

然科学版),1997,1:71-76.

- [3] 马强,张振书,张亚历,等. 结肠癌细胞多药耐药模型 LoVo/Adr 的建立及其耐药相关基因的表达. 中华消化杂志,2002,22:412-415.
- [4] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005,45:51-88.
- [5] Nebert DW, Vasiliou V. Analysis of the glutathione S-transferase (GST) gene family. *Hum Genomics*, 2004,1:460-

464.

- [6] Hayashi R, Chinyanga F, Chengedza S, et al. Inhibition of human glutathione transferases by multidrug resistance chemomodulators in vitro. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2006,21:581-587.

(收稿日期:2010-03-12)

(本文编辑:金昱)

含氢溶液对四氯化碳诱导小鼠急性肝损伤的保护作用

谢江 陈国庆 曹保轩

四氯化碳(CCl₄)有较强的致肝脏毒性,目前普遍应用于诱导急性肝损伤模型。CCl₄进入体内后,经肝微粒体细胞色素 P450 激活,产生活性三氯甲基自由基、二氯甲烷自由基和过氧化三氯甲烷自由基,这些自由基可与细胞内和细胞膜的大分子发生共价结合,使酶功能失活,肝细胞膜脂质过氧化,破坏细胞膜结构和功能,进而导致肝细胞损伤^[1]。CCl₄还可激活库普弗细胞释放大量炎性因子,扩大炎性反应,进一步加重肝损伤。近年有研究发现,氢分子可有效抑制羟自由基,但并不影响其他具有重要生理调节作用的氧自由基,具有选择性抗氧化作用^[2]。目前已有大量研究证实氢分子可明显减轻缺血再灌注引起的脑、肝、心、小肠氧化损伤,还可有效抑制结肠炎、药物性肝炎中的炎性损伤。本研究通过观察饱和含氢 0.9%氯化钠溶液对 CCl₄ 诱导小鼠急性肝损伤的保护作用,并进一步探讨其对肝细胞氧化应激和炎性反应的影响,为临床急性肝损伤的治疗提供新思路。

一、材料和方法

1. 含氢溶液的制备方法^[3]:将高压氢气(输出压力 0.4 MPa)通入 0.9%氯化钠 6 h 以达到饱和浓度,灭菌,4℃保存。气相色谱法检测其中氢浓度为 0.75 mmol/L,达到了 0.6 mmol/L 的有效氢治疗浓度。

2. 动物分组及处理:42 只 C57BL/6 小鼠(上海第二军医大学动物中心提供),溶液体重 20~22 g,自由饲养,均分为 3 组。正常对照组腹腔注射花生油,1 h 后以 5 ml/kg 剂量腹腔注射 0.9%氯化钠溶液。模型组腹腔注

射 CCl₄ 制作急性肝损伤模型,1 h 后以 5 ml/kg 剂量腹腔注射 0.9%氯化钠溶液。治疗组造模方法同模型组,1 h 后以 5 ml/kg 剂量腹腔注射含氢 0.9%氯化钠溶液。16 h 后,乙醚麻醉,取眼球血、切取肝脏。

3. 肝脏组织病理学检查:肝脏标本甲醛固定,乙醇脱水,石蜡包埋,4 μm 切片,HE 染色,光镜下观察组织形态学变化。

4. 肝功能及肿瘤坏死因子(TNF-α)检测:眼球血凝固后,4℃离心 20 min,取上清,全自动生化分析仪(HITACHI,日本)检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平。按照 TNF-α ELISA 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)说明书操作,用酶标仪(Thermo,芬兰)检测样本吸光度并通过标准曲线计算 TNF-α 浓度。

5. 肝组织氧化应激及抗氧化指标检测:制备肝组织匀浆,离心后取上清,按丙二醛(malondialdehyde,MDA)、谷胱甘肽(glutathione,GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、过氧化氢酶(catalase,CAT)、谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase,GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase,GPx)试剂盒(均购自南京建成生物工程所)说明书操作,用分光光度计(BioTek,美国)在不同波长下检测各样本吸光度变化,计算肝组织中 MDA、GSH、SOD、CAT、GR、GPx 含量。

6. 统计学处理:结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异比较采用单向方差分析,两样本均数间比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

二、结果

1. 小鼠一般状况:注射 CCl₄ 16 h 后,模型组小鼠死亡 3 只,治疗组及正常对照组均存活。与正常对照组小鼠比较,模型组小鼠毛发无光泽,易激惹,食欲差,精神萎靡,体重无明显改变。治疗组小鼠精神、食欲等状况明显改善。

2. 肝组织形态学变化:正常对照组小鼠肝组织结构

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2010.07.018

作者单位:200050 上海市同仁医院外科(谢江、陈国庆);济南军区司令部门诊部外科(曹保轩)

通信作者:谢江

完整,细胞形态正常,未见细胞凋亡、坏死、浆细胞及中性粒细胞浸润。模型组肝组织结构紊乱,肝细胞严重水肿、变性,弥漫性大片状坏死,伴汇管区大量中性粒细胞浸润。治疗组上述病理改变明显减轻,肝损伤显著改善。见图1。

3. 血清肝功能及 TNF- α 水平: 模型组小鼠血清转氨酶水平、肝组织 TNF- α 浓度均高于正常对照组,含氢0.9%氯化钠溶液能有效抑制肝细胞转氨酶和 TNF- α 的释放,显著降低 CCl₄ 导致的肝功能损伤,减轻炎症反应,组间差异均有统计学意义(P 值均<0.01)。见表1。

4. 肝组织氧化应激及抗氧化水平: 与正常对照组相比,模型组小鼠肝组织 MDA 水平显著升高,SOD、CAT、GR、GPx 活性显著降低,治疗组则获显著改善,组间差异均有统计学意义(P 值均<0.01)。见表2。

讨论 CCl₄ 在肝微粒体细胞色素 P450 激活下产生大量氧自由基,可引起强烈的脂质过氧化反应,破坏细胞膜结构和功能,是引起肝脏损伤的关键因素。因此,抑制自由基产生、增强组织抗氧化能力是减轻 CCl₄ 肝损伤的重要手段^[4]。CCl₄ 产生的氧自由基及脂质过氧化还能与肝内抗氧化酶 SOD、CAT、GR 和 GPx 反应,降低其清除氧自由基的能力,进而减少组织中还原性 GSH 含量^[5]。GSH 是清除 CCl₄ 毒性代谢产物的重要物质,也是氧化应激条件下维持细胞生存的重要因素,GSH 耗竭会引起细胞大量坏死。因此本研究将氧自由基作为减轻 CCl₄ 肝损伤的治疗靶向。氢气作为一种生理惰性气体,被广泛用于预防潜水员减压病的发生。最近有研究发现氢气具有选择性抗氧

化作用,在氧化损伤的临床治疗方面有广阔的应用前景。氢分子量小,能弥散至线粒体和细胞核,维持线粒体膜电位稳定和 ATP 合成,有效抑制细胞脂质氧化及 DNA 损伤^[2]。MDA 是脂质氧化的标志物,CCl₄ 诱导后小鼠肝组织 MDA 水平显著升高,含氢溶液具有选择性抗氧化作用,能有效抑制肝脏 MDA 生成,提高 GSH 含量,减轻脂质氧化损伤。肝组织 SOD、CAT、GR、GPx 活性能有效反映肝细胞的抗氧化能力。腹腔注射 CCl₄ 能严重损伤小鼠肝功能,增强肝脏脂质过氧化水平,减少 GSH 含量,显著降低肝组织 SOD、CAT、GR 和 GPx 活性,抑制自身抗氧化反应。含氢0.9%氯化钠溶液能明显减轻肝脏脂质过氧化水平,增强自由基清除能力,有效保护 CCl₄ 诱导的肝功能损伤。TNF- α 在炎症、损伤的主动防御反应中起重要作用。过量 TNF- α 能诱发炎症介质、活化中性粒细胞、诱导肝细胞凋亡,还能正反馈促进氧自由基释放,是导致全身炎症反应和急性肝损伤的重要因素^[6]。CCl₄ 诱导后小鼠血清中 TNF- α 水平明显升高,而含氢0.9%氯化钠溶液能降低 TNF- α 表达,减轻肝脏炎症级联反应,抑制肝功能损伤。

综上所述,腹腔注射含氢0.9%氯化钠溶液能明显减轻 CCl₄ 诱导的肝脏脂质过氧化,显著减少炎症因子释放,提高肝组织抗氧化能力,从而有效保护梗阻性黄疸肝功能损伤。然而,氢分子是否能作为信号分子调节信号通路发挥作用,尚未得到证实,因此含氢溶液保护作用的机制仍需进一步研究。含氢溶液价格低廉、使用安全便利,在临床治疗中有广泛的应用前景,可作为急性肝功能损伤的

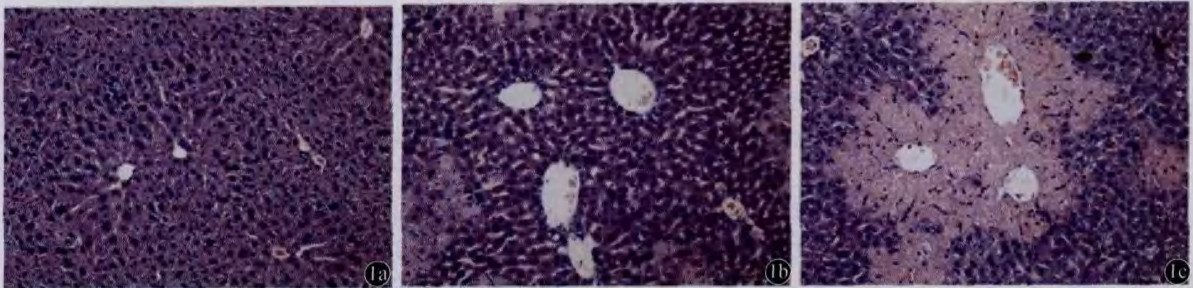


图1 含氢0.9%氯化钠对四氯化碳诱导急性肝损伤的保护作用 HE ×100 1a 正常对照组 1b 模型组 1c 治疗组

表1 各组小鼠血清丙氨酸转氨酶、天冬氨酸转氨酶、肿瘤坏死因子水平($\bar{x} \pm s$)

组别	丙氨酸转氨酶(U/L)	天冬氨酸转氨酶(U/L)	肿瘤坏死因子(pg/ml)
正常对照组(n=14)	69.32±5.16	133.54±8.14	40.30±17.40
模型组(n=11)	259.85±9.19	301.94±12.95	120.93±22.86
治疗组(n=14)	179.32±8.84	176.55±9.21	67.14±20.45

表2 各组小鼠丙二醛、谷胱甘肽、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽还原酶和谷胱甘肽过氧化物酶水平($\bar{x} \pm s$)

组别	丙二醛(nmol/mg)	谷胱甘肽(nmol/mg)	超氧化物歧化酶(U/mg)	过氧化氢酶(U/mg)	谷胱甘肽还原酶(U/mg)	谷胱甘肽过氧化物酶(U/mg)
正常对照组(n=14)	7.45±2.25	26.62±3.39	26.64±2.41	6.62±1.39	5.22±0.39	7.32±1.03
模型组(n=11)	13.15±2.36	18.61±2.56	15.62±3.38	3.61±1.56	3.61±0.56	4.55±1.13
治疗组(n=14)	8.63±2.10	23.11±2.32	19.71±2.89	7.11±1.42	4.51±0.72	6.54±0.92

有效保护和治疗手段。

参 考 文 献

[1] Edwards MJ, Keller BJ, Kauffman FC, et al. The involvement of Kupffer cells in carbon tetrachloride toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993,119:275-279.

[2] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*, 2007,13:688-694.

[3] Park JK, Jeong DH, Park HY, et al. Hepatoprotective effect of Arazyme on CCl4-induced acute hepatic injury in SMP30 knock-out mice. *Toxicology*, 2008,246:132-142.

[4] Manibusan MK, Odin M, Eastmond DA. Postulated carbon tetrachloride mode of action; a review. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2007,25:185-209.

[5] Basu S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation; eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients. *Toxicology*, 2003,189:113-127.

[6] Wu YL, Piao DM, Han XH, et al. Protective effects of salidroside against acetaminophen-induced toxicity in mice. *Biol Pharm Bull*, 2008,31:1523-1529.

(收稿日期:2010-02-03)

(本文编辑:杨学文)

褪黑素干预重症急性胰腺炎肾损伤及其受体表达

金尹 陈丽倩 张浩 吴建胜 高道键 孙学成 贾国葆 黄智铭

急性胰腺炎(acute pancreatitis, AP)是临床常见的急重症,其中 10%~20% 的患者发展为重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)^[1],病死率高达 15%~20%^[2]。胰外器官损伤中肾功能障碍发生率仅次于肺功能障碍,为 14%~43%^[3],且大多同时伴有其他器官系统的损害,发展至急性肾功能衰竭(ARF)后病死率高达 80%。褪黑素(melatonin, MT)是由哺乳动物松果体分泌的一种吲哚类激素,具有强大的抗氧化作用及免疫调节作用。本研究通过对实验性 SAP 大鼠应用 MT 后,探讨其对肾功能障碍的影响及 MT 受体(MR)表达。

一、材料和方法

1. 动物模型制备:健康 SD 雄性大鼠 36 只,体重 250~350 g,由上海实验动物中心提供。将大鼠饲养 1 周后随机均分为 3 组,予以造模。术前 12 h 禁食不禁水,5%水合氯醛(1.3 ml/200 g~1.4 ml/200 g)腹腔内注射麻醉,无菌条件下经大鼠腹正中线入腹,确认胰管,采用 20 号静脉留置针经对侧的十二指肠插入肠腔,留置针进入十二指肠乳头后拔出内芯,同时在胆管出肝门处用无损伤小动脉夹夹闭,防止注入药物反流入肝脏。正常对照组(SO 组)仅翻动几次;SAP 组注入 4%脱氧胆酸钠(0.1 ml/100 g);MT 组在诱导 SAP 前 30 min 经腹腔注射 MT(50 mg/kg),常

规关腹,动物造模后于背部皮下分点注射 2.0 ml 无菌 0.9%氯化钠溶液,补充水分。每组分别于术后第 4 和 12 小时取大鼠 6 只,经下腔静脉取血,离心留取上清液-20 ℃保存,供血清淀粉酶、尿素氮、肌酐检测;取胰腺组织和右侧肾脏组织分两部分,一部分放置于-70 ℃保存,进行相关检测,另一部分经 4%多聚甲醛固定,石蜡包埋分别行 HE 染色,免疫组化观察。

2. 试剂:MT(Ruibio)先以无水乙醇(<0.2%);脱氧胆酸钠(Sigma 公司),Trzol(Invitrogen 公司),逆转录试剂盒(Fermentas 公司,PCR Mix(Tiangen 公司),100 bp DNA Ladder(MBI 公司)。MR 和 β -actin 引物由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成,MR1 上游引物 5'-TGCTACATTTGC-CACAGTCTCA-3' 下游引物 5'-CCAGCACAGGCAAAA-AGTA-3',扩增片段长 375 bp。 β -actin 上游引物 5'-CAAGTTCAACGGCACAGTCAA-3' 下游引物 5'-GTG-GTCATGAGCCCTTCCA-3',扩增片段长 590 bp。抗羊 MR 多克隆抗体(适用于大鼠)和 SABC 免疫组化试剂盒购于武汉博士德公司。丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购于南京建成生物工程公司。酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒为 R&D 公司产品。

3. 肾脏 MR 免疫组化染色:肾脏组织石蜡包埋后切成 4 μ m 厚切片,经脱蜡、水化、封闭后,加入抗羊 MR 抗体 1:100 稀释后,4 ℃孵育过夜,二抗孵育 30 min, SABC 孵育 30 min, DAB 显色,苏木精复染,盐酸乙醇分化,氨水反蓝,最后脱水、透明、封片,镜检。

4. RT-PCR 检测肾组织 MR 表达:按 Trizol 法抽提总 RNA,并行 RT-PCR 反应,反应条件为 95 ℃预变性 5 min,

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2010.07.019

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2080387);温州市科委重大项目基金(Y20090006)

作者单位:325000 温州,温州医学院附属第一医院消化科
通信作者:吴建胜,Email: wzwujs@163.com