

# 妊娠及哺乳期母鼠注射麻黄素对仔鼠肝组织 TGF- $\beta_1$ 和 c-Fos 表达的影响

孟茹<sup>①</sup> 安晶晶<sup>①</sup> 俞诗源<sup>①②\*</sup> 袁静<sup>①</sup> 魏娉婷<sup>①</sup>

① 西北师范大学生命科学学院 兰州 730070; ② 西北师范大学学报编辑部 兰州 730070

**摘要:** 为探讨妊娠及哺乳期小鼠 (*Mus musculus*) 注射麻黄素后对仔鼠肝组织 TGF- $\beta_1$  及 c-Fos 表达的影响, 将 30 例受孕小鼠随机分为对照组和麻黄素组。麻黄素组小鼠从受孕第 3 天开始连续腹腔注射 6.0 g/L 麻黄素溶液直到分娩后 15 天, 每天注射 2 次, 每次 0.2 ml; 对照组每天 2 次注射等量的生理盐水。称量检测仔鼠体重和肝重的变化, 同时用免疫组织化学方法检测仔鼠肝组织中细胞生长因子 TGF- $\beta_1$  和原癌基因 c-Fos 蛋白表达的变化。麻黄素组仔鼠体重与对照组相比显著降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 肝体比与对照组相比明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 仔鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$  和 c-Fos 蛋白阳性表达强度与对照组相比有不同程度的增强 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 表明妊娠及哺乳期小鼠注射麻黄素影响仔鼠肝的发育。

**关键词:** 麻黄素; 仔鼠; 肝; TGF- $\beta_1$ ; c-Fos; 免疫组织化学

**中图分类号:** Q495 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2015) 03-352-07

## Effects of Ephedrine Injection during Pregnancy and Lactation on TGF- $\beta_1$ and c-Fos Expression in the Liver of Filial Mice

MENG Ru<sup>①</sup> AN Jing-Jing<sup>①</sup> YU Shi-Yuan<sup>①②\*</sup> YUAN Jing<sup>①</sup> WEI Pin-Ting<sup>①</sup>

① College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730070; ② Editorial Department of the University Journal, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, China

**Abstract:** To investigate the TGF- $\beta_1$  and c-Fos expression in mouse (*Mus musculus*) liver after injecting ephedrine during pregnancy and lactation, 30 pregnant mice were randomly divided into control group and ephedrine group. The pregnant mice of ephedrine group was intraperitoneally injected twice a day with 0.2 ml 6.0 g/L ephedrine solution from 3 days of pregnancy to 15 days after delivery, while the control group was injected with same amount of saline. Changes of body weight and liver weight were detected and the expression of c-Fos protein and TGF- $\beta_1$  were measured by immunohistochemistry in the liver of filial mice. The results showed that the body weight in ephedrine group was lower than that of the control group at the

**基金项目** 甘肃省自然科学基金项目 (No. 1107RJZA141), 兰州市社会发展项目 (No. 2013-3-72);

\* 通讯作者, E-mail: syyu006@nwnu.edu.cn;

**第一作者介绍** 孟茹, 女, 硕士研究生; 研究方向: 动物发育生物学; E-mail: hsbkwwt@163.com。

收稿日期: 2014-07-30; 修回日期: 2014-12-02 DOI: 10.13859/j.cjz.201503004

developmental period (Fig. 1) ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The ratio of liver and body weight in the ephedrine group was significantly increased than the control group (Fig. 2) ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). The optical density of TGF- $\beta_1$  and c-Fos protein expression in the liver of ephedrine group was significantly increased than that of the control group at the each developmental period (Fig. 3 - 5) ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The results reveal that ephedrine affects the development of liver in filial mouse after injecting ephedrine during pregnancy and lactation.

**Key words:** Ephedrine; Filial mice; Liver; TGF- $\beta_1$ ; c-Fos; Immunohistochemistry

麻黄素 (ephedrine, EPH) 又称麻黄碱, 有收缩血管、增加汗腺及唾液腺分泌、缓解平滑肌痉挛的作用, 它对中枢神经系统有兴奋作用, 长期过量或滥用麻黄素会致其成瘾和产生依赖性, 出现心肌梗塞、癫痫和意识丧失等多种临床症状, 严重时甚至出现死亡 (刘志民 2002, Abourashed et al. 2003)。有关麻黄素不良反应的报道大多集中于心血管系统和神经系统, 近来国内外学者开始关注麻黄素对组织器官的影响, Nadir等 (1996) 报道长期服用麻黄制剂后出现4例急性肝炎, 孙隽等 (2012) 发现仔鼠 (*Mus musculus*) 注射麻黄素后肝有不同程度的损伤, 且超氧化物歧化酶、过氧化氢酶的活性降低, 而丙二醛含量升高。有研究表明, 女性在妊娠期间吸食苯丙胺类药物不仅会造成本身的伤害, 也可能导致胎儿畸形、发育障碍等 (乔石等 2003), 研究亦表明, TGF- $\beta_1$  和 c-Fos 参与肝细胞的凋亡及损伤修复等过程 (Weiner et al. 1990, 余日安等 2004)。但有关孕妇应用麻黄素是否对胎儿有影响的研究鲜有报道, 本研究对妊娠及哺乳期雌鼠连续腹腔注射麻黄素后, 观察 TGF- $\beta_1$  和 c-Fos 蛋白在仔鼠肝发育中的表达, 探讨妊娠及哺乳期母鼠注射麻黄素后对仔鼠肝发育的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂

盐酸麻黄素 (甘肃省公安厅提供, 纯度  $\geq 98\%$ ), 根据半数致死量及成瘾量将盐酸麻黄素用生理盐水配制成 6.0 g/L 水溶液, 4 ~ 6°C 下保存备用。TGF- $\beta_1$  和 c-Fos 蛋白、SP 法免疫试剂盒

(武汉博士德公司) 置 4°C 冰箱保存; 二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 显色剂为北京中杉金桥生物技术有限公司产品。

### 1.2 实验动物处理

选取昆明小鼠 45 只 (来源于兰州大学实验动物中心), 体重 25 ~ 30 g, 实验前适应性饲养 1 周后按雌雄比例为 2 : 1 合笼, 按王昱 (2009) 的方法检查小鼠受孕情况, 将 30 例受孕小鼠随机分为对照组和麻黄素组。麻黄素组小鼠从受孕第 3 天开始每天腹腔注射 6.0 g/L 麻黄素溶液 2 次, 分别在 9:00 时和 16:00 时进行注射, 每次注射量为 0.2 ml, 至孕小鼠分娩后 15 天, 对照组每天同一时间腹腔注射等量的生理盐水。

### 1.3 体重、肝重检测

分别取对照组和麻黄素组出生 1 d、5 d、10 d、15 d 的仔鼠, 用电子天平 (JA1003B, 上海越平科学仪器有限公司, 精度 1 mg) 称量体重后处死, 取出肝, 用滤纸吸水后称量肝重, 并计算肝体比, 然后将肝组织切块放入 15% 福尔马林溶液固定备用。

### 1.4 免疫组织化学观察

分别取上述固定的仔鼠肝组织块, 按试剂盒操作要求, 制作仔鼠肝组织切片, 脱蜡至水, 柠檬酸钠缓冲液微波抗原修复, 3%  $H_2O_2$  孵育消除内源性过氧化物酶活性, 山羊血清封闭, 一抗用兔抗 TGF- $\beta_1$  (1 : 50)、c-Fos (1 : 50) 蛋白于 4°C 过夜, PBS 冲洗后, 滴加生物素标记的二抗 (羊抗兔 IgG) 37°C 孵育 30 min, 滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液 37°C 孵育 30 min, 阴性对照用 PBS 代替一抗, DAB 显色, 苏木精复染, 常规脱水、透明、封片, 生

物显微镜观察TGF-β<sub>1</sub>和c-Fos蛋白的表达并拍照。

### 1.5 图像分析与数据处理

用冯红丽等(2009)的方法,利用Image-proplus 6.0对图像进行定量分析,每张切片选取5个视野(10×40),分析TGF-β<sub>1</sub>、c-Fos蛋白在每张切片上表达的平均光密度值。实验数据用SPSS 13.0进行统计分析,结果以平均值±标准差(Mean±SD)表示,两组间均数比较采用双尾t-检验。

## 2 结果

### 2.1 仔鼠体重的变化

妊娠及哺乳期母鼠注射麻黄素后仔鼠的体重与对照组相比均有不同程度的降低(图1)。麻黄素组仔鼠体重在5 d、10 d、15 d与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P < 0.01$ )。

### 2.2 仔鼠肝体比的变化

妊娠及哺乳期母鼠注射麻黄素后仔鼠肝体比与对照组相比均有不同程度的升高(图2)。麻黄素组仔鼠肝体比在5 d、10 d、15 d与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ )或极显著( $P <$

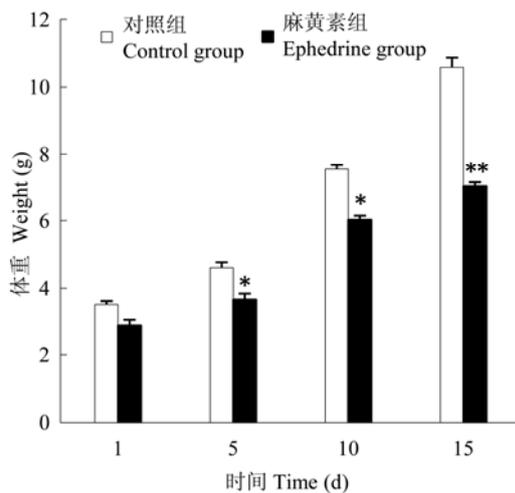


图1 仔鼠体重的变化

Fig. 1 The change of weight of filial mice

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Comparison with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

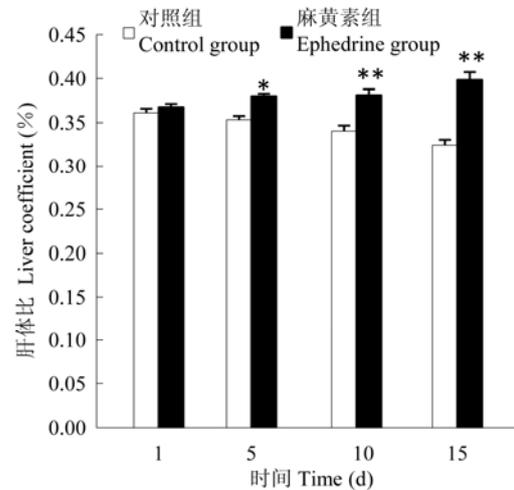


图2 仔鼠肝体比的变化

Fig. 2 The change of liver coefficient of filial mice

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Comparison with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

0.01)。

### 2.3 仔鼠肝组织 TGF-β<sub>1</sub> 表达的变化

免疫组织化学结果显示,TGF-β<sub>1</sub>在肝组织中的阳性表达部位呈棕色或棕黄色(图3a~c),对照组仔鼠肝组织中TGF-β<sub>1</sub>阳性细胞数量少(图3a);麻黄素组仔鼠肝组织中TGF-β<sub>1</sub>阳性表达与对照组相比有不同程度的增强,阳性细胞数量多而密集,染色较深,主要见于部分肝细胞、肝血窦内皮细胞中(图3b,c)。麻黄素组1 d、5 d仔鼠肝中TGF-β<sub>1</sub>阳性表达与同期对照组相比增加,但差异不显著( $P > 0.05$ ),10 d仔鼠肝中TGF-β<sub>1</sub>阳性表达强度大于对照组,且差异显著( $P < 0.05$ ),15 d仔鼠肝中TGF-β<sub>1</sub>呈强阳性表达,与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ )(图4)。

### 2.4 仔鼠肝组织 c-Fos 蛋白表达的变化

免疫组织化学结果显示,c-Fos蛋白在仔鼠肝中的阳性表达部位呈棕色或棕黄色(图3d~h)。对照组仔鼠肝组织中c-Fos蛋白阳性细胞数量少(图3d,e);麻黄素组仔鼠肝组织c-Fos蛋白阳性表达与对照组相比有不同程度的增强,阳性细胞数量多而密集,染色较深(图3f~h)。麻黄素组1 d仔鼠肝c-Fos蛋白阳性表达与对照组相比增强,但差异不显著( $P > 0.05$ ),

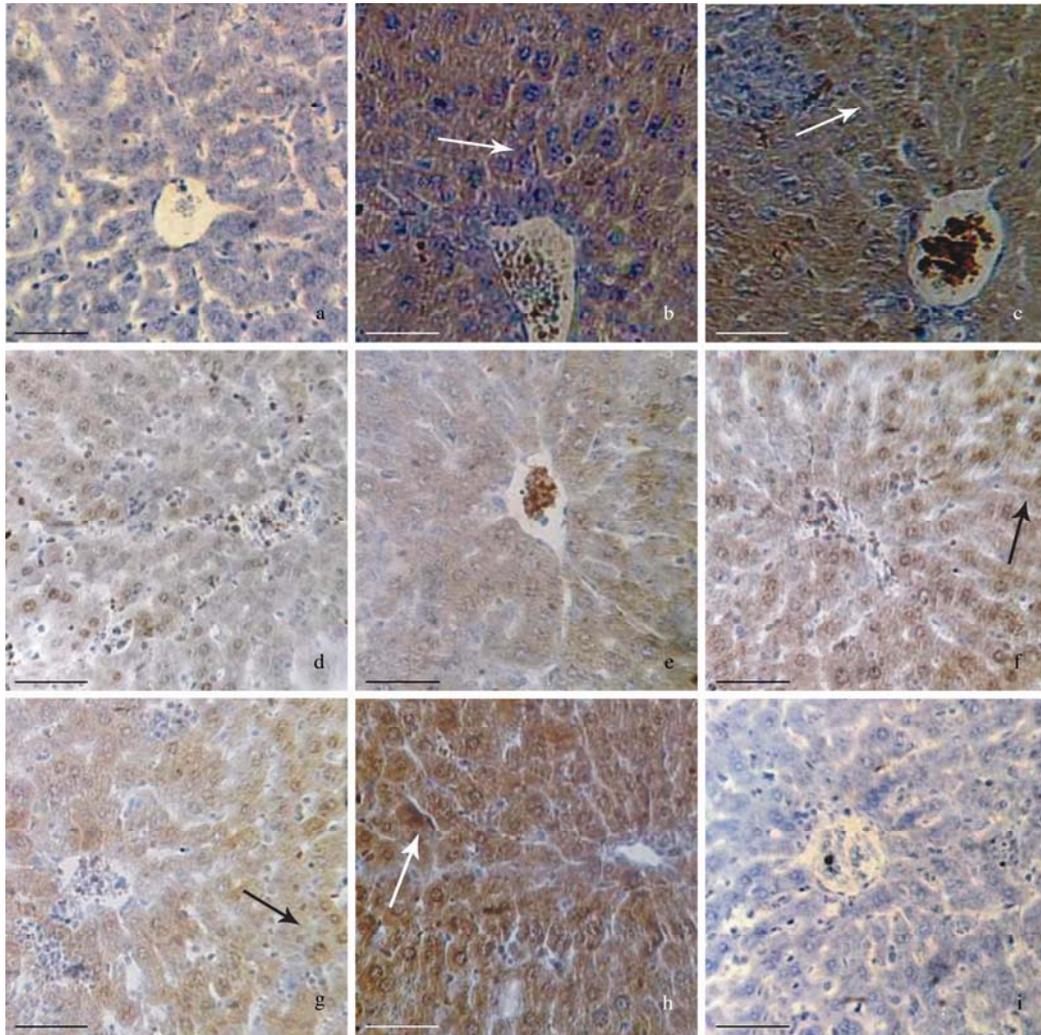


图 3 仔鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub> 和 c-Fos 蛋白的表达

Fig. 3 Change of TGF-β<sub>1</sub> and c-Fos protein expression in liver of filial mice

a. 对照组 5 d 仔鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub> 的表达；b. 麻黄素组 5 d 仔鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub> 的表达；c. 麻黄素组 10 d 仔鼠肝组织中 TGF-β<sub>1</sub> 的表达；d. 对照组 10 d 仔鼠肝组织中 c-Fos 蛋白的表达；e. 对照组 15 d 仔鼠肝组织中 c-Fos 蛋白的表达；f. 麻黄素组 5 d 仔鼠肝组织中 c-Fos 蛋白的表达；g. 麻黄素组 10 d 仔鼠肝组织中 c-Fos 蛋白的表达；h. 麻黄素组 15 d 仔鼠肝组织中 c-Fos 蛋白的表达；i. 阴性对照；↑ 指示阳性表达；标尺为 20 μm。

a. Expression of TGF-β<sub>1</sub> in control group mouse liver at day 5; b. Expression of TGF-β<sub>1</sub> in ephedrine group mouse liver at day 5; c. Expression of TGF-β<sub>1</sub> in ephedrine group mouse liver at day 10; d. Expression of c-Fos protein in control group mouse liver at day 10; e. Expression of c-Fos protein in control group mouse liver at day 15; f. Expression of c-Fos protein in ephedrine group mouse liver at day 5; g. Expression of c-Fos protein in ephedrine group mouse liver at day 10; h. Expression of c-Fos protein in ephedrine group mouse liver at day 15; i. Negative control of filial mouse liver; ↑ Showing positive expression; Bar = 20 μm.

5 d、10 d 子鼠肝组织 c-Fos 蛋白阳性表达强度显著大于对照组 ( $P < 0.05$ ), 15 d 子鼠肝 c-Fos

蛋白表达强度极显著大于对照组 ( $P < 0.01$ ) (图 5)。阴性对照组无棕黄色反应物 (图 3i)。

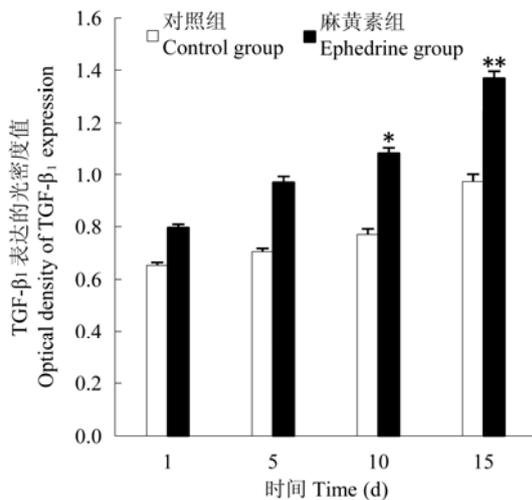


图 4 仔鼠肝 TGF-β<sub>1</sub> 表达的光密度变化

Fig. 4 The change in average optical density of TGF-β<sub>1</sub> expression in the liver of filial mice

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Comparison with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

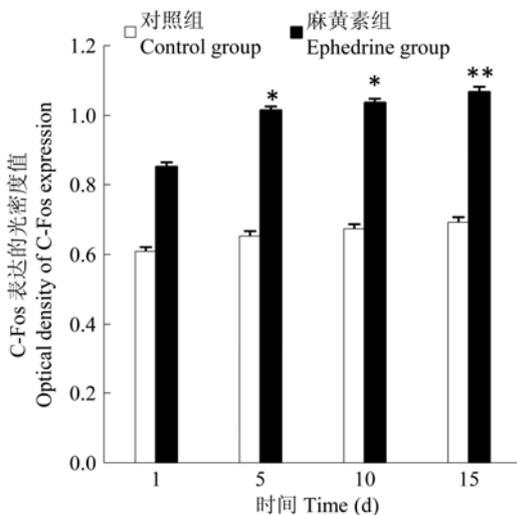


图 5 仔鼠肝 c-Fos 表达的光密度变化

Fig. 5 The change in average optical density of c-Fos expression in the liver of filial mice

与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

Comparison with the control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

### 3 讨论

#### 3.1 麻黄素对仔鼠体重和肝体比的影响

麻黄素是一种中枢神经类药物, 可兴奋下

丘脑的饱食中枢, 增加饱腹感而抑制摄食中枢的活动, 并可引起神经兴奋而增加能量消耗, 使体脂减少, 从而达到减肥目的 (Shekelle et al. 2003)。苯丙胺等早期的中枢兴奋剂因产生欣快感, 具有成瘾性和依赖性, 滥用易造成危害。本实验中麻黄素组仔鼠体重均低于对照组, 这与前期的研究报道一致 (俞诗源等 2013)。孕妇吸食甲基苯丙胺可致胎儿畸形, 增加早产儿、新生儿死亡和宫内死胎的发生率 (Osada et al. 1986, 俞诗源等 2010), 麻黄素对妊娠期孕小鼠本身有危害 (俞诗源等 2014), 并会通过胎盘对体内的胎儿造成一定的影响。妊娠及哺乳期母鼠长时间注射麻黄素后, 母体内所积累的麻黄素或产生的大量代谢残留物会通过血胎屏障或乳汁进入仔鼠体内, 引起仔鼠食欲降低, 摄食量降低, 导致仔鼠因营养不良而使体重下降。肝是机体内物质代谢和药物代谢及解毒的器官, 任何影响机体代谢的物质进入体内都会导致肝功能异常。本实验中麻黄素组仔鼠肝体比高于对照组, 可能是给母鼠长时间注射麻黄素后间接影响了仔鼠的活动, 导致仔鼠兴奋性增强, 活动量明显增加, 加速了能量消耗, 促进了肝糖原分解, 同时部分麻黄素长期滞留在肝中, 对仔鼠肝亦造成了严重损伤 (孙隽等 2012), 使仔鼠肝发育受到影响, 肝重量明显降低, 但其与体重的比值有所升高。

#### 3.2 麻黄素对仔鼠肝组织TGF-β<sub>1</sub>表达的影响

肝纤维化是由于细胞外基质的合成与降解失调所致, 其发生的中心环节就是肝星状细胞 (hepatic satellite cell, HSC) 的激活, 而细胞生长因子TGF-β<sub>1</sub>在肝星状细胞的激活、促进细胞外基质合成方面发挥着重要作用 (Gressner et al. 2002)。当肝发生损伤时, 肝内星状细胞、枯否细胞等通过旁分泌与自分泌途径, 释放细胞因子和可溶性因子相互作用, 参与肝纤维化的发生与发展, 受损的肝细胞不断合成TGF-β<sub>1</sub>, 引起肝星状细胞活化, 增加细胞外基质的合成, 同时贮脂细胞会大量分泌 I、III、IV型胶原从而抑制细胞外基质的降解, 使肝纤

维化加剧 (Bedossa et al. 1995, 陈晓红等 2001)。本实验中,麻黄素组仔鼠肝组织TGF- $\beta_1$ 阳性表达程度随着时间的延长而呈明显的递增趋势,表明TGF- $\beta_1$ 表达水平与肝纤维化严重程度密切相关。长时间给妊娠期及哺乳期母鼠注射麻黄素后,母鼠体内积累的或大量代谢残留的麻黄素通过血胎屏障或乳汁进入仔鼠体内,产生过多的活性氧攻击肝细胞,促使脂质过氧化水平升高,造成仔鼠肝组织炎症的发生,启动了肝纤维化的形成,使肝组织内间质细胞、枯否细胞等合成TGF- $\beta_1$ 增加,TGF- $\beta_1$ 激活星状细胞(HSC),促进细胞外基质的合成及积累使肝纤维化加剧。另外麻黄素长期在体内积累,超过了肝代偿能力,会引起大量肝细胞凋亡。

### 3.3 麻黄素对仔鼠肝组织 c-Fos 蛋白表达的影响

*c-fos* 基因属于即刻早期基因(immediate-early gene, IEG)之一,可表达产生 c-Fos 蛋白,为核内蛋白类细胞癌基因(王悦等 2011)。在大多数正常细胞中表达水平较低,而在体内外生物、化学、物理因素的刺激下,均可引起 *c-fos* 基因的快速表达,并且可与 Jun 蛋白家族形成异源二聚体调节转录激活蛋白 AP-1 的活性,参与对目的基因表达的调控及细胞间的信息传递,影响细胞增殖、分化及凋亡(刘平等 2004)。研究表明, *c-fos* 原癌基因在内外因素的刺激下被激活,使 c-Fos 蛋白的表达增加,过量的 c-Fos 蛋白将启动 Caspase 级联反应,导致细胞凋亡加速(王悦等 2011)。在细胞生长静止期 c-Fos 蛋白基本不表达,当肝组织增生时会导致其有阳性表达,但表达量极低(王悦等 2011)。本实验结果表明,当妊娠期及哺乳期给母鼠长期注射麻黄素后仔鼠肝中的 c-Fos 阳性表达明显增强,可见 *c-fos* 作为早期应答基因,在麻黄素的刺激下能够被诱导快速表达。仔鼠处在发育阶段,各个器官还未发育完全,而且一直受到麻黄素的影响,肝作为代谢及解毒器官会首先受到损伤,激活肝中 *c-fos* 原癌基因,诱导 c-Fos 蛋白的大量表达。麻黄素积累时间越长, c-Fos 阳性表达

的光密度值越高,提示麻黄素诱导肝组织损伤的机理可能与 *c-fos* 基因的表达相关。

综上所述,妊娠期及哺乳期小鼠注射麻黄素后会影响到仔鼠的体重和肝重,影响仔鼠肝组织中 TGF- $\beta_1$  和 c-Fos 蛋白的表达,由此可能影响到仔鼠肝的组织结构,引起仔鼠肝细胞的凋亡,其具体机理还有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- Abourashed E A, El-Alfy A T, Khan I A, et al. 2003. Ephedra in perspective—a current review. *Phytotherapy Research*, 17(7): 703–712.
- Bedossa P, Paradis V. 1995. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ): A key-role in liver fibrogenesis. *Journal of Hepatology*, 22(Suppl 2): 37–42.
- Gressner A M, Weiskirchen R, Breitkopf K, et al. 2002. Roles of TGF- $\beta$  in hepatic fibrosis. *Frontiers in Bioscience*, 4(1): 793–807.
- Nadir A, Agarwal S, King P D. 1996. Acute hepatitis associated with the use of a Chinese herbal product, Ma-huang. *American Journal of Gastroenterology*, 91(7): 1436–1438.
- Osada J, Aylagas H, Sanchez-Vegazo I, et al. 1986. Effect of S-adenosyl-L-methionine on thioacetamide-induced liver damage in rats. *Toxicology Letters*, 32(1/2): 97–106.
- Shekelle P G, Hardy M L, Morton S C, et al. 2003. Efficacy and safety of ephedra and ephedrine for weight loss and athletic performance: a meta-analysis. *The Journal of the American Medical Association*, 289(12): 1537–1545.
- Weiner F R, Giambone M A, Czaja M J, et al. 1990. Ito-cell gene expression and Collagen regulation. *Hepatology*, 11(1): 111–117.
- 陈晓红, 何有成, 周元平, 等. 2001. TGF- $\beta_1$ 、TNF- $\alpha$  及 IL-6 与肝纤维化的关系. *上海免疫学杂志*, 21(6): 364–368.
- 冯红丽, 俞诗源, 王昱, 等. 2009. 金雕肺的组织结构及 KGF、c-Fos 和 Bax 的表达. *动物学杂志*, 44(1): 33–38.
- 刘平, Dominique B. 2004. 肝癌发生过程中转录因子AP-1活化的研究. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 24(1): 28–30.
- 刘志民. 2002. 苯丙胺类中枢兴奋剂滥用防治. *中国药物滥用防治杂志*, (3): 4–14.

- 乔石, 何丽萍. 2003. 苯丙胺类兴奋剂对妊娠期母儿的影响. 中国药物滥用防治杂志, 9(6): 35-37.
- 孙隽, 李重阳, 俞诗源, 等. 2012. 麻黄素对仔鼠肝组织结构和相关活性物质的影响. 解剖学报, 43(3): 398-404.
- 王昱. 2009. 兴奋剂对生长发育期小鼠大脑颞叶皮层组织结构和相关酶活性物质及学习记忆能力的影响. 兰州: 西北师范大学硕士学位论文.
- 王悦, 邓海平, 俞诗源. 2011. X 射线对仔鼠皮肤组织结构及 c-Fos、KGF 表达的影响. 动物学杂志, 46(3): 123-130.
- 余日安, 马良, 陈学敏. 2004. 硒对大鼠肝细胞凋亡和原癌基因 *c-myc*、*c-fos* 和 *c-jun* 表达的影响. 卫生毒理学杂志, 18(2): 67-69.
- 俞诗源, 陈琛. 2013. 中药复方对麻黄素成瘾小鼠大脑颞叶结构的影响. 西北师范大学学报: 自然科学版, 49(2): 84-89.
- 俞诗源, 刘小媛, 吴转子, 等. 2014. 中药复方液对麻黄素损伤小鼠卵巢的保护作用. 西北师范大学学报: 自然科学版, 50(3): 79-87.
- 俞诗源, 王悦, 郭婷婷, 等. 2010. 海洛因对母鼠体重、行为及肺中相关活性物质表达的影响. 西北师范大学学报: 自然科学版, 46(2): 94-100.

## 《动物学杂志》第十二届编辑委员会

**名誉主编:** 马 勇

**主 编:** 宋延龄

**副主编:** 赵 勇 彭景榭 孙悦华 梁 冰 (常务)

**编 委:** (以姓氏笔画为序)

丁长青 马 勇 马志军 马建章 王德华 计 翔 石树群 边疆晖 刘洒发  
 孙青原 孙悦华 宋延龄 宋林生 宋昭彬 张正旺 张明海 张春光 张树义  
 张堰铭 李 明 李枢强 李保国 李春旺 李新正 杨增明 陈广文 宛新荣  
 郑光美 费 梁 赵 勇 赵亚辉 夏国良 徐宏发 桂建芳 梁 冰 彭贤锦  
 彭景榭 曾治高 蒋志刚 蒋学龙 谢 锋 戴家银 魏辅文

**编 辑:** 梁 冰 尹 航