

DOI:10.3724/SP.J.1008.2015.01300

还原型谷胱甘肽保护线粒体并减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤

蔡林林,傅海龙,张卿卿,李永华,朱秋峰,袁红斌,徐海涛*

第二军医大学长征医院麻醉科,上海 200003

[摘要] **目的** 探讨还原型谷胱甘肽(GSH)减轻肝脏缺血再灌注(I/R)损伤的作用及机制。**方法** 将成年SD大鼠分为假手术组、I/R组和GSH组,每组20只。除假手术组外,其余组建立70%大鼠肝I/R损伤模型,肝脏缺血时间为60 min。GSH组大鼠于缺血前5 min经股静脉注射5 mg/kg的GSH。再灌注后通过血清学和组织学指标观察肝损伤情况,TUNEL染色评价肝细胞凋亡。比较各组肝组织GSH与氧化型谷胱甘肽(GSSG)的比值(GSH/GSSG比值),检测各组肝细胞线粒体钙容纳力(CRC)。**结果** 与I/R组比较,再灌注6 h后GSH组血清天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)均降低($P < 0.05$)。再灌注24 h,与I/R组比较,GSH组肝组织损伤减轻,凋亡细胞数目减少($P < 0.05$);同时,再灌注6 h后GSH组肝组织GSH/GSSG比值较I/R组增加($P < 0.05$);与I/R组比较,再灌注后6 h GSH组肝细胞线粒体CRC增加($P < 0.05$)。**结论** GSH预处理能减轻大鼠肝脏I/R损伤,该作用可能与减轻线粒体氧化应激,从而抑制线粒体通透性转换孔开放有关。

[关键词] 肝;再灌注损伤;谷胱甘肽;线粒体

[中图分类号] R 575 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2015)12-1300-04

Glutathione protects mitochondrion and alleviates liver ischemia-reperfusion injury in rats

CAI Lin-lin, FU Hai-long, ZHANG Qing-qing, LI Yong-hua, ZHU Qiu-feng, YUAN Hong-bin, XU Hai-tao*

Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effects of glutathione (GSH) against hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury and the related mechanism. **Methods** SD rats were randomized into Sham, I/R and GSH groups with 20 rats in each group. Rat models of segmental (70%) warm hepatic ischemia were established in I/R and GSH groups. GSH was injected through the femoral vein at the dose of 5 mg/kg 5 min before ischemia. At 24 h after reperfusion, liver injury was evaluated by serological and histological indices. Liver cell apoptoses were evaluated by TUNEL staining. The GSH/oxidized glutathione (GSSG) ratios of tissue level were compared between different groups. Liver mitochondria were collected and the mitochondrial calcium capacity (CRC) was evaluated. **Results** The serum aspartate transaminase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) levels in GSH group were significantly decreased 6 h after reperfusion compared with I/R group ($P < 0.05$). 24 h after reperfusion, the liver injury was alleviated and the number of apoptosis cells was significantly decreased in GSH group compared with I/R group ($P < 0.05$). The GSH/GSSG ratio of tissue level in GSH group was significantly increased 6 h after reperfusion compared with I/R group ($P < 0.05$). Liver mitochondrial CRC in GSH group was significantly increased 6 h after reperfusion compared with I/R group ($P < 0.05$). **Conclusion** GSH preconditioning can protect liver from hepatic I/R injury, which is possibly by inhibiting oxidative response and subsequent inhibition of mitochondrial permeability transition.

[Key words] liver; reperfusion injuries; glutathione; mitochondria

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2015, 36(12):1300-1303]

还原型谷胱甘肽(GSH)是哺乳动物细胞内含量最丰富的低相对分子质量的多肽,由谷氨酸、半胱氨

酸和甘氨酸残基组成。我们前期的研究显示,肝脏缺血再灌注(I/R)时,氧化应激导致的细胞线粒体能

[收稿日期] 2015-04-01 **[接受日期]** 2015-08-21

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(81300344),上海市卫计委重点项目(20120708),上海市科委生物医药引导项目(124119a3601)。Supported by National Natural Science Foundation of China for Young Scientists (81300344), Key Program of Shanghai Health and Family Planning Committee (20120708), and Biological Medicine Guide Program of Shanghai Science and Technology Committee (124119a3601)。

[作者简介] 蔡林林,硕士生。E-mail: caipj828@126.com

* 通信作者 (Corresponding author)。Tel: 021-81885828, E-mail: xu_tt@163.com

量障碍是细胞坏死和凋亡的关键环节^[1-2],而大部分的药性肝保护措施均能提高组织 GSH 含量。肝脏 I/R 时,线粒体内钙超载是线粒体通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)开放的重要诱因^[3]。采用非穿透性 Ca^{2+} 荧光分子探针,通过动态检测线粒体悬液的荧光强度,能敏感观察到已知浓度的外源性 Ca^{2+} 刺激下线粒体外钙流的变化,并以此判断 MPTP 开放的时机,评价 MPTP 敏感性^[1-2]。本研究拟在此基础上,研究大鼠肝脏缺血前 GSH 预处理对再灌注时肝细胞的保护作用及线粒体机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂 雄性 SD 大鼠,鼠龄 8 周,体质量 220 g 左右,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[许可证号 SYXK(沪)2012-0003]。饲养于第二军医大学实验动物中心,每日光照 12 h,自由进食。于术前 12 h 开始禁食,不禁饮水。

GSH 由重庆药友制药有限责任公司提供;Calcium green-5N 分子探针购自美国 Invitrogen 公司;原位末端标记法(TUNEL)检测试剂盒购自瑞士罗氏公司;GSH 和氧化型谷胱甘肽(GSSG)检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 实验分组与动物模型的建立 取大鼠 60 只,随机分为假手术组、I/R 组和 GSH 组,每组 20 只。各组大鼠用 1%戊巴比妥(30 mg/kg)腹腔注射麻醉后,腹部正中切口开腹。I/R 组和 GSH 组大鼠用无损伤血管夹夹闭肝左叶和肝中叶入肝血管(相应肝叶的门静脉和肝动脉),进行 70%肝脏热缺血处理 60 min,之后松开血管夹行再灌注^[1-2]。缺血前 5 min,GSH 组大鼠经股静脉注射 5 mg/kg GSH 溶液(用生理盐水溶解),I/R 组给予同体积的生理盐水。假手术组不阻断血流,其余操作同 I/R 组。

1.3 检测样本的采集与处理 于再灌注后 6 h 和 24 h 各取 10 只大鼠断头处死,迅速经心脏取血,并分离和获取血清样本。取各组大鼠新鲜肝脏组织,经 4℃生理盐水漂洗后,于肝左叶取约 3 mm×3 mm×5 mm 的肝组织块,置入 4%的中性甲醛固定,用于病理学检查。其余肝组织迅速置入液氮中保存,备检,肝右叶用于线粒体分离纯化。肝脏线粒体分离和纯化使用差速离心法^[2]。以牛血清白蛋白为标准,采用 Bradford 法进行线粒体蛋白定量。

1.4 血清天冬氨酸转氨酶(AST)和丙氨酸转氨酶(ALT)水平的测定 将再灌注后 6 h 获取的大鼠血清样本经日立 7600 型全自动生化分析仪检测 AST 和 ALT。

1.5 肝组织病理学检查 取再灌注后 24 h 各组大鼠固定后的肝组织样本,切成 2 mm×3 mm×6 mm 的肝组织块,脱水,石蜡包埋,切片,H-E 染色,光镜(×100)下观察肝组织形态。TUNEL 染色按照试剂盒方法操作,切片在光镜下(×400)观察,并随机选取 10 个视野,计数 TUNEL 阳性细胞。

1.6 肝组织 GSH/GSSG 比值测定 将液氮中标本于冰浴中解冻后,加入 PBS 匀浆,离心后取上清,按 GSH 和 GSSG 检测试剂盒要求步骤检测。

1.7 钙容纳力(CRC)测定 取分离的线粒体蛋白 2 mg,加入孵育介质[含 70 mmol/L 蔗糖、210 mmol/L 甘露醇、10 mmol/L Tris-MOPS(3-吗啉丙磺酸)、5 mmol/L Tris-琥珀酸、2 μmol/L Tris-鱼藤酮、20 μmol/L Tris-EGTA(乙二醇四乙酸)、1 mmol/L KH_2PO_4 ,pH 7.4] 2 mL。在孵育介质中加入 1 μmol/L Calcium green-5N 分子探针,于 25℃下孵育 2 min 后,每分钟向悬液中加入终浓度 10 μmol/L CaCl_2 脉冲,通过 FlexStation II 荧光检测仪(美国 Molecular Devices 公司)动态检测线粒体悬液中荧光强度,激发和发射波长分别为 500 nm 和 530 nm,直到出现持久性的线粒体外 Ca^{2+} 浓度剧增,记录所需要的外源性钙脉冲的次数。计算驱动单位线粒体 MPTP 开放所需要的外源性 Ca^{2+} 的摩尔量即为 CRC。

1.8 统计学处理 用 SPSS 10.0 统计软件进行两因素方差分析,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间两两比较采用 LSD 法。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 ALT 和 AST 水平的比较 再灌注后 6 h,与 I/R 组比较,GSH 组的血清 AST 和 ALT 水平均降低($P < 0.05$),见图 1。

2.2 各组大鼠肝组织的病理改变 再灌注后 24 h,I/R 组的肝组织汇管区血窦内见大量充血,血窦排列紊乱,肝细胞出现核固缩,空泡变性,呈现大片坏死;而 GSH 组肝组织汇管区大部分肝细胞形态完好,无明显充血,汇管区远端有局灶坏死(图 2)。TUNEL 染色显示,GSH 组肝细胞凋亡减少(图 2),阳性细胞比例为(17.3±4.1)%,低于 I/R 组的(33.3±6.0)%,差异有统计学意义($n=10, P < 0.05$)。

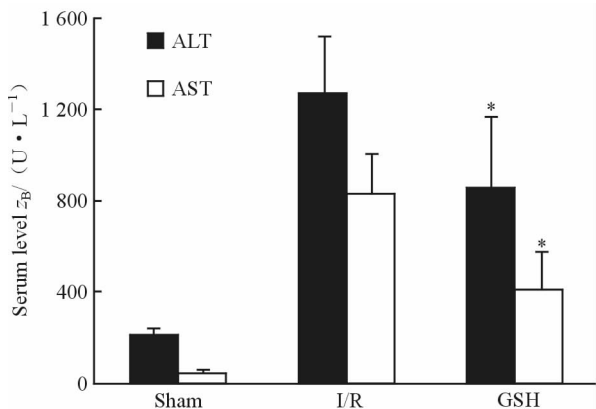


图1 再灌注后6 h各组大鼠血清ALT和AST水平的比较

Fig 1 Serum levels of ALT and AST 6 h after reperfusion in rats of each group

I/R: Ischemia/reperfusion; GSH: Glutathione; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate transaminase. * $P < 0.05$ vs I/R group. $n=10$, $\bar{x} \pm s$

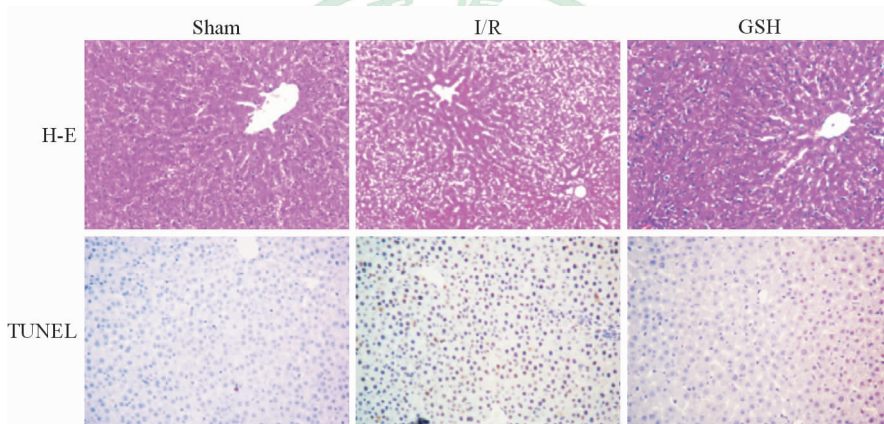


图2 再灌注后24 h各组肝组织H-E染色和原位末端转移酶标记染色结果

Fig 2 H-E and TUNEL staining 24 h after reperfusion in rat liver of each group

I/R: Ischemia/reperfusion; GSH: Glutathione. Original magnification: $\times 100$ (H-E), $\times 400$ (TUNEL)

3 讨论

I/R损伤是临床常见病理过程,其机制复杂,主要包括微循环障碍、间质水肿、炎症细胞浸润、免疫调节障碍、实质细胞功能障碍、细胞坏死和凋亡等。在一些手术如体外循环、肝切除、肝移植术等中,I/R损伤不可避免,并直接影响手术疗效和患者预后。因此,如何减轻I/R损伤一直是临床面临的重要任务。目前,大量的研究致力于药物性缺血预处理以期减轻I/R损伤。理想的预处理药物应该能模拟人体生理保护作用,对I/R损伤的产生机制具有拮抗作用,同时对机体无或仅有较小不良反应^[4]。目前临床上尚无符合上述条件的药物。

GSH是哺乳动物细胞内自然合成的,含量最丰

2.3 各组肝组织GSH/GSSG比值情况 再灌注后6 h,假手术组肝组织GSH/GSSG比值为(8.74±0.66);与I/R组(3.89±0.96)比较,GSH组肝组织中GSH/GSSG比值(6.22±1.24)升高($n=10$, $P < 0.05$)。

2.4 各组肝细胞MPTP通透性的比较 再灌注后6 h,与I/R组比较,GSH组肝细胞线粒体在外源性Ca²⁺脉冲诱导下的耐受性增加($P < 0.05$):使用琥珀酸为能量底物时,对线粒体悬液施加单次10 μmol/L CaCl₂脉冲,假手术组线粒体接受的脉冲次数最多,CRC也最高,为(73.2±12.6) nmol/mg;GSH组为(54.2±17.3) nmol/mg;而相同反应条件下,I/R组的耐受性最差,为(31.4±3.3) nmol/mg,与GSH组相比较CRC降低($n=10$, $P < 0.05$)。提示再灌注后6 h,GSH预处理能降低I/R时MPTP对外源性Ca²⁺刺激的敏感性,抑制其开放。

富的,由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的低相对分子质量的多肽。药理研究表明,GSH在人体内作为一种还原剂,具有清除体内氧自由基、抗氧化、解毒等重要生理活性^[5-7]。前期研究显示,肝脏I/R损伤时细胞内GSH生物合成能力降低,含量下降^[1-2]。本研究发现使用外源性GSH预处理可以减轻I/R后的肝组织细胞损伤,降低血浆AST和ALT水平,并在远期起到保护肝组织作用,减少肝细胞凋亡。机制研究显示,GSH预处理能增加再灌注早期肝线粒体CRC,抑制MPTP开放。我们认为该作用可能与GSH的强还原性特性、减少了活性氧(reactive oxygen species, ROS)等过氧化物的产生、阻断了MPTP开放的瀑布级联,从而进一步抑制了后续的线粒体相关细胞坏死和凋亡有关。

线粒体是真核生物进行氧化代谢的部位,在维持组织器官功能稳定及细胞结构完整中起到至关重要的作用^[8]。I/R 时,由于细胞外 Ca^{2+} 超载、氧化应激反应产物增加,线粒体外膜对蛋白质的通透性增高,以致可溶性的膜间蛋白从线粒体释放出来;同时线粒体内膜的膜电位下降^[9-11],导致线粒体膜通透性改变,直接引发线粒体破坏,细胞坏死,同时诱导 Bcl-2 及 Caspase 家族活化,引起细胞凋亡的级联反应,并导致细胞凋亡^[12-13]。因此,稳定线粒体膜电位、保护线粒体功能、抑制线粒体参与的细胞坏死和凋亡途径能有效改善 I/R 损伤^[8-13]。结合我们以往的研究发现,I/R 损伤后,由于 ROS 产生增加,对氧化反应十分敏感的线粒体膜通透性升高,线粒体功能受损,并进一步诱发细胞凋亡,加重细胞损伤^[14]。因此,理论上采用抗氧化药物直接抑制 ROS 产生可以有效改善线粒体功能。GSH 是一种强还原剂,可以减少体内 ROS 和超氧化物歧化酶的产生^[15],本研究进一步证实了 GSH 通过抑制 MPTP 开放引起的细胞坏死和凋亡,从而起到肝保护作用。本实验结果为临床肝切除或肝移植手术中使用 GSH 进行肝保护提供了理论依据。

[参考文献]

- [1] Fu H, Chen H, Wang C, Xu H, Liu F, Guo M, et al. Flurbiprofen, a cyclooxygenase inhibitor, protects mice from hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting GSK-3 β signaling and mitochondrial permeability transition [J]. *Mol Med*, 2012, 18: 1128-1135.
- [2] Fu H, Xu H, Chen H, Li Y, Li W, Zhu Q, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 ameliorates liver ischemia/reperfusion injury via an energy-dependent mitochondrial mechanism [J]. *J Hepatol*, 2014, 61: 816-824.
- [3] Pardo A C, Rinaldi G J, Mosca S M. Mitochondrial calcium handling in normotensive and spontaneously hypertensive rats: correlation with systolic blood pressure levels[J]. *Mitochondrion*, 2015,20: 75-81.
- [4] Alchera E, Dal Ponte C, Imarisio C, Albano E, Carini R. Molecular mechanisms of liver preconditioning [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16: 6058-6067.
- [5] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A.

- Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. *Circulation*, 1986, 74: 1124-1136.
- [6] Zhang Y C, Zhang Q, Li H, Zhang J, Wang G S, Xu C, et al. Prognostic factors for late mortality after liver transplantation for benign end-stage liver disease[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124: 4229-4235.
- [7] Abe K, Kimura H. The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator [J]. *J Neurosci*, 1996, 16: 1066-1071.
- [8] Lowicka E, Beltowski J. Hydrogen sulfide (H_2S)-the third gas of interest for pharmacologists[J]. *Pharmacol Rep*, 2007, 59: 4-24.
- [9] Kimura Y, Kimura H. Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress[J]. *FASEB J*, 2004, 18:1165-1167.
- [10] Whiteman M, Li L, Kostetski I, Chu S H, Siau J L, Bhatia M, et al. Evidence for the formation of a novel nitrosothiol from the gaseous mediators nitric oxide and hydrogen sulphide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 343: 303-310.
- [11] Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 264: 687-701.
- [12] Bauerfeld C P, Rastoqi R, Pirockinaite G, Lee I, Huttemann M, Monks B, et al. TLR4-mediated AKT activation is MYD88/TRIF-dependent and critical for induction of oxidative phosphorylation and mitochondrial transcription factor A in murine macrophages[J]. *J Immunol*,2012,188:2847-2857.
- [13] Hirsch J, Hansen K C, Choi S, Noh J, Hirose R, Roberts J P, et al. Warm ischemia-induced alterations in oxidative and inflammatory proteins in hepatic Kupffer cells in rats[J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006,5: 979-986.
- [14] Picard C, Casanova J L, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or IkappaBalpha deficiency[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2011, 24:490-497.
- [15] Francis R C, Vaporidi K, Bloch K D, Ichinose F, Zaplo W M. Protective and detrimental effects of sodium sulfide and hydrogen sulfide in murine ventilator-induced lung injury [J]. *Anesthesiology*, 2011, 115: 1012-1021.