

硫化氢及一氧化氮在非酒精性脂肪性肝病患者血浆中的变化

郑艳丽^{1,2}, 谢杏榕¹, 谭华炳¹, 李金科¹, 李芳¹, 雷飞飞¹ (1. 湖北医药学院附属人民医院 感染性疾病科, 十堰市 442000; 2. 湖北房县中医院, 十堰市 442100)

摘要: 目的 探讨硫化氢(H₂S)、一氧化氮(NO)在非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)发病中的作用。方法 45例确诊的NAFLD患者, 根据脂肪肝程度分为轻度组(A组)、中度组(B组)、重度组(C组)。选择20例同期健康体检正常者为对照组(D组)。全部标本同步检测血甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)、NO及H₂S水平。结果 A、B、C组H₂S水平分别为(22.78 ± 3.23) μmol/L、(17.98 ± 2.67) μmol/L、(12.57 ± 2.12) μmol/L, 与D组(29.13 ± 4.47) μmol/L相比均显著下降, 差异有统计学意义(A组与D组比较, $P < 0.05$; B、C组与D组比较, $P < 0.01$)。C组H₂S水平低于B组, B组H₂S水平低于A组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。A、B、C组血NO水平分别为(42.45 ± 6.12) μmol/L、(54.77 ± 5.99) μmol/L、(69.23 ± 6.33) μmol/L, 与D组(29.23 ± 3.97) μmol/L相比均显著上升, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。C组NO水平高于B组, B组NO水平高于A组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。A、B、C组TG水平分别为(2.45 ± 0.94) mmol/L、(2.99 ± 0.89) mmol/L、(3.87 ± 1.13) mmol/L, 与D组(1.63 ± 0.24) mmol/L相比均显著上升, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。C组TG水平高于B组, B组TG水平高于A组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。A、B、C组TC水平分别为(9.99 ± 1.46) mmol/L、(10.13 ± 1.99) mmol/L、(10.24 ± 2.21) mmol/L, 与D组(5.44 ± 0.78) mmol/L相比均显著上升, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。A、B、C组间TC水平比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 H₂S、NO与NAFLD的发生、发展相关, 非酒精性脂肪性肝病程度与TG密切相关。

关键词: 脂肪肝, 酒精性; 硫化氢; 一氧化氮; 血浆; 甘油三酯类

Changes on hydrogen sulfide and nitric oxide in plasma of patients with NAFLD

ZHENG Yan-li^{1,2}, XIE Xing-rong¹, TAN Hua-bing¹, LI Jin-ke¹, LI Fang¹, LEI Fei-fei¹ (1. Department of Infectious Diseases, Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan City 442000, China; 2. Fang County TCM Hospital, Shiyan City 442100, China)

Abstract: Objective To explore the effect of hydrogen sulfide (H₂S) and nitric oxide (NO) in the morbidity of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Methods** Total of 45 patients with NAFLD were divided into group A (mild group), group B (moderate group) and group C (severe group). Group D (20 cases) were normal healthy person in the same period. Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), NO and H₂S were detected. **Results** H₂S levels in group A, B and C were (22.78 ± 3.23) μmol/L, (17.98 ± 2.67) μmol/L and (12.57 ± 2.12) μmol/L, respectively, which were significantly lower than group D (29.13 ± 4.47) μmol/L both with significant differences ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The differences were significant between group A, B and C ($P < 0.05$). NO levels in group A, B and C were (42.45 ± 6.12) μmol/L, (54.77 ± 5.99) μmol/L and (69.23 ± 6.33) μmol/L, respectively, which were significantly higher than group D (29.23 ± 3.97) μmol/L both with significant differences ($P < 0.01$). There were significant differences between group A, group B and group C ($P < 0.05$). TG levels in group A, B and C were (2.45 ± 0.94) mmol/L, (2.99 ± 0.89) mmol/L and (3.87 ± 1.13) mmol/L, respectively, which were higher compared with group D (1.63 ± 0.24) mmol/L with significant differences ($P < 0.01$). The differences were significant between group A, B and C ($P < 0.05$). TC levels in

group A, B and C were (9.99 ± 1.46) mmol/L, (10.13 ± 1.99) mmol/L and (10.24 ± 2.21) mmol/L, respectively, which were higher than group D (5.44 ± 0.78) mmol/L. The differences were statistically significant ($P < 0.01$). There was no difference between group A, B and C ($P > 0.05$). **Conclusions** H_2S and NO were related to the occurrence and development of NAFLD.

Key words: Fatty liver; alcoholic; Hydrogen sulfide; Nitric oxide; Plasma; Triglycerides

硫化氢(hydrogen sulfide, H_2S)具有与一氧化氮(nitric oxide, NO)相似的生物学特征,通过多种机理参与肝硬化形成的病理生理过程^[1]。 H_2S 、NO与非酒精性脂肪肝(nonalcohol fatty liver disease, NAFLD)的关系尚未明确。研究发现,NAFLD兔的脂肪肝程度与肝组织 H_2S 浓度呈负相关,可通过NAFLD程度负向推测肝组织 H_2S 浓度^[2]。NAFLD兔的血浆 H_2S 浓度下降,与NAFLD程度相关;NO、 H_2S 参与NAFLD的发生、发展,通过干预NO、 H_2S 防治NAFLD可能是未来研究方向^[3]。本研究通过观察 H_2S 、NO在NAFLD患者血浆中的变化,进一步探讨 H_2S 、NO在NAFLD发病中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 实验组 选择经体检确诊为NAFLD患者45例,年龄40~55岁,平均年龄 47.3 ± 7.8 岁,其中男性31例,女性14例。通过病史、体检、肝脏血液检测(血脂、血糖、血尿酸、肝功能、肝纤维化指标、肝脏自身免疫抗体、甲胎蛋白),肝炎病毒(甲、乙、丙、丁、戊型)检测、肝脏彩色多普勒超声,排除服用糖皮质激素、抗癫痫药、噻嗪类利尿药物史,排除糖尿病、病毒性肝炎、自身免疫性肝病、药物性肝炎、肝硬化等疾病。根据彩色多普勒超声结果,分为A组(轻度组)15例、B组(中度组)15例和C组(重度组)15例。

1.1.2 对照组(D组) 选择本院同期进行体检的20例健康人为对照组,无血脂、血糖、肝功能异常,肝脏病原学检测呈阴性,无心、肝、肾、肺及神经病史。

1.1.3 医学伦理 科研项目获得湖北医药学院附属人民医院伦理委员会同意,受检者自愿检测血浆 H_2S 水平,自愿检测有关血液生化指标,自愿检测各种肝炎病毒表面标志物。

1.2 实验试剂和仪器 常规检验设备、试剂为湖

北医药学院临床医学研究所,湖北医药学院附属人民医院检验科、核医学科、超声科常规设备试剂。NO检测试剂购自南京建成科技有限公司。 H_2S 检测设备、试剂为北京大学生理学系相关设备及试剂进行检测。

1.3 标本采集与检测

1.3.1 样本采集 各组均取空腹肘静脉血10 ml,离心提取血浆,置于一70℃的冰柜中待检。

1.3.2 血脂及NO检测 按照说明书检测血浆甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC),采用硝酸还原法检测血浆NO水平。

1.3.3 血浆 H_2S 检测 采用去蛋白法^[4],首先在试管中加入1%醋酸锌0.5 ml,加入0.1ml血浆标本,振荡混匀,使血浆中的硫离子与醋酸锌充分反应形成硫化锌沉淀。再依次加入20 mmol/L对苯二胺盐酸盐0.5 ml和30 mmol/L三氯化铁0.5 ml,室温孵育20分钟使之充分显色。再加入10% (体积分数)三氯醋酸1ml使蛋白沉淀下来,加入2.5 ml蒸馏水补足体积至5 ml,6000 r/min离心5分钟,吸出上清液,用分光光度计在波长670 nm处检测上清液的吸光度,根据 H_2S 标准曲线计算上清液 H_2S 的含量。

1.4 统计学处理 所有数据采用SPSS 9.0统计学软件处理,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,治疗前后组内及组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 H_2S 水平比较 与D组相比,A、B、C组 H_2S 水平均显著下降,差异有统计学意义(A组与D组比较, $P < 0.05$;B、C组与D组比较, $P < 0.01$ 。C组 H_2S 水平低于B组,B组 H_2S 水平低于A组,差异有统计学意义, $P < 0.05$,见表1。

2.2 各组NO变化情况 与D组相比,A、B、C组NO水平均显著上升,差异有统计学意义, $P < 0.01$ 。C组NO水平高于B组,B组NO水平高于A组,差异均有统计学意义, $P < 0.05$,见表1。

2.3 各组TG、TC水平比较 与D组相比, A、B、C组TG水平均显著上升, 差异有统计学意义, $P < 0.01$ 。C组TG水平高于B组, B组TG水平高于A组, 差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。与D组相比, A、B、C组TC水平均显著上升, 差异有统计学意义, $P < 0.01$ 。A、B、C组间比较, TC水平差异无统计学意义, $P > 0.05$, 见表1。

3 讨论

NAFLD是指以肝实质细胞脂肪变性为病理特征, 无过量饮酒史, 并除外其他肝病的临床综合征, 其病理类型包括单纯性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)及NASH相关肝硬化, 且后者可发展为肝癌^[5-7]。NAFLD是发达国家和地区的第一大肝病, 在我国是慢性肝病的第二大病因。NAFLD发病机理及干预研究一直是国内外研究的热点。

气体信号分子H₂S、NO参与病毒性肝病的发生、发展, H₂S、NO参与许多内分泌代谢病的发生、发展。NAFLD既是代谢性疾病, 又是肝脏疾病, 据此笔者推测H₂S、NO可能参与NAFLD的发生、发展。

本课题组发现NAFLD随脂肪肝程度的加重, 肝组织H₂S下降、NO浓度上升^[2,3], 与肝硬化动物及人类肝组织变化相似, 随肝硬化程度加重, 兔肝组织H₂S浓度下降, NO浓度上升^[8-10], 基于以上因素, 课题组开展了本研究。

研究发现与对照组相比, NAFLD轻度组、中度组、重度组血浆H₂S下降, 随脂肪肝程度加重, 逐渐下降; NAFLD轻度组、中度组、重度组血浆NO浓度上升, 随脂肪肝程度加重, 逐渐上升。肝功能、血脂与H₂S、NO浓度变化不密切。说明NAFLD程度是血浆H₂S浓度影响的主要因素。

内源性H₂S是体内含硫氨基酸如蛋氨酸、半胱氨酸、同型半胱氨酸等在5'-磷酸吡哆醛依赖酶[包括胱硫醚-β-合酶(cystathionine-β-synthase, CBS)、胱硫醚-γ-裂解酶(cystathioninase, CSE)]作用下产生的代谢产物^[11]。肝脏是体内H₂S生成的主要部位, 对维持循环血液中H₂S的浓度起到重要作用, 而H₂S在调节正常及肝硬化的微循环中的作用也已被证实; 肝内主要由肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)、肝细胞产生内源性H₂S, 但肝硬化时激活的HSC降低了CSE的表达和活性, 减少H₂S的合成^[12]。NAFLD具有与病毒性肝病相同的由脂肪性肝炎向肝硬化发展的过程, 在NAFLD发展过程中亦会发生激活的HSC降低了CSE的表达和活性, 减少H₂S的合成。另一方面, NAFLD肝血管重构使肝组织缺血缺氧, 内源性H₂S作为气体信号分子首先被消耗, 从而导致肝组织H₂S水平下降, 且与脂肪肝程度呈反比。H₂S浓度的下降又加重肝脏微循环障碍, 形成恶性循环。

NO在一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)的作用下形成, 主要在肝实质细胞和Kupffer细胞中产生。NOS依据是否需要钙元素分为结构型一氧化氮合酶(cNOS, 又分为内皮型和神经型)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)^[13]。内皮型一氧化氮合酶形成的NO对肝脏有益作用, 而iNOS合成的NO对肝脏有毒性作用^[14-16]。在血管主要是内皮细胞分泌NO。NO过低, 导致机体生理功能紊乱, 过高则作为一种自由基对机体产生毒害^[17]。高脂喂养脂肪肝大鼠肝脏中iNOS活性增强, 以及诱导生成的NO水平也增高, iNOS、NO在脂肪肝肝损害中发挥重要作用^[18]。本研究显示随NAFLD加重NO浓度上升, 提示存在iNOS诱导

表 1 A、B、C、D组H₂S、NO、TG、TC水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

	H ₂ S (μmol/L)	NO (μmol/L)	TG (mmol/L)	TC (mmol/L)
A组 (n = 15)	22.78 ± 3.23 ^{ac}	42.45 ± 6.12 ^{bc}	2.45 ± 0.94 ^{bc}	9.99 ± 1.46 ^b
B组 (n = 15)	17.98 ± 2.67 ^{bd}	54.77 ± 5.99 ^{bd}	2.99 ± 0.89 ^{bd}	10.13 ± 1.99 ^b
C组 (n = 15)	12.57 ± 2.12 ^b	69.23 ± 6.33 ^b	3.87 ± 1.13 ^b	10.24 ± 2.21 ^b
D组 (n = 20)	29.13 ± 4.47	29.23 ± 3.97	1.63 ± 0.24	5.44 ± 0.78

注: 与D组比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与B组比较, ^c $P < 0.05$; 与C组比较, ^d $P < 0.05$

的NO浓度上升。

NO和CO在肝硬化大鼠中对H₂S/CSE体系表现为抑制作用,使机体可以在病理状态下达到一种新的平衡,避免气体信号分子之间呈现同向变化,是机体的一种自我保护调节机制^[19]。本研究发现NO浓度的升高也是导致H₂S/CSE抑制,并导致H₂S浓度下降的原因之一。

本研究结果显示,NAFLD脂肪肝程度与TG浓度关系密切,且与TC无密切关系,进一步说明高TG血症是NAFLD形成的主要原因。

本研究存在的问题,一是由于多种原因导致标本量较小,二是未进行肝脏病理学检测,使人体CSE、iNOS关系仅限于推理。但研究证实气体信号分子H₂S、NO参与人体NAFLD的发生、发展,对明确NAFLD的病因、病理生理学变化具有重要意义。在调整血脂代谢、改善生活方式的基础上,调整HSC、肝细胞CSE表达,和(或)提供外源性H₂S,或使用NO抑制剂,可能是未来NAFLD防治研究的方向。

参考文献

- [1] 谭华炳, 李金科. 气体信号分子硫化氢与肝硬化关系研究进展[J]. 西南国防医药, 2011, 21: 109-110.
- [2] 谭华炳, 朱德文, 谢杏榕, 等. 非酒精性脂肪性肝病兔脂肪肝程度与肝组织硫化氢浓度的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32: 2440-2443.
- [3] 谭华炳, 王一平, 许丽, 等. 非酒精性脂肪性肝病兔肝组织硫化氢与一氧化氮的关系[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21: 42-46.
- [4] Zhang C, Du J, Bu D, et al. The regulatory effect of hydrogen sulfide on hypoxic pulmonary hypertension in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 302: 810-816.
- [5] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝病杂志, 2006, 14: 161-163.
- [6] Farrell GC, Chitturi S, Lau GK, et al. Guidelines for the assessment and management of nonalcoholic fatty liver disease in the Asia-Pacific region: executive summary[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 22: 775-777.
- [7] American Gastroenterological Association. American Gastroenterological Association medical position statement: nonalcoholic fatty liver disease[J]. Gastroenterology, 2002, 123: 1702-1704.
- [8] 张宁, 郑勇, 王于理, 等. 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: 307-311.
- [9] 张艳, 张伟. 气体信号分子硫化氢在肝硬化患者中的表达和意义[J]. 河北医学, 2009, 15: 649-651.
- [10] 张永健, 邓勇, 樊海宁, 等. 肝硬化患者血清硫化氢、一氧化氮含量的变化[J]. 基础医学与临床, 2008, 28: 499-500.
- [11] Truong DH, Mihajlovic A, Gunness P, et al. Prevention of hydrogen sulfide (H₂S)-induced mouse lethality and cytotoxicity by hydroxocobalamin (vitamin B₁₂ (12a)) [J]. Toxicology, 2007, 242: 16-22.
- [12] Fiorucci S, Antonelli E, Mencarelli A, et al. The third gas: H₂S regulates perfusion pressure in both the isolated and perfused normal rat liver and in cirrhosis[J]. Hepatology, 2005, 42: 539-548.
- [13] Bhimani EK, Serracino-Inglott F, Sarela AI, et al. Hepatic and mesenteric nitric oxide synthase expression in a rat model of CCl₄ (4)-induced cirrhosis[J]. J Surg Res, 2003, 113: 172-178.
- [14] Koeppl TA, Mihaljevic N, Kraenzlin B, et al. Enhanced iNOS gene expression in the steatotic rat liver after normothermic ischemia[J]. Eur Surg Res, 2007, 39: 303-311.
- [15] García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuan T, et al. Uric acid and anti-TNF antibody improve mitochondrial dysfunction in ob/ob mice[J]. Hepatology, 2006, 44: 581-591.
- [16] Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, Nieto N. Binge ethanol exposure increases liver injury in obese rats[J]. Gastroenterology, 2003, 125: 1818-1833.
- [17] Cary SP, Winger JA, Derbyshire ER, et al. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off [J]. Trends Biochem Sci, 2006, 31: 231-239.
- [18] 吕天英, 卢震亚. 非酒精性脂肪性肝病大鼠肝组织NO和iNOS的变化[J]. 浙江预防医学, 2009, 21: 9-11.
- [19] 宋丽秀, 郑勇, 陈卫刚, 等. 大鼠肝硬化形成中气体信号分子一氧化氮、一氧化碳对硫化氢/胱硫醚-γ-裂解酶体系的影响[J]. 现代生物医学进展, 2010, 10: 1213-1216.

收稿日期: 2011-09-14