

神经生长因子对四氯化碳诱导的小鼠肝纤维化的影响*

张伟¹,刘翠芸²,刘佩佩²,付文娟²,孙水林^{2△},席文娜²

(1.南昌大学附属感染病医院肝病科,南昌 330000;2.南昌大学第二附属医院感染性疾病科,南昌 330006)

[摘要] **目的** 观察神经生长因子(NGF)对四氯化碳(CCL₄)诱导的小鼠肝纤维化的影响。**方法** 将 30 只雌性昆明小鼠分成 3 组:纤维化模型组(A 组)、NGF 干预组(B 组)和生理盐水对照组(C 组)。8 周时采集标本,用全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、清蛋白(ALB);放射免疫法检测肝纤维化指标:透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ)。采用 Ishaki 评分系统对小鼠肝组织炎症活动度及纤维化程度进行评分。**结果** A、B 组 ALT、AST、HA、LN 均明显高于 C 组($F=111.45,658.80,157.43,167.99;P<0.05$);B 组 ALT、AST、LN 均明显低于 A 组($P<0.05$)。HE 染色、网状纤维染色及 Masson 染色显示,A 组肝组织炎症及纤维化程度最明显,B 组肝组织炎症较 A 组显著减轻,未形成纤维间隔,纤维组织细短,C 组肝组织未见明显炎症细胞浸润及纤维形成。A 组肝脏炎症分级和纤维化分期评分较 B、C 组高,且 3 组炎症活动度得分、纤维化得分差异有统计学意义(均 $P<0.05$)。**结论** NGF 可以阻断 CCL₄ 诱导的小鼠肝纤维化,减轻肝组织炎症。

[关键词] 神经生长因子;四氯化碳;肝纤维化**[中图分类号]** R575.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2015)15-2024-04Effect of nerve growth factor on CCL₄-induced hepatic fibrosis in mice*Zhang Wei¹, Liu Cuiyun², Liu Peipei², Fu Wenjuan², Sun Shuilin^{2△}, Xi Wenna²

(1. Department of Liver Disease, Affiliated Infectious Diseases Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330000, China; 2. Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of nerve growth factor(NGF) on CCL₄-induced hepatic fibrosis in mice. **Methods** The hepatic fibrosis model was induced by subcutaneous injection of CCL₄ in mice. Thirty female Kunming mice were equally and randomly divided into three groups: fibrosis model group (A), NGF intervention group (B) and normal saline control group (C). At 8 weeks following the initiation of experiment, the samples were collected to measure ALT, AST, TBIL, ALB by the fully automatic biochemical analyzer, and the liver fibrosis indices (HA, LN, PCⅢ) by radioimmunoassay. The Ishaki scoring system was adopted to assess the severity of hepatic inflammation and fibrosis degree. **Results** Serum levels of ALT, AST, HA and LN in the group A and B were significantly higher than those in the group C ($F=111.45,658.80,157.43,167.99;P<0.05$), the levels of ALT, AST and LN in the group B were significantly lower than those in the group A ($P<0.05$). The HE staining, reticular fiber staining and Masson staining showed that the liver fibrosis degree and the liver tissue inflammation in the group A were most obvious, the liver tissue inflammation in the group B were significantly alleviated as compared with the group A. No fibrous septum was formed and the fiber tissues were fine and short. No obvious inflammatory cells infiltration and fibers formation were found in the liver tissue of the group C. The scores of liver inflammation grade and fibrosis staging in the group C were higher than those in the group B and C, moreover the scores of liver inflammation grade and fibrosis had statistical differences among 3 groups ($P<0.05$). **Conclusion** NGF can block hepatic fibrosis induced by CCL₄ and relieve the liver inflammation.

[Key words] nerve growth factor; CCL₄; hepatic fibrosis

神经生长因子(nerve growth factor, NGF)是一种神经营养因子,属于神经生长因子家族中的一员,NGF 家族由一类结构和功能同源的蛋白组成^[1],广泛分布于人体内。早在 1951 年,Levi-Montalcin 等^[2]发现它与反应神经元细胞表面受体结合,在神经的生长发育、分化、功能维持中起着重要的作用。后来,陆续有研究发现 NGF 可作用于淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞等,调节免疫系统及造血系统功能,还参与炎症肠病、银屑病等多种炎症疾病的发生^[3]。进一步研究表明 NGF 还可以作为一种重要的组织修复因子^[4],而肝纤维化正是肝脏慢性炎症长期反复修复而引起的病理结果,故有学者推测 NGF 与肝

纤维化之间存在某种内在联系。近年来,有体外实验研究发现 NGF 可诱导活化的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)凋亡,从而影响肝纤维化的进展^[5]。但体内实验效果如何罕见报道,本实验通过建立动物肝纤维化模型,观察 NGF 对四氯化碳(CCL₄)诱导的小鼠肝纤维化模型的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级 6~8 周龄健康雌性昆明小鼠 30 只,体质量(20±2)g,由江西中医学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(赣)2011-0001。

1.2 仪器与试剂 透明质酸放射免疫试剂盒、Ⅳ型胶原放射

免疫试剂盒和碘(¹²⁵I)Ⅲ型前胶原氨基端肽放射免疫试剂盒均由北京生方生物技术研究所提供;苏木精:进口分装;伊红:上海锐聪科技发展有限公司;超高倍显微分析系统:泰豪科技股份有限公司。NGF 由南昌大学医学院刘立生教授惠赠。

1.3 方法 将 30 只小鼠平均分成 3 组,即 A 组:3 mL/kg 皮下注射 40% CCL₄(用橄榄油稀释),每隔 2 天 1 次,同时每日肌肉注射生理盐水 0.1 mL,共 8 周;B 组:3 mL/kg 皮下注射 40% CCL₄(用橄榄油稀释),每隔 2 天 1 次,同时每日肌肉注射 NGF 0.1 mL(即 30 μg),共 8 周;C 组:以等量生理盐水皮下注射,每隔 2 天 1 次,共 8 周。在实验第 8 周时,小鼠处死前 12 h 禁食、禁饮。实验步骤:乙醚麻醉后,摘眼球采血,分离血清标本用于生化及核医学检测;再取出右叶肝组织,用 10% 甲醛固定,石蜡切片用于检测。(1)HE 染色:经 10% 甲醛固定,石蜡包埋切片处理后制成 4 μm 连续切片 6 张,切片面积约 1 cm×1 cm,常规 HE 染色。(2)特殊染色:网状纤维染色、masson 染色。(3)Ishaki 评分系统^[6-7]主要观察指标:①血液生化指标包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、清蛋白(ALB);②肝纤维化指标包括透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、Ⅲ型前胶原(PCⅢ);③肝脏组织大体标本、病理形态、Ishaki 评分来观察比较各组肝组织炎症活动度及纤维化程度。

1.4 统计学处理 实验数据用 SPSS18.0 统计软件分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3 组小鼠肝功能指标比较 3 组小鼠实验 8 周时血液标本检测,肝功能指标比较,见表 1。

2.2 3 组小鼠肝纤维化指标比较 3 组小鼠实验 8 周时血清标本检测,肝纤维化指标变化比较,见表 2。

2.3 3 组小鼠肝组织大体肉眼观察结果 A 组肝脏颜色较苍

白,包膜粗糙,可见细小颗粒,质地较硬;B 组肝脏体积增大,外观较 A 组色泽鲜艳,包膜更光滑、饱满,未见颗粒,质软更软,出血较少;C 组肝脏形态正常,色泽红润,包膜光整,质地柔软,见图 1。

表 1 3 组小鼠 8 周时肝功能指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	TBIL(μmol/L)	ALB(g/L)
A 组	93.64±2.24	309.36±9.69	10.18±0.83	31.99±0.92
B 组	87.59±2.25 ^a	285.63±3.83 ^a	9.80±0.69	32.43±0.61
C 组	80.73±1.06 ^{ab}	204.94±5.29 ^{ab}	10.73±0.75	32.13±1.29
F	111.45	658.80	3.77	0.527

^a: $P < 0.05$,与 A 组比较;^b: $P < 0.05$,与 B 组比较。

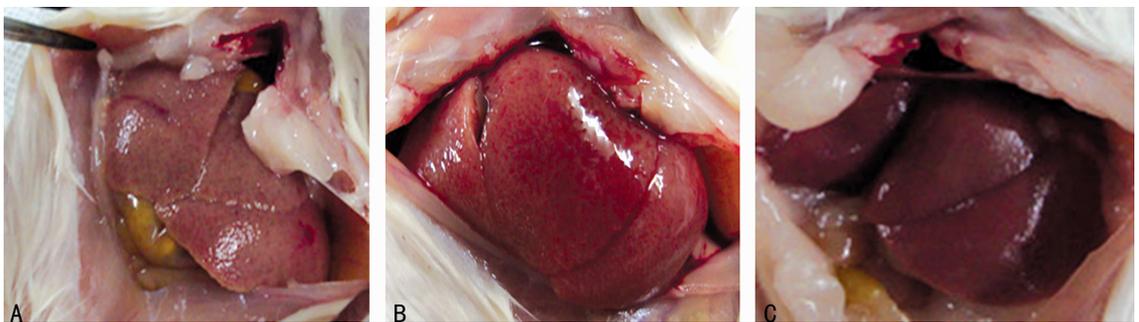
表 2 3 组小鼠 8 周时肝纤维化指标比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	HA(ng/mL)	LN(ng/mL)	PCⅢ(μg/L)
A 组	282.95±32.36	111.83±8.98	31.45±0.99
B 组	144.14±14.55 ^a	96.47±2.58 ^a	28.33±1.17
C 组	133.14±8.36 ^a	63.05±4.88 ^{ab}	—
F	157.43	167.99	—

^a: $P < 0.05$,与 A 组比较;^b: $P < 0.05$,与 B 组比较;—:未测出实际数值。

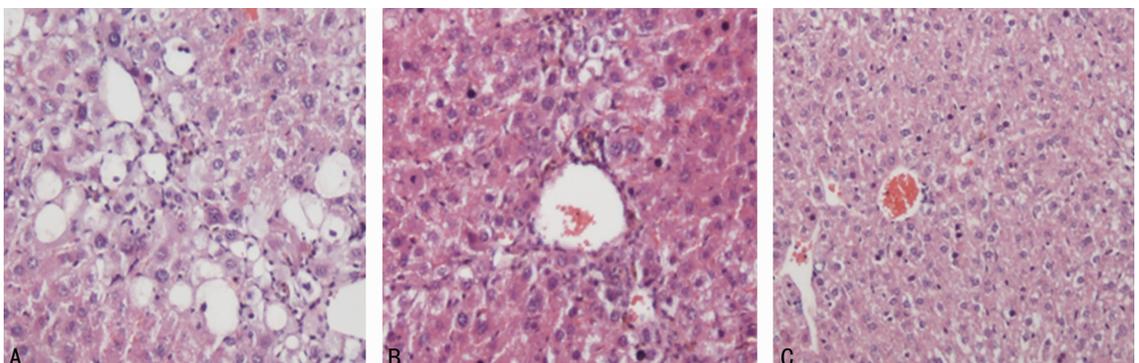
2.4 光学显微镜检测结果

2.4.1 肝组织病理表现 A 组肝脏炎症及纤维化程度最明显,表现为肝细胞结构紊乱,广泛脂肪变性,气球样变、炎症坏死及弥漫的纤维间隔形成,汇管区可见网状纤维粗而多,胶原纤维亦粗,且交织成网状;B 组肝细胞纤维化程度较 A 组显著减轻,汇管区见网状纤维细少,胶原纤维也很细短,呈分支状,未形成纤维间隔,且肝细胞气球样变、脂肪变性及炎症细胞浸润均较 A 组轻;C 组肝细胞排列整齐,肝窦、肝索清晰,未见明显的纤维形成,见图 2~4。



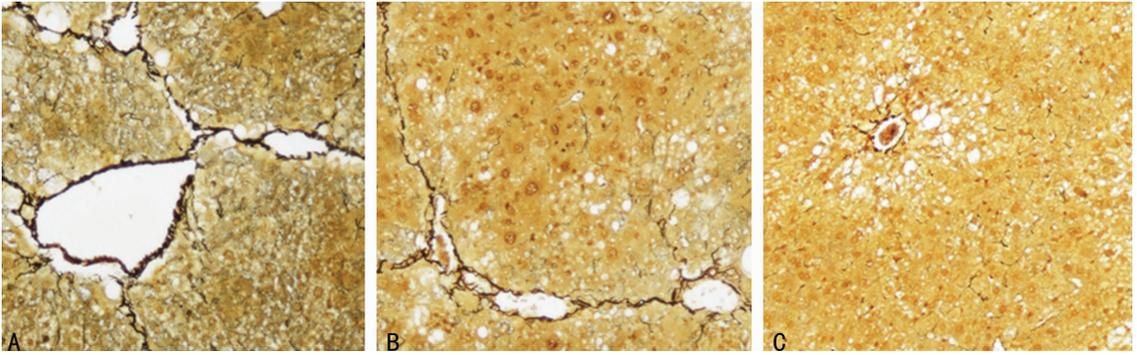
A:A 组;B:B 组;C:C 组。

图 1 3 组小鼠 8 周时肝组织大体形态

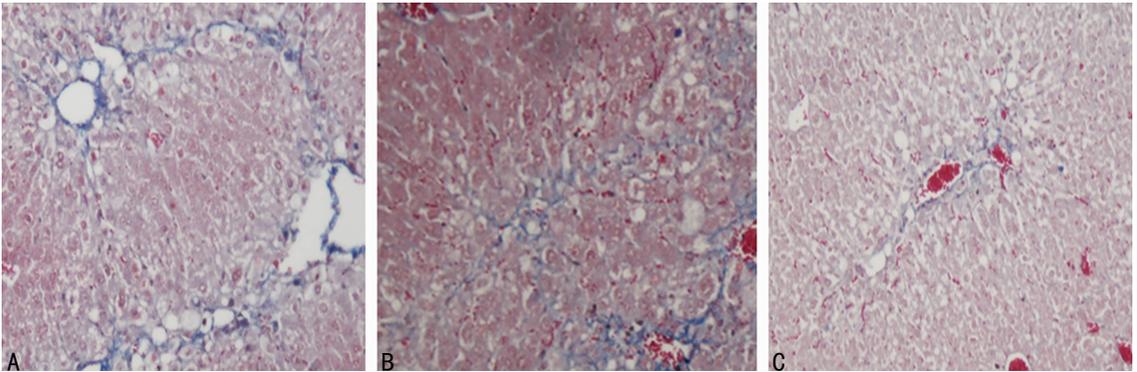


A:A 组;B:B 组;C:C 组。

图 2 3 组小鼠 8 周时肝组织 HE 染色($\times 100$)



A:A组;B:B组;C:C组。

图3 3组小鼠8周时肝纤维化网状纤维染色($\times 100$)

A:A组;B:B组;C:C组。

图4 3组小鼠8周时肝纤维化 masson 染色($\times 100$)

2.4.2 肝脏炎症活动度及纤维化 Ishaki 评分 3组间肝脏炎症活动度得分及肝纤维化得分比较,差异有统计学意义($HC=12.09, P<0.01; HC=17.95, P<0.01$),见图5、6。

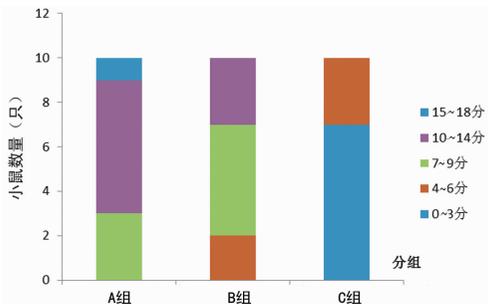


图5 肝脏炎症活动度评分

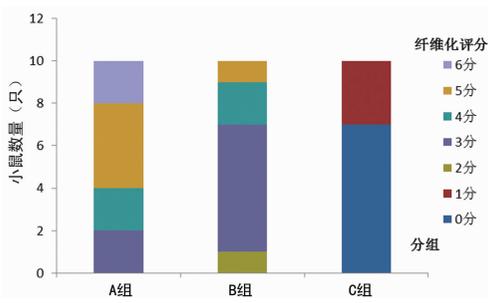


图6 肝纤维化评分

3 讨论

各种原因(如病毒性、药物性、酒精性、自身免疫性、代谢性等)引起的肝脏慢性损伤和修复,会使纤维结缔组织增生,逐渐形成肝纤维化^[8]。然而,肝纤维化可进展为肝硬化,甚至肝癌,直接威胁到肝病患者的生命。如能阻断或逆转肝纤维化,就可

减少严重后果的发生,这是肝病治疗的关键,也是目前国内外医学研究的热点之一。

NGF作为一种神经营养因子,在神经系统的中的应用已经很成熟了。近年来,NGF在肝脏疾病中的作用亦展露头角。一方面,肝损伤时肝细胞可表达NGF,而NGF可抑制核因子- κ B的激活,减少促炎因子的产生,进而抑制肝脏炎症反应,减缓肝纤维化的进展^[9]。另一方面,NGF与肝纤维化密切相关,特别是对肝纤维化的中心环节,即HSC的活化及增殖,其在肝纤维化中扮演重要的角色。NGF可抑制HSC的增殖,作用机制可能是通过诱导凋亡来调节HSC的数量^[10]。另外,NGF可抑制HSC合成I、III型胶原,诱导HSC凋亡,抑制HSC胶原分泌,可能是NGF抗肝纤维化的作用机制^[11]。学者们通过体外实验逐渐认识到NGF在抗肝纤维化中的作用,为此本课题就NGF与抗肝纤维化作用的体内实验效果进行了深入研究。

本实验结果发现,实验8周后,ALT、AST在纤维化模型组(A组)、NGF干预组(B组)和生理盐水组(C组)比较,差异有统计学意义($P<0.05$);但3组中TBIL、ALB差异无统计学意义($P>0.05$)。ALT、AST为反映肝脏炎症的敏感指标,ALT存在于肝细胞的胞质中,AST通常存在于线粒体中,A、B组中AST/ALT >1 ,本研究结果提示3组肝细胞均有损伤,呈慢性化表现。ALT、AST在A组水平最高,在B、C组依次降低,且差异无统计学意义($P>0.05$),表明NGF能有效降低ALT、AST水平,可改善肝脏的炎症。其中TBIL、ALB在A、B、C3组差异无统计学意义,提示TBIL及ALB不能敏感地反映CCL₄诱导的小鼠早期肝损伤,可能在肝脏病变和病程达到一定程度后才会有变化。从肝组织病理常规HE染色观察到,A组汇管区广泛炎症细胞浸润,肝细胞脂肪变性、气球样变均

较 B、C 组严重;另外 Ishaki 肝脏炎症评分显示,A 组小鼠得分多为 10~14 分,B 组多为 7~9 分,C 组多为 0~3 分,且 3 组肝脏炎症活动度得分比较,差异有统计学意义($HC=12.09, P<0.01$)。以上结果进一步提示 NGF 有减轻 CCL₄ 诱导的小鼠肝脏炎症的作用,也有利于减缓肝纤维化的进展。

肝纤维化指标 HA、LN、PⅢ在 A 组中显著升高,高于 B、C 组,各实验组之间差异有统计学意义($P<0.05$)。其中 B 组 HA、LN、PCⅢ水平较 A 组明显低,提示 NGF 有延缓或逆转 CCL₄ 诱导小鼠肝纤维化形成的作用。NGF 能有效阻断肝纤维化亦在组织病理形态学中得到证实:A 组 masson 染色和网状纤维染色可见汇管区周围纤维化明显,可见大量粗且长的网状纤维、胶原纤维以及纤维间隔形成;B 组 masson 染色和网状纤维染色显示其纤维化程度较 A 组显著减轻,纤维组织细少;C 组仅可见到稀少的细短成毛刺状纤维。Ishaki 肝纤维化评分显示,A 组小鼠得分均较高,多数在 5 分,B 组小鼠得分多为 3 分,C 组小鼠则多为 0 分,3 组肝纤维化得分比较差异有统计学意义($HC=17.95, P<0.01$)。以上结果表明 NGF 可有效阻断 CCL₄ 诱导的小鼠肝纤维化,减轻肝组织炎症。

参考文献

- [1] Eibl JK, Strasser BC, Ross GM. Structural, biological, and pharmacological strategies for the inhibition of nerve growth factor [J]. *Neurochem Int*, 2012, 61(8): 1266-1275.
- [2] Levi-Montalcini R, Hamburger V. Selective growth stimulating effects of mousesarcoma on the sensory and sympathetic nervous system of the chick embryo [J]. *J Exp Zool*, 1951, 116(2): 321-361.
- [3] Kolostova K, Taltynov O, Pinterova D, et al. Tissue repair driven by two different mechanisms of growth factor plasmids VEGF and NGF in mice auricular cartilage; regener-

ation mediated by administering growth factor plasmids [J]. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2012, 269(7): 1763-1770.

- [4] 何雅军,朱海燕,舒建昌,等.神经生长因子抑制肝星状细胞增殖的观察[J].*中华肝病杂志*, 2012, 12(20): 912-914.
- [5] Ishaki K, Baptista A, Bianchi L, et al. Histological grading and staging of chronic hepatitis [J]. *J Hepatol*, 1995, 22(6): 696-699.
- [6] Theise ND. Liver biopsy assessment in chronic viral hepatitis; a personal, practical approach [J]. *Mod Pathol*, 2007, 20(1): 3-14.
- [7] Scott L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(6): 1655-1669.
- [8] Oakley F, Trim N, Christothea M, et al. Hepatocytes express nerve growth factor during liver injury: evidence for paracrine regulation of hepatic stellate cell apoptosis [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(5): 1849-1858.
- [9] Trim N, Morgan S, Evans M, et al. Hepatic stellate cells express the low affinity nerve growth factor receptor p75 and undergo apoptosis in response to nerve growth factor stimulation [J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(4): 1235-1243.
- [10] 舒建昌,朱海燕,吕霞,等.神经生长因子对肝星状细胞胶原分泌及形态学的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(12): 2396-2398.
- [11] Wang Y, Gao J, Zhang D, et al. New insights into the antifibrotic effects of sorafenib on hepatic stellate cells and liver fibrosis [J]. *J Hepatol*, 2010, 53(1): 132-144.

(收稿日期:2014-11-10 修回日期:2015-02-07)

《重庆医学》杂志对运用统计学方法的有关要求

1. 统计学符号:按 GB 3358—1982《统计学名词及符号》的有关规定,统计学符号一律采用斜体。

2. 研究设计:应告知研究设计的名称和主要方法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或是横断面调查研究),实验设计(应告知具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、析因设计、正交设计等),临床试验设计(应告知属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等);主要做法应围绕 4 个基本原则(重复、随机、对照、均衡)概要说明,尤其要告知如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

3. 资料的表达与描述:用 $\bar{x} \pm s$ 表达近似服从正态分布的定量资料,用 $M(QR)$ 表达呈偏态分布的定量资料;用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚;用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则;用相对数时,分母不宜小于 20,要清楚区分百分率和百分比。

4. 统计学分析方法的选择:对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 t 检验和单因素方差分析;对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备的条件及分析目的,选用合适的统计学分析方法,不应盲目套用 χ^2 检验。对于回归分析,应结合专业知识和散点图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析;对于具有重复实验数据检验回归分析资料,不应简单化处理;对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系做出全面、合理的解释和评价。

5. 统计结果的解释和表达:应写明采用统计学方法的具体名称(如:成组设计资料的 t 检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的 q 检验等),统计量的具体值(如: $t=3.45, \chi^2=4.68, F=6.79$ 等);在用不等式表示 P 值的情况下,一般情况下选用 $P>0.05, P<0.05$ 和 $P<0.01$ 三种表达方式,无须再细分为 $P<0.001$ 或 $P<0.0001$ 。当涉及总体参数(如总体均数、总体率)时,再给出显著性检验结果的同时,应再给出 95% 可信区间(CI)。