

· 论著 ·

甲状腺素对大鼠肝脏缺血再灌注后 血红素加氧酶-1表达的影响

陈启 王猛 蒋维维 孔连宝

【摘要】 目的 探讨甲状腺素对大鼠肝脏缺血再灌注后血红素加氧酶-1(HO-1)表达的影响及其对肝脏的保护作用与机制。方法 建立70%大鼠肝脏缺血再灌注损伤模型(缺血1 h,再灌注6 h),将30只雄性Sprague-Dawley大鼠随机分为假手术组、对照组、处理组三组,每组10只。处理方法为于缺血48 h前0.1 mg/kg的T3腹腔注射。测定再灌注末血清ALT、AST和肝脏组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的变化,HE染色光镜下肝组织学观察。应用Western blot及RT-PCR检测肝脏HO-1的表达。结果 与假手术组相比,对照组细胞上清液中ALT、AST和MDA含量明显较高($P < 0.05$),SOD明显较低($P < 0.05$);肝细胞坏死严重,排列紊乱。处理组的ALT、AST和MDA显著低于对照组($P < 0.05$),SOD明显高于对照组($P < 0.05$);肝细胞坏死减轻,排列相对整齐。假手术组有少量HO-1表达,处理组HO-1表达高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 甲状腺素能上调HO-1的表达以减少肝细胞坏死,减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤,从而对肝脏有保护作用。

【关键词】 甲状腺素; 血红素加氧酶-1; 再灌注损伤; 肝脏

The effect of thyroid hormone on heme oxygenase-1 expression after liver ischemia reperfusion injury in rat CHEN Qi, WANG Meng, JIANG Wei-wei, KONG Lian-bao. Liver Transplantation Center, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China
Corresponding author: KONG Lian-bao, Email: lbkong@njmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of thyroid hormone on heme oxygenase-1 (HO-1) expression after liver ischemia reperfusion injury in rat. **Methods** An ischemia-reperfusion (I-R) process of 1 h ischemia and then 6 h reperfusion was established in male Sprague-Dawley rat. The 30 rats were randomly divided into three groups; sham-operated, control, treatment. Treatment of 0.1 mg/kg intraperitoneal injection of T3 at 48 h before ischemic. The levels of ALT, AST in serum and malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in liver tissue were detected at reperfusion for 6 hours. The expression of HO-1 were examined by Western blot and RT-PCR. **Results** Compared to the control group, the expression of the HO-1 mRNA and protein was higher in the treatment group. The level of ALT, AST in serum samples and MDA in liver of the treatment group were significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$) and the level of SOD was higher ($P < 0.05$). Histology showed an severe necrosis in the control group. The necrosis was ameliorated in the treatment group. **Conclusions** These results indicate that thyroid hormone up-regulate the expression of HO-1 and decrease the liver ischemic reperfusion injury.

【Key words】 Thyroid hormone; Heme oxygenase-1; Ischemia reperfusion injury; Liver

肝脏缺血再灌注(I-R)损伤是肝叶切除、严重肝外伤以及肝脏移植手术中经常遇到的问题和导致术后肝功能衰竭的重要原因。甲状腺素(thyroid hormone)作为人体正常生长发育所必需一种激素,

在能量代谢机体发育等过程中起着非常重要的作用。大鼠注射一定量的甲状腺激素能够通过增强能量代谢及肝脏Kupffer细胞作用引起大鼠肝脏的一过性氧化应激而对大鼠肝功能无明显损害^[1-2]。本实验通过建立70%大鼠肝脏I-R损伤模型(缺血1 h,再灌注6 h),以血清ALT、AST及肝脏病理变化水平变化反映肝脏受损程度,用甲状腺素干预,探讨其对大鼠肝脏I-R损伤的保护作用。

材料和方法

一、材料

1. 实验动物: 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 30 只, 体重 200 ~ 250 g, 由上海斯莱克动物实验中心提供。术前 12 h 禁食, 自由饮水。SD 大鼠随机分成假手术组、对照组、处理组三组。参照 Kobayashi 方法建立大鼠 70% 肝脏 I-R 损伤模型。(1) 假手术组只行开腹分离肝十二指肠韧带后关腹;(2) 处理组在缺血 48 h 前腹腔注射 0.1 mg/kg 的 T3 (T3 溶解于 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液)^[3];(3) 对照组进腹 48 h 前给予与 T3 等量的溶剂氢氧化钠溶液, 其余操作同处理组。待处理组灌注 6 h, 各组于相同时间点直接穿刺下腔静脉取血 2 ml, 离心 (3000 r/min) 取血清用于检测肝功能指标丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST)。随即处死大鼠, 迅速切下被阻断的肝叶, 剪取 0.5 cm × 0.5 cm 大小的组织块, 以 4% 的中性甲醛固定, 待制常规切片。余肝组织用 0.9% NaCl 冲洗后置液氮保存。

2. 试剂: 甲状腺素 (thyroid hormone) (北京四环生物制药公司); 血红素加氧酶-1 (HO-1) 单克隆抗体 (美国 abcam 公司); PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time 反转录试剂盒 (日本 TaKaRa 公司); Trizol 及 HO-1 引物 (英国 Invitrogen 公司); 2 × Pre-mix (Bioworld 生物公司); PCR Marker (DL500, TaKaRa, 大连宝生物工程有限公司); 5 × 非变性蛋白上样缓冲液 (北京 Beyotime 公司)。

二、检测项目

1. RT-PCR 测定肝组织 HO-1 mRNA 的表达: 采用 RT-PCR 法; HO-1 序列如下: 上游: 5'-CAGAACCAGTCTATGCC-3'; 下游: 5'-GCTCGGGAAGGTGAAAAGAPDH-3'; GAPDH 上游: 5'-CATCAACGACCCCTTCATTG-3'; 下游 5'-GAAGATGGTGATGGGTTTCC-3'。按照 Trizol 试剂盒操作提取组织总 RNA, 并测定各组 RNA 浓度。各取 2 μl, 按照 TaKaRa 公司 RT-PCR 试剂盒操作要求添加反应体

系, 剩余 RNA -20 °C 保存以备后续使用。反应条件为: 94 °C 3 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 10 min。PCR 反应结束后, 取扩增产物 10 μl 进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳结果用 Quantity One 软件进行灰度分析。

2. Western blot 检测肝组织中 HO-1 蛋白的表达: 取肝脏组织约 50 mg, 加入蛋白裂解液 500 μl 进行蛋白提取, 用 BCA 法定量, 100 °C 加热变性等, 调整蛋白浓度后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离及转膜, 5% 脱脂牛奶 4 °C 封闭 1 h, HO-1 单克隆抗体 4 °C 孵育过夜, 用 1% Tween-TBST 液洗膜三次, 每次 15 min, 二抗 37 °C 孵育 1 h 洗膜后 DBA 显色。内参 GAPDH 抗体孵育 (1:10 000) 过夜, 洗膜后显色。结果进行图像扫描分析。

3. 其他检测: 按试剂盒说明书测定肝组织匀浆丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性, 应用全自动生化分析仪测血清 ALT、AST。组织学检测: 取 4% 的中性甲醛固定的肝组织标本, 常规石蜡切片, HE 染色做常规病理学检查。

三、统计学分析

运用 SPSS 15.0 软件进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间均数比较采用方差分析。P < 0.05 认为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组肝脏组织 HO-1 mRNA 表达量的变化 (图 1): 假手术组肝组织中有少量 HO-1 mRNA 表达, 处理组中肝组织 HO-1 mRNA 的表达明显高于对照组, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。

2. 各组肝脏组织 HO-1 蛋白表达量的变化 (图 2): 假手术组肝组织中有少量 HO-1 蛋白表达, 与对照组相比处理组中肝组织 HO-1 蛋白的表达明显增加, 差异有统计学意义 (P < 0.05)。

3. 各组血清 ALT、AST 及肝组织中 MDA、SOD

表 1 各组血清 ALT、AST 及肝组织中 MDA、SOD 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)	MDA (nmol/mg pro)	SOD (nmol/mg pro)
假手术组	66.32 ± 13.26	152.67 ± 24.68	2.48 ± 0.76	212.56 ± 13.68
对照组	1324.00 ± 97.23 ^a	1984.00 ± 164.34 ^a	7.23 ± 1.09 ^a	151.74 ± 9.56 ^a
处理组	845.26 ± 74.75 ^b	1179.00 ± 127.67 ^b	5.04 ± 0.97 ^b	176.45 ± 7.87 ^b

注: 与假手术比较, ^aP < 0.05; 与对照组比较, ^bP < 0.05

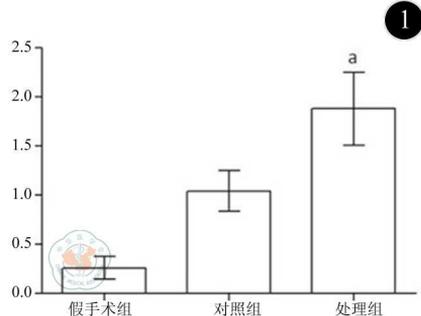
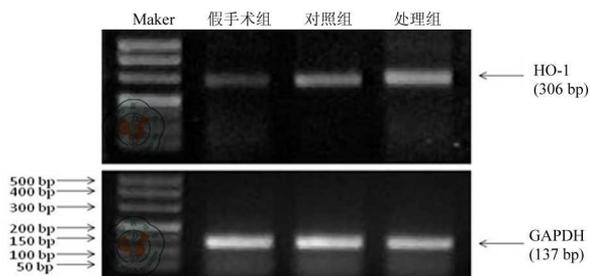


图1 HO-1 mRNA在各组中的表达。与对照组比较, ^a $P < 0.05$

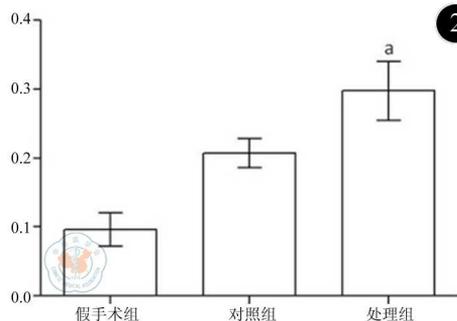
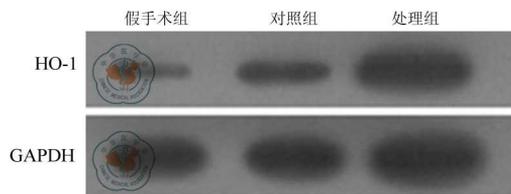


图2 HO-1蛋白在各组中的表达。与对照组比较, ^a $P < 0.05$

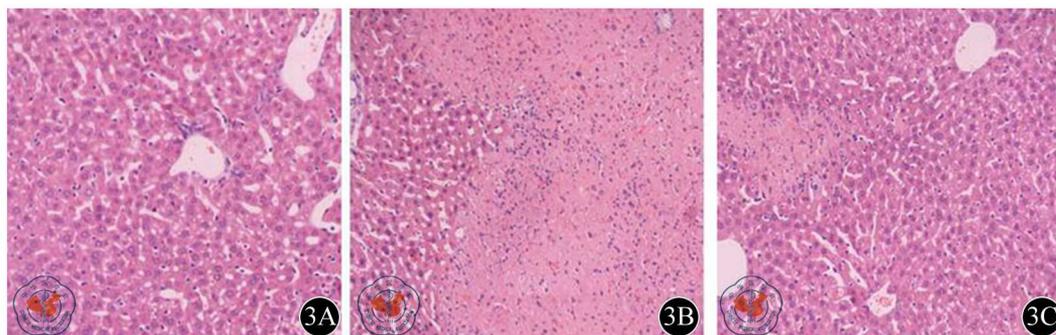


图3 各组肝组织病理学变化(HE ×200)。3A: 假手术组; 3B: 对照组; 3C: 处理组

变化(表1):与假手术组相比,对照组血清ALT、AST水平较高,MDA水平较高,SOD水平较低($P < 0.05$);而处理组血清ALT、AST及MDA水平与对照组相比较低,SOD水平较高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4. 各组肝脏组织学改变(图3):假手术组肝细胞排列正常,未见明显水肿。对照组肝细胞严重坏死,肝细胞排列紊乱;而处理组肝细胞坏死减少,肝细胞排列相对整齐。

讨 论

近年来,肝血管瘤、肝癌、肝硬化等疾病日益增多。肝叶切除、肝移植是治疗上述疾病最有效的方法。肝脏I-R损伤在肝脏外科手术中是不可避免的病理生理过程。I-R损伤对术后恢复和预后有重要影响。因此减轻肝脏I-R损伤始终是临床实践和临床研究的一个重要课题。

Pantos等^[4]研究显示甲状腺激素预处理可能通过改善心肌能量代谢、抑制氧自由基形成、抑制细胞凋亡以及保护心肌的超微结构促进I-R后心室功能的恢复。Li等^[5]研究发现在肾脏I-R损伤中,甲状腺素处理能够通过上调HO-1表达,从而减轻肾脏组织损伤。在肝脏I-R中,甲状腺素能够通过抑制NF- κ B的表达减轻肝脏损伤^[6],但具体机制仍不明确^[7]。本研究利用大鼠肝脏I-R模型,通过对大鼠进行甲状腺素处理组和对照组比较发现,甲状腺素可显著降低血清ALT、AST,减少肝脏坏死,并且上调了HO-1的表达。

血红素加氧酶(heme oxygenase, HO)属微粒体酶系,是血红蛋白分解代谢的限速酶。HO有3种同工酶,分别是HO-1、HO-2和HO-3。其中,HO-2为结构型,主要参与信号转导;HO-1为诱导型酶,是参与血红蛋白代谢的主要亚型,其催化血红蛋白在机体内氧化分解,生成胆绿素、一氧化碳(CO)和

Fe^{2+} , 这些产物及本身均有明确的保护作用^[8]。HO-1 在肝内广泛表达,并在肝 I-R 时表达升高。研究发现通过多种因素诱导 HO-1 过表达可减轻肝脏、心脏、脑组织等 I-R 损伤^[9-11]。本研究发现甲状腺素处理组 HO-1 表达水平明显增高,提示甲状腺素可能诱导 HO-1 的表达。

MDA 是检测氧化应激反应和脂质过氧化反应的良好指标,在多种器官的 I-R 损伤过程中 MDA 均会出现升高,SOD 则是检测器官组织抗氧化状态的指标^[12]。有研究发现在肝脏 I-R 模型中,增加 SOD 活性可以减轻脂质氧化,从而减轻肝脏组织损伤^[13-14]。本研究显示,处理组中 MDA 含量较对照组减少,而 SOD 较对照组增多。此结果提示甲状腺素预处理能减轻肝脏 I-R 损伤的氧化应激。在处理组中甲状腺素能明显上调 HO-1 蛋白及 mRNA 表达。有研究显示 HO-1 主要是在细胞应激情况下被激活,被认为是细胞损伤时在维持抗氧化和氧化的内环境稳定方面起重要作用^[15-16]。因此,从本次实验可以推测,甲状腺素预处理可以减轻肝脏 I-R 损伤,这一过程可能是通过上调肝脏组织中 HO-1 的表达,继而减轻体内氧化反应,加强抗氧化作用,从而起到保护作用。

综上所述,甲状腺素除是生长发育必要的一种激素外,也是一种肝脏 I-R 损伤保护剂,相信随着对甲状腺素作用及其机制的深入研究,甲状腺素及其衍生物可能成为保护肝脏,减轻 I-R 损伤的一条新途径。

参 考 文 献

- [1] Tapia G, Santibáñez C, Farías J, et al. Kupffer-cell activity is essential for thyroid hormone rat liver preconditioning. *Mol Cell Endocrinol*,2010,323:292-297.
- [2] Fernández V, Reyes S, Bravo S, et al. Involvement of Kupffer cell-dependent signaling in T3-induced hepatocyte proliferation in vivo. *Biol Chem*,2007,388:831-837.
- [3] Fernández V, Castillo I, Tapia G, et al. Thyroid hormone preconditioning: protection against ischemia-reperfusion liver injury in the rat. *Hepatology*,2007,45:170-177.
- [4] Pantos C, Mourouzis I, Saranteas T, et al. Thyroid hormone

improves postischemic recovery of function while limiting apoptosis a new therapeutic approach to support hemodynamics in the setting of ischaemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol*,2009,104:69-77.

- [5] Li F, Lu S, Zhu R, et al. Heme oxygenase-1 is induced by thyroid hormone and involved in thyroid hormone preconditioning-induced protection against renal warm ischemia in rat. *Mol Cell Endocrinol*,2011,339:54-62.
- [6] 李长贤,李相成,陈杰,等. 甲状腺激素对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用. *南京医科大学学报:自然科学版*,2010,30:50-54.
- [7] Fernández V, Tapia G, Varela P, et al. Upregulation of liver inducible nitric oxide synthase following thyroid hormone preconditioning: suppression by N-acetylcysteine. *Biol Res*,2009,42:487-495.
- [8] Ryter SW, Alam J, Choi AM. Hemeoxygenase 1/carbon monoxide: form basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*,2006,86:583-650.
- [9] Jancsó G, Cserepes B, Gasz B, et al. Expression and protective role of heme oxygenase-1 in delayed myocardial preconditioning. *Ann N Y Acad Sci*,2007,1095:251-261.
- [10] Yun N, Eum HA, Lee SM. Protective role of heme oxygenase -1 against liver damage caused by hepatic ischemia and reperfusion in rats. *Antioxid Redox Signal*,2010,13:1503-1512.
- [11] Aztatzi-Santillán E, Nares-López FE, Márquez-Valadez B, et al. The protective role of heme oxygenase-1 in cerebral ischemia. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*,2010,10:310-316.
- [12] Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. *Int J Mol Sci*,2011,12:3117-3132.
- [13] 饶建华,姜新春,孟凡军,等. 全反式维 A 酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤肝组织锰超氧化物歧化酶的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*,2011,5:2906-2910.
- [14] Khan M, Mohan IK, Kutala VK, et al. Cardioprotection by sulfaphenazole, a cytochrome p450 inhibitor: mitigation of ischemia-reperfusion injury by scavenging of reactive oxygen species. *J Pharmacol Exp Ther*,2007,323:813-821.
- [15] Paine A, Eiz - Vesper B, Blasczyk R, et al. Signaling to heme oxygenase-1 and its anti-inflammatory therapeutic potential. *Biochem Pharmacol*,2010,80:1895-1903.
- [16] Jones AW, Durante W, Korthis RJ. Heme oxygenase-1 deficiency leads to alteration of soluble guanylate cyclase redox regulation. *J Pharmacol Exp Ther*,2010,335:85-91.

(收稿日期:2011-09-21)

(本文编辑:马超)