

文章编号:1005-6947(2008)09-0883-04

· 基础研究 ·

# 谷氨酰胺和精氨酸对大鼠肝纤维化的影响

陈波<sup>1</sup>, 何生<sup>2</sup>

(1. 湖北省妇幼保健院 乳腺外科, 湖北 武汉 430070; 2. 四川大学华西医院 普通外科, 四川 成都 610021)

**摘要:**目的 研究谷氨酰胺(Gln)和精氨酸(Arg)对大鼠肝纤维化的影响。方法 CCl<sub>4</sub>诱导 Wistar 大鼠 6 周建立肝纤维化动物模型,共 30 只动物随机分为对照组、Gln 处理组和 Arg 处理组,每组 10 只。至 8 周结束时观察各组大鼠肝脏大体观、胶原蛋白含量和肝纤维化的程度。结果 大鼠肝纤维化模型至 8 周结束时,无 1 例死亡。Gln 组肝脏纤维化最严重,对照组次之,Arg 组最轻。结论 Gln 加重了大鼠肝纤维化,而 Arg 明显减轻大鼠肝纤维化。

[中国普通外科杂志,2008,17(9):883-886]

**关键词:** 肝纤维化/继发性;谷氨酰胺/副作用;精氨酸;大鼠

中图分类号:R 657.3

文献标识码:A

## The role of glutamine and arginine in rat hepatic fibrosis

CHEN Bo<sup>1</sup>, HE Sheng<sup>2</sup>

(1. Department of Breast Surgery, Maternity and Child Care Center of Hubei Province, Wuhan 430070, China; 2. Department of General Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of glutamine and arginine in rats with hepatic fibrosis. **Methods** Thirty male Wistar rats with hepatic fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> for 6 weeks were randomly divided into control group ( $n = 10$ ), glutamine treatment group ( $n = 10$ ) and arginine treatment group ( $n = 10$ ). At 8 weeks after treatment, the liver appearance, collagen protein level and the degree of hepatic fibrosis were observed.

**Results** At the end of 8 weeks, there was no death of any group of the rats. The glutamine group showed the most severe hepatic fibrosis, the control group showed less, and the arginine group showed the least fibrosis.

**Conclusions** The degree of hepatic fibrosis is aggravated by glutamine, while arginine obviously relieves rat hepatic fibrosis.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(9): 883-886]

**Key words:** Hepatic Fibrosis/second; Glutamine/adv eff; Arginine; Rats

CLC number: R 657.3

Document code: A

近年来,免疫增强型肠内营养(immune-enhancing diets, IEDs)成为外科营养支持研究的热点问题<sup>[1]</sup>。谷氨酰胺(glutamine, Gln)和精氨酸(arginine, Arg)是目前研究及应用较多的免疫营养物质。大量前瞻性随机对照临床研究认为,IEDs可降低择期手术、创伤及重症监护室(ICU)患者感染性并发症的发生率,缩短住院时间,降低病死

率。肝病患者均存在程度不同的蛋白质——能量营养不良。目前对 IEDs 研究的焦点在于肠道黏膜结构和功能的维护和机体细胞免疫功能的提高,对肝脏影响的研究较少。本研究通过动物实验,初步探讨 Gln 和 Arg 在大鼠肝纤维化中可能产生的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar 纯系雄性大鼠 40 只,8 周龄,体重 180~230 g,购自四川大学华西医学中心实验动物中心。

1.1.2 试剂 四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)(分析纯)购自

**基金项目:**四川省科技厅科技攻关项目(01SY051-43)。

**收稿日期:**2008-06-10; **修订日期:**2008-07-19。

**作者简介:**陈波,男,湖北省妇幼保健院主治医师,主要从事肝胆乳腺外科基础与临床方面的研究。

**通讯作者:**陈波 E-mail:philard@sina.com.cn

成都市联合化工试剂研究所,含量 $\geq 99.5\%$ (批号20050315);市售中性菜籽油;羟脯氨酸测试盒、总蛋白(考马斯亮蓝)检测盒购自南京建成生物工程研究所;Gln和Arg购自成都景田生物药业有限公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 肝纤维化动物模型的建立 40只大鼠诱导前适应性饲养1周。随后按 $0.3\text{ mL}/100\text{ g}$ (体重)予双后肢皮下交替注射 $50\%$   $\text{CCl}_4$ 中性菜籽油溶液,每周2次,持续6周。2,4,6周末随机处死3只大鼠观察肝脏成模情况(图1)。

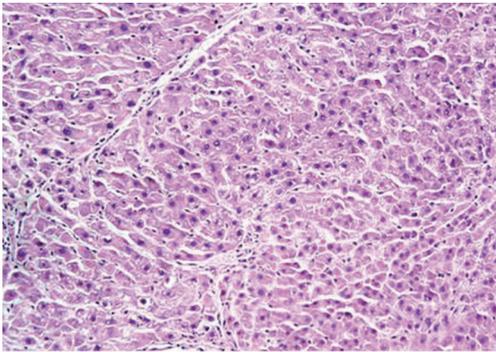


图1 肝硬化大鼠成模6周时肝组织的变化(HE $\times 200$ ) 肝内弥漫性纤维组织增生,肝小叶结构紊乱,并形成不典型假小叶

1.2.2 实验动物分组 将成模大鼠随机分为3组:对照组、Gln处理组和Arg处理组,每组10只。

1.2.3 肝纤维化大鼠干预方法 动物成模后继续按 $0.3\text{ mL}/100\text{ g}$ (体重)予双后肢皮下交替注射 $50\%$   $\text{CCl}_4$ 中性菜籽油溶液,每5天1次。Gln组每天按 $0.5\text{ g}/\text{kg}$ 剂量灌胃,Arg组每天按 $0.5\text{ g}/\text{kg}$ 剂量灌胃,对照组予等容量生理盐水灌胃,至8周结束。

1.2.4 标本采集 予 $1\%$ 戊巴比妥钠 $0.5\text{ mL}/100\text{ g}$ 腹腔注射麻醉,剖腹。先观察鼠肝大体情况,尔后整个肝脏取下,备用。

1.2.5 肝组织胶原蛋白含量的测定 (1)标本处理:肝叶称重后组织匀浆,取上清液 $0.1\text{ mL}$ 加入生理盐水 $0.4\text{ mL}$ ,稀释成 $2\%$ 组织匀浆。(2)标本消化:组织匀浆中加入试剂盒中的消化液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 $1\text{ h}$ 。(3)羟脯氨酸测定:按试剂盒说明,向待测液中加入测定试剂,混匀, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 $15\text{ min}$ ,冷却后 $3\ 500\text{ r}/\text{min}$ 离心 $10\text{ min}$ ;取上清液在 $550\text{ nm}$ 处, $1\text{ cm}$ 光径测定各管吸光度(OD);

再按试剂盒说明测定标本蛋白含量,代入公式计算胶原蛋白含量 $[\text{mg}/\text{g}(\text{蛋白})]$ 。

### 1.2.6 病理切片染色方法

1.2.6.1 常规HE染色 石蜡切片脱蜡至水 $\rightarrow$ 自来水洗 $\rightarrow$ 苏木素染色 $10\text{ min}$  $\rightarrow$ 自来水洗 $\rightarrow 1\%$ 盐酸乙醇分化 $30\text{ s}$  $\rightarrow$ 自来水洗 $\rightarrow$ 氨水返蓝 $30\text{ s}$  $\rightarrow$ 自来水洗 $\rightarrow$ 伊红染色 $2\text{ min}$  $\rightarrow$ 自来水洗 $\rightarrow 80\%$ , $95\%$ 乙醇脱水各 $1\text{ min}$ ,无水乙醇I,II各 $5\text{ min}$  $\rightarrow$ 二甲苯透明,中性树胶封片。

1.2.6.2 肝纤维化Masson染色 (1)石蜡切片 $3\text{ }\mu\text{m}$ ,脱蜡至水洗;(2)用固定液Zenker液 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 温箱内 $0.5\text{ h}$ 或室温数小时;(3)依次用自来水至蒸馏水洗,用Weigelt铁苏木素染液 $5\text{ min}$ ;(4)充分水洗后用盐酸乙醇分化,水返蓝后镜检至胞核呈蓝色间质无色入蒸馏水洗;(5)用Masson丽春红酸性复红染色 $5\sim 10\text{ min}$ ;(6)以 $0.2\%$ 冰醋酸水溶液浸洗片刻,用 $1\%$ 磷钼酸水溶液分化处理 $3\sim 5\text{ min}$ ;(7)不经水洗,直接用亮绿液染色 $5\text{ min}$ ;(8)以 $0.2\%$ 冰醋酸水溶液浸洗片刻, $95\%$ 乙醇溶液及无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.2.7 胶原纤维增生的分级 参照Pilette等报道的胶原增生分级标准<sup>[2]</sup>,由同一名有经验的病理研究人员评定胶原增生等级。分级标准:0级为正常肝脏或无明显胶原增生;1级为胶原纤维增生,中央静脉和汇管区有少量纤维索放散蔓延,但无间隔形成;2级为胶原明显增生,中央静脉和汇管区结缔组织变厚,由此向四周延伸出纤维索,形成不完全纤维隔;3级为胶原大量增生,有个别菲薄的完全间隔形成(假小叶)或较厚的不完全间隔,即将形成假小叶;4级为完全间隔较厚、假小叶大量形成。

### 1.3 统计分析

实验数据采用SPSS(12.0)统计分析软件处理。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组数据采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 3组肝纤维化大鼠肝脏大体观

对照组大鼠可见肝脏颜色苍白,缩小,表面有针尖大小凹陷。Gln组肝脏颜色苍白,明显缩小,表面凹陷较对照组深而大。Arg组大鼠肝脏颜色苍白,略缩小,表面凹陷不明显,为3组中之最轻者。

### 2.2 各组大鼠肝组织胶原蛋白含量

Gln 组含量最高,对照组次之,Arg 组最低,3 组间差异均有显著性(均  $P < 0.05$ )(表 1)。

表 1 各组肝组织胶原蛋白含量[ mg/g( 蛋白) ]

| 组别  | 动物数 | 胶原蛋白含量[ mg/g( 蛋白), $\bar{x} \pm s$ ] |
|-----|-----|--------------------------------------|
| 对照  | 10  | 8.78 $\pm$ 0.78 <sup>1)</sup>        |
| Gln | 10  | 10.35 $\pm$ 0.68                     |
| Arg | 10  | 6.90 $\pm$ 0.64 <sup>1),2)</sup>     |

注:1)与 Gln 组比较, $P < 0.05$ ;2)与对照组比较, $P < 0.05$

### 2.3 常规 HE 染色结果

对照组大鼠肝脏有明显纤维间隔形成,假小叶形成明显;Gln 组大鼠肝脏假小叶较多,几乎充满了整个视野,纤维间隔粗大;Arg 组大鼠肝脏未形成假小叶,纤维间隔细小,主要集中在汇管区(图 2-4)。

### 2.4 肝纤维化 Masson 染色结果

Arg 组大鼠肝脏增生属 1 级,对照组肝脏增生属 3 级,Gln 组肝脏增生属 4 级(图 5-7)。

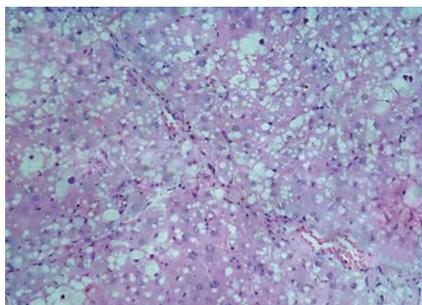


图 2 Arg 组大鼠肝脏组织形态学改变(HE  $\times 200$ ) 未形成假小叶,纤维间隔细小,主要集中在汇管区

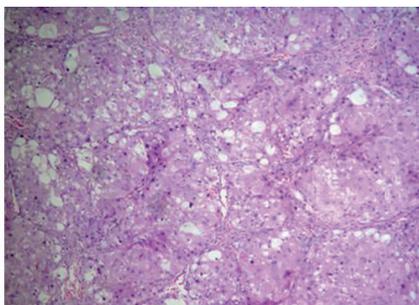


图 3 Gln 组大鼠肝脏组织形态学改变(HE  $\times 100$ ) 假小叶较多,几乎充满了整个视野,纤维间隔粗大

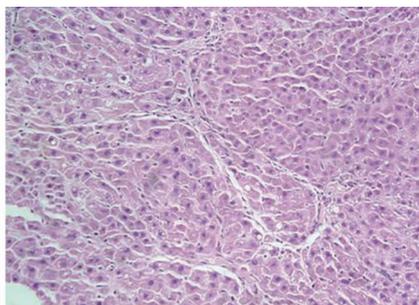


图 4 对照组大鼠肝脏组织形态学改变(HE  $\times 200$ ) 有明显纤维间隔形成,假小叶形成明显

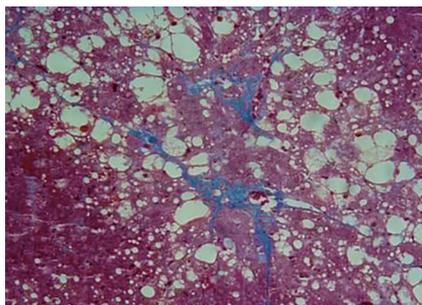


图 5 Arg 组胶原纤维的改变(masson 染色  $\times 200$ ) 胶原纤维增生,中央静脉和汇管区有少量纤维索放散蔓延,但无间隔形成

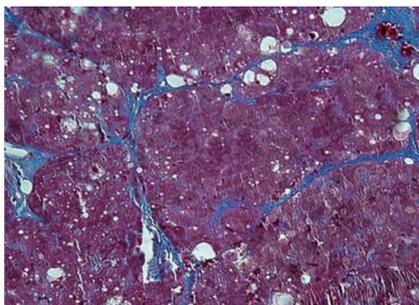


图 6 对照组胶原纤维的改变(masson 染色  $\times 200$ ) 胶原大量增生,有个别菲薄的完全间隔形成(假小叶)或较厚的不完全间隔,已形成假小叶

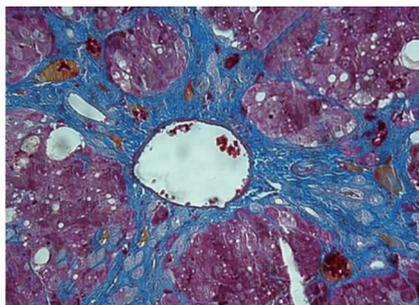


图 7 Gln 组肝脏纤维间隔及假小叶形成(masson 染色  $\times 200$ ) 可见完全间隔较厚及大量假小叶

## 3 讨论

Gln 是人体内含量最为丰富的游离氨基酸,是重要的氮载体和供体,在机体对氨的解毒作用中发挥重要功能<sup>[3-5]</sup>。同时,Gln 是体内快速分化细胞(如肠道上皮细胞、淋巴细胞)的主要能量来源,有助于维持肠道的形态和免疫系统功能。

Gln 还是嘌呤、嘧啶、蛋白质、核苷酸以及抗氧化剂谷胱甘肽(GSH)等物质的前体。肝脏是机体内具有多种代谢功能的重要器官。Gln 既可作为糖异生的底物又可作为“氨”的来源进入鸟氨酸循环,同时,肝组织内含有谷氨酰胺合成酶(GS)和谷氨酰胺酶(glutaminase),既能合成又能分解 Gln,在 Gln 的代谢中具有重要作用。

Arg 是一种半必需氨基酸,但在某些病理状态下,则为必需氨基酸。其代谢产物为多胺、核酸、一氧化氮(NO)和氧化氮等。前两者为细胞分裂所必需的物质,而后两者为血管扩张、肝细胞合成蛋白质和肝细胞线粒体电子传递的重要介质,具有促生长与维持机体平衡的作用。Arg 在代谢应激状态下属必需氨基酸,能对免疫系统产生影响,主要通过细胞免疫产生作用,而对机体体液免疫则无显著影响。Arg 在肠内吸收后的转化途径有三条,即生成 NO、参与某些蛋白质的生成及在精氨酸酶的作用下转化为鸟氨酸<sup>[6]</sup>。研究表明,NO 具有活跃而广泛的生物化学性质,可消除活性氧自由基,抑制中性粒细胞及血小板的黏附聚集,并拮抗血小板活化因子及前列腺素类的血管收缩作用,改善肝脏微循环。

肝纤维化是慢性肝病重要的病理特征,进一步发展则引起肝小叶的破坏和改建,假小叶和结节形成,进入肝硬化阶段甚至恶性转变。临床上,乙型肝炎患者肝脏由于受到病毒的慢性损伤,几乎 100% 合并有程度不同的肝纤维化,部分患者甚至发展为肝硬化、肝癌。肝癌患者 80% 以上合并有肝硬化。这些患者同时又存在不同程度的免疫抑制状态<sup>[7-8]</sup>。由于受到 IEDs 研究的影响,临床医生主张对这部分患者应用 IEDs 制剂。本研究发现,在肝纤维化造模过程中,无论从大体还是常规 HE 染色,Gln 组大鼠肝纤维化程度均明显重于对照组和 Arg 组,其中 Arg 组为最轻。利用定量检测胶原含量评估肝纤维化程度,无论是胶原蛋白含量,还是 Masson 染色胶原增生分

级,均显示以 Gln 组为最重,而 Arg 组为最轻,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示 Gln 可加重大鼠肝纤维化,而 Arg 明显减轻大鼠肝纤维化。

因此笔者认为,临床上肝病患者在应用添加 Gln 的免疫增强营养制剂时应采取慎重态度,而 Arg 的应用则对患者有益。至于其具体机制尚不明,有待研究。

#### 参考文献:

- [1] Sacks GS, Genton L, Kudsk KA. Controversy of immunonutrition for surgical critical-illness patients [J]. *Curr Opin Critical Care*, 2003, 9(4):300-305.
- [2] Pilette C, Rousselet MC, Bedossa P, *et al.* Histopathological evaluation of liver fibrosis: quantitative image analysis vs semi-quantitative scores [J]. *J Hepatol*, 1998, 28(3):439-446.
- [3] Hall JC, Heel K, McCauley R. Glutamine [J]. *Br J Surg*, 1996, 83(3):305-312.
- [4] Labow BI, Souba WW. Glutamine [J]. *World J Surg*, 2000, 24(12):1503-1513.
- [5] Duggan C, Gannon J, Walker WA. Protective nutrients and functional foods for the gastrointestinal tract [J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 75(5):789-808.
- [6] Preiser JC, Berre PJ, VanGossum A, *et al.* Metabolic effects of arginine addition to the enteral feeding of critically ill patients [J]. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 2001, 25(4):182-187.
- [7] Ladhams A, Schmidt C, Sing G, *et al.* Treatment of non-resectable hepatocellular carcinoma with autologous tumor-pulsed dendritic cells [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2002, 17(8):889-896.
- [8] Braga M, Gianotti L, Radaelli G, *et al.* Perioperative immunonutrition in patients undergoing cancer surgery: results of a randomized double-blind phase 3 trial [J]. *Arch Surg*, 1999, 134(4):428-433.

## 本刊 2009 年各期重点内容安排

本刊 2009 年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

|       |             |        |          |
|-------|-------------|--------|----------|
| 第 1 期 | 肝脏肿瘤        | 第 7 期  | 肝脏外科     |
| 第 2 期 | 胆道外科        | 第 8 期  | 胆道微创外科   |
| 第 3 期 | 胰腺外科        | 第 9 期  | 胰腺外科     |
| 第 4 期 | 胃肠道外科       | 第 10 期 | 胃肠道微创外科  |
| 第 5 期 | 乳腺、甲状腺外科    | 第 11 期 | 甲状腺、乳腺外科 |
| 第 6 期 | 血管外科及门静脉高压症 | 第 12 期 | 血管外科及其他  |