

· 论著 ·

环氧合酶 2 在大鼠肝移植缺血再灌注损伤中的作用

李玉民 朱晓亮 李汛 周文策 李斌 石斌

【摘要】 目的 探讨环氧合酶 2 (COX-2) 在大鼠肝移植缺血再灌注损伤中的表达及其作用机制。**方法** 54 只雄性 Wistar 大鼠按随机数字表法分为 3 组: 正常对照组 (6 只); 肝移植组 (24 只); 干预组 (24 只)。RT-PCR 法检测 COX-2 mRNA 的表达; 免疫组织化学染色显示 COX-2 阳性细胞的分布情况; ELISA 法检测血清 TNF- α 和 IL-10 的含量。采用单因素方差检验分析各检测指标结果。**结果** 各组血清学检测指标和 TNF- α 表达变化与移植肝的组织学损伤相一致。COX-2 mRNA 的表达为肝移植缺血再灌注损伤机制所必需, 抑制其表达可加重移植物缺血再灌注损伤。**结论** COX-2 参与了肝移植缺血再灌注损伤, 并且是重要效应分子, 可能起到了降低移植物缺血再灌注损伤的保护性作用。

【关键词】 肝移植; 环氧合酶 2; 缺血再灌注损伤; 大鼠

Effects of cyclooxygenase-2 in ischemia reperfusion injury in liver transplantation in rat LI Yu-min, ZHU Xiao-liang, LI Xun, ZHOU Wen-ce, LI Bin, SHI Bin. Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Corresponding author: ZHU Xiao-liang, Email: zhuxiaoliang1981@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression and role of cyclooxygenase-2 (COX-2) in the ischemia reperfusion injury in liver transplantation in rat. **Methods** Fifty-four male Wistar rats were divided into control group ($n = 6$), liver transplantation group ($n = 24$) and NS398 treated group ($n = 24$) according to random number table. The expression of COX-2 mRNA was detected by RT-PCR, the distribution of COX-2 positive cells by immunohistochemistry, and the content of serum TNF- α and IL-10 by enzyme-linked immunosorbent assay. All the data were processed by one-way ANOVA. **Results** The serum indexes and changes of TNF- α expression were in accordance with the histological injury of liver graft. The expression of COX-2 mRNA was essential to the ischemia reperfusion injury of the liver graft. Inhibition of the expression of COX-2 mRNA would aggravate the ischemia reperfusion injury of the liver graft. **Conclusions** COX-2 plays an important role in the ischemia reperfusion injury in liver transplantation. COX-2 may decrease the ischemia reperfusion injury of liver graft.

【Key words】 Liver transplantation; Cyclooxygenase-2; Ischemia reperfusion injury; Rat

环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 作为一种与损伤关系密切的活性蛋白酶, 在肝移植缺血再灌注损伤中发挥何种作用尚不清楚。本研究建立大鼠肝移植的动物模型, 检测并分析 COX-2 在大鼠肝移植缺血再灌注损伤中的表达及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制作

取清洁级健康雄性 Wistar 大鼠 54 只, 由兰州大学实验动物中心提供。体质量 250 ~ 300 g。按随机数字表法分为 3 组: (1) 正常对照组 (6 只): 麻醉后

开腹, 采血并取部分肝组织。(2) 肝移植组 (24 只): 采用改良二袖套法原位全肝移植^[1], 移植物缺血再灌注后 3、6、12、24 h 肝上下腔静脉采血及肝中叶固定部位取部分肝组织。(3) 干预组 (24 只): 受体无肝期开始前 2 h 按 10 μ g/g 腹腔注射硝基苯-甲基磺胺 (NS398)^[2], 其余步骤同肝移植组。

1.2 实验试剂

NS398 购自美国 Cayman 公司; COX-2 一抗、TNF- α /IL-10 ELISA 试剂盒购自武汉博德生物工程有限公司; PCR 引物及相关试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.3 标本采集及检测

乙醚麻醉后肝上下腔静脉采血, 取血清待测。肝中叶中部固定部位取部分肝组织, 称取 100 mg 放入 -80 $^{\circ}$ C 低温冰箱供 RT-PCR 检测; 另取大小约

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2009.01.018

基金项目: 甘肃省卫生厅专项基金 (2004342)

作者单位: 730000 兰州大学附属第一医院普外二科

通信作者: 朱晓亮, Email: zhuxiaoliang1981@hotmail.com

1 cm × 1 cm × 1 cm 肝组织 2 块, 一块供病理检查和免疫组织化学染色, 一块供透射电镜检查。(1) RT-PCR 检测 COX-2 mRNA 水平: COX-2 上游引物 5'-CTGTATCCCGCCCTGCTGGT-3', 下游引物 5'-GAGGCACTTGCCTTGATGCT-3', 扩增产物长度 287 bp。β-肌动蛋白上游引物 5'-GATGGTGGGTATGGGTCAGAA-3', 下游引物 5'-CTAGGAGCCAGGGCACTAATC-3', 扩增产物长度 839 bp。RT 反应条件为: 42 °C 60 min, 70 °C 10 min; PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min, 以 94 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 1 min 共 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 EB 染色的 2% 琼脂糖凝胶电泳 (90 mV/50 mA, 40 min), 紫外灯下检测后用凝胶成像分析系统测量灰度值, 比较 PCR 产物相对量。(2) 采用 ELISA 法检测 TNF-α 和 IL-10 的表达。(3) 用日立 7020 型全自动生化分析仪检测血清 ALT 和 AST 的表达。(4) 石蜡切片一半进行 HE 染色, 光镜下观察其病理改变情况; 另一半进行免疫组织化学染色, 光镜下观察 COX-2 阳性细胞分布情况。(5) TEM-1230 型透射电镜观察肝脏超微结构改变。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 多组间采用单因素方差分析, 两两比较行 LSD 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

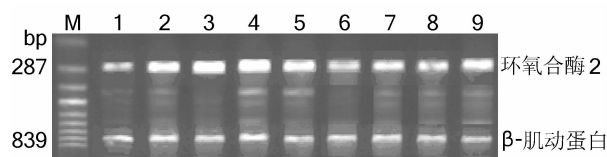
2 结果

2.1 大鼠肝移植术各期时间的比较

由同一术者对肝移植组和干预组大鼠进行肝移植, 供体手术时间、灌注时间、修肝时间、受体手术时间、无肝期时间和总手术时间比较, 差异均无统计学意义。

2.2 大鼠缺血再灌注后各时相点肝组织 COX-2 mRNA 检测情况

采用 RT-PCR 法检测各时相点肝组织 COX-2 mRNA 表达结果, 见图 1。



M: Marker; 1: 正常对照组; 2~5: 肝移植组 (分别为 3、6、12、24 h); 6~9: 干预组 (分别为 3、6、12、24 h)

图 1 大鼠缺血再灌注后各时相点肝组织 COX-2 mRNA 表达结果

2.3 缺血再灌注后各指标的变化

2.3.1 COX-2 mRNA: 肝移植组缺血再灌注后 3 h

COX-2 mRNA 相对表达量较正常对照组明显升高, 随缺血再灌注时间延长逐渐下降; 干预组缺血再灌注后 3、6 h 与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 至 12、24 h 表达水平有升高趋势 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3.2 TNF-α: 肝移植组 3 h TNF-α 与正常对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 6 h 达组内峰值后下降, 24 h 与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 干预组 6 h 时显著高于组内其他各时相点 ($P < 0.01$), 24 h 时与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3.3 IL-10: 肝移植组在缺血再灌注后 3 h IL-10 已达组内峰值 ($P < 0.01$), 以后逐渐下降, 至 24 h 时与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 干预组中 IL-10 表达亦于缺血再灌注后 3 h 达组内峰值 ($P < 0.01$), 渐降至 24 h 时与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3.4 ALT 和 AST: 肝移植组中, 缺血再灌注后 3 h ALT、AST 升高, 6 h 达组内峰值 ($P < 0.01$), 于 12 ~ 24 h 逐渐下降, 至 24 h 时与正常对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 干预组 ALT、AST 表达 6 ~ 12 h 维持在组内较高水平, 24 h 降低。见表 1。

2.4 COX-2 阳性细胞分布情况

缺血再灌注后, COX-2 阳性细胞主要分布于以肝血窦和汇管区为中心区域的血管内皮细胞、肝实质细胞和库普弗细胞, 并形成中央染色重、外周逐渐递减的浓度梯度。肝移植组缺血再灌注后 3 h, 移植植物即有明显的 COX-2 阳性细胞表达并维持至 6 h, 可见有较明显的浓度梯度, 缺血再灌注后 12 ~ 24 h, 阳性细胞表达率及浓度下降, 但仍高于正常对照组并有一定浓度梯度。干预组缺血再灌注后 3 ~ 12 h, 肝组织中极少有 COX-2 阳性细胞表达且染色较淡, 直至缺血再灌注后 24 h 才见明显的阳性细胞表达及浓度梯度, 与 COX-2 mRNA 表达规律较符合。这说明 NS398 对 COX-2 的完全抑制作用不足以维持超过 24 h。见图 2。

2.5 移植肝脏病理和电镜检查结果

大体上干预组损伤变化基本同肝移植组但较后者稍重。肝移植组和干预组损伤最常见于肝血窦的淤血。这种变化可能是内环境及血流/压力变化造成的肝细胞水肿导致的肝小叶中央静脉流出道阻塞所致。肝移植组与干预组比较, 干预组一直未见明显的炎性细胞浸润。见图 3、4。

表 1 大鼠缺血再灌注后各时相点的血清学检查指标变化($\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	TNF- α (ng/L)	IL-10(ng/L)
正常对照组	83.3 $\pm$ 13.2	178.3 $\pm$ 48.2	8.7 $\pm$ 1.4	14.0 $\pm$ 7.2
肝移植组				
3 h	478.0 $\pm$ 54.8 ^a	1101.3 $\pm$ 111.0 ^a	19.3 $\pm$ 2.9 ^a	1593.2 $\pm$ 29.3 ^a
6 h	883.0 $\pm$ 123.9 ^a	1936.0 $\pm$ 95.7 ^a	25.8 $\pm$ 2.9 ^a	973.2 $\pm$ 29.3 ^a
12 h	454.7 $\pm$ 137.2	1017.3 $\pm$ 291.7 ^a	18.3 $\pm$ 2.9 ^a	265.2 $\pm$ 29.3 ^a
24 h	321.3 $\pm$ 29.0	635.0 $\pm$ 154.6	14.3 $\pm$ 2.9	46.2 $\pm$ 29.3
干预组				
3 h	534.0 $\pm$ 84.9 ^a	1272.3 $\pm$ 165.4 ^a	23.3 $\pm$ 2.9 ^a	3044.2 $\pm$ 29.3 ^{ab}
6 h	870.3 $\pm$ 118.2 ^a	2791.0 $\pm$ 247.0 ^{ab}	187.3 $\pm$ 2.9 ^{ab}	1559.2 $\pm$ 29.3 ^{ab}
12 h	1242.7 $\pm$ 233.7 ^{ab}	2559.7 $\pm$ 214.9 ^{ab}	26.3 $\pm$ 2.9 ^{ab}	803.2 $\pm$ 29.3 ^{ab}
24 h	615.0 $\pm$ 115.3 ^{ab}	2013.0 $\pm$ 297.6 ^{ab}	13.8 $\pm$ 2.9	49.7 $\pm$ 8.5

注:^a $P < 0.05$,与正常对照组比较; ^b $P < 0.05$,与肝移植组比较

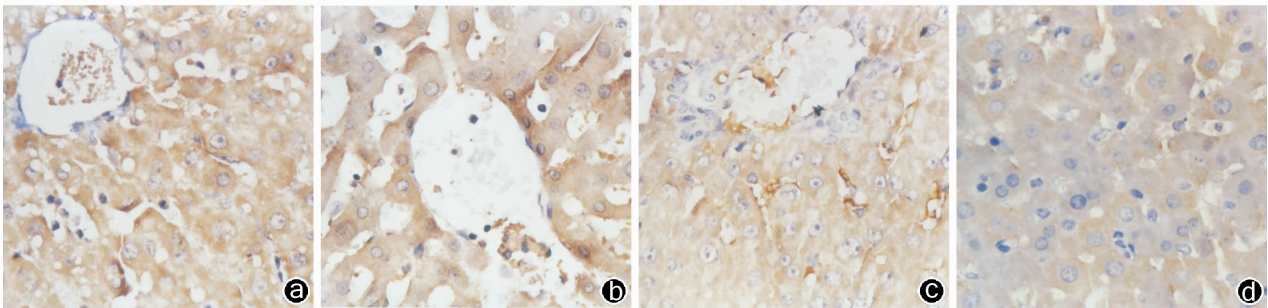


图 2 肝移植组和干预组免疫组织化学染色结果 DAB $\times 400$ a:肝移植组缺血再灌注后 3 h; b:肝移植组缺血再灌注后 6 h; c:肝移植组缺血再灌注后 12 h; d:干预组缺血再灌注后 24 h

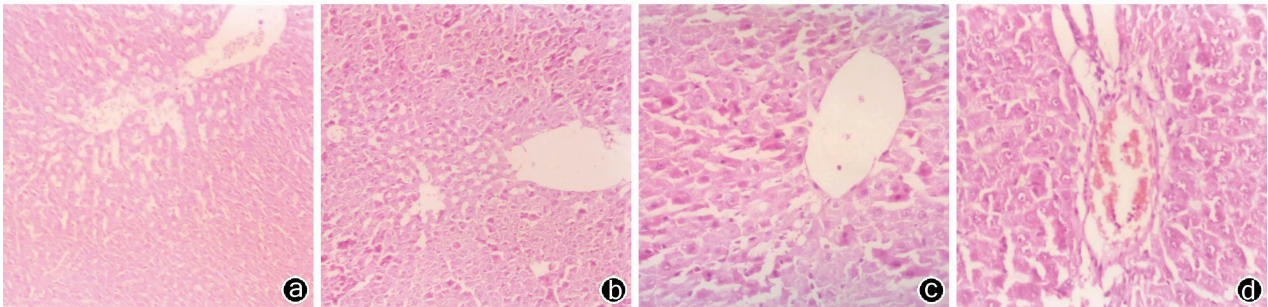


图 3 肝移植组和干预组病理检查结果 HE $\times 100$ a:肝移植组缺血再灌注后 6 h; b:肝移植组缺血再灌注后 24 h; c:干预组缺血再灌注后 6 h; d:干预组缺血再灌注后 24 h

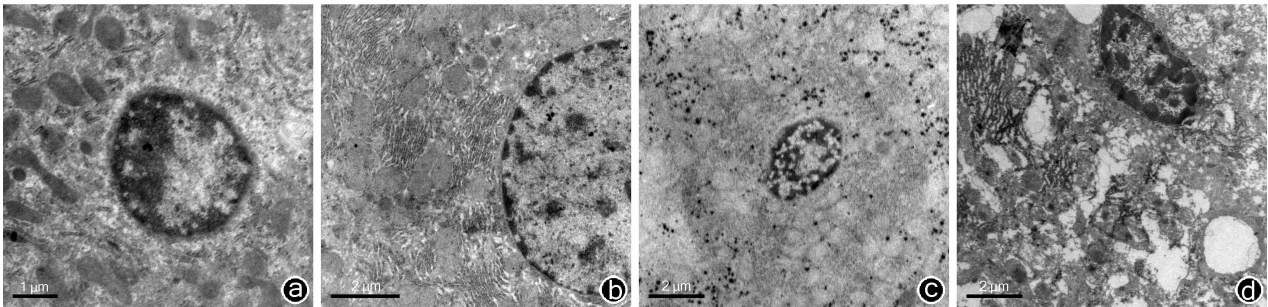


图 4 肝移植组和干预组电镜检查结果 a:肝移植组缺血再灌注后 6 h $\times 20\,000$; b:肝移植组缺血再灌注后 24 h $\times 15\,000$; c:干预组缺血再灌注后 6 h $\times 12\,000$; d:干预组缺血再灌注后 24 h $\times 12\,000$

3 讨论

本研究中,各组 ALT、AST 与 TNF- α 表达变化与移植肝的组织学损伤相一致。TNF- α 在肝移植缺

血再灌注损伤中仍然是损伤产生的上游因子^[3]。IL-10 作为损伤保护因子,其表达在缺血再灌注初期即达到了组内峰值,至 24 h 时已降至正常水平。表

达未受抑制时, COX-2 与 IL-10 具有类似的表达变化趋势, 即于缺血再灌注初期(3 h)已达组内峰值, 而后随缺血再灌注时间延长逐渐下降; 当 COX-2 表达受抑制后, ALT、AST 与 TNF- α 呈现高表达, IL-10 亦明显升高。这说明在肝移植缺血再灌注损伤过程中对 COX-2 的抑制可使 TNF- α 和 IL-10 的表达呈负反馈性升高, 最终损伤因素大于抗损伤因素, 进一步加重移植物的缺血再灌注损伤, 故 COX-2 在肝移植缺血再灌注损伤中所扮演的角色与 IL-10 类似, 具有保护作用^[4]。

实验结果显示, 运用 NS398 从转录水平抑制 COX-2 的表达后, 干预组与肝移植组比较, 损伤性肝酶和细胞因子表达的增加, 造成组织损伤的进一步加重。这说明 COX-2 的表达为肝移植缺血再灌注损伤机制所必需, 缺血再灌注损伤引起 COX-2 较高水平的表达, 但抑制其表达同样可加重缺血再灌注损伤, 提示 COX-2 在肝移植缺血再灌注损伤中起到了阻止损伤进一步加重的保护性作用。本研究同时

发现, NS398 对 COX-2 的抑制作用不足以维持超过 24 h, 此结果与 RT-PCR 检测结果相一致, 说明 COX-2 表达与 COX-2 mRNA 表达相一致, 无延迟性表达。

所有结果显示, COX-2 是包含在损伤后复杂调节网络中的重要效应物, 其作用结果可能依赖于其下游产物在促损伤-抗损伤间的比例关系。

参考文献

- [1] 刘骅, 曹晖, 吴志勇. 改良二袖套法大鼠原位肝移植 180 例. 消化外科, 2006, 5(1): 52-56.
- [2] Mochizuki M, Ishii Y, Itoh K, et al. Role of 15-deoxy delta(12, 14) prostaglandin J2 and Nrf2 pathways in protection against acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(11): 1260-1266.
- [3] Kim SH, Lee SM. Expression of hepatic vascular stress genes following ischemia/reperfusion and subsequent endotoxemia. Arch Pharm Res, 2004, 27(7): 769-775.
- [4] 吕月涛, 刘江伟, 冯德元, 等. 环氧化酶-2 与肝损伤. 中国普通外科进展, 2007, 10(4): 341-343.

(收稿日期: 2008-07-16)

(本文编辑: 张玉琳)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊可直接用缩写的常用词汇

本刊将允许作者对下列比较熟悉的常用词汇直接用缩写, 即在论文中第一次出现时, 可以不标注中文:

AFP	甲胎蛋白	GGT	γ -谷氨酰转氨酶	NK 细胞	自然杀伤细胞
Alb	白蛋白	HAV	甲型肝炎病毒	PaCO ₂	动脉血二氧化碳分压
ALP	碱性磷酸酶	Hb	血红蛋白	PaO ₂	动脉血氧分压
ALT	丙氨酸氨基转移酶	HBV	乙型肝炎病毒	PBS	磷酸盐缓冲液
AST	天冬氨酸氨基转移酶	HBsAg	乙型肝炎 e 抗原	PCR	聚合酶链反应
AMP	腺苷一磷酸	HBsAg	乙型肝炎表面抗原	PEI	经皮酒精局部注射疗法
ADP	腺苷二磷酸	HCV	丙型肝炎病毒	PLT	血小板
ATP	腺苷三磷酸	HE	苏木素-伊红	PT	血浆凝血酶原时间
ARDS	急性呼吸窘迫综合征	HIFU	高强度聚焦超声	PTC	经皮肝穿刺胆道造影
CEA	癌胚抗原	IBil	间接胆红素	PTCD	经皮经肝胆管引流
CT	X 线计算机断层摄影术	IFN	干扰素	RBC	红细胞
DAB	二氨基联苯胺	IL	白细胞介素	RFA	射频消融
DBil	直接胆红素	抗-HBc	乙型肝炎核心抗体	RT-PCR	逆转录-聚合酶链反应
DMSO	二甲基亚砷	抗-HBe	乙型肝炎 e 抗体	TACE	经导管(肝)动脉栓塞化疗
ELISA	酶联免疫吸附测定	抗-HBs	乙型肝炎表面抗体	TBil	总胆红素
ENBD	内镜鼻胆管引流	LC	腹腔镜胆囊切除术	TC	总胆固醇
ERBD	内镜逆行胆管支架引流	LDH	乳酸脱氢酶	TG	甘油三酯
ERC	内镜逆行胆管造影	MA	微波消融	TGF	转化生长因子
ERCP	内镜逆行胰胆管造影	MRCP	磁共振胰胆管造影	TNF	肿瘤坏死因子
EST	内镜乳头括约肌切开	MRI	磁共振成像	TP	总蛋白
EUS	内镜超声	MODS	多器官功能障碍综合征	WBC	白细胞
GAPDH	3-磷酸甘油醛脱氢酶	MTT	四甲基偶氮唑蓝	VEGF	血管内皮生长因子