DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.03.021

大鼠实验性肝纤维化过程中血清和肝组织PC-Ⅲ、HA、LN水平的动态变化

陈东风 冷恩仁 刘为纹* 徐有奇** (第三军医大学附属大坪医院消化内科)重庆,630042

提 要 用四氯化碳制作大鼠肝纤维化模型,采用放免法测定大鼠血清及肝匀浆中Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ)、透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)的含量。结果发现,随着实验时间的延长,肝匀浆PC-Ⅲ、HA、LN含量逐渐升高,血清PC-Ⅲ、HA、LN水平与肝匀浆中三者的含量有显著相关性。提示随着细胞外基质成分在肝内的沉积,肝纤维化逐渐进展为肝硬化,血清PC-Ⅲ、HA、LN水平能较好地反映肝纤维化的进程,对诊断肝纤维化、肝硬化有一定的价值。

关键词 肝纤维化;Ⅲ型前胶原;透明质酸;层粘连蛋白

中图法分类号 R575.2

肝纤维化的本质是细胞外基质(extracellular matrix,ECM)成分在肝内的异常沉积。为研究ECM在肝内的沉积情况及血清肝纤维化指标是否能真正反映其在肝组织内的含量,我们采用大鼠四氯化碳肝纤维化模型,研究了血清及肝匀浆中Ⅲ型前胶原(procollagen type-Ⅲ,PC-Ⅲ)、透明质酸(hyaluronic acid,HA)及层粘连蛋白(Laminin,LN)这3种ECM成分的关系,以探讨ECM在肝内的沉积规律及血清PC-Ⅲ、HA、和LN对肝纤维化、肝硬化的诊断价值。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性Wistar大鼠54只,体重200±20 g,本院动物中心提供,其中8只作对照组,其余46只用于模型组。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制作 对照组大鼠接受橄榄油(上海卫辉化学试剂厂,批号941012)后腿皮下注射,剂量为0.02 ml/kg bw,每周2次。模型组接受CCL_4(重庆化学试剂总厂,批号941024)和橄榄油等量混合液后腿皮下注射,剂量为0.02 ml/kg bw,每周2次。

1.2.2 标本采取 模型组每隔3周处死8只大鼠,最后一次处死大鼠为第15周,对照组于第15周全部处死。用3%戊巴比妥钠(0.02 ml/kg)腹腔注射麻醉后,经心脏采血,分离血清,-20℃保存;分别取肝、脾组织块固定供常规病理用。

1.3 检测方法

1.3.1 肝匀浆制备 将新鲜肝组织剪碎,溶于生理盐水中,用ZS83-1型组织匀浆机将肝组织彻底打碎,4℃时15000 r/min离心30 min,取上清液按Lowry法进行蛋白定量。

1.3.2 光镜观察

1.3.3 应用重庆市肿瘤研究所提供的Ⅲ型前胶原(PC-Ⅲ)放免试剂盒,上海第二军医大学海军医学研究所提供的透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)放免试剂盒,严格按说明书操作,测定肝匀浆及血清PC-Ⅲ、HA、LN含量。

1.3.4 应用美国CX-4全自动生化测定仪测定血清白蛋白(A)、球蛋白(G)及丙氨酸转移酶(ALT)。

1.3.5 数据统计 数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用我校数学教研室编制的医用统计分析程序进行t检验及直线相关分析,$P<0.05$有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

对照组大鼠至处死前均存活,体重增加96±12 g。模型组造模过程中共死亡6只(13.04%),至15周处死时,模型组大鼠体重增加22.5±21 g,显著低于对照组($P<0.05$)。

2.2 肝脾大体形态观察

模型组大鼠3周起肝脏开始肿大;9周停止肿大,韧度增加;12周起肝体积回缩、质变硬;15周时肝脏呈黄褐色,表面结节状,形成典型肝硬化,其中3只大鼠有腹水。脾脏从第6周开始肿大,15周时为最大值。

2.3 光镜观察

对照组肝小叶结构完整,无变性坏死、炎细胞浸润及纤维组织增生。模型组第3周,肝细胞脂肪变性、坏死。6周时,肝细胞变性、坏死加重,少许炎细胞浸润、纤维组织开始增生。9周时,肝小叶结构遭破坏,炎细胞浸润及肝细胞变性坏死进一步加重,增生的纤维组织开始伸入肝小叶。12周时肝细胞变性坏死,炎细胞浸润较稳定,纤维间隔接近形成,假小叶开始形成,15周时形成典型肝硬化。本模型6周时肝纤维化开始启动(肝纤维化早期),9周为肝纤维加速期(肝纤维化中期),12周为肝纤维化高峰期,15周为肝硬化期。

* 附属西南医院消化内科 重庆,630038

** 附属大坪医院同位素科 重庆,630042

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

2.4 大鼠血清、肝匀浆 PC-Ⅲ、HA、LN 水平变化（见表 1）

表 1 大鼠血清及肝匀浆 PC-Ⅲ、LN 及 LN 水平变化（$n=8$）

Tab 1 Concentrations of PC-Ⅲ, HA and LN in serum and liver homogenate in different groups of rats

	Serum (μg/L)			Homogenate (μg/g protein)		
	PC-Ⅲ	HA	LN	PC-Ⅲ	HA	LN
Control	40.3± 6.7	72.4± 9.4	30.1± 5.4	50.2± 8.2	100.6±11.3	40.2± 6.0
week 3	42.1±13.2	81.5±16.0	32.3±12.7	55.9±13.0	106.5±16.0	43.4±14.6
week 6	49.7±12.8	92.6±16.8	35.9±15.2	63.9± 9.5	127.6±32.9	50.8±15.8
week 9	77.4±19.2	159.6±31.2	60.8±15.3	83.5±12.3	211.9±34.7	71.2±14.7
week 12	133.5±28.2	250.3±50.1	90.6±18.4	136.9±27.4	312.4±42.3	99.8±20.3
week 15	94.1±18.6	299.8±45.1	100.5±21.3	140.1±37.4	358.9±51.2	111.7±18.6

血清 HA 在 3 周时较对照组增高（$P<0.05$），血清 PC-Ⅲ、LN 从第 3 周起高于对照组，但差异无显著性（$P>0.05$）；6 周时 PC-Ⅲ仍与对照组差异无显著性（$P>0.05$），HA、LN 却显著高于对照组（$P<0.01$），以后各期均显著高于对照组（$P<0.01$）；HA、LN 在 15 周时达最高值，但 PC-Ⅲ但在 15 周时反而低于 12 周（$P<0.01$）。肝匀浆 3 项指标从第 6 周起各期均显著高于对照组（$P<0.01$），各组间有显著性差异（$P<0.01$），高峰值均在 15 周。

经相关分析，血清与肝匀浆 PC-Ⅲ在第 6、9、12 周时有显著正相关（$r=0.7124\sim0.8143$，$P<0.05$）；血清、肝匀浆 HA 在 9、12、15 周有显著正相关（$r=0.8313\sim0.8942$，$P<0.01$）；血清与肝匀浆 LN 在 6、9、12、15 周均有显著正相关（$r=0.8021\sim0.9234$，$P<0.01$）。血清 PC-Ⅲ、HA、LN 水平能较好地反映肝匀浆中的变化。

2.5 模型组各阶段 PC-Ⅲ、HA、LN 较对照组升高幅度（见表 2）

表 2 模型组各阶段与对照组升高倍数比较（$n=8$）

Tab 2 Ratio of model groups *vs* control

	Serum			Homogenate		
	PC-Ⅲ	HA	LN	PC-Ⅲ	HA	LN
Week 3	1.05	1.04	1.07	1.13	1.06	1.08
Week 6	1.23	1.27	1.19	1.27	1.27	1.26
Week 9	1.92	2.20	2.02	1.66	2.11	1.77
Week12	3.31	3.46	3.00	2.72	3.11	2.49
Week15	2.33	4.14	3.34	2.78	3.56	2.78

在实验第 6 周肝纤维化启动期，血清三指标升高幅度相近似；在第 9、12 周 HA 升高幅度最高；到肝硬化形成的 15 周时，HA、LN 继续升高，而 PC-Ⅲ下降。在肝匀浆指标中，第 6 周肝纤维化启动期，肝匀浆中 PC-Ⅲ、HA、LN 几乎同步升高；第 12 周肝纤维化高峰期仍以 HA 最高，PC-Ⅲ次之，LN 相对最低；在 15 周肝硬化形成时，升高幅度继续保持上述顺序。

2.6 各组肝功能改变（见表 3）

表 3 大鼠对照组、模型组肝功能改变（$n=8$）

Tab 3 Levels of liver function in different groups of rats

	ALT (IU)	Albumin (g/L)	Globulin (g/L)
Control	32.9± 7.1	36.4±1.9	24.6±1.2
week 3	210.8±19.5※※	31.8±2.0	27.8±1.3※※
week 6	298.0±19.7※※	30.6±2.1	29.9±1.0※※
week 9	320.0±22.7※※	29.1±2.5※	30.5±1.2※※
week12	291.3±23.1※※	28.8±2.6※※	30.1±1.3※※
week15	301.3±33.9※※	27.9±2.3※※	32.0±1.9※※

※：$P<0.05$ *vs* control，※※：$P<0.01$ *vs* control

模型组各阶段丙氨酸转移酶（ALT）均较对照组显著升高（$P<0.01$），第 3 周 ALT 与以后各组差异均有显著性（$P<0.01$），但 6、9、12、15 周组间差异无显著性（$P>0.05$），提示从第 6 周起 ALT 就基本保持在一个较高的水平上。随时间的推移，白蛋白（A）逐渐下降，球蛋白（G）逐渐上升。血清 PC-Ⅲ在 12 周时与 A 显著负相关（$r=-0.7014$，$P<0.05$）；血清 HA 在 6、9 周与 G 呈显著正相关（$r=0.6981$，0.7014，$P<0.05$）；肝匀浆 HA 在 9、12 周时与 G 间呈显著正相关（$r=0.6303$，0.6581，$P<0.05$）；血清及肝匀浆 LN 在 12、15 周时与 G 呈显著正相关（$r=0.7019$，0.6832，$P<0.05$）。血清、肝匀浆中的 PC-Ⅲ、HA 和 LN 水平与肝功能状态密切相关。

3 讨论

参与肝纤维化的细胞外基质成分（ECM）包括胶原蛋白、蛋白多糖和粘连糖蛋白三大类。胶原蛋白以胶原纤维的形式发挥作用，蛋白多糖则形成无定形基质填充，包围于胶原纤维之间，各种粘连糖蛋白则在纤维与细胞之间介导它们的相互粘连[1]。

PC-Ⅲ、HA 和 LN 分别是胶原、蛋白多糖、粘连糖

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

蛋白这3种ECM成分的代表[2]。从实验第6周开始，肝匀浆中这3种ECM成分便开始较对照组显著升高，并随实验时间延长而逐渐增高，高峰值均在第15周肝硬化形成期。第15周时肝匀浆的PC-Ⅲ水平与第12周比较其增加值明显低于HA、LN周期相比的增加值，提示在第15周肝硬化形成时PC-Ⅲ的合成、代谢及在肝内的沉积速度明显减慢，这与肝纤维化高峰期及肝硬化期时Ⅲ型胶原合成，代谢减弱，Ⅰ型胶原增生活跃相一致[3]。肝匀浆中PC-Ⅲ、HA和LN在不同时期都与肝功能有显著相关性，提示它们在肝内沉积与肝细胞损伤，肝功能状态密切相关。随着肝细胞的进行性损伤，通过各种途径激活了肝内ECM合成细胞，如Ito细胞，内皮细胞，肝细胞，致使ECM合成增加，加之肝窦内皮细胞、肝细胞对其降解能力下降，ECM便在肝组织内沉积下来，逐渐形成肝纤维化，最终发展成肝硬化[4]。

从实验第6～15周，血清HA、LN与肝匀浆HA、LN有显著相关性，血清PC-Ⅲ在第6、9和12周时与肝匀浆PC-Ⅲ有显著相关性，这说明血清中这3项指标能较好地反映肝匀浆中的水平变化，即ECM在肝内的沉积情况。血清PC-Ⅲ在第12周时达高峰，15周时反而下降，这是因为15周时Ⅲ型胶原代谢趋于平衡，进入血清中的PC-Ⅲ明显减少，故血清PC-Ⅲ水平下降[5]。比较血清中PC-Ⅲ、HA和LN的变化情况可以看出，HA在第3周便较对照组显著升高，且HA在每个实验阶段增加幅度最大，这说明HA能较早反映肝细胞损伤，且能更好地反映肝纤维化和肝硬化。血清PC-Ⅲ在第9周时才较对照组显著升高，与HA和LN相比升高最晚，且血清PC-Ⅲ水平在肝硬化形成时反而下降，提示血清PC-Ⅲ仅对肝纤维化中期、高峰期敏感。血清LN对肝纤维化、肝硬化的判断价值介于HA和PC-Ⅲ之间。

综上所述，随着肝细胞损伤的进行性加重，PC-Ⅲ、HA、LN这3种ECM成分在肝内沉积逐渐增多，在肝硬化形成时达高峰。血清中PC-Ⅲ、HA和LN水平能较好地反映它们在肝内的沉积情况。血清HA水平能较早反映肝细胞损伤。三者对肝纤维化、肝硬化的诊断价值以HA较高，LN次之，PC-Ⅲ局限性较大。

参考文献

1 Iredale JP, Arthur MJP. Hepatocyte-matrix interactions. Gut, 1994; 35: 729

2 Bissell DM. Connective tissue metabolism and hepatic fibrosis: an overview. Semi Liver Dis, 1990; 40: 1

3 Yamanoto H, Murawakl Y, Kawasaki H. Hepatic collagen synthesis and degradation during liver regeneration after partial hepatectomy. Hepatology, 1995; 21: 155

4 Gressner AM, Bachem MG. Molecular mechaisms of liver fibrogenesis——a homage to the role of activated fat-storing cells. Digestion, 1995; 56: 335

5 Wu J, Danielsson A. Detection of hepatic fibrogenesis: A review of available techniques. Scand J Gastroenterol, 1995; 30: 817

(收稿：1995-11-07；修回：1996-05-04)

(编辑 张大春)

Study of changes of procollagen Ⅲ, hyaluronic acid and laminin in serum and homogenate liver in CCL_4-induced liver fibrosis in rats

Chen Dongfeng, Leng Enren, Liu Weiwen, Xu Youqi (Department of Gastroenterology, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract Liver fibrosis was induced with carbon tetrachloride in rats and the level of procollagen Ⅲ (PC-Ⅲ), hyaluronic acid (HA) and laminin (LN) in the serum and liver homogenate of the rats were determined with radioimmunoassay. It was found that the level of PC-Ⅲ, HA and LN in the liver homogenate was gradually increased with progress of the study. The serum level of PC-Ⅲ, HA and LN was significantly correlated to that in the liver homogenate. These findings suggest that the accumulation of the extracellular matrix in the liver might play an important role in the pathogenesis of liver fibrosis and the serum level of PC-Ⅲ HA and LN can be used as useful index to diagnose liver fibrosis and liver cirrhosis.

Key words liver fibrosis; procollagen Ⅲ; hyaluronic acid; laminin

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