

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.26.003

# S-腺苷蛋氨酸对奈乙硫氰酸酯致大鼠药物型胆汁淤积性肝病肝纤维化的保护作用

靳丹丹,毛 华<sup>△</sup>

(南方医科大学附属珠江医院消化内科,广州 510000)

**[摘要]** 目的 研究 S-腺苷蛋氨酸(SAMe)对奈乙硫氰酸酯(ANIT)诱发大鼠药物型胆汁淤积性肝病肝纤维化的保护作用。方法 将 18 只 SD 大鼠分为 3 组:A 组(空白对照组)、B 组(造模+NS)、C 组(造模+SAMe),每组各 6 只,各组大鼠腹腔注射后 72 h 处理。采用全自动生化分析仪检测各组肝脏血清学指标,并取肝脏组织行 HE 染色及 MASSON 染色观察肝脏病理组织学变化及胶原含量改变。结果 C 组大鼠的血清学指标谷氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBiL)、直接胆红素(DBiL)、间接胆红素(IBiL)、谷氨酰转氨酶( $\gamma$ -GGT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆汁酸(TBA)明显低于 B 组,3 组之间比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );但 3 组之间总胆固醇(Chol)水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。C 组大鼠的胶原纤维含量及胶原纤维面积比均明显低于 B 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 SAMe 能通过改善药物型胆汁淤积性肝病的肝功能,降低胶原纤维含量及面积,进一步保护肝脏组织。

**[关键词]** 肝硬化;胆汁淤积,肝内;S-腺苷蛋氨酸

**[中图分类号]** R575

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2015)26-3609-04

## Protective effects of S-adenosyl methionine on liver fibrosis of rats with cholestatic liver disease induced by alpha-naphthyliso thiocyanate

Jin Dandan, Mao Hua<sup>△</sup>

(Department of Digestive System, Zhujiang Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou 510000, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the protective effects of S-adenosyl methionine(SAMe) on liver fibrosis of rats with cholestasis induced by alpha-naphthyliso thiocyanate. **Methods** 18 SD rats were randomly divided into three groups, the group A (blank control group), B [model+ normal saline(NS)] and C (model + SAMe), 6 rats in each group. The rats in each group were sacrificed at 72 h after intraperitoneal injection. Serum levels of liver indicators in each group were detected by the full automatic biochemical analyzer. The liver tissue was taken for conducting HE staining and MASSON staining and observing the pathological changes of livers. **Results** Compared with the group B, the serum levels of ALT, AST, TBiL, DBiL, IBiL,  $\gamma$ -GGT, ALP and TBA in the group C were significantly decreased, the differences among 3 groups were statistically significant( $P < 0.05$ ); but the total Chol level had no statistical difference among 3 groups( $P > 0.05$ ). The collagen fibers content ( $175.1 \pm 127.9$ ) and the collagen fibers area ratio( $14.1 \pm 6.4$ ) in the group C were significantly lower than those in the group B, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** SAMe can decrease the content and area of collagen fibers and further protect the liver tissue by improving the liver function in drug induced cholestasis liver disease.

**[Key words]** liver cirrhosis; cholestasis, intrahepatic; S-adenosyl methionine

药物型胆汁淤积性肝病(drug induced cholestatic hepatitis)是药物及其代谢产物产生的毒性作用或发生的过敏反应导致的胆汁形成、分泌和(或)排泄异常引起的肝脏病变。S-腺苷蛋氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAMe)又称 S-腺苷甲硫氨酸,是含硫氨基酸的一种,是存在于人体组织的一种生理活性分子,由蛋氨酸与三磷酸腺苷在腺苷蛋氨酸合成酶催化下合成的,目前已广泛应用于治疗胆汁淤积性肝病,但其作用机制还未完全阐述清楚。本实验采用经口灌服奈乙硫氰酸酯(alpha-naphthyliso thiocyanate, ANIT)致药物性胆汁淤积,从而进一步研究 SAMe 对 ANIT 诱发胆汁淤积大鼠肝细胞、肝功能的影响,探讨 SAMe 对药物型胆汁淤积性肝病的保护作用。

### 1 材料与与方法

**1.1 实验动物** 健康刚断乳的雄性清洁级 SD 大鼠 18 只,体质量( $100 \pm 20$ )g,由南方医科大学实验动物中心提供。

**1.2 实验材料** 注射用腺苷蛋氨酸(思美泰,500 mg/支),ANIT(美国 Sigma 公司),台式冷冻离心机,恒温水浴箱,全自动生化分析仪,光学显微镜。

**1.3 动物模型的建立及处理** 将 18 只 SD 大鼠分为 3 组,每组各 6 只,每组动物分笼饲养,普食,自来水适应性喂养 2 d,在第 3 d 上午造模组和实验组每只大鼠按 50 mg/kg 灌服 1% ANIT+麻油混合液 1 次(ANIT 50 mg/kg,麻油 5 mL/kg),空白组给予相同剂量的生理盐水。灌胃前后 12 h 所有动物均禁食不禁水,以保证所灌服药物充分均匀的吸收。灌胃 12 h 后,实验组(C 组)给予 SAMe 腹腔注射,注射量为 60 mg/kg,空白对照组(A 组)和造模组(B 组)给予 0.9% 氯化钠注射液腹腔注射,注射量同实验组的 SAMe 溶液量。各组大鼠腹腔注射后 72 h 处理<sup>[1]</sup>,6% 水合氯醛 250 mg/kg 腹腔注射麻醉后,逐层剪开腹腔,分离腹主动脉,抽取 2 mL 动脉血置于促凝管内,

4 000 r/min 离心 10 min, 吸出血清,  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱保存待检。抽血后取部分肝脏组织, 生理盐水冲洗后立即放入液氮中保存待检。

**1.4 观察指标** 收集血清学标本及肝脏组织, 采用全自动生化分析仪检测各组肝脏组织血清学指标丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TbIL)、直接胆红素 (DbIL)、谷氨酰转肽酶 ( $\gamma$ -GGT)、碱性磷酸酶 (ALP) 的变化; 肝脏组织进行 HE 染色及 Masson 染色, 评估肝纤维化程度及胶原纤维面积及定量, 每例切片随机选取 5 个不重复的视野 ( $\times 400$  倍), Masson 染色以蓝色胶原沉积为阳性信号, 用 Image-Pro Plus6.0 软件分析图片, 使用 Invert contrast 反相应用照片, 使用 Photoshop 转化为黑白灰阶, 校正吸光度, 以消除照片亮度及对比度不一致的误差。测量积分吸光度 (IOD), 计算平均吸光度 (average optical density, AOD),  $\text{AOD} = \text{IOD} / (\text{总面积} - \text{空白面积})$ , 空白面积指照片中非蓝色组织的空白区域面积, 以 AOD 来反映胶原纤维表达水平; 胶原纤维沉积面积计算: 使用上述选取视野图片, 同样用 Image-Pro Plus6.0 软件分析图片, 测量积分面积 (area), 计算胶原纤维面积百分比, 胶原纤维面积百分比 = 胶原纤维面积 / 肝组织面积  $\times 100\%$ 。

**1.5 统计学处理** 数据采用 SPSS13.0 软件包进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA); 方差不齐报告采用 Welch 检验统计量; 组间多重比较采用 LSD 方法, 方差不齐采用 Dunnett's T3 方法。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 3 组之间血清学相关指标的比较** 通过表 1 可以发现, C 组的血清学指标 ALT、AST、AKP、TbIL、DbIL、IbIL、GGT、TBA 均明显下降, 与 A 组及 B 组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但 3 组之间总胆固醇 (Chol) 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 与 C 组比较, B 组 ALT、AST、AKP、TbIL、DbIL、TBA 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 而 IbIL、GGT、Chol 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 而 A 组仅 AST、TbIL、DbIL、IbIL、TBA 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), ALT、AKP、GGT、Chol 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。与 A 组比较, B 组 ALT、AST、AKP、

TbIL、DbIL、GGT、TBA 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但 IbIL 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。

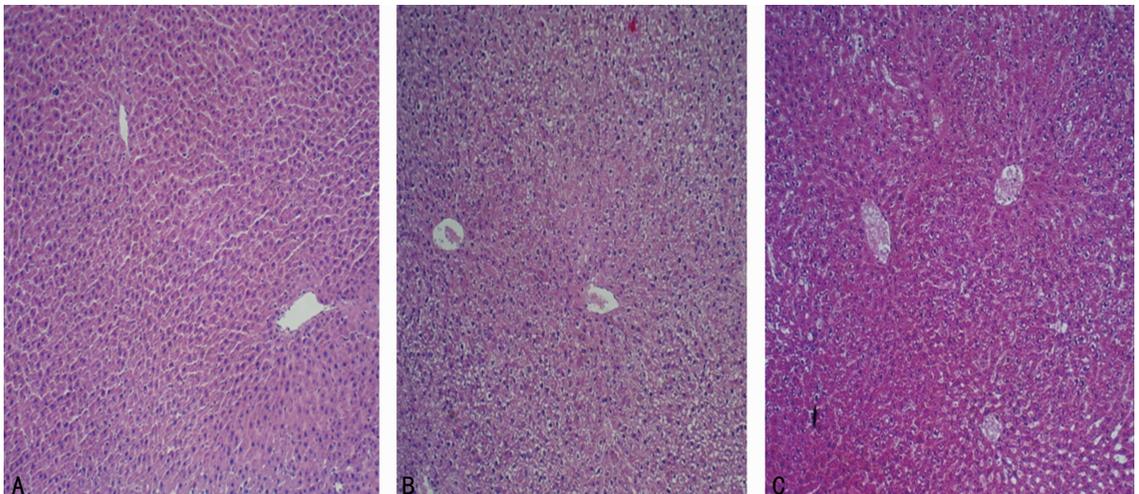
**2.2 肝脏病理组织学变化** HE 染色, 光镜下观察, B 组肝内广泛纤维组织增生, 假小叶形成, 胆管增生, 炎性细胞浸润明显, 肝细胞明显肿胀, 有些呈空泡状变性, 碎屑状坏死; 而 C 组显示肝小叶结构尚清晰, 无明显的炎症细胞浸润, 未见明显纤维化, 胆小管扩张等现象; A 组肝小叶结构清晰, 无炎症细胞浸润及纤维增生 (图 1)。

**2.3 3 组肝脏组织胶原纤维定量比较** 正常肝脏组织可见少量胶原纤维沉积, 在 MASSON 染色中, 胶原纤维呈蓝色分布。B 组胶原纤维阳性表达量明显增多, 主要聚集在门静脉、汇管区、纤维间隔和邻近的肝窦, 在炎性细胞浸润区的表达也明显增加; C 组汇管区、纤维间隔和邻近的肝窦胶原纤维表达量 ( $175.1 \pm 127.9$ ) 及胶原纤维沉积面积比 ( $14.1 \pm 6.4$ ) 显著减少, 与 B 组比较差异有统计学意义 ( $P_{\text{area}\%} = 0.001$ ,  $P_{\text{AOD}} = 0.000$ ); 与 A 组比较,  $P < 0.05$  ( $P_{\text{area}\%} = 0.067$ ,  $P_{\text{AOD}} = 0.029$ ); A 组与 B 组之间胶原纤维面积比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (见表 2); 统计分析, 总体方差齐性  $F_{\text{area}\%} = 35.746$ ,  $F_{\text{AOD}} = 92.278$ 。

表 1 3 组治疗 72 h 时肝脏血清学指标变化情况比较

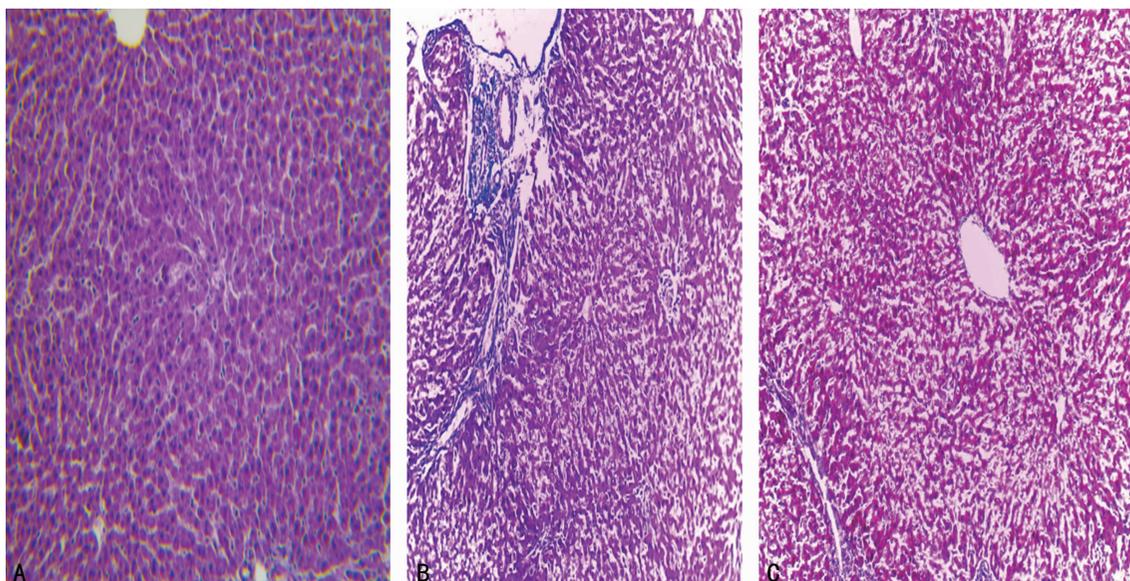
项目	A 组	B 组	C 组	F	P
ALT(IU/L)	35.00 $\pm$ 2.00	712.0 $\pm$ 171.0*#	37.00 $\pm$ 3.21	46.54	0.00
AST(IU/L)	23.00 $\pm$ 5.03*	1 262.0 $\pm$ 222.0*#	152.00 $\pm$ 13.50	136.20	0.00
ALP(IU/L)	142.00 $\pm$ 16.90	1 507.0 $\pm$ 137.0*#	635.00 $\pm$ 230.00	121.58	0.00
TbIL( $\mu$ mmol/L)	13.00 $\pm$ 1.17*	308.0 $\pm$ 48.5*#	55.00 $\pm$ 10.60	62.30	0.01
DbIL( $\mu$ mmol/L)	0.40 $\pm$ 0.29*	229.0 $\pm$ 34.1*#	50.00 $\pm$ 9.57	86.37	0.00
IbIL( $\mu$ mmol/L)	13.00 $\pm$ 1.46*	76.0 $\pm$ 29.0	4.40 $\pm$ 1.86	22.86	0.01
GGT(IU/L)	1.00 $\pm$ 1.00	5.7 $\pm$ 0.6#	3.30 $\pm$ 2.08	8.65	0.02
TBA( $\mu$ mmol/L)	4.80 $\pm$ 0.85*	247.0 $\pm$ 27.8*#	44.00 $\pm$ 12.40	164.25	0.00
Chol(mmmol/L)	2.92 $\pm$ 0.62	6.1 $\pm$ 2.7	3.30 $\pm$ 2.20	2.19	0.19

\*:  $P < 0.05$ , 与 C 组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 A 组比较。



A: A 组 HE 染色; B: B 组 HE 染色; C: C 组 HE 染色。

图 1 SMAe 对 ANIT 致大鼠急性胆汁淤积性肝病肝组织形态学的影响 ( $\times 100$ )



A: A 组 Masson 染色; B: B 组 Masson 染色; C: C 组 Masson 染色。

图 2 SMAe 对 ANIT 致大鼠急性胆汁淤积性肝病肝组织形态学的影响(×400)

表 2 3 组治疗 72 h 时肝脏胶原纤维量及胶原纤维面积的比较(×400)

组别	n	胶原纤维定量(平均吸光度 AOD)	F	P
A 组	6	62.51±34.24	92.278	0.000
B 组	6	339.20±9.53*#		
C 组	6	175.10±127.90		

\*: P<0.05, 与 C 组比较; #: P<0.05, 与 A 组比较。

表 3 3 组治疗 72 h 时肝脏胶原纤维面积百分比的比较(×400)

组别	n	胶原纤维面积百分比(area%)	F	P
A 组	6	5.2±4.5*	35.746	0.000
B 组	6	37.7±3.1*#		
C 组	6	14.1±6.4#		

\*: P<0.05, 与 C 组比较; #: P<0.05, 与 A 组比较。

### 3 讨 论

肝脏是人体重要的代谢及解毒器官,药物经呼吸道、消化道及静脉进入人体后,经过肝脏的解毒功能,转化成相对安全的代谢产物,从而排出体外,所以,肝脏与药物具有密切的关系。药物型胆汁淤积性肝病是由于药物本身及其代谢产物的作用导致肝功能的损害,属于药物型肝损害中最常见的一种,目前还未发现有效的预测指标及诊疗手段<sup>[2]</sup>。它作为临床上一种常见病,因其病程较长,损伤较重,常迁延发展,成为临床上一大难题,其中,约 50% 的患者导致肝衰竭<sup>[3]</sup>。近年来,随着新药的研发、药物的广泛应用以及多种药物的联合应用,引起药物性肝损害的比例呈现逐年增长的趋势。据调查,大约有 1 100 余种药物可引起肝损害。另外,朱超慧等<sup>[4]</sup>研究表明,引起药物性肝损害的药物主要为抗生素类,其中抗结核药 58 例,占 87.88%,且女性多于男性;此外国内外也有关于抗肿瘤药物、抗结核药物、中药及免疫抑制剂引起肝损害的报道<sup>[5-8]</sup>。根据 2005 年美国食品与药品监督管理局(Food and Drugs Ad-

ministration, FDA) 药物肝毒性委员会及结合国际药物性肝损害标准,将药物性肝损害分为:肝细胞损害型、胆汁淤积型、混合型。

目前,药物型胆汁淤积性肝病是引起急性肝衰竭及肝移植的重要原因之一,对于其致病机制的探索仍是临床上的一项重大挑战。有研究表明,外源性物质,如亲脂性化合物经过细胞色素 P450 系统转化为亲水性化合物,从而产生有毒代谢产物;大量消耗抗氧化产物,加重胞内蛋白质的氧化,增加线粒体细胞膜的通透性,减少 ATP 的合成,抑制 Ca<sup>2+</sup> 依赖性 ATP 酶的活性,使 Ca<sup>2+</sup> 的螯合能力下降<sup>[9]</sup>。同时,年龄、既往肝脏病变史、酶诱导及抑制作用、基因多样性等都会影响这个过程。对于胆汁淤积性肝病的治疗,临床上主要有熊去氧胆酸(UDCA)、SAmE、激素及免疫抑制剂、ERCP 及内镜下治疗、肝移植及血液净化治疗等等。

SAmE 是含硫氨基酸的一种,是存在于人体组织的一种生理活性分子,由蛋氨酸与三磷酸腺苷在腺苷蛋氨酸合成酶催化下生成。它作为甲基供体(转甲基作用)和生理性巯基化合物(如半胱氨酸、牛磺酸、谷胱甘肽和辅酶 A)的前体(转硫基作用)参与体内重要的生化反应,被广泛应用于治疗各种原因导致肝内胆汁淤积性疾病,如慢性肝炎、肝硬化及妊娠期肝内胆汁淤积等,其退黄效果明显,疗效肯定,其临床功效已经得到验证,但其发病机制尚未完全阐明<sup>[10]</sup>。目前,关于 SAmE 对于药物型胆汁淤积性肝病的中有关胶原纤维含量及面积的研究较少。本研究中通过 SAmE 作用于奈乙硫氨酸酯(ANIT)致急性药物型胆汁淤积性肝病的大鼠模型上,比较其各项肝功能指标、病理学改变及胶原纤维含量及面积的变化。分析显示,SAmE 组的 ALT、AST、ALP、TbIL、DbIL、IbIL、TBA 明显下降,与空白对照组及造模组相比,差异具有统计学意义,进一步证明了 SAmE 对药物型胆汁淤积性肝病具有显著的保护作用,与文献一致。病理切片中可见 SAmE 组肝内无明显纤维组织增生及假小叶形成,炎性细胞浸润不明显,胆管增生、肝细胞肿胀、空泡状变性,碎屑状坏死均较生理盐水造模组明显减轻。Masson 染色中可见 SAmE 组胶原纤维定量及面积均明显

低于造模组,与空白对照组接近,说明 SAME 可以通过降低胶原纤维的含量及面积,延缓肝纤维化的进展,进一步保护肝脏组织的作用。这可能与其以下方面有关。SAME 可提高超氧化歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的活性,抑制肝星状细胞的转录生长因子(TGF- $\beta$ 1)的表达,有效抑制肝星状细胞的增殖及 I 型胶原的合成,延缓肝纤维化<sup>[11]</sup>; Chtourou 等<sup>[12]</sup>研究表明, SAME 还可抑制前胶原 mRNA 的表达,减轻炎症反应,从而阻断肝纤维化的进程。另外, S-腺苷蛋氨酸还可通过转甲基作用增加膜磷脂的生物合成,增加膜流动性并加 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATP 酶活性,加快胆酸转运;同时通过转巯基作用,增加生成细胞内主要解毒剂谷胱甘肽和半胱氨酸,增加肝细胞的解毒作用和对自由基的保护作用,生成的牛磺酸可与胆酸结合,增加其可溶性。Jeon 等<sup>[13]</sup>研究表明, S-腺苷蛋氨酸通过抑制次黄嘌呤核酸转化成次黄嘌呤,从而提高肝脏组织腺苷浓度,有助于肝细胞 ATP 的生成。张钊等<sup>[14]</sup>研究表明, SAME 还可以通过降低肝脏各种细胞 Toll 样受体 4(TLR4)的表达,增强和肝 X 受体  $\alpha$ (LXR $\alpha$ )的表达,最终导致肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平降低和白细胞介素-10(IL-10)水平增高,进一步减轻内毒素所致的肝损害<sup>[14]</sup>。

总之, S-腺苷蛋氨酸有助于改善药物型胆汁淤积性肝病的肝功能,降低肝脏组织的胶原纤维,延缓肝纤维化的进展,对其作用机制的深入探究为将来临床提供可靠的依据及基础。

#### 参考文献

- [1] 杨新波,黄正明,曹文斌,等. CCl<sub>4</sub>, D-Gal, ANIT 致小鼠肝损伤模型的实验研究[J]. 世界华人消化杂志, 1998, 6(1):19-20.
- [2] 禹铮,贾继东. 药物性肝损伤的危险因素、诊断规范及停药标准[J]. 临床肝胆病杂志, 2013, 29(9):674-677.
- [3] Liu XY, Hu JH, Wang HF, et al. Etiological analysis of 1 977 patients with acute liver failure, subacute liver failure and acute-on-chronic liver failure[J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2008, 16(10):772-775.
- [4] 朱超慧,李楠,吴凯,等. 药物性肝损伤 S-腺苷蛋氨酸治疗的临床分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2010, 25(6):651-653.

- [5] Hartleb M, Biernat L, Kochel A. Drug-induced liver damage—a three-year study of patients from one gastroenterological department[J]. Med Sci Monit, 2002, 8(4):R292-R296.
- [6] Meier Y, Cavallaro M, Roos M, et al. Incidence of drug-induced liver injury in medical inpatients[J]. Eur J Clin Pharmacol, 2005, 61(2):135-143.
- [7] 张涛,贾继东. 107 例药物性肝损害的病因和临床特点[J]. 肝脏, 2005, 10(3):174-176.
- [8] 陆玮婷,李军,欧宁,等. 276 例药物性肝损伤的病因和临床表现分析[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(11):832-834.
- [9] Grattagliano I, Bonfrate L, Diogo CV, et al. Biochemical mechanisms in drug-induced liver injury: certainties and doubts[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(39):4865-4876.
- [10] Xie W, Park HB, Cook J, et al. Advances in membrane materials: desalination membranes based on directly copolymerized disulfonated poly(arylene ether sulfone) random copolymers[J]. Water Sci Technol, 2010, 61(3):619-624.
- [11] 刘梅,陆伦根,窦爱霞,等. S-腺苷蛋氨酸对人肝星状细胞增殖和氧应激及转化生长因子  $\beta$ 1 表达的影响[J]. 肝脏, 2007, 12(2):99-102.
- [12] Chtourou Y, Trabelsi K, Fetoui H, et al. Manganese induces oxidative stress, redox state unbalance and disrupts membrane bound ATPases on murine neuroblastoma cells in vitro: protective role of silymarin[J]. Neurochem Res, 2011, 36(8):1546-1557.
- [13] Jeon BR, Lee SM. S-adenosylmethionine protects post-ischemic mitochondrial injury in rat liver[J]. J Hepatol, 2001, 34(3):395-401.
- [14] 张钊,龚建平. S-腺苷蛋氨酸对内毒素性肝损害的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(11):1145-1148.

(收稿日期:2015-03-08 修回日期:2015-07-16)

## 统计资料类型

统计资料共有三种类型:计量资料、计数资料和等级资料。按变量值性质可将统计资料分为定量资料和定性资料。

定量资料又称计量资料,指通过度量衡的方法,测量每一个观察单位的某项研究指标的量的大小,得到的一系列数据资料,其特点为具有度量衡单位、多为连续性资料、可通过测量得到,如身高、红细胞计数、某一物质在人体内的浓度等有一定单位的资料。

定性资料分为计数资料和等级资料。计数资料为将全体观测单位(受试对象)按某种性质或特征分组,然后分别清点各组观察单位(受试对象)的个数,其特点是没有度量衡单位,多为间断性资料,如某研究根据患者性别将受试对象分为男性组和女性组,男性组有 72 例,女性组有 70 例,即为计数资料。等级资料是介于计量资料和计数资料之间的一种资料,可通过半定量的方法测量,其特点是每一个观察单位(受试对象)没有确切值,各组之间仅有性质上的差别或程度上的不同,如根据某种药物的治疗效果,将患者分为治愈、好转、无效或死亡。