

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01433

青藤碱对大鼠原位肝移植缺血再灌注损伤的保护作用

林峰¹, 慕宁¹, 王海梁¹, 傅宏¹, 王正昕¹, 王全兴², 丁国善¹, 傅志仁^{1*}

1. 第二军医大学长征医院全军器官移植研究所, 上海 200003

2. 第二军医大学基础部免疫学教研室, 免疫学研究所, 上海 200433

[摘要] **目的:**探讨青藤碱对大鼠原位肝移植缺血再灌注损伤的保护作用。**方法:**采用 Kamada's“二袖套法”建立 SD→SD 大鼠原位肝移植模型,随机分为假手术组、对照组、低剂量(40 mg/kg)和高剂量(80 mg/kg)青藤碱组,分别观察移植术后1周存活率,检测术后2、6、12、24 h 血清 ALT, TUNEL 法检测肝细胞凋亡指数(AI), RT-PCR 检测肝脏组织中的 TNF- α 、IL-1 β mRNA 的含量,并观察移植肝脏病理学改变。**结果:**与对照组比较,青藤碱低剂量、高剂量组术后1周存活率显著提高(75%、75% vs 12.5%, $P < 0.01$);在各个时间点,青藤碱治疗组的 ALT 水平明显低于对照组($P < 0.01$),肝组织中的 TNF- α 、IL-1 β mRNA 表达与对照组相比均显著降低($P < 0.01$),肝脏病理学形态也明显改善。**结论:**青藤碱可以通过抑制 TNF- α 、IL-1 β 等炎症性细胞因子合成,抑制肝细胞凋亡,减轻肝细胞及肝窦内皮细胞的损伤,达到保护肝移植缺血再灌注损伤的效果。

[关键词] 原位肝移植;青藤碱;大鼠;缺血再灌注损伤;细胞凋亡;细胞因子

[中图分类号] R 692 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1433-05

Protective effect of sinomenine on ischemia-reperfusion injury during orthotopic liver transplantation in rats

LIN Feng¹, MU Ning¹, WANG Hai-liang¹, FU Hong¹, WANG Zhen-xin¹, WANG Quan-xing², DING Guo-shan¹, FU Zhi-ren^{1*}

1. Organ Transplantation Institute of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Immunity Research Institute, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the protective effect of sinomenine on the cold ischemia/reperfusion injury during orthotopic liver transplantation (OLT) in rats. **Methods:** OLT were performed in normal rats using Kamada's two-cuff technique. The rats were randomly divided into sham operation, control and two sinomenine groups. Animals in sinomenine groups were treated with low (40 mg/kg) or high dose (80 mg/kg) of sinomenine. The serum and tissue samples of rats in each group were collected 2, 6, 12, and 24 h after reperfusion, and the one-week survival rate was observed. The apoptosis index (AI) of liver cells after OLT was detected by TUNEL. The expression of TNF- α and IL-1 β mRNA in the liver were detected by RT-PCR. **Results:** Compared with the control group, the level of ALT was significantly decreased in the two sinomenine treatment groups at different time points after transplantation, and their one-week survival rates were also significantly increased (75%, 75% vs 12.5%, $P < 0.01$). Compared with the control group, the AI of liver cells was markedly decreased in sinomenine treatment groups ($P < 0.01$). Sinomenine treatment also significantly decreased the expression of TNF- α and IL-1 β mRNA ($P < 0.01$) and greatly ameliorated the focal necrosis of hepatocytes and sinusoidal endothelial cells (SECs). **Conclusion:** Sinomenine can inhibit hepatocyte apoptosis by inhibiting the synthesis of TNF- α and IL-1 β . sinomenine can prevent hepatic cells and SECs from cold ischemia/reperfusion injury during orthotopic liver transplantation in rats.

[KEY WORDS] orthotopic liver transplantation; sinomenine; rats; ischemia and reperfusion injury; apoptosis; cytokines

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1433-1437]

缺血再灌注引起的肝脏损伤是在肝脏短暂缺氧并再氧合时触发,是一个连续不断的过程,并最终导致肝细胞损伤^[1]。缺血再灌注损伤是肝移植过程中不可避免的、多因素参与的复杂病理生理过程。如何减少缺血再灌注损伤,提高边缘性供肝的利用率

一直是肝移植领域的研究焦点。然而,到目前为止仍没有可以预防缺血再灌注损伤的有效方法。研究^[2]表明,肝窦内皮细胞(EC)、Kupffer 细胞(KC)及中性粒细胞(PMN)在缺血再灌注损伤发病机制中起了重要作用。

[收稿日期] 2008-05-07 **[接受日期]** 2008-06-10

[作者简介] 林峰, 博士生. E-mail: linfeng0316@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-63610109-73303, E-mail: zhirenf@sh163.com

青藤碱(sinomenine, SN)是一种从来源广泛的中草药清风藤中提取的生物碱单体,具有抗炎、抗氧化、免疫抑制、保肝等作用,分子式为 $C_{19}H_{23}NO_4$,相对分子质量为329.38,具有抗炎、免疫抑制、镇痛等药理作用^[3]。本研究采用SD大鼠建立原位肝移植模型,探讨青藤碱是否具有减轻肝移植缺血再灌注损伤的作用,为临床缺血再灌注损伤的治疗提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物及大鼠原位肝移植模型制备 选用清洁级雄性10~12周SD大鼠(由第二军医大学实验动物中心提供),体质量220~250 g。动物于第二军医大学免疫学教研室动物实验室,按标准饮食,分笼饲养。采用Kamada's“二袖套”^[4]法建立肝移植模型。受体肝上下腔静脉重建采用缝合法,肝下下腔静脉、门静脉采用套管法,胆总管采用插管法,肝动脉不予重建。

1.2 主要试剂和实验仪器 RT-PCR试剂:TRIzol总RNA快速抽提试剂(Invitrogen),RNA PCR Kit (AMV) Ver 3.0 (TaKaRa);青藤碱盐酸盐粉剂(纯度99.3%)由湖南正清制药股份有限公司提供;TUNEL试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.3 动物分组 将196只SD大鼠随机分为4组,假手术组为28只,其余3组每组28对大鼠,具体分组如下。假手术组:进腹后进行肝移植受体肝脏游离,不作肝切除。青藤碱低剂量组:受体术前24 h和术前1 h经尾静脉给予青藤碱40 mg/kg。青藤碱高剂量组:同法给予青藤碱80 mg/kg。对照组同法给予生理盐水0.2 ml/只。供肝使用4℃乳酸林格液冷保存5 h。

1.4 标本获取 各组8只用于观察1周存活率,其余大鼠于再灌注后2、6、12、24 h各取5只麻醉后,经下腔静脉采血4 ml,离心后取上清-70℃低温冰箱保存。同时采集相应时间点的大鼠肝脏右叶中间部分,置于10%的中性甲醛溶液固定,部分组织保存于-70℃冰箱中。

1.5 观察指标

1.5.1 1周存活率 各组分别取8只大鼠观察1周存活率。

1.5.2 肝功能测定 采用直接活力测定法在BeckmanCX7全自动生化分析仪上,测定各组大鼠术后不同时相的血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)。

1.5.3 移植肝脏的病理学检查 将大鼠各时间点

采集的肝组织切成0.5 cm×0.5 cm,送病理科制成病理切片,作常规H-E染色检查。

1.5.4 TUNEL法检测肝细胞凋亡 切片常规脱蜡至水;微波修复抗原;3% H_2O_2 封闭内源性的过氧化物酶;滴加1:10的TdT标记缓冲液湿盒内37℃1 h(PBS代替TdT作阴性对照);DAB显色,室温3~5 min;苏木精复染室温8 min,依次脱水、透明、中性树胶封片。根据凋亡细胞的形态学特征,病理科医师光镜下单盲阅片,每张切片随机选择5~10高倍视野,用百分数表示凋亡指数(apoptosis index, AI)^[5]。AI=凋亡细胞数/1 000个细胞×100%。

1.5.5 RT-PCR检测肝脏组织中TNF- α 、IL-1 β mRNA的表达水平 按TRIzol试剂说明书进行RNA抽提。取0.5 μ g RNA产物,用RT-PCR试剂盒将其逆转录为cDNA,-70℃保存待用。以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照,TNF- α 、IL-1 β 和 β -actin引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。 β -actin引物:上游5'-AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3'下游5'-GCA GCT CAG TAA CAG TCC GC-3'(扩增产物501 bp);IL-1 β 引物:上游5'-TCA GGC AGG CAG TAT CAC-3',下游5'-TTA CAC AGG ACA GGT ATA GAT TC-3'(扩增产物390 bp);TNF- α 引物:上游5'-GTC GTA GCA AAC CAC CAA G-3',下游5'-TGA CTC CAA AGT AGA CCT G-3'(扩增产物404 bp)。PCR循环条件为:94℃2 min,50℃30 s,72℃1 min,35个循环,72℃延长10 min。退火温度: β -actin 50℃,TNF- α 51℃,IL-1 β 55℃。用1.5%琼脂糖凝胶电泳PCR产物,溴化乙啶染色,凝胶成像系统和图像分析系统观察并半定量计算PCR产物的相对表达量,结果以目的基因与 β -actin mRNA的灰度值比值表示。

1.6 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SSPS 10.0软件进行所有数据的统计学处理。各组1周存活率的比较用 χ^2 检验。其余用One-Way ANOVA分析。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 1周存活率 假手术组1周存活率为100%。对照组术后仅1只大鼠存活时间超过1周,其余动物在术后3 d左右死亡,1周存活率为12.5%,而两青藤碱组术后存活时间多在1周以上,两组的1周存活率均为75%,1周生存时间明显长于对照组($P<0.01$);低剂量青藤碱组与高剂量青藤碱组术后1周存活率比较无统计学差异(表1)。

表 1 各组大鼠肝移植术后 1 周存活率比较
Tab 1 One-week survival rates of rats after OLT

Group	Survival time t/d	Survival rates(%)
Sham operation	>7,>7,>7,>7,>7,>7,>7,>7	100.00**
Control	1,3,3,2,4,3,2,>7	12.50
SN 40 mg/kg	4,>7,>7,>7,>7,>7,5,>7	75.00**
SN 80 mg/kg	>7,>7,>7,>7,6,4,>7,>7	75.00**

** P<0.01 vs control group

2.2 肝移植术后外周血清 ALT 水平的改变 与假手术组比较,对照组和两青藤碱组的移植术后 ALT 水平在术后 2 h 即迅速升高,6 h ALT 水平达到高峰,随后逐渐下降,但对照组下降缓慢。青藤碱预处理后的 ALT 水平显著低于对照组(P<0.01)。低剂量组和高剂量组术后各个时间点 ALT 也有显著差异(P<0.05)。肝移植术后各组大鼠血清 ALT 水平见图 1。

2.3 肝脏组织病理学检查 假手术组的肝小叶结构完整,无肝细胞损伤表现(图2A)。对照组肝细胞

索状排列紊乱,肝细胞明显肿胀,空泡样变性较重,肝小叶中央静脉周围中性粒细胞浸润明显,出现点状或灶状肝细胞坏死区域,这种病理改变在术后 6 h 最明显(图 2B)。而青藤碱治疗后肝脏组织的肝小叶结构较为完整,肝细胞肿胀程度较轻微,散在中性粒细胞浸润,肝细胞坏死区域较少,各个对应时间点的病理变化较对照组明显减轻,低剂量组的肝脏形态学改变较高剂量更为明显(图 2C、2D)。

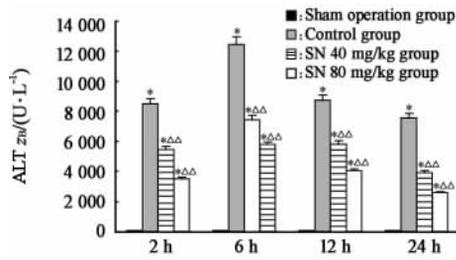


图 1 各组大鼠肝移植术后各时相的血清 ALT 水平改变
Fig 1 Serum ALT level of rats after OLT

* P<0.05 vs Sham operation group; △△ P<0.01 vs Control group. n=5, x±s

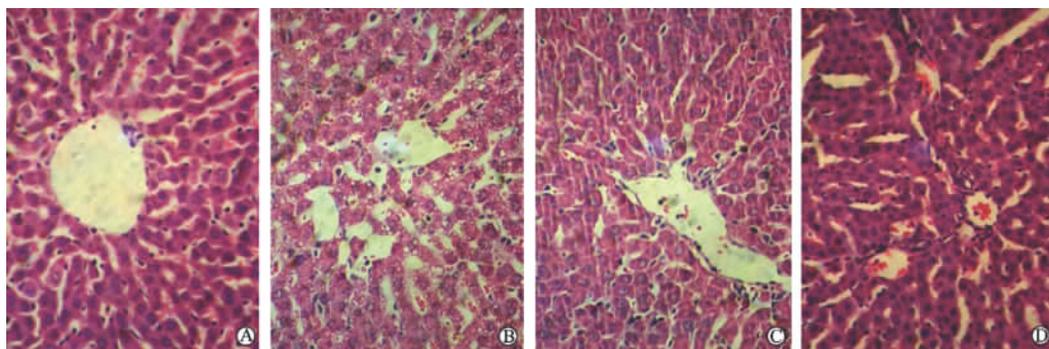


图 2 肝脏组织病理学检查
Fig 2 Pathology of liver

A: Sham operation group; B: Control group; C: SN40 mg/kg group; D: SN80 mg/kg group. Original magnification: ×400

2.4 TUNEL 检测肝脏细胞凋亡 各组在各个时间点的标本中,均有细胞凋亡的发生。与假手术组比较,对照组和两青藤碱组的 AI 值在术后随着时间延长,凋亡数增加。但是青藤碱预处理后的 AI 值显著低于对照组(P<0.01)。低剂量青藤碱组和高剂量组之间 AI 值在不同时间点也存在明显差异(图 3)。

2.5 RT-PCR 检测肝脏组织中 TNF-α、IL-1β mRNA 的表达水平

2.5.1 各组肝组织 TNF-α mRNA 表达水平 假手术组肝组织中 TNF-α mRNA 的表达水平极低,而对照组 TNF-α mRNA 的表达水平在再灌注后 6 h 达到高峰,12 h 后开始下降。青藤碱两治疗

组 TNF-α mRNA 的表达水平也在再灌注后 6 h 最高,但与对照组相比各个时间点的 TNF-α mRNA 表达量显著降低(P<0.01)。高剂量青藤碱组 TNF-α mRNA 表达水平低于低剂量治疗组(P<0.05,图 4)。

2.5.2 各组肝组织 IL-1β mRNA 表达水平 假手术组肝组织中的 IL-1β mRNA 呈平稳的低水平表达;各移植组 IL-1β mRNA 在移植术后 2 h 即达到最高,在随后的各个时间点呈逐渐下降趋势。两青藤碱处理组 IL-1β mRNA 的表达水平在各个时间点明显低于对照组(P<0.01);但青藤碱两治疗组之间比较无显著差异(图 5)。

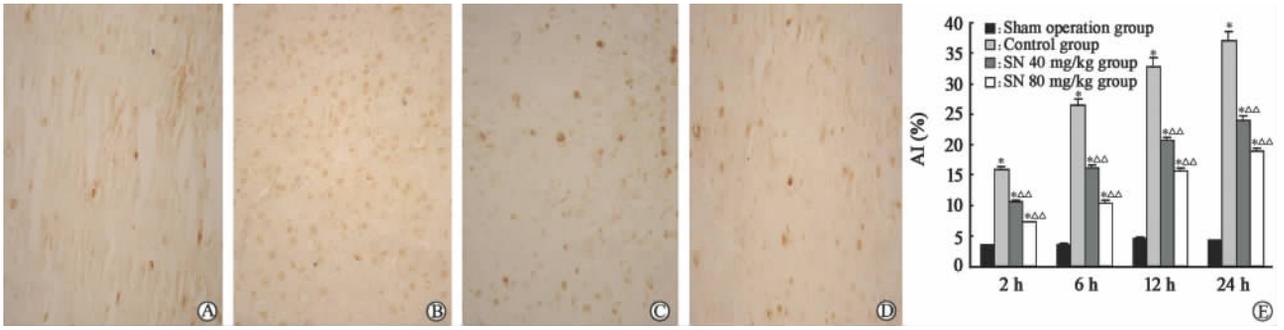


图3 TUNEL检测结果

Fig 3 TUNEL results

A: Sham operation group 24 h; B: Control group 24 h; C: SN 40 mg/kg group 24 h; D: SN 80 mg/kg group 24 h. Original magnification: $\times 200$. E: Apoptosis index(AI) of liver cells after OLT in rats. * $P < 0.05$ vs Sham operation group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Control group. $n = 5, \bar{x} \pm s$

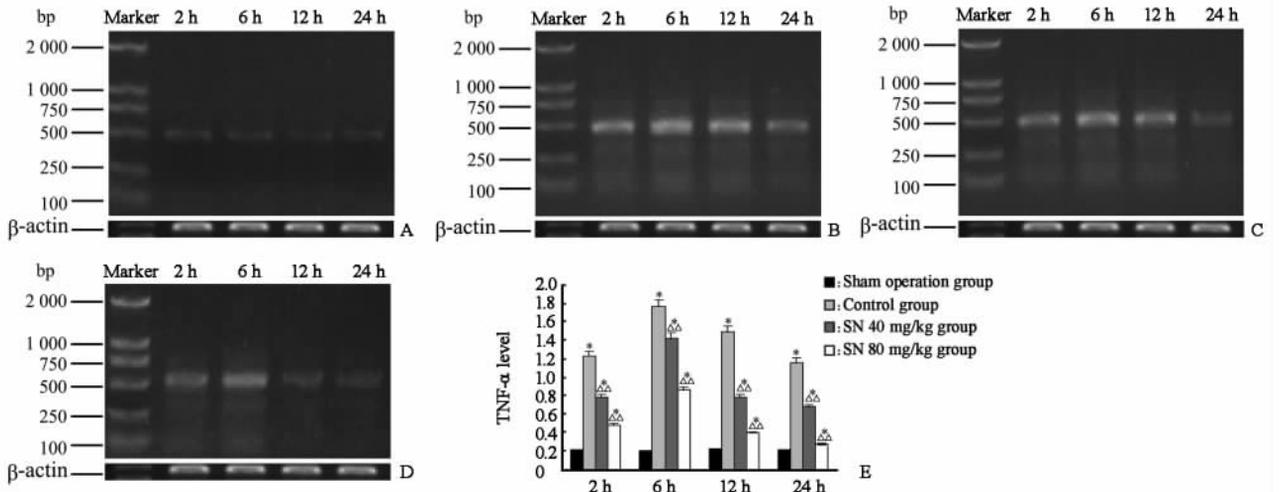


图4 术后各组不同时间点 TNF-α mRNA 表达

Fig 4 Expression of TNF-α mRNA at different time points after OLT in four groups

A: Sham operation group; B: Control group; C: SN 40 mg/kg group; D: SN 80 mg/kg group; E: Semi-quantitative results of TNF-α mRNA expression in four groups. * $P < 0.05$ vs Sham operation group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Control group. $n = 5, \bar{x} \pm s$

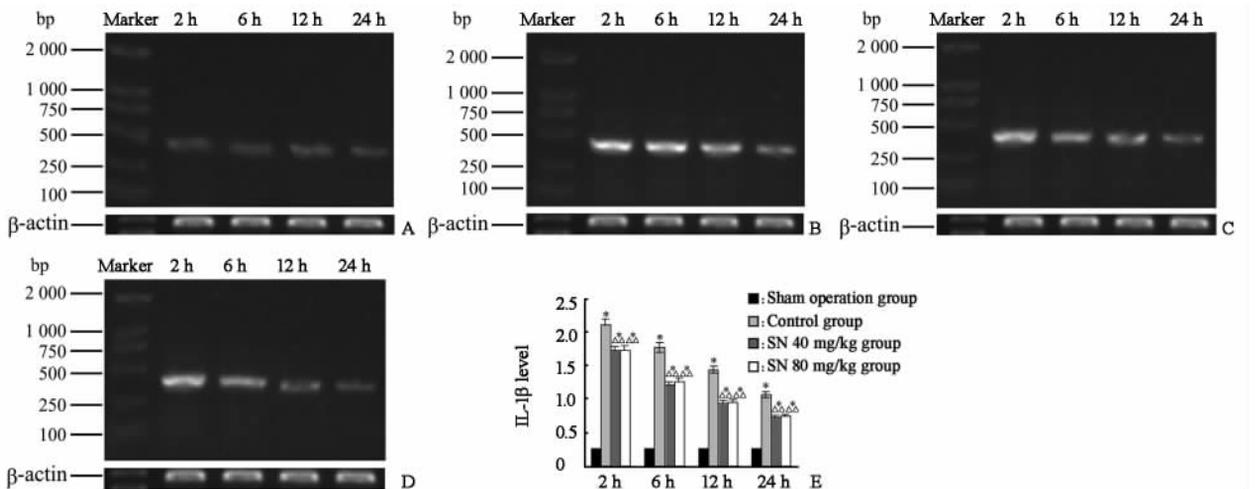


图5 术后各组不同时间点 IL-1β mRNA 的表达

Fig 5 Expression of IL-1β mRNA at different time points after OLT in four groups

A: Sham operation group; B: Control group; C: SN 40 mg/kg group; D: SN 80 mg/kg group; E: Semi-quantitative results of IL-1β mRNA expression in four groups. * $P < 0.05$ vs Sham operation group; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs Control group. $n = 5, \bar{x} \pm s$

3 讨 论

目前已有多种青藤碱制剂应用于临床治疗类风湿性关节炎等自身免疫性疾病,取得较好疗效,且副作用小^[6]。但青藤碱在肝移植缺血再灌注损伤中的作用在国内外的研究中未见报道,我们通过建立大鼠肝移植模型来研究青藤碱对缺血再灌注损伤的保护作用。文献^[7]报道大鼠肝脏在 4℃ 乳酸林格液中保存的安全时限为 2~4 h,为探讨青藤碱对供肝冷缺血再灌注损伤是否具有保护性作用,我们采用将供肝于移植术前置于 4℃ 乳酸林格液中保存 5 h。

肝脏缺血再灌注后 KC 被大量激活,释放一系列的致炎性损伤因子,导致肝窦内皮细胞损伤及肝功能受损,引起肝脏细胞凋亡^[8]。我们将青藤碱预用于冷保存前,观察青藤碱对大鼠肝移植术后 1 周存活率及肝细胞形态及功能改变的影响。实验结果表明,青藤碱对移植肝脏有明显的保护作用,显著提高了大鼠移植术后 1 周的存活率,并改善大鼠肝功能。对照组大鼠术后 1 周存活率为 12.5%,而两青藤碱治疗组大鼠术后 1 周存活率均达到 75%,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。对照组大鼠镜下检查发现肝细胞明显肿胀,胞质内脂肪及空泡样变性较重,肝小叶结构破坏严重,出现点状或灶状肝细胞坏死,符合移植术后原发性移植肝功能不全的表现。此外,与对照组相比,两青藤碱治疗组大鼠移植术后肝功能指标 ALT 在各个时间点上显著降低。

在肝脏缺血再灌注期间,KC 细胞活化后产生并释放 TNF- α 和 IL-1 β ^[9],TNF- α 和 IL-1 β 是肝脏缺血再灌注损伤过程中起着关键性作用的细胞因子。鉴于 TNF- α 在肝脏缺血再灌注损伤中的核心作用,阻断该介质能减轻肝脏的损伤。IL-1 主要是由白细胞合成分泌的一种炎症细胞因子,IL-1 β 是其主要分泌形式。IL-1 β 能够刺激 TNF- α 的产生^[10],亦能促进中性粒细胞产生氧自由基^[11]。TNF- α 和 IL-1 β 均能明显上调中性粒细胞黏附分子-1 和内皮细胞 ICAM-1 的表达,促使这些细胞在肝脏脉管系统内聚集^[12]。

在我们的实验研究中发现,对照组缺血再灌注后 TNF- α 和 IL-1 的分泌分别于术后 6、2 h 达到高峰,而经青藤碱预处理后,虽然 TNF- α 和 IL-1 β 的表达水平也在相同时间点达到高峰,但是上升幅度明显受到抑制。提示青藤碱通过抑制 KC 细胞和内皮细胞的活化,减少了 TNF- α 、IL-1 β 等细胞因子的分泌,减少了中性粒细胞与内皮细胞的黏附、游走和损伤性酶类、氧自由基的释放,使肝细胞凋亡减少,提

高术后存活率,改善了肝功能,达到保护缺血再灌注损伤的效果。在我们的实验中发现青藤碱对大鼠肝移植缺血再灌注损伤保护作用具有剂量依赖性,高剂量的青藤碱具有更好的效果,但是低剂量青藤碱的病理形态学改变较高剂量更加明显,提示剂量的增加对肝细胞和肝窦内皮细胞的保护作用并没有增强,可能随着剂量增加其对肝脏的毒副作用亦增加,这需要我们作进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] Centurion S A, Centurion L M, Souza M E, Gomes M C, Sankarankutty A K, Mente E D, et al. Effects of ischemic liver preconditioning on hepatic ischemia/reperfusion injury in the rat [J]. *Transplant Proc*, 2007, 39: 361-364.
- [2] Hirsch J, Hansen K C, Choi S, Noh J, Hirose R, Roberts J P, et al. Warm ischemia-induced alterations in oxidative and inflammatory proteins in hepatic Kupffer cells in rats [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5: 979-986.
- [3] Zeng Y, Gu B, Ji X, Ding X, Song C, Wu F. Sinomenine, an antirheumatic alkaloid, ameliorates clinical signs of disease in the Lewis rat model of acute experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30: 1438-1444.
- [4] Kamada N, Calne R Y. A surgical experience with five hundred and thirty liver transplantation in the rat [J]. *Surgery*, 1983, 93: 64-69.
- [5] Patel T. Apoptosis in hepatic pathophysiology [J]. *Clin Liver Dis*, 2000, 4: 295-317.
- [6] 叶仙蓉, 颜克序, 吴克美, 冯孝章, 黄宇明, 仇 萍. 青藤碱衍生物的合成及其抗炎镇痛活性 [J]. *药学学报*, 2004, 39: 180-182.
- [7] Sumimoto R, Jamieson N V, Wake K, Kamada N. 24-hour rat liver preservation using UW solution and some simplified variants [J]. *Transplantation*, 1989, 48: 1-5.
- [8] Malhi H, Gores G J, Lemasters J J. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths [J]? *Hepatology*, 2006, 43: S31-S44.
- [9] Tanaka Y, Chen C, Maher J M, Klaassen C D. Kupffer cell-mediated downregulation of hepatic transporter expression in rat hepatic ischemia-reperfusion [J]. *Transplantation*, 2006, 82: 258-266.
- [10] Nakamitsu A, Hiyama E, Imamura Y, Matsuura Y, Yokoyama T. Kupffer cell function in ischemic and nonischemic livers after hepatic partial ischemia/reperfusion [J]. *Surg Today*, 2001, 31: 140-148.
- [11] Glasgow S C, Ramachandran S, Csontos K A, Jia J, Mohankumar T, Chapman W C. Interleukin-1beta is prominent in the early pulmonary inflammatory response after hepatic injury [J]. *Surgery*, 2005, 138: 64-70.
- [12] Witthaut R, Farhood A, Smith C W, Jaeschke H. Complement and tumor necrosis factor- α contribute to Mac-1 (CD11b/CD18) upregulation and systemic neutrophil activation during endotoxemia *in vivo* [J]. *J Leukoc Biol*, 1994, 55: 105-111.