

· 综述 ·

反映 H₂S 在肝缺血再灌注损伤中保护作用的检测指标研究进展

耿亚松¹综述, 杜津²审校

(1. 天津医科大学总医院检验科, 天津 300052; 2. 中国人民解放军第二五四医院, 天津 300142)

关键词: 硫化氢; 肝疾病; 再灌注损伤; 实验室技术和方法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.22.022

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2012)22-2739-03

肝缺血再灌注损伤(HIRI)常见于肝切除、肝移植术、外伤和休克中。有实验证明, 某些情况下该损伤比单纯的肝缺血对机体的损伤要更为严重, 可累及机体多个脏器, 发生多器官功能不全综合征(MODS), 并且由于许多细胞因子表达的改变, 会导致肿瘤细胞从归巢、黏附、血管基底膜降解和肿瘤血管形成的每一步都受到影响, 进而影响肿瘤的增殖与转移^[1]。目前 HIRI 损伤的机制还不是很清楚, 但大量研究证实缺血再灌注(I/R)损伤的主要发生机制与自由基产生增多、钙超载、微血管损伤、能量代谢障碍等密切相关, 其中自由基增多和钙超载是其关键机制^[2], 能量代谢障碍是其始发环节^[3]。近年来, 内源性 H₂S 的免疫调节、保护作用受到越来越多的关注, 也促进了内源性 H₂S 新药的研究。H₂S 作为继 NO、CO 之后的一种新的内源性气体信号小分子, 由于它分子小, 容易透过细胞膜, 依赖或不依赖第二信使的作用方式, 使得其在肺动脉高压、高血压、感染性休克等心血管系统疾病的发病中起到重要作用, 但其在 HIRI 中的保护作用还处于研究探索中。

1 H₂S 对 HIRI 具有保护作用

张伟等^[4]通过检测 HIRI 中 H₂S 与 ALT、ALP、丙二醛(MDA)、肝细胞凋亡指数(AI)以及谷胱甘肽(GSH)的水平并进行统计学分析得出: H₂S 与其他指标高度相关, 并指出内源性 H₂S 作为气体信号分子在 HIRI 过程中能抑制肝细胞凋亡, 对肝细胞具有积极的保护作用^[5-6]。H₂S 的作用机制目前尚未完全阐明, 但目前有以下几种观点: H₂S 可能是通过开放的钾 ATP 通道而发挥作用^[7]; 与其他气体信号分子如 NO 协同发挥作用^[8-9]; 可能有清除氧自由基的作用^[10]; 此外, H₂S 具有促炎作用^[11]。

2 H₂S 对 HIRI 保护作用的检测指标

HIRI 包括早期(再灌注 6 h 内, 主要在前 2 h 内)和晚期(再灌注 6 h 以后, 主要在 18~24 h)^[12]。因此可通过检测 H₂S 注射后不同时间点肝功能的变化以及体内某些特定物质来反映 H₂S 在 HIRI 不同时段的保护作用。目前国内外检测的指标主要有肝功能血清学指标、反映氧自由基代谢情况的物质以及肝 AI 等。

2.1 反映肝功能的检测指标

2.1.1 ALT/AST ALT 与 AST 是最常用的检测肝功能的指标。一般认为, HIRI 可分为两相。I 相损伤为灌注的 1 h 内, 接下去的 5 h, 转氨酶的活性基本维持在 I 相损伤水平。II 相损伤为损伤后 6~24 h, 转氨酶活性再次显著升高。通过建立局部 I/R 模型, 测定大鼠肝脏缺血 60、90 min 再灌注 0、2、4、6、12、24、48 h 时的血清 ALT 水平, 并行病理检查(相对细胞死亡率), 认为 ALT 水平可直接反映肝脏 I/R 损伤程度; 损伤程度越重, ALT 水平越高、细胞死亡率也越高, 故可将 ALT 作为 HIRI 程度的判定指标^[13]。在多器官功能衰竭时, H₂S 保护组大鼠血清 ALT 水平明显降低^[14]。心力衰竭时, AST 活性

显著降低($P < 0.05$)^[15]。

2.1.2 乳酸脱氢酶(LDH) LDH 是能催化乳酸脱氢生成丙酮酸的酶, 当肝细胞损伤或坏死后, 血中 LDH 大量增多。实验证明, 在缺氧/复氧心肌细胞培养液中, H₂S 保护组 LDH 泄出量是对照组的 1/5, 且心肌细胞中超氧化物歧化酶(SOD)产生增加, MDA 生成减少^[16]。另外, 刘国磊等^[15]也证实, 在大鼠心力衰竭中, 给予 NaHS 治疗后, 心肌损伤程度明显减轻; 血浆和心肌 MDA 水平明显降低($P < 0.05$), 血浆 AST 和 LDH 活力显著降低($P < 0.05$)。

2.2 反映氧自由基代谢的物质 SOD、MDA、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 等是反映氧自由基水平的主要观察指标。

2.2.1 SOD SOD 是生物体内重要的抗氧化酶, 是生物体内清除自由基的首要物质, 并具有修复细胞的功能。催化反应方程式为: $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$, 生成的 H₂O₂ 在体内过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)的作用下立即分解。细胞内氧自由基水平增加时, 可诱导 SOD 的生物合成及增加其活性, 因此可通过检测血液中 SOD 水平间接反映氧自由基的生成量和机体清除氧自由基即抗脂质过氧化的能力, 一般应用比色法检测。H₂S 能显著降低肠 I/R 大鼠血清和小肠组织 MDA 水平, 提高 SOD、GSH-Px 水平^[17]。

2.2.2 MDA MDA 是血浆中自由基作用于过氧化脂质(LPO)的代谢产物, 一般用硫代巴比妥酸比色法检测。MDA 水平可反映机体内脂质过氧化物的氧化速率和强度^[18], 间接地反映出机体细胞受氧自由基攻击的严重程度。有实验表明: 肝 I/R 组血清、肝组织 MDA 高于假手术组($P < 0.01$), SOD 低于假手术组($P < 0.01$), 且 AST、ALT 水平较假手术组升高($P < 0.01$)^[19]。与肺 I/R 损伤组比较, 预先给予 NaHS 组血浆 SOD 升高, MDA、MPO 降低($P < 0.01$)^[20]。在创伤失血性休克继发肺损伤中, 外源性 H₂S 的作用亦可使血中 SOD、MDA、髓过氧化物酶(MPO)出现此结果^[21]。

2.2.3 GSH-Px GSH-Px 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶, 它能催化还原型 GSH 变为氧化型 GSH(GSSG), 使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物, 同时促进 H₂O₂ 的分解, 从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害。它的生理功能主要是催化 GSH 参与过氧化反应, 清除在细胞呼吸代谢过程中产生的 H₂O₂ 和羟自由基。在多器官功能衰竭时, H₂S 保护组大鼠血清 SOD、GSH-Px 显著增高($P < 0.05$), MDA 水平明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)^[14]。H₂S 在低氧性肺动脉高压(HPH)形成中的氧化应激过程中发挥抗氧化作用, 其作用机制部分是通过减少 GSSG 的水平, 从而提高机体的抗氧化能力^[22]。

2.3 其他可用于监测肝脏损伤的物质

2.3.1 NO、内皮素-1(ET-1)、白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α) 等炎症介质的检测 通过相关性分析发现,

在肝手术患者缺血再灌注期间,NO 与 ALT 之间呈负相关关系;而 ET-1 与 ALT 之间呈明显的正相关^[23]。有研究者在盲肠结扎穿孔法制备的感染性休克大鼠模型及静脉注射内毒素法制备的内毒素休克大鼠模型中发现,大鼠血管组织中 H₂S 生成普遍增加,同时伴随 NO 生成增加,两者呈现明显的正相关关系,表明 H₂S 参与休克时血管反应的病理生理过程,并与其他气体信号分子如 NO 形成复杂的网络联系^[8]。另外,有研究证明,H₂S 可剂量依赖性舒张动脉平滑肌,单独应用 H₂S 引起的舒血管效应很微弱,而在 NO 存在情况下,舒张效应可扩大 13 倍^[9]。IL-6、IL-8 和 TNF- α 是研究最为深入的促炎症细胞因子。以 ELISA 法检测血浆 NO、ET-1、IL-6 和 TNF- α 水平,放射免疫法检测血浆白细胞介素-8(IL-8)水平。在大鼠肢体 I/R 后心肌损伤中,吸入 H₂S 后,血浆 MPO、TNF- α 及心肌 MPO、TNF- α 水平明显降低($P < 0.05$)^[24]。在高肺血流性肺动脉高压中,H₂S 保护组可降低血浆 ET-1 水平^[25]。

3.3.2 Bcl-2 蛋白与 Bax 蛋白 Bcl-2 蛋白家族是一个特别的家族,成员中有些促进凋亡,如 Bad、Bid、Bax,有些阻止细胞凋亡,如 Bcl-2、Bcl-x、Bcl-w。Bcl-2 能够阻止细胞色素 C 从线粒体释放到细胞质,从而抑制了细胞凋亡。郝云龙和闻勤生^[26]在研究还原型谷胱甘肽对 HIRI 细胞凋亡的影响时发现:与正常肝组织比,损伤肝组织,Bcl-2 蛋白表达减少而 Bax 表达增高,细胞凋亡指数增加。Acquaviva 等^[27]的研究认为 Bcl-2 很可能是一种新型快速短效的静脉麻醉药丙泊酚抑制细胞凋亡的主要作用位点。Bcl-2 蛋白与 Bax 蛋白一般用免疫组化法检测。H₂S 处理可以抑制 Fas 蛋白表达和促进 Bcl-2 蛋白表达,减轻心肌细胞凋亡^[28]。黄晓伟等^[29]在研究外源性 H₂S 在大鼠心肌 I/R 损伤中的作用时发现,外源性 H₂S 对 I/R 大鼠的血流动力学指标有不同程度的改善,并且能够下调凋亡促进因子 Bax 的 mRNA 表达,上调 survivin 的 mRNA 表达,对凋亡抑制基因 Bcl-2 的 mRNA 表达没有明显影响。

2.3.3 细胞凋亡率与 AI 细胞凋亡率作为反映细胞凋亡的敏感和准确指标,已被广泛地应用于细胞凋亡的检测。一般应用流式细胞仪检测肝细胞凋亡率。研究发现,一定浓度的 H₂S 可使细胞存活率明显升高,细胞凋亡率降低^[30]。AI 是指以细胞核蓝色为阴性,细胞核呈棕黄色为阳性,计算 5 个高倍视野下($\times 400$)阳性细胞占观察细胞的百分比,一般应用末端转移酶标记技术(TUNEL)检测,用于评估组织细胞凋亡状态,AI 越高表示凋亡越严重。于水等^[31]通过实验证明,外源性 H₂S 可改善再灌注损伤心功能的各项指标($P < 0.05$),使 AI 降低($P < 0.05$)。

2.3.4 三磷酸腺苷(ATP)与线粒体膜电位(MMP) 一般应用高效液相色谱法(HPLC)检测细胞内 ATP 的水平;罗丹明 123(Rh123)染色荧光显微镜照相检测 MMP。实验证明,一定浓度的 NaHS 预处理可显著地抑制细胞毒性及氧化应激反应,使 SOD 活性、ATP 水平及 MMP 提高^[32]。汪莉等^[33]证实 H₂S 可通过抑制 MMP 下降,从而减轻缺氧/复氧造成的心肌细胞损伤。

2.3.5 细胞间黏附分子-1(ICAM-1) ICAM-1 是中性粒细胞浸润聚集的关键因素。其在肝、脑、肾缺血再灌注损伤中与相应脏器的损伤密切相关^[34-36]。Sivarajah 等^[37]发现外源性 H₂S 处理可以通过抑制 ICAM-1 的表达和 PMN 的聚集减轻炎症反应,同时抑制 Caspase-9 的活化及促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,从而减少细胞凋亡。

3 展望

目前,H₂S 在人体主要器官(如心、脑、肾)I/R 中的保护作

用日益受到重视,并促进了新药的研究,而在 HIRI 过程中是否有保护作用及其作用机制的研究才刚刚起步。寻找能更加准确特异地反映 H₂S 在 HIRI 中的保护作用的检验指标是各种药理研究、临床应用的基础。

参考文献

- 周伟平,孙汉勇.肝缺血再灌注损伤对肿瘤增殖、转移的影响[J].世界华人消化杂志,2010,18(9):861-864.
- Geng B, Yang J, Qi Y, et al. H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 313(2):362-368.
- Jassem W, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury in organ transplantation[J]. Kidney Int, 2004, 66(2):514-517.
- 张伟,樊海宁,秦伟,等.气体信号分子硫化氢在大鼠肝缺血-再灌注损伤中的作用[J].青海医学院学报,2007,28(2):83-87.
- Calver JW, Elston M, Nicholson CK, et al. Genetic and pharmacologic hydrogen sulfide therapy attenuates ischemia-induced heart failure in mice[J]. Circulation, 2010, 122(1):11-19.
- Kang K, Zhao M, Jiang H, et al. Role of hydrogen sulfide in hepatic ischemia-reperfusion-induced injury in rats[J]. Liver Transpl, 2009, 15(10):1306-1314.
- 张宁,郑勇,王于理.内源性硫化氢在不同时期大鼠肝硬化中的作用[J].世界华人消化杂志,2009,17(3):307-311.
- 康凯,姜洪池.气体信号分子硫化氢与疾病[J].中国普外基础与临床杂志,2009,16(2):170-173.
- 顾俊,卢竞前,李易.硫化氢与心血管疾病研究进展[J].实用医药杂志,2009,26(9):84-86.
- 殷亚俊,刘志勇.硫化氢对大鼠肺缺血再灌注氧化损伤的影响[J].现代医学,2009,37(3):184-188.
- Zhi L, Ang AD, Zhang H, et al. Hydrogen sulfide induces the synthesis of proinflammatory cytokines in human monocyte cell line U937 via the ERK-NF- κ B pathway[J]. J Leukoc Biol, 2007, 81(5):1322-1332.
- 向进见,田夫,李文岗,等.姜黄素对大鼠肝缺血再灌注早期肝组织一氧化氮表达的影响[J].世界华人消化杂志,2010(10):987-992.
- 元文勇,余伟平,叶启发,等.大鼠肝脏缺血再灌注损伤程度判定指标的选择[J].中国普通外科杂志,2008,17(7):650-653.
- 刘浩,席孝忠,程永刚,等.硫化氢对多器官功能障碍综合征大鼠的保护作用[J].西安交通大学学报:医学版,2009,30(4):482-485.
- 刘国磊,刘青云,陈奎,等.内源性硫化氢在大鼠心力衰竭中的变化及作用[J].郧阳医学院学报,2008,27(1):16-18.
- 曾翔俊,王红霞,王艳霞,等.硫化氢拮抗乳鼠心肌缺氧/复氧损伤机制初探[J].中国病理生理杂志,2009,25(5):839-843.
- Gusarova GA, Wang IC, Major ML, et al. A cell-penetrating ARF peptide inhibitor of FoxM1 in mouse hepatocellular carcinoma treatment[J]. J Clin Invest, 2007, 117(1):99-111.
- Nanetti L, Taffi R, Vignini A, et al. Reactive oxygen species plasma levels in ischemic stroke[J]. Mol Cell Biochem, 2007, 303(1/2):19-25.
- 张琳,买买提祖农·买苏尔,袁一木,等.葡萄籽原花青素对大鼠肝缺血再灌注损伤的抗氧化作用研究[J].新疆医科大学学报,2010,33(2):121-123.
- 王兴民,季海峰,王万铁,等.硫化氢/胱硫醚- γ -裂解酶系统在肺缺血/再灌注损伤中的作用[J].中国中西医结合急救杂志,2010,17(3):155-158.
- 王艳,姚立农,蒋玮,等.外源性硫化氢对创伤失血性休克继发肺

- 损伤的保护作用[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(8): 1318-1320.
- [22] 魏红玲, 杜军保, 唐朝枢, 等. 硫化氢对低氧性肺动脉高压中氧化应激的调节作用[J]. 北京大学学报: 医学版, 2007, 39(6): 565-569.
- [23] 周军, 陈烨, 石恒林, 等. 参附注射液复合异丙酚对围手术肝缺血-再灌注损伤影响的研究[J]. 现代预防医学, 2008, 35(9): 1759-1761.
- [24] 陈雯, 刘莉, 张颖, 等. 外源性 H₂S 吸入对大鼠肢体缺血/再灌注后心肌损伤的保护作用研究[J]. 中国急救医学, 2008, 28(10): 902-905.
- [25] 李晓惠, 杜军保, 唐朝枢. 硫化氢供体对大鼠高肺血流性肺动脉高压中内皮素-1 及结缔组织生长因子表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(3): 446-450.
- [26] 郝云龙, 闻勤生. 还原型谷胱甘肽对肝缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(17): 2101-2102.
- [27] Acquaviva R, Campisi A, Murabito P, et al. Propofol attenuates peroxynitrite-mediated DNA damage and apoptosis in cultured astrocytes: an alternative protective mechanism[J]. Anesthesiology, 2004, 101(6): 1363-1371.
- [28] Takemura G, Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management[J]. Prog Cardiovasc Dis, 2007, 49(5): 330-352.
- [29] 黄晓伟, 姚玲玲, 姚泰, 等. 外源性 H₂S 在大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用[J]. 复旦学报: 医学版, 2008, 35(2): 216-219.
- [30] 廖新学, 杨春涛, 杨战利, 等. 硫化氢对抗化学性缺氧引起的心肌损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2009, 25(8): 1012-1017.
- [31] 于水, 杨海扣, 米琰, 等. PI3K/Akt 信号通路在外源性硫化氢后处理大鼠离体心肌中的作用[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(6): 759-764.
- [32] 魏水生, 廖新学, 谭钰婧, 等. 热休克蛋白 90 在硫化氢抗化学性缺氧诱导心肌细胞氧化应激损伤中的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(12): 2329-2333.
- [33] 汪莉, 徐钢, 季永, 等. 硫氢化钠后处理对缺氧/复氧心肌细胞线粒体渗透性转换的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(12): 1610-1614.
- [34] 张国华, 薛富善, 孙莉, 等. 芬太尼对大鼠肝脏缺血再灌注损伤后期细胞凋亡因子的影响[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(13): 2047-2049.
- [35] 刘开祥, 李浩, 傅军林, 等. 低分子肝素对鼠脑缺血再灌注损伤 P-选择素和 L-选择素表达的影响[J]. 广东医学, 2008, 29(10): 1628-1630.
- [36] 李丹丹, 焦炳华, 孟建中, 等. 低分子肝素对大鼠肾缺血再灌注损伤时 ICAM-1 及 MCP-1 表达的影响[J]. 山东医药, 2008, 48(8): 12-14.
- [37] Sivarajah A, Collino M, Yasin M, et al. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of hydrogen sulfide in a rat model of regional myocardial I/R[J]. Shock, 2009, 31(3): 267-274.

(收稿日期: 2012-05-29)

· 综述 ·

血小板在机体清除腺病毒中的作用

邢宇玲^{1,2} 综述, 辛晓敏^{2△}, 金英玉² 审校

(哈尔滨医科大学附属第一医院检验科, 黑龙江哈尔滨 150001)

关键词: 腺病毒科; 血小板; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.22.023**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2012)22-2741-03

基因治疗作为一种新兴的医疗手段, 为人类疾病治疗开辟了一条新的途径。基因治疗最关键的问题之一是要选择合适的载体以确保治疗基因安全、高效地导入靶细胞。腺病毒因具有诸多优点而被作为最广泛的运载工具, 特别是用于肿瘤基因治疗。但是作为非血液传染的病原体, 腺病毒在血液里没有幸存的变异机制, 在血液循环过程中很快会被清除^[1]。而血小板减少症也是在应用腺病毒做基因载体治疗时高剂量全身给药的一个副作用^[2]。近年来, 腺病毒引起血小板减少的机制是研究热点, 本文对血小板与腺病毒之间的相互关系做了汇总, 将在这里粗浅地探讨一下腺病毒在体内被清除时, 血小板所发挥的作用。

1 腺病毒

1.1 腺病毒介绍 因该病毒最初来自腺体, 故命名为腺病毒。腺病毒分布十分广泛, 能够引起呼吸道、肠黏膜上皮细胞溶解性感染^[3]。在军队中也可引起呼吸系统疾病的暴发流行^[4]。可在淋巴样和腺样细胞中引起潜伏感染, 在啮齿动物细胞中引起转化感染。

1.2 腺病毒分类 根据宿主范围不同, 腺病毒分为哺乳动物腺病毒属和禽类腺病毒属。人腺病毒属于腺病毒科, 根据免疫学、生物学、生物化学特性不同, 将其分为 A~G 7 个亚种, 共

有 55 个血清型^[5], 不同血清型的腺病毒有不同的器官亲和性并引起相应的临床表现^[6]。

1.3 腺病毒结构 腺病毒是一种线性无包膜的双链 DNA 病毒, 病毒颗粒直径 60~90 nm, 呈二十面体立体对称。病毒衣壳有 252 个壳粒, 规则排列成 240 个六邻体(每面 12 个)和 12 个五邻体单位, 其中五邻体位于顶角处, 从每个顶角壳粒的基底伸出一根纤毛突起, 其末端具有一个结节区, 因此腺病毒的衣壳结构可以分为五邻体和六邻体两部分, 其中五邻体又由五邻体基底部、纤毛突起和结节区组成^[7]。在体外试验中, 纤维蛋白介导了病毒与宿主细胞的黏附, 接着五邻体基质又参与促使病毒内陷入细胞的过程^[8]。

1.4 腺病毒作为基因载体的用途 由于腺病毒载体转导目的基因具有高效率、低致病性、高滴度以及在体内不整合入宿主细胞染色体等优点, 已被认为是最有效的转基因载体之一, 并广泛应用于人类基因治疗。但是腺病毒载体的应用还存在一些不足, 如临幊上注射腺病毒载体后的一个普遍的副作用: 血小板减少症^[7]。

2 血小板

2.1 血小板介绍 血小板是一类小的、圆盘形的细胞, 来源于