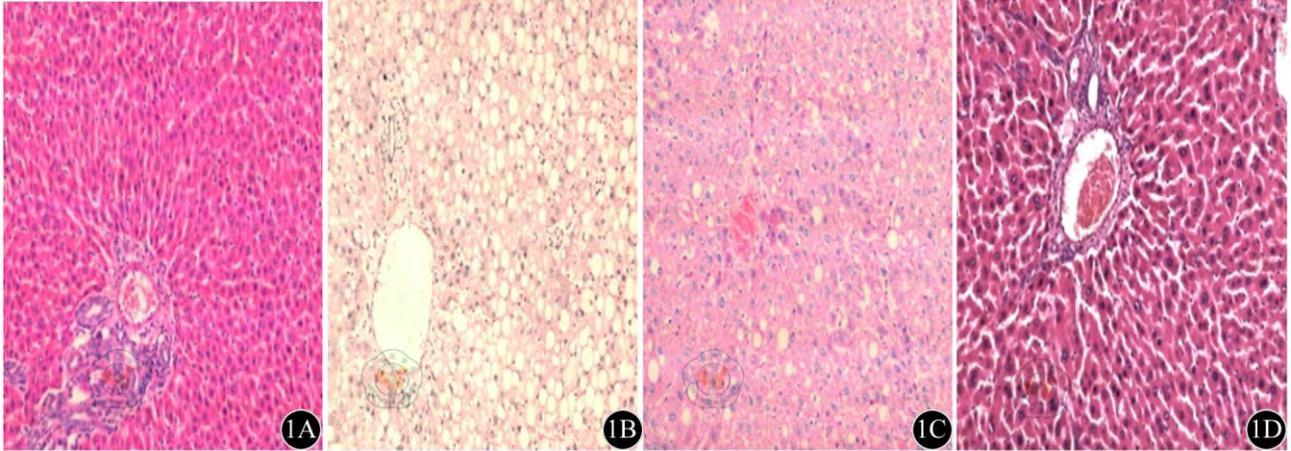


图1 各组大鼠肝组织纤维化程度比较 (第6周末) (HE ×10)。1A: 正常对照组; 1B: 模型对照组; 1C: 低剂量NaHS组; 1D: 高剂量NaHS组

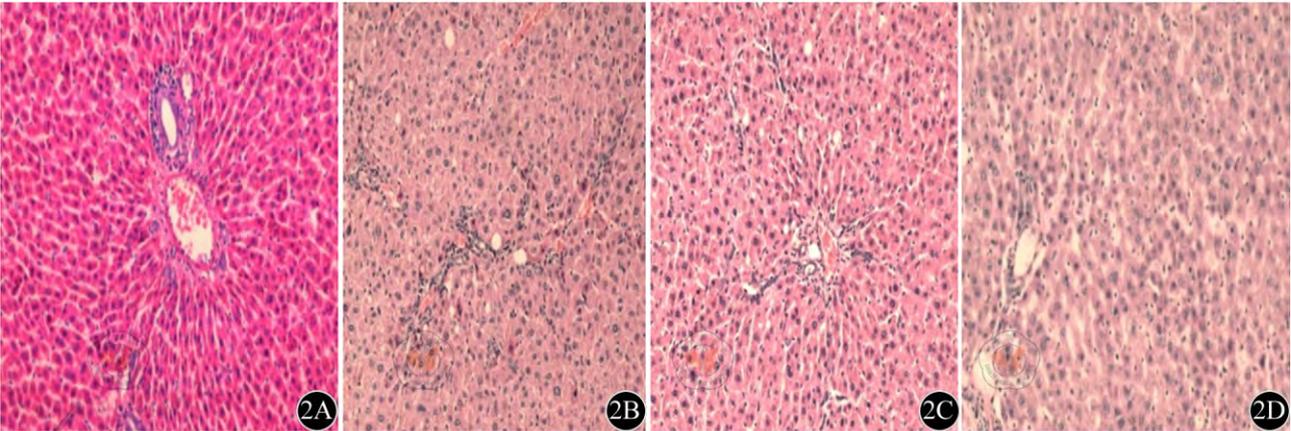


图2 各组大鼠肝组织纤维化程度比较 (第8周末) (HE ×10)。2A: 正常对照组; 2B: 模型对照组; 2C: 低剂量NaHS组; 2D: 高剂量NaHS组

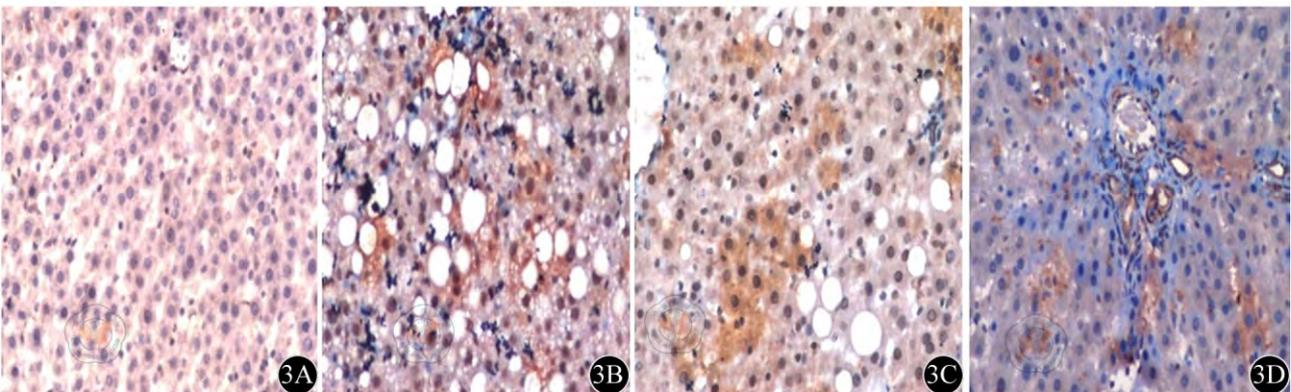


图3 各组大鼠Bcl-2的表达及凋亡指数比较 (第6周末) (免疫组化 ×20)。3A: 正常对照组; 3B: 模型对照组; 3C: 低剂量NaHS组; 3D: 高剂量NaHS组

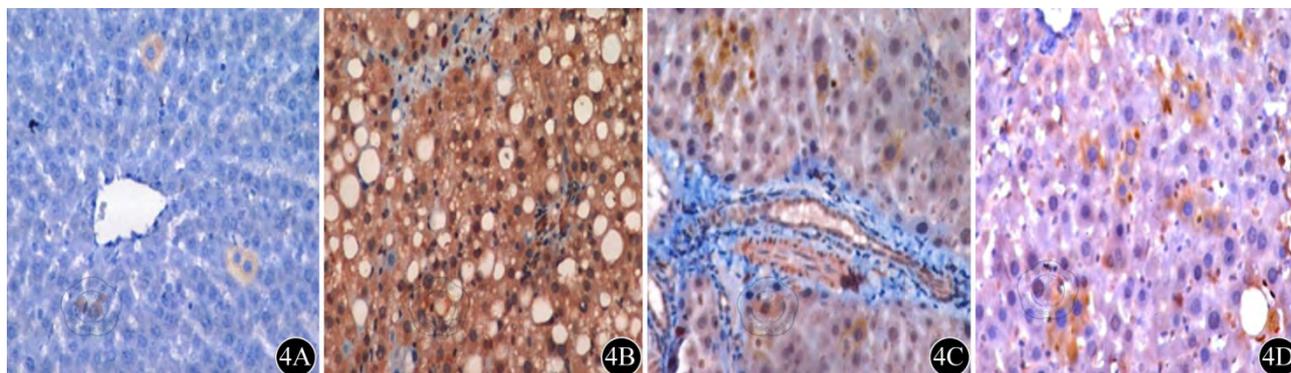


图4 各组大鼠Bax的表达及凋亡指数比较(第6周末)(免疫组化×20)。4A: 正常对照组; 4B: 模型对照组; 4C: 低剂量NaHS组; 4D: 高剂量NaHS组

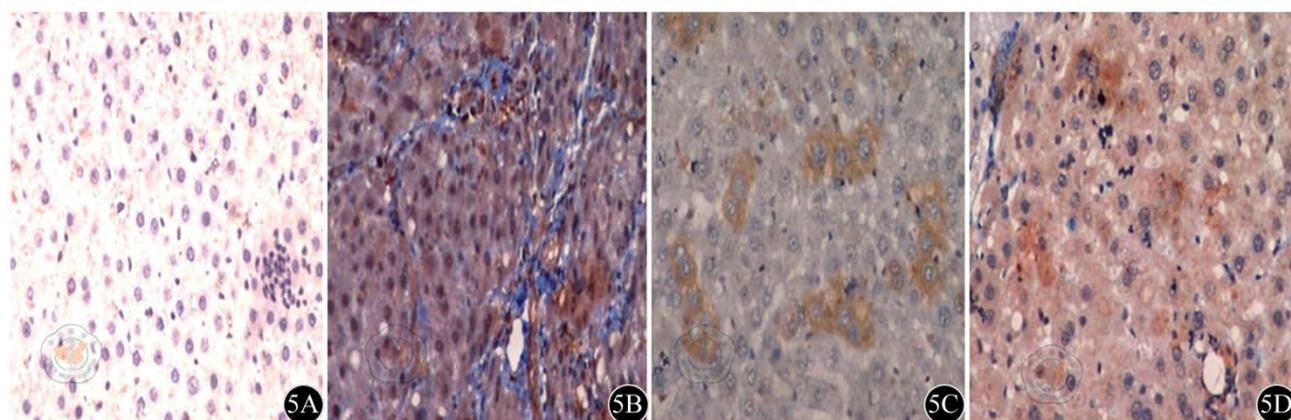


图5 各组大鼠Bcl-2的表达及凋亡指数比较(第8周末)(免疫组化×20)。5A: 正常对照组; 5B: 模型对照组; 5C: 低剂量NaHS组; 5D: 高剂量NaHS组

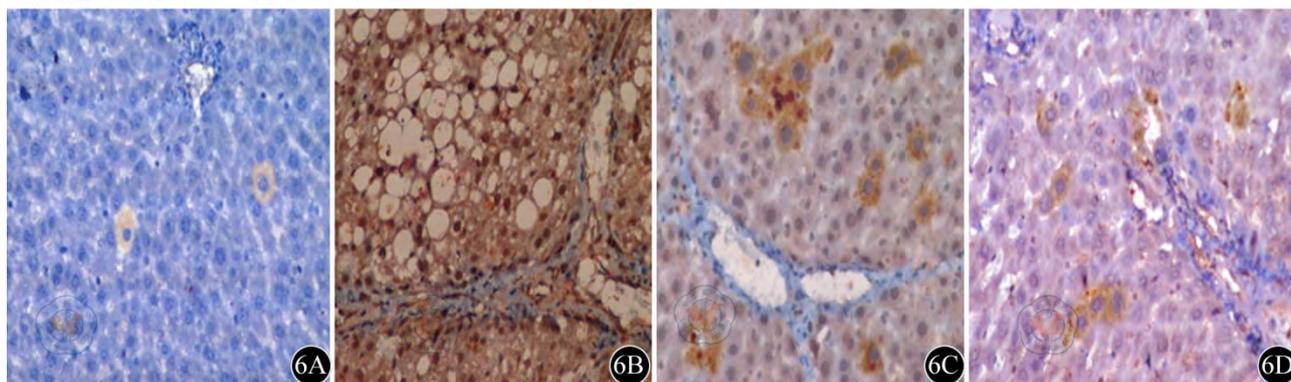


图6 各组大鼠Bax的表达及凋亡指数比较(第8周末)(免疫组化×20)。6A: 正常对照组; 6B: 模型对照组; 6C: 低剂量NaHS组; 6D: 高剂量NaHS组

Fiorucci等^[4]发现给正常大鼠及肝硬化大鼠注射去甲肾上腺素后,门静脉压呈剂量依赖性增高,但这种效应在经NaHS预处理过的大鼠身上被部分消除,提示H₂S在维持门静脉压方面有重要作用。赵强等^[5]发现H₂S具有降低肝脏I、III型胶原表达的作用,肝内H₂S合成减少将使I、III型胶原合成的抑制降低,这在肝硬化和门脉高压的形成中具有重要的意义。

肝细胞凋亡的速度和程度与肝纤维化的进程密切相关,其中Bcl-2蛋白家族在调控肝细胞凋亡过程中起着举足轻重的作用。Bcl-2蛋白是体内重要的凋亡抑制基因,而其同源蛋白Bax则具有相反的功能,为凋亡促进基因。研究发现,Bcl-2过度表达与Bax构成异源二聚体抑制凋亡,而Bax过度表达与Bax构成同源二聚体促进细胞凋亡,且Bax/Bcl-2的比值影响细胞的凋亡状态^[6]。

本实验研究发现:随着观察时间的延长, CCl_4 诱导的肝纤维化大鼠的一般状况逐渐变差, 进食减少, 体重减轻。病理检查显示模型对照组大鼠肝索排列紊乱, 汇管区炎性细胞、坏死细胞增多, 汇管区和小叶内出现局限性的纤维化, 同时胶原纤维向肝实质延伸, 部分区域出现纤维纵隔, 肝小叶结构破坏, 甚至有假小叶形成; 第6周末及第8周末模型对照组与正常对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明造模成功; 与模型对照组比较, 高、低剂量NaHS组变性坏死肝细胞减少, 胶原合成减少, 结缔组织轻度增生, 肝纤维化程度减轻, 并且大多处于 I、II 期, 未见假小叶形成 ($P < 0.01$)。另外, 与第6周末比较, 第8周末模型对照组肝纤维化更显著 ($P < 0.01$), 而对应的NaHS组在减轻胶原合成及肝纤维化程度方面效果更优 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 说明随着观察时间的延长, 肝纤维化大鼠的胶原合成及肝纤维化程度愈来愈严重, 而外源性 H_2S 的抑制胶原合成及抗肝纤维化作用更明显 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。实验结果与沈钦海等^[7]的结论相似。

CCl_4 诱导的肝纤维化大鼠的凋亡细胞主要分布在肝实质中, 以小叶居多, 胞核呈棕黄色。正常对照组肝组织中亦偶见凋亡细胞。本实验研究发现肝细胞凋亡以第6周末明显, 至第8周末肝细胞凋亡数目减少 ($P < 0.01$), 第6周末及第8周末, 模型对照组肝细胞广泛凋亡, 与正常对照组及高、低剂量NaHS组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 而高剂量NaHS组与低剂量NaHS组比较差异亦有统计学意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。Bcl-2、Bax在正常大鼠肝细胞浆、肝窦中呈低水平表达。在肝纤维化大鼠中, Bcl-2主要表达在汇管区、肝窦、纤维间隔及肝细胞膜, 中央静脉及肝细胞浆内亦有少量表达; 而Bax主要表达于肝细胞浆、肝窦、纤维间隔及中央静脉。实验结果显示Bax在第6周末模型对照组中表达最强, 第8周末Bax表达下降 ($P < 0.01$), 说明肝细胞凋亡在第6周末达最高峰; 而Bcl-2在第8周末的模型对照组中表达最强, 与第6周末比较差

异有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明第8周末肝细胞凋亡减少; 与罗新华等^[8]的实验结果相似。而且我们发现Bax/Bcl-2与肝细胞凋亡指数呈正相关 ($r = 0.414$, $P < 0.05$), 说明Bax的表达越强, 肝细胞凋亡就越多, Bcl-2表达越强, 肝细胞凋亡就越少, 并且Bax/Bcl-2可能是决定肝细胞凋亡的决定性因素之一。此外, 外源性 H_2S 供体NaHS可以调节Bax与Bcl-2的表达, 与剂量呈正相关 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。且在第8周末, 高剂量NaHS组的Bax/Bcl-2及凋亡指数已接近正常, 说明NaHS可能通过调节凋亡调节蛋白Bax及Bcl-2的表达控制肝纤维化进程, 为进一步的信号转导通路研究提供理论依据。

综上所述, 在 CCl_4 诱导的肝纤维化大鼠模型中, 外源性 H_2S 可以减轻肝脏胶原合成并显著改善肝脏的纤维化程度, 同时可通过调节Bax与Bcl-2的表达发挥抗肝纤维化效应, 为临床逆转早期肝纤维化的瓶颈提供新的思路。

参 考 文 献

- [1] Zhang H, Bhatia M. Hydrogen Sulfide: A Novel Mediator of Leukocyte Activation[J]. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2008, 1: 1-15.
- [2] Wang R. Two's company, three's a crowd can H_2S be the third endogenous gaseous transmitter?[J]. FASEB J, 2002, 16(13): 1792-1798.
- [3] Zhao W, Ndisang JF, Wang R. Modulation of endogenous production of H_2S in rat tissues[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2003, 81(9): 848-853.
- [4] Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, et al. The third gas: H_2S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis[J]. Hepatology, 2005, 42(3): 539-548.
- [5] 赵强, 陈卫刚, 赵瑾, 等. 硫化氢对肝纤维化大鼠肝脏 I、III 型胶原表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(4): 300-306.
- [6] Chia SJ, Tang WY, Elnatan J, et al. Prostate tumours from an Asian population: examination of bax, bcl-2, p53 and ras and identification of bax as a prognostic marker[J]. Br J Cancer, 2000, 83(6): 761-768.
- [7] 沈钦海, 秦召敏, 逯爱梅. 硫化氢对大鼠肝纤维化的预防作用[J]. 中南大学学报: 医学版, 2012, 37(9): 911-915.
- [8] 罗新华, 杨勤, 程明亮, 等. 肝纤维化形成过程中大鼠肝组织 Bcl-2、Bax 表达的动态研究[J]. 贵州医药, 2004, 7(28): 579-581.

(收稿日期: 2013-12-05)

(本文编辑: 戚红丹)