



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.011
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3757.shtml

· 基础研究 ·

乌司他丁对大鼠原位肝脏移植供肝的保护作用

江翰, 王子豪, 李永盛, 边睿, 施伟斌

(上海交通大学医学院附属新华医院 普通外科, 上海 200092)

摘要

目的: 探讨乌司他丁对大鼠原位肝脏移植供肝的保护作用及机制。

方法: 分别用单纯 UW 液 (模型组) 或含乌司他丁 (乌司他丁组)、HO-1 诱导剂 CoPP (CoPP 组)、HO-1 抑制剂 ZnPP (ZnPP 组) 的 UW 液灌注切取的供体大鼠肝脏并保留灌注液 1 h 后, 原位移植受体大鼠。移植后 24 h 取移植肝脏与受体大鼠血标本, 行肝脏病理学检查及评分; 分别用 real-time PCR 和 Western bolt 法检测肝组织 HO-1 mRNA 与蛋白的表达; 用 Elisa 法检测大鼠血清中 IL-2 和 IL-10 的含量。

结果: 与模型组比较, 乌司他丁组与 CoPP 组供肝的损伤明显减轻、Suzuki 评分降低, 而 ZnPP 组损伤加重、Suzuki 评分升高 (均 $P < 0.05$); 乌司他丁组与 CoPP 组 HO-1 mRNA 与蛋白的表达明显上调, 而 ZnPP 组明显下调 (均 $P < 0.05$); 乌司他丁组与 CoPP 组大鼠血清中 IL-2 水平明显降低、IL-10 水平明显升高, 而 ZnPP 组 IL-2 水平明显升高、IL-10 水平明显降低 (均 $P < 0.05$)。

结论: 乌司他丁可能通过上调移植大鼠肝脏的 HO-1 水平, 减轻再灌注损伤、抑制排斥反应而发挥保护作用。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(1):53-57]

关键词

肝移植; 血红素加氧酶-1; 乌司他丁; 大鼠
中图分类号: R675.3

Protective effect of ulinastatin on liver grafts in rats with orthotopic liver transplantation

JIANG Han, WANG Zihao, LI Yongsheng, BIAN Rui, SHI Weibin

(Department of General Surgery, Xinhua Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China)

Corresponding author: SHI Weibin, Email: weibindr@aliyun.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the protective effect of ulinastatin on the liver grafts in rats with orthotopic liver transplantation and its mechanism.

Methods: The livers removed from the donors were respectively perfused with UW solution alone (model group) or UW solution containing ulinastatin (ulinastatin group), heme oxygenase 1 (HO-1 group) inducer CoPP (CoPP group) or HO-1 inhibitor ZnPP (ZnPP group), with perfusate reservoir for 1 h, and then were orthotopically transplanted into the recipient rats. The liver grafts and blood samples were harvested from the recipient rats at 24 h after transplantation, the pathological examination and scoring for the liver was performed, the HO-1 mRNA and protein expressions in the liver grafts were determined by real-time PCR and Western bolt respectively, and the serum levels of IL-2 and IL-10 were detected by Elisa assay.

Results: Compared with model group, the injuries in the liver grafts were remarkably alleviated and Suzuki

基金项目: 上海市科学技术科研计划项目 (11nm0503700); 广东天普研究基金资助项目 (01201116)。

收稿日期: 2013-10-24; 修订日期: 2013-12-20。

作者简介: 江翰, 上海交通大学医学院附属新华医院住院医师, 主要从事肝胆胰疾病分子靶向治疗方面的研究。

通信作者: 施伟斌, Email: weibindr@aliyun.com

scores were significantly decreased in ulinastatin group and CoPP group, while the liver injury was aggravated and Suzuki score was significantly increased in ZnPP group (all $P < 0.05$); the HO-1 mRNA and protein expressions in the liver grafts were significantly up-regulated in ulinastatin group and CoPP group, but were significantly down-regulated in ZnPP group (all $P < 0.05$); the IL-2 levels were decreased and IL-10 levels were increased significantly in ulinastatin group and CoPP group, while the IL-2 level was increased and IL-10 level was decreased significantly in ZnPP group (all $P < 0.05$).

Conclusion: The protective effect of ulinastatin on the liver grafts in rats may probably be associated with its up-regulating HO-1 expression and thereby reducing the reperfusion injury and inhibiting the rejection reaction.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(1):53-57]

KEYWORDS Liver Transplantation; Heme Oxygenase-1; Ulinastatin; Rats

CLC number: R675.3

移植组织本身存在着的保护性基因(protective gene)在肝移植中的作用已经被人们所认识^[1-3]。在保护性基因中,最有效、研究最多的是血红素加氧酶 1(heme oxygenase 1, HO-1)^[4-5]。HO-1 可促进 T 细胞增殖和 IL-2 分泌的功能,但不影响 IL-10 的分泌^[6],其靶细胞是机体最强的抗原递呈细胞,树突状细胞(dendritic cell, DC)^[7]。之前已有实验^[8-9]提示乌司他丁(ulinastatin)调节机体免疫也表现为抑制 IL-2 分泌,不影响 IL-10 分泌。那么乌司他丁的这种免疫调节作用是否是通过调控 HO-1 表达来实现的呢?为此本实验通过建立大鼠原位肝移植模型来进一步研究乌司他丁对肝脏保护效应的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 供体雄性 Wistar 大鼠,46 只,体质量 150~200 g;受体雄性 SD 大鼠,体质量 300~350 g,均购于中科院上海分院实验动物中心。

1.1.2 药物 乌司他丁购自广东天普生化医药公司,生理盐水购自广东大冢制药,低分子肝素购自葛兰素史克,RT-PCR 试剂盒购自 TaKaRa。兔抗鼠 HO-1 多克隆抗体购自 Santa Cruz,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 抗体购自 Sigma 公司。UW 液购自美国 DuPont Critical Care 公司,其他试剂均为国产分析纯试剂。IL-2, IL-10 酶联免疫试剂盒(购自上海岳阳生物技术公司)。

1.2 方法

1.2.1 PV 和 IVC 套管和胆道支架管的制作^[10]

PV 和 IVC 套管由硬质塑胶管制成,套管壁刻槽,套管长 2 mm,套管柄长 2 mm。PV 套管外径

2.0 mm,内径 1.8 mm;IVC 套管外径 3.0 mm,内径 2.8 mm。胆道支架管由硬膜外导管制成,直径 0.8 mm,长 4 mm。

1.2.2 实验分组 模型动物随机分为 4 组:模型组(UW 液)、乌司他丁组(5 万 U/kg)、CoPP 组(HO-1 诱导剂 CoPP 5 mg/kg)和 ZnPP 组(HO-1 抑制剂 ZnPP 20 mg/kg),每组 10 只。

1.2.3 手术方法 大鼠麻醉采用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,原位肝移植手术方法采用改良的 Kamada 二袖套法^[11]。

1.2.3.1 供体手术 术前 12 h 禁食,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,上腹部反“L”切口进腹,游离肝脏左叶,游离门静脉左支、肝左动脉、肝左静脉和左肝管,钳夹右正中裂离断肝实质,结扎断面的细小血管、胆管分支。经门静脉左支插入灌注管,左肝动脉近心端近分叉处插入动脉灌注管进行灌注,灌注液为 4 ℃的 UW 液(含低分子肝素 10 U/mL)经左肝管断端插管冲洗胆道,至流出液清澈无血,肝脏冷却后,离断肝周血管,切除左半肝,称重,置 4 ℃的 UW 液中修整。清洗腹腔,关腹。

1.2.3.2 保留灌注 供体手术中将相应药物溶解于灌注液若干,实施保留灌注。肝左动静脉插管后,以含药物的灌注液灌洗至肝叶冷却,切出的供肝修整结束后,再从动静脉灌入含药灌注液(模型组以 UW 代替),夹闭血管以保留灌注液时间为 1 h。等移去受体肝脏时,开放供肝血管,用 4 ℃的 UW 液冲洗后放入供体腹腔完成吻合。

1.2.3.3 受体手术 麻醉及手术切口同供体手术。游离肝脏:游离肝上及肝下腔静脉;游离左右门静脉分支;离断胃十二指肠动脉,游离肝动脉及胆

总管,在近肝实质处离断肝管分支,离断肝短静脉将下腔静脉与肝尾叶分离,游离肝右、肝中和肝左静脉主干并离断,结扎肝右静脉,移除受体肝脏,妥善修整各血管断端,肝静脉成型。将供肝置入受体动物腹腔,连续缝合吻合肝静脉成型口和供肝肝左静脉,吻合门静脉和供肝门静脉左支,恢复肝脏血流。供肝肝左动脉和受体肝总动脉对端吻合重建肝动脉。胆总管和供肝左肝管对端吻合。清洗腹腔,关腹。术后供、受体均单笼饲养,24 h后开始进食^[12]。

1.2.4 样本留取及检测指标 各组于术后24 h取外周血及肝脏。检测肝脏组织形态学变化,用Suzuki评分来评价肝脏移植后肝再灌注损伤程度;用real-time PCR检测移植肝组织中的HO-1 mRNA的表达;Western bolt法检测移植肝组织中的HO-1蛋白表达;IL-2, IL-10的检测方法按照试剂盒说明书采用双抗体夹心ELISA法检测。

1.3 统计学处理

采用SPSS 18.0软件进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型的建立

围手术期大鼠因麻醉死亡2只,大鼠肝原位肝移植成功40只,死亡4只,成功率87.0%(40/46)(图1)。

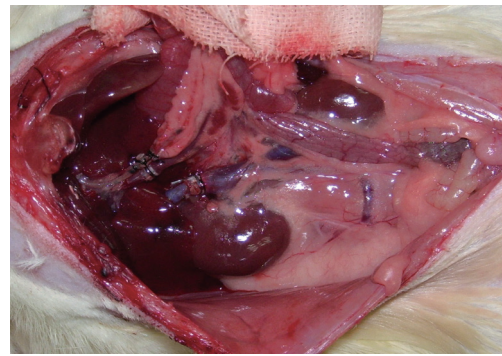


图1 成功的大鼠原位肝移植

Figure 1 Successful orthotopic liver transplantation

2.2 各组移植肝脏形态学变化

模型组有明显的再灌注损伤病理改变,与模型组比较,乌司他丁组和CoPP组肝组织损伤减轻,而ZnPP组肝组织损伤加重(图2)。各组移植肝组织Suzuki评分差异有统计学意义(均 $P<0.05$)(表1)。

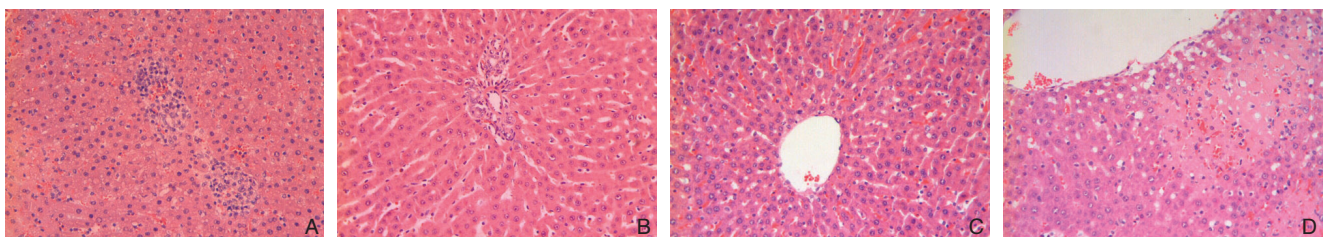


图2 肝移植术后24 h肝脏病理切片(HE \times 200)

A: 模型组; B: 乌司他丁组; C: CoPP组; D: ZnPP组

Figure 2 Graft tissue sections at 24 h after liver transplantation (HE \times 200)

A: Model group; B: Ulinastatin group; C: CoPP group;

D: ZnPP group

表1 各组肝损伤 Suzuki 评分比较

Table 1 Suzuki scores for liver injury in each group

组别	评分
模型组	2.83 \pm 0.75
乌司他丁组	1.33 \pm 0.52 ¹⁾
CoPP组	1.66 \pm 0.82 ¹⁾
ZnPP组	3.33 \pm 0.58 ¹⁾

注: 1) 与模型组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. model group

2.3 各组移植肝脏 HO-1 mRNA 的表达

与模型组比较,乌司他丁组和CoPP组肝组

织HO-1 mRNA表达明显升高,而ZnPP组肝组织HO-1 mRNA表达明显降低(均 $P<0.5$)(图3)。

2.4 各组移植肝脏 HO-1 蛋白的表达

各组肝组织HO-1蛋白的表达改变与HO-1 mRNA表达改变趋势一致(图4)。

2.5 各组受体大鼠血清 IL-2 水平

与模型组IL-2水平(34.2 pg/mL)比较,乌司他丁组与CoPP组大鼠术后24 h血清中IL-2水平明显降低,分别为20.1 pg/mL和19.8 pg/mL,而ZnPP组IL-2水平明显升高,达45.5 pg/mL,差

异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 5)。

2.6 各组受体大鼠血清 IL-10 水平

与模型组 IL-10 水平 (65.7 pg/mL) 比较, 乌司他丁组与 CoPP 组大鼠术后 24 h 血清 IL-10 水

平明显升高, 分别为 89.8 pg/mL 和 92.1 pg/mL, 而 ZnPP 组水 IL-10 水平明显降低 (40.2 pg/mL), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$) (图 6)。

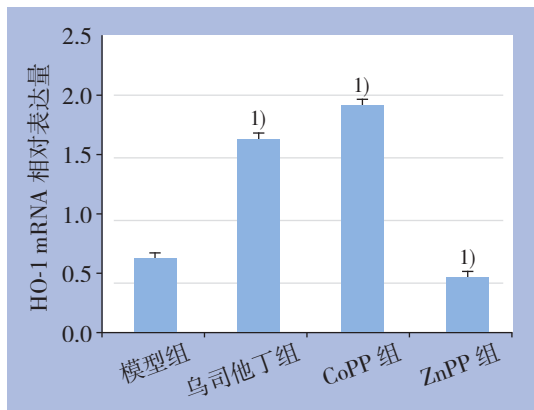


图 3 各组移植后 24 h 肝脏组织中 HO-1 mRNA 表达 1) 与模型组比较, $P < 0.05$

Figure 3 HO-1 mRNA expressions in the liver grafts in each group at 24 h after transplantation 1) $P < 0.05$ vs. model group

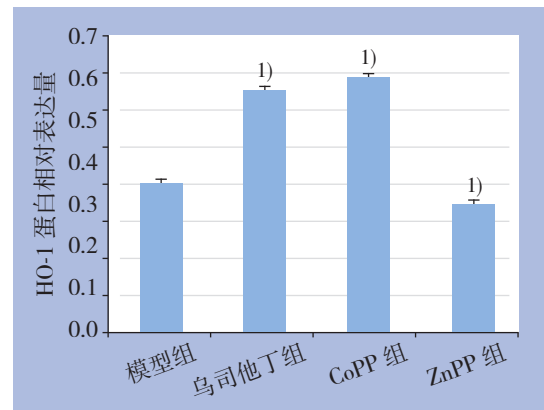


图 4 各组移植后 24 h 肝脏组织中 HO-1 蛋白表达 1) 与模型组比较, $P < 0.05$

Figure 4 HO-1 protein expression in the liver grafts in each group at 24 h after transplantation 1) $P < 0.05$ vs. model group

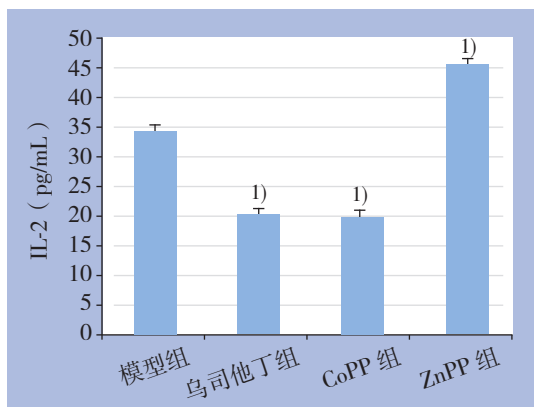


图 5 各组移植术后 24 h 血清 IL-2 含量 1) 与模型组比较, $P < 0.05$

Figure 5 The serum IL-2 levels in each group at 24 h after transplantation 1) $P < 0.05$ vs. model group

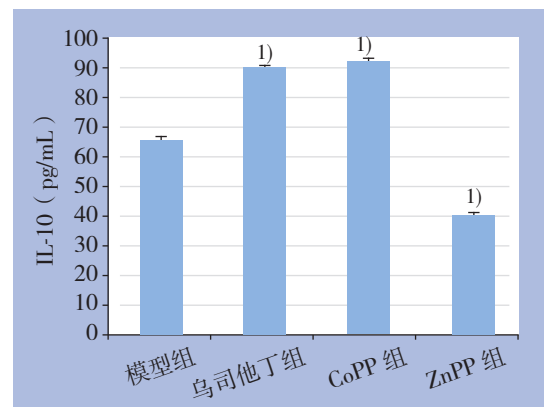


图 6 各组移植术后 24 h 血清 IL-10 含量 1) 与模型组比较, $P < 0.05$

Figure 6 The serum IL-10 levels in each group at 24 h after transplantation 1) $P < 0.05$ vs. model group

3 讨论

抑制宿主免疫系统对移植物的排异反应, 是维护移植物功能的最主要的因素^[13]。由于特异性免疫耐受的机制尚未能弄清, 而器官克隆、干细胞移植到临床应用尚需经历漫长的道路, 因此, 移植后的免疫调节依然是免疫抑制为主^[14-16]。但是, 免疫抑制剂的长期乃至终生应用会引发了一系列的毒副作用, 包括过敏反应、肝肾毒性、神经毒

性、过度免疫抑制继发感染及恶性肿瘤的发生等等, 同时患者还需承担高额的费用, 这些都给移植受体带来了十分不利的影 响^[17-19]。因此, 寻找有效、低毒而且价廉的免疫抑制制剂, 一直都是学者们在移植后抑制宿主免疫排异方面努力的方向。

乌司他丁是从人尿液中分离出的一种尿胰蛋白酶抑制剂。有研究^[20-21]发现, 乌司他丁对炎症细胞因子以及溶酶体酶的释放具有一定的抑制作用。同时也能清除氧自由基, 降低血液黏滞度, 减

少缺血再灌注损伤,并对肝、肾功能有一定的保护作用。

血红素氧合酶(hemeoxygenase, HO)是血红素分解代谢的限速酶,主要包括HO-1、HO-2、HO-3等同工酶。研究显示HO-1除了固有的降解血红素外,还能通过多种调控机制产生抗氧化、抗炎、抗凋亡等一系列生物学效应^[4]。

本研究结果显示,乌司他丁供肝保留灌注移植植物可以上调肝组织的HO-1表达,同时降低受体大鼠IL-2水平、升高其IL-10水平,提示乌司他丁可能具有抑制移植后急性免疫排斥和减轻缺血再灌注损伤的双重保护作用,从而保护了移植物的功能。通过本次实验,验证了肝移植术后同时发挥上调保护性基因HO-1,并抑制宿主免疫排斥的肝脏保护的双重效应理论的可行性,为活体肝移植(LDLT)术后肝脏保护综合治疗提供新的思路,也为乌司他丁成为该综合治疗方案中的新型有效、低毒、价廉药物的应用前景提供实验支持,最终为LDLT在临床上的广泛应用发展和肝移植质量的提高提供理论指导和实验支持。

参考文献

- [1] Matthay MA, Howard JP. Progress in modelling acute lung injury in a pre-clinical mouse model[J]. *Eur Respir J*, 2012, 39(5):1062-1063.
- [2] Dushianthan A, Grocott MP, Postle AD, et al. Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury[J]. *Postgrad Med J*, 2011, 87(1031):612-622.
- [3] Pae HO, Oh GS, Choi BM, et al. Carbon monoxide produced by heme oxygenase-1 suppresses T cell proliferation via inhibition of IL-2 production[J]. *J Immunol*, 2004, 172(8):4744-4751.
- [4] Otterbein LE, Choi AM. Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279(6):L1029-1037.
- [5] Kim YS, Zhuang H, Koehler RC, et al. Distinct protective mechanisms of HO-1 and HO-2 against hydroperoxide-induced cytotoxicity[J]. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(1):85-92.
- [6] Inoue KI, Takano H. Urinary trypsin inhibitor as a therapeutic option for endotoxin-related inflammatory disorders[J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19(4):513-520.
- [7] Luedde T, Liedtke C, Manns MP, et al. Losing balance: cytokine signaling and cell death in the context of hepatocyte injury and hepatic failure[J]. *Eur Cytokine Netw*, 2002, 13(4):377-383.
- [8] Tang-Feldman YJ, Lochhead GR, Lochhead SR, et al. Interleukin-10 repletion suppresses pro-inflammatory cytokines and decreases liver pathology without altering viral replication in murine cytomegalovirus (MCMV)-infected IL-10 knockout mice[J]. *Inflamm Res*, 2011, 60(3):233-243.
- [9] Hu Y, Russek SJ. BDNF and the diseased nervous system: a delicate balance between adaptive and pathological processes of gene regulation [J]. *J Neurochem*, 2008, 105(1):1-17.
- [10] 孙鹏,蔡端,张群华,等. 异种反应性天然抗体在豚鼠至大鼠肝移植中的作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2002, 19(2):120-121.
- [11] 李强,李敬东,李德新,等. 大鼠原位肝移植制作过程中常见失败原因分析及处理策略[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(1):30-34.
- [12] 熊力,王玉柱,叶启发,等. 大鼠自体原位肝移植灌注模型的技术改良[J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(7):716-717.
- [13] Brasile L, Buelow R, Stubenisky BM, et al. Induction of heme oxygenase-1 in kidneys during ex vivo warm perfusion[J]. *Transplantation*, 2003, 76(8):1145-1149.
- [14] Amersi F, Shen XD, Anselmo D, et al. Ex vivo exposure to carbon monoxide prevents hepatic ischemia/reperfusion injury through p38 MAP kinase pathway[J]. *Hepatology*, 2002, 35(4):815-823.
- [15] Tullius SG, Nieminen-Kelhä M, Buelow R, et al. Inhibition of ischemia/reperfusion injury and chronic graft deterioration by a single-donor treatment with cobalt-protoporphyrin for the induction of heme oxygenase-1[J]. *Transplantation*, 2002, 74(5):591-598.
- [16] Yin D, Zhou C, Kusaka I, et al. Inhibition of apoptosis by hyperbaric oxygen in rat cerebral ischemic model[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003, 23(7):855-864.
- [17] Russo-Neustadt AA, Beard RC, Huang YM, et al. Physical activity and antidepressant treatment potentiate the expression of specific brain-derived neurotrophic factor transcripts in the rat hippocampus[J]. *Neuroscience*, 2000, 101(2):305-312.
- [18] Zaitzu M, Hamasaki Y, Tashiro K, et al. Ulinastatin, an elastase inhibitor, inhibits the increased mRNA expression of prostaglandin H2 synthase-type 2 in Kawasaki disease[J]. *J Infect Dis*, 2000, 181(3):1101-1109.
- [19] Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, et al. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme[J]. *Trends Immunol*, 2003, 24(8):449-455.
- [20] Duckers HJ, Boehm M, True AL, et al. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation[J]. *Nat Med*, 2001, 7(6):693-698.
- [21] Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, et al. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis[J]. *J Exp Med*, 2000, 192(7):1015-1026.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 江翰,王子豪,李永盛,等. 乌司他丁对大鼠原位肝脏移植供肝的保护作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(1):53-57. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.011
Cite this article as: JIANG H, WANG ZH, LI YS, et al. Protective effect of ulinastatin on liver grafts in rats with orthotopic liver transplantation[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(1):53-57. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.01.011