维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)05－0592－03

还原型谷胱甘肽对大鼠慢性肝损伤的保护作用

石小枫, 刘 杞, 郭树华

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察还原型谷胱甘肽(GSH)对实验性慢性肝损伤的保护作用。方法:用四氯化碳致大鼠慢性肝损伤模型,GSH 分别采用灌胃及腹腔注射两个途径给药,剂量分别为 1.25g/kg、0.5g/kg、0.2g/kg 及 0.4g/kg、0.1g/kg、0.025g/kg,实验结束时采血检测 ALT、AST、白蛋白等,并解剖动物分离肝脏,作肝病理形态、纤维化分级及Ⅰ型胶原免疫组化观察。结果:GSH 灌胃及腹腔注射给药组的 ALT、AST 水平较模型组明显为低。病理形态观察发现,GSH 能使肝细胞肿胀及脂肪变性程度明显减轻,抑制纤维组织的增生及Ⅰ型胶原的表达。结论:GSH 对四氯化碳所致的慢性肝损伤有明显的保护作用,为其临床应用提供了药理学基础。

【关键词】还原型谷胱甘肽;慢性肝损伤;大鼠

【中国图书分类法分类号】R36 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－11－11

Effect of glutathione on chronic liver injury in rat

SHI Xiaofeng, et al

(*Institute for Viral Hepatitis, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To observe the prevention of glutathione(GSH) against chronic liver injury in rat. *Methods*: The chronic liver injury model was made by intracutaneous injection of carbon tetrachloride twice a week in rats for 24 times. From the 8th week after the carbon tetrachloride injection, GSH was given by oral or peritoneal administration once a day for 60 days. The animals were sacrificed at the end of the experiment. The serum level of ALT, AST were measured. The liver tissue was studied with histopathological or immunohistochemical assay. *Results*: GSH markly decreased the serum level of ALT, AST and improved liver tissue inflammation and lessend the liver fibrosis in histopathology compared with the model group. In the immunohistochemical stain, the deposition of type Ⅰ collagen of liver tissue significantly decreased in GSH treatment group compared with the model group. *Conclusion*: GSH can protect live from injury induced by toxic material.

【Key words】 Glutathione; Chronic liver injury; Rat

还原型谷胱甘肽是含有巯基的三肽,其主要功能在于能对人体氧化还原系统、巯基酶起活化作用,并产生解毒效应。还原型谷胱甘肽参与体内三羧酸循环及糖代谢使体内获得高能量,起辅酶的作用。我们的研究表明,还原型谷胱甘肽对 D－氨基半乳糖及四氯化碳所致的小鼠急性肝损伤有明显的保护作用[1],本文进一步探讨了还原型谷胱甘肽对四氯化碳致大鼠慢性肝损伤的保护作用。

1 材料与方法

作者介绍:石小枫(1964－),男,副教授,硕士,
主要研究方向:病毒性肝炎的免疫发病机理及治疗。

1.1 实验动物

Wistar 大鼠 240 只,体重 110～180g/只,雌雄各半,购自重庆市中药研究院实验动物研究室。

1.2 药物及主要试剂

还原型谷胱甘肽(GSH)由重庆药友制药有限公司提供,临用时用生理盐水配制;联苯双酯购自浙江温岭制药厂;Ⅰ型胶原抗体购自上海医科大学病理教研室,工作浓度 1∶50;ABC 试剂盒购自华美生物制品公司;四氯化碳(CCl_4)由重庆东方试剂厂出品;ALT、AST 试剂盒购自上海荣盛试剂厂;血清唾液酸、总蛋白、白蛋白试剂盒购自重庆医学检验试剂研究所。

1.3 实验方法

1.3.1 GSH 灌胃对 CCl4 致大鼠慢性肝损伤的影响 Wistar 大鼠 120 只,雌雄各半,随机分为 6 组,每组 20 只,即:生理盐水组、模型组、联苯双酯组、GSH 0.2g/kg、0.5g/kg、

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.25g/kg 3个剂量组。除正常对照外,其余各组大鼠经皮下注射10%的CCl_4液体石蜡液 5ml/kg,每周 2 次,连续 3 个月,造成肝损伤,从第 2 月开始分别灌胃不同的相应药物及生理盐水,每日 1 次,连续 2 个月,每周称 1 次体重以调节给药量。实验结束时采血测 ALT、AST、总蛋白、白蛋白及唾液酸,取一部分肝脏,烘干后称重,用氯氨 T 法测羟脯氨酸含量,另取一部分肝脏用 10%福尔马林固定后作病检,按肝细胞肿胀、脂肪变性程度分为轻、中、重,用"+、++、+++"表示,无变化用"-"表示,并进行纤维组织增生程度分级。

1.3.2 GSH 腹腔注射对 CCl_4 致大鼠慢性肝损伤的影响 Wistar 大鼠 120 只,雌雄各半,随机分为 6 组,每组 20 只,即:生理盐水组、模型组、联苯双酯组、GSH 0.025g/kg、0.1g/kg、0.4g/kg 3个剂量组。肝组织病理切片按试剂盒说明书进行Ⅰ型胶原免疫组化染色观察。其余均同上。

2 结 果

2.1 GSH 灌胃对 CCl_4 致大鼠慢性肝损伤的保护作用

2.1.1 GSH 灌胃对 CCl_4 致大鼠肝功的影响

表 1 结果提示,GSH 灌胃对 CCl_4 致大鼠慢性肝损害 ALT、AST 的升高有明显的降低作用。肝羟脯氨酸含量测定,GSH1.25g/kg 组较模型组低,但无统计学意义。对唾液酸无影响。

2.1.2 GSH 灌胃对 CCl_4 致大鼠慢性肝损害的病理形态观察

表 2 结果揭示,GSH 0.2g/kg、0.5g/kg、1.25g/kg 灌胃对 CCl_4 致大鼠肝细胞肿胀及脂肪变性有明显的抑制作用;1.25g/kg 组的肝纤维组织增生程度也明显低于模型组,从整个病理学形态的改善方面体现了一定的剂量效应关系。

2.2 GSH 腹腔注射对 CCl_4 致大鼠慢性肝损伤的保护作用

2.2.1 GSH 腹腔注射对 CCl_4 致大鼠肝功的影响

表 3 结果提示,GSH 腹腔注射对 CCl_4 致大鼠 ALT、AST 的升高有明显的降低作用,并成剂量效应关系,对白蛋白的改善不明显。同样对肝羟脯氨酸及唾液酸无明显影响。

2.2.2 GSH 腹腔注射对 CCl4 致大鼠慢性肝损害的病理形态观察

表 1 GSH 灌胃对 CCl_4 致大鼠肝功的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量(g/kg)	动物数(只)	给药时间(天)	白蛋白(g/dl)	ALT(U/L)	AST(U/L)
生理盐水		16	60	4.21±0.70	31.40±12.10	49.90±9.60
模型组		16	60	3.38±0.28	219.60±48.00	213.40±25.40
联苯双酯	0.06	16	60	3.55±0.59	48.40±10.00**	117.10±7.60**
GSH	0.20	15	60	3.42±0.50	61.70±20.00**	127.60±31.70**
	0.50	17	60	3.58±0.40	64.70±19.00**	125.10±19.70**
	1.25	16	60	3.42±0.47	59.90±15.50**	116.10±9.90**

注:** 与模型组比 $P<0.01$;* 与模型组比 $P<0.05$ 下同。

表 2 GSH 灌胃对 CCl_4 致大鼠肝损害的病理观察

组 别	剂量(g/kg)	动物数(只)	给药时间(天)	肝细胞肿胀脂肪变性				纤维组织增生分级					
				-	+	++	+++	1	2	3	4	5	6
生理盐水		16	60	16	0	0	0	16	0	0	0	0	0
模型组		16	60	0	2	9	5	0	2	5	3	3	3
联苯双酯	0.06	16	60	0	11	5	0**	0	2	7	3	2	2
GSH	0.20	15	60	0	12	2	1**	0	3	6	2	3	1
	0.50	17	60	4	9	2	2**	1	3	7	4	1	1
	1.25	16	60	6	8	2	0**	3	6	4	2	1	0**

表 3 GSH 腹腔注射对 CCl_4 致大鼠肝功的影响($\bar{x} \pm s$)

组 别	剂量(g/kg)	动物数(只)	给药时间(天)	白蛋白(g/dl)	ALT(U/L)	AST(U/L)
生理盐水		16	60	3.38±0.48	13.11±8.6	45.30±11.20
模型组		16	60	2.98±0.30	129.10±45.70	252.70±56.20
联苯双酯	0.060	16	60	2.75±0.34	31.50±17.20**	211.50±79.80
GSH	0.025	15	60	2.79±0.37	49.50±14.40**	227.50±32.50
	0.100	16	60	2.96±0.35	38.70±11.06**	204.10±26.70**
	0.400	15	60	2.77±0.43	16.10±5.68**	204.80±37.60**

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 4 GSH 腹腔注射对 CCl_4 致大鼠肝损害的病理观察

组别	剂量(g/kg)	动物数(只)	给药时间(天)	肝细胞肿胀脂肪变性				纤维组织增生分级					
				−	+	++	+++	1	2	3	4	5	6
生理盐水		16	60	16	0	0	0	16	0	0	0	0	0
模型组		16	60	0	1	9	6	0	1	5	3	4	3
联苯双酯	0.060	16	60	2	9	5	0**	0	1	8	3	2	2
GSH	0.025	15	60	1	6	4	4	0	2	6	3	3	1
	0.100	16	60	1	9	4	2*	1	2	7	5	0	1
	0.400	15	60	3	8	3	2**	3	6	4	1	1	0**

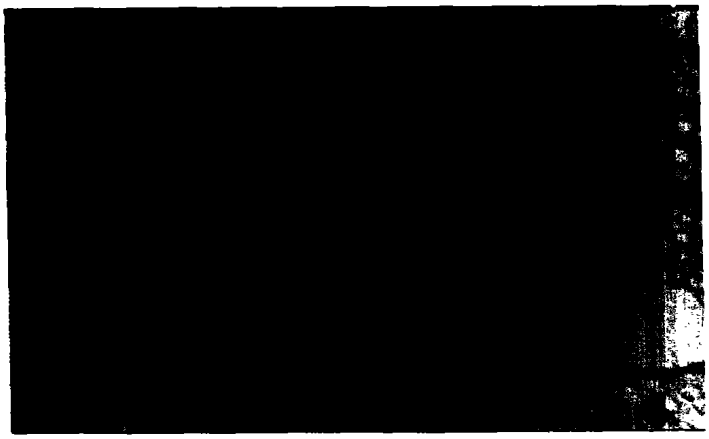


图 1 模型组(ABC 法 100×)

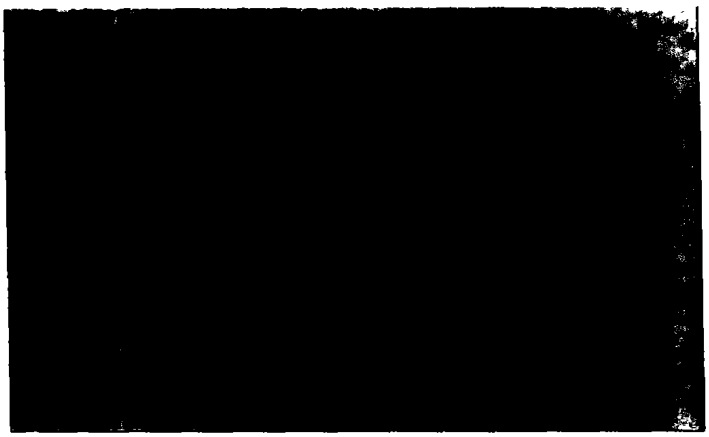


图 2 GSH 0.48g/kg 组(ABC 法 100×)

表 4 结果揭示,GSH 腹腔注射 0.1g/kg、0.4g/kg 能明显改善 CCl_4 导致的大鼠肝细胞肿胀、脂肪变性;并且对纤维组织的增生也有明显的抑制作用,体现一定的剂量效应关系。

2.2.3 对Ⅰ型胶原表达的影响 免疫组化检测了肝组织的Ⅰ型胶原表达,结果为:模型组假小叶中央静脉周围强阳性染色,向小叶周边延伸,狄氏间隙、汇管区也有Ⅰ型胶原的阳性染色;而 GSH 腹腔注射 0.4g/kg 组动物肝组织中央静脉周围、汇管区、及部分狄氏间隙有弱阳性染色,说明其Ⅰ型胶原的表达程度明显低于模型组(见图 1、图 2)。

3 讨 论

GSH 是人体内一种很重要的物质,它参与体内三羧酸循环及糖代谢,使体内获得高能量,起辅酶的作用,它是甘油醛磷酸脱氢酶的辅基,又是乙二醛酶及磷酸丙糖脱氢酶的辅酶,能激活多种酶,具有多种多样的生理活性且在肝脏中存在的浓度最高,能提高血浆一氧化氮含量而改善肝脏微循环[2]。CCl_4 是肝脏剧毒物质,进入体内后经肝脏细胞色素 P_{450} 酶系代谢,产生阴离子自由基及超氧阴离子自由基,与细胞膜上的蛋白质或非饱和脂肪酸共价结合,产生脂质可氧化物引起细胞膜及内质网等膜结构的破坏,继而造成 DNA 和蛋白质的损害。而 GSH 可为谷胱甘肽过氧化酶提供还原剂,以抑制或减少自由基的产生,起到保护肝细胞的作用。肝炎和肝硬化等肝脏疾患会使血中 GSH 浓度降低,药物和金属中毒会增加肝脏对 GSH 的消耗,因此从外部补充 GSH 对肝脏顺利进行解毒和物质代谢具有重要意义。

本文所用 GSH(商品名:阿托莫兰)由重庆药友制药有限公司生产,作为新药应用于临床治疗多种原因所致的肝损害,临床研究表明 GSH 对酒精所致的肝损伤患者 ALT、AST 及黄疸的升高有明显的降低作用,临床症状也有不同程度的改善,总有效率为 93%,与进口的相应药品 TAD 有相同的疗效,但价格较进口药品更为低廉[3]。本文用 CCl_4 致大鼠慢性肝损伤模型,研究了 GSH 对肝损伤的保护作用,结果表明 GSH 灌胃和腹腔注射给药能降低 CCl_4 致大鼠 ALT、AST 的升高,但对白蛋白无明显影响,这可能和慢性损伤时出现代偿有关。胶原分子中绝大部分氨基酸常以甘氨酸-脯氨酸-羟脯氨酸或羟赖氨酸重复排列,羟脯氨酸几乎是胶原中特有的氨基酸,但本实验用氯胺 T 法检测中由于标准差过大,虽治疗组与模型组相比有一定的降低,没有显示出统计学意义。在病理形态方面,GSH 还能使肝细胞肿胀、脂肪变性及纤维化程度明显减轻,(下转第 635 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

筛选试验发现,萘替芬对曲霉菌等丝状真菌的抑杀效果甚佳,而酮康唑对酵母类真菌的抑菌较好,将两种药物按一定比例组成复方,其抗菌作用大大增强,明显强于萘替芬或酮康唑单独使用。

实验结果表明,将萘替芬与酮康唑联合使用对皮肤须癣毛癣菌或白念珠菌引起的皮肤真菌感染的治愈率甚高,不仅治愈时间而且治愈率均较萘替芬或酮康唑单独使用为优,提示复方萘替芬霜一个有发展前景的外用抗真菌药,值得临床试用。

参 考 文 献

[1] 廖万清,李志刚,温 海,等.复方萘替芬喷雾剂及冷霜的研制与应用[J].第二军医大学学报,1999;20(3):187-188.

[2] 郭宁如,吴绍熙,沈永年,等.特比萘芬治疗豚鼠皮肤须癣毛癣菌感染的疗效[J].新药与临床,1996;15(6):339-341.

[3] 鲍燕燕,凌 云,陈冰璞,等.布替萘芬对豚鼠皮肤须发癣霉的疗效观察[J].中国抗生素杂志,2000;25(2):145-147.

[4] 陈光仍,张 莉.浅部真菌致病菌种分析[J].中华皮肤科杂志,1996;29(5):365.

[5] 程培华,廖耀玲,高秋思,等.桂北地区浅部真菌病原菌分离培养观察[J].中华皮肤科杂志,1996;29(1):62.

[6] 郭润身.太原地区病原真菌调查报告[J].中华皮肤科杂志,1989;22(1):28.

[7] 吴绍熙,郭宁如.国产抗真菌药药效学研究[J].中华皮肤科杂志,1994;27(2):80.

[8] Spitzer ED. Persistence of the initial infection in recurrent cryptococcal meningitis[J]. Lancet,1993;(8845):595.

[9] Paltauf FG, Daum G, Iuder G, et al. Squalene and ergosterol biosynthesis in fungi treated with naftifine, a new antimycotic agent[J]. Biochem Biophys Acta,1982;712:268.

(上接第 594 页)免疫组化提示其Ⅰ型胶原的合成也受到了抑制,这可能和 GSH 能对人体氧化还原系统、巯基酶起活化作用,并产生解毒效应,使肝脏受有毒物质的攻击减轻,损伤的肝细胞得以再生有关。

联苯双酯是治疗慢性肝炎的药物,能抑制 CCl_4 引起的肝脏微粒体脂质过氧化及与肝脏微粒体、脂质的共价结合,从而减轻 CCl_4 的毒性代谢产物(自由基)所引起的肝细胞生物膜的结构和功能损害,使升高的 ALT 降低,此外,联苯双酯对肝脏解毒过程中起重要作用的终末氧化酶细胞素 P_{450} 有明显诱导作用,加强对 CCl_4 等毒物的解毒能力。本文中其作为阳性对照药物,显示了抗 CCl_4 致肝细胞损伤作用。

参 考 文 献

[1] 石小枫,刘 杞,郭树华.还原型谷胱甘肽对小鼠急性肝损伤的保护作用[J].现代医药卫生,2002;18(10):849-850.

[2] Kronck KD, Fehsel K, Suschek C, et al. Inducible nitric oxide synthase - derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival[J]. Int Immunopharmacol,2001;1(8):1407-1420.

[3] 张全海,郭树华,胡大荣,等.国产还原型谷胱甘肽治疗酒精性肝病疗效观察[J].中华肝脏病杂志,2000;8(4):239-240.