



冬虫夏草菌丝提取物降低二甲基亚硝胺大鼠肝硬化门静脉高压效应的组织学基础

王宪波, 刘平, 唐志鹏, 李风华, 刘成海, 胡义扬, 徐列明

上海中医药大学曙光医院肝病研究所, 上海 201203

目的:探讨冬虫夏草菌丝提取物(*Cordyceps mycelia* extract, CME)对二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)大鼠肝硬化门静脉高压的防治效应及其作用机制。

方法:50 只 Wistar 大鼠采用 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ DMN 腹腔注射持续 4 周的方法制备大鼠肝硬化模型,并取 15 只大鼠作为正常对照组。造模即日起 CME 预防组大鼠($n=15$)予 0.74 g/(kg·d) CME 灌胃(按冬虫夏草菌丝生药质量计算),1 次/d,预防用药持续 4 周;CME 治疗组大鼠($n=10$)于造模成功后开始给药,用药 4 周。分别于造模后 3 d、2 周、4 周和造模终止后 2 周、4 周进行动态效应观察,肠系膜前静脉分支插管法检测门静脉压力(pressure of portal vein, Ppv);放射免疫法测定血清透明质酸(hyaluronic acid, HA)含量,免疫组织化学法检测肝窦壁 CD44、第Ⅷ因子相关抗原血管假性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)、 α -平滑肌肌动蛋白(alpha-smooth muscle actin, α -SMA)、层黏连蛋白(laminin, LM)、Ⅳ型胶原(collagen type IV, Col IV)和Ⅰ型胶原(collagen type I, Col I)表达。

结果:预防用药 4 周后,与模型组比较,CME 组大鼠门静脉管径显著缩小,门静脉压力显著降低($P<0.05$),血清 HA 含量显著下降($P<0.05$),vWF、 α -SMA、Col IV、LM、Col I 染色减弱($P<0.05$),CD44 染色增强($P<0.05$)。治疗用药 2 周时,与模型组比较,CME 组大鼠门静脉直径显著缩小,门静脉压力显著降低($P<0.05$),血清 HA 含量显著下降($P<0.05$)。治疗用药 4 周时 CME 组大鼠门静脉管径与门静脉压力恢复至同期正常对照组大鼠水平。治疗用药 2、4 周时,与模型组比较,CME 组大鼠肝窦壁 CD44 染色面积增加($P<0.05$),LM、 α -SMA、vWF 和 Col I 染色减弱($P<0.05$),肝窦壁 Col IV 染色无显著变化。

结论:CME 对 DMN 致大鼠肝硬化门静脉高压具有良好的干预和治疗作用。CME 抗肝窦壁损伤、保护肝窦内皮细胞、抑制肝星状细胞活化,抑制肝窦毛细血管化形成与促进其逆转是其效应的组织学基础。

关键词:冬虫夏草菌丝提取物; 门静脉高压; 肝硬化; 肝窦内皮细胞; 大鼠

中图分类号: R657.34; **文献标志码:** A; **文章编号:** 1672-1977(2008)11-1136-09

Wang XB, Liu P, Tang ZP, Li FH, Liu CH, Hu YY, Xu LM. *J Chin Integr Med/Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao.* 2008; 6(11): 1136-1144.

Received May 7, 2008; published online November 15, 2008.

Free full text (PDF) is available at www.jcimjournal.com.

Indexed/abstracted in and full text link-out at PubMed.

Forward linking and reference linking via CrossRef.

DOI: 10.3736/jcim20081107

Open Access

Cordyceps mycelia extract decreases portal hypertension in rats with dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis: a study on its histological basis

Xian-bo WANG, Ping LIU, Zhi-peng TANG, Feng-hua LI, Cheng-hai LIU, Yi-yang HU, Lie-ming XU

Institute of Liver Diseases, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)课题(No. 2006CB504801);上海市重点学科建设项目(No. Y0302);上海市教育委员会 E-研究院建设计划(No. E-03008)

Correspondence: Ping LIU, MD, Professor; Tel: 021-51322444; E-mail: liuliver@online.sh.cn

Objective: To study the effects of *Cordyceps mycelia* extract (CME) on portal hypertension in rats with dimethylnitrosamine (DMN) induced liver cirrhosis and probe into the mechanism of the action.

Methods: A rat model of liver cirrhosis was induced by peritoneal injection of DMN (at a dose of 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, once a day, 3 consecutive days per week) for 4 weeks. Other 15 rats were assigned into normal control group. The rats in CME-prevented group were administrated CME 0.74 g/(kg · d), once a day, simultaneously with DMN treatment and kept on 4-week administrating, and the rats in CME-treated group were administrated after the model was established. After 3-day, 2- and 4-week DMN injection and 2-, 4-week after the rat liver got cirrhosis, the pressure of portal vein (Ppv) was directly measured by intubation via tributary of vena mesenterica anterior. The serum hyaluronic acid (HA) content was measured by radioimmunoassay. The expressions of CD44, von Willebrand factor (vWF), laminin (LM), α -smooth muscle actin (α -SMA), type I collagen (Col I) and type IV collagen (Col IV) proteins in the hepatic sinusoidal walls were examined by immunohistochemistry.

Results: The caliber of portal vein (Cpv) and Ppv in the CEM group (after 4-week prevention) were significantly decreased as compared with those in the untreated group at the same point of time ($P < 0.05$), also including serum HA content ($P < 0.05$), and vWF, Col I, Col IV, LM, α -SMA positive staining ($P < 0.05$); however, CD44 positive staining were increased in the CEM group ($P < 0.05$). The Cpv, Ppv and serum HA content were significantly decreased after 2-week CME treatment as compared with those in the untreated group ($P < 0.05$). After 4-week CME treatment, the Cpv and Ppv in the CEM group were recovered to the normal level. After 2- and 4-week CME treatment, vWF, Col I, LM and α -SMA positive stainings were decreased ($P < 0.05$), and CD44 positive staining was increased ($P < 0.05$) in the CME group as compared with those in the untreated group at the same point of time, but there were no marked changes found in Col IV staining.

Conclusion: CME plays a good role in preventing and treating the portal hypertension in rats with DMN-induced liver cirrhosis. The histological bases of the effects are to treat liver sinusoidal endothelial cell injury, inhibit hepatic stellate cell activation, inhibit and reverse hepatic sinusoidal capillarization.

Keywords: *Cordyceps mycelia* extract; portal hypertension; liver cirrhosis; liver sinusoidal endothelial cells; rat

门静脉高压是肝硬化常见的病理表现,也是影响肝硬化患者预后的重要因素,积极寻找治疗肝硬化门静脉高压的药物和方法具有重要的医学价值和社会意义。二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)诱导的大鼠肝纤维化动物模型具有类似人类肝纤维化和肝硬化的病理特征,常用于肝纤维化和肝硬化门静脉高压的发病机制研究和药物干预研究^[1-5]。冬虫夏草菌丝(*Cordyceps mycelia*)具有抗肝纤维化作用^[6],但尚未见到有关其治疗肝硬化门静脉高压的研究报道。本研究旨在探讨冬虫夏草菌丝提取物(*Cordyceps mycelia* extract, CME)对DMN大鼠门静脉高压的干预和治疗作用,并对其作用机制进行探讨,以期为临床应用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 65只Wistar雄性大鼠,清洁级,体质量(150±10)g,中国科学院上海实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂和仪器 DMN,东京化成工业株式会社产品;冬虫夏草菌丝,江西国药责任有限公司产品。透明质酸(hyaluronic acid, HA)检测试剂盒,上海海军医学研究所产品;兔抗人CD44多克隆抗体,武汉博士德生物公司产品;兔抗人第Ⅷ因子相

关抗原血管假性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)多克隆即用型抗体,DAKO公司产品,上海中达医学应用研究所提供;兔抗鼠层黏连蛋白(laminin, LM)多克隆抗体, SIGMA公司产品;鼠抗人 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)单克隆抗体,DAKO公司产品;兔抗鼠I型胶原(collagen type I, Col I)、IV型胶原(collagen type IV, Col IV)抗血清,复旦大学上海医学院病理教研室产品,工作浓度1:100。Power Lab生理数据处理和分析系统,澳大利亚ADI公司产品;HPIAS-1000高清晰度彩色病理图文分析系统,武汉同济医科大学千屏影像工程公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 冬虫夏草菌丝提取物的制备 冬虫夏草菌丝用70%乙醇回流提取6次,3h/次,合并回流提取液,回收乙醇;流浸膏加水混匀,用石油醚反复萃取至萃取液颜色变为淡棕色,回收石油醚;提取物浓缩干燥至粉末状。由中国科学院上海药物研究所制备。

1.2.2 模型制备和分组 Wistar大鼠65只,饲养于清洁级动物房。其中50只大鼠用于肝硬化模型制备,以DMN 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 剂量作腹腔内注射,1次/d,每周连续3d、共4周^[7]。15只正常大鼠给予等剂量生理盐水腹腔注射,设为正常对照组。

自造模之日起,从造模大鼠中采用随机数字表方法随机取 15 只大鼠给予 CME 干预,设为 CME 预防组,按冬虫夏草菌丝原药材 0.74 g/kg(冬虫夏草菌丝原药材临床成人用量 6 g/d,按 65 kg 体质量成人的 8 倍量计算)灌胃,1 次/d;于给药后 3 d、2 周、4 周 3 个观察点分别取模型组与 CME 预防组大鼠各 5 只以及正常对照大鼠 3 只,对门静脉压力及其相关生化、肝组织学指标作动态观察。

造模 4 周后大鼠肝硬化模型形成,20 只大鼠随机分为模型组和 CME 治疗组。CME 治疗组大鼠给予 CME 灌胃,0.74 g/kg,1 次/d,共 4 周;正常对照组大鼠给予与药物等量的生理盐水灌胃。于给药后 2 周和 4 周,分别取模型组与 CME 组 5 只,同期正常对照组大鼠 3 只,检测门静脉压力后,经下腔静脉采血并获取肝组织。

1.2.3 观察指标

1.2.3.1 门静脉直径及压力的测定 大鼠用 2% 戊巴比妥钠(2 ml/kg 体质量)腹腔注射麻醉后,仰卧位固定,打开腹腔,暴露门静脉主干,用游标卡尺测量距肝门 0.5 cm 处的门静脉直径;于肠系膜前静脉右侧靠近门静脉处分离出一回肠肠系膜静脉分支,结扎其远端,然后用血管剪剪开一适宜缺口,将 PE-100 导管自缺口插入后,沿肠系膜前静脉上行,通过脾静脉至门静脉主干,固定导管并接通压力换能器,经 Power Lab 生理数据处理和分析系统获得门静脉压力数据。

1.2.3.2 血清透明质酸含量测定 血清透明质酸测定采用放射免疫法,具体操作按试剂盒说明书进行。

1.2.3.3 CD44、vWF、 α -SMA、LM、Col IV 和 Col 表达测定 免疫组化染色法检测 CD44、vWF、 α -SMA、LM、Col IV 和 Col I 表达。取肝脏组织,石蜡切片,常规脱蜡至水,0.3% H_2O_2 -甲醇,室温 10 min,沸水浴 20 min,0.1% 胰蛋白酶 37 °C 消化 30 min,加入第一抗体,4 °C 过夜,加入兔抗人第二抗体,37 °C 30 min,二氨基联苯胺显色 5 min,水洗、烘干、封片。PBS(pH 7.4)作空白对照染色。

图像定量分析:每组各取 3 只大鼠肝脏免疫组化染色切片,在每张组织片随机选择 5 个不同视野,在 200 倍光学显微镜下,测定标准测量窗口(一个视野)中肝窦壁阳性区域的面积比。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析,计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析,并用 LSD-*t* 检验进行两两比较;门静脉压力与各指标的相关分析用直线回归模型 Regression 进行相关性检验。检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 门静脉直径和门静脉压力变化 与同期正常对照组比较,DMN 造模 2 周后,模型组大鼠门静脉直径有增宽趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$);4 周和终止造模后 2 周(6 周)后显著增宽($P < 0.05$);8 周后大鼠肝门静脉直径仍比正常对照宽,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。模型组大鼠门静脉压力在造模 2 周后显著高于同期正常对照组($P < 0.05$),4 周时门静脉压力达峰值;与 4 周时的模型组比较,终止造模后 2 周(6 周)后,门静脉压力降低($P < 0.05$),但仍显著高于同期正常对照组($P < 0.05$),终止造模后 4 周(8 周)后仍高于同期正常对照组大鼠,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与同期模型组比较,CME 干预用药 2 周时门静脉直径与门静脉压力差异均无统计学意义($P > 0.05$);干预用药 4 周时门静脉直径显著缩小、门静脉压力显著降低($P < 0.05$)。治疗用药 2 周时门静脉直径显著减小、门静脉压力显著降低($P < 0.05$);治疗用药 4 周时门静脉直径与门静脉压力有所缩小或降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。与正常对照组比较,CME 预防用药 2 周时门静脉直径增宽($P < 0.05$),而 2 周和 4 周时门静脉压力均高于正常对照组($P < 0.05$);CME 治疗 2 周和 4 周时与正常对照组比较,门静脉直径和门静脉压力差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1 和表 2。

表 1 各组大鼠门静脉直径的变化

Table 1 Change of the caliber of portal vein in different groups

($\bar{x} \pm s$, mm)

Group	n	Caliber of portal vein			
		After 2-week prevention	After 4-week prevention	After 2-week treatment	After 4-week treatment
Normal control	3	2.57 $\pm$ 0.16	2.73 $\pm$ 0.06	2.84 $\pm$ 0.10	2.71 $\pm$ 0.31
Untreated	5	2.94 $\pm$ 0.12	3.45 $\pm$ 0.25*	3.15 $\pm$ 0.16*	3.07 $\pm$ 0.16
CME	5	2.97 $\pm$ 0.20*	2.92 $\pm$ 0.53 Δ	2.80 $\pm$ 0.23 Δ	2.95 $\pm$ 0.18

* $P < 0.05$, vs normal control group; Δ $P < 0.05$, vs untreated group.

表 2 各组大鼠门静脉压力的变化
 Table 2 Change of the pressure of portal vein in different groups

Group	n	Pressure of portal vein			
		After 2-week prevention	After 4-week prevention	After 2-week treatment	After 4-week treatment
Normal control	3	7.54±0.22	6.78±0.09	6.02±0.62	6.89±0.36
Untreated	5	11.11±3.13*	14.81±1.42*	12.34±1.75*	8.68±1.80
CME	5	10.03±1.92*	11.74±1.02*△	7.76±1.05△	7.44±0.28

* $P < 0.05$, vs normal control group; △ $P < 0.05$, vs untreated group.

2.2 血清 HA 含量变化 DMN 造模 3 d 后与正常对照组比较,模型组和 CME 组大鼠血清 HA 含量急剧增高 ($P < 0.05$)。造模 2 周后较 3 d 时下降 ($P < 0.05$),4 周时再次增高至 3 d 时水平;终止造模因素后 2 周(第 6 周)较 4 周时显著下降 ($P < 0.05$),第 8 周时进一步下降 ($P < 0.05$);与同期模型组比较,CME 预防用药 2 周时,大鼠血清 HA 含量有所降低,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),预

防用药 4 周时显著下降 ($P < 0.05$);治疗用药 2 周时下降更明显 ($P < 0.05$),治疗用药 4 周时降至正常对照组大鼠的水平,但与同期模型对照组之间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常对照组比较,CME 预防用药 3 d、4 周和治疗用药 2 周时,大鼠血清 HA 水平仍显著增高 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组大鼠血清 HA 含量变化
 Table 3 Change of serum HA content in different groups

Group	n	HA				
		After 3-day prevention	After 2-week prevention	After 4-week prevention	After 2-week treatment	After 4-week treatment
Normal control	3	91.58±18.09	138.03±67.54	82.74±18.21	53.21±11.96	57.69±9.84
Untreated	5	987.35±457.23*	436.47±175.61*▲	1 009.27±202.46*	109.62±36.5*□	80.52±53.48□
CME	5	1 074.53±444.37*	340.66±144.98	356.29±161.69*△	68.24±4.01*△	57.09±8.56

* $P < 0.05$, vs normal control group; △ $P < 0.05$, vs untreated group; ▲ $P < 0.05$, vs 3 d in same group; □ $P < 0.05$, vs 4-week in same group.

2.3 肝窦壁 CD44、vWF、α-SMA、Col I、Col IV 及 LM 变化

2.3.1 肝窦壁 CD44 变化 与正常对照组大鼠相比,DMN 造模 3 d、2 周、4 周和终止造模后第 2 周(6 周)、第 4 周(8 周)后大鼠肝窦壁 CD44 表达显著减少 ($P < 0.05$)。与同期模型组比较,CME 组大鼠肝窦壁 CD44 表达于 CME 预防用药 3 d 时差异无统计学意义;但预防用药 2 周和 4 周以及治疗用药 2 周和 4 周时其阳性染色均显著增强 ($P < 0.05$)。CME 预防用药 3 d、2 周、4 周和治疗用药 2 周、4 周时大鼠肝窦壁 CD44 表达仍明显弱于正常

对照组 ($P < 0.05$)。见图 1。
 2.3.2 肝窦壁 vWF 变化 与正常对照组大鼠比较,DMN 造模 3 d、2 周、4 周后肝窦壁 vWF 表达显著增加,4 周时达峰值,终止造模后渐趋减轻,但 6 周、8 周时肝窦壁 vWF 表达仍显著异常 ($P < 0.05$)。与同期模型组比较,预防用药 3 d 时大鼠肝窦壁 vWF 染色无显著差异,预防用药 2 周、4 周以及治疗用药 2 周、4 周时 vWF 阳性染色均显著减弱 ($P < 0.05$)。CME 预防用药 3 d、2 周、4 周和治疗用药 2 周、4 周时大鼠肝窦壁 vWF 表达仍明显强于正常对照组 ($P < 0.05$)。见图 2。

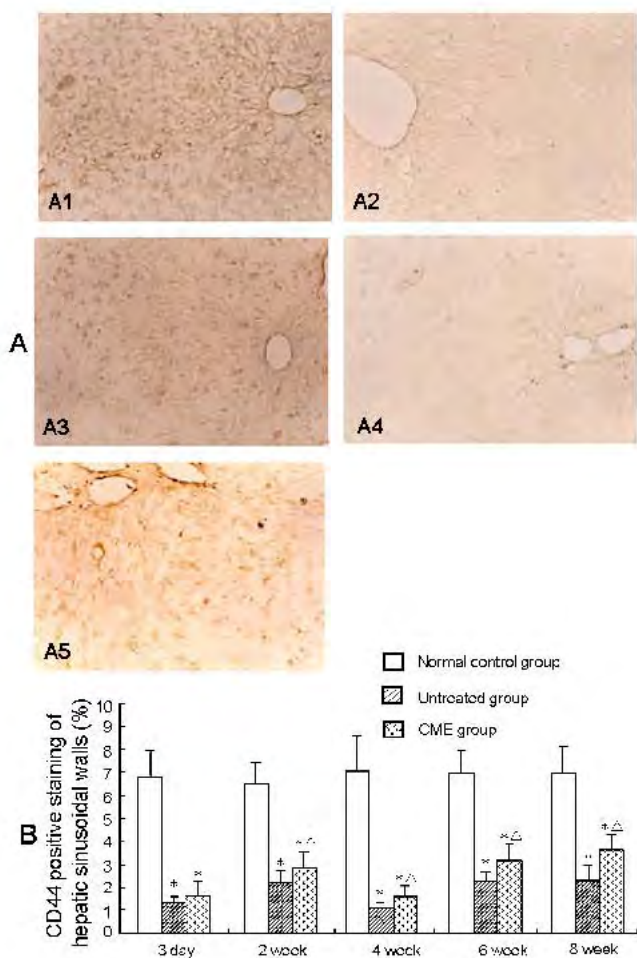


图1 各组大鼠肝窦壁 CD44 表达的变化

Figure 1 Change of CD44 expression in the hepatic sinusoidal walls in different groups

A; Expression of CD44 in the hepatic sinusoidal walls in rats was detected by immunohistochemical staining (Light microscopy, $\times 200$). A1; Normal control group; A2; Untreated group (after 4-week DMN injection); A3; CME group (after 4-week CME prevention); A4; Untreated group (4 weeks after DMN injection); A5; CME group (after 4-week CME treatment). B; Comparison of the area ratio of CD44 positive staining of the hepatic sinusoidal walls in different observing times. * $P < 0.05$, Δ normal control group; Δ $P < 0.05$, Δ untreated group.

2.3.3 肝窦壁 α -SMA 变化 与正常对照组大鼠比较, DMN 造模 3 d、2 周、4 周后肝窦壁 α -SMA 表达显著增加, 4 周时达峰值, 终止造模后渐趋减轻, 但 6 周、8 周时肝窦壁 α -SMA 表达仍显著异常 ($P < 0.05$)。与同期模型组比较, 3 d 时预防组肝窦壁 α -SMA 染色无明显差异, 预防用药 2 周、4 周以及治疗用药 2 周、4 周时肝窦壁 α -SMA 阳性染色均显著减弱 ($P < 0.05$)。CME 预防用药 3 d、2 周、4 周和治疗用药 2 周、4 周时大鼠肝窦壁 vWF 表达仍明显强于正常对照组 ($P < 0.05$)。见图 3。

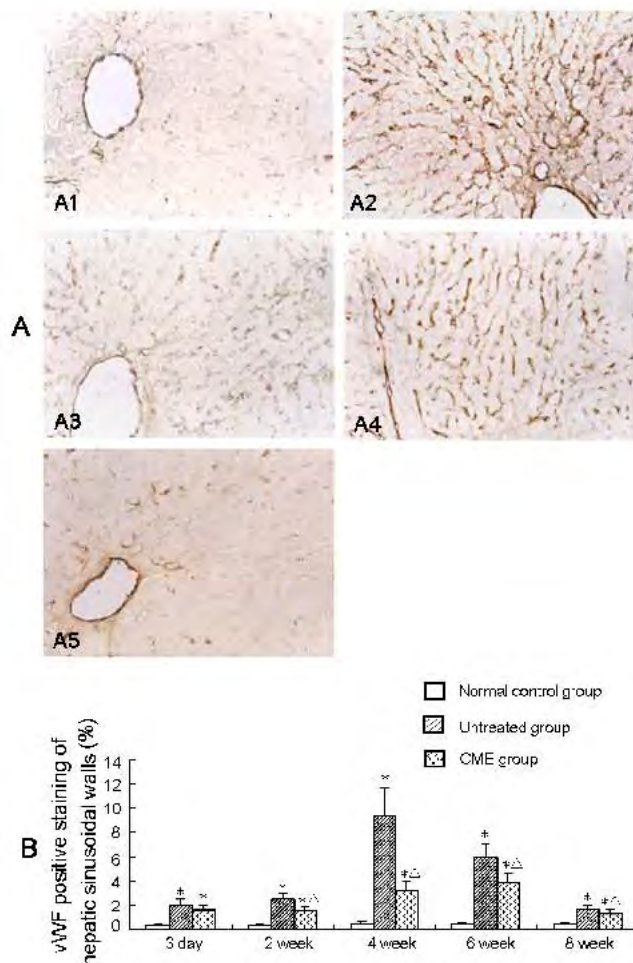


图2 各组大鼠肝窦壁 vWF 表达的变化

Figure 2 Change of vWF expression in the hepatic sinusoidal walls in different groups

A; Expression of vWF in the hepatic sinusoidal walls in rats was detected by immunohistochemical staining (Light microscopy, $\times 200$). A1; Normal control group; A2; Untreated group (after 4-week DMN injection); A3; CME group (after 4-week CME prevention); A4; Untreated group (4 weeks after DMN injection); A5; CME group (after 4-week CME treatment). B; Comparison of the area ratio of vWF positive staining of the hepatic sinusoidal walls in different observing times. * $P < 0.05$, Δ normal control group; Δ $P < 0.05$, Δ untreated group.

2.3.4 肝窦壁 LM 变化 与正常对照组大鼠比较, DMN 造模 3 d、2 周、4 周后肝窦壁 LM 表达显著增加, 4 周时达峰值, 终止造模后渐趋减轻, 但 6 周、8 周时肝窦壁 LM 表达仍显著异常 ($P < 0.05$)。与同期模型组比较, 3 d 时预防组肝窦壁 LM 染色无明显差异, 预防用药 2 周、4 周以及治疗用药 2 周、4 周时肝窦壁 LM 阳性染色均显著减弱 ($P < 0.05$)。CME 预防用药 3 d、2 周、4 周和治疗用药 2 周、4 周时大鼠肝窦壁 LM 表达仍明显强于正常对照组 ($P < 0.05$)。见图 4。

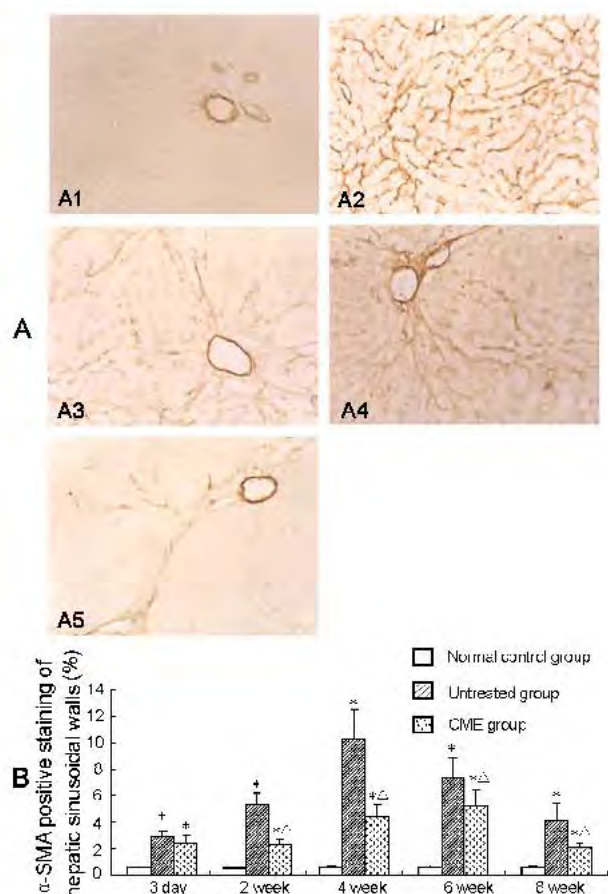


图3 各组大鼠肝窦壁 α-SMA 表达的变化

Figure 3 Change of α-SMA expression in the hepatic sinusoidal walls in different groups

A; Expression of α-SMA in the hepatic sinusoidal walls in rats was detected by immunohistochemical staining (Light microscopy, ×200). A1; Normal control group; A2; Untreated group (after 4-week DMN injection); A3; CME group (after 4-week CME prevention); A4; Untreated group (4 weeks after DMN injection); A5; CME group (after 4-week CME treatment). B; Comparison of the area ratio of α-SMA positive staining of the hepatic sinusoidal walls in different observing times. * $P < 0.05$, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.05$.

2.3.5 肝窦壁 Col I 变化 与正常对照组大鼠比较,DMN 造模 3 d、2 周、4 周后肝窦壁 Col I 表达显著增加,4 周时达峰值,终止造模后渐趋减轻,但 6 周、8 周时肝窦壁 Col I 表达仍显著异常 ($P < 0.05$)。与同期模型组比较,3 d 时预防组肝窦壁 Col I 染色无明显差异,预防用药 2 周、4 周以及治疗用药 2 周、4 周时肝窦壁 Col I 阳性染色均显著减弱 ($P < 0.05$)。CME 预防用药 2 周、4 周和治疗用药 2 周、4 周时大鼠肝窦壁 Col I 表达仍明显强于正常对照组 ($P < 0.05$)。见图 5。

2.3.6 肝窦壁 Col IV 变化 与正常对照组大鼠相比,肝窦壁 Col IV 则在 DMN 造模 3 d、2 周均显著减

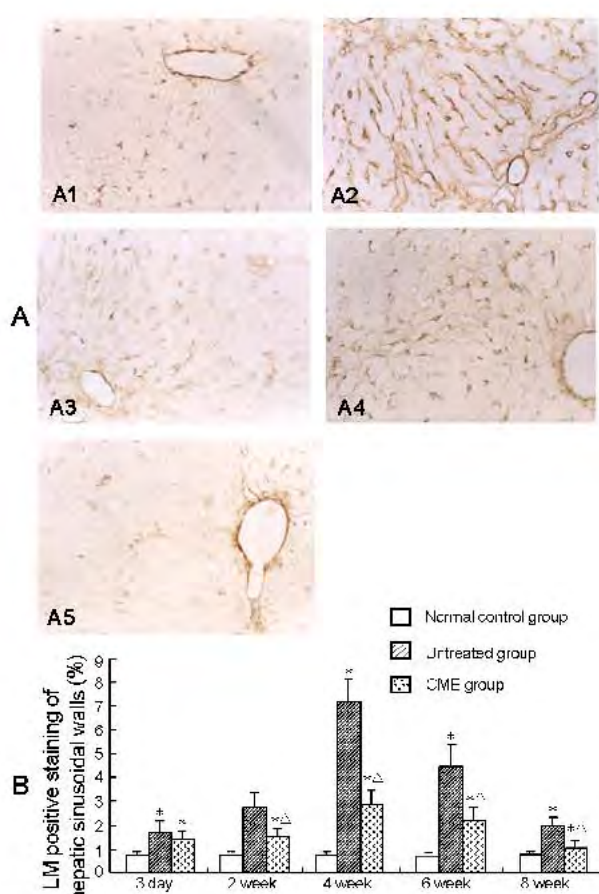


图4 各组大鼠肝窦壁 LM 表达的变化

Figure 4 Change of LM expression in the hepatic sinusoidal walls in different groups

A; Expression of LM in the hepatic sinusoidal walls in rats was detected by immunohistochemical staining (Light microscopy, ×200). A1; Normal control group; A2; Untreated group (after 4-week DMN injection); A3; CME group (after 4-week CME prevention); A4; Untreated group (4 weeks after DMN injection); A5; CME group (after 4-week CME treatment). B; Comparison of the area ratio of LM positive staining of the hepatic sinusoidal walls in different observing times. * $P < 0.05$, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.05$, Δ $P < 0.05$.

少,4 周、6 周时显著增加 ($P < 0.05$)。与同期模型组比较,CME 预防用药 3 d 时预防组肝窦壁 Col IV 染色增强 ($P < 0.05$),2 周时两组无明显差异,预防用药 4 周时肝窦壁 Col IV 染色显著弱于模型对照组 ($P < 0.05$);治疗用药 2 周、4 周时与同期模型对照组间均无显著性差异 ($P > 0.05$)。CME 预防用药 3 d、2 周时肝窦壁 Col IV 表达弱于正常对照组大鼠 ($P < 0.05$),CME 治疗用药 2 周时肝窦壁 Col IV 表达较正常对照组大鼠增强 ($P < 0.05$),而预防用药 4 周和治疗用药 4 周时两组之间比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 6。

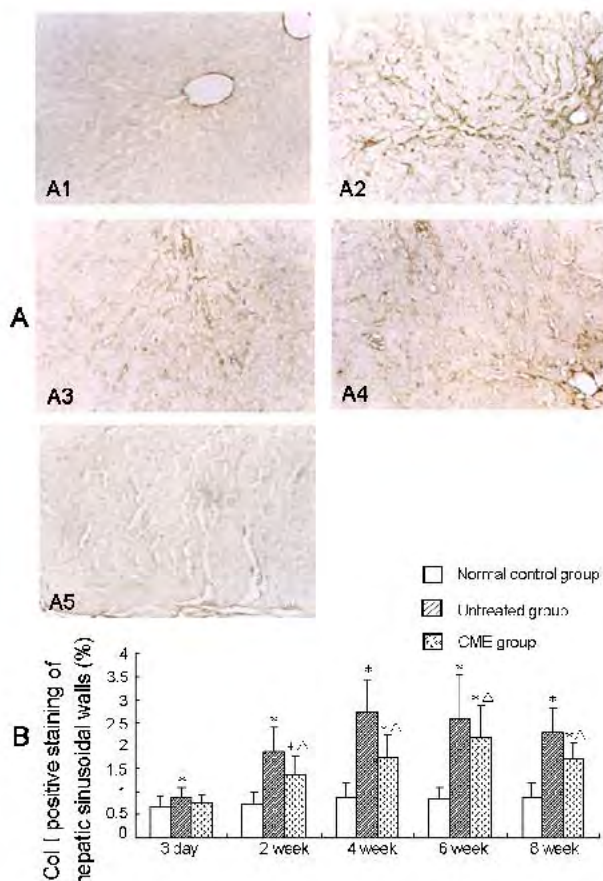


图 5 各组大鼠肝窦壁 Col I 表达的变化

Figure 5 Change of Col I expression in the hepatic sinusoidal walls in different groups

A; Expression of Col I in the hepatic sinusoidal walls in rats was detected by immunohistochemical staining (Light microscopy, $\times 200$). A1; Normal control group; A2; Untreated group (after 4-week DMN injection); A3; CME group (after 4-week CME prevention); A4; Untreated group (4 weeks after DMN injection); A5; CME group (after 4-week CME treatment). B; Comparison of the area ratio of Col I positive staining of the hepatic sinusoidal walls in different observing times. * $P < 0.05$, $\approx$ normal control group, $\Delta P < 0.05$, $\approx$ untreated group.

2.4 门静脉压力与观测指标的相关性 以各指标动态观察时间点的均值作相关分析,其结果显示,门静脉压力与门静脉直径呈正相关, $r = 0.809$ ($P < 0.05$);门静脉压力与肝窦壁 α -SMA、LM、vWF 及 HA 含量呈正相关, r 值分别为 0.921、0.901、0.893 和 0.827 ($P < 0.05$);门静脉压力与肝窦壁 CD44 和 Col I、Col IV 无关, r 值分别为 -0.626 、 0.385 、 0.405 ($P > 0.05$).

3 讨论

肝硬化是门静脉高压最常见的原因。传统上认为肝硬化时,纤维化和再生结节压迫血管,导致血管扭曲,从而使肝窦和终末门静脉阻力增加。但近年

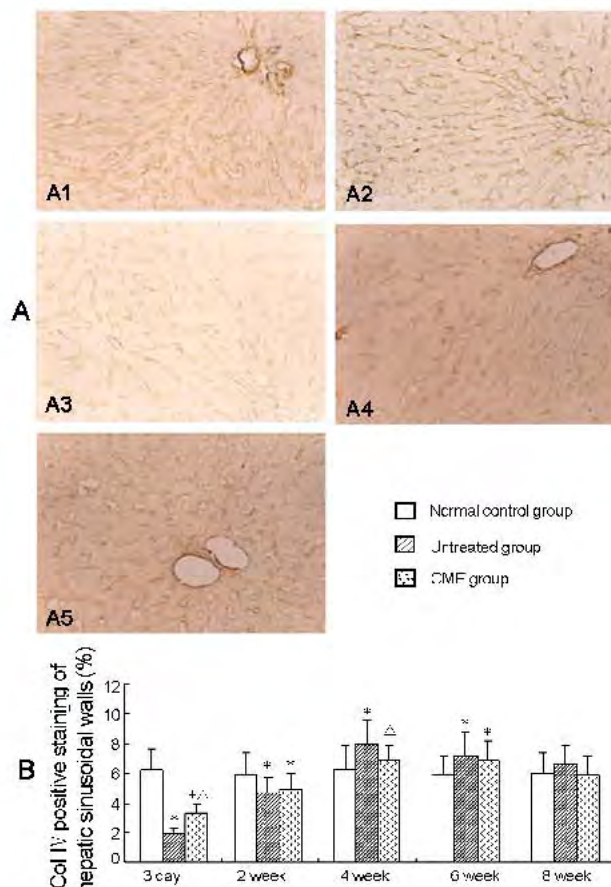


图 6 各组大鼠肝窦壁 Col IV 表达的变化

Figure 6 Change of Col IV expression in the hepatic sinusoidal walls in different groups

A; Expression of Col IV in the hepatic sinusoidal walls in rats was detected by immunohistochemical staining (Light microscopy, $\times 200$). A1; Normal control group; A2; Untreated group (after 4-week DMN injection); A3; CME group (after 4-week CME prevention); A4; Untreated group (4 weeks after DMN injection); A5; CME group (after 4-week CME treatment). B; Comparison of the area ratio of Col IV positive staining of the hepatic sinusoidal walls in different observing times. * $P < 0.05$, $\approx$ normal control group, $\Delta P < 0.05$, $\approx$ untreated group.

来研究认为,许多潜在性的可逆性因素起主要作用,包括肝窦壁细胞的收缩性,血管活性物质(如内皮素、一氧化氮)的产生及影响内脏小动脉的各种全身性神经体液因子等,肝细胞肿胀也促成门静脉高压。其中肝窦的血流障碍在肝硬化门静脉高压形成中的作用越来越受到重视^[8-11]。

早期形成门静脉压增高是 DMN 肝硬化大鼠模型的一个重要特征^[12]。本文实验结果显示,在采用 DMN 腹腔注射 3 次的 2 周后门静脉压力即显著增高,造模 4 周后的门静脉压力均值为同期正常对照组大鼠的 2.2 倍,其门静脉管径呈同步增大;在终止 DMN 刺激后随着时间的推移而趋向逆转,终止 DMN 刺激 2 周后仍显著高于同期正常对照组大

鼠,第 8 周的均值较同期正常对照组大鼠增高 28%。表明 DMN 所致的慢性肝损伤大鼠门静脉压增高先于肝硬化的形成,终止造模因素刺激后门静脉压的缓解快于肝纤维化的消解。提示肝纤维结缔组织沉积并不是 DMN 肝硬化门静脉压增高的关键因素,肝窦壁的破坏及其结构的改变可能是重要原因之一。

肝窦主要由肝窦内皮细胞 (sinusoidal endothelial cells, SECs) 组成,SECs 远侧胞浆部分有发达的窗孔,其窗孔无隔膜,细胞膜表面有高度敏感和特异性透明质酸受体 CD44^[13],这与血管内皮细胞表达特异性标志物 vWF 呈鲜明的差别^[14]。内皮下无基底膜存在,但分布有特殊构型的 Col IV 及少量的 LM,在面向肝细胞一侧 Disse 腔中附着有肝星状细胞 (hepatic stellate cells, HSCs)。肝窦这一独特生态环境及结构是保证血液和肝细胞间正常物质交换以及保持门静脉压较为稳定的组织学基础。

免疫组化观察结果显示,在造模 3 d 后,肝窦壁 CD44、Col IV 表达显著减少,vWF、 α -SMA 及 LM 表达显著增加,血清 HA 含量急剧增高;其中 Col IV 表达显著减少与血清 HA 含量的急剧增高充分显示出肝窦壁损伤是 DMN 肝损伤的早期事件,此后,除 Col IV 表现为 2 周前减少、4 周增加外,其他指标均随着给予 DMN 造模时间的推进而呈进行性减少或增加,在终止造模因素刺激后则有所缓解。表明 DMN 的毒性作用可破坏正常的肝窦壁结构,导致肝窦内皮细胞向血管内皮细胞的转化,由于 SECs 表达的 CD44 减少,使 SECs 清除循环中 HA 的功能降低,导致血清 HA 水平升高,HA 浓度高低是评价 SECs 功能的重要指标^[5, 13, 15]。 α -SMA 既是肝星状细胞活化标志,也是反映肝星状细胞收缩力的指标。活化的肝星状细胞分泌 IV 型胶原和 I 型胶原以及 LM 等细胞外基质,由于 α -SMA 表达量增加而收缩力也增强,促使肝窦直径变窄,以致肝窦血流阻力增加,进而引起门静脉压力的增高^[9, 10]。动态观察模型大鼠各时间点门静脉压力与各指标的相关性分析结果充分显示出肝窦壁病变在门静脉高压形成中的作用(门静脉压力与肝窦壁 α -SMA、LM、vWF、血清 HA 含量等均呈显著的正相关关系, r 值依次为 0.921、0.901、0.893 与 0.827)。

在 DMN 造模的同时,持续给模型大鼠 CME 干预,2 周时门静脉压略有下降,4 周时较同期模型组显著降低;在 4 周造模成型并终止 DMN 刺激后给予 CME 治疗,用药 2 周时门静脉压力与门静脉管径显著低于 6 周模型对照大鼠,用药 4 周时门静脉压与门静脉管径已回复至同期正常大鼠的水平。显

示出 CME 具有良好的降低 DMN 大鼠门静脉压增高的效应。

结合肝组织学及血清 HA 含量的变化结果可以看出,CME 干预用药 3 d 时可以显著抑制肝窦壁 IV 型胶原的降解,2 周时肝窦壁 CD44 阳性染色显著增加,vWF 和 α -SMA 阳性染色显著减少,LM 和 Col I 沉积减少;4 周时包括血清 HA 含量在内的所有观测指标与同期模型对照组相比,均显著改善;对于已造模成型的 DMN 大鼠肝硬化,治疗用药 2 周后,上述各指标除 Col IV 外,较同期模型对照组均有显著改善,治疗用药 4 周时,肝窦壁 CD44 染色显著增加, α -SMA 阳性染色及 LM 和 Col I 沉积均显著减少。此动态观察结果充分显示出 CME 保护肝窦壁、抗肝窦壁损伤以及促进损伤肝窦壁修复的综合作用,可以认为这是 CME 干预治疗二甲基亚硝胺大鼠肝硬化门静脉高压效应的组织学基础。

REFERENCES

- 1 Shimamoto T, Mori Y, Takagi H, *et al.* Experimental studies on morphological changes of microcirculation of DMN-induced liver cirrhosis after normothermic ischemia with charge-coupled device microscope. *J Gastroenterol Hepatol.* 2003; 18(9): 1071-1075.
- 2 Sakamoto M, Ueno T, Nakamura T, *et al.* Improvement of portal hypertension and hepatic blood flow in cirrhotic rats by oestrogen. *Eur J Clin Invest.* 2005; 35(3): 220-225.
- 3 Wang XB, Liu P, Tang ZP, *et al.* Role of injury and phenotype shift of liver sinusoidal endothelial cells in the development of portal hypertension of cirrhosis in rats. *Zhongguo Bing Li Sheng Li Za Zhi.* 2005; 21(9): 1811-1816. Chinese with abstract in English.
王宪波,刘平,唐志鹏,等.肝窦内皮细胞损伤和表型改变在大鼠肝硬化门脉高压发生中的作用. *中国病理生理杂志.* 2005; 21(9): 1811-1816.
- 4 Wang XB, Liu P, Tang ZP, *et al.* Role of hepatic stellate cells activation in development of portal hypertension of dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis in rats. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Xiao Hua Za Zhi.* 2005; 13(4): 211-214. Chinese with abstract in English.
王宪波,刘平,唐志鹏,等.肝星状细胞活化在大鼠肝硬化门脉高压形成中的作用. *中国中西医结合消化杂志.* 2005; 13(4): 211-214.
- 5 Wang XB, Liu P, Tang ZP, *et al.* Study on the mechanisms of development of sinusoidal capillarization. *Zhonghua Xiao Hua Za Zhi.* 2004; 24(5): 289-292. Chinese with abstract in English.
王宪波,刘平,唐志鹏,等.肝窦毛细血管瘤化的形成机

- 制研究. 中华消化杂志. 2004; 24(5): 289-292.
- 6 Li FH, Liu P, Xiong WG, *et al.* Effects of *Cordyceps sinensis* on dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis in rats. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao. 2006; 4(5): 514-517. Chinese with abstract in English.
李风华, 刘平, 熊卫国, 等. 冬虫夏草菌丝对二甲基亚硝胺诱导的大鼠肝纤维化的作用. 中西医结合学报. 2006; 4(5): 514-517.
- 7 Casu A, Canepa M, Nanni G. Perisinusoidal stellate cells or Ito cells and their role in hepatic fibrosis. Pathologica. 1994; 86(5): 467-499.
- 8 Rockey DC. Hepatic fibrosis, stellate cells, and portal hypertension. Clin Liver Dis. 2006; 10(3): 459-479, vii-viii.
- 9 Reynaert H, Thompson MG, Thomas T, *et al.* Hepatic stellate cells: role in microcirculation and pathophysiology of portal hypertension. Gut. 2002; 50(4): 571-581.
- 10 Bataller R, Brenner DA. Liver fibrosis. J Clin Invest. 2005; 115(2): 209-218.
- 11 Oda M, Han JY, Nakamura M. Endothelial cell dysfunction in microvasculature: relevance to disease processes. Clin Hemorheol Microcirc. 2000; 23(2-4): 199-211.
- 12 Wang XB, Liu P, Tang ZP, *et al.* Dynamic changes of pressure of portal vein in development of liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rats. Shi Jie Hua Ren Xiao Hua Za Zhi. 2002; 10(4): 401-405. Chinese with abstract in English.
王宪波, 刘平, 唐志鹏, 等. 二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化形成中门脉压力的动态变化. 世界华人消化杂志. 2002; 10(4): 46-49.
- 13 Satoh T, Ichida T, Matsuda Y, *et al.* Interaction between hyaluronan and CD44 in the development of dimethylnitrosamine-induced liver cirrhosis. J Gastroenterol Hepatol. 2000; 15(4): 402-411.
- 14 Albornoz L, Alvarez D, Otaso JC, *et al.* Von Willebrand factor could be an index of endothelial dysfunction in patients with cirrhosis: relationship to degree of liver failure and nitric oxide levels. J Hepatol. 1999; 30(3): 451-455.
- 15 George J, Tsutsumi M, Takase S. Expression of hyaluronic acid in N-nitrosodimethylamine induced hepatic fibrosis in rats. Int J Biochem Cell Biol. 2004; 36(2): 307-319.