DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.013

内皮素及前列环素在内毒素血症所致肝损害中的作用

刘宝华 王代科 (第三军医大学附属大坪医院普通外科)重庆, 630042
陈惠孙 胡德耀 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室)重庆, 630042

提 要 目的: 探索内皮素-1(ET-1)及前列环素(PGI2)在内毒素血症所致肝损害中的作用。方法: 选用Wistar大鼠120只,分为对照组、内毒素组、内毒素+ ET-1抗体组、内毒素+ 前列环素组。观察了伤后3、6、9、12和24 h血浆中 ET-1、谷丙转氨酶(GPT)的含量;肝组织中 ET-1、PGI2、乳酸脱氢酶(LDH)和丙二醛(MDA)的含量。结果: 内毒素血症时,血浆和肝组织中 ET-1明显升高。血浆 GPT、肝组织中 LDH、MDA均显著升高。肝组织 ET-1与 MDA呈显著正相关。内皮素抗体部分拮抗内毒素所致肝损伤。结论: 内毒素血症时 ET-1对肝组织有一定损害作用。PGI2通过舒张血管平滑肌对肝组织有一定保护作用。

关键词 内毒素血症;内皮素;前列环素;肝疾病/病理生理学
中图法分类号 R575

血管内皮细胞分泌多种活性物质,通过旁分泌和自分泌的方式调节血管壁张力及血管平滑肌细胞增殖。内皮素(Endothelins, ETs)是已知最强的缩血管活性肽,而前列环素(Prostacyclin, PGI2)具有舒张血管的作用[1,2]。本实验初步观察了内皮素-1(Endothelin-1, ET-1)及 PGI2在内毒素血症所致肝损害中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

大肠杆菌内毒素($O_{111}B_4$)和 PGI2为 Sigma公司产品。ET-1抗体购自英国皇家医学院。

1.2 动物分组及处理

Wistar大鼠120只,体重 200 g~ 270 g,随机分成4组: 正常对照组(C组);内毒素组(LPS组): 内毒素 10 mg·kg^{-1};内毒素+ PGI2组(LP组): 内毒素 10 mg·kg^{-1}+ PGI2 40 ng·kg^{-1};内毒素+ 内皮素-1抗体组(LEA组): 内毒素 10 mg·kg^{-1}+ 1∶2000内皮素-1抗体(2 ml·kg^{-1})。药物自左股静脉注入,分别于伤后3、6、9、12 h和24 h(每时相点6只)分批活杀动物。取血浆、肝右叶组织。

1.3 观察指标

1.3.1 血浆、肝组织 ET-1含量测定 血浆: 血2 ml,加入30 μl 10% EDTA二钠和40 μl抑肽酶,混匀,4℃ 3000× g离心10 min,取上清于- 70℃保存备用。肝组织: 取组织约 100 mg,加入1 ml 1 mol HCl碾磨,随后 100℃水浴 10 min,匀浆,4℃ 3000× g离心10 min,取上清- 70℃保存备用。应用放射免疫法测定 ET-1含量[3]。药盒由解放军总医院提供。

1.3.2 肝组织 PGI2代谢产物6-酮-$PGF_{1\alpha}$含量测定 取液氮保存组织 50 mg,移入微型匀浆器中,加 0.2 ml无水乙醇和 0.8 ml生理盐水,匀浆。用 0.1 mol HCl按 100 μl/10 mg组织计算加入量,调 pH 3.0~ 4.0,加重蒸馏乙酸乙酯 5.0 ml×2,提取样品,每次 4℃ 3000× g离心 15 min,将两次提取上清合并,吹干。密封后- 70℃保存备用。按照6-酮-$PGF_{1\alpha}$药盒放免法测定。药盒由解放军总医院提供。

1.3.3 肝组织 MDA含量测定 取肝组织,用4℃生理盐水洗去残血,制成 10%组织匀浆。以硫代巴比妥法测定肝组织过氧化终产物 MDA[4]。

1.3.4 血浆 GPT、肝组织 LDH测定 采用比色法测定 GPT和 LDH。

1.4 数据处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 Student's t 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 血浆、肝组织 ET-1活性的变化

给予内毒素后 3 h,血浆 ET-1活性升高非常显著($P < 0.01$),6 h达高峰,较对照升高6倍。此后逐渐降低,但24 h仍显著高于对照组($P < 0.05$),见表1。肝组织中 ET-1活性变化趋势与血浆中的变化一致,只是下降速度较血浆中 ET-1活性下降速度慢,24 h仍非常明显的高于对照组($P < 0.01$),见表2。内毒素和 PGI2同时给予时,血浆和肝组织 ET-1含量明显高于对照组($P < 0.05$~ 0.01)。但是,血浆 ET-1活性于3、9、12 h时相点、肝组织 ET-1活性于6 h时相点显著低于内毒素组($P < 0.05$),见表1、2。

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

表 1 血浆 ET-1含量的变化 (C_B /ng·L^{-1})

Tab 1 The changes of plasma ET-1 levels in endotoxemia in rats (C_B /ng·L^{-1})

Group	Post-administration (h)				
	3	6	9	12	24
C	14.8± 3.4	15.3± 4.1	13.9± 3.2	15.4± 3.6	13.8± 4.6
LPS	38.3± 6.5**	88.6± 32.2**	72.3± 23.4**	53.5± 17.1**	21.4± 6.6
LP	30.2± 5.2**#	85.3± 40.6**	49.4± 13.0**#	31.0± 8.7**#	26.0± 4.7

*: P < 0.05, **: P < 0.01 *vs* C; #: P < 0.05 *vs* LPS

表 2 肝组织 ET-1含量的变化 (w_B /pg·100 mg^{-1})

Tab 2 The changes of hepatic ET-1 levels in endotoxemia in rats (w_B /pg·100 mg^{-1})

Group	Post-administration (h)				
	3	6	9	12	24
C	119.2± 45.2	106.3± 39.6	118.9± 43.8	123.4± 50.3	119.8± 35.6
LPS	265.0± 75.6**	475.8± 215.1**	352.5± 154.1**	343.3± 193.6*	210.0± 29.5**
LP	203.3± 24.2**	284.1± 61.2**#	251.7± 39.2**	205.8± 74.7	183.3± 60.5*

*: P < 0.05, **: P < 0.01 *vs* C; #: P < 0.05 *vs* LPS

2.2 肝组织 6-酮-$PGF_{1\alpha}$活性变化

LPS组肝组织 6-酮-$PGF_{1\alpha}$活性伤后逐渐升高 (P < 0.05~0.01),24 h接近正常水平。LEA组 6-酮-$PGF_{1\alpha}$活性于 3、9、12 h明显低于 LPS组 (P < 0.05),见表 3

表 3 肝组织 6-酮-$PGF_{1\alpha}$含量的变化 (w_B /pg·100 mg^{-1})

Tab 3 The changes of hepatic 6-keto-$PGF_{1\alpha}$ levels in endotoxemia in rats (w_B /pg·100 mg^{-1})

Group	Post-administration (h)				
	3	6	9	12	24
C	147.5± 62.2	150.3± 39.1	140.8± 53.1	157.4± 54.2	139.8± 25.6
LPS	235.8± 85.6*	433.3± 265.1*	606.7± 229.3**	552.0± 239.9**	164.8± 76.0
LEA	157.3± 37.4#	239.8± 219.1	349.8± 170.0#	348.3± 160.1*#	131.0± 39.6

*: P < 0.05, **: P < 0.01 *vs* C; #: P < 0.05 *vs* LPS

2.3 血浆 GPT活性变化

LPS组 GPT活性于伤后明显升高 (P < 0.05~0.01)。LP、LEA组 GPT活性于伤后 6 h显著高于对照组 (P < 0.01);9、12 h则明显低于 LPS组 (P < 0.05),见表 4

表 4 血浆 GPT含量的变化 (C_B /U·L^{-1})

Tab 4 The changes of plasma GPT levels in endotoxemia in rats (C_B /U·L^{-1})

Group	Post-administration (h)				
	3	6	9	12	24
C	20.5± 4.4	22.3± 3.1	18.9± 4.2	21.3± 3.6	19.8± 5.6
LPS	29.2± 8.5*	45.0± 9.6**	86.8± 13.2**	89.1± 19.0**	37.3± 13.9*
LP	26.7± 9.6	40.3± 14.2*	72.9± 12.8**#	65.6± 12.1**#	42.1± 14.3**
LEA	26.9± 7.6	42.8± 9.4*	72.9± 11.3**#	53.6± 8.9**#	43.8± 9.6**

*: P < 0.05, **: P < 0.01 *vs* C; #: P < 0.05 *vs* LPS

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

2.4 肝组织 LDH活性变化

各组伤后 LDH含量均显著高于对照组($P<0.05\sim0.01$)。LP组 LDH活性于伤后 6 h时明显低于 LPS组($P<0.05\sim0.01$)。LEA组 LDH活性除 12 h外,各时相点均低于 LPS组($P<0.05\sim0.01$),见表 5。

表 5 肝组织 LDH含量的变化(M_B/U·g^{-1})

Tab 5 The changes of hepatic LDH levels in endotoxemia in rats (M_B/U·g^{-1})

Group	Post-administration (h)				
	3	6	9	12	24
C	360.8± 110.8	354.3± 106.5	376.2± 120.5	341.2± 108.9	352.7± 124.3
LPS	680.4± 141.2**	1071.0± 204.9**	1269.2± 147.2**	1555.0± 239.9**	1489.2± 175.8**
LP	766.6± 274.1**	484.7± 135.6##	812.4± 178.4**##	1297.8± 144.3**#	1031.3± 297.8**##
LEA	415.8± 93.7##	666.9± 145.7**##	1102.7± 162.6**#	1354.5± 133.2**	927.6± 270.8**##

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* C; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* LPS

2.5 肝组织 MDA活性变化

给予内毒后 LPS组肝组织 MDA活性显著高于对照组($P<0.05\sim0.01$)。LP组 MDA活性于 3、6、9 h明显低于 LPS组($P<0.05\sim0.01$)。LEA组 MDA活性于 6、9 h也明显低于 LPS组($P<0.05\sim0.01$),见表 6。

表 6 肝组织 MDA含量的变化(M_B/nmol·g^{-1})

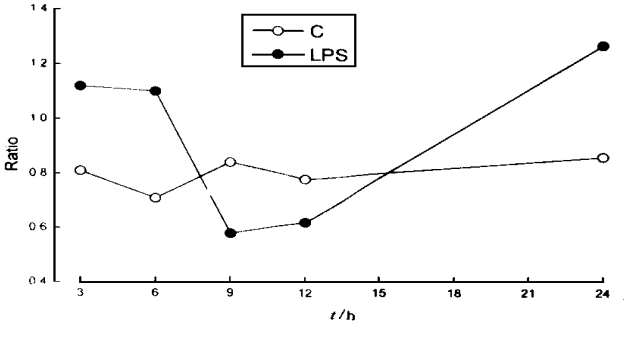
Tab 6 The changes of hepatic MDA levels in endotoxemia in rats (M_B/nmol·g^{-1})

Group	Post-administration (h)				
	3	6	9	12	24
C	4.0± 1.3	4.0± 1.2	3.8± 0.9	4.1± 0.8	4.2± 0.8
LPS	7.0± 3.2*	11.0± 1.8**	10.1± 2.0**	10.2± 2.8**	5.8± 0.5*
LP	4.2± 1.3#	8.4± 1.7**#	8.2± 1.0**#	9.5± 2.2**	5.3± 1.2*
LEA	5.0± 1.8	7.9± 0.9**##	8.0± 1.2**#	8.6± 1.4**	5.0± 1.0

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* C; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* LPS

2.6 LPS组肝组织 ET-1与 6-酮-$PGF_{1\alpha}$比值

该比值与对照组相比,伤后 3、6 h高于对照组,9、12 h低于对照组,24 h再次升高见附图。



附图 LPS组肝组织 ET-1/6-酮-$PGF_{1\alpha}$的比值

Fig Ratio of hepatic ET-1 to 6-keto-$PGF_{1\alpha}$

3 讨论

给大鼠一次输注 10 mg·kg^{-1}内毒素,血浆、肝组织中 ET-1活性迅速升高,6 h在高峰,24 h时仍明显高于对照组。血浆 ET-1的主要来源于全身血管内皮细胞。肝组织中 ET-1除来自肝血管和肝血窦内皮细胞外,肝脏 Kupffer细胞和贮脂细胞也能合成和分泌 ET-1[5]。内毒素血症时,ET-1的合成和释放增加,除内毒素的直接作用外,还有内毒素的间接作用,内毒素可激活单核巨噬细胞,并使其释放肿瘤坏死因子、IL-1、6和 γ-干扰素等。上述细胞因子也能引起 ET-1合成和释放增加[6~8]。

内毒素和 PGI_2同时输注时,血浆、肝组织 ET-1活性在不同时相点低于 LPS组,表明 PGI_2能部分抑

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

制 ET-1的合成和释放。目前研究表明,PGI_2通过 3′,5′-环磷酸腺苷(cAMP)在 ET-1 mRNA转录和翻译水平抑制 ET-1的合成[6]。内毒素和内皮素抗体同时给予时,肝组织 PGI_2活性则明显低于内毒素组,间接说明 ET-1对 PGI_2的合成和释放有促进作用。目前认为 ET-1通过与血管内皮细胞的内皮素 B型受体结合促进 PGI_2合成和释放[7]。也有人认为 ET-1还可直接激活细胞膜上磷脂酶 A_2,促进花生四烯酸代谢,后者在氧化酶作用下,进一步生成 PGI_2。

目前研究表明,在内毒素作用下,内皮细胞释放的 ET-1活性增加,ET-1以其强烈缩血管作用也参与脓毒症的发生和发展[8,9]。ET-1对肝脏损害作用是通过与肝血管平滑肌细胞、肝血窦周围贮脂细胞上内皮素 A型受体结合,通过多条途径进行信息传递,使肝血管平滑肌细胞、贮脂细胞收缩[10],引起肝血流量降低,导致肝损害。本实验发现内毒素血症时,ET-1含量升高,并且与肝组织 MDA呈正相关($r = 0.9243$, $P < 0.01$)。内毒素和内皮素抗体同时给予时、血浆 GPT、肝组织 LDH和 MDA含量较内毒素降低。上述结果说明 ET-1参与了内毒素血症时的肝损害作用。另外,PGI_2则能使血浆 GPT、肝组织中 LDH和 MDA含量低于内毒素组,表明 PGI_2通过舒张血管作用,使肝损害程度减轻。

总之,内皮细胞释放的血管活性物质及它们之间的相互作用决定了血管口径的变化及组织器官的灌流量。根据本实验结果和近年来文献报道,内毒素血症时,ET-1通过其缩血管作用,降低肝组织血流灌注量,加重组织细胞损伤。PGI_2通过舒张血管作用,减轻肝组织损伤。因而,内皮源性血管活性物质在一定程度上影响着内毒素血症的发生和发展过程。

参考文献

1 Masaki T, Kimura S, Yanagisawa M *et al*. Molecular and cellular mechanism of endothelin regulation. Implications for vascular function. Circulation, 1991; 84(4): 1457

2 Webb D J, Haynes W G. Venoconstriction to endothelin-1 in humans is attenuated by local generation of prostacyclin but not nitric oxide. J Cardiovasc Pharmacol, 1993; 22(8): S317

3 曾 强,李振中,余霞君等.内皮素的放射免疫分析.解放军医学杂志, 1991; 16(6): 403

4 莫 简.医学自由基生物学导论.北京:人民卫生出版社, 1989: 219~230

5 Housset C, Rockey D C, Bissell M *et al*. Endothlin receptors in rat liver: Lipocytes as a contractile target for endothlin-1. Proc Natl Acd Sci USA, 1993; 90(10): 9266

6 Luscher T F, Boulanger C M, Dohi Y *et al*. Endothelium-derived contracting factors. Hypertension, 1992; 19(2): 117

7 Luscher T F, Oemar B S, Boulanger C M *et al*. Molecular and cellular biology of endothelin and its receptor-PartⅡ. J Hypertension, 1993; 11(2): 121

8 Morise Z, Ueds M, Aiura K *et al*. Pathophysiologic role of endothelin-1 in renal function in rats with endotoxin shock. Surgery, 1994; 115(2): 199

9 Mitaka C, Hireta Y, Makita K *et al*. Endothelin and atrial natriuretic peptide in septic shock. Am Heart J, 1993; 126(2): 466

10 Sakamoto M, Ueno T, Kin M *et al*. Ito cell contraction response to endothelin-1 and substance P. Hepatology, 1993; 18(4): 978

(收稿: 1996-02-29;修回: 1996-12-20)
(编辑 王 红、沈锡庚)

Effects of endothelin-1 and prostacyclin on hepatic damage in endotoxemia in rats

Liu Baohua, Chen Huisun, Wang Daike, Hu Deyao (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630042)

Abstract Objective: To observe the effects of endothelin-1 (ET-1) and prostacyclin (PGI_2) on hepatic damage in endotoxemia. Methods: One hundred and twenty Wistar rats were randomized into the control, endotoxin (10 mg/kg), endotoxin plus PGI_2 and endotoxin plus ET-1 antibody (1:20000, 2 ml/kg) groups and killed in the 3rd, 6th, 9th, 12th and 24th hour respectively. Plasma and hepatic ET-1 concentrations were determined. Plasma glutamic pyruvictransaminase enzyme (GPT), hepatic PGI_2, lactate dehydrogenate (LDH), and malondialdehyde (MDA) were also measured. Results: In endotoxemia, ET-1 contents in plasma and the liver were markedly increased and hepatic ET-1 concentration was positively correlated to hepatic MDA concentration. ET-1 antibody partially ameliorated hepatic damages in endotoxemia. Conclusion: ET-1 can ameliorate hepatic damages during endotoxemia and PGI_2 can protect the liver through its dilating effect on the vascular smooth muscle.

Key words endotoxemia; endothelin; prostacyclin; liver disease/physiopathology

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