DOI:10.16016/j.1000-5404.1990.04.008

脂质过氧化在D-氨基半乳糖致大鼠肝坏死中的意义及维生素E的治疗作用

张永明 向居正 李奇芬 李 平 吴力克 何长伦 郝 飞（西南医院 传染科）

提 要 本文观察了D-GalN致大鼠肝坏死模型中MDA和抗氧化系统的动态变化及其与肝损害的关系，并通过VE治疗观察抗氧化剂对肝脏的保护作用。结果表明，肝损害随着肝和血中MDA的显著升高而加重，二者关系密切，同时，抗氧化系统受损。VE注射治疗不仅显著提高了血和肝内VE含量，显著降低了血和肝MDA水平，不同程度地维持了GSH水平和SOD、GSH-px活力，而且显著改善了肝脏病变，更重要的是使致死量D-GalN中毒大鼠存活率得到显著提高。

关键词 过氧化脂质；半乳糖胺；维生素E；超氧化物歧化酶；肝坏死；谷胱甘肽

已经证实，全身各个系统的多种损害与自由基损伤有关[1]。作为自由基损伤的重要方式之一，脂质过氧化在各种类型肝炎中均显著增强，其中以重型肝炎为著[2]。D-氨基半乳糖（D-GalN）致大鼠肝坏死是目前公认较好的暴发性肝坏死动物模型[3]。本实验旨在通过系统观察肝坏死模型中脂质过氧化产物丙二醛（MDA）的改变规律以及抗氧化剂维生素E（VE）的治疗作用，对脂质过氧化在肝坏死发病机理中的地位作一初步评价。

1 材料和方法

1.1 模型制作[3]

健康Wistar大鼠35只（雌雄各半，体重187.0±27.5g）随机分为7组，同时腹腔一次性注射不同剂量D-GalN（重庆医科大学化学教研室产品，批号881030），观察10天内存活情况。结果最适亚致死量为1.0g/kg，致死量为1.8g/kg。重复实验证实本模型稳定。

1.2 实验分组

①存活率观察：治疗组和对照组各15只同时注射致死量D-GalN，定期记录存活率。治疗组于12h始腹腔注射VE（250mg/kg，日1次，共3次）。每次注射VE的同时给对照组注射等容量生理盐水。②指标观察：A、B两组同时注射亚致死量D-GalN，A组（48只）注射后0.5、2、4、6、12、24、48和72h各随机活杀6只测定指标。B组（18只）VE治疗方法同治疗组，指标测定与A组同步进行。B组每次治疗的同时A组注射等容量生理盐水。另取15只不作任何处理活杀测定指标作为正常对照。

1.3 检测指标

肝促凝血活酶试验（HPT）按试剂说明书进行。血清鸟氨酸氨甲酰转移酶（OCT）以比色法[4]测定。血浆和肝匀浆MDA以TBA法[5][6]测定。血浆和肝匀浆VE以荧光法[7]测定，肝匀浆还原型谷胱甘肽（GSH）和谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-px）以比色法[8][9]测定，血清和肝匀浆超氧化物歧化酶（SOD）以化学发光法[10]测定。肝匀浆蛋白含量以CBB-SDS法[11]测定。光镜观察肝脏病变（HE染色）。

统计学处理：两样本率比较采用χ^2检验，相关性分析及其显著性检验、多因素方差分析在计算机上进行。

2 结果

2.1 血和肝MDA变化及VE治疗的影响（表1）

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

表1 血和肝MDA含量变化及VE治疗的影响 ($\bar{X}\pm SD$)

	组别	中毒前 (n=15)	中毒后 (h) (n=6)						
			0.5	2	4	6	12	24	48	72
肝MDA (nmol/mg·pr)	A	1.39±0.5	1.8 ±0.4	1.7 ±0.5	3.6 ±1.1**	3.1 ±0.4**	4.3 ±0.5**	10.6 ±3.9**	2.9 ±1.1**	2.8 ±2.2**
	B							3.4 ±1.7ΔΔ	2.4 ±1.7	1.8Δ ±1.1
血浆MDA (nmol/ml)	A	7.8±2.7	7.1 ±3.8	5.2 ±3.5	7.6 ±0.8	5.8 ±1.4	9.8 ±3.9*	10.7 ±7.1*	13.8 ±6.2**	10.4 ±3.5*
	B							5.4 ±1.4ΔΔ	5.7 ±0.6ΔΔ	6.5 ±1.7Δ

注：*, **与中毒前比$P<0.05$和$P<0.01$

Δ, ΔΔ与A组比$P<0.05$和$P<0.01$

A为生理盐水对照组，B为VE治疗组

（以后表中符号意义与此表相同）

2.2 自由基清除剂及酶的改变及VE治疗的影响（表2、3）

表2 自由基清除剂和酶的早期变化 ($\bar{X}\pm SD$)

时间 (h)	数目 (n)	肝GSH (μmol/mg·pr)	肝GSH-px (Eu/mg·pr)	SOD 血清 (Eu/ml)	SOD 肝脏 (Eu/mg·pr)	VE 血浆 (μg/ml)	VE 肝脏 (μg/g·pr)
中毒前	15	5.4±1.1	30.0±9.0	1190.8±84.9	112.7±0.7	5.58±3.5	15.34±2.1
注射后0.5	6	5.96±2.23	28.3±4.9	1135 ±125.8	108.8±4.9	1.8 ±0.8**	495.8±180***
2	6	3.35±0.53*	25.2±5.8	1011.7±235.3	106.9±4.9	0.3 ±0.1**	88.7±8.6**
4	6	3.7 ±0.7 9*	19.4±8.5*	1037.5± 41.3	104.3±4.1	0.2 ±0.1**	0.05±0.01*
6	6	3.38±1.1*	15.3±5.8**	987 ±187.2*	95.6±3.2*	0.5 ±0.3**	13.7±7.1
12	6	3.7 ±0.8*	21.9±7.4*	990 ±258.4*	92.3±4.5**	1.99±0.8**	7.9±2.1*

表3 VE治疗对自由基清除剂和酶的影响 ($\bar{X}\pm SD$)

组别	时间 (h)	数目 (n)	肝GSH (μmol/mg·pr)	肝GSH-px (Eu/mg·pr)	SOD 血清 (Eu/ml)	SOD 肝脏 (Eu/mg·pr)	VE 血浆 (μg/ml)	VE 肝脏 (μg/g·pr)
O▼		15	5.4±1.1	30.0±9.0	1190.8±84.9	112.7±0.7	5.58±3.5	15.34±2.1
A	24	6	3.3±0.7*	25.1±11.6	426.5±391.1**	101.6±1.9	7.4 ±2.6*	24.6 ±11.2**
B		6	3.8±0.7	29.6± 7.1	690.0±242.5ΔΔ	102.9±2.9	5.2 ±3.0Δ	30.50 ±93.4ΔΔ
A	48	6	3.8±0.7*	25.5± 6.1	883.3±178.7*	101.6±1.8	5.2 ±2.6	4.1 ± 2.9**
B		6	3.7±0.9	29.6± 4.7	1020.5± 44.1Δ	98.2±5.9	23.0±10.1ΔΔ	91.0 ±47.1ΔΔ
A	72	6	2.1±0.7**	25.4±10.0	800.0±288.5*	86.9±8.0**	5.4± 2.4	111.0 ±11.3**
B		6	5.3±0.6ΔΔ	27.8± 7.5	981.5±136.8Δ	100.2±5.1Δ	23.2± 9.3ΔΔ	85.4 ±39.4Δ

注：▼为中毒前正常对照

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

2.3 肝功能和肝损伤的变化及VE治疗的影响（表4）

表4 肝功能和肝损伤变化及VE治疗的影响（$\bar{X}\pm SD$）

	组别	中毒前 (n=15)	中毒后 (h) (n=6) 0.5	2	4	6	12	24	48	72
HPT (活动度%)	A	132 ±6.12	115.2 ± 1.8*	111.6 ± 4.1*	85.2 ±13.8**	60.9 ±15.8**	49.3 ±27.7**	18.3 ±15.3**	28.3 ±21.6**	53.7 ±41.7**
	B							41.0 ±10.9△△	78.4 ±34.7△△	115.3 ±30.9△△
OCT (IU/L/min)	A	6.8 ±1.6	23.8 ± 5.7**	43.7 ± 9.1**	72.8 ±24.4**	319.2 ±54.6**	245.3 ±34.5**	170.8 ±50.1**	174.6 ±37.8**	129.9 ±32.4**
	B							101.1 ±48.6△	149.5 ±44.9	21.4 ± 6.2△△

2.4 肝脏病理变化及VE治疗影响

A组（对照组）中毒后30min可见肝细胞界限不甚清楚，明显充血。12h出现点状坏死，24～72h坏死区扩展为大片状，有时充满整个视野，伴弥漫性炎细胞浸润，广泛充血和出血。部分切片可见细胞增生。B组（VE治疗组）细胞变性程度轻，坏死区域小，肝小叶结构清晰，肝细胞在72h增生活跃。

2.5 肝MDA与肝损害的相关关系

总的看，随着肝MDA增高肝脏病变逐步加重。肝MDA与HPT和OCT分别有显著的负相关或正相关（r分别为－0.6351和0.5658，P值均<0.01）。

2.6 VE治疗对致死量D-GalN中毒大鼠存活率的影响（见表5）

表5 VE治疗对致死量D-GalN中毒大鼠存活率的影响

组别	数目 (n)	观察时间 (h) 24	48	72	96	120	240
对照组	15	15(100)	7(46.7)	3(20)	1(6.7)	1(6.7)	1(6.7)
治疗组	15	15(100)	11(73.3)	9(60)	7(46.7)*	7(46.7)*	7(46.7)*

注：括号外为存活数，括号内为存活率（%）

*：两组相比$P<0.05$

3 讨论

在机体抗氧化系统中，SOD能特异地清除$O_2^{\cdot-}$[3]，GSH-px能通过氧化GSH而使H_2O_2和其它一些有机过氧化物解毒[3]。本实验结果显示，D-GalN中毒后30min血浆VE即显著下降而肝VE却异常增高，数小时后血和肝SOD、GSH-px活性及GSH水平都有显著或非常显著的降低，说明抗氧化系统受到了严重损害，机体已无法有效地清除各种自由基。

D-GalN的肝损伤机理尚不明了，脂质过氧化与之是否有关未见详尽报道。本实验发现，肝损害的加重伴随着肝MDA的升高，二者高度一致。肝MDA水平与肝功能和肝损伤程度分别有着显著的负相关和正相关，均说明脂质过氧化与肝损害关系密切。脂质过氧化是各种自由基均能促发的一个逐级放大的连锁反应，一旦发生则生物膜的完整性和流动性会迅速受到破坏[1]。

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

本实验还发现，中毒后30min血清OCT（一个肝特异性线粒体酶[4]）已非常显著升高，肝切片可见细胞界限不清，这可能是极早期发生了脂质过氧化造成生物膜损伤的结果。再者，中毒后30min血浆VE即显著降低，而肝VE却升高数10倍。这可能系D-GalN中毒后机体处于“氧化应激”状态，血浆VE被肝细胞迅速摄取所致。血和肝VE的早期变化与血清OCT、肝病理的早期变化均强烈提示脂质过氧化发生极早。虽然本实验中肝MDA于4h才显著提高，但并不排除极早期发生脂质过氧化的可能性，因为目前检测MDA的方法尚不太灵敏[1]。由于肝细胞内的脂质过氧化反应，血和肝VE迅速被耗竭，通过某种信息传递机制促发脂肪等组织中VE释放入血，而后入肝。可能是VE的这种消耗和释放的“不均衡”造成了血和肝VE含量在某些时相的剧烈波动。

VE用于治疗D-GalN所致肝坏死尚无报道。实验表明VE治疗不仅显著提高了各时相血和肝VE水平，而且不同程度维持了GSH水平和SOD、GSH-px活力；显著降低了肝和血MDA水平，重要的是使肝损害显著减轻，使致死量D-GalN中毒大鼠存活率得到显著提高。

综上所述，脂质过氧化在D-GalN致大鼠肝坏死的发病机理上可能占有重要地位。

（本实验得到复合伤研究室陈宗荣、临床生化教研室吴治芬、野战外科研究所汪江淮等同志的指导和协助，谨此致谢）

参考文献

1. Cross CE. Oxygen radicals and human disease. Ann Inter Med 1987; 107(4):526
2. 范学工，等。病毒性肝炎病人血清过氧化脂质含量及其与病情的关系。中华医学杂志 1988；68（2）:76
3. Okawa M, et al. Effects of regenerating liver cytosol on drug-induced hepatic failure. Surgery 1985; 97(3):455
4. Ohshita M, et al. A direct method for the estimation of ornithine carbamoyltransferase activity in serum. Chin Chem Acta 1976; 67(1):145
5. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. Method in Enzymology 1984; 105:328
6. Ohkowa H, et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95(2):351
7. Desai ID. Vitamin E analysis methods for animal tissues. Methods in Enzymology 1984; 105:138
8. Beutler E, et al. Improved for the determination of blood glutathione. J Lab Clin Med 1963; 61(5):882
9. Hafeman DG, et al. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. J Nutr 1974; 104(5):580
10. 李益新，等。超氧化物歧化酶活力测定的新方法—化学发光法。生物物理生物化学进展 1983；（2）:59
11. 叶庆林，等。微量蛋白质定量的CBB-SDS法。临床检验杂志 1986；4（2）:120
12. Lemogne M, et al. Breath pentane analysis as an index of lipid peroxidation:a functional test of vitamin E status. Am J Clin Nutr 1987; 46(2):267

（收稿：1989.05.04；修回：1990.01.09）

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

The Important Role of Lipid Peroxidation in Liver Cell Necrosis of Rats Induced by D-galactosamine and the Therapeutic Effect of Vitamin E

Zhang Yongming, et al. (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical College)

Systematic changes of lipid peroxidation product and the antioxidant system in liver cell necrosis of rats induced by D-galatosamine (D-galN) were studied; the relationship between these data and degree of liver cell damage were observed; therapeutic effect of vitamin E (VE), a kind of free radical scavenger was investigated. Results: occurrence and intensification of liver damage (LD) after intraperitoneal injection of a sublethal dose of D-galN were accompanied by the accumulation of malondialdehyde (MDA) in liver and plasma. The degree of LD was closely correlated with the increased MDA level and decreased antioxidant function. VE injection provided increase of plasma and liver VE level, supressed MDA level, maintained the reduced glutathione(GSH)content and activities of superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase (GSH-px) at various degrees, and ameliorated the LD. VE injection also increased the survival rate of rats with liver necrosis induced by a lethal dose of D-galN. The results suggested that the lipid peroxidation might play an important role in liver necrosis induced by D-galN.

Key words: lipid peroxides; galactosamine; vitamine E/TU; superoxide dismutase; necrosis, liver; glutathione

论文摘要

斑秃免疫病理观察及病因学探讨

张景政 导师 刘荣卿教授 (西南医院·皮肤科)

本文通过对244例斑秃患者的临床、病理、免疫病理、自身抗体等方面的观察，探讨斑秃的病因。结果发现：青年发病率较高，部分患者有家族史及精神创伤史。毛球周围有淋巴细胞浸润，有时可见毛囊中有多核巨细胞存在，毛发周期明显异常，大量毛发由生长期提前进入并持续存在于休止期。毛囊及毛球中的郎格罕细胞（LC）明显增多，主要是$T_6^+DR^-$的LC增多，LC的这种改变与病情活动性有关。毛周及外周血T_3、T_4、T_8、T_4/T_8检查表明毛囊周围及外周血T细胞亚群比例失调。24/54斑秃见毛囊角朊细胞表达HLA-DR抗原。直接免疫荧光（DIF）显示81.5%患者毛囊周围及毛囊内有C_3、IgG及IgM沉积，主要有3种形态。33.3%患者发现有ANA、抗胃壁细胞、平滑肌及甲状腺等自身抗体。循环免疫复合物（CIC）检查未见异常。对比观察了强的松和长压定在治疗斑秃中的利弊，并推荐了治疗方案。斑秃可能是由于遗传而使患者存在着易感因素。在精神创伤等诱因作用下，免疫功能发生紊乱，导致以毛球为中心的异常免疫反应，影响了正常的毛发生长周期，致使毛发脱落。

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