

· 讲座与综述 ·

# 氢气对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及研究进展

刘 渠, 杨甲梅

【关键词】 氧化应激; 缺血再灌注; 抗氧化; 氢气

【中图分类号】 R575 【文献标识码】 C 【文章编号】 1006-4761(2009)05-0390-03

肝脏缺血再灌注损伤是肝脏手术过程中常见的、多因素参与的病理生理变化,可产生氧自由基,损伤肝细胞超微结构,影响肝脏的功能,是导致肝脏外科患者术后肝功能衰竭甚至死亡的主要原因。因此,如何减轻或防治肝脏缺血再灌注损伤是目前肝脏外科研究的热点,然而到目前为止尚没有可以治疗肝脏缺血再灌注损伤的有效方法。

氢气作为一种生理惰性气体,是宇宙的重要组成部分,也是维持行星运行的燃料<sup>[1]</sup>。氢气具有还原性,能直接与氧化成分反应,同时也很易燃,曾用作航天飞机的推进剂。氢气是质量最轻的气体,分子小且呈电中性,很容易扩散,能轻易地穿过细胞膜及细胞器膜。由于氢气麻醉性小,在减压环境下不易产生气泡,已被广泛用于预防潜水员减压病的发生。最近,Ohsawa 等<sup>[2]</sup>研究发现氢气的抗氧化特性在临床治疗特别在缺血再灌注损伤方面有广阔的应用前景,为氢气的临床应用提供了新的思路。

## 1 缺血再灌注与氧化应激

当组织受到缺血再灌注时,活性氧簇(reactive oxygen species ROS)在再灌注的早期大量产生,引起强烈的细胞氧化,从而对肝、脑、心、肾等产生严重的损伤<sup>[3]</sup>。延长热缺血时间则会加重再灌注引起的氧化应激,导致更严重的再灌注损伤<sup>[4]</sup>。而且 ROS 已被认为是导致生活方式相关疾病,特别是癌症和衰老的主要原因。因此,抑制缺血再灌注时的氧化应激,安全、有效的清除 ROS 或氧自由基已成为国内外学者研究的热点之一。

氧化应激是过多的 ROS 或自由基引起的强烈的细胞氧化。过多的 ROS 会导致 DNA 碎裂,脂质过氧化反应和蛋白失活,从而引起细胞凋亡或坏死<sup>[5]</sup>。在 ROS 中,尽管  $O_2^-$  和  $H_2O_2$  有细胞毒作用,在低浓度下却有重要的生理功能:它们是大量信号转导的信号调节分子,可调节重要的生物进程,如细胞凋亡,增殖和分化。高浓度下,  $H_2O_2$  通过髓过氧化物酶转化为次氯酸;次氯酸可防止细菌入侵。NO, 另一种 ROS,可作为神经递质和调控血管扩张。OH 是一种强效的 ROS,有研究表明羟基来源于生物系统中 H-W 反应或 Fenton 反应产生的过氧化氢和过氧化氢,能与核酸、脂质、蛋白反应导致严重的细胞氧化<sup>[6,7]</sup>。由于超氧阴离子和过氧化氢可通过抗氧化酶、超氧化物歧化酶和过氧化酶或谷胱甘肽过氧

化物酶来清除,而目前人体内尚未发现清除 OH 的生物酶。因此,安全、有效的清除 OH 是一个关键抗氧化过程。

## 2 氢气与缺血再灌注损伤

目前通过呼吸内源性气体信号分子来治疗疾病已逐步引起人们的重视,这些气体在应激条件下生成增加反映了其对机体存在保护性作用。已有学者研究证明呼吸 NO、CO、 $H_2S$  对于多种器官的缺血再灌注损伤都有很好的保护作用<sup>[8-10]</sup>。然而,这些气体都存在内在的毒性作用,若要将其应用于临床治疗中,就需要通过进一步研究,找出既有有效的治疗效果又能避免其毒性作用的治疗浓度,但目前尚未有相关研究结果报道。因此,没有毒性作用的氢气就显示出特有的临床应用价值。

Ohsawa 等<sup>[2]</sup>研究表明氢气可以作为一种治疗性的抗氧化剂来中和缺血再灌注后的氧化应激。为了诱导 ROS 的产生,作者给细胞施加线粒体呼吸复合物 I 抑制剂或使之处于缺乏氧气和葡萄糖的环境中。在氧化损伤后,细胞经受线粒体去极化,ATP 缺乏,DNA 氧化,脂质过氧化反应和细胞的坏死、凋亡。若将氢气溶解于培养基中,则能防止上述损伤的发生,增强细胞活力,并与之存在剂量依赖性。在这些研究中,Ohsawa 等<sup>[2]</sup>发现能有效的促进细胞生存的的氢气浓度为  $25 \mu\text{mol/L}$ 。

由于氢气可以保护线粒体及核中 DNA 免受氧化损伤,这表明氢气弥散力强,能渗透到细胞核与线粒体(产生活性氧簇的主要场所)中。试验中荧光探针和电子顺磁共振波谱显示氢气可以选择性清除羟基,而不会影响氧化还原反应或细胞信号转导中的 ROS。Ohsawa 等<sup>[2]</sup>认为选择性羟基清除是缺血再灌注后氢气保护细胞免受氧化损伤的机制。

为了检测氧化应激中氢气的治疗效能,Ohsawa 等<sup>[2]</sup>研究大鼠模型(大脑中动脉结扎再灌注)时发现:如果在损伤再灌注阶段前吸入 2% 的氢气可以显著减少梗死体积,而且可以明显降低脑组织脂质过氧化反应和 DNA 氧化。氢气治疗不仅可以抑制损伤初期的大脑损伤,而且可以抑制损伤进展,增强长期的神经功能,如体温调节和体重维持。

氢气的治疗性保护作用对于肝脏的缺血再灌注损伤同样适用,可以显著减轻肝功能损伤,有望为临床上延长肝门阻断时间、促进术后患者肝功能的恢复提供理论基础,为肝脏缺血再灌注损伤的防治提供简便、实用的辅助治疗手段。

【作者单位】上海市东方肝胆外科医院特需科,上海 200438

Fukuda 等<sup>[3]</sup>通过测定缺血再灌注肝脏中 ALT、MDA 等指标及组织病理学分析表明呼吸氢气能显著抑制缺血再灌注损伤导致的肝细胞变性,减轻脂质过氧化损伤,从而有效的保护肝细胞功能。

Hayashida 等<sup>[11]</sup>研究表明氢气在心肌缺血再灌注中同样具有显著的保护作用,且对于氧饱和度和血液动力学参数无显著影响。他们首先在离体灌注心脏实验中证实了呼吸氢气有利于心脏左室功能的恢复,通过动物实验进一步发现氢气可以减少缺血再灌注后心肌梗死的体积,防止缺血再灌注损伤后病理性的心肌左室重塑,且 2% 的氢气能提供最显著的保护作用。

氢分子对于缺血再灌注器官不仅具有抗氧化作用,还能显著抑制组织的炎性反应,从而促进器官功能的恢复。Zheng 等<sup>[12]</sup>研究表明大鼠小肠缺血再灌注前 10 min 静脉注射氢生理盐水,能显著降低血清 DAO、TNF- $\alpha$ 、IL- $\beta$ 、IL-6 及组织 MDA、MPO 水平,减轻小肠形态学损伤,通过抑制小肠移植后氧化应激和炎性反应来保护小肠缺血再灌注损伤。该小组进一步研究表明静脉注射氢生理盐水还可以抑制大鼠肠缺血再灌注后肺组织中中性粒细胞浸润,脂质过氧化, NF- $\kappa$ B 活性及 TNF- $\alpha$ 、IL- $\beta$  水平,从而减轻肠缺血再灌注后的肺损伤<sup>[13]</sup>。Buchholz 等<sup>[14]</sup>认为在小肠移植过程中呼吸氢气也能有效减轻移植过程中小肠缺血再灌注损伤。小肠移植后的大鼠胃肠动力及空肠平滑肌收缩受抑制,肠壁及受体肺组织炎性因子显著升高伴中性粒细胞浸润,肠粘膜糜烂、肠壁渗透性增加。而术中呼吸氢气后则能显著改善上述病理改变,促进小肠移植后肠道功能的恢复。在肝脏缺血再灌注过程中氢分子治疗是否存在上述作用,仍需进一步研究。

缺血再灌注损伤包括急性坏死和延迟细胞凋亡两个步骤<sup>[15]</sup>。凋亡是程序性细胞死亡,其特征性超微结构改变包括细胞皱缩,核浓缩, DNA 碎裂。在分子水平,凋亡可被天冬氨酸-半胱氨酸蛋白酶的级联反应所激活,包括 caspase-12 和 caspase-3 等<sup>[16]</sup>。Cai 等<sup>[17]</sup>研究发现氢气能通过减少 HI 引发的 caspase 依赖性凋亡来提供神经保护。通过 TTC 染色, Nissl 染色, TUNEL 染色及 Caspase-12 和-3 的活力检测, Cai 等认为 HI 损伤后立即予以 2% 氢气治疗,能显著降低脑梗死率,增加残存神经元数目,降低 Caspase-12 和-3 的活力,减少细胞凋亡,研究还发现氢气的神经保护作用有时间依赖性, 120 min 组的神经保护作用显著强于其他两组。这就为进一步探究氢气的细胞保护机制及临床应用提供了新的研究方向与理论基础。

### 3 展望

目前的研究均已证明氢气通过清除羟基、抑制氧化应激反应来保护细胞。然而,在细胞保护的基因表达中未发现氢气介导的基因改变,氢气的抗氧化活性中是否激活潜在性的信号通路或调控蛋白尚未得到证实。因此氢气保护细胞组织免受氧化应激的机制仍需进一步阐明。

众所周知,人和动物消化道内许多正常细菌能产生氢气,一些研究表明肠道菌群产生的大部分氢气被消化道吸收

入血<sup>[18]</sup>。有研究表明胃和肝中有丰富的氢气: Olson 和 Maier<sup>[19]</sup>测定了鼠胃粘液层平均氢气量为 43  $\mu$ mol/L, 浓度范围 17 ~ 93  $\mu$ mol/L。Maier 等<sup>[20]</sup>也发现鼠肝中平均氢气浓度为 53  $\mu$ mol/L, 鼠小肠中氢气浓度范围 118 ~ 239  $\mu$ mol/L。这些研究表明肝、胃、脾、小肠中的氢气浓度以达到了缺血再灌注损伤后抗氧化应激的浓度,所以我们认为氢气是一种内源性抗氧化剂。然而内源性氢气是否具有同样的抗氧化治疗作用则需要我们进一步研究证实。

总之,氢气作为一种治疗性抗氧化剂,通过选择性清除羟基,能对多器官的缺血再灌注损伤起有效的保护作用,而且氢气易于制备,使用时方便、安全,在临床治疗中有广阔的应用前景,可为肝脏缺血再灌注损伤的防治开辟一条崭新的道路。

### 参考文献

- 1 Sun XJ, John H Zhang. Hydrogen-an endogenous antioxidant in the body. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29(3): 233 - 235.
- 2 I. Ohsawa, M. Ishikawa, K. Takahashi, M, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*, 2007, 13: 688 - 694.
- 3 K. Fukuda, S. Asoh, M. Ishikawa, et al. Inhalation of hydrogen gas suppresses hepatic injury caused by ischemia/reperfusion through reducing oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361: 670 - 674.
- 4 H. A. Zar, K. Tanigawa, Y. M. Kim, J. R. Lancaster. Rat liver postischemic lipid peroxidation and vasoconstriction depend on ischemia time. *Free Radic Biol Med*, 1998, 25: 255 - 264.
- 5 S. Kuroda, B. K. Siesjö. Reperfusion damage following focal ischemia: pathophysiology and therapeutic windows. *Clin Neurosci*, 1997, 4: 199 - 212.
- 6 Liu H, Colavitti R, Rovira I. I. Redox-dependent transcriptional regulation. *Circ Res*, 2005, 97: 967 - 974.
- 7 Murad, F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci Rep*, 2004, 24: 452 - 474.
- 8 C. Szabo. Hydrogen sulphide and its therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 917 - 935.
- 9 J. W. Elrod, J. W. Calvert, J. Morrison, J. E, et al. Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci*, 2007, 104: 15560 - 15565.
- 10 A. Kobayashi, K. Ishikawa, H. Matsumoto, et al. Synergetic antioxidant and vasodilatory action of carbon monoxide in angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *Hypertension*, 2007; 1040 - 1048.
- 11 K Hayashida, M Sano, I Ohsawa, et al. Inhalation of hydrogen gas reduces infarct size in the rat model of myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 373: 30 - 35.
- 12 Zheng XF, Mao YF, Cai JM, et al. Hydrogen-Rich Saline Protects against Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Free Radical Res*, 2009, 7: 1 - 7.
- 13 Mao YF, Zheng XF, Cai JM, et al. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381(4): 602 - 5.

- 14 B. M. Buchholz, D. J. Kaczorowski, R. Sugimoto, et al. Hydrogen Inhalation Ameliorates Oxidative Stress in Transplantation Induced Intestinal Graft Injury. *Am J Trans*, 2008, 8: 1 - 10.
- 15 F. J. Northington, D. M. Ferriero, D. L. Flock, L. J. Martin. Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis. *J Neurosci*, 2001, 21: 1931 - 1938.
- 16 S. Elmore. Apoptosis; a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 2007, 259: 495 - 516.
- 17 Cai JM, Kang ZM, Liu WW, et al. Hydrogen therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *Neurosci Lett*, 2008.
- 18 Maier R J. Availability and use of molecular hydrogen as an energy substrate for *Helicobacter* species. *Microbs Infect*, 2003, 5: 1159 - 1163.
- 19 Olson J W, Maier R J. Molecular hydrogen as an energy source for *Helicobacter pylori*. *Science*, 2002, 298: 1788 - 1790.
- 20 Maier R J. Use of molecular hydrogen as an energy substrate by human pathogenic bacteria. *Biochem Soc Trans*, 2005, 33: 83 - 85.

(本文编辑 朱立新)

## 胆道恶性肿瘤的胆汁蛋白质组学研究

王 伟, 艾开兴

【关键词】 胆道恶性肿瘤; 胆汁; 蛋白质组学; 肿瘤标志物

【中图分类号】 R 735.8 【文献标识码】 C 【文章编号】 1006-4761(2009)05-0392-03

胆道恶性肿瘤是指原发于肝外胆道系统的恶性肿瘤, 包括胆囊癌和胆管癌, 是一类预后较差的消化系统肿瘤。美国 2007 年新发胆道恶性肿瘤近 9,250 例<sup>[1]</sup>, 2008 年近 9,520 例<sup>[2]</sup>。我国胆道恶性肿瘤发病率在消化道恶性肿瘤中居第五位, 同时是我国十大致死恶性肿瘤之一。胆道恶性肿瘤早期缺乏特异性临床表现。一经诊断, 多属中晚期, 治疗效果和预后都较差, 若不加以治疗, IV 期胆囊癌病人的平均中位生存期是 12 周, 中晚期胆管癌是 24 ~ 44 周<sup>[3]</sup>。早期诊断成为提高胆道恶性肿瘤治愈率和生存率的关键, 而胆汁蛋白质组学研究为发现理想肿瘤标志物带来了希望<sup>[4]</sup>。

### 1 蛋白质组学技术

蛋白质组学分为组成性蛋白质组学、比较蛋白质组学和相互作用蛋白质组学三大领域<sup>[5]</sup>。其中比较蛋白质组学通过寻找正常与病理状态下整体蛋白质表达的差异, 在发现药物治疗靶点和筛选肿瘤标志物方面具有优势, 为肿瘤的早期诊治、预后、疗效评价、随访、发病机制研究及新药研发带来新的机遇。

蛋白质组学研究主要依赖三大技术: 蛋白质分离技术、蛋白质鉴定技术和生物信息学技术。直观性强、通量较高的双向凝胶电泳 (two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2D-PAGE) 是目前最常用的蛋白质分离技术, 随着固相 pH 梯度胶条 (immobilized pH gradient strips, IPGs) 和荧光染

色等方法的改进, 其分辨率有了新的提高, 但仍难以分离低丰度、极酸、极碱和难溶性蛋白质, 反相高效液相色谱 (reverse phase high-performance liquid chromatography, RPHPLC)、毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 和液相等电聚焦 (isoelectric focusing, IEF) 等技术的发展克服了以上缺点; 质谱分析 (mass-spectrometry, MS) 因具有通量高、灵敏和自动化操作等优势, 成为蛋白质鉴定的核心技术。MS 技术主要包括基质辅助激光解吸/电离飞行时间质谱 (matrix assist laser desorption ionization time of light mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 和电喷雾电离串联质谱 (electrospray ionization tandem mass spectrometry, ESI-MS/MS)。近年来, 新型质谱技术如表面增强激光解吸离子化质谱 (surface enhanced laser desorption-ionization mass spectrometry, SELDI-MS) 和图像质谱 (imaging MS) 的出现, 极大提高了蛋白质鉴定的效率。此外, 蛋白质芯片 (ProteinChip) 作为快速筛检复杂蛋白质样品的方法, 因具有自动化及微型化的优点, 应用日益广泛; 生物信息学技术 (bioinformatics) 包括数据分析的软件系统和信息存储的数据库, 为分析、搜索与储存蛋白质信息提供了保障。

### 2 胆汁蛋白质组学研究

胆汁蛋白质组学研究起步不久。He 等<sup>[6]</sup>先分离出人胆囊胆汁中的脂质泡和混合微胶粒相关蛋白, 经过双向电泳、银染后, 分别发现了 59 个和 471 个肽点, 且绝大多数胆汁蛋白质属于混合微胶粒相关蛋白。Stark 等<sup>[7]</sup>认识到在蛋白质组学研究前, 对胆汁的去脂操作会损失掉含疏水基团的蛋白质, 他们通过萃取有机溶剂后行色谱分析的方法检测这部分蛋白质, 首次发现了人胆囊胆汁中的一些疏水性多肽 (血红

【基金项目】上海市科委科研基金项目 (基金编号 09411964600); 上海市教委科研创新重点项目 (基金编号 09zz22) 基金

【作者单位】上海交通大学附属第六人民医院, 上海 200233

【通讯作者】艾开兴。