

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00136

供肝丹参多酚酸盐预处理减轻受体大鼠肝移植术后胆道损伤

宋少华^{1△}, 郭闻渊^{1△}, 傅志仁¹, 傅宏^{1*}, 沈筱芸², 刘芳¹, 王正昕¹, 丁国善¹

1. 第二军医大学长征医院器官移植中心, 上海 200003

2. 第二军医大学基础部免疫学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的** 观察丹参多酚酸盐预处理供肝对受体大鼠肝移植术后胆道损伤的影响, 探讨其可能的作用机制。 **方法** 根据供体肝脏保存方法, 受体大鼠随机分为 UW 液组、丹参多酚酸盐预处理组 (UW 液 + 0.4 mg/ml 丹参多酚酸盐)、生理盐水对照组 (UW 液 + 等量生理盐水)。大鼠行胆道持续外引流肝动脉化原位肝移植, 观察移植术后 1、6、24 h 胆汁流量及胆汁酸盐分泌量。大鼠行肝动脉化大鼠原位肝移植, 移植术后 2 周检测各组大鼠血清碱性磷酸酶、胆汁酸盐及总胆红素水平, 观察胆道并发症发生率; 采用实时荧光定量 PCR、蛋白印迹法分别检测肝脏移植植物内胆酸盐输出泵 (bile salt export pump, BSEP) 基因及蛋白的表达。 **结果** 与 UW 液组及生理盐水对照组相比, 丹参多酚酸盐预处理组大鼠术后早期胆汁流量及胆汁酸盐分泌量明显增加 ($P < 0.05$); 术后 2 周血清碱性磷酸酶、胆汁酸盐及总胆红素水平明显降低 ($P < 0.05$), 胆汁淤积等胆道并发症发生率明显降低 ($P < 0.01$); 肝脏移植植物内 BSEP mRNA 及蛋白表达均升高 ($P < 0.05$)。 **结论** UW 液内加入丹参多酚酸盐保存供肝可明显减轻受体大鼠肝移植术后胆道损伤, 降低术后胆道并发症的发生, 可能与其促进移植肝内 BSEP 表达有关。

[关键词] 丹参多酚酸盐; 移植预处理; 肝移植; 胆道损伤

[中图分类号] R 657.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)02-0136-04

Pretreatment of donor liver with salvianolate reduces biliary injury in rats after liver transplantation

SONG Shao-hua^{1△}, GUO Wen-yuan^{1△}, FU Zhi-ren¹, FU Hong^{1*}, SHEN Xiao-yun², LIU Fang¹, WANG Zheng-xin¹, DING Guo-shan¹

1. Organ Transplantation Center, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department of Immunology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To evaluate the effect of pretreating donor liver with salvianolate on biliary injury after orthotopic liver transplantation (OLT) in rats, and to discuss the underlying mechanisms. **Methods** According to the preservation solutions of the liver grafts, the recipients rats were allocated in three groups: UW solution group, salvianolate group (UW solution + 0.4 mg/ml salvianolate), and saline group (UW solution + saline). In experiment 1, the recipient rats underwent arterialized OLT with biliary extra-drainage, and the bile flow and bile salt secretion were recorded at 1, 6, and 24 h post-transplantation. In experiment 2, the recipient rats underwent arterialized OLT, and the serum alkaline phosphatase, bile salt, total bilirubin, and the incidence of biliary complications were examined at 2 weeks post-transplantation. Meanwhile, the mRNA and protein expression of bile salt export pump (BSEP) in the liver samples were also detected using real-time RT-PCR and Western blotting analysis, respectively. **Results** Compared with the UW solution and saline groups, salvianolate group exhibited significantly increased bile flow and bile salt secretion at 1, 6, and 24 h post-transplantation ($P < 0.05$). At 2 weeks post-transplantation, salvianolate group had significantly lower serum alkaline phosphatase, bile salt, total bilirubin ($P < 0.05$), and incidence of biliary complications ($P < 0.01$), and significantly higher expression of BSEP mRNA and protein compared with the other two groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Salvianolate addition in UW preservation solution can ameliorate biliary injury and reduce the incidence of biliary complications after OLT in rats, which might be associated with increased expression of BSEP in liver graft.

[Key words] salvianolate; transplantation conditioning; liver transplantation; biliary injuries

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(2):136-139]

[收稿日期] 2009-09-24 **[接受日期]** 2010-01-05

[基金项目] 上海市卫生局青年科研项目(2008Y085). Supported by Youth Research Project of Shanghai Health Bureau(2008Y085).

[作者简介] 宋少华, 博士生. E-mail: 77472087@163.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885745, E-mail: fuhong@medmail.com.cn

肝脏移植术后胆道并发症的发生率可高达22%~64%^[1],包括胆漏、吻合口狭窄、胆汁淤积、肝内胆管狭窄(intra-hepatic biliary strictures, IHBS)等,严重影响肝移植术后患者的生活质量及长期存活率^[2]。胆道并发症的高危因素包括移植术后肝动脉栓塞、供肝保存时间过长、ABO血型不匹配、移植肝血管内皮细胞损伤及胆道损伤等,其中,肝脏及胆道组织缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤与胆道并发症发生最密切^[3-4]。丹参多酚酸盐是从传统中药丹参中提取的水溶性有效成分,具有抗氧化、抗氧自由基、抗血栓、抗血小板聚集及免疫调节作用,能够扩张冠状动脉、改善心肌血流量和降低心肌IR损伤^[5-6]。因此,本研究将其应用于肝移植术前供肝的保存,观察受体移植术后胆道损伤情况,探讨其对移植术后胆道损伤的影响及可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 丹参多酚酸盐购自上海绿谷制药有限公司,用生理盐水配制成8 mg/ml溶液备用;大鼠胆汁酸盐输出泵(bile salt export pump, BSEP)蛋白免疫印迹试剂盒购自Abcam公司(Cambridge, UK);BCA蛋白浓度分析试剂盒购自美国Pierce公司;SYBR Premix Ex Taq 荧光定量试剂盒购自日本TaKaRa公司。

1.2 动物来源及分组 雄性4~6周龄Sprague-Dawley大鼠,体质量200~250 g,购自上海必凯实验动物有限公司,无特殊病原体(specific pathogen free, SPF)环境饲养,自由进食、饮水。根据供体肝脏保存方法,受体大鼠随机分为UW液组、丹参多酚酸盐预处理组(UW液+0.4 mg/ml丹参多酚酸盐)、生理盐水对照组(UW液+等量生理盐水)。UW液组供肝于4℃ UW液中保存10 h,丹参多酚酸盐预处理组供肝置于含0.4 mg/ml丹参多酚酸盐的4℃ UW液中保存10 h,生理盐水对照组供肝置于含有与丹参多酚酸盐组等量生理盐水的4℃ UW液中保存10 h。

1.3 移植术后胆汁分泌量的观察 各组受体大鼠($n=4, N=12$)行胆道持续外引流肝动脉化大鼠原位肝移植^[7],收集术后1、6、24 h胆汁进行胆汁流量检测,并采用 3α -羟脱氢酶法^[8]检测胆汁酸盐分泌量。

1.4 移植术后胆道损伤相关指标的检测 各组受体大鼠($n=20, N=60$)行动脉化大鼠原位肝移植,观察术后2周各组受体存活率、胆道并发症发生率,

同时采用自动化分析仪(Beckman Corp, CA, USA)检测血清碱性磷酸酶、胆汁酸盐及总胆红素水平,以及肝组织内BSEP的mRNA及蛋白表达变化。

1.5 移植术后肝组织内BSEP基因及蛋白表达的变化 取原位肝移植大鼠术后2周肝组织,采用实时定量RT-PCR和蛋白质印迹法分别检测肝组织BSEP基因及蛋白表达情况。

1.5.1 实时定量RT-PCR检测 取冻存组织标本约10 mg,研磨器研磨,TRIzol试剂抽提总RNA,建立RT-PCR反应体系。引物序列如下,BSEP上游引物:5'-CCA AGC TGC CAA GGA TGC TA-3',下游引物:5'-CCT TCT CCA ACA AGG GTG TCA-3'; β -actin上游引物:5'-CGG AAC CGC TCA TTG CC-3',下游引物:5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司采用ABI StepOne™ real time RT-PCR仪(Applied Biosystems, USA)合成。目的基因mRNA表达水平以相应标本内 β -actin mRNA为基准,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算^[9],并将UW液组标本内目的基因表达水平设为1,对其他组标本内目的基因表达水平进行标准化。

1.5.2 蛋白质印迹检测 用冷裂解液匀浆化肝组织,4℃离心10 min,收集上清并采用BCA蛋白分析试剂盒测定蛋白浓度,然后向裂解物内加入含十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulphate, SDS)的蛋白缓冲液,水浴锅内煮沸10 min。用12% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质(每泳道30 μ g蛋白),用转膜系统(Bio-Rad, Hercules, CA)将蛋白转移至硝酸纤维素膜,常温下用含5%脱脂奶粉的TBST(tris-buffered saline, pH 7.6,含0.05% Tween 20)封闭2 h。经TBST清洗2次后,加入1:1 000稀释的第一抗体,4℃孵育过夜。加入辣根过氧化物酶偶联的第二抗体孵育1 h,最后加入底物并曝光、显影。采用灰度分析系统半定量计算目的蛋白与 β -actin之比。

1.6 统计学处理 采用SPSS 16.0统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单向方差分析,组间多重比较采用LSD法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受体术后早期胆汁及胆汁酸盐分泌量变化 结果(表1)表明:与UW液组及生理盐水对照组相

比,丹参多酚酸盐预处理组受体大鼠术后早期胆汁分泌量、胆汁酸盐分泌量均明显增加($P<0.05$)。

表 1 各组受体大鼠肝移植术后早期(1、6、24 h)胆汁及胆汁酸盐分泌量

Tab 1 Bile flow of liver graft and bile salt secretion in recipient rats at 1, 6, and 24 h post-transplantation

($n=4$)

Group	Bile flow of liver graft ($\mu\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)			Bile salt secretion ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$)		
	1 h	6 h	24 h	1 h	6 h	24 h
UW solution	0.020±0.004	0.030±0.006	0.0450±0.008	10.3±2.6	16.4±3.7	20.4±3.5
Salvianolate	0.040±0.006*	0.060±0.010*	0.080±0.015*	25.6±5.7*	35.9±6.1*	41.2±8.6*
Saline control	0.025±0.005	0.035±0.008	0.040±0.010	15.8±3.3	20.2±4.3	22.6±5.9

* $P<0.05$ vs UW solution group or saline control group at the same time point

2.2 受体术后2周胆道损伤相关指标的变化 结果(表2)表明:与UW液组及生理盐水对照组相比,丹参多酚酸盐预处理组受体大鼠术后2周血清碱性磷酸酶、胆汁酸盐及总胆红素水平明显降低($P<0.05$)。

表 2 受体大鼠术后2周胆道损伤相关指标的变化

Tab 2 Serum markers of associated bile duct injury in recipient rats two weeks post-transplantation

($n=20$)

Group	Alkaline phosphatase $\alpha_B/(U \cdot L^{-1})$	Bile salt $c_B/(\mu\text{mol} \cdot L^{-1})$	Total bilirubin $\rho_B/(\text{mg} \cdot L^{-1})$
UW solution	203.4±45.6	12.7±3.6	47±14
Salvianolate	113.5±25.3*	6.5±2.3*	21±8*
Saline control	233.4±55.8	13.1±4.7	51±18

* $P<0.05$ vs UW solution group or saline control group

2.3 受体术后2周胆道并发症发生率 UW液组受体术后2周存活率为70%(14/20),其中4只死于胆漏和胆总管梗阻,8只出现肝叶片状黄染甚至累及整个肝脏,胆道并发症发生率为60%(12/20);生理盐水对照组受体术后2周存活率为75%(15/20),其中3只死于胆漏和胆总管梗阻,10只出现肝叶片状黄染甚至累及整个肝脏,胆道并发症发生率为65%(13/20);丹参多酚酸盐预处理组受体术后2周生存率为95%(19/20),其中1只死于术后出血,6只出现肝叶片状黄染甚至累及整个肝脏,胆道并发症发生率为30%(6/20)。与UW液组及生理盐水对照组相比,丹参多酚酸盐预处理组受体大鼠术后2周胆道并发症发生率明显降低,差异有统计学意义($P<0.01$)。

2.4 受体术后2周移植体内BSEP表达的变化 结果(图1)表明:与UW液组及生理盐水对照组相比,丹参多酚酸盐预处理组受体大鼠术后2周肝脏移植体内BSEP的mRNA及蛋白水平明显升高($P<0.05$)。

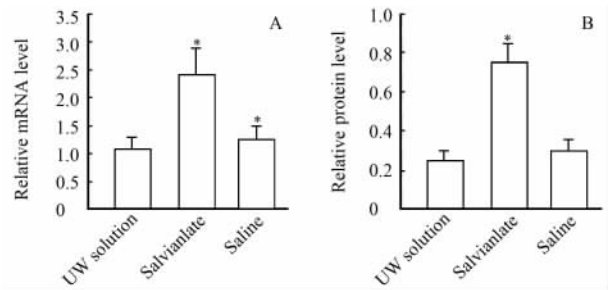


图 1 受体大鼠术后2周肝脏移植体内BSEP mRNA(A)及蛋白(B)表达情况

Fig 1 BSEP mRNA level (A) and protein level (B) in liver graft two weeks post-transplantation

* $P<0.05$ vs UW solution group or saline control group; $n=20, \bar{x} \pm s$

3 讨论

胆汁淤积等胆道并发症常出现于经历冷IR损伤的肝移植受者或因创伤、肿瘤切除及各种休克而发生肝脏热IR损伤的患者^[10-12]。就无心跳供体肝移植而言,随着器官保存技术和外科手术技术的提高,其发病率及病死率明显降低,而胆汁淤积、胆道狭窄等胆道并发症已成为严重威胁肝移植患者生命的最主要并发症^[13-14]。近年来,随着活体供肝移植(living donor liver transplantation, LDLT)技术的进步,活体肝移植受体及移植物的存活率明显提高,但术后高发的胆道并发症已成为困扰该技术广泛应用的主要障碍之一^[15]。因此,胆道并发症是当前肝脏移植研究领域亟待解决的难题。

由于缺乏合适的肝移植术后胆道并发症动物模型,目前胆道并发症相关研究甚少。考虑到供体冷保存时间是术后胆道并发症发生的主要危险因素之一,本研究尝试采用延长供体在4℃ UW液内保存时间的方法建立胆道并发症的动物模型;鉴于胆道系统主要血供来源于肝动脉,本研究所有肝脏移植模型均行动脉吻合,恢复供体肝动脉血供。研究结果表明该方法建立的大鼠肝脏移植模型术后2周胆

汁淤积等胆道并发症发生率高(约为60%~70%),且结果稳定、可靠,可以广泛应用于胆道并发症相关研究。

肝脏移植术中肝细胞、胆道细胞再灌注损伤促进胆汁淤积等胆道并发症发生可能与以下因素有关:(1)再灌注损伤干扰了正常的胆汁形成过程;(2)再灌注损伤导致胆汁酸盐转运子的表达或功能发生变化;(3)炎症介质等损伤了胆汁分泌反应;(4)迅速发生的胆道纤维炎症阻塞。细胞内胆汁酸盐淤积本身可进一步加强炎症反应,促进胆汁淤积并诱导胆小管增生,促进胆道损伤^[16]。

胆汁形成依赖于肝细胞基底膜侧及微胆管膜侧胆汁转运系统的正常工作^[17]。其中,微胆管膜侧胆汁酸盐输出泵是肝细胞向小胆管内主动分泌胆汁酸的重要蛋白,属于ATP结合盒转运子的B型亚家族成员,仅表达于肝细胞。其表达及功能异常将导致肝脏胆汁分泌代谢异常,造成肝细胞内胆汁淤积、血清胆汁酸盐浓度升高等^[18]。人类BSEP基因突变将会引起家族性进展性肝内胆汁淤积综合征(progressive familial intrahepatic cholestasis, PF-IC)^[19-21]。上述研究提示BSEP可能对肝移植术后胆道并发症的发生具有重要意义。本研究结果也显示当保存液内加入丹参多酚酸盐后,肝移植术后移植体内BSEP的表达水平较UW液组及生理盐水对照组明显升高,受体术后早期胆汁流量及胆汁酸盐分泌量明显升高,术后2周血清碱性磷酸酶、胆汁酸盐、总胆红素及胆道并发症发生率明显降低。

综上所述,本研究结果初步表明供肝保存液内加入丹参多酚酸盐可以明显减轻受体肝移植术后胆道损伤,降低术后胆道并发症的发生率,可能与其缓解冷IR损伤导致的移植肝内BSEP表达降低有关。

[参考文献]

- [1] Qian Y B, Liu C L, Lo C M, Fan S T. Risk factors for biliary complications after liver transplantation[J]. *Arch Surg*, 2004, 139:1101-1105.
- [2] Nakamura N, Nishida S, Neff G R, Vaidya A, Levi D M, Kato T, et al. Intrahepatic biliary strictures without hepatic artery thrombosis after liver transplantation: an analysis of 1 113 liver transplantations at a single center[J]. *Transplantation*, 2005, 79:427-432.
- [3] Guichelaar M M, Benson J T, Malinchoc M, Krom R A, Wiesner R H, Charlton M R. Risk factors for and clinical course of non-anastomotic biliary strictures after liver transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2003, 3:885-890.
- [4] Baccarani U, Adani G L, Isola M, Avellini C, Lorenzin D, Rossetto A, et al. Steatosis of the graft is a risk factor for posttransplantation biliary complications[J]. *Transplant Proc*, 2009, 41:1313-1315.
- [5] 何香香. 治疗心血管疾病新药——丹参多酚酸盐研制成功[J]. *中国基础科学*, 2005, 7:17.
- [6] 宋少华, 郭闻渊, 傅志仁, 傅宏, 沈筱芸, 刘芳, 等. 丹参多酚酸盐负性调节小鼠骨髓来源树突状细胞成熟及其部分免疫功能[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30:1333-1337.
- [7] Song S H, Guo W Y, Fu Z R, Fu H, Shen X Y, Liu F, et al. Salvianolate negatively regulates maturation and immunologic functions of mouse bone marrow-derived dendritic cells[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2009, 30:1333-1337.
- [7] 王振猛, 唐乙, 宋少华, 陆智杰, 王全兴, 俞卫锋. 大鼠原位肝移植模型的手术技巧[J]. *临床军医杂志*, 2008, 36:638-640.
- [8] Turley S D, Dietschy J M. Re-evaluation of the 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase assay for total bile acids in bile[J]. *J Lipid Res*, 1978, 19:924-928.
- [9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method[J]. *Methods*, 2001, 25:402-408.
- [10] Xu H S, Pilcher J A, Jones R S. Physiologic study of bile salt and lipid secretion in rats after liver transplantation[J]. *Ann Surg*, 1993, 217:404-412.
- [11] Chan F K, Zhang Y, Sutherland F R, Shaffer E A. Effects of liver transplantation on bile formation and biliary lipid secretion in the Sprague-Dawley rat[J]. *Hepatology*, 1995, 22(4 Pt 1):1254-1258.
- [12] Bowers B A, Branum G D, Rotolo F S, Watters C R, Meyers W C. Bile flow—an index of ischemic injury[J]. *J Surg Res*, 1987, 42:565-569.
- [13] Suárez F, Otero A, Solla M, Arnal F, Lorenzo M J, Marini M, et al. Biliary complications after liver transplantation from maastricht category-2 non-heart-beating donors[J]. *Transplantation*, 2008, 85:9-14.
- [14] Maheshwari A, Maley W, Li Z, Thuluvath P J. Biliary complications and outcomes of liver transplantation from donors after cardiac death[J]. *Liver Transpl*, 2007, 13:1645-1653.
- [15] Ushigome H, Sakai K, Suzuki T, Nobori S, Yoshizawa A, Ikoma H, et al. Biliary anastomosis and biliary complications following living donor liver transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2008, 40:2537-2538.
- [16] Hoekstra H, Porte R J, Tian Y, Jochum W, Stieger B, Moritz W, et al. Bile salt toxicity aggravates cold ischemic injury of bile ducts after liver transplantation in *Mdr2^{+/-}* mice[J]. *Hepatology*, 2006, 43:1022-1031.
- [17] Arrese M, Accatino L. From blood to bile: recent advances in hepatobiliary transport[J]. *Ann Hepatol*, 2002, 1:64-71.
- [18] Stieger B. Recent insights into the function and regulation of the bile salt export pump (ABCB11)[J]. *Curr Opin Lipidol*, 2009, 20:176-181.
- [19] Treepongkaruna S, Gaensan A, Pienvichit P, Luksan O, Knisely A S, Sornmayura P, et al. Novel ABCB11 mutations in a Thai infant with progressive familial intrahepatic cholestasis[J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15:4339-4342.
- [20] Keitel V, Burdelski M, Vojnisek Z, Schmitt L, Häussinger D, Kubitz R. *De novo* bile salt transporter antibodies as a possible cause of recurrent graft failure after liver transplantation: a novel mechanism of cholestasis[J]. *Hepatology*, 2009, 50:510-517.
- [21] Fouassier L, Beaussier M, Schiffer E, Rey C, Barbu V, Mergely M, et al. Hypoxia-induced changes in the expression of rat hepatobiliary transporter genes[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 293:G25-G35.