DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.017
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
230 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)03-0230-04

去交感神经状态对大鼠肝功能的影响

夏 锋,董家鸿,何振平,李 昆,陈 莉,王小丽 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨去交感神经状态对肝脏功能的影响。方法 健康Wistar大鼠80只随机分为4组:对照组、CCl_4组、6-OHDA组和CCl_4+6-OHDA组。应用6-OHDA制作去交感神经动物模型,应用CCl_4制作急性肝损伤模型。各组分别经"去交感神经"和"急性肝损伤"处理后,检测不同处理组的各项肝功能指标。结果 在肝损伤的情况下,去交感神经状态有利于蛋白的合成、胆红素的代谢、能量的代谢和ICG排泄,同时也使低血钾的程度减轻。单独去交感神经对肝功能的影响不明显。结论 去交感神经状态可减轻CCl_4致肝损伤时肝功能损害的程度。

关键词:肝脏;交感神经;肝功能;化学性去神经
中图法分类号:R322.47;R338.5 文献标识码:A

Effects of denervation of sympathetic nerve on liver function in rats

XIA Feng, DONG Jia-hong, HE Zhen-ping, LI Kun, CHEN Li, WANG Xiao-li (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effects of sympathetic denervation of the liver on liver function in the normal and chemically injured liver. Methods Eighty healthy male Wistar rats were divided randomly into four groups: control, carbon tetrachloride group (CCl_4), 6-hydroxydopamine group (6-OHDA), and CCl_4+6-OHDA group. Chemical denervation model was prepared by injection of 6-OHDA (2 ml, 100 mg/L) through the mesenteric vein of jejunum loop. Acute liver injury model was established by using CCl_4. Blood chemistry, ATP, arterial ketone body ratio (AKBR) and indocyanine green (ICG15) in each group were determined after treatment of sympathetic denervation and acute liver injury. Results Chemical denervation resulted in significant changes of parameters under acute liver injury, and has beneficial effects on protein anabolism, metabolism of bilirubin and energy, ICG excretion, and alleviation of low-potassium in serum. However, simple sympathetic denervation had no effect on liver function. Conclusion Sympathetic denervation can alleviate liver injury due to CCl_4, and has beneficial effects on liver function.

Key words: liver; sympathetic nerve; liver function test; chemical denervation

形态学的研究证实,肝脏内分布有大量的自主神经纤维。刺激肝门部的肝脏神经支可引发血糖和肝血流量的明显变化[1,2]。但肝脏功能的神经调控机制目前仍然了解甚少。交感神经是自主神经中的重要组成部分。而有关交感神经对肝功能的调控则研究较少。在肝脏外科中经常会游离肝脏周围的韧带,在这些韧带中,特别是肝十二指肠韧带中分布有大量的支配肝脏的神经纤维。这种大范围的游离必然会损伤肝脏的神经丛,从而导致肝脏的去神经状态[3,4]。在肝脏去神经的状态下,是否会对肝脏功能产生影响,目前尚报道较少。本实验应用大鼠去交感神经动物模型,探讨在去交感神经状态下,肝功能的变化和合并肝损伤时肝功能的代偿改变。以了解肝脏的神经调控机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

6-羟基多巴胺(6-Hydroxydopamine, 6-OHDA),羟苯乙醇胺、牛磺胆酸钠、三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷、β-羟丁酸脱氢酶、乙酰乙酸、D,L-1,3-羟丁酸(Sigma,美国);CCl_4(重庆化学试剂公司),前白蛋白试剂盒、白蛋白试剂盒、总蛋白试剂盒和总胆红素、直接胆红素试剂盒(上海长征康仁医学科学有限公司),电解质试剂盒(Beckman,美国),血糖试剂盒(Human,德国),结晶牛血清白蛋白(华美公司分装),电荧光素酶粉(上海植生所)。吲哚氰绿(ICG)(辽阳第三制药厂产品)。

1.2 实验动物与分组

健康Wistar大鼠共80只,雌雄各半,体质量180~220 g,均

作者简介:夏 锋(1968-),男,安徽省马鞍山市人,博士,主治医师,讲师,主要从事肝脏功能的调控方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)65387419

收稿日期:2003-08-23;修回日期:2003-12-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

由第三军医大学实验动物中心提供。随机分成 4 组, 每组 20 只: A: 对照组(Sham 组), 仅于麻醉状态下于腹部切一小口, 随即缝合; B: CCl_4 组, 每组 20 只。于腹部皮下多点注射 60% CCl_4(CCl_4 和灭菌石蜡油之比为 6∶4, 按 0.4 ml/100 g); 于实验后第 4 天追加一次; C: 6-OHDA 组, 按去交感神经动物模型方法; D: CCl_4+6-OHDA 组, 同上方法, 去交感神经后即给予 CCl_4。

各组分别于实验后第 7 天由腹主动脉抽血, 离心取上清, −20 ℃保存备用。

1.3　肝脏去交感神经状态动物模型

参考文献[5,6]的方法并加以改良。

1.4　应用全自动生化分析仪测定如下指标, 按照实验指导方法

前白蛋白(prealbumin, PA): 免疫比浊法; 白蛋白(albumin, Alb): 溴甲酚氯比色法; 总蛋白(total protein, TP): 双缩脲比色法; 总胆红素(total bilirubin, TB)和直接胆红素(BD): 速率法。

电解质　间接选择性电极法(K^+、Na^+、Cl^-), 萘二酯比色法(Ca^{2+})。

1.5　肝脏能量代谢的检测

1.5.1　肝组织三磷酸腺苷(ATP)含量的测定　　应用生物发光法。

1.5.2　动脉血酮体比值(arterial ketone body ratio)　　麻醉后于大鼠腹主动脉穿刺抽血 1.5 ml, 迅速与等量预冷至 4 ℃的 10% 高氧酸 PCA 充分混匀, 4 ℃下 10 000× g 离心 10 min, 取上清液用 69% K_2CO_3 调 pH 至 5.5~6.0; 再次于 4 ℃; 8 000 g 离心 5 min, 取上清待测, 用 Pharmacia 4060 型可见紫外分光光度计在 340 nm 处按 Li KP 等所介绍的方法测定乙酰乙酸(AcAc)和β-羟丁酸(β-HB)浓度, 单位以 mmol/L 表示。计算动脉血酮体比值。AKBR= AcAc/β-HB。

1.6　吲哚氰绿 15 min 潴留率($ICGR_{15}$)的测定

实验用大鼠禁食半天后进行, 从一侧颈静脉用微量注射器快速注入 ICG(0.5 mg/kg), 注药前及注药后 15 min 在对侧颈静脉抽血、分离血浆、用紫外分光光度计系统于波长 805 nm 处测定吸光度, 根据标准曲线计算 ICG 值。

$$R_{15}=\frac{C15\ mg\%}{1\ mg\%}\times 100\%$$

C15 表示注射后 15 min 血浆内靛氰绿的浓度。假设注射 0 时刻血浆内靛氰绿浓度为 1 mg%。

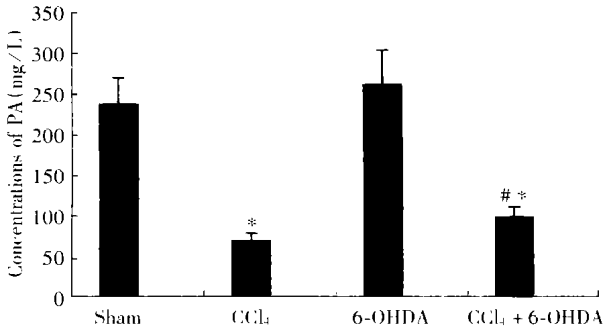
1.7　统计学处理

采用 t 检验。

2　结果

2.1　去交感神经状态对肝脏蛋白合成功能的影响

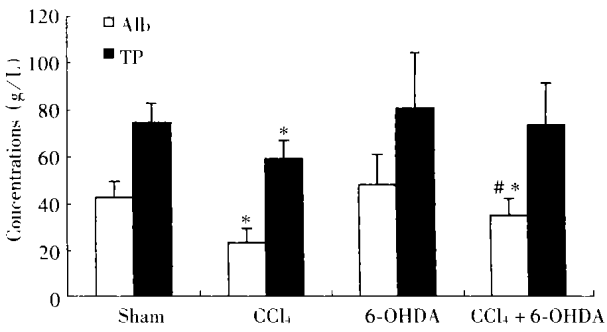
去交感神经状态可对肝损伤后肝脏的蛋白合成功能产生明显的影响。CCl_4 组和 CCl_4+6-OHDA 组的 PA 和 Alb 较 Sham 组明显下降($P<0.01$), 其中 CCl_4+6-OHDA 组的 PA. 和 Alb 较 CCl_4 组升高($P<0.05$), CCl_4 组的总蛋白较 Sham 组亦明显下降($P<0.01$)。单纯去交感神经对蛋白合成影响不大, 见图 1、2。



*: $P<0.05$, *vs* Sham; #: $P<0.05$, *vs* CCl_4

图 1　各组前白蛋白含量的变化

Fig 1　Changes of PA level in each group



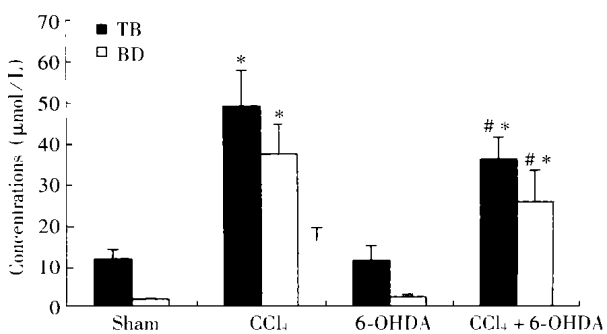
*: $P<0.05$, *vs* Sham; #: $P<0.05$, *vs* CCl_4

图 2　各组白蛋白和总蛋白含量的变化

Fig 2　Changes of Alb and TP level in each group

2.2　去交感神经状态对胆红素代谢的影响

去交感神经状态对肝损伤大鼠的胆红素代谢有明显的影响。CCl_4 组和 CCl_4+6-OHDA 组的 TB 和 BD 均较 Sham 组明显升高($P<0.01$)。CCl_4+6-OHDA 组较单用 CCl_4 组的 TB 和 BD 又明显下降($P<0.05$)。单用 6-OHDA 和 Sham 组比较 TB 和 BD 无明显变化, 差异不显著, 见图 3。



*: $P<0.01$, *vs* Sham; #: $P<0.05$, *vs* CCl_4

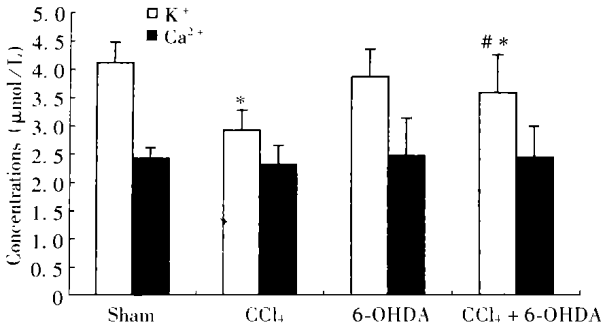
图 3　各组总胆红素和直接胆红素浓度的变化

Fig 3　Changes of TB and DB concentrations in each group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 去交感神经状态对电解质的影响

血 K^+ 的改变较明显，CCl_4 组和 CCl_4＋6-OHDA 组的 K^+ 较 Sham 组明显下降（$P<0.05$），而 CCl_4＋6-OHDA 组较 CCl_4 组却明显上升（$P<0.01$），见图 4。其它 Na^+、Cl^- 和 Ca^{2+} 均无明显变化。



*：$P<0.05$，*vs* Sham；#：$P<0.01$，*vs* CCl_4

图 4 各组电解质（K^+，Ca^{2+}）含量的变化

Fig 4 Changes of K^+ and Ca^{2+} contents in each group

2.4 去交感神经状态对肝脏能量代谢的影响

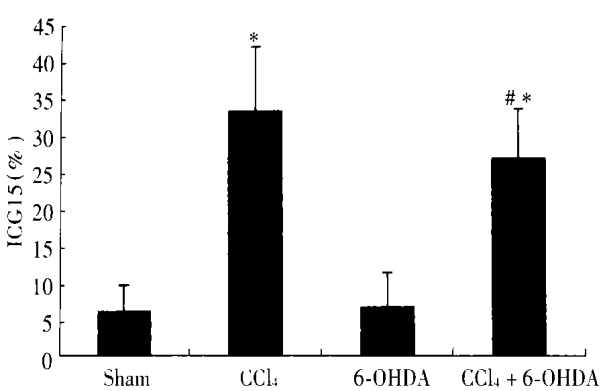
CCl_4 组和 CCl_4＋6-OHDA 组的肝组织 ATP 含量明显下降，与 sham 组比较下降显著（$P<0.01$）。CCl_4＋6-OHDA 组的肝组织 ATP 含量较 CCl_4 组升高（$P<0.01$），6-OHDA 组对肝组织 ATP 的含量影响不显著。AKBR 的变化与 ATP 的变化一致，CCl_4 组和 CCl_4＋6-OHDA 组与 sham 组相比较均下降明显（$P<0.01$）。CCl_4＋6-OHDA 组与 CCl_4 组相比较有升高（$P<0.01$）。单独应用 6-OHDA 对 AKBR 无明显影响。可见去交感神经可对 CCl_4 致急性肝损伤大鼠的能量代谢产生明显的影响，见表 1。

表 1 肝组织 **ATP** 含量及 **AKBP** 的变化（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Changes of ATP and AKBP contents（$\bar{x}\pm s$）

Group	Sham	CCl_4	6-OHDA	CCl_4＋6-OHDA
ATP（μmol/g wet tissue）	2.68±0.19	0.97±0.27 *	2.53±0.26	1.53±0.32 *#
AKBP	0.87±0.04	0.51±0.04 *	0.81±0.08	0.69±0.04 *#

*：1 $P<0.01$，*vs* Sham；#：$P<0.01$，*vs* CCl_4



*：$P<0.05$，*vs* Sham；#：$P<0.01$，*vs* CCl_4

图 5 各组 **ICG15** 含量的变化

Fig 5 Changes of ICG15 in each group

2.5 去交感神经状态对肝脏 ICG 排泄功能的影响

去交感神经状态对急性肝损伤肝脏的 ICG 排泄有利。CCl_4 组和 CCl_4＋6-OHDA 组的 ICG15 较 Sham 组明显升高（$P<0.01$），CCl_4＋6-OHDA 组较 CCl_4 组则明显降低（$P<0.01$）。单用 6-OHDA 组变化不明显，见图 5。

3 讨论

研究结果表明去交感神经状态对肝损伤时的肝脏功能具有显著的影响。对不同的功能指标所产生的影响亦不同。在肝损伤的情况下，去交感神经状态有利于蛋白的合成、胆红素的代谢、能量的代谢和排泄功能，同时也使低血钾的程度减轻。

刺激肝脏交感神经可引起血糖的升高和引起肝血流量的减少，这一机制已得到了较多的实验证明[7]。在 CCl_4 引起的急性肝损伤的情况下，Iwai 等[11] 报道交感神经兴奋可加重肝损伤的程度。而对肝功能的影响尚未见报道[8,9]。前白蛋白是一种半衰期较短而对肝细胞功能变化非常敏感的蛋白成分。由实验结果可见在急性肝损伤的情况下，去除交感神经的支配有利于前白蛋白和白蛋白的合成。而正常大鼠单纯去交感神经则对前白蛋白和白蛋白的合成无明显影响。原因可能是在急性肝损伤的条件下，交感神经处于高紧张性状态，从而起到高效的调控功能。一旦失去了这种调控作用则会产生功能失衡，引起代谢改变。反之，基础状态下的代谢功能则相对较低。另外，副交感神经的调控与交感神经存在着一种拮抗现象。它们共同对肝脏功能进行控制。交感神经来源于下丘脑的腹侧正中，其生理功能偏向于异化代谢及分解作用。而副交感神经是来源于下丘脑外侧部，其生理功能偏向于同化作用。当去交感神经后，也就意味着抑制了异化作用，而使同化作用的趋势占优，所以可使蛋白的合成加强。在游离灌注的肝脏模型中刺激交感神经可使血清转铁蛋白和白蛋白等的合成和分泌受抑制，而刺激迷走神经则可使其增强。这也佐证了这一机制[10,11]。一般情况下在肝脏病变中，胆红素浓度可反映肝细胞的损伤程度，血清胆红素愈高，肝细胞损伤愈严重。实验结果表明去交感神经状态单独存在不引起胆红素的变化，而在急性肝损伤的基础上去神经则有利于肝细胞功能的恢复或减轻肝细胞功能的损害程度，使胆红素的浓度下降。去交感神经时不会影响基础胆汁的合成和分泌，而对一些刺激因素如生长抑素和进食等的反射性调控作用则有重要影响。CCl_4 引起肝损伤的主要原因是自由基，CCl_3-Cl 键的裂解是通过微粒体细胞色素 P450 降解酶和 NADPH 依赖性降解通路而被超氧化所形成。自由基的产生可能引起了肝脏的脂质过氧化

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和随后的膜的破坏。去甲肾上腺素的存在可加强肝脏脂质过氧化的产生,从而破坏肝细胞的功能。本实验结果表明联合应用 CCl_4 和 6-OHDA 可使肝组织的损害程度明显减轻。在急性肝损伤时阻断高紧张性的交感神经可使肝内去甲肾上腺素的量降低,从而有利于肝细胞免于脂质过氧化的破坏[12]。有关肝脏交感神经对电解质代谢的影响的资料较少,本实验结果表明 K^+ 在去交感神经状态时变化较敏感,而 Na^+、Ca^{2+} 和 Cl^- 均无明显变化。Morita 报道在肝脏去神经状态下(主要是交感神经),如果大鼠行正常饮食(0.45% NaCl)将不会导致 NaCl 平衡的失调和动脉压的变化。而当大鼠给予高 NaCl 饮食(8% NaCl, 10 d),则使钠产生潴留和肝动脉压升高。原因是去神经支配大鼠已不能感受肝内的离子渗透压。故不能在逐步增大的钠摄入量的同时加大尿钠的排泄;二是去神经状态使大鼠在大量 NaCl 摄入的情况下不能控制肠道对 NaCl 的吸收和肠道 NaCl 的排泄;三是肝脏神经可能控制着大鼠对盐的食欲。另外交感神经对肝内 K^+ 和 Ca^{2+} 的浓度有一定的影响。在人工灌流的在体肝脏模型中,刺激肝交感神经或在灌注液中加入新福林都有短暂的 Ca^{2+} 外流和 K+ 的摄取,在灌流液中可测出升高的 Ca^{2+} 和随后的重摄取,及 K^+ 的波动。但在本实验中变化明显的是 K^+ 的降低。其机制尚不明确,可能与 K+ 的摄入减少或肝功能的损害的程度相关。也可能与醛固酮的含量升高有关[13, 14]。AKBR 能反映肝细胞能荷的状态和线粒体的氧化还原电位。本实验 CCl_4 组 ATP 和 AKBR 值下降明显,而 CCl_4+6-OHDA 组两者均比 CCl_4 组有明显升高,这与肝功能的状态相关。另外去交感神经后肝脏灌注得到改善也有利于 ATP 和 AKBR 的恢复[15, 16]。本实验单用 CCl_4 组 ICG 潴留明显,而 CCl_4+6-OHDA 组虽较 Sham 组潴留率高但比 CCl_4 组又有所恢复,这表明去交感神经状态可能使肝损伤减轻及使窦状隙的灌流量加大。起到保护和支持肝功能的作用[17, 18]。

本实验结果显示去交感神经状态可对肝功能的变化产生影响,去交感神经状态可减轻 CCl_4 致肝损伤时肝功能损害的程度。

参考文献:

[1] Mundinger T O, Verchere C B, Baskin D G, *et al*. Galanin is localized in sympathetic neurons of the dog liver[J]. Am J Physiol, 1997, 273(6 Pt 1): E1194—E1202.

[2] Lautt W W. Evaluation of surgical denervation of the liver in cats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 1981, 59(9): 1013—1016.

[3] Moghimzadeh E, Nobin A, Rosengren E. Adrenergic nerves and receptors in the liver[J]. Brain Res Bull, 1982, 9(1—6): 709—714.

[4] Niijima A. Nervous regulation of metabolism[J]. Prog Neurobiol, 1989, 33(2): 135—147.

[5] Haeusler G. Vascular reactivity of rats after prevention of hypertension by central administration of 6-hydroxydopamine[J]. J Hypertens Suppl, 1984, 2(3): S73—75.

[6] 夏　锋, 何振平, 段恒春, 等. 去交感神经状态对肝切除后肝再生的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(4): 416—418.

[7] Seseke F G, Gardemann A, Jungermann K. Signal propagation *via* gap junctions, a key step in the regulation of liver metabolism by the sympathetic hepatic nerves[J]. FEBS Lett, 1992, 301(3): 265—270.

[8] Yokohama S, Yoneda M, Nakamura K, *et al*. Effect of central corticotropin-releasing factor on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in rats[J]. Am J Physiol, 1999, 276(3 Pt 1): G622—628.

[9] Iwai M, Shimazu T. Effects of ventromedial and lateral hypothalamic stimulation on chemically-induced liver injury in rats[J]. Life Sci, 1988, 42(19): 1833—1840.

[10] Ogoshi S, Mizobuchi S, Iwasa M, *et al*. Effect of a nucleoside-nucleotide mixture on protein metabolism in rats after seventy percent hepatectomy[J]. Nutrition, 1989, 5(3): 173—178.

[11] Iwai M, Miyashita T, Shimazu T, *et al*. Inhibition of glucose production during hepatic nerve stimulation in regenerating rat liver perfused *in situ*. Possible involvement of gap junctions in the action of sympathetic nerves[J]. Eur J Biochem, 1991, 200(1): 69—74.

[12] Sakaguchi T, Liu L. Hepatic branch vagotomy can block liver regeneration enhanced by ursodesoxycholic acid in 66% hepatectomized rats[J]. Auton Neurosci, 2002, 99(1): 54—57.

[13] Koyama S, Kanai K, Aibiki M, *et al*. Reflex increase in renal nerve activity during acutely altered portal venous pressure[J]. J Auton Nerv Syst, 1988, 23(1): 55—62.

[14] Shibamoto T, Hayashi T Jr, Saeki Y, *et al*. Differential control of sympathetic outflow to kidney, heart, adrenal gland, and liver during systemic hypotension induced by cardiac tamponade in anesthetized dogs[J]. Circ Shock, 1993, 39(2): 114—120.

[15] Stachlewitz R F, Arteel G E, Raleigh J A, *et al*. Development and characterization of a new model of tacrine-induced hepatotoxicity: role of the sympathetic nervous system and hypoxia-reoxygenation[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1997, 282(3): 1591—1599.

[16] Carlson S H, Osborn J W, Wyss J M, *et al*. Hepatic denervation chronically elevates arterial pressure in Wistar-Kyoto rats[J]. Hypertension, 1998, 32(1): 46—51.

[17] Koyama S, Sawano F, Matsuda Y, *et al*. Spatial and temporal differing control of sympathetic activities during hemorrhage[J]. Am J Physiol, 1992, 262(4 Pt 2): R579—R585.

[18] Greenway C V, Burczynski F, Innes I R, *et al*. Effects of bromocryptine on hepatic blood volume responses to hepatic nerve stimulation in cats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 1986, 64(5): 621—624.

（编辑　陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net