

## • 论 著 •

文章编号:1009-4237(2013)02-0157-03

# 氢气生理盐水对大鼠肝缺血再灌注后 氧化应激损伤的保护作用

骆助林, 汤礼军, 汪涛, 罗浩, 黄竹, 王华, 田伏洲

**【摘要】** 目的 研究氢气生理盐水 (Hydrogen-rich saline, HS) 抑制氧化应激, 减轻大鼠肝缺血再灌注损伤 (IRI) 的作用。方法 将 32 只雄性 Wistar 大鼠随机分为假手术组 (sham)、肝缺血再灌注组 (IR)、生理盐水处理组 (IR + NS) 和氢气生理盐水处理组 (IR + HS), 制作 70% 大鼠肝脏缺血再灌注模型, 术后 12h 处死大鼠, 检测各组大鼠血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平; 取肝组织观察其病理学变化, 并观察肝组织内超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH) 变化。结果 与 IR + NS 组相比较, 术后 IR + HS 组肝组织病理损伤情况明显改善, 血清 ALT 及 AST 值较低 ( $P < 0.05$ ), 肝组织 MDA 水平明显下降 ( $P < 0.05$ ), SOD 活性和 GSH 含量明显上升 ( $P < 0.05$ )。结论 HS 能减轻大鼠肝 IRI, 其机制可能与抑制肝缺血再灌注后氧化应激反应有关。

**【关键词】** 氢气; 氧化应激; 肝缺血; 再灌注; 大鼠; 模型

**【中图分类号】** R 453 **【文献标识码】** A

## Protection effects of hydrogen-rich saline for hepatic ischemia-reperfusion injury by reducing oxidative stress in rats

LUO Zhu-lin, TANG Li-jun, WANG Tao, LUO Hao, HUANG Zhu, WANG Hua, TIAN Fu-zhou

(Department of General Surgery, Chengdu General Military Hospital, Chengdu 610083, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the protective effects of hydrogen-rich saline for hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting the oxidative stress in rats. **Methods** Thirty two male Wistar rats were randomly allocated into 4 groups: sham operation group, ischemia-reperfusion (IR) group, IR + normal saline (IR + NS) group and IR + hydrogen-rich saline (IR + HS) group. A rat model of hepatic ischemia-reperfusion injury was established in this experiment. After operation for 12 hours, the rats were sacrificed and the serum and liver samples were collected. The ALT and AST levels in serum were determined, liver histological damage was evaluated, and the superoxide dismutase (SOD), Malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) were also determined. **Results** The pancreas tissue in IR + HS group was more slightly damaged than those in IR + NS group after operation. The ALT, AST level in IR + HS group were significantly lower than those of the IR + NS group ( $P < 0.05$ ). The levels of plasma MDA were lower in IR + HS group than those in IR + NS group ( $P < 0.05$ ). The levels of plasma SOD and GSH were higher in IR + HS group than those in IR + NS group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Hydrogen-rich saline may reduce the damage of hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting oxidant stress in rats.

**【Key words】** hydrogen; oxidative stress; liver ischemia; reperfusion; rats; models

肝脏的缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 是肝脏外科重要的临床病理生理过程, 导致肝叶切除、肝移植术后器官功能障碍和衰竭的重要因素<sup>[1]</sup>。因此在肝脏外科中如何采取措施, 减轻肝脏缺血再灌注损伤具有重要意义。最近发现氢气能抑制炎症相关的细胞因子、缓解炎症发展, 抑制氧化应激损伤, 具有潜在的治疗炎症应激性疾病的

作用<sup>[2]</sup>, 我们推测氢气生理盐水 (hydrogen-rich saline, HS) 在肝脏缺血再灌注损伤过程中氧化应激损伤中也起着一定的作用, 因此我们采用 70% 大鼠肝脏缺血再灌注模型, 对氢气生理盐水在肝脏缺血再灌注损伤中的作用进行研究, 报告如下。

### 材料与方法

#### 1 实验动物分组及处理

成年健康雄性清洁级 Wistar 大鼠 32 只, 质量 (200 ± 50) g, 第三军医大学大坪医院动物中心提供

基金项目: 全军医学科学技术研究“十一五”计划项目 (08Z012)

作者单位: 610083 四川, 成都军区总医院普外科

通讯作者: 汤礼军, E-mail: tfz30061@yahoo.com

[动物合格证编号: SCXK(渝)20020002]。氢气生理盐水(0.6mM)由第二军医大学孙学军教授提供<sup>[3]</sup>,储存于密封的塑胶袋中4°C下保存,使用前经伽玛射线消毒。将32只大鼠均分成4组(n=8): (1)假手术组(sham),动物只接受开腹关腹手术; (2)肝缺血再灌注组(IR); (3)肝缺血再灌注+生理盐水处理组(IR+NS); (4)肝缺血再灌注+氢气生理盐水处理组(IR+HS)。

## 2 动物模型制作

大鼠术前禁食12h,自由饮水,乙醚吸入麻醉。腹正中切口约2cm,用小血管夹夹闭左、中叶肝蒂,造成70%肝脏缺血动物模型<sup>[4]</sup>,保持肝右叶和尾状叶血流通畅,45min后取下血管夹恢复肝脏血供后关腹。氢气生理盐水(0.6mM,6ml/kg,pH 7.4)或者生理盐水(6ml/kg)在肝脏缺血同时经尾静脉注射。假手术组仅开腹后游离肝脏周围韧带然后关腹。术后大鼠自然清醒并自由饮水。

## 3 检测指标及方法

术后12h处死大鼠,统一取大鼠部分组织肝,用10%甲醛固定并常规制作石蜡病理切片,苏木精-伊红染色(HE)后由专门的病理学医师进行病理观察,剩下的肝组织0°C生理盐水中冰浴保存。大鼠血清丙氨酸转氨酶(AIR)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平采用全自动生化分析仪检测,肝组织内SOD活性、GSH、MDA含量均采用检测试剂盒(南京建成生物制品公司)并按说明书进行操作。SOD活性测定采用黄嘌呤氧化酶法(羟胺法),GSH含量测定采用化学比色法,MDA含量的检测采用硫代巴比妥酸(TBA)法。

## 4 统计学处理

数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示,用单因素方差分析和t检验做统计学处理。结果采用SPSS13.0软件包分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

# 结果

### 1 肝组织病理学变化

钳夹肝蒂后,肉眼观察到被阻断的肝叶明显缺血发暗,肝脏表面可见淤积斑块,开放后可见充血红润。各组肝组织病理变化见附图。假手术组大鼠各时点肝脏组织结构清晰,无明显炎症细胞,肝细胞无变性坏死(图1a)。IR组和IR+NS组大鼠术后12h可见肝窦内瘀血及部分肝细胞变性坏死,汇管区大量炎症细胞聚集,以中性粒细胞为主,肝脏组织结构疏松,部分组织结构不完整(图1b、c); IR+HS组

大鼠术后12h细胞肿胀变性,点状肝细胞坏死,肝脏组织内炎症细胞浸润,以中性粒细胞为主,肝脏组织结构基本完整(图1d)。

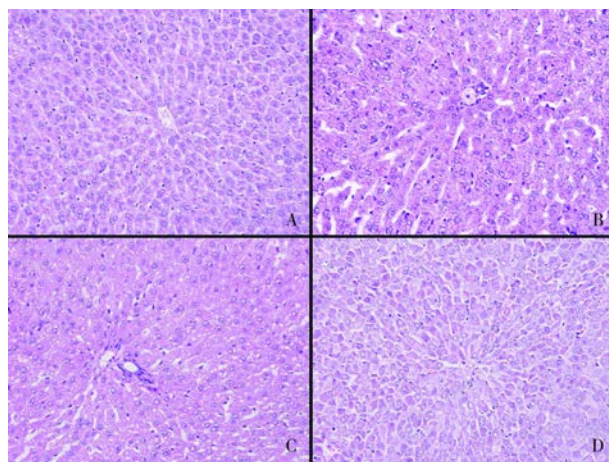


图1 各组术后12h肝脏组织病理变化(HE ×400)

### 2 术后12h血清ALT、AST的检测

IR组、IR+NS组与IR+HS组动物于造模术后12h血清ALT、AST明显升高;与IR+NS组相比较,IR+HS组术后12h血清ALT、AST升高较少( $P < 0.05$ )(表1)。

表1 术后12h血清ALT、AST(IU/L,  $\bar{x} \pm s, n=8$ )

分组	ALT	AST
sham	29.88 ± 4.85	94.38 ± 14.27
IR	264.13 ± 24.29	427.38 ± 16.81
IR+NS	227.63 ± 1.41	420.54 ± 35.18
IR+HS	108.13 ± 28.06 <sup>△</sup>	265.55 ± 27.68 <sup>△</sup>

与IR+NS组相比较:  $\Delta P < 0.05$

### 3 术后12h肝组织内SOD活性和GSH、MDA含量的检测

IR组、IR+NS组与IR+HS组动物于造模术后12h肝组织内MDA含量明显升高,SOD活性和GSH含量下降;与IR+NS组相比较,IR+HS组术后肝组织内MDA含量升高较少( $P < 0.05$ ),SOD活性和GSH含量下降程度也较低( $P < 0.05$ )(表2)。

表2 术后12h肝组织内SOD活性和GSH、MDA含量的检测( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

分组	SOD(U/mg)	MDA(pmol/mg)	GSH(pmol/mg)
sham	38.2 ± 4.9	23.5 ± 7.1	2675 ± 157
IR	12.9 ± 2.2	87.4 ± 13.6	1234 ± 113
IR+NS	12.4 ± 3.6	86.7 ± 26.8	1287 ± 175
IR+HS	21.6 ± 2.5 <sup>△</sup>	38.4 ± 11.5 <sup>△</sup>	1971 ± 96 <sup>△</sup>

与IR+NS组相比较:  $\Delta P < 0.05$

## 讨 论

肝脏 IRI 的确切机制目前仍不清楚,氧自由基的大量形成和脂质过氧化物的增加是细胞损伤的主要病理过程之一,氧化应激损伤在局部及全身炎症损伤中起重要作用<sup>[5]</sup>。器官、组织 IRI 时发生急性炎症反应,大量的炎症细胞活化并分泌大量的炎症递质,引起局部及全身的器官损伤<sup>[6-7]</sup>。再灌注早期中性粒细胞即开始向损伤部位浸润,通过释放 ROS 以及多种蛋白水解酶(蛋白酶、弹性蛋白酶以及 MPO 等)加重细胞损伤<sup>[8-9]</sup>。Glantzounis 等<sup>[10]</sup>发现活性氧(ROS)在肝脏缺血生理盐水中起非常重要的作用。当氧化应激发生时,ROS 的产生与清除之间的平衡将会被打破,导致抗氧化系统的衰竭或者氧化物大量产生。对于肝脏缺血再灌注进行某些处理,如缺血预处理、热应激预处理、药物处理等,可以降低中性粒细胞的浸润,提高细胞对应激原的耐受性,阻止 ROS,减轻肝脏损伤程度<sup>[11]</sup>。

氢气是质量最轻的小分子气体,很容易扩散并轻易地穿过细胞膜。最近 Ohsawa 等<sup>[2]</sup>研究发现氢气的抗氧化特性,在临床治疗氧化应激损伤方面有广阔的应用前景,为氢气的临床应用提供了方向。将氢气溶解于细胞培养基中,则能防止细胞在氧化损伤后出现的线粒体去极化、AIR 缺乏、DNA 氧化、脂质过氧化反应和细胞的坏死、凋亡,增强细胞活力。因此我们推测 HS 处理后,在缺血再灌注过程中也能缓解氧化应激损伤,减轻肝缺血再灌注时的局部和全身损害。

本研究采用 70% 大鼠肝脏缺血再灌注模型,术中经 HS 经尾静脉注射,术后通过病理评分显示与 IR + NS 组相比较,IR + HS 组病理损伤明显较轻,说明 HS 处理能明确减轻 IR 病理损伤。我们观察到再灌注后 12h,肝脏组织内有大量中性粒细胞浸润,而 HS 明显降低了肝脏组织内中性粒细胞浸润。SOD 和 GSH 对机体的氧化与抗氧化的平衡起着关键作用,能加速清体内除自由基和过氧化物,降低脂质过氧化物的生成,自由基和过氧化物对细胞和组织的损伤。MDA 是细胞膜的重要成分-非饱和脂质过氧化反应的终产物,组织内 MDA 含量是体内氧化应激反应水平及程度的敏感指标<sup>[12]</sup>。与 IR + NS 组相比较,IR + HS 组术后肝组织内 MDA 含量升高较少( $P < 0.05$ ),SOD 活性和 GSH 含量下降程度也较低( $P < 0.05$ ),提示 HS 处理后的 IR 大鼠明显的改善了氧化应激的损伤。本研究证实,HS 能够通

过抑制肝缺血再灌注后的氧化应激反应,减轻肝 IRI,但其具体过程和机制有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Katori M, Buelow R, Ke B, et al. Heme oxygenase - 1 over-expression protects rat hearts from cold ischemia /reperfusion injury via anti - apoptotic pathway [J]. *Transplantation*, 2002, 73(2):287 - 292.
- [2] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals [J]. *Nat Med*, 2007, 13(6):688 - 694.
- [3] Zheng X, Mao Y, Cai J, et al. Hydrogen - rich saline protects against intestinal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Free Radic Res*, 2009, 43(5):478 - 484.
- [4] Kohli V, Selzner M, Madden JF, et al. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia - reperfusion injury in the rat liver [J]. *Transplantation*, 1999, 67(8):1099 - 1105.
- [5] Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species [J]. *Int Microbiol*, 2000, 3(1):3 - 8.
- [6] Zhai Y, Shen XD, Hancock WW, et al. CXCR3 + CD4 + T cells mediate innate immune function in the pathophysiology of liver ischemia/reperfusion injury [J]. *J Immunol*, 2006, 176(10):6313 - 6322.
- [7] Walsh KB, Toledo AH, Rivera - Chavez FA, et al. Inflammatory mediators of liver ischemia - reperfusion injury [J]. *Exp Clin Transplant*, 2009, 7(2):78 - 93.
- [8] Heinzlmann M, Mercer - Jones MA, Passmore JC. Neutrophils and renal failure [J]. *Am J Kidney Dis*, 1999, 34(2):384 - 399.
- [9] Okusa MD. The inflammatory cascade in acute ischemic renal failure [J]. *Nephron*, 2002, 90(2):133 - 138.
- [10] Glantzounis GK, Salacinski HJ, Yang W, et al. The contemporary role of antioxidant therapy in attenuating liver ischemia - reperfusion injury: a review [J]. *Liver Transpl*, 2005, 11(9):1031 - 1047.
- [11] Kuboki S, Schuster R, Blanchard J, et al. Role of heat shock protein 70 in hepatic ischemia - reperfusion injury in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292(4):1141 - 1149.
- [12] Taysi S, Cikman O, Kaya A, et al. Increased oxidant stress and decreased antioxidant status in erythrocytes of rats fed with zinc - deficient diet [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2008, 123(1 - 3):161 - 167.

(收稿日期: 2012 - 07 - 17; 修回日期: 2012 - 08 - 28)

(本文编辑: 易 萍)

# 氢气生理盐水对大鼠肝缺血再灌注后氧化应激损伤的保护作用

作者: [骆助林](#), [汤礼军](#), [汪涛](#), [罗浩](#), [黄竹](#), [王华](#), [田伏洲](#)  
作者单位: [610083 四川, 成都军区总医院普外科](#)  
刊名: [创伤外科杂志](#)  
英文刊名: [Journal of Traumatic Surgery](#)  
年, 卷(期): 2013(2)

本文链接: [http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_cswkzz201302021.aspx](http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_cswkzz201302021.aspx)