

# 不同白酒对大鼠肝组织及血清透明质酸和Ⅳ型胶原的影响\*

李 珀<sup>1,2</sup>, 刘俊玲<sup>1\*\*</sup>, 何 常<sup>1,2\*\*\*</sup>, 程明亮<sup>3\*\*\*</sup>, 孙江龄<sup>1\*\*\*\*</sup>

(1. 贵阳医学院 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附院 病理科, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵阳医学院附院 感染科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘 要]** 目的: 探讨饮用不同白酒对大鼠肝脏及中血清透明质酸和Ⅳ型胶原的影响。方法: 雄性 SD 大鼠 131 只分为对照组、A 酒组(高加低剂量组)、B 酒组(高加低剂量组), 于 2、4、6 月末各组随机抽取 2 只大鼠处死, 取肝脏观察组织学改变; 6 月末, 用黄曲霉素 B1 (AFB1) 腹腔注射建立体内肝癌短期模型, 6 周后, 处死大鼠, 观察大鼠肝脏病理学变化, 取血清进行透明质酸(HA)及Ⅳ型胶原(CIV)含量检测。结果: (1) 在单纯灌酒后, A 酒组发生肝纤维化的比例比 B 酒组低, AFB1 造模后肝纤维化、肝硬化并肝癌的发生率 A 酒组低于 B 酒组; (2) 与对照组相比, A 酒组和 B 酒组纤维结缔组织增生明显( $P < 0.05$ ); (3) HA、CIV 在 B 酒组中的含量比 A 酒组中的含量高。结论: 2 种白酒对肝纤维化、肝硬化模型大鼠的血清及肝组织 HA 和 CIV 的影响不同, 引起的肝损伤程度也不同, B 酒可增加 HA 和 CIV 的水平, 相对而言, A 酒的作用要轻得多。

**[关键词]** 酒; 肝疾病, 酒精性; 肝, 纤维化; 透明质酸; 胶原Ⅳ型; 疾病模型, 动物; 大鼠, Sprague-Dawley

**[中图分类号]** R361.2; R575 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2013)06-0593-05

## Pathological Study on Effect of Different Liquor to Rat Liver Tissue, Hyaluronic Acid and Collagen TypeⅣ

LI Bo<sup>1,2</sup>, LIU Junling<sup>1</sup>, HE Chang<sup>1,2</sup>, CHENG Mingliang<sup>3</sup>, SUN Jiangling<sup>1</sup>

(1. Department of Pathology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the influence of different liquor on rat liver. **Methods:** Different doses of A and B liquor were given to 131 male SD rats by lavage. Two rats were randomly selected from each group, and sacrificed at the end of 2, 4, and 6 months afterwards respectively. Histological changes in rat livers were observed. After 6 months, some of the experimental rats were injected aflatoxin B1 into abdomen to make short-term model of liver cancer. The model was established in 6 weeks, and rat livers' histopathological changes were observed. Serum hyaluronic acid (HA) and collagen type Ⅳ (CIV) contents were detected. **Results:** (1) In simple lavage experiment, hepatic fibrosis rate in group A was lower than that in group B; After molding with aflatoxin B1, the hepatic fibrosis rate, and rate of hepatocirrhosis accompanied with hepatocellular carcinoma in group A were lower than those in group B; (2) Compared with normal control group, fiber hyperplasia occurred obviously in group A and group B ( $P < 0.05$ ); (3) Contents of HA and CIV were higher in group B than in group A. **Conclusions:** The levels of HA and CIV in serum and liver are different in rat fibrosis model treated by AFB<sub>1</sub> with liquor A and B

\* [基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973)课题(NO. 2011CB512114); 贵州省科技计划课题(黔科合 SZ[2011]3001)

\*\* 贵阳医学院硕士研究生, 现在重庆市合川区人民医院病理科工作

\*\*\* 通信作者 E-mail: hechang\_66@163.com; chengml@21cn.com

\*\*\*\* 贵阳医学院硕士研究生, 现工作单位为贵阳市口腔医院

respectively, of which liquor B is more serious.

[**Key words**] liquor; liver diseases, alcoholic; liver, fibrosis; hyaluronic acid; collagen type IV; disease models, animal; rats, Sprague-Dawley

长期酗酒能引起肝脏发生多种病变,最常见的是酒精性肝病(alcoholic liver disease, ALD),病理学上的改变包括从中性脂肪在肝内聚积到肝纤维化、肝硬化和肝细胞癌。酒精性肝病的发病率及肝损害的严重程度与酗酒的时间长短以及剂量存在线性正相关。不同白酒中含有不同有益成分,对胶原基因的表达与蛋白质分泌均有不同的抑制作用<sup>[1]</sup>。为研究白酒有益成分与 ALD 进程发生发展的关系,本课题选择两种不同类型的市售白酒观察对大鼠肝脏的影响和大鼠血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)和Ⅳ型胶原(collagen type IV, CⅣ)含量的变化及对肝癌发生的影响。

## 1 材料及方法

### 1.1 材料

**1.1.1 动物** 雄性 SD 大鼠 131 只,体重( $220 \pm 20$ ) g,购自第三军医大学大坪医院实验动物中心,合格证号 SCXK(渝)2007-0005。

**1.1.2 A、B 酒**均为酱香型,通过正规销售途径获取,酒精度测试均为 53 度。

**1.1.3 主要试剂** 黄曲霉素 B1 (AFB1) (FERMENTEK 公司,批号 AF022); 2-乙酰氨基芴(AAF) (SIGMA 公司,批号 127K1630); 二甲亚砜(DMSO) (Amresco 公司),透明质酸(HA)和Ⅳ型胶原蛋白(CⅣ)定量测定试剂盒(化学发光法)(郑州安图绿科生物工程有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 造模** 实验大鼠适应性喂养 1 周后,随机抽取 11 只作为正常对照组(N),余大鼠随机平均分为 4 组(每组 30 只),A 高剂量组(AG)和低剂量组(AD)、B 剂量组(BG)和低剂量组(BD),高剂量组为 10 mL/kg,低剂量组剂量为 5 mL/kg,每日早晨灌胃,每周 5 d<sup>[2]</sup>。6 月末实验组经腹腔注入 AFB1<sup>[3-4]</sup>,400  $\mu\text{g/kg}$ ,每天 1 次,每周 6 次,连续 2 周。停用 AFB1,2 周后换饲含 0.015% 2-乙酰氨基芴(AAF)饲料 2 周。饲养过程中观察大鼠的精神状态、体重、活动、毛发光泽度、食欲以及死亡情况。2、4、6 月末各组随机取 2 只大鼠放血处死,取血清置于  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  备用。肝脏称重后取部分置  $-80$

$^{\circ}\text{C}$  冻存备用,余以 4% 甲醛溶液固定。造模结束后处死余下大鼠,标本处理同前。

**1.2.2 大鼠肝脏组织** 肝组织常规石蜡切片,苏木素-伊红染色(HE 染色),观察各组肝脏纤维化、肝硬化并肝癌程度。Masson 三色法染色参照文献[5]进行。使用 Olympus BH-2 多功能生物显微镜,在高倍镜下( $\times 400$ ),对每例切片选取 25 个有代表性的区域,使用图像分析软件 HPISA-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统(9.0)进行相对灰度值的测定,取均值作为代表此例切片结缔组织染色强度的灰度值。

**1.2.3 HA 定量测定** 采用两步法反应模式,第 1 步是在微孔板各孔中分别加入标准品、样本后,在加入 HA 结合蛋白溶液,混匀后温育,反应中标准品、样本中的 HA 和包被的 HA 衍生物竞争结合 HA 结合蛋白,反应后洗板分离未结合在包被板上的物质;第二步加入酶结合物,与包被板上结合的 HA 结合蛋白反应,温育反应后,充分洗涤除去未结合的酶结合物,然后加入发光底物,测定每孔发光强度,建立标准曲线回算样本中的 HA 含量,样本中 HA 含量与发光强度呈反比,它是判断肝脏纤维增生较为敏感的指标<sup>[6]</sup>。

**1.2.4 CⅣ定量测定** 采用两步法反应模式,第一步是在微孔板各孔中分别加入标准品、样本后温育,反应中标准品、样本中的 CⅣ和包被的 CⅣ固相抗体结合,反应后洗板分离未结合在包被板上的物质;第二步加入酶结合物,与包被板上结合的抗原反应,形成固相抗体-抗原-酶标抗体复合物,反应后充分洗涤除去未结合的酶结合物,然后加入发光底物,测定每孔发光强度,建立标准曲线,根据标准曲线回算样本中的 CⅣ的含量,样本中 CⅣ含量与发光强度呈反比。

CⅣ是肝脏间质基底膜的主要成分,当基底膜发生改变,CⅣ明显的增加,并且它的出现最早,适合作为肝纤维化早期诊断的指标<sup>[7-8]</sup>。

### 1.3 统计学处理

资料采用 SPSS 13.0 系统软件进行分析处理,计量资料采用方差分析, $P < 0.05$  差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

造模过程中,B 酒组死亡 14 只,A 酒组死亡 18 只大鼠,正常对照组无死亡。A 酒组(A 组)大鼠活动度佳,毛发顺滑有光泽,食欲尚可,体重无明显降低,高、低剂量大鼠的状态无明显区别。B 酒组(B 组)毛发光泽度较差、蓬松凌乱,高剂量组大鼠醉酒状态明显,活动度差,食欲和体重随灌胃的时间延长而逐渐减低。正常组大鼠一般情况无异常。

2.2 大鼠肝脏组织学改变

单纯灌胃 2 月末,BG 组 2 只大鼠肝脏有纤维增生,肝细胞点灶状坏死,汇管区见短窄纤维增生;其余四组见肝细胞胞浆疏松,少量空泡细胞或肝细胞点灶状坏死。4 月末,BD 组 1 只、BG 组 2 只大鼠肝脏纤维增生;A 组表现为肝细胞脂肪变性,肝细胞点灶状坏死。6 月末,AD 组 1 只、AG 组、BD 组、BG 组 2 只大鼠肝脏纤维增生。经肝癌模型短期复制,AD 组 1 只、AG 组 6 只、BD 组只、BG 组 6 只大鼠发生肝硬化。AG 组 1 只,BG 组 5 只大鼠发生肝硬化并肝癌(表现为肝细胞异型增生、排列紊乱)。A 组肝纤维化、肝硬化并肝癌的发生率均比 B 组低,正常组肝脏病理变化不明显,见图 1。

整个模型复制过程中,A 组达到肝纤维化的占 52.2% (24/46),AD 组肝纤维化率为 52% (13/25),AG 组肝纤维化率为 52.4% (11/21);B 组肝纤维化的占 78.6% (33/42),BD 组肝纤维化率为 64% (16/25),BG 组肝纤维化率为 100% (17/17)。经 AFB1 肝癌短期造模的大鼠,A 组达到肝纤维化的占 61.8% (21/34),其中 AD 组为 63.1% (12/19),AG 组为 60% (9/15);B 组达到肝纤维化的占 80% (24/30),其中 BD 组纤维化率为 68.4% (13/19),BG 组肝纤维化率 100% (11/11)。在单纯酒喂养和 AFB 肝癌短期模型复制两个阶段,B 组肝纤维化率均高于 A 组。

2.3 大鼠肝脏结缔组织变化

Masson 染色的结果显示,胶原纤维成绿色,肌纤维红色,对比度清晰。正常组肝脏染色胶原纤维较少,A 组和 B 组可见胶原纤维增加,甚至可见假小叶的形成,见图 2。各组大鼠平均灰度值见表 1。

从表 1 中可见,实验组灰度值均较正常对照组高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );AG 组、BD 组、BG 组灰度均值比 AD 组高,差异具有统计学意

义( $P < 0.05$ );BG 组灰度均值比 AG 组高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );BD 组灰度均值与 AG 组灰度均值比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

2.4 大鼠血清 HA 和 CⅣ含量测定 正常血清中 HA 的含量在 120 mg/L 以下,CⅣ含量在 95 mg/L 以下。灌胃 2 月、4 月、6 月后,实验组大鼠血清 HA、CⅣ含量均高于正常组。见表 2。

表 1 大鼠肝脏 Masson 染色灰度值比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab. 1 Comparison of gray values of Masson staining of rat liver

组别	<i>n</i>	灰度值
N	11	122.013 ± 3.318
AD	25	126.832 ± 5.221 <sup>(1)</sup>
AG	21	131.073 ± 5.828 <sup>(1)(2)</sup>
BD	25	131.775 ± 6.139 <sup>(1)(2)</sup>
BG	17	135.518 ± 9.419 <sup>(1)(2)(3)</sup>

<sup>(1)</sup>与 N 比较, $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>与 MD 比较, $P < 0.05$ ; <sup>(3)</sup>与 MG 比较, $P < 0.05$

表 2 大鼠血清 HA 和 CⅣ含量( $\bar{x} \pm s$ , mg/L)  
Tab. 2 HA and CⅣ contents in rat serum

组别	<i>n</i>	HA	CⅣ
N	11	99.216 ± 10.305	89.471 ± 3.373
AD	25	127.405 ± 30.934 <sup>(1)</sup>	105.433 ± 19.842 <sup>(1)</sup>
AG	21	136.333 ± 42.039 <sup>(1)</sup>	114.650 ± 26.158 <sup>(1)</sup>
BD	25	150.780 ± 48.158 <sup>(1)(2)</sup>	122.696 ± 33.147 <sup>(1)(2)</sup>
BG	17	190.095 ± 52.030 <sup>(1)(2)(3)(4)</sup>	177.812 ± 40.196 <sup>(1)(2)(3)(4)</sup>

<sup>(1)</sup>与 N 比较, $P < 0.05$ ; <sup>(2)</sup>与 AD 比较, $P < 0.05$ ; <sup>(3)</sup>与 AG 比较, $P < 0.05$ ; <sup>(4)</sup>与 BD 比较, $P < 0.05$

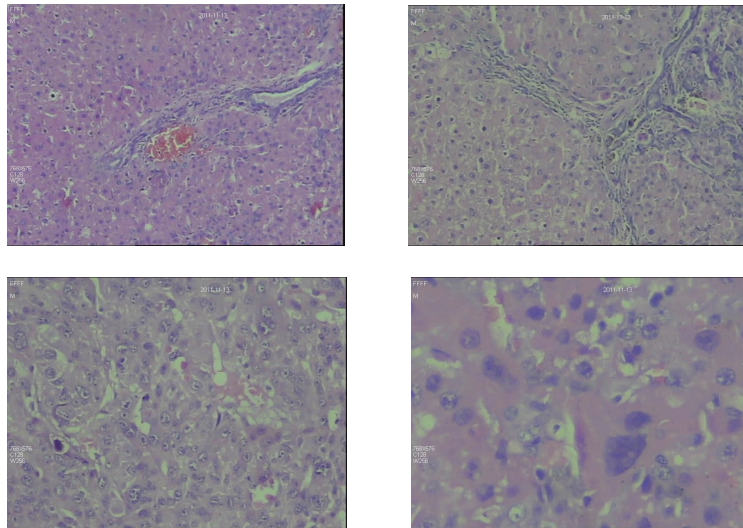
从表 2 可以看出,HA、CⅣ在 AG 组和 B 组中的水平较健康对照组高( $P < 0.05$ ),而 B 组的含量又比 A 组含量高。白酒高、低剂量组之间比较( $P < 0.05$ )差别有统计学意义。

3 讨论

研究显示乙醇损害肝细胞是其直接对肝细胞的毒害作用所致<sup>[1-2]</sup>。当乙醇进入肝细胞后,经肝乙醇脱氢酶(ADH)、过氧化氢物分解酶和肝微粒体乙醇氧化酶氧化,形成乙醛。乙醛对肝细胞有明显的毒性作用,使其代谢发生障碍,导致肝细胞变性、坏死。长期过量饮酒使肝微循环陷于低氧状态,同时肝细胞肿大造成窦隙变窄而导致肝细胞变性和坏死,并促进肝纤维化。肝纤维化进一步发展,肝中心静脉区和汇管区出现纤维束,肝脏正常结构遭到不

可逆破坏并形成假小叶时,肝脏表现出肝硬化的病理特点。乙醛还能与肝细胞内具有防止脂质过氧化

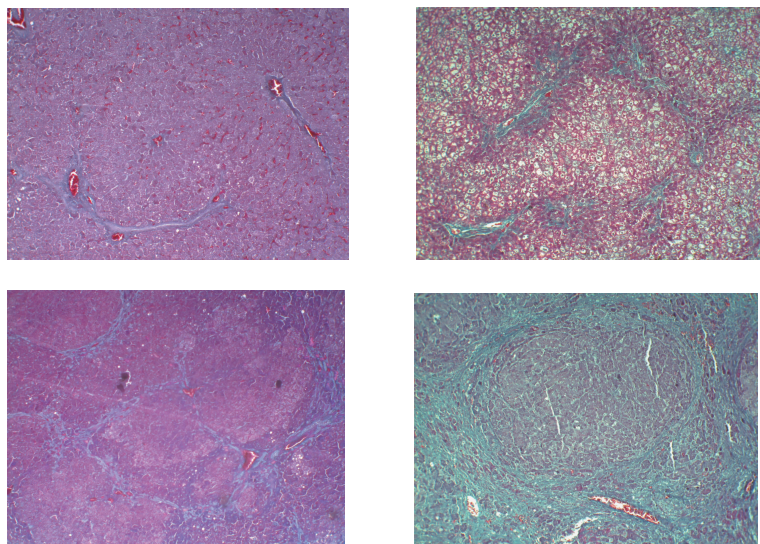
作用的谷胱甘肽结合,导致自由基和脂质过氧化物增加,损伤肝细胞膜,攻击 DNA,产生致肝癌作用。



注:A:AG 组 汇管区可见短粗的纤维增生(×100);B:BG 组 广泛纤维组织增生,肝小叶结构破坏(×100);  
C:肝癌:肝细胞排列紊乱(×100);D:肝细胞排列紊乱,细胞体积不等,染色深浅不一(×400)

图 1 大鼠肝脏组织学改变(HE,6 月末)

Fig. 1 Pathological changes of rat liver tissue



注:A:AD 组;B:AG 组;C:BD 组;D:BG 组

图 2 大鼠肝脏结缔组织(Masson 染色,×100)

Fig. 2 Connective tissue of rat liver tissue

本实验采用单纯灌酒和加用 AFB1 方式,通过大鼠观察肝脏组织学改变、肝脏结缔组织增生情况以及血清学改变了解饮酒对肝脏的影响。灌酒 6 月后,大鼠肝脏的细胞结构发生改变,细胞脂肪变、坏死、纤维增加,B 组发生纤维化的例数明显多于 A 组,且出现的时间较早。建立 AFB1 肝癌短期模型后,而高剂量组发现癌变,低剂量组表现为肝纤

维化、肝硬化。C IV 是肝脏间质基底膜为主要成分,当基底膜发生改变,C IV 明显增加并且它的出现最早,适合作为肝纤维化早期诊断指标<sup>[7-8]</sup>。研究表明,HA、C IV 与肝脏的病变程度呈正相关<sup>[9]</sup>;长期过量饮酒是肝脏组织正常结构遭到破坏,胶原纤维将肝组织分割成大小不一的假小叶,尤其以 B 组明显,纤维增生程度、血清中 HA 和 C IV 的含量

与肝脏的损伤程度成正相关。HA、CⅣ在 AG 组和 B 组中的水平较健康对照组高,且随着纤维化程度的增加而逐渐增高。A 组发生肝纤维化、肝硬化并肝癌发生率少于 B 组,高剂量组肝脏损伤程度较低剂量组严重。A 酒组死亡率低于 B 酒组。提示 A 酒对大鼠生长状态负面影响不明显,对大鼠神经精神状态也无明显的损伤。说明 A 酒对 AFB1 引起肝脏的损伤的过程中起到一定的延缓作用,降低肝脏的损伤,有助于延缓肝纤维化、肝硬化和肝癌的发生。

近些年,对于不同白酒的研究已逐步深入,开展了多方面的基础及临床的研究,取得了一定的成绩。程明亮、吴君等<sup>[10]</sup>认为茅台酒能诱导肝脏金属硫蛋白含量增加,多环节抑制星状细胞活化和胶原蛋白生成可能是干预肝纤维化形成的重要机制;并在体内实验中得出茅台酒金属硫蛋白可清除氧自由基,防止脂质过氧化和 DNA 损伤,对胶原基因的表达与蛋白分泌也有一定的抑制作用<sup>[1]</sup>。

不同白酒对肝脏作用的机理仍值得作更深入的研究,相信在不久的将来会得到正确、完整的结论。

## 4 参考文献

- [1] 程明亮,吴君,张文胜,等. 茅台酒对肝脏的作用及其影响的实验研究[J]. 中华医学杂志, 2003(83):237-241.
- [2] Liu J, Cheng M L. Differential effects between Maotai

and ethanol on hepatic gene expression in mice: possible role of metallothionein and heme oxygenase-1 induction by Maotai[J]. Society for Experimental Biology and Medicine, 2006(2):1535-1541.

- [3] 陈志英,严瑞琪,苏建家,等. 黄曲霉素 B1 致肝癌作用体内短期实验模型探索[J]. 广西医学院学报, 1982(4):10-13.
- [4] 陈志英,严瑞琪,覃国忠,等. 建立黄曲霉素 B1 致肝癌作用体内短期实验模型的进一步研究[J]. 广西医学院学报, 1985(2):17-22.
- [5] 王伯运,李玉松,黄高昇,等. 病理学技术[M]. 人民卫生出版社, 2000:142-143.
- [6] 陆伦根,曾德明. 肝纤维化的诊断和评估[J]. 中华肝脏病杂志, 2005(8):603.
- [7] Rosenberg WM, Voelker M, Thiel R, et al. Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study[J]. Gastroenterology, 2004(6):1704.
- [8] 刘小强,周海中,吴靖珍. 肝病患者血清 HA、PCⅢ、CⅣ、LN 测定的临床意义[J]. 实用临床医药杂志, 2009(6):39-42.
- [9] Luo RH, Yang SJ, Xie JQ, et al. Diagnostic value of five serum markers for liver fibrosis[J]. Zhonghua Ganzangbing Zazhi, 2001(9):148-150.
- [10] 程明亮,吴君,王海琴,等. 茅台酒诱导金属硫蛋白的作用及其对肝星状细胞的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2001(12):1369-1373.

(2013-10-06 收稿,2013-11-13 修回)

中文编辑:陈腾祥;英文编辑:陈腾祥

(上接第 592 页)

剂量组,说明同样条件下同种类型酒类摄入,低剂量组受到损伤严重程度低于高剂量组,饮酒量也与 ALD 发生发展相关。

## 4 参考文献

- [1] 中华医学会肝病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 酒精性肝病诊疗指南(2010 年修订版)[S]. 中华肝脏病杂志, 2010(3):167-170.
- [2] 程明亮,吴君,张文胜,等. 茅台酒对肝脏的作用及其影响的实验研究[J]. 中华医学杂志,2003(83):237-240.
- [3] 吴君,程明亮,王海琴,等. 茅台酒与肝病关系的流行病学调查及病理组织学研究[J]. 世界华人消化杂志, 2001(12):1374-1378.
- [4] Narla G, Heart KE, Reeves HL. Klf 6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer[J]. Science, 2001(25551):2563-2566.

- [5] 王少平,亢黎莉. Klf 6 基因在原发性肝癌中的表达[J]. 华中科技大学学报, 2008(3):343-346.
- [6] 李向荣,林星余,肖忠秀,等. p21 结构功能与研究新进展[J]. 医学综述, 2008(14):2094-2097.
- [7] 何常,邹美平,张人华,等. Klf 6、p21WAF1/CIP1、CyclinD1 在结直肠癌中的表达及意义[J]. 山东医药, 2011(16):28-29.
- [8] 杨平,曹杰,梁立源,等. Klf 6 蛋白在散发性结直肠癌组织中的表达及其与 p21 蛋白的关系[J]. 中华实验外科杂志, 2010(10):1480-1482.
- [9] Choi SS, Diehl AM. Epithelial-to-mesenchymal transitions in the liver[J]. Hepatology, 2009(50):2007-2013.
- [10] Kaimo A, Potter J, Kaimori JY, et al. Transforming growth factor beta1 induces an epithelial-to-mesenchymal transition state in mouse hepatocytes in vitro[J]. J Biol chem, 2007(30):22089-22101.

(2013-10-06 收稿,2013-11-02 修回)

中文编辑:陈腾祥;英文编辑:陈腾祥