

大鼠肢体缺血再灌注后肝细胞损伤及牛磺酸的保护效应

王银环,张连元*,张娜,董淑云,赵利军,李宏杰,孔小燕,刘丽华(华北煤炭医学院病理生理学教研室,河北 唐山 063000)

摘要:目的 观察大鼠肢体缺血再灌注后肝脏的损伤性变化,以及牛磺酸(taurine)对肝脏损伤性变化的影响,探讨牛磺酸对大鼠肢体缺血再灌注后肝脏功能保护作用及可能机制。方法 实验用 Wistar 大鼠 30 只,随机分为对照(control)组,缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)组和牛磺酸+缺血再灌注(taurine + Ischemia reperfusion, TR)组($n=10$)。分别测定各组动物肝组织黄嘌呤氧化酶(XOD)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)、髓过氧化物酶(MPO)、 Ca^{2+} 含量和肝细胞线粒体琥珀酸脱氢酶(SDH)、 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ 、 Ca^{2+} 含量的变化。结果 发现大鼠肢体缺血再灌注后肝脏功能明显受损,牛磺酸减轻了由于肢体缺血再灌注引起的肝细胞和线粒体的钙超载及过氧化等损伤。结论 牛磺酸可以避免或减轻大鼠肢体缺血再灌注继发的肝脏损伤。

关键词:缺血再灌注损伤;肝脏;肢体;牛磺酸

中图分类号:R965 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2006)06-0441-03

The effect of taurine on the liver function after limb ischemia-reperfusion in rats

WANG Yin-huan, ZHANG Lian-yuan*, ZHANG Na, DONG Shu-yun, ZHAO Li-jun, LI Hong-jie, KONG Xiaoyan, LIU Li-hua(Department of Pathophysiology, North China Coal Medical College, Tangshan 063000)

ABSTRACT: OBJECTIVE To observe the effect of taurine on the liver function after limb ischemia-reperfusion in rats. **METHODS** 30 Wistar rats were randomly divided into three groups, including control group, ischemia reperfusion(IR) group and taurine + ischemia reperfusion (TR) group ($n=10$). The levels of XOD, MDA, ROS, MPO, Ca^{2+} in liver tissues and the levels of Ca^{2+} , SDH, $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ in liver mitochondria were measured respectively. **RESULTS** Compared with the IR group, the levels of XOD, MDA, ROS, MPO, Ca^{2+} in liver tissues and the levels of Ca^{2+} in liver mitochondria were decreased in TR group. The activity of SDH, $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATPase}$ in liver mitochondria was improved by taurine. **CONCLUSION** The results indicated that the taurine can protect liver function from limb ischemia-reperfusion injury in rats.

KEY WORDS: ischemia-reperfusion injury; liver function; limb; taurine

牛磺酸是体内含量最丰富的氨基酸,具有广泛的生物学作用^[1]。已有很多实验资料证明牛磺酸具有清除自由基和抗脂质过氧化作用等^[2]。肢体缺血再灌注后,不仅对再灌注组织本身产生严重损伤,而且对远隔器官也会造成损伤,甚至出现休克(止血带休克)这一严重后果。本室曾观察到牛磺酸预处理可以减轻大鼠肢体缺血再灌注后的肺损伤。本实验旨在观察大鼠肢体缺血再灌注后肝脏的损伤性变化及牛磺酸对肝的保护作用及可能机制,为进一步阐明牛磺酸的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 模型复制

采用本室常规方法^[3]制作大鼠肢体缺血再灌注(limb ischemia-reperfusion, LIR)模型,用橡皮圈环绕结扎大鼠双后肢根部,阻断血流 4h 后松解,恢复双后肢血流灌注 4h 后处死动物,迅速摘取大鼠肝组织制备组织匀浆及分离线粒体,

备测各项相关指标。

1.2 动物分组

健康雄性 Wistar 大鼠 30 只(200~250g,购自河南医科大学实验动物中心,医动字:D410116号),分笼喂养 30d,术前 12h 禁食,自由饮水,室温(25 ± 2)℃,相对湿度(40~50)%。随机分为 3 组($n=10$)。①对照组(control组):常规饲养,双后肢松弛环绕橡皮圈,不阻断血流,余操作同 IR 组。②缺血再灌注组(ischemia reperfusion, IR 组):常规饲养,按模型操作。③牛磺酸+缺血再灌注组(taurine + ischemia reperfusion, TR 组):动物每天灌服牛磺酸一次,剂量为 200mg/kg 体重,灌服 30d,其余操作同 IR 组。

1.3 观测指标

测定肝组织中黄嘌呤氧化酶(XOD)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)、髓过氧化物酶(MPO)和 Ca^{2+} 含量,测定肝细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶(SDH)、 $\text{Na}^{+}-\text{K}^{+}-\text{ATPase}$ 、 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-$

基金项目:河北省教育厅科研基金资助项目(2001135)

作者简介:王银环(1979-),女,汉族,河北唐山市人,硕士研究生。Tel: (0315) 3725612 E-mail: wyh_79_0_0@yahoo.com.cn

*通讯作者:张连元, Tel: (0315) 3725612 E-mail: zhangly@ncmc.edu.cn

ATPase和Ca²⁺含量,试剂盒均购自南京建成生物制品公司,余为市售分析纯产品。

1.4 统计处理

结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS统计分析软件,One-way ANOVA方法,q检验作统计学处理。

2 结果

2.1 各组动物肝组织中XOD,MDA,ROS,MPO和Ca²⁺含量变化

IR组与control组比较,肝组织XOD,MDA,ROS,MPO和Ca²⁺均明显升高,分别升高了77.4%,1.06倍,27.2%,66.8%和1.02倍,($P < 0.01$);TR组与IR组比较,XOD,MDA,ROS,表1 各组大鼠肝组织XOD,MDA,ROS,MPO和Ca²⁺含量

Tab 1 The levels of tissue MDA, XOD, MPO, ROS and Ca²⁺ in different groups

Group	XOD (U/g)	MDA (nmol/L)	MPO (A值)	ROS (U/mL)	Ca ²⁺ (mmol)
control	3.54 ± 0.63	1.29 ± 0.14	0.283 ± 0.056	36.38 ± 3.12	0.123 ± 0.014
IR	6.28 ± 0.74**	2.66 ± 0.08**	0.472 ± 0.036**	46.29 ± 6.04**	0.248 ± 0.050**
TR	5.65 ± 0.81** ##	1.67 ± 0.12** ##	0.355 ± 0.041** ##	42.64 ± 3.32* #	0.192 ± 0.426** #

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与IR组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$

Note: * $P < 0.05$,** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$,## $P < 0.01$ vs IR group

表2 各组动物肝线粒体Ca²⁺含量和GSH-P_x,SDH,Na⁺-K⁺-ATPase,Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase活性

Tab 2 The levels of mitochondria GSH-P_x, SDH, Ca²⁺, Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase in different groups

Group	GSH-P _x (U/L)	SDH (U)	Ca ²⁺ (mmol)	Na ⁺ -K ⁺ -ATPase (U/L)	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATPase (U/L)
Control	1.87 ± 0.69	0.16 ± 0.06	0.14 ± 0.03	0.34 ± 0.05	0.33 ± 0.08
IR	1.22 ± 0.28**	0.04 ± 0.02**	0.38 ± 0.06**	0.16 ± 0.03**	0.16 ± 0.03**
TR	1.35 ± 0.19** ##	0.09 ± 0.06** ##	0.31 ± 0.06** ##	0.26 ± 0.07** ##	0.22 ± 0.06** ##

注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$;与IR组比较,## $P < 0.01$

Note: ** $P < 0.01$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs IR group

3 讨论

肢体遭受一定时期的缺血,在血供完全恢复后,可出现比缺血时期更为严重的损伤。此种损伤包括两个方面,即缺血局部骨骼肌微循环和实质细胞的损伤以及全身各主要器官的损害^[4-5]。以往的工作表明大鼠肢体缺血再灌注后,多个脏器的功能受损,肝脏是受损器官之一。本实验结果显示,IR组大鼠肝组织ROS,MDA含量增多,表明氧自由基生成增多,脂质过氧化反应增强,而氧自由基的过多产生与XOD活性增高有关。局部缺血等情况时能诱发黄嘌呤脱氢酶转变为XOD,XOD在催化次黄嘌呤转变为黄嘌呤并进而催化黄嘌呤转变为尿酸的两步反应中,释放大量电子,组织中分子氧接受电子后产生大量氧自由基。这些氧自由基能攻击细胞生物膜磷脂中的多不饱和脂肪酸,引发自由基链式反应,导致MDA大量产生。

IR组大鼠肝组织MPO含量明显高于control组,MPO是中性粒细胞(PMN)嗜天青颗粒中含量较高的酶,每个PMN中所含的MPO相对恒定,所以组织中MPO活性的高低基本上可定量表达组织中PMN的数量,反映PMN游出并在组织内聚集的程度^[6]。PMN导致组织损伤是由于其产生毒性代

MPO和Ca²⁺分别降低了10.0%,37.2%,7.9%,24.8%($P < 0.01$)和22.6%($P < 0.05$);损伤减轻。结果见表1。

2.2 各组大鼠肝线粒体Ca²⁺量和GSH-P_x,SDH,Na⁺-K⁺-ATPase,Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase活性

IR组与Control组比较,肝线粒体Ca²⁺升高了1.71倍($P < 0.01$);而GSH-P_x,SDH,Na⁺-K⁺-ATPase和Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase则分别降低了34.8%,75.0%,52.9%和51.5%,($P < 0.01$);TR组与IR组比较,肝线粒体Ca²⁺降低了18.4%,($P < 0.01$);而GSH-P_x,SDH,Na⁺-K⁺-ATPase和Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase则分别升高了10.7%,1.25倍,62.5%和37.5%,($P < 0.01$),损伤减轻,结果见表2。

谢产物和通过脱颗粒释放组织蛋白酶,对组织产生损害作用。此外,PMN在肝组织中浸润、激活,通过“呼吸爆发”释放大量的氧自由基,也是导致大鼠肢体缺血再灌注后肝组织脂质过氧化反应增强的重要因素之一。

细胞内的GSH-P_x主要存在于胞浆内和线粒体内,在线粒体及胞浆中产生的H₂O₂常靠GSH-P_x清除。GSH-P_x不但能清除H₂O₂,而且使脂质过氧化物转变为正常的脂肪酸,从而防止膜脂质过氧化连锁反应所造成的损伤。本实验IR组大鼠肝细胞线粒体GSH-P_x活性下降,组织清除活性氧的能力降低,也是过氧化反应增强的重要因素。

本实验的结果显示,大鼠肢体缺血再灌注后肝细胞内和肝细胞线粒体内钙离子的含量明显增多。各种原因引起的细胞内钙含量异常增多并导致细胞结构损伤和功能代谢障碍的现象称为钙超载(calcium overload),严重者可造成细胞死亡。本实验所显示的肝细胞及线粒体内Ca²⁺超负荷也是引起肢体缺血再灌注后肝细胞及其线粒体损伤的原因之一。线粒体损伤还表现在Na⁺-K⁺-ATPase和Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase的活性明显降低。

本实验,TR组大鼠肝组织和肝细胞线粒体过氧化反应、

钙超载以及 ATPase 活性降低程度,明显较 IR 组减轻,显示了牛磺酸对遭受肢体缺血再灌注大鼠的肝脏具有一定的保护作用。牛磺酸是体内含量最丰富的氨基酸,具有广泛的生物学作用,是机体内源性抗损伤和细胞保护物质。本实验结果提示:牛磺酸能减轻肢体缺血再灌注后继发的肝脏损伤,保护肝脏功能。而这一效应可能与其避免或减轻肢体缺血再灌注后机体的过氧化反应,改善肝细胞利用氧的能力,改善肝细胞膜的通透性以及与增强细胞和线粒体调节膜内外离子平衡的能力有关。

参考文献

- [1] ZHANG L Y, DONG SH Y, XU Y F, *et al.* Taurine to rat tourniquet shock influence [J]. Chinese Journal of Pathophysiology (中国病理生理杂志) . 1993, 9(2): 208-210.
- [2] WANG Z H, MIU M Y, WANG X M. Taurine to rats liver Mitochondria Oxygen radicals damage protective function [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui(安徽医科大学学报) , 2000, 35

(2): 111-113.

- [3] ZHANG L Y, YANG L. Experimental Textbook of Physiological Science(生理科学实验教程) [M]. 1 th. ed. Beijing: people's amy-medicine press 2001: 30.
- [4] MEN X L, ZHANG L Y, DONG SH Y, *et al.* The influence again which the taurine after the rat limb ischemia reperfusion the lung to injury when the cell apoptosis [J]. Chinese Journal of Pathophysiology(中国病理生理杂志) , 2004, 20(3): 421-424.
- [5] WAN F S H, LIU B, ZHAO X M, *et al.* The influence of taurine to the rat limb ischemia reperfusion the cardiac muscle mitochondria breath enzymatic system [J]. Basic Medical Sciences and Clinics(基础医学与临床) , 2000, 20(4): 45-47.
- [6] MEN X L, DONG S H Y, ZHANG L Y, *et al.* The Antagonistic Action of Aniaodamine on Lipid peroxidation [J]. Modern applied pharmacy(现代应用药理学) , 1996, 10, 13(5): 3-4.

收稿日期: 2005-07-04