

文章编号:1005-6947(2006)01-0019-04

· 实验研究 ·

硒螺旋藻对大鼠肝叶切除术后肝细胞再生和抗氧化能力的影响

黄峰¹, 黄峙², 杨芳², 郑文杰², 张晓林¹

(1. 佛山科学技术学院医学院 外科, 广东 佛山 528000; 2. 暨南大学 生命科学技术学院, 广东 广州 510632)

摘要:目的 研究硒螺旋藻(Se-SP)对大鼠肝叶切除术后肝细胞再生和抗氧化能力的影响,以印证其生物利用价值。方法 用Wistar大鼠复制67%肝叶切除动物模型,设Se-SP高剂量(H)和低剂量(L)治疗组,术前以Se-SP灌胃7d;另设生理盐水(C)及假手术对照组(S)。于手术前及其后24h取鼠肝细胞,检测硒(Se)、丙二醛(MDA)含量及谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和超氧化物歧化酶(SOD)活性;利用免疫组化方法测定肝细胞增生核抗原(PCNA)表达指数,彗星实验检测过氧化氢诱导的肝细胞DNA损伤。结果 与C、S组相比,H组、L组肝细胞中MDA水平明显降低($P < 0.05$),而Se、GPx和SOD明显升高($P < 0.05$);肝细胞PCNA指数明显升高($P < 0.05$),过氧化氢诱导的DNA损伤程度较轻。结论 Se-SP对肝切除鼠肝细胞具有一定的抗氧化和促再生作用。

关键词: 肝切除术; 肝再生; 硒螺旋藻

中图分类号: R657.3; R333.4

文献标识码: A

Effects of selenium enriched *Spirulina platensis* on antioxidation and regeneration of rat hepatocytes after hepatectomy

HUANG Feng¹, HUANG Zhi², YANG Fang², ZHENG Wen-jie², ZHANG Xiao-lin¹

(1. Medical School, Foshan Science and Technology College, Foshan, Guangdong 528000, China;

2. College of Life Science and Technology, Ji Nan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of selenium enriched *Spirulina platensis* (Se-SP) on antioxidation and regeneration of rat hepatocytes after partial hepatectomy. **Methods** Sixty-seven percent hepatectomy was performed in rats after high dose (H) and low dose (L) Se-SP was given via gastric tube for 7 days. Then selenium (Se), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in hepatocytes were determined. The results were compared with normal saline giving via gastric tube before hepatectomy (C) and sham operation (S) groups. Hepatocytes were obtained before operation and 24h after operation, and the expression index of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in hepatocytes was detected by immunohistochemistry, and the DNA damage of hepatocytes induced by peroxide was analyzed by comet assay. **Results** After partial hepatectomy, Se content, GPx and SOD activity, and PCNA expression index were obviously higher ($P < 0.05$), whereas content of MDA was significantly lower ($P < 0.05$) in hepatocytes of rats with high dose and low dose Se-SP (150mg/100/d) than those in control. The DNA oxidation damage in hepatocytes induced by peroxide (100 nM for 30 min) was decreased also in rats with high dose and low dose of Se-SP treatment. **Conclusions** Se-SP has definite antioxidation and regeneration enhancing effects on rat hepatocytes after hepatectomy.

Key words: Hepatectomy; Liver Regeneration; Se-SP

CLC number: R657.3; R333.4

Document code: A

目前,肝切除手术后并发肝衰竭的病死率仍极

基金项目:广东省自然科学基金重点资助项目(05103295)。

收稿日期:2005-03-29; **修订日期:**2005-12-27。

作者简介:黄峰,男,河南信阳人,佛山科学技术学院医学院副教授(南方医科大学硕士研究生),主要从事普通外科方面的研究。

通讯作者:黄峙 电话:020-85220219; E-mail:thsh@jnu.edu.cn。

高,其中生物膜脂质过氧化损伤是诱发肝衰竭的重要机制。肝再生是肝切除术后肝功能重建的基础,氧化还原调节在其中发挥重要作用。螺旋藻(*Spirulina*)中的藻蓝蛋白、藻多糖等具有抗氧化、刺激造血、抗辐射和促进DNA损伤修复的功能^[1-2]。硒参与构成谷胱甘肽过氧化物酶(GPx),硫氧还蛋白还原酶(TR)等硒酶的活性中心,在细胞增殖、分化调

节中起重要作用^[3]。许多天然硒化合物具有抗氧化、抗感染和抗细胞损伤效应,并能调节细胞增殖^[4]。螺旋藻对硒具有较强的生物转化能力,硒螺旋藻(Se-SP)中的生物活性物质具有更强的免疫调节和抗氧化活性^[5]。本文通过大鼠肝切除模型,检测手术前后丙二醛(MDA),Se含量和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx),超氧化物歧化酶(SOD)的活性变化,结合肝细胞增生核抗原(PCNA)表达量及肝细胞对过氧化氢(H₂O₂)诱导的DNA氧化损伤耐受能力的检测,探讨Se-SP对大鼠肝切除术后的抗氧化保护及促肝再生效应。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性Wistar大鼠,体重(220±20)g,购自中山大学医学院实验动物中心。

1.1.2 主要试剂和药品 硒螺旋藻(Se-SP)按照优化条件添加亚硒酸钠自行培养获得^[6],硒含量431μg/g。IV型胶原酶、D-Hanks及RPMI 1640培养液均为Gibco公司产品。PCNA检测试剂盒为博士德产品。小牛血清购自杭州四季青公司。MDA,GPx,SOD检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。2,3-二氨基萘(2,3-DAN)和Oligreen(Molecular Probes)为Sigma公司产品。正常熔点琼脂糖和低熔点琼脂糖(Agarose LMP)为Promega公司产品。淋巴细胞分离液购自中国医学科学院血液研究所。二甲基亚砜(DMSO),Triton X-100,H₂O₂及其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 分组 48只大鼠随机分4组,每组12只。

(1) Se-SP高剂量处理(H)组:用Se-SP 150mg/(100g·d)[补硒量62μg/(100g·d)]灌胃;(2) Se-SP低剂量处理(L)组:灌胃的Se-SP用量为15mg/(100g·d)[补硒量为6.2μg/(100g·d)];(3)生理盐水对照(C)组:用生理盐水5mL/d灌胃;(4)假手术对照(S)组:用生理盐水5mL/d灌胃。用药时间均为7d(表1)。

表1 大鼠分组情况

项目	生理盐水对照(C组)	假手术对照(S组)	高剂量组(H组)	低剂量组(L组)
大鼠数量(只)	12	12	12	12
肝切除量(%)	67	67	67	67
Se-SP用量 [mg/(100g·d)]	-	-	150	15
补硒量 [μg/(100g·d)]	-	-	62	6.2
生理盐水(mL/d)	5	5	-	-
用药时间(d)	7	7	7	7

1.2.2 造模 大鼠经10g/L戊巴比妥钠按体重30mg/kg腹腔注射麻醉,S组大鼠于腹部正中施加3cm切口暴露腹腔,轻轻摆动肝脏左叶与中叶后,关闭腹腔;H组和L组大鼠采用Higgins and Aderson创建的大鼠肝切除模型^[7]。

1.2.3 取样 手术时(0h)及手术后24h每组分别处死5~6只大鼠,取出肝脏。大鼠肝细胞分离采用BREAT法^[7]:打开腹腔,腹腔静脉肝素钠注射,门静脉插管,输液泵匀速前灌液原位灌注,待肝脏血液冲洗干净后,用0.5g/L的胶原酶以8~10mL/min的流速循环灌注肝脏10min,分离肝细胞,200目滤网过滤,500r/min离心8min后PBS洗涤(500r/min 3次)收集肝细胞,PBS调整细胞密度10⁷/mL。

1.3 检测项目

(1)大鼠肝细胞中MDA浓度以及GPx和SOD活性测定按试剂盒说明进行;(2)Se浓度测定采用2,3-二氨基萘(2,3-DAN)荧光法^[8](970CRT荧光分光光度计,上海分析仪器总厂);(3)PCNA表达指数的测定采用免疫组化方法,按试剂盒使用说明书进行操作,按下列公式计算PCNA的指数:PCNA的指数=PCNA阳性肝细胞数÷观察的肝细胞总数×100%;(4)慧星试验按文献方法进行^[9-10],肝细胞与100nM H₂O₂ 37℃作用30min诱导肝细胞氧化损伤,Oligreen(Molecular Probes)染色后,用配备有高解析度数码CDC(韩国三星公司)的荧光显微镜(LHS-H100P-7型,Nikon)获取图像,观察细胞DNA的损伤程度。

1.4 统计学处理

全部数据用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用SPSS10.0软件进行统计学处理,采用单因素方差分析和差异显著性t检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 肝细胞Se含量测定

手术前后H组和L组Se含量均明显高于C组和S组($P < 0.05$);术后各组Se含量均高于术前,其中H组和L组术后比术前显著升高($P < 0.05$)(表2)。

2.2 肝细胞MDA含量测定

手术前,各组MDA含量差异不明显;手术后,除

S组外其它各组MDA含量均比术前明显升高($P < 0.05$),但H组在术后则明显低于C组($P < 0.05$) (表2)。

2.3 肝细胞GPx活性测定

手术前,只有H组GPx活性明显高于对照组($P < 0.05$);手术后,除S组外其它各组GPx活性均比术前明显升高($P < 0.05$),而且治疗组GPx

活性都明显高于S组($P < 0.05$) (表2)。

2.4 肝细胞SOD活性测定

手术前,各组SOD活性各组差异不明显;手术后,除S组外其它各组SOD活性均比术前明显升高($P < 0.05$),而且治疗组SOD活性明显高于S组($P < 0.05$) (表2)。

表2 Se-PS对肝部分切除术肝细胞Se、MDA含量及GPx和SOD活性的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	Se[nmol/10 ⁷ (细胞)]		MDA[nmol/10 ⁷ (细胞)]		GPx[U/10 ⁷ (细胞)]		SOD[U/10 ⁷ (细胞)]	
	实验开始时	术后24h	0h	术后24h	0h	术后24h	0h	术后24h
	0h(n=6)	(n=5)	(n=6)	(n=5)	(n=6)	(n=5)	(n=6)	(n=5)
H	25.3±4.5 ^{1),2)}	30.4±2.9 ^{1),2),3)}	18.0±1.8	25.2±1.7 ^{1),2),3)}	51±7 ^{1),2)}	76±9 ^{1),2),3)}	21±3	45±4 ^{1),2),3)}
L	19.8±1.8 ^{1),2)}	24.2±2.4 ^{1),2),3)}	18.7±2.1	28.3±1.8 ^{2),3)}	47±5	69±7 ^{2),3)}	19±2	40±3 ^{2),3)}
S	17.3±1.8	19.4±1.6	20.0±1.7	22.3±1.7 ¹⁾	43±4	49±5 ¹⁾	18±2	21±3 ¹⁾
C	16.9±1.9	17.6±1.9	19.3±1.6	31.0±2.5 ³⁾	45±4	61±8 ³⁾	19±3	36±5 ³⁾

注:1)与C组比较, $P < 0.05$; 2)与S组比较, $P < 0.05$; 3)与0h比较, $P < 0.05$

2.5 肝细胞PCNA表达指数

手术前,H组和L组大鼠的PCNA指数均高于C组和S组。与手术前相比,手术后各组PCNA指数均有一定程度提高,但只有H组增高显著,并且明显高于C组和S组($P < 0.05$) (图1)。

2.6 H₂O₂诱导的肝细胞DNA损伤

手术前后分离的各组大鼠肝细胞在未经H₂O₂攻击时,彗星试验检测肝细胞DNA无明显损伤,染色区集中明亮;手术后24h分离的各组大鼠肝细胞经100nM H₂O₂ 37℃孵育30min后,彗星试验检测肝细胞DNA均有明显损伤,染色区松散,有明显的头和尾,但各组间损伤程度存在明显差异,其中以

C组肝细胞DNA损伤最为明显,H组肝细胞DNA损伤最轻(图2)。

1)与C组比较, $P < 0.05$; 2)与S组比较, $P < 0.05$; 3)与0h比较, $P < 0.05$

图1 各组大鼠肝细胞PCNA表达指数

H组 L组 S组 C组

a-d: 未经H₂O₂诱导的正常肝细胞; e-h: 经100nM H₂O₂处理30min的损伤肝细胞

图2 各组大鼠肝细胞H₂O₂诱导的DNA损伤

3 讨 论

肝叶切除手术可引起机体一系列的病理生理变化。本实验结果(表 2)表明肝切除手术(C 组)比假手术(S 组)诱发大鼠肝细胞更强烈的脂质过氧化损伤,MDA 含量升高,机体抗氧化酶 GPx 和 SOD 活性呈代偿性增高。Se-SP 富含硒,具有抗氧化活性。硒酶 GPx 具有强大抗氧化作用,它不仅能催化 H_2O_2 ,还能催化有机过氧化物特别是脂质过氧化物(LPO),将其还原为相应的醇,从而减少 $LOO\cdot$ 和 $LO\cdot$ 等自由基的生成,使组织细胞免受过量过氧化物,特别是过氧化脂质的损害,维持细胞正常的功能^[11]。另外,Se-SP 中还富含其它多种抗氧化活性成分如维生素 E,综合发挥抗氧化作用^[1]。本实验发现手术前补充 Se-SP,可明显提高肝切除大鼠肝细胞硒酶 GPx 活性,对 SOD 活性也有明显的上调作用。

肝细胞有巨大的再生潜力,肝细胞再生增殖是一复杂的病理生理过程,尽管单纯肝切除可刺激残肝细胞再生增殖,但这种促进作用是有限的。研究已发现硒构成 GPx、TR、脱碘酶和硒蛋白 P 等硒酶/硒蛋白活性中心,在细胞增殖、分化调节中起重要作用^[3]。本实验结果表明,肝切除术前辅以 Se-SP 则可显著提高肝细胞的 PCNA 表达水平,提示 Se-SP 具有较强的促肝细胞再生效应,将有助于肝脏组织及功能恢复。另外,Se-SP 富含优质蛋白及丰富的藻多糖^[1],对肝功能恢复和增强肝功能贮备有一定作用,对 Se-SP 中可能存在的其它促肝细胞再生修复合活性物质还有待进一步发现。

本实验采用慧星试验研究 H_2O_2 对肝细胞 DNA 的损伤及 Se-SP 的保护作用。发现,C 组比 S 组肝细胞 DNA 损伤更为明显,表明手术后肝细胞对自由基损伤更为敏感,补充 Se-SP 大鼠肝细胞 DNA 损伤则明显减轻,进一步提示 Se-SP 对肝细胞具有较好的抗氧化作用。Se-SP 对 DNA 氧化损伤的保护作用也将有助于肝细胞的再生增殖和功能修复。

本实验证明,Se-SP 可较好地拮抗肝切除术引

起的脂质过氧化损伤,对 H_2O_2 诱导的肝细胞 DNA 的损伤也有一定保护作用,并对肝细胞再生具有明显促进效应。故初步认为,Se-SP 是良好的生物补硒剂,增强机体的抗氧化能力,有助于肝叶切除术后康复。

参考文献:

- [1] 胡鸿钧. 螺旋藻生物学及生物技术原理[M]. 北京: 科学出版社, 2003, 1-36.
- [2] Zhang HQ, Lin A P, Sun Y, *et al.* Chemo- and radio-protective effects of polysaccharide of *Spirulina platensis* on hemopoietic system of mice and dogs [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(12): 1121-1124.
- [3] 黄峙, 向军俭, 郭宝江. 硒蛋白分子生物学研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(5): 642-645.
- [4] 郑文杰, 欧阳政. 植物有机硒的化学及其医学应用 [M]. 广州: 暨南大学出版社, 2001. 253-262; 293-305.
- [5] 黄峙, 郑文杰, 郭宝江. 含硒藻蓝蛋白抗小鼠实验性肝损伤的作用 [J]. *中国病理生理杂志*, 2002, 18(7): 819-822.
- [6] 黄峙, 郭宝江, 郑文杰. 钝顶螺旋藻富硒培养条件的优化 [J]. *生物工程学报*. 2002, 18(3): 373-376.
- [7] 董晓灵, 陈平, 朱瑾, 等. 大鼠肝部分切除术后肝窦内皮细胞对肝细胞增生的影响 [J]. *世界华人消化杂志*, 2004, 12(8): 1861-1864.
- [8] Kessi J, Ramuz M, Wehrli E, *et al.* Reduction of selenite and detoxification of elemental selenium by the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(11): 4734-4740.
- [9] 梁旭竞, 唐永煌, 何玮, 等. 丹参酮对过氧化氢致慢性乙型肝炎患者外周血淋巴细胞 DNA 损伤的影响 [J]. *中西医结合肝病杂志*, 2005, 15(2): 74-77.
- [10] Singh NP, Mccoy MT, Tice PR, *et al.* A simple cell research for quantitation of low levels of DNA damage in individual [J]. *Exp Cell Res*, 1988, 175(1): 184-191.
- [11] 张键, 刘喜春, 赵丹, 等. 地奥心血康对心肌缺血再灌注损伤的抗脂质过氧化作用的研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20(5): 887-890.