论著

文章编号:1000-5404(2006)11-1184-04

谷氨酰胺对急性肝损伤的保护作用及临床意义

王伟强,任成山 (第三军医大学新桥医院消化内科,重庆 400037)

提 要: 目的 探讨谷氨酰胺(GLN)在急性肝损伤中的保护作用及临床意义。**方法** SD大鼠分为3组:模型组、GLN干预组、对照组。采用四氯化碳(CCl_4)腹腔注射诱导急性肝损伤模型。分别于致伤后4、8、12、16、24 h取大鼠血清,全自动生化分析仪检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平;光镜下观察大鼠肝脏病理学改变;电镜下观察肝组织超微结构及细胞胀亡;免疫组织化学染色法检测肝组织核因子-κB(NF-κB)的表达;RT-PCR方法检测肝组织肿瘤坏死因子-α(TNF-α)mRNA的表达;末端脱氧核苷酸转移酶(TdT)介导的2dUTP缺口末端标记技术(TUNEL)检测肝细胞凋亡。**结果** 模型组各时相ALT、AST、NF-κB、TNF-α mRNA与对照组相比均明显增高($P<0.01$),GLN干预组较模型组明显减低($P<0.05$)。光镜下发现模型组大鼠肝组织结构紊乱,有不同程度的肝细胞损伤和炎性细胞浸润。GLN干预组与模型组同时相相比损伤较轻。透射电镜下发现肝细胞出现细胞质肿胀、核溶解性坏死等胀亡样改变及细胞质萎缩、核固缩等凋亡样改变,GLN干预组肝细胞胀亡指数(OI)及凋亡指数(AI)明显低于模型组($P<0.05$)。**结论** GLN可保护CCl_4所致大鼠急性肝损伤,降低血清ALT、AST水平,抑制肝组织NF-κB及TNF-α的表达,保护肝细胞结构及功能完整,减少肝细胞的凋亡及胀亡。

关键词: 谷氨酰胺;肝损伤;急性;核因子-κB;肿瘤坏死因子-α;凋亡;胀亡;细胞

中图法分类号: R459.7; R575; R977.4 **文献标识码**: A

Protective effect of glutamine on acute hepatic injury

WANG Wei-qiang, REN Cheng-shan (Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the roles and clinical significance of glutamine (GLN) in carbon tetrachloride (CCl_4) induced acute hepatic injury. **Methods** The SD rats were divided into model group, GLN pretreated group and control group. The animal model was established by CCl_4 intraperitoneal injection. GLN at dose of 1 g/kg was intragastrically administrated for 7 d before intraperitoneal injection of CCl_4 in the rats of GLN pretreated group. The rats were executed 4, 8, 12, 16, 24 h after injure. To evaluate the hepatic injury, the serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected by automatic biochemistry analysator. The liver tissue was observed by light microscope and transmission electron microscope (TEM). The expression of nuclear factor-κB (NF-κB) was detected by immunohistochemistry and the tumor necrosis factor-α (TNF-α) was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The apoptosis of hepatocyte was detected by TUNEL. The oncosis index was detected by TEM. **Results** The levels of ALT, AST, NF-κB, TNF-α mRNA in model group were apparently elevated as compared to control group ($P<0.01$), but those in GLN pretreated group were lower than model group ($P<0.05$). The confused structure of hepatocytes and inflammatory infiltration were observed by light microscope. Compared to the model group, the hepatic injury in GLN pretreated group were apparently attenuated. Under TEM, the apoptotic hepatocytes showed endochylema atrophia and karyopyknosis, but the oncotic hepatocytes showed endochylema swelling and karyolysis. Both the apoptosis index and oncosis index in GLN pretreated group were apparently lower than those in model group ($P<0.05$). **Conclusion** GLN can control the level of ALT and AST, inhibit the expression of NF-κB and TNF-α mRNA, reduce the apoptosis and oncosis of hepatocytes. GLN plays a significant role in the CCl_4 induced acute rat hepatic injury.

Key words: glutamine; acute hepatic injury; nuclear factor-κB; tumor necrosis factor-α; apoptosis; oncosis; cell

基金项目:全军医学科学技术研究"十五"计划基金重点课题(01Z074)

Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-Year Plan" of PLA(01Z074)

作者简介:王伟强(1977-),男,河北省唐县人,硕士研究生,主要从事急性肝损伤方面的研究。电话:(023)68774665

通讯作者:任成山,电话:(023)65241609,E-mail:Renchengsh@sina.com

收稿日期:2005-09-20;**修回日期**:2005-12-31

谷氨酰胺（glutamine，GLN）是人体内含量最为丰富的游离氨基酸，是重要的氮运载体和供体，在机体对氨的解毒作用中发挥着重要功能。同时，GLN 还是嘌呤、嘧啶、蛋白质、核苷酸以及抗氧化剂谷胱甘肽（glutathione-SH，GSH）等物质的前体[1]。最近研究表明 GLN 能够调节一些基因的表达如 p47phox、p22phox、gp91phox、α-actin、纤维连接蛋白，活化一些蛋白如抗链激酶-1、c-my、c-jun、和 p70s6k[2]。在剧烈运动、创伤、感染等应激和高分解状态下，GLN 的需要量大大超过了机体合成 GLN 的能力，此时机体 GLN 含量降低，导致蛋白质合成减少，影响许多组织和细胞包括肝脏、肠道、肾脏、中枢神经系统、免疫细胞和胰腺 β 细胞的功能。目前，GLN 在急性肝损伤尤其是肝细胞凋亡和胀亡中的作用仍未完全阐明。本实验通过四氯化碳（carbon tetrachloride，CCl_4）致大鼠急性肝损伤模型，研究 GLN 在急性肝损伤中的保护作用及意义。

1　材料与方法

1.1　主要试剂

CCl_4（分析纯）购自重庆市医药股份有限公司，GLN（分析纯）购自北京鼎国生物技术发展中心，NF-κBp65 单克隆抗体购自 Santa 公司，S-P 9001 试剂盒购自北京中杉试剂公司，RT-PCR 试剂盒购自 Promega 公司，TUNEL 染色试剂盒及 Tripure 购自 Roche 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　实验动物模型的制备　　50 只健康、成年、正交系 SD 大鼠（购于第三军医大学实验动物中心），体质量 200～300 g，雌雄不拘。分成 3 组：对照组（$n=10$）、模型组（$n=20$）、GLN 干预组（$n=20$）。适应性喂养 1 周后，GLN 干预组事先以 GLN 1 g/kg 灌胃 7 d，模型组和 GLN 干预组均给予 25% CCl_4 橄榄油溶液 400 mg/kg 腹腔注射，对照组按同样方法给予等量橄榄油腹腔注射[3]。

1.2.2　血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）、门冬氨酸氨基转移酶（AST）的检测　　分别于腹腔注射 CCl_4 后 4、8、12、16、24 h 取对照组 2 只，模型组和 GLN 干预组各 4 只以复合氯醛麻醉大鼠，摘除眼球取血 2～3 ml，4 ℃离心取血清，日立-7110 型全自动生化分析仪（我院检验科提供）检测血清 ALT、AST 水平。

1.2.3　肝组织的留取及病理检查　　留取部分新鲜肝组织立即液氮冻存，部分肝组织于 4% 多聚甲醛固定液固定，常规石蜡包埋、脱水，4 μm 切片。常规 HE 染色，光镜及透射电镜下观察肝细胞病理形态学改变。

1.2.4　免疫组织化学染色　　按照免疫组织化学染色试剂盒 S-P 9001 操作说明书进行，应用抗 NF-κBp65 单克隆抗体作为一抗，该抗体与 NF-κB 的亚单位 p65 区域结合，在正常情况下此区域被抑制蛋白 Ⅰκ B 所覆盖。当 Ⅰκ B 释放后，抗 NF-κB p65 单克隆抗体才能结合，因此该抗体能够在原位识别活化的 NF-κB。DAB 显色、复染、封片。光镜下观察、照片、图像分析。用磷酸盐缓冲液（PBS）代替一抗作为空白对照。结果判定：阳性细胞为细胞核或细胞质呈棕黄色染色。图像采用 Image Pro Plus 图像分析系统分析阳性细胞在参照系中所占相对面积百分比。

1.2.5　RT-PCR　　按照 Tripure 试剂盒说明书，参照文献[4]抽提液氮冻存肝组织总 RNA。TNF-α 上游引物 5′-GCCACCACGCTCTTCCTGTC-3′，下游引物 5′-GGCTACGGGCTTGTCACTC-3′，扩增片段长度 150 bp；以 β-actin 为内参照，上游引物 5′-GCCACCACGCTCTTCTGTC-3′，下游引物 5′-GGCTACGGGCTTGTCACTC-3′，扩增片段长 254 bp（引物均由北京天为时代公司合成）。按以下条件进行：45 ℃ 45 min，95 ℃ 2 min，进行逆转录；95 ℃ 30 s，56 ℃ 1 min，68 ℃ 2 min，40 个循环；68 ℃ 7 min，4 ℃ 4 min。扩增产物经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳分析，以 DNA 标准Ⅰ确定 PCR 扩增产物大小，应用 Image Pro Plus 图像分析软件进行灰度分析，以 TNF-α 与 β-actin 的灰度比值定量。

1.2.6　细胞凋亡的检测　　采用末端脱氧核苷酸转移酶（TdT）介导的 2dUTP 缺口末端标记技术（terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling，TUNEL）检测肝细胞凋亡。计数 3 个高倍阳性视野中阳性细胞数 N_1 及细胞总数 N，肝细胞凋亡指数（apoptosis index，AI）$=N_1/N\times100\%$。

1.2.7　细胞胀亡的检测　　利用透射电镜技术观察胀亡细胞，随机计数 1 000 个肝细胞中的胀亡细胞数，即为胀亡指数（oncosis index，OI）[5]。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，应用 SPSS 12.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　一般情况比较

注射 CCl_4 16 h 后模型组有 4 只大鼠死亡，致死率为 20%，GLN 干预组及对照组未见大鼠死亡，模型组大鼠较对照组大鼠毛发失去光泽，易激惹、食欲不振、精神萎靡，体质量未见明显改变。

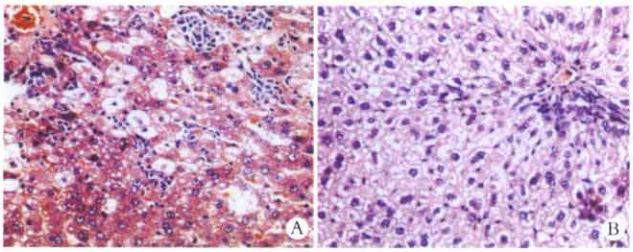
2.2　血清 ALT、AST 水平

注射 CCl_4 4 h 后，模型组大鼠血清 ALT、AST 较对照组明显升高（$P<0.01$），随后 ALT、AST 水平逐渐上升，16 h 后达到高峰。GLN 组各时相较对照组均有不同程度增高，但较模型组明显降低（$P<0.05$）。

2.3　组织病理学特征

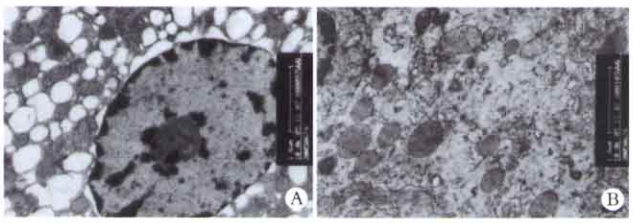
模型组大鼠肝脏不同时相有不同程度的损伤、淤血、坏死，其损伤程度随致伤时间延长而加重，以 16～24 h 损伤最为严重，表现为肝脏弥漫性大片状坏死、出血及淤血。GLN 干预组大鼠肝脏色泽灰暗，部分区域少量淤血，未见大片状坏死。病理切片 HE 染色发现正常组肝组织结构完整、清晰，细胞呈多角形，结构完整，形态、大小规则，未见细胞凋亡、坏死，未见浆细胞及中性粒细胞浸润。模型组大鼠肝组织结构紊乱，肝界板消失，肝细胞大片坏死，有不同程度炎性细胞浸润，见图 1。电镜下，正常对照组肝细胞核膜结构清晰、完整，核内常染色质

多，异染色质少，位于核周，其粗面内质网丰富，呈层状排列，许多核糖核蛋白体附着于膜上，线粒体数量较多，呈圆形或椭圆形，结构完整，嵴丰富，基质均匀，呈中等电子密度，细胞质内有大量α糖原颗粒。模型组肝细胞核出现溶解性空泡，粗面内质网数量减少，滑面内质网明显增加，线粒体肿胀，线粒体嵴数量减少，基质电子密度增高，α糖原颗粒明显减少，即细胞胀亡样改变，见图2A。亦可见细胞凋亡样改变，即细胞质萎缩、核固缩、染色质凝聚成团块位于核边缘呈"新月体"样改变。GLN干预组肝细胞核核膜结构模糊，常染色质多，异染色质少，线粒体数量较多，嵴丰富，基质中等电子密度；粗面内质网丰富，许多糖原体附着于膜上，见图2B。



A：模型组；B：GLN干预组

图1 光镜下大鼠肝组织病理学改变 （HE×200）



A：模型组；B：GLN干预组

图2 电镜下大鼠肝组织超微结构的改变 （TEM×10 000）

2.4 肝组织NF-κB的表达

对照组肝细胞很少表达NF-κB，或仅少量表达于细胞质内；模型组致伤4 h后NF-κB表达明显增强，由细胞质转移至细胞核内，16 h后达到高峰[(36.98±6.32)%]；GLN干预组肝细胞也有不同程度的阳性表达，但较模型组各时相平行比较均降低($P<0.05$)。各组不同时相NF-κB阳性细胞在参照系中所占相对面积百分比，见表1。

表1 各组NF-κB的表达[$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	4 h	8 h	12 h	16 h	24 h
对照组	2.54±0.54	1.96±0.12	2.03±0.16	2.36±0.68	2.15±0.59
模型组	10.52±2.01	12.65±1.26	17.69±2.35	36.98±6.32	26.35±5.12
GLN干预组	2.67±0.96[a]	4.52±0.99[a]	10.52±1.68[a]	20.55±3.72[a]	14.52±2.69[a]

a：$P<0.05$，与模型组比较

2.5 TNF-α mRNA的表达

正常对照组TNF-α mRNA表达痕量，模型组各时相点均有不同程度的表达，在致伤12 h后出现高峰，随后逐渐下降。GLN干预组各时相TNF-α mRNA的表达均较模型组降低($P<0.05$)，模型组和GLN干预组TNF-α与β-actin灰度比值见表2。

表2 各组TNF-α/β-actin灰度比值[$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	4 h	8 h	12 h	16 h	24 h
模型组	0.73±0.11	0.78±0.16	0.98±0.28	0.77±0.15	0.67±0.10
GLN干预组	0.38±0.09[a]	0.42±0.11[a]	0.62±0.15[a]	0.42±0.10[a]	0.36±0.07[a]

a：$P<0.05$，与模型组比较

2.6 细胞凋亡的检测结果

对照组极少数细胞凋亡，模型组致伤后各时相均出现不同程度的细胞凋亡，TUNEL染色表现为细胞核染成棕褐色，核固缩，染色质边集，细胞质嗜酸性，经GLN干预后AI明显降低($P<0.05$)。模型组和GLN干预组各时相AI见表3。

表3 模型组和GLN干预组AI[$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	4 h	8 h	12 h	16 h	24 h
模型组	1.52±0.53	1.81±0.65	2.23±0.83	2.97±1.07	3.05±1.08
GLN干预组	0.62±0.19[a]	0.83±0.33[a]	1.62±0.49[a]	1.82±0.58[a]	1.91±0.65[a]

a：$P<0.05$，与模型组比较

2.7 细胞胀亡的检测结果

透射电镜下发现对照组未见细胞胀亡，模型组在致伤4 h后即出现大量的细胞胀亡样改变，见图2B。细胞胀亡的出现早于细胞凋亡。GLN干预组各时相OI较模型组明显降低($P<0.05$)，模型组和GLN干预组各时相OI见表4。

表4 模型组和GLN干预组各时相OI[$(\bar{x}\pm s)$%]

组别	4 h	8 h	12 h	16 h	24 h
模型组	2.01±0.37	2.56±0.42	3.15±1.02	3.78±1.15	4.05±1.32
GLN干预组	1.25±0.21[a]	1.49±0.31[a]	2.34±0.69[a]	2.98±0.97[a]	3.02±1.13[a]

a：$P<0.05$，与模型组比较

3 讨论

本研究用CCl_4诱导大鼠急性肝损伤，其主要机制是CCl_4在P_{450}作用下形成CCl_3，CCl_3作为自由基可直接与蛋白质和脂肪结合，生成过氧化脂质。所以自由基及启动的脂质过氧化连锁反应是其损伤肝细胞的主要机制之一。本实验结果显示，模型组和GLN干预组大鼠血清ALT、AST，肝组织NF-κB、TNF-α随时相改变均呈上升趋势，但2组同时相平行比较，GLN干预组较模型组ALT平均降低64.3%，AST平均降低58.4%，NF-κB平均降低53.8%，TNF-α平均降低44.4%。这提示补充GLN可降低CCl_4诱导大鼠急性肝细胞损伤模型中血清ALT、AST水平，抑制NF-κB及TNF-α的活性。NF-κB是细胞中的一个重要转录因子，它是由多肽链p65和p50 2个亚基形成的二聚

体，包括 p50 同源二聚体，p65 同源二聚体及 p50-p65 异源二聚体，其中 p50-p65 异源二聚体发挥生理作用。在生理条件下，NF-κB 的 p65 亚基与 NF-κB 抑制蛋白（IκB）结合覆盖 p50 蛋白的核定位信号，使 NF-κB 与 IκB 形成一复合体留在细胞质中，当细胞受到外界因素刺激时，NF-κB 与 IκB 分离，NF-κB 进入细胞核内，其亚基形成环状结构与 DNA 接触，启动许多基因的转录，如 TNF-α、IL-1 等。其调控的基因产物参与了肝脏炎症、肝细胞再生和凋亡等病理生理过程[6]。TNF-α 既能直接损伤肝细胞，又能通过诱生炎症介质、活化中性粒细胞、诱导肝细胞凋亡等产生间接毒性作用[7]。因此，抑制 NF-κB 及 TNF-α 的活性可保护肝细胞损伤。

本研究表明在 CCl_4 诱导急性肝损伤中，细胞胀亡和细胞凋亡同时存在，细胞胀亡和细胞凋亡是 2 种不同的细胞死亡方式，胀亡细胞形态学改变的主要特点是细胞质肿胀、核溶解性坏死，而凋亡细胞主要表现为细胞质萎缩、核固缩[8]。引起肝细胞胀亡的主要原因是由于在自由基的作用下，细胞内钙离子及 ATP 缺乏，导致细胞膜的通透性增加，外水内流，使细胞肿胀。同时，线粒体的渗透性改变，细胞质膜破坏，引起细胞质及内容物肿胀，最终导致细胞胀亡的发生[9]。同时本研究显示肝细胞胀亡的发生早于凋亡，这可能与细胞凋亡的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶（caspase）依赖性有关，在 CCl_4 形成的自由基作用下，线粒体细胞色素 C 大量释放，导致 ATP 严重不足，在 caspase 来不及活化前，细胞已经发生胀亡[10]。最近研究表明，在胆汁郁积性肝损伤中，细胞胀亡比凋亡起着更为主导的作用，以往由于细胞凋亡检测系统的非特异性（如 TUNEL），凋亡在肝细胞损伤中的作用被高估了[11]。本实验结果表明，GLN 干预组各时相 AI 较模型组平均降低 45.2%，OI 平均降低 30.6%。这提示 GLN 可减少 CCl_4 诱导的大鼠肝细胞凋亡和胀亡。然而，GLN 减少肝细胞凋亡和胀亡的机制仍未完全阐明，一方面可能是由于 GLN 有助于清除体内的氧自由基，减轻肝脏解毒负担，保护肝细胞并提高机体抗氧化能力，抑制肝细胞凋亡[12]。另一方面 GLN 可活化促分裂原活化蛋白激酶（mitogen-activated protein kinase，MAPK）、细胞凋亡信号调节激酶（apoptosis signal-regulating kinase-1，ASK-1）、细胞外信号调节激酶（extracellular signal-regulated kinase，ERK）、JUN-核激酶和 $P38^{MAPK}$，激活 MAPK 细胞信号传导途径，从而使活化蛋白-1（active protein-1，AP-1）水平增高，调节细胞的增生和凋亡[13]。另外 GLN 是合成 ATP 的前体，可增加 ATP 含量；能刺激糖原合成，提高肝细胞糖原储备，而糖原储备提高可增强肝细胞抵御氧自由基损害的能力；抑制炎性因子的释放以及中性粒细胞在局部的聚集，增加细胞膜的稳定性；可调节水盐代谢，防止细胞内外水肿的发生。这些均有助于 GLN 抑制肝细胞凋亡和胀亡。

综上所述，GLN 能够保护 CCl_4 所致大鼠急性肝损伤，降低血清 ALT、AST 水平，抑制 NF-κB 及 TNF-α 在肝细胞的表达，减少肝细胞凋亡及胀亡的发生，保护肝细胞结构和功能完整。然而，尽管 GLN 对肝损伤的保护作用逐渐被人们认同，但 GLN 有效的给药途径、剂量、时间及疗程仍有待于进一步深入研究。

参考文献：

[1] NEWSHOLME P, LIMA M M, PROCOPIO J, *et al*. Glutamine and glutamate as vital metabolites[J]. Braz J Med Biol Res, 2003, 36(2): 153-163.

[2] CURI R, Lagranda C J, Doi S Q, *et al*. Glutamine-dependent changes in gene expression and protein activity[J]. Cell Biochem Funct, 2005, 23(2): 77-84.

[3] 苗明三. 实验动物和动物实验技术[M]. 北京：中国中医药出版社，1997：223-224.

[4] 曹廷兵，彭家和，巩　燕，等. 一种用 Tripure 试剂从冻存组织分离纯化 RNA 的方法[J]. 第三军医大学学报，2003，25(9)：822-823.

[5] 赵高峰，僧靖静，鲁显浩，等. 食管鳞状细胞癌组织中细胞胀亡及微血管密度的检测[J]. 郑州大学学报：医学版，2003，38(6)：851-854.

[6] WATANABE T, JONO H, HAN J, *et al*. Synergistic activation of NF-kappaB by nontypeable Haemophilus influenzae and tumor necrosis factor alpha[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(10): 3563-3568.

[7] 颜天华，袁伯俊. 肿瘤坏死因子肝损伤机理研究进展[J]. 国外医学：医药学分册，1998，25(6)：330-334.

[8] 任成山，钱桂生. 细胞凋亡和胀亡及其与多器官功能障碍综合征关系的研究进展[J]. 中国危重病急救医学，2005，17(4)：247-250.

[9] GUJRAL J S, FARHOOD A, JAESCHKE H. Oncotic necrosis and caspase-dependent apoptosis during galactosamine-induced liver injury in rats[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, 190(1): 37-46.

[10] LEVIN S. Apoptosis, necrosis, or oncosis: what is your diagnosis? A report from the Cell Death Nomenclature Committee of the Society of Toxicologic Pathologists[J]. Toxicol Sci, 1998, 41(2): 155-156.

[11] FICKERT P, TRAUNER M, FUCHSBICHLER A, *et al*. Oncosis represents the main type of cell death in mouse models of cholestasis[J]. J Hepatol, 2005, 42(3): 378-385.

[12] GONZALES S, POLIZIO A H, ERARIO M A, *et al*. Glutamine is hightly effective in preventing *in vivo* cobalt-induced oxidative stress in rat liver[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(23): 3533-3538.

[13] MATES J M, PEREZ-GOMEZ C, NUNEZ-DE-CASTRO I, *et al*. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2002, 34(5): 439-458.

（编辑　陈聪连）