

# 富硒乳酸菌干预肝纤维化大鼠 GSH - Px 和免疫细胞活性的变化

杨筱曼, 张 伟, 黄新华, 梁军清, 陈 龙

(南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物医药功能材料工程研究中心, 江苏 南京 210097)

[摘要] 选用健康 SD 大鼠 36 只, 雌雄各半, 随机分为对照组 (C 组)、CCl<sub>4</sub> 注射组 (CCl<sub>4</sub> 组) 和富硒乳酸菌制剂保护组 (CCl<sub>4</sub>-Se 组)。CCl<sub>4</sub> 组和 CCl<sub>4</sub>-Se 组皮下注射 CCl<sub>4</sub> 诱发肝纤维化。C 组和 CCl<sub>4</sub> 组给予普通全价饲料, CCl<sub>4</sub>-Se 组喂含富硒乳酸菌的全价饲料。分别在第 4、8 周测定肝脏指数, 肝组织匀浆谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性, 血中 T 淋巴细胞比例, 红细胞的免疫功能。结果显示, 在整个实验期间, CCl<sub>4</sub>-Se 组的肝脏指数介于对照组和 CCl<sub>4</sub> 组之间。CCl<sub>4</sub> 组肝匀浆中 GSH-Px 活性与 C 组比较均明显下降, CCl<sub>4</sub>-Se 组的 GSH-Px 活性虽较 C 组低, 但高于或明显高于 CCl<sub>4</sub> 组。CCl<sub>4</sub> 组大鼠 T-淋巴细胞 (%)、RBC-CR<sub>1</sub> 花环率和 RBC-IC 花环率都较对照组下降或显著下降, 而 CCl<sub>4</sub>-Se 组大鼠 T-淋巴细胞 (%) 虽与对照组相比也下降, 但明显高于 CCl<sub>4</sub> 组, 其 RBC-CR<sub>1</sub> 花环率和 RBC-IC 花环率也均高于 CCl<sub>4</sub> 组, 并与对照组相当。提示: 富硒乳酸菌制剂通过保护肝组织抗氧化酶活性, 改善和提高免疫细胞功能活动发挥正常有效的作用, 从而干预肝纤维化发生发展。

[关键词] 富硒乳酸菌, 大鼠, 肝纤维化, 谷胱甘肽过氧化物酶, 免疫细胞

[中图分类号] Q 592.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2007)03-0093-04

## Changes of GSH - Px and Immune Cell Activities in Hepatic Fibrosis Rats Intervened by Se-Enriched *Lactobacillus*

Yang Xiaoman, Zhang Wei, Huang Xinhua, Liang Junqing, Chen Long

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Jiangsu Engineering Research Center  
of Biomedical Function Materials, Nanjing 210046, China)

**Abstract** Thirty-six healthy SD rats with half of female and male were chosen and randomly divided into a control group (group C), a CCl<sub>4</sub>-injected group (group CCl<sub>4</sub>) and a CCl<sub>4</sub> plus Se-enriched *lactobacillus* group (group CCl<sub>4</sub>-Se). The number of rats in each group is 12. Hepatic fibrosis was induced by carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>). Group CCl<sub>4</sub> and group CCl<sub>4</sub>-Se were given hypodermic injection of olive oil solution containing 500 g/L CCl<sub>4</sub>, followed by injection of the same solution (0.3 mL/100 g body mass) every 3 days over eight weeks. The rats in group C received hypodermic injection of olive oil at the same dose and frequency. During the entire experimental period, the common complete diet was orally provided daily in group C and group CCl<sub>4</sub>, and the rats in group CCl<sub>4</sub>-Se were given the diets with 3 mg of Se-enriched *lactobacillus* per kg feed. The hepatic index, GSH-Px activity in liver homogenate, T-lymphocyte rates in blood, changes of RBC-CR<sub>1</sub> rosette rates and RBC-IC rosette rates were determined in the 4th and 8th week post CCl<sub>4</sub> injection. The result showed that during the whole experimental period, the hepatic index, which was highest in group CCl<sub>4</sub>, was lower or significantly lower in group CCl<sub>4</sub>-Se than in group CCl<sub>4</sub> but notably higher than in group C. Compared with the group C, the GSH-Px activity in liver homogenate in the group CCl<sub>4</sub> decreased significantly, but in group CCl<sub>4</sub>-Se it was higher or significantly higher than that in the group CCl<sub>4</sub> and was close to that in group C. In group CCl<sub>4</sub>, T-lymphocytes (%) dropped significantly. T-lymphocytes (%) of group CCl<sub>4</sub>-Se is lower than that of group C, but showing an apparent

收稿日期: 2006-08-12 修回日期: 2006-09-25

基金项目: 江苏省重点实验室开放基金 (KJS02022)、江苏省生物医药功能材料工程研究中心资助。

作者简介: 杨筱曼 (1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事动物免疫生理学与生物化学的学习与研究。E-mail: elver1982@hotmail.com

通讯联系人: 陈龙 (1964-), 教授, 博士, 主要从事免疫生理学与生物化学的教学与研究。E-mail: lchen@njnu.edu.cn

increase as compared with group  $\text{CCl}_4$ . RBC-CR1 rosette rates(%) and RBC-IC rosette rates(%) of group  $\text{CCl}_4$  were lower or significantly lower than those of group C. However, both rates(%) of group  $\text{CCl}_4$ -Se were markedly lower than those in group  $\text{CCl}_4$  and close to those in group C. It is suggested that Se-enriched *lactobacillus* could intervene the lipid peroxidation reaction of hepatic fibrosis induced by  $\text{CCl}_4$ , and ameliorate and enhance immunologic cell function activity to keep its normal and beneficial action through antidamage protection.

**Key words** Se-enriched *lactobacillus*; rat hepatic fibrosis; GSH-Px; immunological cell

## 0 引言

肝纤维化是肝脏疾病共同可逆病理过程,进一步可发展为不可逆肝硬变.如果纤维化阶段给予合理控制和治疗,可以避免肝硬变发生<sup>[1,2]</sup>.  $\text{CCl}_4$  对肝细胞有明显的损伤作用,导致肝脂质过氧化,甚至肝硬变,同时继发性抑制机体的免疫功能活动<sup>[3]</sup>.富硒乳酸菌是一种借助乳酸菌利用无机硒转变成有机硒富集并生产有机硒的功能性制剂<sup>[4]</sup>.陈龙等研究显示,富硒乳酸菌能够提高正常机体抗氧化能力,明显改善  $\text{CCl}_4$  诱发肝损伤组织脂质过氧化反应及抗氧化酶活性系统,同时改善和提高免疫细胞功能活动发挥正常有效的作用<sup>[5]</sup>.然而富硒乳酸菌对  $\text{CCl}_4$  诱导的慢性肝纤维化大鼠病理生理发生过程中的保护作用尚未见报道.本研究通过  $\text{CCl}_4$  诱发肝纤维化大鼠模型,观察了日粮添加富硒乳酸菌干预肝纤维化大鼠肝组织 GSH-Px 活性及血液 T 和 B 淋巴细胞比例,红细胞免疫功能变化,旨在探讨富硒乳酸菌防止肝纤维化的作用及其机理,为其应用提供科学依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

选用 36 只健康 SD 大鼠(上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号: SCXK(沪) 2003-0003),雌雄各半,体重  $249.33 \pm 3.26$  g 经 1 周适应性饲养,随机分为 3 组,即对照组(C 组)、 $\text{CCl}_4$  注射组( $\text{CCl}_4$  组), $\text{CCl}_4$ -富硒乳酸菌制剂保护组( $\text{CCl}_4$ -Se 组),每组 12 只.  $\text{CCl}_4$  组和  $\text{CCl}_4$ -Se 组按  $0.3 \text{ mL}/100 \text{ g}$  体重皮下注射含 50%  $\text{CCl}_4$  的橄榄油,对照组注射同等剂量的橄榄油,按每 3 d 1 次,共注射 8 周.自注射之日起, C 组和  $\text{CCl}_4$  组饲喂普通全价饲料,  $\text{CCl}_4$ -Se 组饲喂添加含硒  $3 \text{ mg}/\text{kg}$  饲料的富硒乳酸菌制剂全价饲料<sup>[5]</sup>.大鼠自由采食、饮水,每天换水,隔日换笼中的木屑垫料以保持清洁.环境温度  $20^\circ\text{C} \sim 25^\circ\text{C}$ .

### 1.2 样品采集和处理

分别在  $\text{CCl}_4$  注射后 4、8 周对各组大鼠称重,并从各组取已编号的 6 只大鼠,乙醚麻醉,摘眼球采集血样  $3 \text{ mL}$ ,迅速放入含有肝素钠(1:500)的塑料管内,混匀,进行红细胞免疫功能实验、作血涂片用于 T、B 淋巴细胞比例测定,然后将血液置  $4^\circ\text{C}$  离心( $3000 \text{ r}/\text{min}$  20 min),取出血浆置  $-20^\circ\text{C}$  保存用于其它指标的测定.然后大鼠脱颈椎处死,打开腹腔,采集肝脏、称重,称取  $1 \text{ g}$  肝组织块放入生理盐水中漂洗,吸干,并适当剪成小碎块,加生理盐水  $5 \text{ mL}$ ,在  $4^\circ\text{C}$  条件下制成匀浆液,离心( $3500 \text{ r}/\text{min}$  30 min),取上清液置  $-20^\circ\text{C}$  保存待测.

### 1.3 测定指标和方法

(1) 肝脏指数:取出肝脏后,肉眼观察肝脏外形、体积、颜色、质地改变等,在生理盐水中清洗表面血液,并用滤纸洗干水份后称重,肝脏指数 = (肝重  $\div$  体重)  $\times 100\%$ .

(2) 肝组织谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活性: 硫代二硝基苯甲酸法,试剂盒由南京建成工程研究所提供.

(3) T 淋巴细胞比例: 酸性非特异性酯酶 (acidic  $\alpha$ -naphthyl acetate, ANAE) 组织化学染色法<sup>[6]</sup>.

(4) 红细胞 CR<sub>1</sub> 花环 (RBC-CR<sub>1</sub>R) 和红细胞免疫复合物花环 (RBC-ICR): 试验基本参照郭峰方法<sup>[7]</sup>.冻干补体致敏酵母多糖和冻干未致敏酵母多糖,由上海长海医院红细胞免疫室提供,用前用生理盐水洗涤 3 次后再配成  $1 \times 10^8/\text{mL}$  的酵母菌悬液.以一个红细胞上结有 2 个或 2 个以上酵母菌为 1 个花环,计数 200 个红细胞,计算百分率.

1.4 数据处理

以平均值和标准误 (Mean±SEM)表示, 用计算机统计软件包 Statistica对数据作 Students' t检验, 确定差异显著性.

2 实验结果

2.1 大鼠表现和肝脏指数变化

在实验过程中, C组大鼠行为未见异常, 体形外观、毛色特征和鼠粪形态质地等均正常, 宰杀剖检肝脏色泽暗红, 质地光滑柔软, 未见任何脏器病理变化. CCl<sub>4</sub>组大鼠注射 CCl<sub>4</sub>后即出现精神抑郁, 减食等症状; 毛色暗淡、紊乱; 肝脏大多明显肿大, 颜色灰白, 质地变硬, 表面呈粗糙橘皮状, 可见明显均匀分布的小结节, 肝组织切片 HE染色可见明显肝纤维化表现 (数据未显示). CCl<sub>4</sub>-Se组在整个实验期里没有明显临床症状, 肝脏体积稍大, 颜色稍显灰黄, 质地略粗糙, 但无小结节形成. HE染色肝纤维化程度明显减轻. 整个实验期内, 各组体重均随周龄增加而上升, 各组间虽无明显差异, 但 CCl<sub>4</sub>组低于其它两组; 表 1 显示, 肝脏指数 CCl<sub>4</sub>组最高, CCl<sub>4</sub>-Se组低于或明显低于 CCl<sub>4</sub>组但仍显著高于对照组.

2.2 富硒乳酸菌干预肝纤维化大鼠肝组织匀浆 GSH - Px 活性变化

在整个实验期内, CCl<sub>4</sub>组肝匀浆中 GSH - Px活性与 C组比较均明显下降. CCl<sub>4</sub>-Se组的 GSH - Px活性虽较 C组低, 但高于或明显高于 CCl<sub>4</sub>组 (表 2).

2.3 富硒乳酸菌干预肝纤维化大鼠血中 T 淋巴细胞比例变化

图 1 显示, 整个实验期, CCl<sub>4</sub>组大鼠 T-淋巴细胞 (%) 均呈显著下降的趋势, 而 CCl<sub>4</sub>-Se组大鼠 T-淋巴细胞 (%) 虽与对照组相比也下降, 但明显高于 CCl<sub>4</sub>组.

2.4 富硒乳酸菌干预肝纤维化大鼠血中红细胞免疫功能变化

由表 3 可见, 在实验第 4 周, CCl<sub>4</sub>组 RBC - CR<sub>1</sub>花环率和 RBC - IC花环率都较对照组稍有下降, 在第 8 周时, CCl<sub>4</sub>组 RBC - CR<sub>1</sub>花环率进一步下降, RBC - IC花环率已显著低于对照组, 而 CCl<sub>4</sub>-Se组的 RBC - CR<sub>1</sub>花环率和 RBC - IC花环率均高于 CCl<sub>4</sub>组, 并与对照组接近.

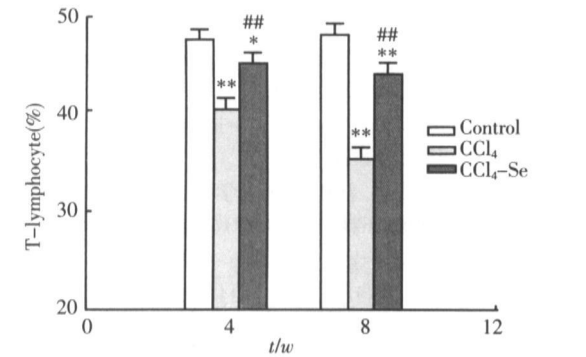


图 1 富硒乳酸菌干预肝纤维化大鼠血中 T 淋巴细胞比例变化  
Fig.1 Changes of blood ratios of T-lymphocytes in hepatic fibrosis rats intervened by Se-enriched lactobacillus

表 1 富硒乳酸菌干预肝纤维化大鼠肝脏指数变化

Table 1 Changes of hepatic index in hepatic fibrosis rats intervened by Se enriched lactobacillus

Index	Group	Post injection with CCl <sub>4</sub>	
		4 w	8 w
H epatic index(%)	Control	4.55±0.18	3.98±0.22
	CCl <sub>4</sub>	5.83±0.26*	6.26±0.14*
	CCl <sub>4</sub> -Se	5.70±0.37*	5.13±0.18**##

\* p < 0.05, \*\* p < 0.01 vs C group ## p < 0.01 vs CCl<sub>4</sub> group (n = 6 Mean±SEM)

表 2 富硒乳酸菌干预肝纤维化大鼠肝组织匀浆 GSH - Px活性变化

Table 2 Changes of GSH-Px activity in liver homogenate of hepatic fibrosis rats intervened by Se enriched lactobacillus

Index	Group	Post injection with CCl <sub>4</sub>	
		4 w	8 w
GSH - Px activity / (× 10 <sup>2</sup> U / g tissue)	Control	38.30±1.29	34.05±3.21
	CCl <sub>4</sub>	15.66±1.32*	17.00±1.51*
	CCl <sub>4</sub> -Se	22.71±1.88#	21.52±2.10*

\*\* p < 0.01 vs C group, # p < 0.05 vs CCl<sub>4</sub> group (n = 6, Mean±SEM)

表 3 富硒乳酸菌干预肝纤维化大鼠血中红细胞免疫功能变化

Table 3 Changes of RBC immune function in hepatic fibrosis rats intervened by Se-enriched lactobacillus

Index	Group	Post injection with CCl <sub>4</sub>	
		4 w	8 w
RBC - CR <sub>1</sub> Rosette rates %	Control	1.67±0.21	1.67±0.21
	CCl <sub>4</sub>	1.50±0.18	1.17±0.22
	CCl <sub>4</sub> -Se	1.58±0.30	2.00±0.37
RBC - IC Rosette rates %	Control	1.75±0.21	2.17±0.33
	CCl <sub>4</sub>	1.33±0.25	1.17±0.21*
	CCl <sub>4</sub> -Se	1.50±0.22	1.42±0.24

\* p < 0.05 vs C group (n = 6 Mean±SEM)

### 3 讨论

肝纤维化发生的机制是极为复杂的,目前已从化学药物、细胞因子、相关激素及其受体拮抗剂、基因调控等方面进行了广泛深入的探索<sup>[8]</sup>,但结果仍不尽人意。

本实验表明,随着肝损伤因素的持续存在,肝纤维化逐渐形成并加重。大鼠体重减轻,肝指数显著高于对照组,而富硒乳酸菌保护组大鼠肝脏指数较  $\text{CCl}_4$  诱导的大鼠显著降低,说明富硒乳酸菌制剂对  $\text{CCl}_4$  诱导的大鼠肝纤维化程度有明显的抑制作用。

本实验结果表明,  $\text{CCl}_4$  组肝组织匀浆中  $\text{GSH-Px}$  的活性在整个实验期间显著降低,而  $\text{CCl}_4-\text{Se}$  组  $\text{GSH-Px}$  活性均高于或显著高于  $\text{CCl}_4$  组。已有资料显示,抗氧化酶  $\text{GSH-Px}$  是生物体内一种重要的含硒酶,能催化过氧化氢还原,减少活性氧和自由基的产生,保护机体组织细胞中不饱和脂肪酸及其它脂类不被氧化破坏;而硒是  $\text{GSH-Px}$  的活性中心,其发挥作用的重要机制就是通过增强  $\text{GSH-Px}$  清除自由基抗氧化活性实现的<sup>[9-10]</sup>。本研究发现,富硒乳酸菌能显著提高肝纤维化大鼠组织匀浆的  $\text{GSH-Px}$  活性,说明富硒乳酸菌可能通过改善和提高组织细胞抗氧化酶活性机制发挥抗纤维化的保护作用。

T 淋巴细胞是体内最重要的免疫活性细胞之一。在整个实验期,  $\text{CCl}_4$  组 T-淋巴细胞 (%) 与对照组相比显著下降,而富硒乳酸菌保护组的下降趋势有所缓解,说明富硒乳酸菌能提高机体的细胞免疫功能,保护  $\text{CCl}_4$  诱导的肝纤维化大鼠的细胞免疫抑制。

红细胞免疫系统是机体免疫系统不可缺少的重要组成部分, Fearon 等指出血循环中 95% 的  $\text{C}_3\text{b}$  受体 ( $\text{CR}_1$ ) 存在于红细胞表面,因此红细胞  $\text{CR}_1$  是红细胞免疫粘附作用的关键部位,并在运送和清除 IC 方面起着重要作用<sup>[11]</sup>。本研究表明,在整个实验期内,  $\text{CCl}_4$  组的  $\text{RBC}-\text{CR}_1$  花环率和  $\text{RBC}-\text{IC}$  花环率均低于对照组,说明  $\text{CCl}_4$  可对大鼠的红细胞免疫功能造成损伤,使其红细胞免疫功能低下,不仅有  $\text{C}_3\text{b}$  受体活性的下降,还可能有数量的减少。按照郭峰的分类法,这种表现类型属于原发性红细胞免疫功能低下或失代偿性红细胞免疫功能低下。分析认为,发生机理可能是  $\text{CCl}_4$  注射导致机体红细胞  $\text{C}_3\text{b}$  受体受到损害,使其粘附活性消失,不能粘附免疫复合物。而富硒乳酸菌对大鼠  $\text{RBC}-\text{CR}_1$  花环形成及  $\text{RBC}-\text{IC}$  花环形成有一定的促进作用,说明富硒乳酸菌能增强大鼠红细胞膜  $\text{C}_3\text{b}$  受体活性及粘附 IC 的能力,即对大鼠红细胞免疫功能有一定的增强作用。

鉴于以上实验结果,富硒乳酸菌保护组大鼠的各项指标均较  $\text{CCl}_4$  诱导组接近于对照组,说明了富硒乳酸菌通过保护肝组织抗氧化酶活性,改善和提高血液 T 淋巴细胞和红细胞免疫细胞功能活动发挥正常有效的作用,从而有效地干预肝纤维化的进一步发展。

### [参考文献]

- [1] Shen L, Fan J G, Shao Y, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver among administrative officers in Shanghai: an epidemiological survey [J]. *World J Gastroenterol* 2003, 9(5): 1106-1110
- [2] Riley T R 3rd, Bhatti A M. Preventive strategies in chronic liver disease: part II: Cirrhosis [J]. *Am Fam Physician* 2001, 64(10): 1735-1740
- [3] 王丙云,陈龙,毛鑫智,等.  $\text{CCl}_4$  诱导肝损伤对大鼠细胞免疫功能的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 1999, 7(12): 1091-1092
- [4] 周娟,陈龙,陈林君,等. 富硒乳酸菌对肝损伤小鼠红细胞脂质过氧化和免疫功能影响 [J]. *营养学报*, 2003, 25(4): 405-408
- [5] Chen L, Pan D D, Zhou J, et al. Protective effect of selenium-enriched lactobacillus on  $\text{CCl}_4$ -induced liver injury in mice and its possible mechanism [J]. *World J Gastroenterol* 2005, 11(37): 5795-5800
- [6] 王承浩,唐玉新,王亚鸣. T-淋巴细胞的酸性非特异性酯酶标记及其定位 [J]. *江西农业大学学报*, 1984(1): 1-10
- [7] 郭峰,虞紫茜,赵中平. 红细胞免疫功能的初步研究 [J]. *中国医学杂志*, 1982, 62(12): 715-716
- [8] 李石. 肝纤维化发生机制 [J]. *中华消化杂志*, 1999, 19(1): 115-122
- [9] 李宣海,汪余勤,程五凤,等. 不同硒水平饲料对大鼠抗氧化和肝纤维化的影响 [J]. *中华消化杂志*, 1999, 19(5): 309-311
- [10] Rotruck J T, Pope A L, Ganther H E, et al. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase [J]. *Science* 1973, 179(73): 588-590
- [11] Fearon D T. Identification of the membrane glycoprotein that is the  $\text{C}_3\text{b}$  receptor of the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte, and monocyte [J]. *J Exp Med* 1980, 152(1): 20-30

[责任编辑: 孙德泉]