文章编号:1000-5404(2012)09-0809-04

论著

β肾上腺素能受体兴奋对大鼠急性肝损伤的影响

李 果[1],夏 锋[1],吴 林[1],姚 超[2],钱 程[2],别 平[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院:全军肝胆外科研究所[1],病理学研究所[2])

[摘要] **目的** 探讨β肾上腺素能受体兴奋对大鼠急性肝损伤的影响。**方法** 使用异丙肾上腺素兴奋β肾上腺素能受体,在不同的用药剂量(1、10、100 mg/kg)和不同的损伤时相点(24、48、72、96 h)以及使用普萘洛尔抑制β肾上腺素能受体兴奋的情况下,检测肝功能指标[谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白蛋白(Alb)和总胆红素(TBil)],观察组织病理学变化,探讨β肾上腺素能受体兴奋对大鼠急性肝损伤的影响。**结果** 大鼠肝损伤程度随着异丙肾上腺素剂量的加大而加重[ALT(IU/L):对照组(336.2±140.5),1 mg/kg组(603.7±239.7),10 mg/kg组(838.6±448.5),100 mg/kg组(1 571.5±714.7),$P<0.05$];在急性肝损伤后第48小时对照组与实验组各项肝功能指标均有统计学差异[ALT(IU/L):(290.8±153.9)、(636.0±385.2),$P<0.05$;AST(IU/L):(521.0±296.8)、(2 289.1±1 361.5),$P<0.05$;Alb(g/L):(28.3±1.3)、(25.2±1.5),$P<0.05$;TBil(μmol/L):(4.1±1.2)、(24.8±16.9),$P<0.05$];应用普萘洛尔抑制β肾上腺素能受体兴奋,能有效防止大鼠急性肝损伤加重[ALT:兴奋组(606.0±154.9) IU/L,抑制组(210.0±176.1) IU/L,$P<0.05$]。**结论** β肾上腺素能受体的兴奋能有效调控大鼠急性肝损伤的进程。

[关键词] β肾上腺素能受体;急性肝损伤;炎症调控
[中图法分类号] R363.271; R575.02; R977.11 [文献标志码] A

Effect of stimulation of β-adrenoceptor on acute liver injury in rats

Li Guo[1], Xia Feng[1], Wu Lin[1], Yao Chao[2], Qian Cheng[2], Bie Ping[1] ([1]Institute of Hepatobiliary Surgery, [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of stimulation of β-adrenoceptor by isoprenaline injection on acute liver injury in rats. **Methods** Effect of intraperitoneal injection of isoprenaline pretreatment to stimulate β-adrenoceptor at different doses (1, 10 and 100 mg/kg), and for different time periods after acute liver injury (24, 48, 72 and 96 h), or of propranolol to inhibit β-adrenoceptor, was detected on the liver function index in blood serum and pathological examination. **Results** With the increase of isoprenaline dose, acute liver injury became more serious (ALT: control group 336.2±140.5 IU/L, 1 mg/kg group 603.7±239.7 IU/L, 10 mg/kg group 838.6±448.5 IU/L, 100 mg/kg group 1571.5±714.7 IU/L, $P<0.05$). Each index of liver function was statistically different between control group and stimulus group at 48 h after acute liver injury (ALT: 290.8±153.9, 636.0±385.2 IU/L, $P<0.05$; AST: 521.0±296.8, 2 289.1±1 361.5 IU/L, $P<0.05$; Alb: 28.3±1.3, 25.2±1.5 g/L, $P<0.05$; TBil: 4.1±1.2, 24.8±16.9 μmol/L, $P<0.05$). Meanwhile, propranolol inhibited β-adrenoceptor activation, and effectively prevented acute liver injury becoming more serious (ALT: stimulus group 606.0±154.9 IU/L, inhibition group 210.0±176.1 IU/L, $P<0.05$). **Conclusion** Stimulation of β-adrenoceptor may effectively regulate the process of acute liver injury in rats.

[**Key words**] β-adrenoceptor; acute liver injury; inflammatory regulation

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772095). Corresponding author: Xia Feng, E-mail: frankfxia@163.com

严重肝外伤、肝内感染及肝脏大手术等可因肝脏组织急性损伤的过度炎症反应而导致肝功能衰竭,临床上应用抗生素及保肝药物难以达到干预肝脏炎症的效果。如何控制急性肝损伤的进展而保护肝功能是临床面临的十分重要而紧迫的问题。大鼠CCl_4急性肝损伤模型的表现症状、肝功能检测指标及肝脏的病理变化与临床的急性肝炎有相似性,且具有条件要求低、

[基金项目] 国家自然科学基金(30772095)
[通信作者] 夏 锋,E-mail: frankfxia@163.com

操作简便、可靠性强及重复性好等优点，是经典的、最常用的肝损伤动物模型[1]。目前已有研究表明，交感神经不但参与了肝脏正常代谢功能的调控，还影响了肝脏的病理生理过程[2]。使用化学性方法去除肝内交感神经，可以显著降低CCl_4所致急性肝损伤的程度，改善肝脏血液循环，有利于合成功能和代谢功能的恢复[3-4]；在大鼠处于内毒素血症的情况下，使用去甲肾上腺素兴奋α肾上腺素能受体可促进TNF-α、IL-1β等促炎因子的释放，加重肝脏损伤[5]。而β肾上腺素能受体与肝脏急性炎症和损伤之间的关系尚不清楚。本实验使用异丙肾上腺素（非选择性β肾上腺素能受体激动剂）兴奋β肾上腺素能受体，应用普萘洛尔（非选择性β肾上腺素能受体阻滞剂）阻断β肾上腺素能受体，探讨β肾上腺素能受体兴奋对大鼠急性肝损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年雄性SD大鼠，体质量180～220 g，购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心，在第三军医大学西南医院中心实验室动物房清洁级环境中饲养，温度控制在20～26 ℃，湿度50%左右，动物饲养笼定期消毒，饲养房内定期紫外杀毒，大鼠分笼喂养，自由饮食。

1.2 实验仪器和试剂

全自动生化分析仪、低速离心机、CCl_4、橄榄油、无水乙醚、异丙肾上腺素（Sigma-Aldich公司）、0.9% NaCl、普萘洛尔（Sigma-Aldich公司）。

1.3 检测异丙肾上腺素对大鼠肝功能的影响

SD大鼠20只，随机分为对照组和实验组（$n=10$）。对照组：10 ml/kg腹腔注射0.9% NaCl；实验组：10 mg/kg腹腔注射1 mg/ml异丙肾上腺素（溶于0.9% NaCl[6]）。于24 h后抽取静脉血于促凝管中并将肝脏组织保存于10%甲醛中。用低速离心机将静脉血3 600 r/min离心15 min，收集血清并用全自动生化分析仪检测肝功能指标：谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、白蛋白（Alb）和总胆红素（TBil）。保存于10%甲醛中的肝脏组织石蜡包埋切片后，HE染色观察肝脏损伤的组织形态。

1.4 检测使用不同剂量的异丙肾上腺素兴奋β肾上腺素能受体对大鼠急性肝损伤的影响

SD雄性大鼠60只，随机分为对照组和实验组。对照组（$n=15$）：10 ml/kg腹腔注射0.9% NaCl，30 min后，1 ml/kg腹腔注射30% CCl_4（CCl_4与橄榄油3∶7配制[7]）。实验组再分为3个小组（$n=15$），腹腔注射异丙肾上腺素1、10、100 mg/kg，注射30 min后，1 ml/kg腹腔注射30% CCl_4。于急性肝损伤后第48小时收集大鼠血清和肝脏组织，用于检测肝功能指标和HE染色观察肝脏损伤的组织形态，方法同1.3。

1.5 不同时相点检测异丙肾上腺素兴奋β肾上腺素能受体对大鼠急性肝损伤的影响

SD雄性大鼠40只，随机分为对照组和实验组（$n=20$）。对照组：处理方法同1.3对照组。实验组：10 mg/kg腹腔注射异丙肾上腺素，30 min后1 ml/kg腹腔注射30% CCl_4。于急性肝损伤后第24、48、72、96小时分别在对照组和实验组中随机选取5只大鼠收集血清和肝脏组织，检测肝功能指标和HE染色观察肝脏损伤的组织形态，具体方法同1.3。

1.6 检测使用普萘洛尔抑制异丙肾上腺素兴奋β肾上腺素能受体对大鼠急性肝损伤的影响

SD雄性大鼠15只，随机分为3组（$n=5$）。急性损伤组：处理方法同1.3对照组；兴奋组：处理方法同1.3实验组；抑制组：10 mg/kg腹腔注射1 mg/ml普萘洛尔（溶于0.9% NaCl[8]），30 min后10 mg/kg腹腔注射1 mg/ml异丙肾上腺素，30 min后再1 ml/kg腹腔注射30% CCl_4。于急性肝损伤后第48小时收集大鼠血清和肝脏组织，检测肝功能指标和HE染色观察肝脏损伤的组织形态，具体方法同1.3。

1.7 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用SPSS 13.0统计软件行单因素方差分析或t检验。

2 结果

2.1 异丙肾上腺素对大鼠肝功能的影响

对照组与实验组大鼠肝功能指标差异均无统计学意义（$P>0.05$，表1）。肝脏组织HE染色观察：对照组与实验组肝索均呈放射状排列，肝细胞大小均匀，肝细胞核位于细胞中央，圆而清晰，肝窦无淤血及炎症细胞浸润。

表1 异丙肾上腺素对肝功能的影响（$n=10$，$\bar{x}\pm s$）

组别	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	Alb(g/L)	TBil(μmol/L)
对照组	32.0±5.7	85.4±9.2	29.6±1.3	2.9±0.4
实验组	32.7±8.3	88.8±5.7	28.9±1.1	2.7±0.2
t值	−0.220	−0.990	1.290	2.053
P值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

2.2 不同剂量的异丙肾上腺素兴奋β肾上腺素能受体对大鼠急性肝损伤的影响

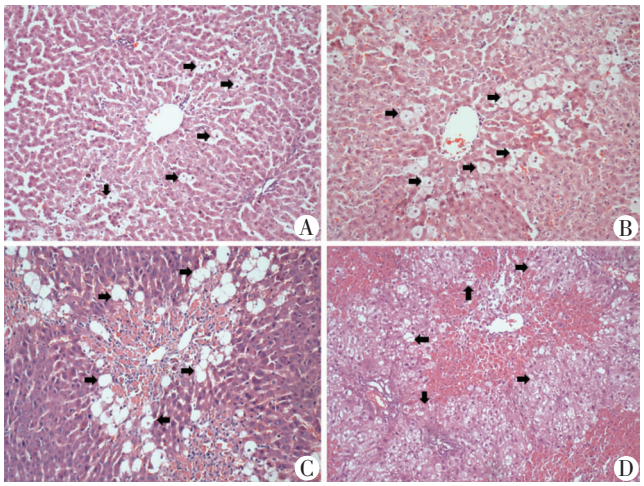
2.2.1 各剂量组肝功能指标检测 1 mg/kg组15只大鼠均存活，肝功能指标除ALT与对照组相比差异有统计学意义外（$P<0.05$），其余均无统计学意义（$P>0.05$）；10 mg/kg组1只大鼠死亡，各项肝功能指标与对照组相比差异有统计学意义（$P<0.05$），并且Alb和TBil与1 mg/kg组相比差异有统计学意义（$P<0.05$）；100 mg/kg组5只大鼠死亡，各项肝功能指标与对照组和1 mg/kg组相比差异有统计学意义（$P<0.05$），而与10 mg/kg组相比差异无统计学意义（$P>0.05$，表2）。

表2 不同剂量组肝功能指标（$n=15$，$\bar{x}\pm s$）

组别	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	Alb(g/L)	TBil(μmol/L)
对照组	336.2±140.5	857.3±505.8	27.0±2.5	4.6±1.9
1 mg/kg剂量组	603.7±239.7[a]	1 264.0±568.9	26.5±1.9	5.8±1.7
10 mg/kg剂量组	838.6±448.5[a]	1 633.7±575.9[a]	24.5±1.3[ab]	9.4±2.4[ab]
100 mg/kg剂量组	1 571.5±714.7[ab]	3 277.8±1 721.9[ab]	23.3±1.8[ab]	18.8±10.4[ab]
F值	19.552	16.242	9.875	20.398
P值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与1 mg/kg组比较

2.2.2　各剂量组肝脏组织 HE 染色观察　　对照组:肝索呈放射状排列,肝细胞水肿和脂肪变性范围较小,个别肝细胞呈气球样变;1 mg/kg 组肝细胞水肿和脂肪变性范围稍扩大,肝细胞气球样变性增多,有少量散在淋巴细胞浸润;10 mg/kg 组和 100 mg/kg 组肝组织明显淤血,肝细胞水肿和脂肪变性范围明显扩大,气球样变肝细胞增多显著,淋巴细胞在肝组织中广泛浸润(图 1)。



↑:气球样变肝细胞;A:对照组;B:1 mg/kg 剂量组;C:10 mg/kg 剂量组;D:100 mg/kg 剂量组

图 1　各剂量异丙肾上腺素兴奋 β 肾上腺素能受体对急性肝损伤肝组织的影响　(HE ×100)

2.3　不同时相点检测异丙肾上腺素兴奋 β 肾上腺素能受体对大鼠急性肝损伤的影响

2.3.1　各时相点肝功能指标检测　　在急性肝损伤后第 24 小时,实验组 ALT、AST 与对照组比较显著升高($P<0.05$);第 48 小时,实验组与对照组各项比较显著升高($P<0.05$);第 72、96 小时,实验组所有肝功能指标与对照组比较无统计学差异($P>0.05$),且急性肝损伤状态逐渐消失(表 3)。

表 3　急性肝损伤后各时相点肝功能指标($n=20, \bar{x}\pm s$)

组别	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	Alb(g/L)	TBil(μmol/L)
第 24 小时				
对照组	466.9±220.1	1 146.4±521.7	28.4±3.1	4.6±1.3
实验组	1 779.7±780.1	3 402.7±721.8	29.0±2.2	6.4±3.5
t 值	−4.859	−7.600	−0.447	−1.433
P 值	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05
第 48 小时				
对照组	290.8±153.9	521.0±296.8	28.3±1.3	4.1±1.2
实验组	636.0±385.2	2 289.1±1 361.5	25.2±1.5	24.8±16.9
t 值	−2.514	−3.815	4.682	−3.657
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05
第 72 小时				
对照组	184.8±56.8	321.0±88.5	27.4±1.5	9.1±1.7
实验组	180.3±63.5	366.7±165.5	26.4±1.4	14.1±6.3
t 值	0.103	−0.522	1.009	−1.345
P 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05
第 96 小时				
对照组	60.2±6.1	96.6±10.9	30.1±1.3	4.5±0.7
实验组	54.7±10.3	93.3±4.5	29.2±0.9	5.5±3.0
t 值	0.982	0.647	1.040	−0.798
P 值	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

2.3.2　各时相点肝脏组织 HE 染色观察　　急性肝损伤后第 24、48 小时,实验组与对照组比较,肝细胞水肿和脂肪变性范围大,气球样变性肝细胞较多,伴淤血及大量淋巴细胞浸润,两组之间差异明显;急性肝损伤后第 72、96 小时,实验组与对照组比较,病变减轻,两组之间差异不大。

2.4　使用普萘洛尔抑制异丙肾上腺素兴奋 β 肾上腺素能受体对大鼠急性肝损伤的影响

2.4.1　各组肝功能指标检测　　兴奋组各项肝功能指标与正常损伤组相比差异有统计学意义($P<0.05$),与前述实验结果一致;抑制组与兴奋组相比较,除 Alb 外,其余肝功能指标差异均有统计学意义($P<0.05$),肝损伤程度明显降低,而与正常损伤组相比较,差异无统计学意义($P>0.05$,表 4)。

表 4　抑制实验各组肝功能指标($n=5, \bar{x}\pm s$)

组别	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	Alb(g/L)	TBil(μmol/L)
正常损伤组	290.8±153.9	521.0±296.8	28.0±1.4	3.8±0.7
兴奋组	606.0±154.9[a]	1 136.8±366.5[a]	25.7±1.8[a]	5.3±1.4[a]
抑制组	210.0±176.1[b]	417.2±293.2[b]	26.0±1.1	3.4±0.8[b]
F 值	9.040	8.237	5.769	5.222
P 值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

a:$P<0.05$,与正常损伤组比较;b:$P<0.05$,与兴奋组比较

2.4.2　各组肝脏组织 HE 染色观察　　兴奋组肝细胞水肿和脂肪变性范围较大,气球样变性肝细胞较多,伴淤血及大量淋巴细胞浸润;正常损伤组和抑制组病变则明显减轻。

3　讨论

本研究显示,异丙肾上腺素本身并不对大鼠肝脏造成损伤而影响肝功能,但在大鼠 CCl_4 急性肝损伤模型中,随着异丙肾上腺素剂量的加大、β 肾上腺素能受体兴奋程度越高,大鼠急性肝损伤就越严重,甚至因为剂量太大,引起肝功能急性衰竭而导致大鼠死亡;β 肾上腺素能受体的兴奋加重大鼠急性肝损伤的现象在急性肝损伤后第 24 小时开始出现,第 48 小时最明显,第 72 小时以后由于肝脏组织自我修复,急性肝损伤逐渐消失;而应用普萘洛尔抑制 β 肾上腺素能受体兴奋,则能有效防止大鼠急性肝损伤加重。Iwai 等[9]研究证明,交感神经受刺激而兴奋可以导致血液循环中儿茶酚胺浓度增高,肝损伤加重;夏锋等[3-4, 10]研究证实,使用化学性方法去除肝内交感神经,可以显著降低 CCl_4 所致急性肝损伤的程度,改善肝脏血液循环,有利于合成功能和代谢功能的恢复;曾议等[11]研究发现,颈交感干离断和肝内去交感神经均能减轻 CCl_4 所致大鼠急性肝损害。这些研究结果与本研究结果一致,均认为交感神经可通过神经递质作用于相应受体而发挥调控肝脏炎症的进展。

Kupffer细胞是定居于肝脏内的巨噬细胞,与肝脏的急、慢性炎症关系密切,起到重要的防御作用。Hahn等[12]研究发现,在败血症后期,Kuppfer细胞β肾上腺素能受体表达上调,导致细胞内cAMP含量上升,并与炎症抑制相关。对其他单核巨噬细胞研究发现,应用β肾上腺素受体激动剂可显著抑制TNF-α、IL-6等促炎因子的释放,起到炎症抑制的作用[6,13]。而炎症因子正好可以调控细胞色素氧化酶P450的活性。细胞色素氧化酶P450是CCl_4在体内分解代谢的关键酶。CCl_4在细胞色素氧化酶P450的分解、代谢作用下,转换为三氯甲基(·CCl_3),进一步形成自由基,如:CCl_3OO·、NO,从而攻击细胞膜以及线粒体和内质网等膜样结构物质,造成脂质过氧化,最后导致细胞死亡[14-15]。然而,在炎症情况下,TNF-α、IL-6等炎症因子及NO可抑制P450家族多个成员表达下降、活性降低,其机制可能主要与细胞内cAMP浓度增高,信号传导途径JAK/STAT和SHP22/RAS/MAPK的激活,孕烷X受体(pregnane X receptor, PXR)与芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)表达增加等有关[16-17]。

基于以上实验研究及文献报道,β肾上腺素能受体的兴奋加重大鼠CCl_4急性肝损伤的机制可能是:在兴奋了Kupffer细胞的β肾上腺素能受体之后,Kupffer细胞释放的炎症因子减少,使得细胞色素氧化酶P450的活性抑制程度减弱,CCl_4在体内代谢正常,自由基产生相对较多,肝损伤程度加重。但本实验并没有涉及以上内容,在下一步的研究中,可通过去除Kupffer细胞后再行β肾上腺素能受体兴奋对肝损伤的影响实验以及Kupffer细胞离体实验加以探索,为临床上及时有效地控制肝脏炎症的进展提供依据。

综上所述,本实验结果表明,β肾上腺素能受体兴奋可加重大鼠急性肝损伤,而β肾上腺素能受体抑制则能有效防止大鼠急性肝损伤加重,也就说明交感神经可通过兴奋β肾上腺素能受体来调控肝脏内的炎症进程。

参考文献:

[1] 刘彦双, 朱淑霞, 王永利. 急性肝损伤模型的研究进展[J]. 河北医药, 2007, 29(6): 613-614.

[2] Chida Y, Sudo N, Takaki A, *et al*. The hepatic sympathetic nerve plays a critical role in preventing Fas induced liver injury in mice[J]. Gut, 2005, 54(7): 994-1002.

[3] 夏锋, 董家鸿, 何振平, 等. 去交感神经状态对大鼠肝功能的影响[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(3): 230-233.

[4] 夏锋, 董家鸿, 何振平, 等. 去交感神经状态对肝脏血流量的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(1): 43-45.

[5] Zhou M, Das P, Simms H H, *et al*. Gut-derived norepinephrine plays an important role in up-regulating IL-1beta and IL-10[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1740(3): 446-452.

[6] Wang J, Li J, Sheng X, *et al*. Beta-adrenoceptor mediated surgery-induced production of pro-inflammatory cytokines in rat microglia cells[J]. J Neuroimmunol, 2010, 223(1/2): 77-83.

[7] Moreno M, Chaves J F, Sancho-Bru P, *et al*. Ghrelin attenuates hepatocellular injury and liver fibrogenesis in rodents and influences fibrosis progression in humans[J]. Hepatology, 2010, 51(3): 974-985.

[8] Hajhashemi V, Sadeghi H, Minaiyan M, *et al*. The role of central mechanisms in the anti-inflammatory effect of amitriptyline on carrageenan-induced paw edema in rats[J]. Clinics (Sao Paulo), 2010, 65(11): 1183-1187.

[9] Iwai M, Shimazu T. Exaggeration of acute liver damage by hepatic sympathetic nerves and circulating catecholamines in perfused liver of rats treated with D-galactosamine[J]. Hepatology, 1996, 23(3): 524-529.

[10] Xia F, He Z, Li K, *et al*. Evaluation of the role of sympathetic denervation on hepatic function[J]. Hepatol Res, 2006, 36(4): 259-264.

[11] 曾议, 夏锋, 田峰, 等. 不同节段去交感神经对CCl4所致大鼠急性肝损伤的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(9): 1262-1264.

[12] Hahn P Y, Yoo P, Ba Z F, *et al*. Upregulation of Kupffer cell beta-adrenoceptors and cAMP levels during the late stage of sepsis[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1404(3): 377-384.

[13] Donnelly L E, Tudhope S J, Fenwick P S, *et al*. Effects of formoterol and salmeterol on cytokine release from monocyte-derived macrophages[J]. Eur Respir J, 2010, 36(1): 178-186.

[14] Pramyothin P, Janthasoot W, Pongnimitprasert N, *et al*. Hepatotoxic effect of (+)usnic acid from Usnea siamensis Wainio in rats, isolated rat hepatocytes and isolated rat liver mitochondria[J]. J Ethnopharmacol, 2004, 90(2/3): 381-387.

[15] Chen X W, Serag E S, Sneed K B, *et al*. Herbal bioactivation, molecular targets and the toxicity relevance[J]. Chem Biol Interact, 2011, 192(3): 161-176.

[16] Sunman J A, Hawke R L, LeCluyse E L, *et al*. Kupffer cell-mediated IL-2 suppression of CYP3A activity in human hepatocytes[J]. Drug Metab Dispos, 2004, 32(3): 359-363.

[17] Wu R, Cui X, Dong W, *et al*. Suppression of hepatocyte CYP1A2 expression by Kupffer cells *via* AhR pathway: the central role of proinflammatory cytokines[J]. Int J Mol Med, 2006, 18(2): 339-346.

(**收稿**:2012-02-14;**修回**:2012-02-27)

(编辑 邓强庭)