

IFN α -2a对CCl₄诱导肝纤维化的作用及影响因素

张伟, 易珍, 叶长根, 刘翠芸, 孙水林, 李金明, 席文娜

张伟, 易珍, 叶长根, 刘翠芸, 孙水林, 李金明, 席文娜, 南昌大学第二附属医院感染性疾病科 江西省南昌市 330006
张伟, 硕士研究生, 主要从事肝纤维化的治疗研究.
江西省科技厅基金资助项目, No. 2009BSB11115
作者贡献分布: 课题设计由孙水林主持; 研究过程由张伟、易珍、叶长根、刘翠芸、李金明及席文娜共同完成; 数据分析由张伟完成; 论文写作由张伟与孙水林共同完成.
通讯作者: 孙水林, 教授, 主任医师, 330006, 江西省南昌市, 南昌大学第二附属医院感染性疾病科. sunshuilin2280@126.com
收稿日期: 2011-09-13 修回日期: 2011-10-30
接受日期: 2011-11-02 在线出版日期: 2011-11-08

Interferon α -2a reduces carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats

Wei Zhang, Zhen Yi, Chang-Gen Ye, Cui-Yun Liu, Shui-Lin Sun, Jin-Ming Li, Wen-Na Xi

Wei Zhang, Zhen Yi, Chang-Gen Ye, Cui-Yun Liu, Shui-Lin Sun, Jin-Ming Li, Wen-Na Xi, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China
Supported by: the Foundation of Jiangxi Department of Science and Technology, No. 2009BSB11115
Correspondence to: Shui-Lin Sun, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China. sunshuilin2280@126.com
Received: 2011-09-13 Revised: 2011-10-30
Accepted: 2011-11-02 Published online: 2011-11-08

Abstract

AIM: To observe the effect of IFN α -2a on liver fibrosis induced with carbon tetrachloride (CCl₄) in rats.

METHODS: Fifty female Sprague-Dawley rats were equally and randomly into five groups: groups A, B, C, D and E. Liver fibrosis was induced in rats of groups B, C and D with CCl₄. Group A was treated with normal saline, while groups C, D and E were treated with 60 000, 120 000 and 60 000 U/kg IFN α -2a, respectively. At week 8, blood and liver tissue samples were collected to measure liver function (ALT, AST, TBIL, TP), evaluate liver fibrosis (HA, LN, PCIII) and pathological changes (HE staining, masson staining and reticular fiber staining).

RESULTS: Hepatic fibrosis was successfully in-

duced by CCl₄ injection, and significant fibrosis around the portal area and formation of spiky fibers and fibrous septa were observed. Serum levels of ALT, AST, TBI, HA and LN levels were significantly higher in groups B, C and D than in group A ($F = 14.8, 4.4, 7.8, 51.3, 68.9$; all $P < 0.05$). Serum levels of ALT, AST and TBI were significantly lower in groups C and D than in group B, and in group D than in group C.

CONCLUSION: IFN α -2a reduces CCl₄-induced liver fibrosis in a dose-dependent manner in rats.

Key Words: Liver fibrosis; Interferon α -2a; extracellular matrix

Zhang W, Yi Z, Ye CG, Liu CY, Sun SL, Li JM, Xi WN. Interferon α -2a reduces carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(31): 3207-3211

摘要

目的: 观察干扰素 α -2a(interferon alfa-2a, IFN α -2a)对CCl₄诱导肝纤维化的作用及影响因素.

方法: 建立CCl₄诱导大鼠肝纤维化模型, SD雌性大鼠50只, 分成5组, 每组10只, 即生理盐水对照组(A组)、纤维化模型组(B组)、 6×10^4 U/kg IFN α -2a干预组(C组)、 12×10^4 U/kg IFN α -2a干预组(D组)及 6×10^4 U/kg IFN α -2a对照组(E组). 造模8 wk时采集血标本及肝组织标本, 分别进行肝功能指标ALT、AST、TBIL、TP, 肝纤维化指标HA、LN、PCIII检测, 及组织病理形态学观察包括HE染色、Masson染色和网状纤维染色.

结果: CCl₄腹腔注射成功诱导大鼠肝纤维化模型, 表现为汇管区周围纤维化明显, 有芒状纤维和纤维间隔形成. 血清学检测: B、C、D组ALT、AST、TBI、HA、LN均明显高于A组(F 值分别为14.8, 4.4, 7.8, 51.3, 68.9; 均 $P < 0.05$); C、D组ALT、AST、TBI均明显低于B组; D组的上述指标又明显低于C组. 组织病理: HE染色、Masson染色和网状纤维染色

■背景资料

肝纤维化是一个可逆性的病变, 临床上对肝纤维化缺乏较好的治疗手段, 如能寻求一种有效的抗纤维化方法或药物, 及时阻断、逆转肝纤维化将为临床上各种肝纤维化患者带来希望的曙光.

■同行评议者

范学工, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

■研究前沿

IFN α 是治疗病毒性肝炎的主要药物,研究发现其抗病毒作用的同时有抗肝纤维化作用,大多数学者认为其抗肝纤维化作用是通过抗病毒作用实现的。

均显示, C、D组肝组织炎症及肝纤维化程度较B组显著减轻, D组较C组肝纤维化程度更轻, A、E组肝组织未见炎症及纤维化。

结论: IFN α -2a能够阻断CCl $_4$ 诱导肝纤维化, 其作用效果随IFN α -2a剂量增加而增强。

关键词: 肝纤维化; 干扰素 α -2a; 细胞外基质

张伟, 易珍, 叶长根, 刘翠芸, 孙水林, 李金明, 席文娜. IFN α -2a对CCl $_4$ 诱导肝纤维化的作用及影响因素. 世界华人消化杂志 2011; 19(31): 3207-3211

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/3207.asp>

0 引言

肝纤维化(hepatic fibrosis)是一切慢性肝病的共同病理基础, 其实质是肝脏内纤维结缔组织增生, 肝内细胞外基质(extra cellular matrix, ECM)合成大于降解, 导致大量ECM过度沉积于肝脏^[1,2]. 有25%-40%的肝纤维化患者最终发展为肝硬化甚至肝癌, 严重危害人们健康. 肝纤维化是一个可逆性的病变^[3], 临床上对肝纤维化缺乏较好的治疗手段, 如能寻求一种有效的抗纤维化方法或药物, 及时阻断、逆转肝纤维化将为临床上各种病因所致肝纤维化患者带来希望的曙光. IFN α 是治疗病毒性肝炎的主要药物^[4,5], 研究发现其抗病毒作用的同时有抗肝纤维化作用^[6], 大多数学者认为其抗肝纤维化作用是通过抗病毒作用得以实现的^[7,8], IFN α 对非嗜肝细胞病毒感染性肝纤维化是否也有作用? 其影响因素如何? 本研究建立以CCl $_4$ 诱导肝纤维化的动物模型, 用干扰素 α -2a(interferon alfa-2a, IFN α -2a)进行干预, 以便了解其对非嗜肝细胞病毒感染性肝纤维化的阻断效果、影响因素。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂清洁级健康SD大鼠50只, 体质量200 g \pm 20 g, 由南昌大学医学院动物科学部提供; 注射用人重组IFN α -2a(3×10^6 U/支, 批号6920559000259)购自长春长生基因药业股份有限公司; 肝纤四项放射免疫试剂盒购自北京生方生物技术研究。

1.2 方法

1.2.1 建立大鼠肝纤维化模型: 采用随机对照原则将SD大鼠分为5组, 每组10只. A组: 予2 mL/kg生理盐水肌肉注射, 隔日1次; B组: 予50% CCl $_4$ 2 mL/kg(用花生油稀释), 腹腔注射, 2次/wk; C组: 建立CCl $_4$ 诱导肝纤维化模型的同时予 6×10^4 U/kg

IFN α -2a肌肉注射, 隔日1次; D组: 建立CCl $_4$ 诱导肝纤维化模型的同时予 12×10^4 U/kg IFN α -2a肌肉注射, 隔日1次; E组: IFN α -2a 6×10^4 U/kg肌肉注射, 隔日1次; 共8 wk。

1.2.2 标本收集: 造模8 wk时, 处死SD大鼠前, 乙醚吸入麻醉大鼠, 采眼球内眦静脉血5 mL, 静置离心后取上层血清送肝功能及肝纤维化指标检测. 固定大鼠, 断颈、开腹, 取出肝组织, 用100 g/L福尔马林固定, 然后进行病理形态学HE染色、Masson染色和网状纤维染色。

1.2.3 血生化学检测: 全自动生化分析仪检测肝功能指标ALT、AST、TBIL、TP; 放射免疫法检测肝纤维化指标HA、LN、PCIII。

1.2.4 病理形态学检测: 分别进行HE、Masson、网状纤维染色, 并在光学显微镜下观察、拍照。

统计学处理 实验数据用SPSS17.0统计软件处理, 对各个实验组数据进行方差分析(ANOVA分析)及多重比较(最小显著差法, LSD), $P<0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 血清学检测 肝功能结果: ALT、AST、TBIL: B组显著高于A组, C、D组显著低于B组, D组显著低于C组($P<0.05$), 对照组A、E组之间无差异; 各组之间TP无差异(表1). 表明IFN α -2a能有效降低肝功能ALT、AST水平, 且此作用随IFN α -2a剂量的增加而增强. 肝纤维化指标结果: HA: B组显著高于A组, B组低于C组($P<0.05$), D组与对照A、E组之间无显著差异; LN各实验组之间均有显著性差异($P<0.01$, 表2)。

2.2 病理形态学改变 对照组(A、E组): HE染色可见汇管区仅少量炎症细胞浸润; Masson染色和网状纤维染色汇管区纤维化非常轻. 纤维化模型组(B组): HE染色可见胆管再生, 界面炎症较重; Masson染色和网状纤维染色可见汇管区周围纤维化明显, 有芒状纤维和纤维间隔形成. 6×10^4 U/kg IFN α -2a干预C组: HE染色可见小胆管增生, 界面炎症比较轻微; Masson染色和网状纤维染色汇管区周围可见纤维化. 12×10^4 U/kg IFN α -2a干预D组: HE染色可见汇管区稍扩大, 界面炎症较轻; Masson染色和网状纤维染色可见汇管区纤维化较轻(图1-3). 炎症活动度分级及纤维化程度分期(表3)。

3 讨论

我国是病毒性肝炎的高发区, 仅慢性HBV感染

表 1 各实验组肝功能指标结果分析

分组	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	TBIL(μ mol/L)	TP(g/L)
A组	53.8 \pm 7.2	230.2 \pm 66.2	4.5 \pm 0.8	73.3 \pm 7.4
B组	143.7 \pm 46.3 ^a	310.3 \pm 34.2 ^a	8.8 \pm 1.7 ^a	65.4 \pm 5.7
C组	84.0 \pm 10.2 ^{ac}	286.8 \pm 16.0 ^{ac}	6.5 \pm 2.2 ^{ac}	76.8 \pm 5.7
D组	34.9 \pm 9.8 ^{ce}	269.0 \pm 26.9 ^{ace}	6.5 \pm 1.0 ^{ace}	75.2 \pm 5.3
E组	54.4 \pm 5.8 ^{ce}	216.0 \pm 13.4 ^{ceg}	4.7 \pm 0.9 ^{ceg}	73.8 \pm 6.8
F值	14.8	4.4	7.8	2.6
P值	<0.01	<0.01	<0.01	>0.05

^aP<0.05 vs A组; ^cP<0.05 vs B组; ^aP<0.05 vs C组; ^eP<0.05 vs D组.

表 2 各实验组肝纤维化指标结果分析

分组	HA(ng/mL)	LN(ng/mL)	PCIII(ng/mL)
A组	65.7 \pm 4.0	43.8 \pm 9.5	—
B组	171.4 \pm 34.6 ^a	179.2 \pm 38.8 ^a	31.4
C组	179.2 \pm 16.1 ^a	256.2 \pm 23.7 ^{ac}	31.0
D组	76.9 \pm 9.1 ^{ce}	124.4 \pm 21.7 ^{ace}	3.2
E组	72.7 \pm 7.9 ^{ce}	76.0 \pm 4.9 ^{ceg}	—
F值	51.3	68.9	—
P值	<0.01	<0.01	—

^aP<0.05 vs A组; ^cP<0.05 vs B组; ^aP<0.05 vs C组; ^eP<0.05 vs D组.

者就高达9 300万, 其中慢性乙型肝炎患者有2 000万, 相当一部分患者伴有肝纤维化. 如未接受及时治疗, 约25%-40%患者可发展为肝硬化, 病情多反复, 预后很差. 肝纤维化是一个可逆性的病变, 临床上对肝纤维化缺乏较好的治疗手段, 如能寻求一种有效的治疗方法或药物及时阻断、逆转肝纤维化, 将为临床上各种肝纤维化患者带来希望. IFN α 具有较强的免疫调节、抗病毒、抗肿瘤等作用, 他是目前的治疗病毒性肝炎的主要药物, 研究发现其抗病毒的同时有抗肝纤维化的作用. 大多数学者认为IFN α 抗肝纤维化作用是通过抗病毒作用而得以实现的. 在前期的实验研究中发现IFN α 对CCl $_4$ 诱导肝纤维化也有阻断作用^[10], Kovalszky等认为IFN α 抗肝纤维化作用不依赖其抗病毒作用^[11]. Watanabe等报道IFN- α 可提高MMP活性, 促进EMC降解^[12]. Ninomiya等认为IFN- α 可以直接影响MMP及TIMP的比率, 从而促进胶原的降解, 进而改善肝纤维化^[13]. IFN α 对非嗜肝细胞病毒感染性肝纤维化是否亦有作用及影响因素如何? 本实验进行了一些探讨.

实验结果显示, IFN α -2a干预组(C、D组)较

表 3 肝组织炎症活动度分级及纤维化程度分期

分组	炎症活动度分级	纤维化程度分期
A组	G ₀ 级	S ₀ 期
B组	G ₂ 级	S ₂ 期
C组	G ₁ 级	S ₁₋₂ 期
D组	G ₀₋₁ 级	S ₀₋₁ 期
E组	G ₀ 级	S ₀ 期

炎症活动度分级及纤维化程度分期标准参照《肝纤维化诊断及诊疗评估共识》^[9].

纤维化模型组(B组)肝功能ALT、AST、TBIL均有显著性差异(P <0.01), 对照组(A、E组)的ALT、AST、TBIL指标较IFN α -2a干预组(C、D组)又更低; 以上结果表明IFN α -2a能有效降低大鼠肝功能ALT、AST水平, 提示其能减轻肝脏的炎症.

病理形态学HE染色亦较直观的反映出IFN α -2a能减轻肝脏的炎症: 对照组(A、E组)汇管区仅少量炎症细胞浸润; 纤维化模型组(B组)胆管再生, 界面炎症较重; IFN α -2a干预组C组小胆管增生, 界面炎症比较轻微; D组汇管区稍扩大, 界面炎症较轻.

肝纤维化指标HA: 肝纤维化模型组(B组)及IFN α -2a干预C组显著升高, 均高于对照组A组, 但C组高于B组, D组显著低于B组, (P <0.05), A、D、E组之间无显著差异(P >0.05); LN: 各实验组之间均有显著差异(P <0.01), B、C、D组较A组均显著升高, B组低于C组, D组低于B组(P <0.05); PCIII: B组高于D组, A、E组未测出, 表明A、E组PCIII含量很低, 提示对照组无明显肝纤维化. 以上实验结果均与肝纤维化的形成过程相吻合, 在肝纤维化形成的早期阶段主要以HA、LN分泌升高为主, 肝纤维化形成的后期阶段以PCIII、

■相关报道

Watanabe等报道IFN- α 可提高MMP活性, 促进EMC降解. Ninomiya等认为IFN- α 可以直接影响MMP及TIMP的比率, 从而促进胶原的降解, 改善肝纤维化.

■创新盘点

本研究建立以CCl₄诱导肝纤维化的动物模型,用IFN α -2a进行干预,以便了解其对非嗜肝细胞病毒感染性肝纤维化的阻断效果及其影响因素。

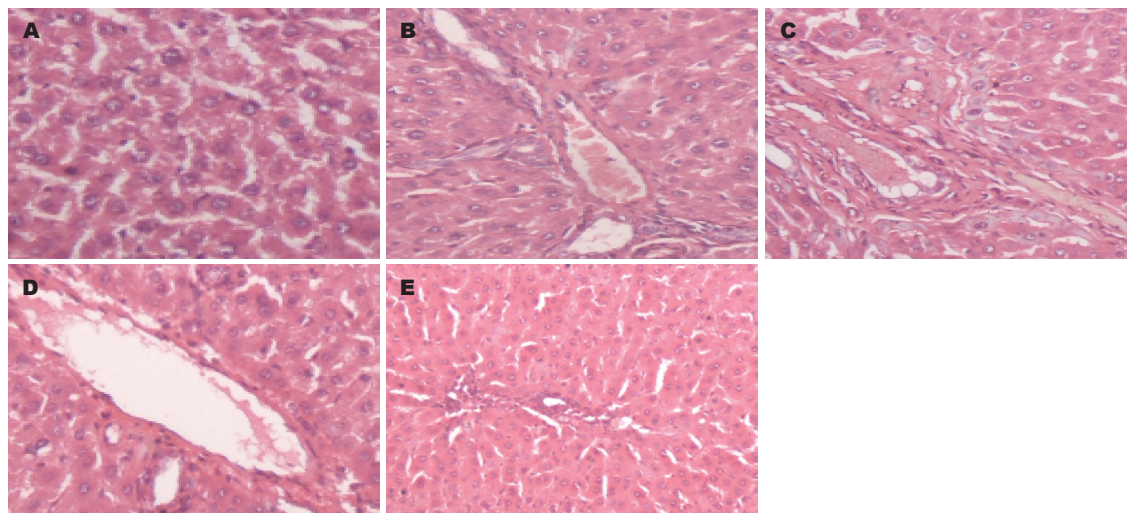


图 1 肝组织HE染色图片($\times 100$). A, E: A, E组, 汇管区仅少量炎症细胞浸润; B: B组, 胆管再生, 界面炎症较重; C: C组, 小胆管增生, 界面炎症比较轻微; D: D组, 汇管区稍扩大, 界面炎症较轻。

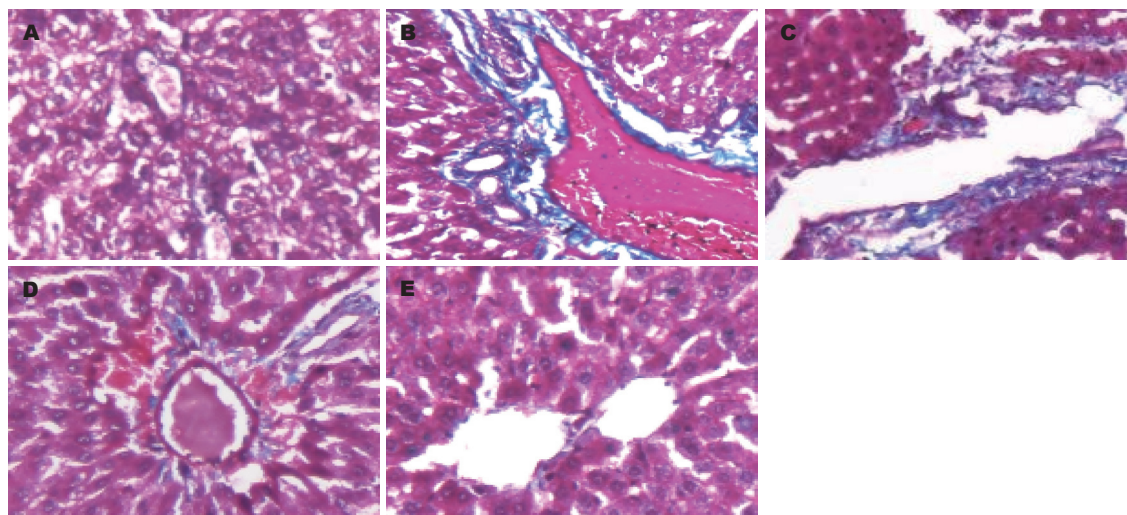


图 2 肝组织Masson染色图片($\times 200$). A, E: A, E组, 汇管区纤维化非常轻; B: B组, 汇管区周围纤维化明显, 有芒状纤维形成; C: C组, 汇管区周围可见纤维化; D: D组, 汇管区纤维化较轻。

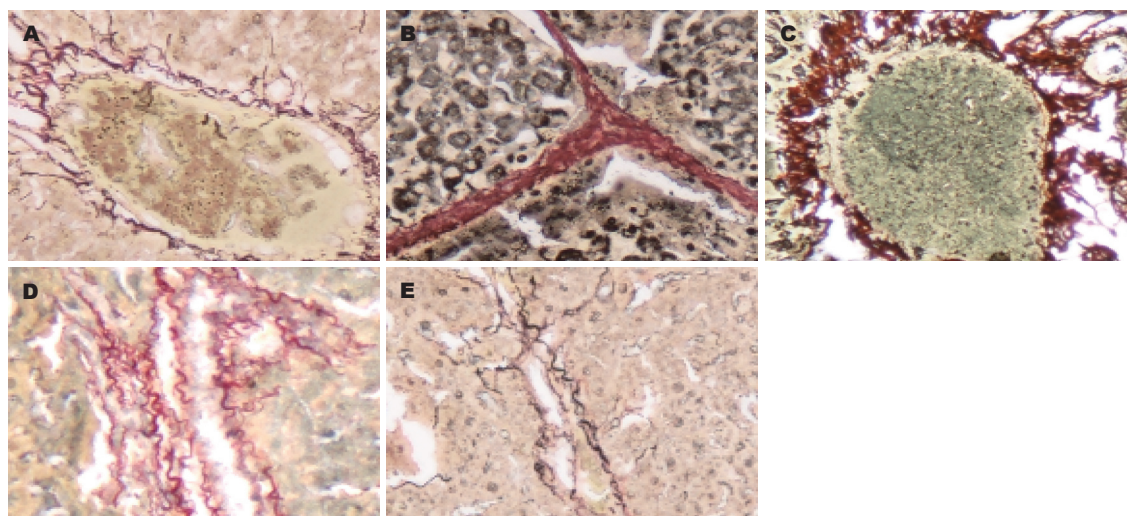


图 3 肝组织网状纤维染色图片($\times 200$). A, E: A, E组, 汇管区纤维化非常轻; B: B组, 汇管区周围纤维化明显, 有纤维间隔形成; C: C组, 汇管区周围可见纤维化; D: D组, 汇管区纤维化较轻。

■应用要点

IFN α 是治疗病毒性肝炎的主要药物,临床发现其抗病毒的同时有改善肝纤维化的作用,为临床上各种病因所致肝纤维化的治疗提供新思路。

IVC升高为主^[14]; B组的HA、LN检测结果低于C组可能因B组已进入肝纤维化阶段, 肝脏炎症趋于稳定, HA、LN分泌相对减少, 而C组仍处于炎症活动阶段, HA、LN分泌仍旺盛。故C组的HA、LN较B组更高, 提示IFN α -2a有延缓或阻断CCl₄诱导大鼠肝纤维化的作用。D组较C组明显降低, 进一步证实IFN α -2a能有效改善肝纤维化, 且作用效果与IFN α -2a的剂量相关。

IFN α -2a能有效改善肝纤维化的作用亦可从组织病理得到证实: 肝纤维化模型组(B组)Masson染色和网状纤维染色可见汇管区周围纤维化明显, 有芒状纤维和纤维间隔形成, 纤维化程度分期处于S₂期; IFN α -2a干预C组Masson染色和网状纤维染色显示其纤维化程度较B组显著减轻, 纤维化程度分期处于S₁₋₂期。以上结果表明IFN α -2a能够有效阻断CCl₄诱导性肝纤维化, 与本研究的前期研究结果相似^[10]。

进一步分析还发现IFN α -2a干预组(C、D组)之间, D组较C组肝功能及肝纤维化指标检测均明显降低($P < 0.05$); D组Masson染色和网状纤维染色显示D组纤维化程度较C组有明显的改善。此结果提示, IFN α -2a阻断CCl₄诱导的肝纤维化的效果与IFN α -2a的剂量呈正相关, 12×10^4 U/kg IFN α -2a干预剂量对CCl₄诱导的肝纤维化的阻断效果较 6×10^4 U/kg IFN α -2a干预剂量更佳。对照组(A、E组)肝功能、肝纤指标及组织病理均显示两组之间无显著差异, 表明IFN α -2a作为单因素干预不影响本研究结果。

总之, IFN α -2a能有效阻断CCl₄诱导的肝纤维化, 作用随IFN α -2a的剂量增加而增强。

4 参考文献

- 1 Tsukada S, Parsons CJ, Rippe RA. Mechanisms of liver fibrosis. *Clin Chim Acta* 2006; 364: 33-60
- 2 Manning DS, Afdhal NH. Diagnosis and quantitation of fibrosis. *Gastroenterology* 2008; 134: 1670-1681
- 3 Benyon RC, Iredale JP. Is liver fibrosis reversible?

- 4 Okazaki I, Watanabe T, Inagaki Y. [Recent advance in understanding mechanisms of fibrogenesis and fibrolysis in hepatic fibrosis]. *Nihon Shokakibyo Gakkaï Zasshi* 2002; 99: 353-364
- 5 Adinolfi LE, Utili R, Tonziello A, Ruggiero G. Effects of alpha interferon induction plus ribavirin with or without amantadine in the treatment of interferon non-responsive chronic hepatitis C: a randomised trial. *Gut* 2003; 52: 701-705
- 6 Poynard T, McHutchison J, Manns M, Trepo C, Lindsay K, Goodman Z, Ling MH, Albrecht J. Impact of pegylated interferon alfa-2b and ribavirin on liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2002; 122: 1303-1313
- 7 Inagaki Y, Nemoto T, Kushida M, Sheng Y, Higashi K, Ikeda K, Kawada N, Shirasaki F, Takehara K, Sugiyama K, Fujii M, Yamauchi H, Nakao A, de Crombrughe B, Watanabe T, Okazaki I. Interferon alfa down-regulates collagen gene transcription and suppresses experimental hepatic fibrosis in mice. *Hepatology* 2003; 38: 890-899
- 8 Fort J, Pilette C, Veal N, Oberti F, Gallois Y, Douay O, Rosenbaum J, Calès P. Effects of long-term administration of interferon alpha in two models of liver fibrosis in rats. *J Hepatol* 1998; 29: 263-270
- 9 Gabrielli GB, Capra F, Casaril M, Corrocher R, Colombari R, De Sandre G. Serum laminin P1 in chronic viral hepatitis: correlations with liver histological activity and diagnostic value. *Clin Chim Acta* 1996; 252: 171-180
- 10 席文娜, 孙水林, 李方春, 罗杰, 肖影群, 章萍, 张伟. α -2a干扰素对大鼠肝组织bcl-2基因表达的影响及意义. *世界华人消化杂志* 2009; 17: 3237-3240
- 11 Kovalszky I, Nagy P, Szende B, Lapis K, Szalay F, Jeney A, Schaff Z. Experimental and human liver fibrogenesis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 1998; 228: 51-55
- 12 Watanabe T, Niioka M, Ishikawa A, Hozawa S, Arai M, Maruyama K, Okada A, Okazaki I. Dynamic change of cells expressing MMP-2 mRNA and MT1-MMP mRNA in the recovery from liver fibrosis in the rat. *J Hepatol* 2001; 35: 465-473
- 13 Ninomiya T, Yoon S, Nagano H, Kumon Y, Seo Y, Kasuga M, Yano Y, Nakaji M, Hayashi Y. Significance of serum matrix metalloproteinases and their inhibitors on the antifibrogenetic effect of interferon-alfa in chronic hepatitis C patients. *Intervirolgy* 2001; 44: 227-231
- 14 王辉, 惠小阳, 李闻捷, 许育, 范华杰, 杜大海. 血清PCIII水平与肝纤维化活跃程度的相关性. *现代检验医学杂志* 2006; 21: 68-70

■同行评价

本文采用动物实验, 观察了IFN α -2a的抗肝纤维化作用, 获得了阳性结果, 有潜在的临床应用价值。

编辑 曹丽鸥 电编 闫晋利