论著

文章编号:1000-5404(2012)08-0754-04

外源性硫化氢对大鼠肝纤维化的影响

沈钦海[1], 秦召敏[1], 于天贵[1], 刘 丽[1], 郝丽娜[2] (250002 济南,山东医学高等专科学校基础医学部临床教研室[1];250100 济南,山东大学医学院基础医学部[2])

[摘要] **目的** 探讨外源性硫化氢对四氯化碳(CCl_4)诱导大鼠肝纤维化的预防作用。**方法** 将24只Wistar雄性大鼠随机分为3组,每组8只,即正常对照组、模型组、硫化氢(H_2S)预防组。H_2S预防组除腹腔注射40% CCl_4外,还给予NaHS腹腔注射,1次/d,至第8周,所有大鼠均被处死,收集大鼠血液,检测肝纤维化指标;取肝组织检测脂质过氧化指标及观察肝脏病理变化;应用RT-PCR和Western blot方法检测肝组织NF-κB的表达。**结果** 外源性H_2S能降低血清HA、LN、PCⅢ及肝组织MDA含量($P<0.01$或$P<0.05$),增加肝组织SOD、GSH-Px活性($P<0.01$),减轻肝纤维化程度($P<0.05$),而且能使NF-κB表达明显减少。**结论** 外源性硫化氢对CCl_4诱导的大鼠肝纤维化具有保护作用,其机制可能与硫化氢抑制NF-κB表达有关。

[关键词] 硫化氢;肝纤维化;大鼠

[中图法分类号] R575.02;R914.3;R965 [文献标志码] A

Effect of exogenous hydrogen sulfide on liver fibrosis in rats

Shen Qinhai[1], Qin Zhaomin[1], Yu Tiangui[1], Liu Li[1], Hao Lina[2] ([1]Department of Clinical Medicine, Division of Preclinical Medicine, Shandong Medical College, Jinan, Shandong Province, 250002; [2]Department of Preclinical Medicine, Medical College, Shandong University, Jinan, Shandong Province, 250100, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the preventive effect of exogenous hydrogen sulfide (H_2S) on carbon tetrachloride(CCl_4)-induced hepatic fibrosis in rats. **Methods** Twenty-four male Wistar rats were randomly divided into normal control group ($n=8$), model group ($n=8$), and H_2S prevention group ($n=8$). NaHS was injected into the abdominal cavity of rats in H_2S prevention group in addition to 40% CCl_4, once a day, for 8 weeks. Then, all rats were sacrificed and blood samples were collected to test the indications of hepatic fibrosis. Lipid peroxide indications and liver pathological changes were observed in liver tissue samples. Expression of NF-κB in liver tissue was detected by RT-PCR and Western blotting, respectively. **Results** Exogenous H_2S significantly decreased the serum HA, LN, PCⅢ I and MDA levels, hepatic fibrosis, expression of NF-kB and increased the SOD and GSH-Px activities in liver tissues ($P<0.01$ or $P<0.05$). **Conclusion** Exogenous H_2S protects against CCl_4-induced hepatic fibrosis in rats by inhibiting the expression of NF-κB.

[**Key words**] hydrogen sulfide; hepatic fibrosis; rat

Supported by the Department of Education of Shandong Province(J09LF29). Corresponding author: Shen Qinhai, Tel: 86-531-86305265, E-mail: sqhsdy@163.com

肝纤维化的实质是肝脏细胞外基质(extracellular matrix, ECM),主要是胶原纤维,合成过多而降解相对不足,从而使过多的ECM沉积在肝脏组织中而形成的。肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)目前被公认为是ECM的主要细胞来源,HSC的激活是肝纤维化形成初始的中心环节[1],且HSC的激活是一个级联反应过程,即当肝脏受到各种损伤(肝炎病毒感染、氧化应激等)时,局部的肝细胞、Kupffer细胞、窦内皮细胞、血小板、中性粒细胞等释放多种细胞因子。HSC活化时伴有NF-κB激活,而NF-κB (nuclear factor kappa B)是一种重要的抗凋亡基因转录因子,与炎症反应密切相关,在慢性肝病向肝纤维化发展过程中起重要作用。内源性硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)被认为是继一氧化氮和一氧化碳之后的第3类气体信号分子,研究[2]证实硫化氢具有扩张血管、抑制血管平滑肌增殖和抗氧化应激等多种生物学效应。本实验通过外源性H_2S对NF-κB表达的影响,探讨H_2S抗肝纤维化的分子机制,从而为肝硬化门脉高压的预防及治疗提供理论依据。

[基金项目] 山东省教育厅资助课题(J09LF29)

[通信作者] 沈钦海,电话:(0531)86305265,E-mail: sqhsdy@163.com

1 材料与方法

1.1 药品和试剂

RPMI1640 与 NaHS 均购自美国 Sigma 公司;过氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所产品);透明质酸(hyaluronic acid,HA)、层粘连蛋白(laminin,LN)、三型前胶原(procollagen,PCⅢ)放射免疫检测试剂盒(上海海军医学研究所);Marker 和 Trizol 试剂为 Gibco 公司;引物合成为上海博亚生物技术公司;first strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR 和 PCR 扩增试剂均为 Roche 公司;抗 β-actin 抗体与 NF-κB 蛋白的第一抗体为鼠抗人抗体(美国 Santa Cruz 公司),羊抗鼠二抗购自晶美公司;胰蛋白酶购自上海生工公司。

1.2 实验动物

24 只 6 周龄健康,SPF 级 Wistar 雄性大鼠,体质量 200 ~ 220 g/只(山东省实验动物中心提供)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及模型制备 将 24 只雄性大鼠随机分为 3 组,每组 8 只:正常对照组、模型组、H_2S 预防组。正常对照组腹腔注射石蜡油 0.1 ml/kg,模型组和干预组给予 40% CCl_4 的石蜡油腹腔注射,剂量为 0.1 ml/kg,2 次/周,共 8 周;预防组除上述步骤外还给予 NaHS 腹腔注射[3],剂量为 56 μmol/kg,其他则给予生理盐水 1 ml 腹腔注射,1 次/d,共 8 周,所有动物在实验过程中均自由饮水和摄食。

1.3.2 肝纤维化与脂质过氧化指标的检测 将动物麻醉,摘眼球取血,分离血清,采用放免法检测 HA、LN、PCⅢ型胶原,按试剂盒说明进行操作;取肝左叶同一部位组织,制备成肝匀浆,按试剂盒说明书步骤操作检测肝组织 SOD、MDA 和 GSH-Px 的酶活性。

1.3.3 肝脏病理学检测 取肝左叶同一部位,10% 甲醛固定,不同浓度乙醇脱水,石蜡包埋,连续切片,常规脱蜡,行 HE 及 Masson 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。根据肝组织病理变化,将纤维化分为 0 ~ 4 级[4]:0 级:无肝纤维化;1 级:纤维结缔组织仅局限于汇管区或汇管区扩大,有向肝小叶发展的倾向;2 级:纤维结缔组织增生进入肝小叶 2/3 并有 1 级同样的改变;3 级:纤维结缔组织进入肝小叶中央周围;4 级:纤维结缔组织在全小叶多处弥漫性增生,假小叶形成,并有 3 级同样的改变。

1.3.4 RT-PCR 检测 NF-κB mRNA 表达 根据 GenBank 中 NF-κB 基因序列设计引物,由上海生工公司合成,上游引物序列:5′-TATGTGGAGATCATTGAGCAG-3′,下游引物序列:5′-GACCGCATTCAAGTCATAGTC-3′,产物为 365 bp;β-actin 上游引物序列:5′-CAGAGCAAGAGAGGCATCCTG-3′,下游引物序列:5′-TGCTCGAAGTCTAGGGCAACA-3′,产物为 501 bp。按说明书应用 Trizol 法抽提总 RNA,进行逆转录,并以逆转录反应产物为模板进行 PCR 扩增,扩增条件为:94 ℃ 50 s,58 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,30 个循环,然后 72 ℃ 5 min 延伸,扩增产物在琼脂糖凝胶中进行电泳,观察成像。

1.3.5 Western blot 法检测 NF-κB 蛋白的表达 将肝组织加入蛋白裂解液充分裂解,机械制备成匀浆,然后于 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min,蛋白提取物经定量后,取 50 μg 在 SDS-PAGE 凝胶上电泳,然后电转膜到醋酸纤维素膜上,封闭 2 h 后,分别加入 NF-κB 和 β-actin 一抗,在 4 ℃条件下过夜,充分用 PBS 漂洗 3 次,每次 10 min,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗震荡孵育 2 h,洗去未结合的二抗,滴加 ECL 化学发光试剂,X 线片曝光显影,观察图像。

1.4 统计学分析

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 6.12 软件对 2 组间均数比较采用 t 检验;各组肝纤维化病理分级采用秩和分析。

2 结果

2.1 H_2S 对血清肝纤维化指标的影响

由表 1 所示,与对照组比较,模型组 HA、LN 及 PCⅢ含量显著增加($P < 0.01$),说明造模成功;H_2S 预防组与模型组比较,血清 HA、LN 及 PCⅢ显著降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。

表 1 H_2S 对大鼠血清肝纤维化指标的影响($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	HA(μg/L)	LN(μg/L)	PCⅢ(μg/L)
对照组	118.47 ± 23.61	49.25 ± 9.54	63.30 ± 13.86
模型组	341.53 ± 37.15[a]	76.42 ± 7.26[a]	205.72 ± 35.10[a]
预防组	208.31 ± 27.43[b]	58.28 ± 5.40[c]	109.63 ± 23.24[b]

a: $P < 0.01$,与正常对照组比较;b: $P < 0.01$,c: $P < 0.05$,与模型组比较

2.2 H_2S 对脂质过氧化指标活性的作用

由表 2 结果表明,与对照组比较,模型组肝组织 SOD 和 GSH-Px 活性降低,MDA 含量升高,差异显著($P < 0.01$);与模型组比较,预防组 SOD 与 GSH-Px 活性显著升高($P < 0.01$),MDA 活性显著降低($P < 0.01$)。

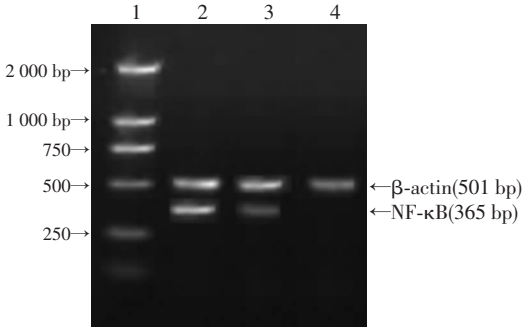
表 2 H_2S 对脂质过氧化指标的影响($n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	GSH-Px(U/mg)
对照组	1.43 ± 0.31	147.60 ± 25.31	91.13 ± 8.46
模型组	4.67 ± 0.86[a]	93.54 ± 10.12[a]	42.27 ± 6.82[a]
预防组	2.53 ± 0.37[b]	116.35 ± 23.64[b]	63.8 ± 3.16[b]

a: $P < 0.01$,与对照组比较;b: $P < 0.01$,与模型组比较

2.3 RT-PCR 检测肝组织 NF-κB mRNA 的表达

图 1 所示在模型组和预防组中,肝组织中 NF-κB mRNA 均有表达,但模型组表达量最多,条带最亮,预防组条带较暗,而对照组中则没有 NF-κB mRNA 表达。

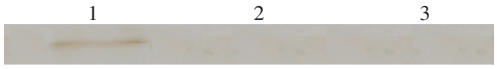


1:标准;2:模型组;3:预防组;4:对照组

图 1 RT-PCR 检测 NF-κB mRNA 的表达

2.4 Western blot 法检测 NF-κB 的蛋白表达

图2结果显示，模型组有 NF-κB 蛋白表达，条带较亮，预防组由于 NF-κB 蛋白表达量太少，没有显示条带，对照组没有蛋白表达，无条带。



1：模型组；2：预防组；3：对照组

图2 Western blot 检测 NF-κB 蛋白的表达

2.5 大鼠肝脏病理变化

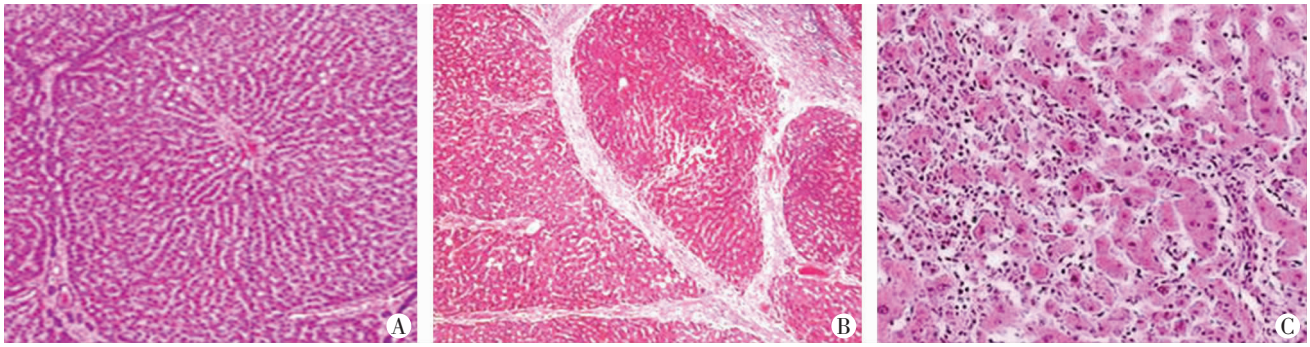
肝组织苏木精-伊红（HE）和 Masson 染色观察肝组织中胶原沉积，结果显示（图3、4），正常对照组肝小叶完整、肝索排列整齐，结构完整；模型组肝索排列紊乱，汇管区炎性细胞、坏死细胞增多，汇管区和小叶内出现局限性的纤维化，部分区域出现纤维纵隔，肝小叶结构破坏，甚至有假小叶形成；治疗组与模型组比较，变性坏死肝细胞减少，肝纤维化程度明显减轻。秩和检验表明（表3），正常对照组为0级；模型组大多为3、4级；预防组大鼠肝细胞变性、坏死明显减轻，结缔组织轻度增生，大多为1、2级，未见假小叶形成，预防组与模型组比较纤维化程度明显减轻（$P<0.05$）。

表3 各组大鼠肝组织纤维化程度（$n=8$）

组别	肝纤维化的分级				
	0级	1级	2级	3级	4级
对照组	8	0	0	0	0
模型组	0	0	0	3	5
预防组	0	4	3	1	0

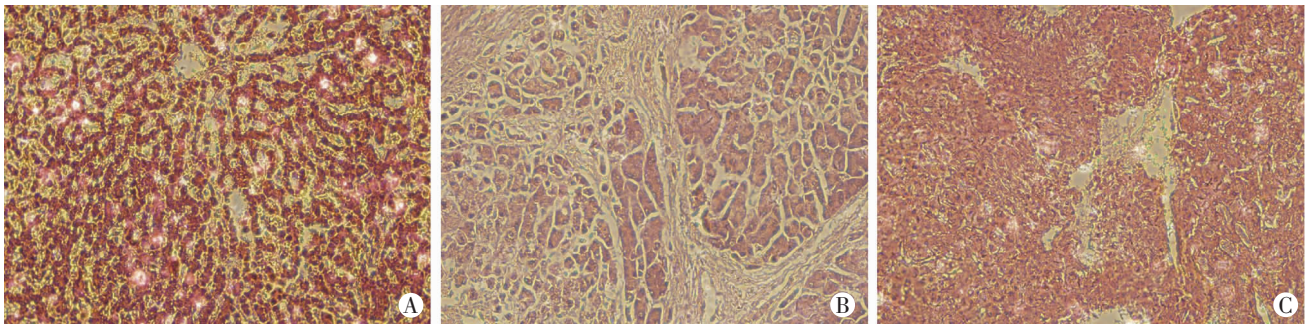
3 讨论

在肝硬化进展的病理生理过程中，肝纤维化是肝脏发展至肝硬化的必经阶段，而肝星状细胞活化是肝纤维化发生的核心环节。许多研究证实 NF-κB 在肝纤维化的发生、发展中起重要作用[5]。NF-κB 对肝脏再生及炎症反应均有调节作用，抑制 NF-κB 可以影响 HSC 的激活过程。体内的研究表明，HSC 激活可伴有 NF-κB 等转录因子的激活及 C-myb 基因表达的增强，而 C-myb 蛋白可结合于 α-SMA 基因调控区，故 NF-κB 及 C-myb 在 HSC 激活的过程中具有重要的作用[6-8]。在肝纤维化过程中涉及多种细胞的凋亡反应，NF-κB 是 HSC 最重要的抗凋亡因子，它能够抑制细胞凋亡。实验证明 NF-κB 对 HSC 有抗凋亡效应[9]，NF-κB 可通过刺激活化 HSC 表达基因拮抗小鼠 HSC 的凋亡[10]。Schwabe 等[11]研究发现 NF-κB 除了抑制肝细胞凋亡以外，对 HSC 也有抗凋亡作用，并且还可以促进其增生。因此，有学者研究认为 NF-κB 通路在诱导肝星状细胞凋亡，逆转肝纤维化中有重要作用[6]。近年来研究发现，气体信号分子硫化氢与一氧化氮、一氧化碳相似，具有多种生物学功能[12]。H_2S 作为重要的新型气体信号分子参与调节平滑肌的舒张功能[13]，抑制平滑肌细胞增殖和诱导平滑肌细胞凋亡的作用[14]。有研究发现，H_2S 通过下调凋亡抑制因子 Bcl-2 及 NF-κB



A：对照组；B：模型组；C：预防组

图3 HE 染色观察各组大鼠肝组织病理变化 （×100）



A：对照组；B：模型组；C：预防组

图4 Masson 染色观察各组大鼠肝组织病理变化 （×100）

水平，激活效应因子 Caspase-3 而促进血管平滑肌细胞凋亡[15-16]。本实验结果显示，与模型组比较，H_2S 预防组血浆中 HA、LN、PC Ⅲ 含量明显降低，且伴随着 NF-κB 表达的下降，而 NF-κB 可直接参与胶原蛋白的调控[17]，因此抑制 NF-κB 活性可能具有直接减少细胞外基质（ECM）合成的作用。另外，氧化应激，特别是脂质过氧化产物，可能是 HSC 活化和增生的重要媒介，它们可能是通过 NF-κB 等信号途径而起作用。氧化应激诱导 NF-κB 在 HSC 活化的过程中起重要作用[18-19]。有研究显示外源性 H_2S 通过减轻氧化应激拮抗肺纤维化而起到保护作用[20]。体外研究证明氧应激下硫化氢对 HSC 细胞具有保护作用，可抑制肝纤维化的发生、发展[21]，提示 H_2S 能够参与氧化应激反应。本实验结果发现，外源性 H_2S 参与了抗脂质过氧化作用，与模型组比较，H_2S 预防组 MDA 的含量明显降低，GSP-Px、SOD 活性升高，且病理变化明显减轻。

总之，本实验表明在 CCl_4 诱导的大鼠肝硬化模型中，外源性硫化氢对 NF-κB 表达具有抑制作用，抑制 NF-κB 的表达不仅可抑制 HSC 介导的肝内炎症反应，而且还可促进激活的 HSC 的凋亡，抑制肝纤维化的发展。因此，加强 H_2S 抗肝纤维化发生机制的研究，不仅将成为肝纤维化治疗的新靶点，也可为 H_2S 的临床应用提供了一定的理论基础和依据。

参考文献：

[1] Friedman S L. Mechanisms of disease: Mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications[J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2004, 1(2): 98-105.

[2] Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress[J]. FASEB J, 2004, 18(10): 1165-1167.

[3] Yan H, Du J, Tang C. The possible role of hydrogen sulfide on the pathogenesis of spontaneous hypertension in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(1): 22-27.

[4] Hayasaka A, Saisho H. Serum markers as tools to monitor liver fibrosis [J]. Digestion, 1998, 59(4): 381-384.

[5] 周宇，唐志凌，魏陶丽，等. 核因子-NF-κB p65 反义寡核苷酸对大鼠肝星状细胞转化生长因子 β1 及细胞间黏附分子 1 表达的影响[J]. 中华肝脏病杂志，2008，16(10)：762-766.

[6] Lang A, Schoonhoven R, Tuvia S, *et al*. Nuclear factor kappaB in proliferation, activation, and apoptosis in rat hepatic stellate cells[J]. J Hepatol, 2000, 33(1): 49-58.

[7] Buck M, Kim D J, Houglum K, *et al*. c-Myb modulates transcription of the alpha-smooth muscle actin gene in activated hepatic stellate cells [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 278(2): G321-G328.

[8] Vasiliou V, Lee J, Pappa A, *et al*. Involvement of p65 in the regulation of NF-kappaB in rat hepatic stellate cells during cirrhosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 273(2): 546-550.

[9] Oakley F, Meso M, Iredale J P, *et al*. Inhibition of inhibitor of kappaB kinases stimulates hepatic stellate cell apoptosis and accelerated recovery from rat liver fibrosis[J]. Gastroenterology, 2005, 128(1): 108-120.

[10] Elsharkawy A M, Wright M C, Hay R T, *et al*. Persistent activation of nuclear factor-kappaB in cultured rat hepatic stellate cells involves the induction of potentially novel Rel-like factors and prolonged changes in the expression of IkappaB family proteins[J]. Hepatology, 1999, 30(3): 761-769.

[11] Schwabe R F, Schnabl B, Kweon Y O, *et al*. CD40 activates NF-kappa B and c-Jun N-terminal kinase and enhances chemokine secretion on activated human hepatic stellate cells[J]. J Immunol, 2001, 166(11): 6812-6819.

[12] Yang G, Wu L, Jiang B, *et al*. H_2S as a physiologic vasorelaxant: hypertension in mice with deletion of cystathionine gamma-lyase[J]. Science, 2008, 322(5901): 587-590.

[13] Zhao W, Zhang J, Lu Y, *et al*. The vasorelaxant effect of H_2S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener[J]. EMBO J, 2001, 20(21): 6008-6016.

[14] 陈晓波，杜军保，张春雨，等. 新型气体信号分子硫化氢对低氧大鼠肺动脉平滑肌细胞凋亡的影响[J]. 北京大学学报：医学版，2004，36(4)：341-344.

[15] Sodha N R, Clements R T, Feng J, *et al*. The effects of therapeutic sulfide on myocardial apoptosis in response to ischemia-reperfusion injury[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2008, 33(5): 906-913.

[16] Oh G S, Pae H O, Lee B S, *et al*. Hydrogen sulfide inhibits nitric oxide production and nuclear factor-kappaB *via* heme oxygenase-1 expression in RAW264. 7 macrophages stimulated with lipopolysaccharide[J]. Free Radic Biol Med, 2006, 41(1): 106-119.

[17] Novitskiy G, Potter J J, Rennie-Tankersley L, *et al*. Identification of a novel NF-kappaB-binding site with regulation of the murine alpha2 (I) collagen promoter[J]. J Biol Chem, 2004, 279(15): 15639-15644.

[18] Lee K S, Lee S J, Park H J, *et al*. Oxidative stress effect on the activation of hepatic stellate cells[J]. Yonsei Med J, 2001, 42(1): 1-8.

[19] Jokelainen K, Reinke L A, Nanji A A. NF-Kappab activation is associated with free radical generation and endotoxemia and precedes pathological liver injury in experimental alcoholic liver disease[J]. Cytokine, 2001, 16(1): 36-39.

[20] 李虹，刘新民，耿彬，等. 新型气体信号分子硫化氢在大鼠肺纤维化发病中的作用[J]. 北京大学学报：医学版，2006，38(2)：140-145.

[21] 阳丹才让，邓勇，任利，等. 硫化氢对 MDA 及 GSH 在大鼠肝星状细胞氧应激中表达的影响[J]. 世界华人消化杂志，2009，17(36)：3725-3728.

（**收稿**：2011-10-27；**修回**：2011-12-29）

（编辑 王 红）