

瘦素对缺氧复氧培养 L02 肝细胞功能和氧化产物的影响

周少丽¹, 郭娜¹, 葛緬¹, 黑子清¹, 陈规划^{2*}

(中山大学 1. 附属第三医院麻醉科; 2. 附属第三医院肝脏移植中心//器官移植研究所, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】观察瘦素对缺氧复氧人肝脏细胞(L02)的肝功能保护和丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的影响。【方法】将 L02 细胞分别分为正常对照组、单纯缺氧 12 h 复氧组和缺氧 12 h 复氧加不同浓度的瘦素(分别为 100、200、400、800 和 1 600 $\mu\text{g/L}$)干预组,取细胞上清液检测谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、MDA 的浓度和 SOD 活性;电镜检测细胞凋亡的形态学改变。【结果】①与正常对照组相比,L02 细胞经缺氧 12 h 复氧培养后,ALT 和 AST 浓度明显升高($P < 0.01$),加用不同浓度瘦素干预组 ALT 和 AST 浓度较单纯缺氧 12 h 复氧组下降($P < 0.01$);②与正常对照组相比,L02 细胞经缺氧 12 h 复氧培养后,MDA 浓度明显升高($P < 0.05$),SOD 活性下降($P < 0.05$),加用不同浓度瘦素干预组 MDA 浓度较单纯缺氧 12 h 复氧组下降($P < 0.05$);SOD 活性上升($P < 0.05$);③电镜检测单纯缺氧复氧后细胞呈现明显凋亡形态学改变,加用瘦素 100 $\mu\text{g/L}$ 处理细胞组细胞仅轻度改变。【结论】瘦素对缺氧复氧培养导致 L02 肝细胞的细胞损伤有一定的保护作用;可能与瘦素抑制氧自由基生成,减少脂质过氧化有关。

关键词: 缺氧-复氧; L02 细胞; 肝功能; 瘦素; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R977.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)05-0527-05

Effect of Leptin on Hypoxia-reoxygenation Induced Apoptosis and Liver Function and Oxidation Products in Human L02 Cells

ZHOU Shao-li¹, GUO Na¹, GE Mian¹, HEI Zi-qing¹, CHEN Gui-hua^{2*}

(1. Department of Anesthesiology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University;

2. The Organ Transplantation Research Institute and Liver Transplantation Center//Department of Liver Transplantation Center, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of leptin on hypoxic-reoxygenation induced apoptosis, level of alanine aminotransferase (ALT), and aspartate aminotransferase (AST), malondialdehyde (MDA) content and super oxide dismutase (SOD) activity in human L02 cells. 【Methods】 In the experiment, L02 cell damage was induced by hypoxic air (95% N₂ and 5% CO₂). The culture L02 cells was divided into hypoxic group(hypoxic 12 hours) alone, unhypoxic normal group and the hypoxic groups plus treated with leptin(100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$, 400 $\mu\text{g/L}$, 800 $\mu\text{g/L}$, and 1 600 $\mu\text{g/L}$) in vitro. The levels of ALT and AST, the MDA content and the SOD activities of the culture cell liquid were detected. The pathology and ultrastructure of the L02 cell were also observed. 【Results】 ①Levels of AST and ALT were significantly increased in hypoxia-reoxygation group compared with the control group ($P < 0.01$), in the leptin treatment groups, levels of AST and ALT were decreased compared with the hypoxia-reoxygation group ($P < 0.01$). ②Compared with the controled group, the MDA content was significantly increased and SOD activity was significantly decreased in hypoxia-reoxygation group ($P < 0.05$). In the leptin treatment groups, the MDA content was reduced and SOD activity was significantly increased compared with the hypoxia-reoxygation group ($P < 0.05$). ③In the hypoxia-reoxygation group the L02 cell ultrastructure presented aptopsis significantly, in the leptin treatment groups, the change of ultrastructure were attenuated. 【Conclusion】 Leptin can protect cultured L02 cells against hypoxia-reoxygation injury, the protective mechanisms maybe related to reducing the released of oxyradical and inhibiting the lipid peroxidation.

Key words: hypoxia-reoxygation; L02 cells; liver function; apoptosis; SOD and MDA; leptin; effects

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(5): 527-531]

收稿日期: 2008-08-30

基金项目: 广东省自然科学基金(7001567)

作者简介: 周少丽, 博士研究生, E-mail: zhou13925051801@163.com; * 通信作者, 陈规划, 教授, 博士生导师

肝脏移植和肝脏手术过程中因阻断肝脏血供和后续肝脏血流开放引发肝细胞缺血再灌注损伤(hepatic ischemia and reperfusion injury, HIRI)^[1], 从而引起肝功能障^[2]和氧化产物增加^[3]。因此采取有效手段预防肝脏缺血缺氧导致再灌注损伤以及减少氧化产物和保护肝功能对于临床患者的恢复有着重要的意义。瘦素(leptin, 瘦素)是具有促进细胞生长和分化作用的一种细胞因子, 且有抑制细胞凋亡和调节细胞生长周期的作用。已有研究证实瘦素对缺氧的脑细胞^[4]和肺泡上皮细胞等具有保护作用, 但瘦素是否也有预防肝脏缺血再灌注损伤值得研究。本研究利用厌氧培养肝细胞复制肝脏缺血缺氧损伤模型, 观察不同浓度的瘦素作用后肝细胞功能的改变和氧化产物变化的影响, 为探讨瘦素预防肝脏缺血再灌注损伤可行性。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM 培养基(Gibco), 杭州四季青新生牛血清, 全自动酶标仪(Bio-Rad Mode 1680), 透射电镜(Hitachi H-600), 人瘦素(Sigma), MDA、SOD、ALT 和 AST 试剂盒(南京建成), 人肝细胞株 L02 为中山大学药理实验室提供。

1.2 细胞培养及处理

L02 细胞置于体积分数为 10% 的新生牛血清的 DMEM 培养液, 在 37 °C 体积分数为 5% 的 CO₂ 培养箱培养。取对数生长期细胞, 按细胞生长密度为 1×10^5 个/孔接种于 6 孔培养板中, 24 h 贴壁后分别分为正常对照组(C 组)和缺氧复氧组(IR 组)及缺氧复氧组 + 瘦素不同质量浓度组(分别为 100 μg/L、200 μg/L、400 μg/L、800 μg/L 和 1 600 μg/L)。后 6 组细胞置于厌氧培养罐中(体积分数 95% 的 N₂ 和 5% 的 CO₂) 37 °C 培养 12 h, 后取出细胞置于 CO₂ 细胞培养箱 12 h, 取细胞上清液作相关检测。

1.3 肝功能的检测

吸取上清液, 采用赖氏法检测 ALT 和 AST。

1.4 MDA 含量和 SOD 活性的测定

吸取细胞上清液, 采用硫代巴比妥酸反应法测定 MDA 含量, 采用黄嘌呤氧化物法测定 SOD 活性。

1.5 光镜下观察细胞形态学的改变

取单纯缺氧复氧组、缺氧复氧 + 瘦素 100 μg/L 组和缺氧复氧 + 瘦素 200 μg/L 组细胞于光镜下观察细胞形态学的改变。

1.6 细胞透射电镜观察

取正常对照组、缺氧 12 h 复氧组和缺氧 12 h 复氧 + 瘦素(100 μg/L)共 3 个组的细胞用固定液固定后, 送学校电镜室观察细胞凋亡的形态学改变。

1.7 统计学处理

各组实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析采用 SPSS 12.0 分析软件, 多组间重复测量采用方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 瘦素对厌氧培养的 L02 细胞肝功能的影响

与正常组相比, 细胞缺氧复氧后 ALT 和 AST 升高明显($P < 0.01$), 加用不同浓度瘦素组处理后细胞 ALT 和 AST 较单纯缺氧复氧组升高幅度下降($P < 0.01$)。不同浓度瘦素处理组组间 ALT 和 AST 浓度变化比较无明显差异($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 L02 肝细胞上清液浓度 ALT 和 AST 浓度的变化
Table 1 Change of ALT and AST content in culture

| Group | L02 cell liquid ($\bar{x} \pm s, n = 6$) | |
|-------------------|--|----------------------------|
| | ALT (nmol/mL) | AST (U/mL) |
| Control | 35.3 ± 3.7 | 42.41 ± 2.89 |
| IR | 65.6 ± 4.5 ¹⁾ | 93.32 ± 2.41 ¹⁾ |
| IR + Leptin 100 | 44.4 ± 3.9 ²⁾ | 66.52 ± 2.88 ²⁾ |
| IR + Leptin 200 | 45.4 ± 3.7 ²⁾ | 62.66 ± 3.37 ²⁾ |
| IR + Leptin 400 | 45.2 ± 3.2 ²⁾ | 61.69 ± 2.41 ²⁾ |
| IR + Leptin 800 | 43.2 ± 2.8 ²⁾ | 65.07 ± 3.37 ²⁾ |
| IR + Leptin 1 600 | 42.7 ± 3.6 ²⁾ | 68.44 ± 2.89 ²⁾ |

Leptin unit: μg/L; 1) Compared with control group, $P < 0.01$; 2) Compared with IR group, $P < 0.01$

2.2 SOD 活性的变化

单纯缺氧复氧组 SOD 活性明显低于正常对照组($P < 0.05$), 经不同浓度瘦素处理的缺氧复氧组细胞 SOD 明显高于单纯缺氧复氧组($P < 0.05$), 不同浓度瘦素处理组组间 MDA 浓度和 SOD 活性变化比较无明显差异($P > 0.05$, 表 2)。

2.3 MDA 浓度的变化

单纯缺氧复氧组 MDA 浓度明显高于正常对

表 2 L02 肝细胞上清液 MDA 浓度和 SOD 活性的变化
Table 2 Change of MDA content and SOD activity in culture L02 cell liquid ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

| Group | MDA content (nmol/mL) | SOD activity (U/mL) |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|
| Control | 23.5 ± 1.0 | 20.8 ± 3.2 |
| IR | 30.2 ± 2.4 ¹⁾ | 13.0 ± 1.8 ¹⁾ |
| IR + Leptin 100 | 22.4 ± 1.7 ²⁾ | 15.4 ± 2.2 ²⁾ |
| IR + Leptin 200 | 20.0 ± 3.5 ²⁾ | 15.3 ± 2.5 ²⁾ |
| IR + Leptin 400 | 19.4 ± 1.5 ²⁾ | 16.9 ± 1.9 ²⁾ |
| IR + Leptin 800 | 19.3 ± 2.5 ²⁾ | 17.1 ± 1.8 ²⁾ |
| IR + Leptin 1 600 | 19.0 ± 1.8 ²⁾ | 15.7 ± 2.1 ²⁾ |

Leptin unit: $\mu\text{g/L}$; Compared with control group 1) $P < 0.05$;
Compared with IR group 2) $P < 0.05$

对照组 ($P < 0.05$), 经不同浓度瘦素处理的缺氧复氧组细胞 MDA 浓度明显低于单纯缺氧复氧组 ($P <$

0.05, 表 2)。

2.4 光镜下细胞形态学的改变

单纯缺氧复氧组 (图 1B)、缺氧复氧 + 瘦素 100 $\mu\text{g/L}$ 组 (图 1C) 和缺氧复氧 + 瘦素 200 $\mu\text{g/L}$ 组 (图 1D) 3 组细胞经厌氧罐培养后细胞数目少于正常对照组 (图 1A), 部分细胞体变圆变小, 折光增强, 以图 1B 明显。分别经 100 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$ 的瘦素处理的图 1C 和图 1D 与图 1B 相比, 细胞数目有所增加, 细胞体变圆变小和折光增强的细胞较图 1B 减少。

2.5 电镜下病理学改变

正常对照组细胞: 处于正常生长状态, 核大染色均匀, 电镜下核仁清晰可见, 细胞质内细胞器丰富 (图 2A); 缺氧复氧 + 瘦素 (100 $\mu\text{g/L}$) 保护组细胞: 细胞轻度肿胀, 细胞膜有少许出泡现象, 细胞器基本正常, 属于早期可复性凋亡细胞 (图 2B);

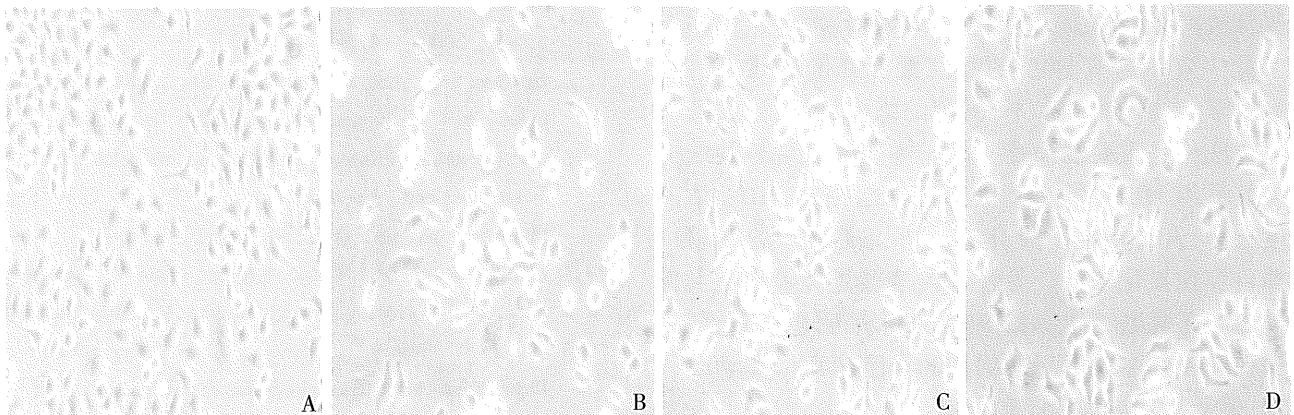


图 1 L02 细胞的光镜下形态

Fig.1 Morphology of L02 cells under microscope ($\times 100$)

A: control group; B: hypoxic group (IR); C: hypoxic group + Leptin (100 $\mu\text{g/L}$); D: hypoxic group + Leptin (200 $\mu\text{g/L}$). Fig. A: L02 cells grew very well; Fig. B: Some L02 cells changed to conglobated and apoptosis; Fig. C and Fig. D: L02 cells were less apoptosis than Group B

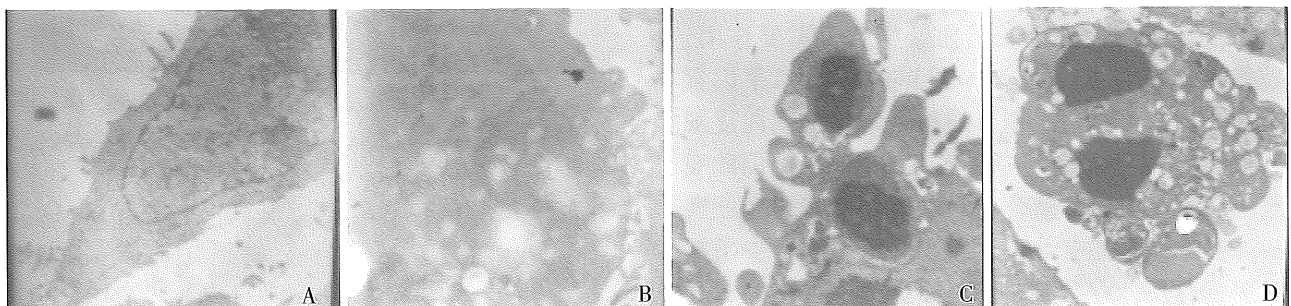


图 2 L02 细胞的超微结构观察

Fig.2 Pathology and ultrastructure of L02 cells

A: control group, $\times 8\ 900$; B: hypoxic group + Leptin (100 $\mu\text{g/L}$), $\times 8\ 900$; C and D: hypoxic group (IR), $\times 11\ 000$

单纯缺氧复氧未加瘦素保护组细胞:细胞体积缩小,细胞核浓缩边集,核仁消失,细胞质内细胞器退变,细胞膜上有出泡现象但连续性完整(图2D),有凋亡小体形成(图2C),呈现凋亡细胞特征。

3 讨论

肝脏缺血再灌注损伤(HIRI)是肝叶切除、肝移植、低血容量性休克等手术常见的病理生理过程,可导致炎症反应、肝功能异常和细胞凋亡等^[2-3, 5-6]。门静脉阻断是肝叶切除或肝移植手术加重肝细胞损害引起术后肝功能恢复不良的原因^[7]。HIRI发生机制复杂,其中氧化损伤是肝脏缺血/再灌注损伤的机制之一,主要是肝脏缺血再灌注损伤时,机体通过多种途径产生大量的氧自由基,自由基攻击肝细胞膜引发脂质过氧化反应产物MDA增加,同时内源性的抗氧化剂如SOD失活或减少。Chang等^[8]在肝脏缺血/再灌注损伤实验中应用含有SOD的血红素能降低ALT、AST和过氧化物产物的水平,肝脏的结构良好,证实氧化损伤是重要的治疗手段。本研究发现单纯缺氧复氧组L02细胞上清液与正常组相比,MDA浓度上升,SOD活性下降,证实了肝细胞缺氧复氧培养后存在氧化损伤。另外单纯缺氧复氧组细胞上清液与正常组相比,ALT和AST水平明显升高,细胞在光镜和电镜下呈现明显的细胞凋亡形态学改变,显示出功能和形态的异常。

在抑制肝脏缺血再灌注损伤引起的细胞凋亡的众多研究中,已证实蛋白水解酶抑制剂、抗氧化剂、NO、CO、HO-1和抗凋亡基因治疗等取得了一定的成效^[9-13]。瘦素是一种多靶器官、功能广泛的蛋白激素,具有多种生理功能,包括抑制摄食、增加能量消耗外^[14],还具有调节生长发育、炎症和免疫功能^[15];促进上皮细胞、血管生长等重要作用。现有研究表明,瘦素是调节机体内ROS水平因素之一。瘦素可以通过调节单核巨噬细胞或内皮细胞分泌ROS,激发传导通路产生作用^[16-18]。因此瘦素被认为具有调节氧化应激功能。已有研究证实Leptin在急性炎症反应时造成的组织损伤中发挥重要的作用,并能减轻肠缺血再灌注损伤大鼠肝脏功能的影响^[19-20]。本研究通过不同浓度组的瘦素处理后ALT、AST改善明显,SOD活性上升,MDA浓度下降,细胞凋亡减轻,证实了瘦素能减

轻肝细胞缺氧复氧的氧化损伤和保护肝功能。经瘦素处理后细胞与单纯缺氧复氧培养细胞相比,细胞损伤有改善,光镜下细胞变圆数目减少;透射电镜下细胞轻度肿胀,细胞凋亡减轻,提示瘦素还具有一定的拮抗肝细胞细胞凋亡的作用。

综上所述,瘦素对缺氧复氧L02肝细胞肝功能有保护作用,可能与增加缺氧后肝细胞SOD活性和减少MDA含量有关,从而减少氧自由基的产生和增加氧自由基的清除;另外瘦素对减轻肝细胞的凋亡也有作用,其机制值得进一步研究。

参考文献:

- [1] 赖东明,刘璐,李文滨,等. siRNA对小鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2004,25(4):322-325.
- [2] Qian Y, Liu Z, Geng X. Lack of protection of ischaemic preconditioning in the rat model of major hepatectomy with ischaemia reperfusion injury [J]. Asia J Surg, 2008,31(7):140-147.
- [3] Urakami H, Abe Y, Grisham MB. Role of reactive metabolites of oxygen and nitrogen in partial liver transplantation: lessons learned from reduced-size live ischaemia and reperfusion injury [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007,34(9):912-919.
- [4] Zhang, Feng MD, Wang, Suping, Signore, Armando P, et al. Neuroprotective effects of leptin Against Ischemia injury induced by Oxygen-Glucose Deprivation and Transient Cerebral ischemia [J]. Stroke, 2007,38(8):2329-2336.
- [5] Lan AK, Luk HN, Goto S, et al. Stress response to hepatectomy in patients with a healthy or a diseased liver [J]. World J Surg, 2003,27(7):761-764.
- [6] Marcos A, Fisher RA, Ham JM, et al. Liver regeneration and function in donor and recipient after right lobe adult living donor liver transplantation [J]. Transplantation, 2000,69(7):1375-1379.
- [7] Jiang H, Meng F, Li J, et al. Anti-apoptosis effects of oxymatrine protect the liver from warm ischemia reperfusion injury in rats [J]. World J Surg, 2005,29(11):1397-1401.
- [8] Chang EJ, Lee SH, Mun KC, et al. Effect of artificial cells on hepatic function after ischemia reperfusion injury in liver [J]. Transplant Proc, 2004,36(7):1959-1961.
- [9] Tsung A, Kaizu T, Malcao A, et al. Ethyl pyruvate ameliorates liver ischemia-reperfusion injury by

- decreasing hepatic necrosis and apoptosis [J]. *Transplantation*, 2005, 79(2):196-204.
- [10] Kaizu T, Nakao A, Tsung A, et al. Carbon monoxide inhalation ameliorates cold ischemia/reperfusion injury after rat liver transplantation [J]. *Surgery*, 2005, 138(2):229-239.
- [11] Sass G, Soares MC, Yamashita K, et al. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice [J]. *Hepatology*, 2003, 38(4):909-918.
- [12] Kienle K, Rentsch M, Müller T, et al. Expression of BCL-2 in liver grafts after adenoviral transfer improves survival following prolonged ischemia and reperfusion in rat liver transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2005, 37:439-441.
- [13] Contreras JL, Vilatoba M, Eckstein C, et al. Caspase-8 and caspase-3 small interfering RNA decrease ischemia/reperfusion injury to the liver in mice [J]. *Surgery*, 2004, 136(2):390-400.
- [14] 吴华,修玲玲,隋 籛,等.瘦素基因 Codn25(CAA/CAG)和 G-2548A 变异与肥胖症易感性的关系 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2005, 26(03):300-303.
- [15] 陈壮桂,李 鸣,纪经智,等.吸入糖皮质激素对哮喘患儿血清瘦素、IL-4 及 IFN- γ 的影响 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2008, 29(02):240-F3.
- [16] Sánchez-Pozo C, Rodríguez-Baño J, Domínguez-Castellano A, et al. Leptin stimulates the oxidative burst in control monocytes but attenuates the oxidative burst in monocytes from HIV-infected patients [J]. *Clin Exp Immunol*, 2003, 134(3):464-469.
- [17] Maingrette F, Renier G. Leptin increases lipoprotein lipase secretion by macrophages: involvement of oxidative stress and protein kinase C [J]. *Diabetes*, 2003, 52(8):2121-2128.
- [18] Bouloumie A, Marumo T, Lafontan M, et al. Leptin induces oxidative stress in human endothelial cells [J]. *FASEB J*, 1999, 13(10):1231-1238.
- [19] Shi Y, Yan GT, Lin J, et al. Intestinal ischemia-reperfusion injury made leptin decreased [J]. *Regul Pept*, 2006, 133(1-3):27-31.
- [20] 王晓辉,王录焕,邓子辉,等.瘦素对肠缺血/再灌注损伤大鼠肝脏功能的影响及其机制 [J]. *感染 炎症 修复*, 2007, 8(3):137-139.

(编辑 徐 杰)

(上接第 500 页 from page 500)

种传染性很强的急性传染病,容易导致群集发病,易感人群为青少年。临床表现以阵发性咳嗽、咳白色稀薄痰、发热、咽痛、咽部充血及扁桃体肿大为主要表现,大部分病例的白细胞总数正常或降低,约一半患者嗜酸性粒细胞下降,多伴有低钾血症。该病有自限性,预后良好,二级防护可有效预防该病的传染。

参考文献:

- [1] 中国疾病预防控制中心. 甲型 H1N1 流感诊疗方案 (2009 年试行版第一版) [EB/OL]. (2009-05-10) [2009-07-05]. <http://www.chinacdc.net.cn/n272442/n272530/n273736/n273781/n4624704/n4661330/appendix/fkjszn.pdf>
- [2] Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans [J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(25):2605-2615.
- [3] Carrat F, Vergu E, Ferguson NM, et al. Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies [J]. *Am J Epidemiol*, 2008, 167(7):775-785.
- [4] Human infection with new influenza A (H1N1) virus: Mexico, update, March-May 2009 [J]. *Wkly Epidemiol Rec*. 2009, 84(23):213-219.
- [5] CDC. Swine-origin influenza A (H1N1) virus infections in a school—New York City, April 2009 [J]. *MMWR*, 2009, 58(17):470-472.
- [6] Bean B, Moore B, Sterner B, et al. Survival of influenza viruses on environmental surfaces [J]. *J Infect Dis*, 1982, 146(1):47-51.
- [7] Boone SA, Gerba CP. The occurrence of influenza A virus on household and day care center fomites [J]. *J Infect*, 2005, 51(2):103-109.
- [8] Carr MJ, Gunson R, Maclean A, et al. Development of a real-time RT-PCR for the detection of Swine-lineage Influenza A (H1N1) virus infections [J]. *J Clin Virol*, 2009, 45(3):196-199.
- [9] 中国疾病预防控制中心. 甲型 H1N1 流感医院感染控制指南 [EB/OL]. (2009-05-15) [2009-07-05]. <http://www.chinacdc.net.cn/n272442/n272530/n273736/n273781/n4624704/n4661330/appendix/fkjszn.pdf>

(编辑 孙慧兰)