维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)03-0383-03

N-乙酰半胱氨酸对肝损伤大鼠体内 NO 水平及 NOS 活性的影响

巫国谊, 赵有蓉, 郭树华

(重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨 N-乙酰半胱氨酸(N- Acetylcysteine,NAC)对肝损伤大鼠肝脏病理的影响及对肝脏损伤保护的作用机制。方法:选用 36 只 SD 大鼠随机分为 3 组,正常对照组:腹腔注射生理盐水 10ml/kg 1 次;肝损伤模型组:给予 D-gal 1g/kg 腹腔注射 1 次; NAC 实验组:于腹腔注射 D-gal 1g/kg 后 6、12、18 h 分别腹腔注射 NAC 0.1mmol/kg 1 次。急性肝损伤模型建立后 24h 取血及肝组织标本,观察比较各组大鼠肝组织病理改变,测定其血清、肝组织 NO 水平及肝组织 NOS 活性。结果:NAC 实验组大鼠的肝脏病理形态较肝损伤模型组有所改善,其血清 NO 水平较肝损伤模型组增高,而肝组织中 NO 水平较模型组降低,均具有统计学差异。NAC 组大鼠肝组织中 cNOS 活性较模型组有明显提高,而 iNOS 活性较模型组明显降低(P 均 <0.05)。结论:NAC 可以改善急性肝损伤大鼠的肝脏病理改变,该保护作用可能通过影响不同型别的 NOS 活性而改变体内不同部位的 NO 水平有关。

【关键词】乙酰半胱氨酸;肝损伤;一氧化氮;一氧化氮合酶

【中国图书分类法分类号】R575.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2005-03-31

The effect on nitric oxide and nitric oxide synthase of liver injured rat after N-acetylcysteine treatment

WU Guoyi, et al

(*Institute of Viral Hepatitis, the Second College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the protective effect of NAC on the acute liver injury of rat and its mechanism. *Methods*: 36 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into saline control group (group A, $n=12$), acute liver injury group (group B, $n=12$) and NAC intervention group (group C, $n=12$). In group B&C, SD rats were injected intraperitoneally with D-galactopyranoside(D-gal) (1g/kg). In group C, SD rats were received N-acetylcysteine (NAC) three times after D-gal were given. Animals were killed at 24 hours after the D-gal injection. The pathologic section of rat liver were observed and the concentration of NO and the activity of NOS in rat liver tissue of each group were assayed. *Results*: The pathologic changes of rat liver were significantly improved in NAC group. The hepatic NO concentration of acute liver injury rats were significantly decreased in the NAC group. Whereas the serum NO concentration was significantly increased in the same group. It showed that the iNOS were inhibited but the cNOS were activated after NAC treatment. *Conclusion*: NAC can improve the liver tissue pathologic changes of D-gal acute liver injury in rats. The protective activities may associate with the influence on the different types of NOS activities and then change the NO level in different organs in rats.

【Key words】N-acetylcysteine; Liver injury; Nitric oxide; Nitric oxide synthase

N-乙酰半胱氨酸是自然存在的氨基酸 L-半胱氨酸乙酰化的衍生物。它是一种极好的巯基供体,在体内可以促进还原型谷胱甘肽(Glutathione, GSH)生成,具有解毒及直接清除自由基的作用。已有报道 NAC 可以通过改变血清和肝脏组织中的一氧化氮(Nitric oxide, NO)水平而发挥作用[1]。本实验通过观察实验性肝损伤大鼠肝脏病理变化,探讨 NAC 对肝损伤大鼠的肝脏的保护作用;并通过检测肝损伤动物模型血清及肝脏中的 NO 水平和肝组织中不同型别一氧化氮合酶(Nitric oxide synthase, NOS)活性变化,进一步探讨 NAC 对肝损伤保护作

作者介绍:巫国谊(1977-),男,硕士生,
主要研究方向:病毒性肝炎的治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

用的机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

健康 SD 大白鼠 36 只(四川省医学科学院实验动物研究所提供),雌雄各半,体重 200 ± 20g。随机分为:正常对照组、肝损伤模型组和 NAC 实验组,每组各 12 只大鼠,实验前禁食 12h,但予自由饮水。正常对照组:腹腔注射生理盐水 10ml/kgl 次;肝损伤模型组:给予 D－gal(重庆医科大学生物医学工程研究室)1g/kg 腹腔注射 1 次;NAC 实验组:腹腔注射 D－gal 1g/kg 后 6、12、18h 分别腹腔注射 NAC 0.1mmol/kg 各 1 次(NAC 注射液由杭州民生药业提供)。

1.2 标本采集

注射生理盐水后 24h 处死正常对照组,另两组均于注射 D－gal 后 24h 摘除眼球取血、处死、摘除肝脏待用。全血标本避免溶血,取 6ml 离心(3000r/s)5min,分离血清,于－20℃保存,用于测定 NO 水平;动物处死后立即解剖,取肝左叶中部约 0.2×0.5cm 于 10% 福尔马林固定,供病理学观察,取肝右叶约 1g 用生理盐水充分冲洗,于－70℃冻存备用,用于测定 NO 水平和 NOS 活性。

1.3 肝组织病理评定标准

所取肝左叶组织在福尔马林固定后 48h 以石蜡包埋,常规切片,HE 染色,在 10×40 倍光学显微镜下随机观察各组大鼠每个肝组织切片各 10 个视野下的肝组织病理学改变。参照 Knodell 组织活动指数(HAI)评定方案标准 对肝组织中肝细胞变性坏死,炎性细胞浸润程度分为正常、轻度、中度、重度 4 级,分别用"－、+、++、+++"表示。"－"表示肝组织正常;"+、++、+++"分别表示肝小叶中有 25%、25%～50%、>50% 肝细胞变性坏死及炎性细胞浸润。将其病理标本的分级计入相应表格供统计学分析。

1.4 大鼠体内 NO 水平和 NOS 活性测定方法

血清及肝脏 NO 水平测定采用硝酸还原酶法[2],检测步骤按照南京建成生物工程研究所试剂盒要求进行。肝组织 0.5g 加生理盐水制备成 10% 组织匀浆,以 1000r/min,离心 5min,取上清用于测定肝组织 NO 水平。NOS 活性测定,先将肝组织样本置于冰块上,以 0.15mol/L NaCl 预先充分冲洗,然后加入 5 倍体积的匀浆缓冲液匀浆。匀浆缓冲液含 10mmol/L HEPES、0.3mol/L 蔗糖、0.1mmol/L EDTA、1mmol/L DTT、10mg/L 胰蛋白酶抑制剂、10mg/L leupeptin、2mg/L aprotinin、1g/L PMSF,并用 NaOH 调 pH 至 7.47。肝组织匀浆后,以 100000r/min 离心 1h,用 0.22μm 滤膜过滤上清,所得样品于冰块上保存,4h 内测定。以 H^3－精氨酸转化实验测定样品中的构造型一氧化氮合酶(constitutive NOS, cNOS)和诱导型一氧化氮合酶(inducible NOS, iNOS)[3]。

1.5 统计学分析

计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。等级资料以"－、+、++和+++"表示,按照不同等级归入不同组别,进行两样本间的 Wilcoxon 秩和检验。

2 结 果

2.1 肝组织病理学改变(表 1,图 1、2)

各组大鼠肝组织病理评定后分等级计数,进行两样本间的 Wilcoxon 秩和检验,其结果显示模型组大鼠肝脏变性坏死炎症程度较重与正常组有显著性差异($P<0.05$),NAC 实验组大鼠肝脏病理较模型组明显改善,且有显著性差异($P<0.05$)。提示 D－gal 已造成大鼠急性肝损伤,而以 NAC 处理后大鼠肝细胞形态结构有明显改善。

表 1 大鼠肝病理观察计数表

组别	只数	肝脏病理改变程度			
		－	+	++	+++
正常对照组	12	10	2	0	0
肝损伤模型组*	12	1	3	5	3
NAC 实验组**	12	3	6	3	0

*表示与正常组比较 $P<0.05$;**表示与模型组比较 $P<0.05$;

表中数字为按病理分级所记大鼠的只数。

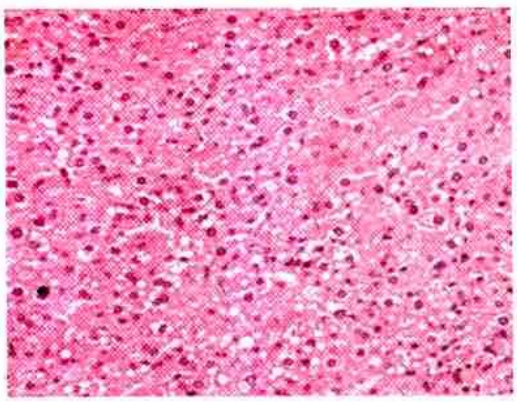


图 1 肝损伤模型组大鼠肝病理改变 (HE×40)

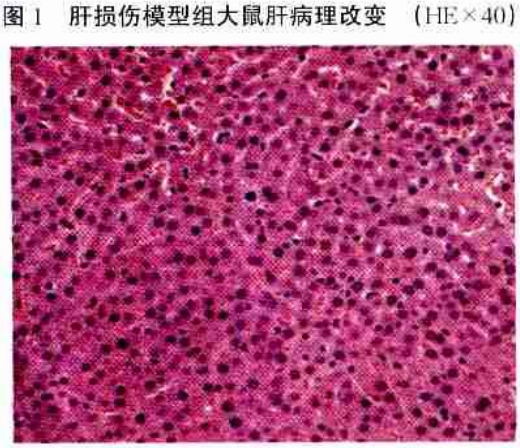


图 2 NAC 实验组大鼠肝病理改变 (HE×40)

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 各组大鼠血清及肝脏 NO 水平(表 2)

模型组大鼠血清 NO 水平较正常组增高,具有显著性差异;NAC 组大鼠血清 NO 水平较模型组进一步增高,且有显著性差异(P 均<0.05)。模型组大鼠肝组织中 NO 水平较正常组明显增高,而 NAC 组大鼠肝组织中 NO 水平较模型组显著降低(P 均<0.05)。

表 2 各组大鼠血清及肝脏 NO 水平($\bar{x} \pm s$)

大鼠组别	只数	血清 NO 浓度 (mmol/L)	肝脏 NO 浓度 (mmol/g)
正常对照组	12	40.6±3.6	59.4±14.0
肝损伤模型组	12	50.5±2.8*	113.4±16.2*
NAC 实验组	12	59.8±4.4**	101.6±15.8**

* 表示与正常组比较 $P<0.05$;** 表示与模型对照组比较 $P<0.05$。

表 3 各组大鼠肝组织 cNOS 及 iNOS 活性 (ukat/g)($\bar{x} \pm s$)

大鼠组别	只数	cNOS 活性	iNOS 活性
正常对照组	12	80.6±13.5	0±0
肝损伤模型组	12	39.0±8.0*	95.8±16.2*
NAC 实验组	12	59.8±4.4**	55.2±10.1**

* 表示与正常对照组比较 $P<0.05$;** 表示与模型对照组比较 $P<0.05$。

2.3 各组大鼠肝组织 cNOS 及 iNOS 活性(表 3)

正常组大鼠肝组织中构造型一氧化氮合酶(cNOS)活性为(80.6±13.5)ukat/g,而模型组大鼠 cNOS 活性表达水平较正常组明显降低($P<0.05$);NAC 组大鼠肝组织 cNOS 活性较正常组低,但较模型组显著增高,均具有统计学差异(P 均<0.05);正常组大鼠肝组织中无诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性表达,而模型组大鼠 iNOS 活性表达处于较高水平(95.8±16.2)ukat/g,NAC 组大鼠肝组织 iNOS 活性较模型组显著降低(P 值均<0.05)。

3 讨 论

NO 是脂溶性气体物质,体内 NO 主要由 NOS 催化 L-精氨酸生成。它是有细胞毒性作用的分子,是组织损伤的诱发因子和各种病变的增强因子,同时它又是生物体许多部分的信号分子,是先天性免疫应答的调节性效应分子,作为一种信息传递物质维持正常的生理功能,NO 的这种双重性在人体的病理和生理过程中及在肝脏疾病的发生与治疗中具有重要作用[4]。肝脏组织中有两种类型 NOS,即构造型(cNOS)和诱生型(iNOS),cNOS 分布于血管内皮细胞和血小板等处,促进合成的 NO 大部分释放入血液,其生物效应以生理状态下细胞间信息传递为主,具有扩张血管,提高肝脏血液灌流而达到保护肝脏的作用;iNOS 分布于肝细胞、枯氏细胞等处,可被脂多糖(LPS)、内毒素及多种细胞因子诱导活化,产生大量具有细胞毒性作用的内源性 NO,参与各种肝病的病理过程[5,6]。因此研究 NAC 对 NO 及不同型别 NOS 活性的影响,对于探讨 NAC 肝脏保护作用机制及其临床应用具有重要的意义。

本实验显示 NAC 能明显改善实验性肝损伤大鼠的肝组织病理,与王佩等[7]报告结果一致,进一步证实 NAC 对肝脏有明显保护作用。本研究中,肝损伤模型组大鼠血清及肝组织中 NO 水平均明显增高,这可能是由于肝组织损伤而产生高浓度 NO,并弥散进入血清所致。组织中高水平的 NO 主要由肝细胞或枯氏细胞产生,在肝损伤中起毒性作用。而 NAC 组大鼠血清中 NO 水平进一步提高,肝组织中的 NO 水平显著降低,与文献报告[8]结果相似,提示 NAC 改善肝病理可通过提高血清中 NO 水平,达到扩张小血管,调节肝脏灌流保护肝脏的作用;并可通过显著降低大鼠肝组织中的 NO 水平,减轻肝组织中高水平 NO 的毒性作用。

通过 H^3-精氨酸转化实验测定肝组织不同型别的 NOS 活性,结果发现,肝损伤大鼠模型组 cNOS 活性较正常大鼠组显著降低,cNOS 催化产生的 NO 主要释放于血清中,发挥有益的生物效应,因此 cNOS 活性的降低对保护肝脏是不利的;NAC 组大鼠肝组织中 cNOS 活性较肝损伤大鼠模型组显著提高,与血清 NO 水平提高的变化一致,这一结果提示 NAC 可能是通过激活位于血管内皮细胞的 cNOS 活性而提高血清 NO 水平,起到保护肝脏的作用。正常组大鼠肝组织无 iNOS 活性表达,而肝损伤模型组中 iNOS 处于高度活性状态,与其肝组织中高水平 NO 相一致,提示肝损伤大鼠 iNOS 高度活性能促进产生大量具有细胞毒性作用的内源性 NO,参与各种肝病的病理过程,在肝损伤中具有重要作用。NAC 组大鼠肝组织中 iNOS 活性及 NO 水平均较模型组显著降低,提示 NAC 可能通过抑制 iNOS 活性而减少组织中具有毒性作用的高浓度 NO 的损害。

本研究结果提示,NAC 较好的肝组织保护作用,可能与其通过影响不同型别的 NOS 活性导致改变机体内不同组织中 NO 水平有关。(下转第 389 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

生、发展起着重要作用,并与凋亡相关基因 bcl-2、bax 在脑胶质瘤的发展中分别起协同和拮抗作用,因此阻断 survivin 的表达对于脑胶质瘤的治疗可能是一个行之有效的方法。Kanwar 等[9]在动物模型癌组织内注射编码反义 survivin 的质粒可阻断 survivin 的表达,并能刺激抗肿瘤的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)增生,诱导细胞凋亡,抑制肿瘤生长。因此对 survivin 在脑胶质瘤中抑制凋亡作用的研究,为肿瘤治疗寻找新的靶点,制定新策略带来了挑战性的机遇。

参 考 文 献

[1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997;3(8):917-921.

[2] Adida C, Crotty PL, Mograth J, et al. Developmentally regulated expression of the novel cancer anti-apoptosis gene survivin in human and mouse defferentiational[J]. Am J Pathol, 1998;152:43-49.

[3] Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, et al. A giant ubiquitinconjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors [J]. J Cell Biol, 1998;141:1415-1422.

[4] Shankar SL, Mani S, O'Guin KN, et al. Survivin inhibition induces human neutral tumor cell death through caspase-independent and caspase-dependent pathways[J]. J Neurochem, 2001;79:426-436.

[5] Lu CD, Altieri DC, Tanigawa N, et al. Expression of a novel antiapoptosis gene, survivin, correlated with tumor cell apoptosis and p53 accumulation in gastric carcinomas[J]. Cancer Res, 1998;58:1808-1812.

[6] Barimaga M. Death by dozens of cuts[J]. Science, 1998;280(5360):32-34.

[7] Yin C, Dnudson CM, Korsmeyer SJ, et al. Bax suppresses tumorigenesis and stimulates apoptosis in vivo[J]. Nature, 1997;13385(6617):637-640.

[8] Tamm I, Wang Y, Sausville E, et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), bax, caspase, and anticancer drugs[J]. Cancer Res, 1998;58:5315-5320.

[9] Kanwar JR, Shen W-P, Kanwar RK, et al. Effects of survivin antagonists on growth of established tumors and B7-1 immunogene therapy[J]. Natl Cancer Inst, 2001;93:1541-1552.

(上接第 385 页)而 NAC 如何通过其它机制对肝脏产生保护作用尚待进一步研究。

参 考 文 献

[1] Gregory S, Kelly N. D. Clinical Applications of N-acetylcysteine[J]. Altern Med Rev, 1998;3:114-127.

[2] 董雯岳,石一复. 硝酸盐还原酶还原-比色法测定一氧化氮代谢产物[J]. 陕西医学检验,1999;14(3):5-6.

[3] 熊静波. 组织器官及培养细胞一氧化氮合酶活性测定[J]. 国外医学临床生化与检验学分册,1997;18(4):151-153.

[4] Kroncke KD, Fehsel K, Kold-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases[J]. Clin Exp Immunol, 1998;113:147-156.

[5] Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection, how, why, when, where[J]. NO Biol Chem, 1997;1:107-120.

[6] 关玉娟. 一氧化氮及一氧化氮合酶与肝病[J]. 中华内科杂志,1999;38(5):353-354.

[7] 王 佩,吴锡铭. N-乙酰半胱氨酸对硫代酰胺致大鼠肝衰竭的防治作用[J]. 中国现代应用药学杂志,2000;17(4):266-269.

[8] Phillip Harrison, Julia Wendon, Roger Williams. Evidence of increased guanylate cyclase activation by acetylcysteine in fulminant hepatic failure[J]. Hepatology, 1996;5:1067-1072.