

硫化氢对MDA及GSH在大鼠肝星状细胞氧应激中表达的影响

阳丹才让, 邓勇, 任利, 王聪, 樊海宁

阳丹才让, 邓勇, 任利, 王聪, 樊海宁, 青海大学附属医院肝胆胰外科 青海省西宁市 810001

国家自然科学基金资助项目, No. 30960374

作者贡献分布: 此课题由阳丹才让、邓勇及樊海宁设计; 研究过程由阳丹才让、王聪及任利操作完成; 研究获取研究经费、所用试剂及分析工具由樊海宁提供; 数据分析和论文写作由阳丹才让完成。

通讯作者: 樊海宁, 副教授, 硕士生导师, 810001, 青海省西宁市城西区同仁路29号, 青海大学附属医院肝胆胰外科。

fanhaining@medmail.com.cn

收稿日期: 2009-01-07 修回日期: 2009-11-20

接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-28

Effects of hydrogen sulfide on the expression of glutathione and malondialdehyde in culture supernatant of rat hepatic stellate cells during oxidative stress

Cai-Rang Yangdan, Yong Deng, Li Ren, Cong Wang, Hai-Ning Fan

Cai-Rang Yangdan, Yong Deng, Li Ren, Cong Wang, Hai-Ning Fan, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, the Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, Qinghai Province, China

Supported by: National Nature Science Foundation of China, No. 30960374

Correspondence to: Professor Hai-Ning Fan, Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, the Affiliated Hospital of Qinghai University, 29 Tongren Road, Chengxi District, Xining 810001, Qinghai Province, China. fanhaining@medmail.com.cn

Received: 2009-01-07 Revised: 2009-11-20

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-28

Abstract

AIM: To investigate the effects of hydrogen sulfide (H_2S) on the contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) in culture supernatant of rat hepatic stellate cell (HSC) during oxidative stress.

METHODS: HSC-T6 cells were divided into four groups: normal control group (untreated cells), ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) treatment group (treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ of Fe-NTA), sodium hydrosulphide (NaHS) treatment group (treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ of Fe-NTA and NaHS

at a concentration of 20, 100 or 200 $\mu\text{mol/L}$), and glibenclamide (GLBN) treatment group (treated with 500 $\mu\text{mol/L}$ of Fe-NTA and GLBN at a concentration of 20, 200 or 700 $\mu\text{mol/L}$). The contents of MDA and GSH in culture supernatant of HSC-T6 cells were detected using the MDA kit and GSH kit, respectively.

RESULTS: After HSC-T6 cells were incubated with Fe-NTA for 24 h, the content of MDA in culture supernatant increased significantly ($P < 0.05$), while the content of GSH in culture supernatant was reduced significantly in cells incubated with Fe-NTA (both $P < 0.05$). Compared with Fe-NTA-treated cells, the contents of MDA in culture supernatant of cells treated with both Fe-NTA and NaHS for 24 h were reduced significantly (100 $\mu\text{mol/L}$: 4.48 ± 0.07 nmol/mg prot vs 5.05 ± 0.07 ; 200 $\mu\text{mol/L}$: 3.58 ± 0.02 nmol/mg prot vs 5.05 ± 0.07 nmol/mg prot; both $P < 0.05$), and the contents of GSH in supernatant of cells treated with both Fe-NTA and NaHS for 12 and 24 h increased significantly (100 $\mu\text{mol/L}$: 35.57 ± 2.02 mg/g prot vs 33.64 ± 2.95 mg/g prot; 36.49 ± 2.08 mg/g prot vs 31.06 ± 3.08 mg/g prot; 200 $\mu\text{mol/L}$: 36.92 ± 2.30 mg/g prot vs 33.64 ± 2.95 mg/g prot; 37.59 ± 2.03 mg/g prot vs 31.06 ± 3.08 mg/g prot; all $P < 0.05$). In contrast, GLBN treatment induced opposite effects on the contents of MDA and GSH in Fe-NTA-treated cells when compared with NaHS (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: H_2S may be an antioxidant that can exert protective effects on the liver by inhibiting the development and progression of hepatic fibrosis.

Key Words: Hepatic stellate cell; Hydrogen sulfide; Sodium hydrosulfide; Glutathione

Yangdan CR, Deng Y, Ren L, Wang C, Fan HN. Effects of hydrogen sulfide on the expression of glutathione and malondialdehyde in culture supernatant of rat hepatic stellate cells during oxidative stress. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(36): 3725-3728

摘要

目的: 探讨硫化氢对MDA与GSH在大鼠肝星

■背景资料

肝纤维化是继发于各种慢性肝损伤之后组织修复过程中的代偿反应, 是慢性肝病发展为肝硬化必经的病理过程, 肝纤维化的中心环节-肝星状细胞(HSC)活化一直是慢性肝病的研究热点之一。因此抑制他的活化以及降低活化后减轻对机体的损伤也是肝纤维化治疗中的重点。

■同行评议者

张锦生, 教授, 复旦大学上海医学院病理学系

■创新盘点

本研究通过铁超载的方法复制出肝纤维化模型,给予升高和降低H₂S两种处理方式,并通过测定上清液中MDA与GSH含量来探讨H₂S对HSC的影响。

状细胞氧应激中表达的影响。

方法: 将HSC-T6分为8组: 空白组(B组, HSC-T6)、对照组(C组, B组+500 μmol/L Fe-NTA)、NaHS组(N1: C组+20 μmol/L NaHS; N2: C组+100 μmol/L NaHS; N3: C组+200 μmol/L NaHS)、格列苯脲组(G1: C组+20 μmol/L GLBN; G2: C组+200 μmol/L GLBN; G3: C组+700 μmol/L GLBN)。用MDA试剂盒测试血清MDA含量; 用GSH试剂盒测定上清中GSH含量。

结果: 24 h后MDA含量对照组和空白组有明显差异($P<0.05$), 而GSH含量12与24 h均有明显差异(均 $P<0.05$)。给予NaHS后, MDA含量24 h N2和N3组与对照组均有明显差异(4.48 ± 0.07 nmol/mg prot, 3.58 ± 0.02 nmol/mg prot vs 5.05 ± 0.07 nmol/mg prot, 均 $P<0.05$), 12与24 h GSH含量N2和N3组与对照组有明显差异(35.57 ± 2.02 mg/g prot, 36.92 ± 2.30 mg/g prot vs 33.64 ± 2.95 mg/g prot; 36.49 ± 2.08 mg/g prot, 37.59 ± 2.03 mg/g prot vs 31.06 ± 3.08 mg/g prot, 均 $P<0.05$)。给予GLBN处理后, 各项指标结果与给予NaHS处理后结果相对应, 各组与相对应组比较均有明显差异(均 $P<0.05$)。

结论: 氧应激下硫化氢对HSC细胞具有保护作用, 可抑制肝纤维化的发生发展。

关键词: 肝星状细胞; 硫化氢; 硫氢化钠; 谷胱甘肽

阳丹才让, 邓勇, 任利, 王聪, 樊海宁. 硫化氢对MDA及GSH在大鼠肝星状细胞氧应激中表达的影响. 世界华人消化杂志 2009; 17(36): 3725-3728
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3725.asp>

0 引言

肝纤维化源于肝脏纤维组织过度沉积, 是肝脏纤维组织增生和分解失衡的结果。肝纤维化的机制非常复杂。肝细胞的炎症、坏死、免疫反应、肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)的活化, 脂质过氧化物的大量外溢, TGF- β , PDGF等多种细胞因子, 均参与了这一过程^[1-2]。HSC的增生激活是肝纤维化发生的中心环节^[3], 各种致纤维化因素最终都会以HSC为靶标, 通过激活HSC使细胞外基质大量形成并沉积导致肝纤维化的发生^[4]。

氧应激尤其是脂质过氧化产物例如丙二醛(MDA)等在HSC激活早期具有重要意义^[5], MDA可促进I型胶原mRNA的表达, 提示氧应激与肝

纤维化之间存在可能的联系^[6-7], 氧化应激和脂质过氧化与肝纤维化形成的关系密切, 氧化和抗氧化损伤的失衡可以促进HSC的增殖, 导致胶原合成增加。MDA是脂质过氧化的重要中间产物, 能够反应氧化损伤程度, MDA的累积可以通过多种途径激活HSC。还原型谷胱甘肽(GSH)是一种广泛存在于正常细胞中的生理性活性物质, 含有巯基, 可通过巯基与体内的自由基相结合, 是体内最重要的抗氧化物之一^[8]。

为了研究硫化氢(H₂S)在肝纤维化发生中的地位和作用^[9], 我们运用铁超载的方法激活HSC^[10-11], 在细胞水平复制氧应激肝纤维化模型, 给予外源性H₂S供体NaHS和H₂S作用的K_{ATP}阻滞药物格列苯脲, 通过测定上清中MDA与GSH含量, 探讨H₂S对HSC的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)购自湖南湘雅细胞基因库; 胎牛血清为杭州四季青生物工程公司产品; DMEM(高糖)为美国Gibco产品; MDA试剂盒均购自南京建成生物工程研究所; 次氨基乙酸二钠(Na₂NAC)、二甲基亚砜(DMSO)均购自美国Sigma公司; GSH试剂盒购自碧云天生物技术研究。

1.2 方法

1.2.1 体外细胞培养: 肝星状细胞株(HSC-T6), 用含15%灭活的胎牛血清、100 mg/L青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM培养液, 培养置于37℃、50 mL/L CO₂培养箱内培养, 每2-3 d传代1次; 取对数生长期的HSC, 2.5 g/L胰酶消化后, 用含150 mL/L胎牛血清的DMEM配成细胞悬液, 接种于96孔或24孔培养板, 密度为 5×10^7 /L, 每一组设3个复孔, 每孔加入DMEM培养液100 μL, 至于37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中培养过夜。24 h后细胞贴壁良好, 换用2 mL/L胎牛血清的DMEM培养, 使其生长同步化, 再培养24 h后加入Fe-NTA产生氧应激。

1.2.2 实验分组: 将HSC-T6分为8组: 空白组(B组, HSC-T6); 对照组(C组, B组+500 μmol/L Fe-NTA); NaHS组(N1: C组+20 μmol/L NaHS; N2: C组+100 μmol/L NaHS; N3: C组+200 μmol/L NaHS); 格列苯脲组(G1: C组+20 μmol/L GLBN; G2: C组+200 μmol/L GLBN; G3: C组+700 μmol/L GLBN)。

1.2.3 测定MDA及GSH含量: 设置6, 12, 24 h 3个时间点, 用MDA试剂盒测试上清液MDA含量,

表 1 上清液中MDA含量 (nmol/mg prot, $n = 3$, mean \pm SD)

分组	6 h	12 h	24 h
空白组	1.96 \pm 0.11	2.25 \pm 0.13	2.36 \pm 0.08
对照组	2.14 \pm 0.05	2.78 \pm 0.04	5.05 \pm 0.07 ^a
N1	2.12 \pm 0.01	2.74 \pm 0.03	4.85 \pm 0.16
N2	2.09 \pm 0.03	2.61 \pm 0.03	4.48 \pm 0.07 ^c
N3	2.04 \pm 0.08	2.53 \pm 0.21	3.58 \pm 0.02 ^c
G1	2.39 \pm 0.28 ^e	3.09 \pm 0.11 ^e	5.24 \pm 0.29 ^e
G2	2.55 \pm 0.12 ^{ce}	3.39 \pm 0.07 ^e	5.45 \pm 0.07 ^{ce}
G3	2.69 \pm 0.07 ^{ce}	4.93 \pm 1.45 ^{ce}	6.01 \pm 0.15 ^{ce}

^a $P < 0.05$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$ vs 对照组; ^e $P < 0.05$ vs NaHS对应各组。

表 2 上清液中GSH含量 (mg/g prot, $n = 3$, mean \pm SD)

分组	6 h	12 h	24 h
空白组	34.95 \pm 2.60	37.76 \pm 3.81	39.21 \pm 2.07
对照组	34.73 \pm 2.56	33.64 \pm 2.95 ^a	31.06 \pm 3.08 ^a
N1	34.20 \pm 2.45	34.66 \pm 1.97	34.85 \pm 2.16
N2	34.23 \pm 2.36	35.57 \pm 2.02 ^c	36.49 \pm 2.08 ^c
N3	34.22 \pm 1.98	36.92 \pm 2.30 ^c	37.59 \pm 2.03 ^c
G1	32.38 \pm 0.29 ^{ce}	31.31 \pm 2.87 ^e	30.75 \pm 2.28 ^e
G2	32.56 \pm 0.13 ^{ce}	29.10 \pm 3.10 ^e	25.46 \pm 2.08 ^{ce}
G3	32.68 \pm 0.08 ^{ce}	27.10 \pm 3.20 ^{ce}	26.03 \pm 2.16 ^{ce}

^a $P < 0.05$ vs 空白组; ^c $P < 0.05$ vs 对照组; ^e $P < 0.05$ vs NaHS对应各组。

应用要点

本研究提示, H₂S能够在一定范围内减少氧化损伤, 提高抗氧化能力, 对肝纤维化具有一定的保护作用, 也为GSH在临床上用于脂肪肝和肝纤维化的治疗提供了理论和实验依据, 为继续研究其抗纤维化作用打下了理论基础。

GSH试剂盒检测上清中GSH含量。

统计学处理 计量资料以mean \pm SD表示, 用SPSS11.5软件进行统计分析。组间差异用单因素方差分析(One-way ANOVA), 有显著差异者用Student-Newman-Keuls q 检验进行两两比较。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 上清液中MDA含量 给予Fe-NTA后, 6 h和12 h, 对照组和空白组差异不明显, 24 h后对照组和空白组有明显差异($P < 0.05$)。给予NaHS后6 h和12 h处理组与对照组均无明显差异, 24 h N2和N3组与对照组均有明显差异(均 $P < 0.05$)。给予GLBN治疗后6 h和24 h的G2, G3组, 12 h的G3组与对照组均有明显差异(均 $P < 0.05$)。各处理组随着时间的延长除G1组在6 h, 12 h差异不明显外, 其余各时间组均有差异(均 $P < 0.05$, 表1)。

2.2 上清液中GSH含量 给予Fe-NTA后, 6 h对照组和空白组差异不明显, 12 h与24 h对照组和空白组有明显差异(均 $P < 0.05$)。给予NaHS后6 h处理组与对照组无明显差异, 12 h与24 h的N2和N3组与对照组均有明显差异(均 $P < 0.05$)。给予GLBN治疗后6 h和24 h的G2, G3组, 12 h的G3组与对照组均有明显差异(均 $P < 0.05$)。各处理组随着时间的延长除N1与G1组差异不明显外, 其余各时间组均有差异(均 $P < 0.05$, 表2)。

3 讨论

HSC的活化是肝纤维化发生的中心环节^[12], 无论是那一种病因引起的肝纤维化最终都会激活HSC, 通过效应的自我放大导致肝纤维化的发生发展。因此抑制他的活化以及降低活化后减轻对机体的损伤也是肝纤维化治疗中的重点。

铁沉积既可以直接激活HSC, 又可以通过脂质过氧化反应导致HSC的间接激活。刘梅 *et al* 应用不同浓度的次氨基三乙酸铁(Fe-NTA)培养大鼠HSC证实铁剂可以引起鼠HSC的增殖, 导致氧化抗氧化失衡^[6]。本实验通过给予Fe-NTA处理HSC-T6也发现了类似的现象, 提示运用铁超载来促进HSC增殖是一种可靠的肝纤维化造模方法。

氧化应激与肝纤维化形成关系密切, 各种因素造成的肝损伤产生了大量的脂质过氧化物, 超出了机体的清除能力, 使其发生脂质过氧化, MDA水平提高, MDA是脂质过氧化的重要终产物之一, 反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度, 铁超载可产生大量的自由基和脂质过氧化物, 导致机体抗氧化损伤的防御机制受损, 不能清除过多的自由基和MDA等脂质过氧化物^[10]。而HSC内MDA累积, 通过不同途径激活HSC, 促进其增殖和合成胶原, 导致肝纤维化的发生, 于洪波 *et al*用高脂饮食喂饲大鼠也得出了类似结果^[13]。GSH含有巯基, 是体内重要的抗氧化物之一, 是由谷氨酸、半胱氨酸和甘氨酸组成的一种三肽。他在酶的催化下能与过氧化物和自由基相结合, 对抗氧化物的破坏作用^[14]。

动物实验证实H₂S能够缓解门脉高压的形成^[15-16], 对肝硬化大鼠具有一定的保护作用。本研究通过铁超载的方法复制出肝纤维化模型, 给予升高和降低H₂S两种处理方式, 结果提示H₂S能够在一定范围内减少氧化损伤, 提高抗氧化能力, 对肝纤维化具有一定的保护作用, 也为GSH在临床上用于脂肪肝和肝纤维化的治疗提供了理论和实验依据, 为继续研究其抗纤维化作用打下了理论基础。

4 参考文献

- 1 Liu SQ, Yu JP, He L, Yu HG, Luo HS. [Effects of

■同行评价

本文对硫化氢对MDA及GSH在大鼠肝星状细胞氧应激中表达的影响进行了研究,内容新颖,结论有一定参考意义。

- nuclear factor kappaB and transforming growth factor beta1 in the anti-liver fibrosis process using Ginkgo biloba extract] *Zhonghua Ganzangbing Zazhi* 2005; 13: 903-907
- 2 Proell V, Carmona-Cuenca I, Murillo MM, Huber H, Fabregat I, Mikulits W. TGF-beta dependent regulation of oxygen radicals during transdifferentiation of activated hepatic stellate cells to myofibroblastoid cells. *Comp Hepatol* 2007; 6: 1
- 3 Friedman SL. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med* 1993; 328: 1828-1835
- 4 Senoo H, Kojima N, Sato M. Vitamin A-storing cells (stellate cells). *Vitam Horm* 2007; 75: 131-159
- 5 Thiele GM, Freeman TL, Klassen LW. Immunologic mechanisms of alcoholic liver injury. *Semin Liver Dis* 2004; 24: 273-287
- 6 刘梅, 陆伦根, 陈尉华, 窦爱霞, 房静远, 曾明德, 郑瑞丹. 氧应激对大鼠肝星状细胞增殖的影响及还原型谷胱甘肽的抗氧化作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2596-2600
- 7 Varela-Rey M, Fontán-Gabás L, Blanco P, López-Zabalza MJ, Iriburu MJ. Glutathione depletion is involved in the inhibition of procollagen alpha1(I) mRNA levels caused by TNF-alpha on hepatic stellate cells. *Cytokine* 2007; 37: 212-217
- 8 Zheng S, Yumei F, Chen A. De novo synthesis of glutathione is a prerequisite for curcumin to inhibit hepatic stellate cell (HSC) activation. *Free Radic Biol Med* 2007; 43: 444-453
- 9 陈晓波, 杜军保, 耿彬, 蒋宏峰, 唐朝枢. 感染性和内毒素性休克大鼠动脉组织中硫化氢的变化. *基础医学与临床* 2003; 23: 384-387
- 10 MacDonald RJ, Swift GH, Quinto C, Swain W, Pictet RL, Nikovits W, Rutter WJ. Primary structure of two distinct rat pancreatic preproelastases determined by sequence analysis of the complete cloned messenger ribonucleic acid sequences. *Biochemistry* 1982; 21: 1453-1463
- 11 Liu EH, Chen MF, Yeh TS, Ho YP, Wu RC, Chen TC, Jan YY, Pan TL. A useful model to audit liver resolution from cirrhosis in rats using functional proteomics. *J Surg Res* 2007; 138: 214-223
- 12 Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis. *Front Biosci* 2002; 7: d808-d826
- 13 于洪波, 戴林, 彭海英, 牟新春, 左中. 复方中药对大鼠高脂饮食所致脂肪性肝炎肝组织氧化和抗氧化系统的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2842-2847
- 14 Cubero FJ, Nieto N. Ethanol and arachidonic acid synergize to activate Kupffer cells and modulate the fibrogenic response via tumor necrosis factor alpha, reduced glutathione, and transforming growth factor beta-dependent mechanisms. *Hepatology* 2008; 48: 2027-2039
- 15 Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, Orlandi S, Renga B, Rizzo G, Distrutti E, Shah V, Morelli A. The third gas: H2S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis. *Hepatology* 2005; 42: 539-548
- 16 黄新莉, 周晓红, 韦鹏, 张晓静, 孟祥艳, 姜晓辉. 内源性硫化氢在脂多糖引起的肺动脉高压中的作用. *生理学报* 2007; 59: 357-362

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》入选北京大学图书馆 2008年版《中文核心期刊要目总览》

本刊讯 《中文核心期刊要目总览》(2008年版)采用了被索量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录、基金论文比、Web下载量等9个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库及文摘刊物达80余种, 统计文献量达32400余万篇次(2003-2005年), 涉及期刊12 400余种. 本版还加大了专家评审力度, 5500多位学科专家参加了核心期刊评审工作. 经过定量评价和定性评审, 从我国正在出版的中文期刊中评选出1980余种核心期刊, 分属七大编73个学科类目. 《世界华人消化杂志》入选本版核心期刊库(见R5内科学类核心期刊表, 第66页). (科学编辑: 李军亮 2009-12-28)