

16, 16-二甲基前列腺素 E₂ 和 r-干扰素抗大鼠肝纤维化实验研究

田 静 吕 坚¹ (杭州 310014 杭州市第六人民医院; ¹ 原杭州市第六人民医院)

摘要 目的: 研究 16, 16-二甲基前列腺素 E₂ (dm PGE₂) 及 r-干扰素 (IFN-r) 的抗肝纤维化作用。方法: 以二甲基亚硝酸 (DMN) 腹腔注射诱导大鼠肝纤维化模型, 染毒开始及染毒后 5 周分别用 dm PGE₂ 和 IFN-r 预处理和治疗肝纤维化。与正常及染毒组比较, 观察各组病理及肝纤维化程度。结果: dm PGE₂ 预处理组和治疗组肝纤维化程度与 IFN-r 组相近, 且明显小于染毒组, 羟脯氨酸 (H₂O₂)、血清透明质酸 (HA) 较染毒组明显降低。结论: dm PGE₂ 有较好的抗肝纤维化作用。

关键词 16, 16-二甲基前列腺素 E₂; r-干扰素; 二甲基亚硝酸; 羟脯氨酸; 透明质酸

Experimental study of 16, 16-dimethylprostaglandin E₂ and gamma interferon on anti-Hepatofibrosis in rats

Tian Jing, Lv Jian (Hangzhou 310014 Sixth of Hospital of Hangzhou)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the action of 16, 16-dimethylprostaglandin E₂ (dm PGE₂) and Gamma Interferon (IFN-r) on anti-hepatofibrosis in rats. **METHOD:** Using dimethylnitrosamine (DMN) produced rat model of hepatic fibrosis. In the meantime, using dm PGE₂ and IFN-r pre-cured and cured model rats in different stage. Then, observed the effects with histology technique and hepatic fibrosis index, compared the result between themselves and with control groups. **RESULTS:** compared to DMN control group, histological injury degree and collagen deposition degree in dm PGE₂ and INF-r groups decreased significantly, index of hydroxyproline (H₂O₂) and hyaluronic acid (HA) were significantly lower. No obvious difference between dm PGE₂ groups and INF-r groups were observed. **CONCLUSION:** These results suggested that dm PGE₂ had better anti-hepatofibrosis effect in experimental rats.

KEY WORDS 16, 16-Dimethylprostaglandin E₂, Gamma-Interferon, Dimethylnitrosamine, Hydroxyproline, Hyaluronic acid

16, 16-二甲基前列腺素 E₂ (dm PGE₂) 是一种较强的细胞保护剂, 具有显著的保护肝细胞、胃粘膜和肾脏的作用, 已有多篇文章报道其可抗四氯化碳、氨基半乳糖、异硫氰酸萘酯、乙醇等对肝脏的损害作用。1988 年首次报道 dm PGE₂ 有抗肝纤维化作用^[1], 但实验用模型仅有营养性缺乏和四氯化碳中毒两种^[2]。我们利用二甲基亚硝胺(DMN) 致肝纤维化模型观察 dm PGE₂ 的预防及治疗作用, 同时用已知有效药物 r-干扰素 (IFN-r) 作为对照药物^[3], 比较二者的抗肝纤维化作用。

材料与方法

1 动物及药品

SD 大鼠 120 只, 雌雄各半, 体重 220±20g, 浙江大学湖滨校区实验动物中心提供, 合格证号: 医动字第 22- 961018 号; dm PGE₂ 购自美国 Sigma 公司; 注射用重组 r-干扰素, 上海克隆生物高技术有限公司生产; 二甲基亚硝胺, 日本东药化成工业会社生产。

2 方法

2.1 分组及染毒造模: 将 120 只大鼠随机分成四组, 分别为 N 组: 正常对照组(10 只); D 组: 染毒对照组(70 只); D+ P 组: dm PGE₂ 预防治疗组(20 只); D+ I 组: IFN-r 预防治疗组(20 只)。后三组按 11mg/kg 体重腹腔注射 1.1% DMN 生理盐水溶液, 注射三周, 每周连续注射三天, 共注射 9 次; N 组以生理盐水 2ml/只代替。其中 D+ P 组每天腹部皮下注射 dm PGE₂100μg/kg, D+ I 组每天大腿内侧肌注 IFN-r25 万/kg。三周后处死 D+ P 组、D+ I 组及 D 组中 9 只染毒大鼠。再将 D 组中剩余大鼠随机分成三组, 分别为 D/N 组: 中毒治疗对照组(16 只); D/P 组: dm PGE₂ 治疗组(16 只); D/I 组: IFN-r 治疗组(16 只)。其中 D/N 组腹腔注射生理盐水 2ml/只/日, D/P 组腹部皮下注射 dm PGE₂100μg/(kg·d), D/I 组大腿内侧肌注 IFN-r25 万/(kg·d)。5 周后处死全部大鼠, 颈动脉取血, 血清作透明质酸(HA)测定; 于肝右叶取肝组织 4 块, 3 块用 10% 福尔马林固定作病理检查, 1 块作羟脯氨酸(HYP)测定。

2.2 观察指标及检测方法: 以 120℃ 加压 2 小时水解湿肝, 用高效液相色谱法(HPLC)测定 H₂O₂ 含量^[4]; HA 用放免法测定, 试剂由上海试剂研究所提供; 肝组织切片分别作 HE 染色、苦味酸天狼红染色、α-SMA 免疫组化染色。按慢性肝炎分级分期标准判定肝纤维化程度, 纤维化程度(S)分 0~ 4 级^[5]。

2.3 统计方法: 对 H₂O₂ 和 HA 数据采用方差分析 t 检验, 对病理资料采用等级分类计算 t 值。

结 果

本实验造模 3 周后, 染毒对照组死亡 13 只, D+ I 组死亡 5 只, D+ P 组死亡 7 只; 治疗结束后, D/N 组死亡 7 只, D/I 组死亡 5 只, D/P 组死亡 5 只, N 组无死亡。所有中毒大鼠中有 50% 以上有严重腹水。

1 血清 HA 及肝脏 H₂O₂ 水平比较 见表 1。

表 1 各组大鼠 HA 和 H₂O₂ 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组 别	H ₂ O ₂ (μg/g 湿肝)	HA (ng/ml)
染毒对照组	1234.28±108.44*	1193.4±87.24*
正常对照组	855.36±76.81	405.37±39.54
dm PGE ₂ 预防治疗组	1012.47±98.35**	1178.56±78.64***
IFN-r 预防治疗组	1085.64±86.94**	1132.29±98.17**
中毒治疗对照组	1289.53±124.19*	1182.62±81.35*
dm PGE ₂ 治疗组	851.12±92.47**	474.76±40.46**
IFN-r 治疗组	901.22±98.63**	429.33±39.28**

注: * 两对照组比较 P> 0.05, 分别与 N 组比较 P< 0.001; 与相应对照组比较** P< 0.001, *** P> 0.05

dm PGE₂ 组、IFN-r 组肝脏 H₂O₂ 含量与对照组比较显著降低, 并且 dm PGE₂ 组与 IFN-r 组之间无明显差异(P> 0.05); 各治疗组中血清 HA 含量与 D/N 组比较显著降低(P< 0.001)。

2 病理组织学检查 见表 2。

表 2 各组大鼠肝纤维化程度比较

组 别	n	0	1	2	3	4
染毒对照组	9	0	0	3	4	2
正常对照组	10	10	0	0	0	0
dm PGE ₂ 预防治疗组	13	0	4	6	2	1
IFN-r 预防治疗组	15	1	5	7	2	0
中毒治疗对照组	9	0	0	3	4	2
dm PGE ₂ 治疗组	11	2	5	3	1	0
IFN-r 治疗组	11	2	6	2	1	0

根据病理切片, 染毒对照组第 3 周肝脏形成纤维化, 染毒结束至第 8 周, 肝纤维化未逆转。正常对照组大鼠 HE 染色肝细胞多呈单核, 肝板条索状以肝小叶中央静脉为中心呈放射样排列, α-SMA 免疫组化染色及天狼红染色显示肝板间有少许极为纤细的网状纤维包绕肝窦, 门脉区少有纤维分布, 根据评分标准均为 0 级。染毒对照组、治疗中毒对照组大鼠 HE 染色见肝小叶失去正常结构, 肝板排列紊乱, 肝细胞普遍变性, 脂肪变性、水样变性甚至气球样变, 许多标本可见程度、范围不等的肝细胞坏死。α-SMA 免疫组化染色及天狼红染色显示汇管区大量胶原沉积, 多数可见相互连接的纤维隔, 重新分割肝小叶。根据评分标准, 属 3~ 4 级的标本为 67% (6/9)。各预防组在汇管区有胶原沉积, 染色显示结缔组织增生程度较对照组减轻, 肝纤维化分级多在 2~ 3 级; 各治疗组大鼠肝细胞变性多为脂肪变性, 胶原染色显示结缔组织增生程度明显减轻, 与染毒组比较差异明显(P< 0.05)。α-SMA 免疫组化染色结果与天狼红染色结果非常相关。

讨论

dm PGE₂ 抗肝纤维化的机制目前尚不十分清楚, 据报道, dm PGE₂ 可抑制脯氨酸与胶原蛋白的结合, 即抑制胶原

的合成;对细胞内外胶原降解有加速作用,故其可能机制有:
(1)抑制胶原合成;(2)促进胶原降解;(3)保护肝细胞,减轻炎症反应。

已有较多文献报道 IFN- γ 的抗肝纤维化作用,其机制可能为:(1)直接作用于肝星状细胞(HSC)抑制胶原合成及分泌细胞外间质(ECM);(2)免疫增强作用,促进胶原酶的分泌与激活。

结果发现 dm PGE₂ 和 IFN- γ 的治疗作用基本相近,但是从 HA 指标看,二者均无预治疗作用,而从 H_yP 指标看,二者又有预治疗作用。国外文献报道, dm PGE₂ 对营养性及 CCl₄ 性模型有预治疗作用,但无治疗的报道。其可能的原因有:
(1)DMN 染毒造成严重的肝硬化腹水,预治疗时间三周,药物不足以抵抗毒物;(2)药物剂量不够;(3)HA 为胶原代谢指标,而 H_yP 为肝中总胶原指标,二者可能存在一个时间差,也就是当肝中胶原下降时,血清中 HA 上升,一段时间后,HA 再下降。

总之,从实验结果看, dm PGE₂ 和 IFN- γ 对 DMN 肝纤维化具有一定的预防作用,而治疗肝硬化腹水比较显著。

参考文献

- 1 Ruwart M.J. et al. 16, 16-Dimethyl Prostaglandin E₂ Delays Collage Formation in Nutritional Injury in Rat Liver. Hepatology(Baltimore) 1988; 8(1): 61~ 4
- 2 荻野英朗. 16, 16-Dimethyl Prostaglandin E₂の肝腺维化抑制効果とその机序. 肝脏. 1994; 35(3): 216~ 23
- 3 Braoni Gs, et al. Interferon gamma decreases hepatic stellate cell activation and extracellular matrix deposition in liver fibrosis. Hepatology, 1996; 23: 1189
- 4 聂小春, 等. 柱前衍生化高效液相色谱法测定复方氨基酸制剂的应用研究. 药物分析杂志, 1996; 16(5): 295
- 5 第五次全国传染病寄生虫病学术会议修订病毒性肝炎防治方案. 中华内科杂志, 1995; 34: 788