

硒对实验性肝损伤保护作用的研究

张复春* 舒昌杰 韩 珏** 史尔丽 任瑛云** 贺美丽

(第一附属医院传染科 西安 710061)

摘要 采用综合法建立慢性肝损伤动物模型,分组观察硒对实验性肝损伤的影响。结果表明:①补硒组谷丙转氨酶降低,血清白蛋白回升,肝组织病理改变减轻;②补硒组动物肝组织硒含量及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性显著增高($P < 0.01$);③超微结构显示补硒组比对照组也有明显改善。表明硒具有保护肝损伤和促进肝细胞再生的作用。

关键词 硒;实验性肝损伤;大鼠;GSH-Px

硒是人体必需微量元素;硒缺乏与克山病及恶性肿瘤等疾病发生有密切的关系。近年来,研究发现肝病、肝癌患者均呈现低硒现象,且硒缺乏程度与肝脏损害、病程进展及癌变有关^[1,2]。预防性补硒能降低癌前病变的发生率及鸭乙型肝炎的患病率^[3]。但是有关补硒治疗慢性肝损伤的研究尚少。作者通过动物实验观察补硒对慢性肝损伤的影响,为临床应用硒等防治肝病提供实验依据。

材料和方法

1 动物和主要试剂 健康SD纯种大白鼠,雄性,体重125~150g,本校实验动物中心提供。亚硒酸钠系北京化工厂出品,其它试剂均为分析纯。

2 慢性肝损伤动物模型的制备^[4] 取

SD大鼠,以常规饲料喂养,30%乙醇为饮料,前两周饲料中加入20%猪油及0.5%胆固醇。实验第1天按5ml/kg皮下注射四氯化碳,以后每隔3d按2.5ml/kg皮下注射40%四氯化碳花生油溶液,于第8周末停止注射,第9周末活杀取材检查。

3 实验分组 将实验大鼠随机分为4组,正常对照组以常规饲料喂养,饮自来水,于实验同期注射等量生理盐水。加硒预防组、加硒治疗组及慢性肝损伤对照组(简称慢肝对照组)为实验组,依上述方法制备慢性肝损伤动物模型。加硒预防组于实验开始前两周开始喂养加硒饲料;加硒治疗组从实验开始两周后喂养加硒饲料;慢肝对照组以常规饲料喂养。饲料配方见表1。

表1 各组鼠饲料组成及硒含量

组别	麦粉%	玉米粉%	麸皮%	豆粉%	鱼粉%	盐%	奶粉%	亚硒酸钠 mg/kg	硒含量 mg/kg
加硒饲料	25	20	20	20	12	1	2	1	0.5
常规饲料	25	20	20	20	12	1	2	0	0.185

4 检查方法

4.1 生化测定 硒测定参照卜圻方

法^[5];GSH-Px测定参照张嘉麟方法^[6];谷丙转氨酶(ALT)检查采用改良赖氏法;血清蛋白测定用双缩脲法;参照八木国夫法测定脂质过氧化物(LPO)^[7]。

* 广州市传染病医院 510060

** 地方性骨病研究所

4.2 肝组织病理检查 低温下活体取大鼠肝右叶,4%多聚甲醛固定,冰冻切片,H-E染色,光镜下观察以下4项指标:①肝细胞空泡变性;②肝细胞溶解坏死;③脂肪变性;④肝小叶结构破坏。以上观察项目按半定量分级,病理改变程度用“+”号的多少表示。

4.3 电镜检查 低温下活体取小块肝组织 $0.5\text{mm}^3\sim 1.0\text{mm}^3$,用2.5%戊二醛和3%多聚甲醛的磷酸盐缓冲液固定2h以上,经1%锇酸固定后,丙酮系列脱水,Epon 812树脂包埋,LKB超薄切片切片机切片,用醋酸铀和枸橼酸铅双重染色后透射镜观察。

结 果

1 硒对慢性肝损伤动物体重及肝重的影响 实验开始时及活杀前空腹称大鼠体重,并在活杀后取肝称湿重。结果表明,慢肝对照组动物体重明显减轻,肝重增加;加硒预防组和加硒治疗组动物体重回升,肝重下降,尤以加硒预防组变化明显(见表2)。

表2 各组动物体重及肝重($\bar{x}\pm s$)

组 别	体重(g)		实验后肝重 (g/100g BW)
	实验前	实验后	
正常对照组	162±21.37	265±38.73**	3.81±0.46**
加硒预防组	160±19.00	238±27.00**	4.00±0.33*
加硒治疗组	159±21.96	214±40.58	4.29±0.77
慢肝对照组	159±20.27	195±34.89	5.70±0.49

各组与慢肝对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (下同) $n = 10$ (下同)

2 硒对慢性肝损伤动物肝功能的影响

结果显示慢性对照组 ALT 较正常对照组显著升高,血清白蛋白明显降低。加硒预防组和加硒治疗组与慢肝对照组比较 ALT 下降,白蛋白增加,以加硒预防组最为明显(见表3)。

3 硒对慢性肝损伤动物血硒水平及血清 LPO 的影响 表4显示慢肝对照组血硒水平较正常对照组降低,无显著性差异($P > 0.05$)。加硒预防组和加硒治疗组血硒水平增高,其中加硒预防组与慢肝对照组比

表3 各组动物血清谷丙转氨酶及白蛋白含量($\bar{x}\pm s$)

组 别	ALT(U/L)	白蛋白(g/L)
正常对照组	31.45±9.17**	49.01±4.09**
加硒预防组	41.76±10.99**	42.49±3.21**
加硒治疗组	55.00±15.21*	39.41±6.40*
慢肝对照组	73.00±16.81	33.50±4.83

较有显著性差异($P < 0.05$)。慢肝对照组血清 LPO 显著增高,补硒后 LPO 显著降低($P < 0.01$),可基本正常(见表4)。

表4 各组动物血硒水平及血清 LPO($\bar{x}\pm s$)

组 别	血硒(mg/L)	LPO($\mu\text{mol MDA/L}$)
正常对照组	0.299±0.105	2.425±0.326**
加硒预防组	0.355±0.159*	2.450±0.121**
加硒治疗组	0.331±0.040	2.629±0.461**
慢肝对照组	0.229±0.090	3.430±0.903

4 硒对慢性肝损伤动物肝组织硒含量及 GSH-Px 活性的影响 表5显示慢肝对照组与正常对照组比较,肝组织硒含量降低,GSH-Px 活性显著下降($P < 0.01$);加硒预防组和加硒治疗组肝组织硒含量回升,GSH-Px 活性也明显增强(见表5)。

表5 各组动物肝组织硒含量及 GSH-Px 活性($\bar{x}\pm s$)

组 别	肝硒含量 ($\mu\text{g/g}$)	GSH-Px (U/min·mg)
正常对照组	0.533±0.079**	123.44±11.43**
加硒预防组	0.550±0.201*	119.52±12.63**
加硒治疗组	0.459±0.203	115.90±11.36**
慢肝对照组	0.389±0.105	89.07±11.35

5 硒对慢性肝损伤动物肝组织病理改变的影响 加硒预防组和加硒治疗组肝脏病变程度比慢肝对照组均有减轻,加硒预防组优于加硒治疗组(见表6)。

6 硒对慢性肝损伤动物肝细胞超微结构变化的影响(见图1、2、3) 电镜下观察各组肝细胞器,显示慢肝对照组有多种异常,如细胞核异染色质凝聚成块,核膜不平整,核周间隙扩大;线粒体增多,内膜不清,脊膜消失,基质电子密度降低;粗面内质网数量减少,有

些内质网扩张呈空泡状,膜上核蛋白

表6 各组动物肝组织病变

组别	肝细胞空泡变性	肝细胞溶解坏死	脂肪性变	肝小叶结构破坏
正常对照组	0	0	0	0
加硒预防组	+	+	++	+
加硒治疗组	++	++	+++	++
慢肝对照组	+++	+++	+++	+++

体颗粒不匀,胞浆内可见脂滴出现(见图3)。加硒预防组和加硒治疗组细胞器病变较慢肝对照组明显减轻,以线粒体和粗面内质网为显著(见图1、2)。

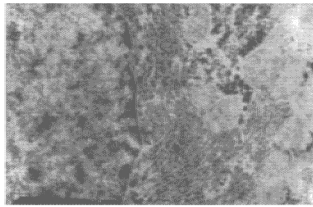


图1 加硒预防组肝细胞 ×10000

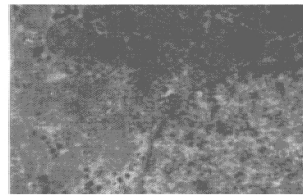


图2 加硒治疗组肝细胞 ×8000

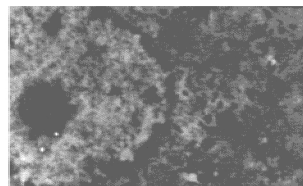


图3 慢肝对照组肝细胞 ×8000

讨论

本研究用综合法建立的慢性肝损伤动物

模型,其肝功能损害和肝组织病理改变符合慢性肝炎的表现,说明本实验动物模型是成功的,研究结果显示,补硒能明显改善慢性肝损伤动物的肝脏功能,阻止肝坏死,使大鼠体重回升,肝重下降,病理改变减轻,说明亚硒酸钠对四氯化碳等造成的肝损伤能起到保护作用,为临床应用硒制剂防治慢性肝病提供了实验依据。

近年来,自由基损害及脂质过氧化反应在肝损伤中的作用日趋受到重视^[3]。四氯化碳和乙醇引起的肝损伤主要涉及自由基作用和脂质过氧化反应。GSH-Px是体内重要的抗氧化酶之一,具有清除自由基和脂质过氧化物,保护细胞膜和生物大分子结构的生物学功能,硒是GSH-Px的必需成分。研究资料表明,慢性活动性肝炎、肝硬化患者血硒降低。本文结果显示,慢性肝损伤动物肝组织硒含量降低,血清LPO含量增加,在低硒出现同时发现GSH-Px活性也显著下降,使机体清除自由基及抗氧化能力降低,进一步加重肝损伤。慢性肝损伤动物经补硒后肝组织内低硒状态得以改善,GSH-Px活性显著增强,通过GSH-Px发挥抗氧化功能,减轻肝细胞损害,使肝功能改善,与文献报道一致^[30]。

本研究结果显示,加硒预防组和加硒治疗组均能使动物肝损伤减轻。在加硒预防组肝功能基本正常,肝组织无明显病理改变,疗效优于加硒治疗组。造成两组疗效差异的原因可能是:①加硒预防组在肝损伤之前,硒已得到补充,动物体内硒及GSH-Px活性处于较高水平,当给予肝毒剂时,动物体内GSH-Px可有效的发挥其清除自由基和阻止脂质过氧化功能,使肝损伤大大减轻。而加硒治疗组是在大鼠已造成损伤后才得到硒补充,此时,肝细胞损伤已趋严重,单纯补硒不易使肝损伤恢复到正常,尚需配合其它治疗,②与补硒时间长短有关。

电镜观察肝细胞超微结构的变化,显示

加硒预防组和加硒治疗组大鼠肝细胞核及细胞器的损伤程度,比慢肝对照组明显减轻,尤其是线粒体和粗面内质网的变化最为明显。另有文献报道,硒能促进正常胎肝细胞DNA、RNA和蛋白质的合成^[10]。本研究也显示补硒后慢性肝损伤动物的血清白蛋白含量增加,进一步证实了上述观点。这些资料说明,补硒有利于肝细胞蛋白质的合成和再生。

目前,对慢性肝病尚缺乏理想的治疗方法。根据慢性肝病发病的自由基学说,给予患者适当补充抗氧化剂是必要的。从本研究结果看,临床补硒用于慢性肝病的防治有一定价值和发展前途,至于临床如何开展治疗及效果如何有待进一步研究。

参考文献

- 1 Casaril M, Stanzial A M, Gabrielli G B, et al. Serum selenium in liver cirrhosis: correlation with markers of fibrosis. *Clin Chim Acta*, 1989; 182: 221
- 2 杨冬华,刘为纹,袁爱力.肝病、肝癌血硒水平及谷胱甘肽过氧化物酶活力改变及其意义. *中华内科杂志*, 1988; 27(10): 612
- 3 李文广. 硒预防病毒性肝炎的实验研究. *微量元素与健康研究*, 1992; (4): 6
- 4 邱培伦,袁素芬,舒昌杰,等. 大黄廕虫丸对实验性肝损伤的保护作用. *中西医结合杂志*, 1988; 8(11): 668
- 5 卜 圻,李广元. 环境地球化学与健康. 第一版,北京:地震出版社,1987: 321~323
- 6 张嘉麟,方允中. 血液中谷胱甘肽过氧化物酶活力微量测定. *中华医学检验学杂志*, 1985; 8(4): 199
- 7 八木国夫. 过酸化脂质的测定. *临床检查*, 1979; 23: 115
- 8 Korpela H, Kumpulainen J, Luoma P V, et al. Decrease serum selenium in alcoholics as related to liver structure and function. *Am J Clin Nutr*, 1985; 42: 147
- 9 Thomson C D, Medin D. Selenium and vitamin E supplementation activities of glutathione peroxidase in human tissues. *Am J Clin Nutr*, 1988; 48: 316
- 10 阎小君,李广元,任瑛云,等. 硒对胎鼠肝细胞核酸及蛋白质合成的影响. *西安医科大学学报*, 1991; 12(1): 10

(1993—04—05 收稿 1993—11—03 修回)

STUDY OF THE PROTECTIVE EFFECT OF SELENIUM SUPPLEMENTATION ON EXPERIMENTAL LIVER INJURY

Zhang Fuchun, Shu Changjie, Han Cong, et al

(Department of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital)

Abstract In order to find out the effects of Se supplementation on experimental liver injury. Rats by ethanol and carbon tetrachloride-induced liver injury recieved daily for 8 weeks. Se as sodium selenite. The results showed that Se concentration and GSH-Px activities increased significantly in liver, as compared with liver injury controls. The restoration of liver function and improvement of hepatic histo-

logic damage were observed after Se supplementation. The ultrastructure of the Se supplementation groups improved significantly comparing with liver injury controls, particularly the mitochondria and rough endoplasmic reticulum. It was confirmed that Se had the hepatocyte regenerative and protective effects on chronic liver injury.

Key words Se; experimental liver injury; rat; GSH-Px