

· 短篇论著 ·

血红素氧合酶-1 基因在大鼠供肝缺血再灌注损伤中的抗炎作用

胡明政 张伯 杨小华 秦磊 钱海鑫 王学浩

【摘要】 目的 探讨血红素氧合酶-1 (HO-1) 基因在大鼠供肝缺血再灌注损伤中的抗炎作用。**方法** 将 32 只雄性 SD 大鼠分为实验组 (16 只) 和对照组 (16 只)。将已转染 HO-1 基因的腺病毒载体和空载体分别注入实验组和对照组供体大鼠腹腔 (各 8 只)。36 h 后取供肝, 冷保存 4 h 后行大鼠原位肝移植。缺血再灌注 6 h 后检测血清 ALT、AST、TNF- α 、肝组织 HO-1 蛋白的表达以及阳性巨噬细胞计数。采用 *t* 检验和秩和检验行统计学分析。**结果** (1) 实验组血清 ALT 和 AST 分别为 (439 ± 81) U/L 和 (1110 ± 73) U/L, 对照组分别为 (1005 ± 120) U/L 和 (1583 ± 175) U/L, 两组比较, 差异有统计学意义 ($t = 11.090, 7.050, P < 0.05$)。 (2) 实验组和对照组血清 TNF- α 分别为 (15 ± 13) μ g/L 和 (52 ± 11) μ g/L, 两组比较, 差异有统计学意义 ($t = 0.009, P < 0.05$)。 (3) 实验组和对照组肝组织 HO-1 蛋白的表达分别为 0.28 ± 0.07 和 0.04 ± 0.03 , 两组比较, 差异有统计学意义 ($T = 42.5, P < 0.05$)。 (4) 实验组中 HO-1 阳性细胞大量表达于血管区, 其阳性巨噬细胞的计数为 2 ± 1 , 显著少于对照组的 8 ± 2 ($t = 0.007, P < 0.05$)。**结论** HO-1 在大鼠供肝缺血再灌注损伤中可能通过抑制肝巨噬细胞的激活, 降低 TNF- α 的释放而发挥抗炎作用。

【关键词】 血红素氧合酶-1; 肝移植; 缺血再灌注损伤; 大鼠

缺血再灌注损伤是引起移植肝原发性无功能和术后原发性肝功能紊乱的主要原因之一^[1]。其主要表现包括: 内皮细胞的损伤和肝内库普弗细胞的激活, 以及大量炎症介质和细胞因子的释放从而造成肝脏损伤^[2]。血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 是血红素降解的限速酶, 同时也具有重要的细胞保护作用。HO-1 的保护作用与其抗炎作用有重要关系, 但其具体机制尚不明确^[3]。本研究采用转染人源性 HO-1 基因的腺病毒载体研究 HO-1 在大鼠供肝缺血再灌注损伤中的抗炎作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雄性 SD 大鼠 32 只, 体质量 230 ~ 250 g, 由苏州大学实

验动物中心提供。携带人源性 HO-1 基因的腺病毒载体由本实验室自行构建^[4]。

1.2 分组

将大鼠分为实验组 (16 只) 和对照组 (16 只)。实验组 8 只供体大鼠在取肝前 36 h 于腹腔注射 Ad-HO-1 (2.5×10^{12} pfu/L) 1 ml/只, 对照组 8 只供体大鼠在相同时间点于腹腔注射空载体悬液 (2.5×10^{12} pfu/L) 1 ml/只。供肝切取修整后保存 4 h (灌注液和保存液均为 0 ~ 4 °C 的林格液), 然后进行大鼠原位肝移植。供肝再灌注 6 h 后取材, 液氮保存待测。

1.3 方法

1.3.1 原位肝移植模型的建立: 在二袖套法的基础上改良建立大鼠原位肝移植模型。

1.3.2 ALT 和 AST 及血清 TNF- α 的检测: 取下腔静脉血离心, 采集上清液用全自动生化分析仪检测 ALT 和 AST 水平, 并用 ELISA 试剂盒 (购自 ADL 公司) 检测血清 TNF- α 水平。

1.3.3 Western blot 检测 HO-1 蛋白表达: 蛋白裂解液裂解肝组织, 4 °C 离心取上清液, 上样电泳, 转膜, 封闭, 加入一抗、二抗, 显色曝光于 X 光胶片。采用 UVI Doc 分析软件对条带灰度进行分析, 计算灰度比。

1.3.4 常规病理观察和免疫组织化学检测 HO-1 及巨噬细胞: 4% 甲醛溶液固定肝组织, 常规石蜡切片, 取其中部分切片行 HE 染色, 并于光镜下行病理组织学观察。另一部分切片采用免疫组织化学法检测 HO-1 和巨噬细胞, 以细胞质黄染判定为阳性细胞。每组选择含中央汇管区的两个视野进行阳性巨噬细胞计数, 然后进行统计学分析。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 11.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验, 方差不齐采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 术后肝功能情况

实验组门静脉复流 6 h 后血清 ALT 和 AST 分别为 (439 ± 81) U/L 和 (1110 ± 73) U/L, 对照组分别为 (1005 ± 120) U/L 和 (1583 ± 175) U/L, 两组比较, 差异有统计学意义 ($t = 11.090, 7.050, P < 0.05$)。

2.2 两组血清 TNF- α 水平比较

实验组和对照组血清 TNF- α 水平分别为 (15 ± 13) μ g/L 和 (52 ± 11) μ g/L, 两组比较, 差异有统计学意义 ($t = 0.009, P < 0.05$)。

2.3 Western blot 检测 HO-1 蛋白表达情况

实验组和对照组的条带灰度比值分别为 0.28 ± 0.07 和

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2010.05.021

基金项目: 江苏省临床免疫重点实验室基金; 江苏省自然科学基金 (BK2007057)

作者单位: 215006 苏州大学第一附属医院普通外科 (胡明政、张伯、杨小华、秦磊、钱海鑫); 210029 南京医科大学第一附属医院肝脏外科 (王学浩)

通信作者: 钱海鑫, Email: hzm7112@yahoo.cn

0.04 ± 0.03, 两组比较, 差异有统计学意义 ($T=42.5, P<0.05$)。

2.4 肝脏组织病理学检查

(1) 常规病理切片。实验组肝组织结构基本正常, 未见明显的肝细胞肿胀、坏死, 汇管区仅少许炎性细胞浸润; 对照组肝组织肿胀、充血, 肝实质可见点状坏死灶, 汇管区有大量炎性细胞浸润, 血管内皮破坏, 肝实质内有散在的炎性细胞 (图 1)。(2) 免疫组织化学染色: 实验组可见大量 HO-1 阳性细胞表达于血管区域, 对照组则只有少许 (图 2)。然而对照组的汇管区可见大量阳性巨噬细胞, 其细胞计数为 8 ± 2 , 显著多于实验组的 2 ± 1 , 两组比较, 差异有统计学意义 ($t=0.007, P<0.05$)。见图 3。

3 讨论

如何减轻肝移植时缺血再灌注对供肝造成的损伤是目前肝移植研究中需要解决的重要问题之一。缺血再灌注激活肝内库普弗细胞使其吞噬功能加强, 并释放水溶性酶和多种炎症介质, 直接损伤内皮细胞和肝细胞, 这是造成供肝缺血再灌注损伤的主要原因之一。

HO-1 是细胞应激机制中的重要保护因子之一, 它不仅可以直接降解血红素, 有效防止细胞内外高浓度的血红素对机体细胞的损害, 同时它分解血红素形成的产物 CO、亚铁离子和胆绿素也对细胞具有保护作用^[5-8]。在本研究中, 我们利用腺病毒为载体转染人源性 HO-1 基因, 使供肝高表达 HO-1, 发现实验组受体的肝功能明显好于对照组, 血清 TNF- α 水平显著低于对照组。在应激状态下, TNF- α 主要由巨噬细胞激活后产生并释放, 是炎症损伤过程的重要细胞因子。有研究表明, 抑制缺血再灌注过程中 TNF- α 的产生, 可以

明显减轻肝脏结构和功能的损伤^[9-10]。本研究中实验组供肝 TNF- α 水平显著降低, 而肝功能和肝组织结构明显好于对照组, 同时, 我们发现实验组供肝高表达 HO-1 时, 肝组织中的阳性巨噬细胞数量也明显减少。因此我们推断, 血液中 TNF- α 的降低可能是由于 HO-1 抑制了肝内巨噬细胞的激活, 从而减轻供肝的炎症反应, 缓解了缺血再灌注对供肝的损伤。

综上所述, 大鼠供肝高表达 HO-1 在缺血再灌注损伤中可能通过抑制供肝巨噬细胞的激活而降低机体 TNF- α 的释放来发挥抗炎作用。

参考文献

- [1] Kupiec-Weglinski JW, Busuttill RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. Transplant Proc, 2005, 37(4): 1653 - 1656.
- [2] Zhu H, Marco C, Gianfranco F. Early changes of graft function, cytokines and superoxide dismutase serum levels after donor liver denervation and Kupffer cell depletion in a rat-to-rat liver transplantation model. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2009, 8(2): 152 - 156.
- [3] Su H, van Dam GM, Buis CI, et al. Spatiotemporal expression of hemeoxygenase-1 detected by in vivo bioluminescence after hepatic ischemia in HO-1/Luc mice. Liver Transpl, 2006, 12(11): 1634 - 1639.
- [4] 胡明政, 吴建武, 张伯, 等. 人源性 HO-1 基因转染在大鼠供肝缺血再灌注损伤中的抗凋亡作用. 中华实验外科杂志, 2008, 25(11): 1410 - 1411.
- [5] Geuken E, Buis CI, Vusser DS, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human livers before transplantation correlates with graft injury and function after transplantation. Am J Transplant, 2005, 5(8): 1875 - 1885.
- [6] Kaizu T, Nakao A, Tsung A, et al. Carbon monoxide inhalation

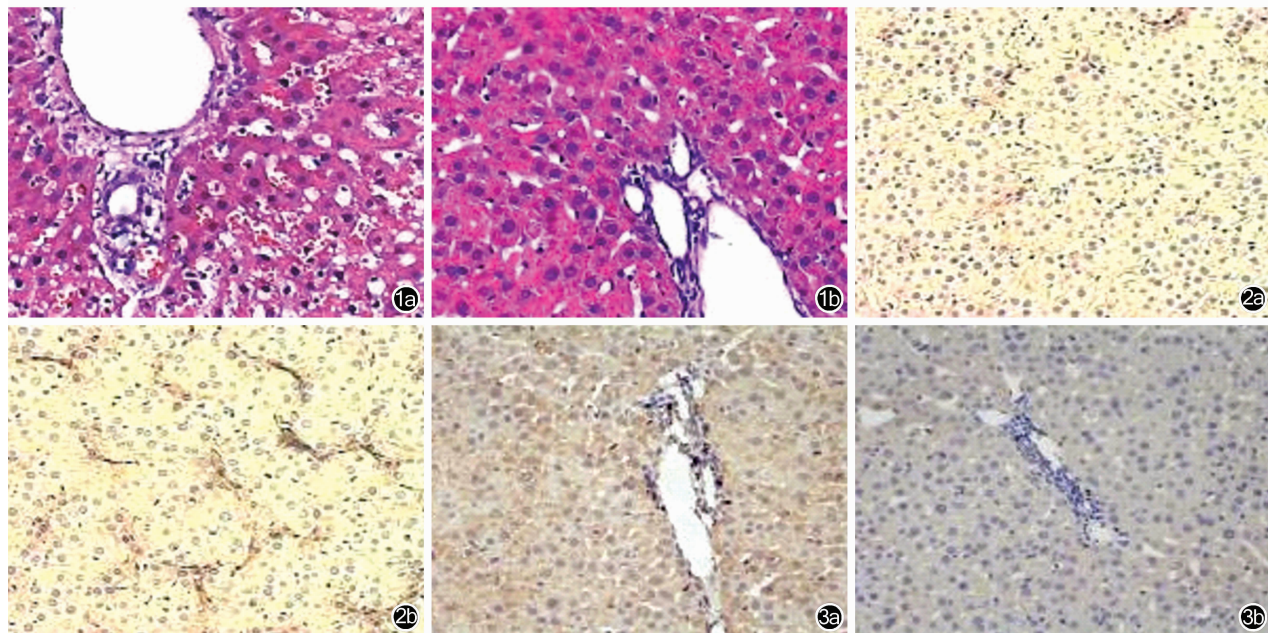


图 1 肝移植术后肝脏组织的病理改变 HE × 200 1a: 对照组肝窦扩张并有大量红细胞, 汇管区炎性细胞浸润, 血管内皮破坏, 肝实质内有散在的炎性细胞; 1b: 实验组肝结构基本正常, 肝细胞无变性坏死 图 2 肝移植术后 HO-1 阳性细胞的表达 SP × 100 2a: 对照组仅见少许胞质黄染的细胞表达于血管区域; 2b: 实验组见大量胞质黄染的阳性细胞表达于血管区域 图 3 肝移植术后阳性巨噬细胞的表达 SP × 200 3a: 对照组血管壁可见较多核大而胞质黄染的细胞; 3b: 实验组血管壁偶见较多核大而胞质黄染的细胞

- ameliorates cold ischemia/reperfusion injury after rat liver transplantation. *Surgery*, 2005, 138(2): 229-235.
- [7] Tomiyama K, Ikeda A, Ueki S, et al. Inhibition of Kupffer cell-mediated early proinflammatory response with carbon monoxide in transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Hepatology*, 2008, 48(5): 1608-1620.
- [8] Fondevila C, Shen XD, Tsuchiyashi S, et al. Biliverdin therapy protects rat livers from ischemia and reperfusion injury. *Hepatology*, 2004, 40(6): 1333-1341.

- [9] López-Nebolina F, Toledo-Pereyra LH. Anti-ischemic effect of selectin blocker through modulation of tumor necrosis factor- α and interleukin-10. *J Surg Res*, 2007, 138(2): 275-283.
- [10] Kanoria S, Jalan R, Seifalian AM, et al. Protocols and mechanisms for remote ischemic preconditioning: a novel method for reducing ischemia reperfusion Injury. *Transplantation*, 2007, 84(4): 445-458.

(收稿日期: 2010-03-26)

(本文编辑: 张昊)

脾静脉-左肾上腺静脉吻合术治疗门静脉海绵样变

戈小虎 李雪松 赛力木 任昊 慈红波

【摘要】 目的 探讨脾静脉-左肾上腺静脉吻合术治疗门静脉海绵样变的疗效。**方法** 分析 2004 年 6 月至 2010 年 5 月新疆维吾尔自治区人民医院收治的 5 例门静脉海绵样变患者的临床资料。采用脾静脉-左肾上腺静脉分流 + 贲门周围血管离断术治疗该病。**结果** 5 例患者中, 3 例行脾静脉-左肾上腺静脉端侧吻合, 2 例行脾静脉-左肾上腺静脉端端吻合, 分流术后门静脉压力下降至 $18 \sim 24 \text{ cm H}_2\text{O}$ ($1 \text{ cm H}_2\text{O} = 0.098 \text{ kPa}$)。全组患者无手术死亡, 术后无消化道出血、肝功能异常。前 4 例患者术后每间隔 6 ~ 12 个月复查 B 超, 吻合口血流通畅, 无血栓形成。**结论** 门静脉海绵样变患者左肾上腺静脉通常增粗, 脾静脉-左肾上腺静脉分流术是合理、简单的手术方式。

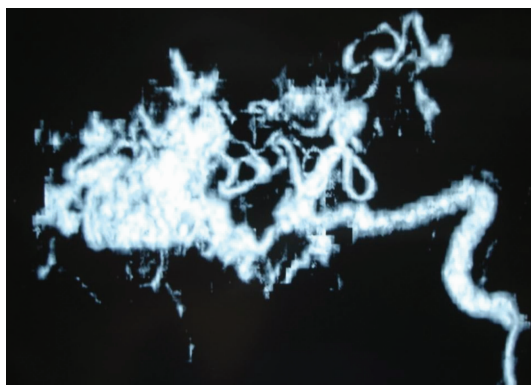
【关键词】 门静脉海绵样变; 分流手术

门静脉海绵样变(cavernous transformation of portal vein, CTPV)是指门静脉主干或其分支完全或部分堵塞后, 在其周围形成的海绵样扭曲的静脉网。我科在前期研究的基础上, 逐步在临床中开展脾静脉-左肾上腺静脉这一新的分流方法治疗门静脉海绵样变^[1-2]。本研究回顾性分析 2004 年 6 月至 2010 年 5 月我科采用该分流手术治疗 5 例 CTPV 患者的临床资料, 旨在探讨该病的治疗方法和术后疗效。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本组 5 例 CTPV 患者, 均为女性; 年龄 13 ~ 24 岁, 平均年龄 18 岁。5 例患者均有多次呕血、黑便病史。体格检查: 贫血貌, 皮肤及巩膜未见黄染, 脾脏肋下可扪及。血常规检查: WBC、Hb、PLT 均有不同程度下降。CT 或 MRI 血管成像检查: 肝外门静脉及其周围呈蜂窝状血管团(图 1); 食管、胃底处可见迂曲静脉丛; 脾中度至高度肿大。胃镜检查: 食管胃底静脉重度曲张。术前诊断: 门静脉海绵样变, 门静脉高压症, 脾功能亢进。



门静脉及其周围呈蜂窝状血管团

图 1 MRI 血管成像检查结果

1.2 手术方法

手术探查见肝脏大小、形态、质地未见异常, 肝门处可见海绵状血管瘤样改变, 脾脏淤血、肿大, 冠状静脉扩张、迂曲。5 例患者术中测门静脉压力为 $32 \sim 40 \text{ cm H}_2\text{O}$ ($1 \text{ cm H}_2\text{O} = 0.098 \text{ kPa}$)。切除脾脏后, 解剖显露左肾静脉, 见左肾静脉、左肾上腺静脉及卵巢静脉增粗, 部分呈“佛手”样改变(图 2)。因患者肾静脉较短, 游离后与脾静脉无法吻合, 而左肾上腺静脉直径约 6 ~ 8 mm, 与脾静脉距离较为接近, 且易于游离。故行脾静脉-左肾上腺静脉分流 + 贲门周围血管离断术(图 3, 4)。

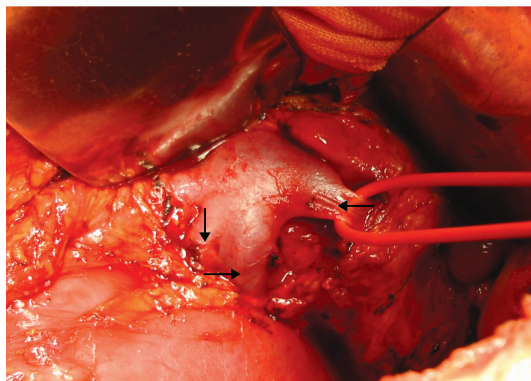


图 2 术中可见左肾静脉(→)、左肾上腺静脉(←)及卵巢静脉(↓)增粗, 部分呈“佛手”样改变

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2010.05.022

作者单位: 830001 乌鲁木齐, 新疆维吾尔自治区人民医院肝胆外科