DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.06.033
第23卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 6
2001年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2001

文章编号:1000-5404(2001)06-0695-03

论著

肝脏缺血再灌注损伤时大鼠血清谷胱甘肽及其相关酶活性的变化

包国强,吴金生,马庆久,鲁建国,王占明 (第四军医大学唐都医院普通外科,西安 710038)

提 要:目的 还原型谷胱甘肽(GSH)是体内重要的氧自由基的清除剂。本实验意在研究缺血肝脏复流后血清谷胱甘肽及其相关酶水平变化,及L-精氨酸对其水平的影响。方法 雄性SD大鼠90只随机分为3组:左中肝叶先行缺血70 min,后恢复血流,于复流前静脉给予生理盐水(损伤组),或复流前静脉给与L-精氨酸(200 mg/kg)(处理组);假手术组只给与暴露左中肝叶之肝蒂。各组动物分别在复流后0、1、3、6、12 h取血清标本,用以检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、MDA、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和谷胱甘肽-S转移酶(GSH-ST)。并取肝组织标本做光镜和电镜观察,了解组织病变特点。结果 损伤组血清ALT、MDA、GSH-ST和GSH-PX含量较假手术组有明显的提高($P<0.05$),而在复流后3 h血清GSH水平明显降低($P<0.05$)。给与L-精氨酸处理可以明显减轻这种变化($P<0.05$)。结论 L-精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用可能与上调还原型谷胱甘肽水平有关。血清GSH-PT、GSH-ST活性受到肝细胞损伤后释放增加的影响,与肝脏损伤程度有关。

关键词:缺血再灌注损伤;肝脏;谷胱甘肽;一氧化氮
中图法分类号:R364.12;R575.02;R619.9 文献标识码:A

Changes of serum reduced glutathione and related enzymes in hepatic ischemic-reperfusion injury in rats

BAO Guo-qiang, WU Jin-sheng, MA Qing-jiu, LU Jian-guo, WANG Zhan-ming (Department of General Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: **Objective** The release of free radical (FR) is associated with hepatic ischemic-reperfusion (IR) injury. In this study, the effects of nitric oxide on serum reduced glutathione (GSH) and related enzymes were investigated. **Methods** A total of ninety male SD rats were devided into three groups: sham operation (Group Ⅰ) and 70 min ischemia followed by reperfusion with being given L-arginine (200 mg/kg) (Group Ⅲ) or saline (Group Ⅱ) intravenously just before the reflow. Rats were sacrificed at 0, 1, 3, 6 and 12 h after reperfusion. Serum alanine aminotransferase (ALT), methylenedioxyamphetamine (MDA), reduced glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-PT) and glutathione sulfurtransferase (GSH-ST) were determined. The morphologic change of the liver was studied. **Results** Serum AST, MDA, GST-PX and GSH-ST increased significantly in Group Ⅱ while GSH decreased significantly from 3 h after reperfusion. The above changes were reversed by the NO donor, L-arginine significantly. **Conclusion** These results demonstrate the changes of serum GSH, GSH-PX and GSH-ST in the hepatic IR injury and reflect the extent of tissue injury. These may correlate with the protective role of L-arginine in the hepatic IR injury.

Key words: ischemic-reperfusion injury; liver; reduced glutathione; nitric oxide

在肝脏缺血再灌注中,氧自由基与细胞膜的膜脂产生脂质过氧化反应,产生一系列的脂质过氧化物,脂质过氧化自由基(ROO^{+})可使肝细胞膜结构受损,细胞完整性破坏。还原型谷胱甘肽(GSH)是一种良好的氧自由基清除剂,在肝脏再灌注期间,肝窦内持久存在的氧应激,使其氧化过程加速,肝组织谷光甘酞过氧化酶活力降低[1]。本实验的目的在于研究在肝脏缺血再灌注后,血清还原型谷胱甘肽(GSH)、还原型谷胱甘肽过氧化酶(GSH-PX)、谷胱甘肽转硫酶(GSH-ST)的变化,以及应用大剂量L-精氨酸对其的影响。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

SD雄性大鼠(200~250 g,购自第四军医大学实验动物中心)90只随机分为3组,每组30只。Group Ⅰ(假手术组):只给与开腹及暴露左中肝叶肝蒂处理;Group Ⅱ(损伤组):给与缺血70 min,再灌注前约10 min静脉注射生理盐水;Group Ⅲ(L-精氨酸处理组):给与缺血70 min,再灌注前约10 min静脉注射L-精氨酸(200 mg/kg)。各组动物分别在再灌注后0、1、3、6、12 h分批通过肝上下腔静脉取血约2 ml,并取肝脏标本,后处死。

1.2 模型制备[2]

SD大鼠以10 g/L戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,取腹正中切口进腹,暴露肝脏左、中叶之肝蒂。用无创血管夹夹闭中叶和左叶的门静脉和肝动脉,使约70%的肝脏缺血,以防止发生严重肠系膜静脉淤血。70 min后去除血管夹,恢复缺血肝血流,分两层关腹,建立肝脏缺血再灌注损伤的动物模型。假手术组只给与开腹暴露肝蒂处理,不阻断肝脏血流。

1.3 血清ALT、MDA、GSH、GSH-PX、GSH-ST检测

1.3.1 血清标本处理 将血液标本注入离心管,加入抑肽酶2 kIU,静置约20 min,2 000 r/min离心10 min,提取血清标本。-20 ℃保存,待测。

1.3.2 血清ALT检测 采用赖氏法。按试剂盒说明书进行,购自北京北化精细化学品公司。

1.3.3 血清MDA检测 采用Ohkawa等介绍的TBA法[3]进行检测,试剂盒购自南京聚力生物医学工程研究所。

1.3.4 血清GSH检测 按试剂盒说明书操作,购自南京聚力生物医学工程研究所。

作者简介:包国强(1974-),男,河北省衡水市人,硕士研究生,医师,主要从事肝移植的基础方面的研究。电话:(029)3577731
收稿日期:2000-09-08;修回日期:2000-12-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3.5 血清 GSH-PX 检测 采用 DTNB 直接法[4]，试剂盒购自南京聚力生物医学工程研究所。

1.3.6 血清 GSH-ST 检测 按试剂盒介绍的方法进行，试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.4 形态学观察

肝脏标本用 100 ml/L 福尔马林液固定，HE 染色，光镜观察（另取各组缺血前及再灌注后 6 h 肝组织 1 mm^3，40 ml/L 戊二醛固定后，行扫描电镜检查）。

1.5 统计学处理

实验数据采用 $\bar{x}\pm s$ 表示，各实验组数据采用 SPSS 10.0 软件作统计学处理。

2 结果

2.1 血清 ALT 的水平

作者通过检测血清丙氨酸氨基转移酶（ALT）水平，作为评价大鼠肝脏功能的指标。有表 1 可以看出：损伤组复流后各时间点血清 ALT 水平明显高于缺血前（$P<0.01$）。复流后血清 ALT 水平逐渐升高，在复流后 6 h 达到最高点，后渐下降。而复流后处理组血清 ALT 水平明显低于损伤组（$P<0.05$）。说明动物模型的建立是成功的。

表 1 各组大鼠血清 ALT 水平变化（U/L）

Tab 1 The levels of serum ALT (U/L)

Group	n	Time after reperfusion (h)				
		0	1	3	6	12
Ⅰ	6	41.80±10.17	40.01±10.78	45.35±0.57	42.24±14.54	42.89±12.12
Ⅱ	6	255.57±19.91[a]	282.53±21.87[a]	299.69±22.06[a]	369.78±28.07[a]	248.33±37.32[a]
Ⅲ	6	249.96±6.60	234.91±42.74[b]	87.79±9.71[b]	147.06±6.16[b]	201.03±64.29

a: $P<0.05$ *vs* group Ⅰ; b: $P<0.01$ *vs* group Ⅱ

2.2 血清 MDA 的含量

氧自由基可以使细胞膜的多价不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应，脂质过氧化反应的可以产生丙二醛（MDA）、酮基、羧基、过氧化氢基、新的自由基等脂质过氧化物。血清 MDA 含量在损伤组在各时间点明显高于假手术组（$P<0.01$），再灌注后 6 h，血清 MDA 含量达到峰值后下降。再灌注后 3、6 h，处理组血清 MDA 含量较损伤组均有明显降低（$P<0.05$）。提示缺血再灌注能导致肝组织脂质过氧化损伤，应用 L-精氨酸可以减轻复流后早期的肝脏脂质过氧化损伤，见表 2。

2.3 血清 GSH、GSH-PX、GSH-ST 水平

损伤组血清 GSH 水平较假手术组为低，自再灌注后 3 h，两组之间差异有显著性（$P<0.05$）。再灌注后 3 h，处理组血 GSH 水平高于对照组及假手术组。处理组 GSH-PX 活力显著低于对照组（$P<0.05$），但仍明显高于假手术组（$P<0.05$）。血清 GSH-ST 活力在对照组明显升高（$P<0.01$），应用 L-精氨酸，这种改变明显受到抑制，见表 3。

表 2 各组大鼠血清 MDA 含量变化（mmol/L，$n=6$）

Tab 2 The levels of serum MDA (mmol/L, $n=6$)

Group	Time after reperfusion (h)				
	0	1	3	6	12
Ⅰ	7.743±0.346	7.011±0.782	7.974±0.027	7.789±0.214	7.800±0.564
Ⅱ	12.846±3.671[b]	15.923±3.067[b]	40.769±1.820[b]	21.282±4.423[b]	14.231±2.371[b]
Ⅲ	9.692±2.430	15.948±1.515	17.436±2.655[a]	12.384±3.466[a]	10.461±4.185

a: $P<0.05$ *vs* group Ⅰ; b: $P<0.01$ *vs* group Ⅱ

表 3 血清 GSH、GSH-PX、GSH-ST 水平变化

Tab 3 The levels of serum GSH, GSH-PX, GSH-ST

Group	n	Time after reperfusion (h)				
		0	1	3	6	12
GSH (mmol/L)						
Ⅰ	6	0.425±0.070	0.400±0.023	0.398±0.097	0.398±0.102	0.389±0.044
Ⅱ	6	0.403±0.156	0.323±0.115[a]	0.223±0.061[a]	0.267±0.116[a]	0.333±0.198
Ⅲ	6	0.446±0.248	0.466±0.031[b]	0.455±0.049[b]	0.453±0.098[b]	0.413±0.151
GSH-PX (U/L)						
Ⅰ	6	142.85±12.83	140.91±8.89	143.16±7.37	140.34±9.14	141.22±6.53
Ⅱ	6	196.67±3.73[a]	195.11±2.67[a]	195.39±3.74[a]	193.01±8.52[a]	189.35±4.97[a]
Ⅲ	6	174.97±19.29[b]	166.07±4.45[b]	163.87±7.10[b]	162.85±28.04[b]	175.89±16.21
GSH-ST (U/ml)						
Ⅰ	6	41.29±12.57	44.25±2.62	34.12±6.59	38.13±6.27	37.16±3.58
Ⅱ	6	75.42±5.07[a]	74.56±9.73[a]	81.06±6.01[a]	69.17±12.73[a]	66.49±13.24[a]
Ⅲ	6	66.23±19.99	64.64±1.54[b]	34.68±1.78b	40.55±6.02[b]	40.47±7.67[b]

a: $P<0.05$ *vs* group Ⅰ; b: $P<0.01$ *vs* group Ⅱ

2.4 组织病理变化

光镜观察发现，损伤组单纯缺血后细胞明显肿胀，窦间隙变窄。在复流后 1 h，电镜可以发现肝细胞明显脂滴形成和内质网扩张，肝窦内可以发现白细胞的聚集和微血栓的形成，并可偶见肝细胞点灶状坏死。光镜及电镜发现，在窦内皮细胞、肝实质细胞均可见明显的细胞凋亡现象，这些细胞表现为细胞皱缩、核碎片和调亡小体。处理组各时间点病理变化轻微，细胞内仅见少量脂滴形成，细胞凋亡现象减少。

3 讨论

肝脏缺血再灌注损伤常见于临床肝移植和肝切除术中，它所导致的原发性肝功能损害是手术失败的主要原因。再灌注可以诱导以下的损伤因素：①炎性因子（如 TNF-alpha、IL-1）和自由基的激活和释放；②内皮细胞-白细胞间粘附因子表达上调（Selectins，beta-inte-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

grins, ICAM-1); ③肝脏微血管内皮细胞和白细胞相互作用[5]。自由基作为重要的损伤因子, 与肝脏缺血再灌注损伤有明确的关系。Fan 等[6] 认为活性氧可以产生过氧化反应, 直接造成组织损伤, 并引起细胞损害的"瀑布效应", 导致炎性反应、细胞死亡、器官功能衰竭。自由基造成细胞损伤的机制主要有以下几个方面: (1)发生脂质过氧化反应, 破坏细胞膜的完整, 影响线粒体的功能; (2)自由基可以使蛋白变性, 影响酶的活性; (3)破坏 DNA 的稳定性, 诱导细胞凋亡。

NO 作为内皮细胞依赖的血管舒张因子, 在肝脏缺血再灌注损伤中具有重要作用。许多研究者认为 NO 在肝缺血再灌注损伤中具有双重作用, NO 和 O_2^- 生成的 $ONOO^-$ 是氧化应激的主要自由基之一。也有观点认为 NO 本身能和 OH 反应生成 HONO 而减轻对组织的损伤, 同时 NO 与等其他自由基反应产生低毒的自由基而起解毒功能[7]。内源性 NO 可以清除氧自由基, 从而对缺血再灌注损伤产生保护作用[8], 阻断内源性 NO 生成可以加重肝脏的缺血再灌注损伤[9], 还有研究认为 SOD 对再灌注损伤的保护可能是有 NO 介导的[10]。张福琴等[11] 发现 DCDDP 对肺高压大鼠脂质过氧化损伤的保护作用, 可能与升高组织 NO 含量有关。众多研究表明, 大剂量 L-精氨酸对肝脏缺血再灌注损伤具有明确的保护作用却是勿容质疑的[12~14], 其保护机制主要体现为[15, 16]: (1)下调内皮素(ET)及其受体的表达, 改善肝脏微循环, 提高肝窦灌注率; (2)抑制血小板的聚集和白细胞的粘附, 防止血管内血栓形成; (3)抑制白细胞源性自由基的生成和活化白细胞造成的炎性损伤; (4)可以抑制 TNF-α 诱导的细胞凋亡和肝细胞毒性; 还原型谷胱甘肽(GSH)作为 3 个氨基酸的小分子多肽, 是细胞内巯基的主要储存库。它能作为还原剂而保护多种氧化应激产生的组织损伤。GSH 除了通过清除脂质过氧化物和过氧化氢而抑制自由基的生成外, 还可以直接作用与自由基, 使之转变为稳定分子。而谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽转硫酶(GSH-ST)可以催化 GSH 与脂质过氧化物、过氧化氢反应, 从而抑制自由基的生成。从实验结果可以看出, 肝脏缺血再灌注后, 血清 GSH 水平降低, 再灌注 3、6 h 更加明显, 与血清 MDA 水平呈明显的相关性, 说明 GSH 参与清除肝脏再灌注后产生的自由基, 抑制脂质过氧化反应。应用 L-精氨酸后, 再灌注后血清 MDA 含量升高, 说明 L-精氨酸可以减少肝脏缺血再灌注后自由基的产生, 减轻组织脂质过氧化损伤。并且在体外循环中也发现, L-精氨酸通过降低 MDA 可以对肺损伤产生保护作用。血清 GSH 升高的机制可能为: (1)应用 L-精氨酸后, 自由基生成减少, GSH 消耗降低; (2)肝脏微循环改善后, 细胞内 $NADPH^+$ 含量升高, 将氧化型谷胱甘肽(GSST)转变为 GSH。在肝脏缺血再灌注损伤后, 血清 GSH-PX、GSH-ST 活性轻度升高, 与既往报道肝组织检测结果似有矛盾, 主要考虑以下原因: (1)肝窦持续氧应激的存在, 刺激其释放; (2)肝细胞内富含 GSH-PX 等过氧化酶, 由于肝细胞破坏, GSH-PX、GSH-ST 释放增加。有报道血清 GSH-ST 与 ALT 的变化存在明显的一致性, 但其改变要早于 ALT, 可以作为良好的肝功判断指标。这与本实验的结果是一致的。

总之, 大剂量 L-精氨酸肝脏缺血再灌注脂质过氧化损伤有明确的保护作用, 而这种保护作用上调还原型谷胱甘肽的水平有关。血清谷胱甘肽过氧化酶、谷胱甘肽转硫酶的活性升高与肝脏的损伤程度有关, 是良好的损伤判断指标。

参考文献:

[1] Liu H Y, Han M, Peng L X. The beneficial effects of methyprednisooline on hepatic ischemic reperfusion injury in rabbits[J]. Zhonghua Shiyan Waike Zazhi (Chinese Jounal of Experimental Surgery), 1994, 11(6): 355—356.

[2] Kohli M, Selzner M, Madden J F, *et al*. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver [J]. Transplantation, 1999, 67(8): 1 099—1 105.

[3] Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction[J]. Anal Biochem, 1979, 95: 351—353.

[4] Xia Y M, Zhu L Z. The determination of glutathione peroxidyse in blood and tissue-DTNB direct meythod[J]. Weisheng Yanjiu (Journal of Hybiene Reserch), 1987, 16: 29—33.

[5] Menger M D, Richter S, Yamauchi J, *et al*. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. Hepatogastroenterology, 1999, 46 (Suppl 2): 1 452—1 457.

[6] Fan C, Zwacka R M, Engelhardt J F. Therapeutic approaches for ischemia/reperfusion injury in the liver[J]. J Mol Med, 1999, 77(8): 577—592.

[7] Peralta C, Hotter G, Closa D, Gelpi E, *et al*. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion in the rat: role of nitric oxide and adenosine[J]. Hepatology, 1997, 25(4): 934—937.

[8] Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, *et al*. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver[J]. J Surg Res, 1995, 59 (6): 772—779.

[9] Wang Y, Mathews W R, Guido D M, *et al*. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia [J]. Shock, 1995, 4(4): 282—288.

[10] Saad S, Minor T, Terasaki M, *et al*. Significance of nitric oxide synthesis on effectiveness of superoxide dismutase in reperfusion damage to the liver [J]. Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd, 1997, 114: 695—698.

[11] Zhang F Q, Li Z C, Zhao D H, *et al*. Effects of DCDDP, a dihydropyridine calcium antagonist, on SOD activity and MDA concentration in rat with pulmonary hypertension[J]. Di-si Junyi Daxue Xuebao (J Fourth Mil Med Univ), 1998, 19(5): 564—566.

[12] Koken T, Inal M. The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver[J]. Clin Chim Acta, 1999, 288(1—2): 55—62.

[13] Cottart C H, Do L, Blanc M C, *et al*. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion in the rat[J]. Hepatology, 1999, 29(3): 809—813.

[14] Shimamura T, Jin M B, Suzuki T, *et al*. Nitric oxide enhancement attenuates ischemia and reperfusion injury of canine livers[J]. Transplant Proc, 1999, 31(1—2): 1 065—1 067.

[15] Liu P, Yin K, Nagele R. Inhibition of nitric oxide synthase attenuates peroxynitrite generation, but augments neutrophil accumulation in hepatic ischemia-reperfusion in rats[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1998, 284(3): 1 139—1 146.

[16] Taylor B S, Alarcon L H, Dilliar T R. Inducible nitric oxide synthase in the liver regulation and function[J]. Biochemistry Mosc, 1998, 63(7): 766—781.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net