DOI:10.16016/j.1000-5404.1992.01.007

内毒素对体外培养肝细胞脂质过氧化损伤的作用*

王 涛 陈惠荪 汪江淮 刁有芳 田昆仑 蒋建新（第三军医大学 野战外科研究所）630042

提 要 本研究通过体外实验，探讨了内毒素对肝细胞脂质过氧化损伤的作用以及SOD的保护效应。用分离的大鼠肝细胞与内毒素（500ng/ml）共同孵育，6h肝细胞MDA、LDH和SOD水平均显著上升（$P<0.05\sim0.01$），而且LDH和SOD升高早于MDA；预先将PMN经内毒素处理后，再与肝细胞共孵，激活的PMN能显著损伤肝细胞，引起肝细胞MDA升高和LDH释放增加（$P<0.01$），SOD活性下降（$P<0.05$）。给予SOD治疗能部分抑制PMN对肝细胞的损伤作用。上述结果提示，内毒素对PMN引起肝细胞的损伤具有增强作用；内毒素亦可直接诱导肝细胞脂质过氧化损伤，但其机制尚待进一步阐明。

关键词 休克；内毒素；肝/细胞学；过氧化脂质类；超氧化物歧化酶类

内毒素休克时肝细胞和亚细胞器损伤以及动物死亡率与氧自由基介导的脂质过氧化反应密切相关。已往的工作已经证实，内毒素休克时血浆，肺，肝和肾的脂质过氧化物（LPO）明显升高，尤以肝LPO升高最早，同时伴有黄嘌呤氧化酶（XOD）升高和超氧化物歧化酶（SOD）下降，如预先使用黄嘌呤氧化酶抑制剂别嘌呤醇或SOD等抗氧化剂，则能明显改善动物活存率[1][2]。关于内毒素休克时脏器组织脂质过氧化损伤的发生机制尚未阐明，而内毒素在其中的作用更是鲜见报道。有文献报告，体外将牛肺内皮细胞与内毒素共孵，当内毒素剂量达到10μg/ml时内皮细胞出现脂质过氧化损伤，丙二醛（MDA）升高[3]。但是内毒素休克时肝组织脂质过氧化损伤是否与内毒素的直接作用有关尚不清楚。本文通过体外实验初步探讨内毒素对肝细胞脂质过氧化损伤的作用及SOD的保护效应。

1 材料与方法

1.1 试剂

胶原酶（Sigma），胰蛋白酶（DIFCO），SOD（苏医），RPMI 1640（GIBCO），E.coli内毒素O_2,B_6（DIFCO），Percoll（Pharmacia），酵母多糖（Serva），四乙氧基丙烷（Sigma）。

1.2 细胞分离方法

1.2.1 肝细胞分离培养方法[4]：Wistar大鼠麻醉后，在无菌条件下切开腹腔，取肝剪碎，用胶原酶和胰蛋白酶（1:1混合液中），消化20min，过滤，50×g离心，培养液洗涤2次。细胞悬浮后接种至24孔板，5%CO_2，37℃培养4h弃去未贴壁细胞，台盼蓝检查细胞存活率>90%。加各种处理因素继续培养至相应实验时限。

1.2.2 白细胞分离方法[5]：用Percoll间接密度梯度法分离。NH_4Cl-Tris缓冲液溶解残余红细胞，培养液洗涤2次，悬浮至所需浓度，置于5%CO_2，37℃备用。

1.3 胞内SOD测定方法

培养细胞到时限后，Hank's液洗涤2次，离心后沉淀加0.05mol/L碳酸钠缓冲液，冻融法破坏细胞，10 000×g，20min，4℃离心，留上清备用。用化学发光法测定其活力。结果以u/mg pro表示。

1.4 实验方法与分组

1.4.1 内毒素处理组：在2×10^6肝细胞中加入500ng/ml内毒素，置CO_2培养箱继续孵育2、4、6、8h。

1.4.2 激活的PMN损伤组：1×10^6肝细胞中分别加入2×10^6正常PMN和预先用内毒素孵育4h的PMN，再加酵母多糖0.1mg，孵育120min。

1.4.3 SOD治疗组：预先加入SOD（50μg/ml）10min后，再加上述各种处理因素。

至实验时限后，按TBA法测细胞内MDA，结果以nmol/mg pro表示[6]；比色法测培养上清LDH，u/ml表示；培养肝细胞送电镜检查。

1.5 统计：

* 国家自然科学基金资助项目

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

实验数据作单因素方差分析，以$\bar{x}\pm S$表示。

2 结　果

2.1 体外内毒素孵育对正常肝细胞的损伤作用

500ng/ml内毒素与正常肝细胞共孵，随时间延长，肝细胞MDA持续升高。孵育6h和8h组MDA明显高于对照组（$P<0.05\sim0.01$）。肝细胞内SOD活性在4 h时较对照明显升高，6h和8h继续上升（$P<0.01$）（表1）。随着孵育时间延长，内毒素组和对照组LDH逐渐升高，但显然内毒素组肝细胞LDH的释放较对照升高更甚，其中孵育4 h后与相应对照时相比较有显著差异（$P<0.05\sim0.01$）（表2）。

表1　体外内毒素孵育对肝细胞MDA和SOD的影响

	对照组	孵育2 h	孵育4 h	孵育6 h	孵育8h
MDA	0.136±0.016	0.159±0.029	0.168±0.028	0.182±0.026*	0.195±0.029**
(nmol/mg pro)	(n=10)	(n=10)	(n=10)	(n=8)	(n=10)
SOD	3.891±0.763	3.533±0.513	5.233±1.055**	5.428±1.177**	6.670±1.166△**
(u/mg pro)	(n=9)	(n=9)	(n=9)	(n=10)	(n=10)

* 系与对照组相比　* $P<0.05$　** $P<0.01$

▲ 与邻近值相比　△ $P<0.05$

表2　内毒素孵育对肝细胞培养上清LDH (u/ml) 的影响

	孵育			
	2 h	4 h	6 h	8h
对照组	1.405±1.193	1.512±0.211	1.616±0.212*	1.782±0.366**
内毒素组	1.688±0.328	1.796±0.326△	2.051±0.249△△*	2.172±0.322△△**

* 与自身2 h比较　* $P<0.05$　** $P<0.01$

▲ 与对照同时相比较　△ $P<0.05$　△△ $P<0.01$

2.2 经内毒素预处理PMN对肝细胞的损伤作用

加内毒素预处理的PMN与肝细胞共孵，其肝细胞MDA水平较对照和未经内毒素处理PMN与肝细胞共孵后的MDA显著升高（$P<0.05\sim0.01$），胞内SOD活性低于未经内毒素处理组和明显低于对照组（$P<0.05$），上清LDH也较两组高（表3）。

表3　激活的PMN对肝细胞的损伤

	对照组 (PMN+肝c)	Ⅰ组 (PMN+肝c+O-Ⅰ)	Ⅱ组 (内毒素+PMN+肝c+O-Ⅰ)
MDA (nmol/mg pro)	0.219±0.028 (n=9)	0.313±0.045** (n=8)	0.363±0.040△** (n=10)
SOD (u/mg pro)	5.865±1.850 (n=8)	5.004±1.260 (n=8)	4.473±1.223* (n=8)
LDH (u/ml)	1.383±0.245 (n=7)	1.934±0.482** (n=8)	2.127±0.365** (n=10)

与对照组相比$P<0.05$　**$P<0.01$；　△Ⅰ组与Ⅱ组相比　△$P<0.05$

2.3 外源性SOD对体外肝细胞损伤的保护效应

2.3.1 SOD对内毒素引起肝细胞损伤的实验治疗　预先加入SOD治疗的肝细胞与内毒素孵育8h

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

后，肝细胞MDA含量和上清LDH活性与未治疗组相比无显著差异，但胞内SOD活性明显升高（$P<0.05$）（图1）。

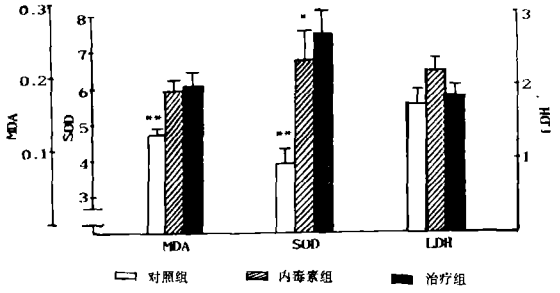


图1 SOD对内毒素引起肝细胞损伤的实验治疗

*与SOD治疗组相比 *$P<0.05$ **$P<0.01$

2.3.2 SOD对激活的PMN引起肝细胞损伤的实验治疗

治疗组肝细胞MDA明显低于未治疗组（$P<.05$），且与对照组无显著差异，胞内SOD活性较对照组和未治疗组均有非常显著的升高（$P<0.01$）（图2）。

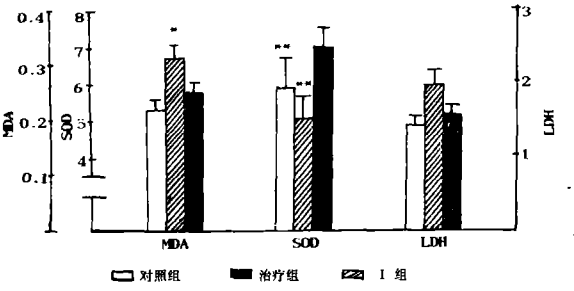


图2 SOD对激活的PMN引起肝细胞损伤的实验治疗

*与SOD治疗组相比 *$P<0.05$ **$P<0.01$

2.4 形态学改变

经内毒素处理的肝细胞与正常细胞相比，胞膜上微绒毛部分脱落，线粒体肿胀，嵴断裂呈絮状改变。

3 讨 论

大量实验资料表明，内毒素休克时各重要脏器组织均可发生不同程度的脂质过氧化损伤，这种损伤与休克严重程度和动物存活率密切相关。肝脏在各脏器组织中LPO升高最早、幅度最大，脂质过氧化损伤最为严重。本实验采用体外内毒素与肝细胞共孵，观察细胞MDA、SOD和上清LDH的变化，结果发现孵育6 hMDA显著升高，并维持高水平，SOD和上清LDH的增高更早于MDA升高；病理检查示胞膜部分损伤，线粒体明显病变。上述结果表明内毒素能直接引起肝细胞及亚细胞器的严重损伤。损伤发生机制或途径可能与下述两方面有关：首先内毒素引起的肝细胞损伤与氧自由基介导的脂质过氧化损伤途径有关。SOD是底物诱导酶，它的升高间接反映O_2^-的生成情况[7]。本实验中内毒素作用于肝细胞，先有SOD升高，提示细胞内有大量O_2^-生成；以后出现MDA升高，说明肝细胞发生了氧自由基介导的脂质过氧化损伤。此外内毒素能直接作用于肝线粒体，引起能量代谢障碍，线粒体膜通透性增加[8]，致使线粒体单价泄漏的氧自由基增多，线粒体LPO升高。如用膜稳定剂稳定线粒体膜则能明显抑制内毒素引起的线粒体Ⅲ态呼吸和呼吸控制率的下降以及线粒体LPO的升高，从而保护线粒体正常结构和功能[9]。病理学检查也证实了内毒素引起的线粒体损伤。这进一步提示内毒素诱导的脂质过氧化可能与线粒体功能障碍有关；其次，内毒素对肝细胞也有直接细胞毒作用，而且这种作用似乎并不依赖于氧自由基介导的脂质过氧化损伤。实验结果显示，内毒素与肝细胞共孵，上清LDH活性的升高显然早于MDA的升高，用SOD预先治疗并不能明显抑制LDH的升高。Harlan[8]也观察到内毒素能引起^{51}Cr标记的内皮细胞损伤，^{51}Cr释放增加，用SOD或CTA并不能抑制这种变化。除上述作用外，内毒素亦可通过直接激活白细胞，释放氧自由基等毒性介质损伤肝细胞。本实验将PMN经内毒素预处理后，再与肝细胞共孵，肝细胞MDA升高，SOD下降及上清LDH增高均较未用内毒素处理的PMN对肝细胞的作用明显，提示内毒素对激活的

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PMN所导致的正常肝细胞损伤具有增强和放大效应。另外，实验中SOD治疗组细胞内SOD含量均较未治疗组明显升高，这是因为SOD分子量较大，不能通过正常细胞膜自由进出，只有当细胞膜受损，通透性明显增加时，胞外高浓度的SOD进入胞内，使细胞内SOD活性明显增高。

综上所述，内毒素休克时，肝细胞的损伤可能与内毒素诱导的脂质过氧化反应和内毒素对肝细胞的直接毒性作用均有关系。但是脂质过氧化损伤在内毒素对肝细胞的细胞毒作用中所占的地位和关系值得进一步研究和探讨。

参 考 文 献

1. 仲持真　吴肇光。内毒素休克大鼠血清及组织脂质过氧化物的变化。中华实验外科杂志　1989；6:114～5
2. Kunimono F, Morita T, Ogawa R, et al. Inhibition of lipid peroxidation improves survival rate of endotoxemic rats. Circ Shock 1987; 21: 15～22
3. 饶花平　罗正曜　尤家骏，等。内毒素对小牛肺血管内皮细胞的影响及山莨菪碱的保护作用。湖南医科大学学报 1989；14: 115～8
4. Richard LD, Richter GW. Isolation and culture of Kupffer cells and hepatocytes from single rat livers. Lab Invest 1981; 45:558～66
5. Giudicelli J, Philip PJM, Delque P, et al. A single-step centrifugation method for separation of granulocytes and mononuclear cells from blood using discontinuous density gradient of percoll. J Immuno Methods 1982; 54:43～6
6. 翁玉椿　王秀平　卢泳才。细胞和细胞膜内过氧化脂质的微量测定。细胞生物学杂志　1985；7:142～3
7. Mecord JM. The Superoxide Free Radical:Its Biochemistry and Pathophysiology. Surgery 1983; 94:412
8. William S. Mitochondria Handbook of Shock and Trauma. Vol I Basic Science 1983
9. 陆付耳　李鸣真　叶望云，等。"热毒清"保护线粒体的实验研究。危重病急救医学 1989；创刊号:25～9
10. Harlan JM, Harker LA, ReidyMA, et al. Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro. Lab Invest 1983; 48:269～74

(收稿：1991-01-19；修回：1991-11-29)

In vitro study of endotoxin effects on lipid peroxidation injury of hepatocytes of rats

Wang Tao, Chen Huisun, Wang Jianghuai, et al (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract The effects of endotoxin on lipid peroxidation injury of rat hepatocytes and the protective effects of exogenous superoxide dismutase (SOD) were studied in vitro. It was found that after the isolated rat hepatocytes and endotoxin (500 ng/ml) were incubated together for 6 hours, there was an obvious increase of malondialdehyde (MDA) level and lactic dehydrogenase (LDH) and SOD activities, and the increase of LDH and SOD activities occurred earlier than that of MDA level. Polymorphonuclear neutrophils (PMN) after activated by endotoxin could destroy the hepatocytes and increase MDA level and LDH and SOD activities which could partially be inhibited with the pretreatment of exogenous SOD.

These findings suggest that endotoxin can intensify the injurious effects of PMN on hepatocytes and it can also directly induce lipid peroxdation injury on hepatocyes but the mechanism was not clear.

Key words shock; endotoxins; liver/CY; lipid peroxides; superoxide dismutase

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net