

文章编号:1005-6947(2006)07-0508-04

· 基础研究 ·

三七总皂甙对大鼠移植肝缺血再灌注损伤的保护作用

李远明, 叶启发, 张毅, 明英姿, 刘斌, 赵于军

(中南大学湘雅三医院 湘雅移植医学研究院, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 探讨三七总皂甙预处理对大鼠移植肝缺血再灌注损伤的保护作用。方法 建立大鼠原位肝移植模型,然后分为三七预处理组(P组)、对照组(N组)和假手术组(S组)3组,取血检查ALT,AST;用免疫组化法检测 caspase-3 和 TNF- α 的表达, TUNEL 法检测肝细胞凋亡,行肝组织病理检查。结果 鼠肝移植模型 N 组的血 ALT, AST 数值、肝细胞中 caspase-3 和 TNF- α 的表达及肝细胞的凋亡均明显高于 P 组,差异均有显著意义($P < 0.05$)。结论 肝细胞凋亡加重移植肝缺血再灌注损伤,三七总皂甙预处理对大鼠肝移植缺血再灌注损伤有保护作用。

关键词:肝移植;再灌注损伤;模型;动物;三七总皂甙

中图分类号:R657.3;R619.9

文献标识码:A

The protective effect of panax notoginseng saponins on the transplanted liver during ischemia-reperfusion injury in rat with orthotopic liver transplantation

LI Yuan-ming, YE Qi-fa, ZHANG Yi, MING Ying-zi, LIU Bin, ZHAO Yu-jun

(Xiangya Transplantation Medical Academy, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective function of panax notoginseng saponins (PNS) on grafted liver during ischemia-reperfusion in rat with orthotopic liver transplantation. **Methods** After establishing rat orthotopic liver transplantation model, the rats were randomly divided into three groups: the experimental group (P), the control group (N), and sham operation group (S). The levels of serum ALT and AST were determined, the hepatic pathohistological changes were observed, the expression of caspase-3 and TNF- α were examined by immunohistochemistry, and the apoptotic hepatocytes in grafted liver were detected by TUNEL method. **Results** The levels of ALT, AST, and the expression of caspase-3 and TNF- α , and apoptotic cells in grafted liver were significantly higher in the control group than that in the experimental group. **Conclusions** PNS can protect the grafted liver from injury during ischemia-reperfusion in rat orthotopic liver transplantation.

Key words: Liver Transplantation; Reperfusion Injury; Models, Animal; Panax Notoginseng Saponins

CLC number: R657.3; R619.9

Document code: A

肝移植目前已被广泛接受,是为治疗终末期肝病的惟一手段,目前,原发性移植肝无功能已成为继排异反应之后导致再移植的第二大原因。同时还有移植后移植肝出现原发性功能紊乱。产生这

种并发症的主要原因之一是缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤。过去认为 IR 损伤只出现细胞坏死。随着研究的深入,发现细胞凋亡和坏死早期存在部分相似和共有的某些机制。本研究观察移植肝 IR 损伤中 caspase-3 和 TNF- α 的表达,三七总皂甙(panax notoginseng saponins, PNS)是否可以保护移植肝 IR 损伤及可能的作用途径,企为治疗移植肝 IR 损伤提供新的保护方法。

收稿日期:2005-07-20; 修订日期:2005-12-19。

作者简介:李远明,男,湖南怀化人,中南大学湘雅三医院博士研究生,主要从事腹部器官移植基础与临床方面的研究。

通讯作者:李远明 E-mail:lymoy@sohu.com。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂

三七总皂甙购于昆明制药集团股份有限公司。caspase-3 和 TNF- α 免疫组化抗体均来自武汉博士得公司。细胞凋亡检测试剂盒购于德国宝灵曼公司。

1.2 实验动物及分组

雄性 SD 大鼠购于中南大学实验动物中心,体重为 250 ~ 300 g,分别用作供、受体,术前禁食 12 h。将动物随机分为 3 组:(1)生理盐水对照组(N 组,18 只),切取供肝前 1 h 经阴茎背静脉注射生理盐水(NS) 2 mL;(2)三七总皂甙预处理组(P 组,18 只),切取供肝前 1 h 静脉注射 PNS(50 mg/kg) + NS 共 2 mL;(3)假手术对照组(S 组,6 只),打开腹腔,仅游离肝脏,结扎左膈下静脉及右肾上腺静脉。

1.3 大鼠原位肝移植术(OLT)模型建立

采用 Kamada's 袖套法^[1],即用袖套法吻合肝下腔静脉和门静脉,肝上下腔静脉的吻合采用对端缝合,以内置支撑管吻合胆管,不吻合肝动脉。供体手术选用乙醚半开放麻醉,解剖胆总管时将长 4 mm 的塑料管的一半插入胆总管后结扎固定。将切除的供肝置于 4℃ 生理盐水保存液中。袖套管由聚乙烯制成。血管袖套的准备在保存液中完成,血管袖套和袖套柄的长度均为 2 mm。受体手术也用乙醚半开放麻醉,切除受体肝脏后,供肝置入原位,用 7-0 线对端吻合肝上下腔静脉,供肝门静脉套管插入受体门静脉,结扎固定,恢复供肝血供,结束无肝期。将供体肝下腔静脉套管及胆总管支撑管插入受体肝下腔静脉和胆总管,结扎固定。供肝的热缺血时间为 0 ~ 1 min,冷缺血时间为 2 h,无肝期平均为(19.25 ± 2.27) min(16 ~ 23 min)。

1.4 标本获取

N 组、P 组于供肝再灌注后 2, 6, 24 h 各时点处死,S 组于术后同样时点处死。从下腔静脉采集血标本,送检丙氨酸转氨酶(ALT)、天门冬氨酸转氨酶(AST);取肝中叶,右半部分置 -80℃ 保存,左半部分用 10% 的福尔马林溶液固定,石蜡包埋待用。

1.5 标本检测

1.5.1 ALT, AST 的检测 于各时点下腔静脉采血,用日立 7170S 全自动生化分析仪检测。

1.5.2 组织学检查 石蜡包埋的肝组织行 5 μ m

连续切片,HE 染色,普通光学显微镜下观察。

1.5.3 免疫组化检测移植肝组织 caspase-3 和 TNF- α 的表达 (1) caspase-3/TNF- α 免疫组化实验步骤:组织用 10% 中性福尔马林固定常规切片 3 μ m,脱蜡至水,然后用磷酸盐缓冲液(PBS)水化 10 min;用含 0.5% H₂O₂ 的甲醇溶液室温孵育 30 min 后,PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加正常血清封闭液,室温孵育 30 min 后,甩去多余液体,不洗;滴加小兔抗人 caspase-3/TNF- α 多克隆抗体(滴度 1:50),4℃ 孵育过夜;PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加生物素标记的羊抗兔 IgG,于 37℃ 孵育 30 min 后,PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加 S-A/HRP 工作液,于 37℃ 孵育 30 min 后,PBS 洗 3 次,每次 5 min;在 0.05% DAB 溶液中加入 H₂O₂ 至终浓度为 0.03%,以此作为显色液,镜下控制显色;显色满意后,用梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。(2)免疫组化结果判定:阳性细胞评定标准以细胞浆染色成棕黄色为阳性细胞。

1.5.4 TUNEL 法检测肝细胞凋亡 操作按说明书进行,在末端脱氧核酸转移酶(TdT)介导下,使生物素化的三磷酸脱氧尿苷(dUDP)标记至 DNA 断裂后形成的 3'-OH 末端,借助生物素与亲和素的特异结合,使过氧化物酶连接至 DNA 断点,加入底物,最后常规二氨基联苯胺液显色,苏木精复染。阳性对照采用试剂盒所带阳性片,阴性对照用 PBS 替代 TdT。镜下观察细胞核中棕黄着色的凋亡细胞。凋亡细胞的形态须符合以下 4 点:单个细胞,周围无炎症反应及坏死,胞膜皱缩,胞核致密深染呈棕黄色颗粒或碎片。每例切片计数 5 个 400 倍视野,细胞凋亡指数(AI) = 凋亡细胞数/总细胞数 × 100%^[2]。

1.6 统计学处理

数值均采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。用 SAS 软件分别对各组数据进行方差分析及两两组间 *t* 检验。

2 结果

2.1 血清 ALT, AST 水平

2.1.1 血清 ALT 水平 供肝再灌注后 2, 6, 24 h 时点,大鼠肝移植模型 N 组及 P 组均较 S 组明显升高($P < 0.01$),N 组较 P 组明显升高,差异有显著意义($P < 0.01$)(表 1)。

2.1.2 血清 AST 水平 N 及 P 组较 S 组明显升高($P < 0.01$),N 组较 P 组明显升高,差异有显著

意义 ($P < 0.05$) (表1)。

2.2 组织学变化

光镜下观察, S组大鼠肝组织结构未见明显异常; 而N组及P组大鼠的肝组织可见不同程度的肝窦充血和肝细胞肿胀, 且P组肝组织的损害程度明显减轻。

2.3 免疫组化图像分析及数据处理结果

在物镜40倍视野下, 每组随机选取20个视野, 用HPIAS-1000型全自动彩色图像分析系统测定肝细胞内棕黄色颗粒的平均吸光度(A)值。S组各时点肝细胞中仅见极少量caspase-3和TNF- α 的表达, 供肝再灌注后2h N组caspase-3和TNF- α 的表达明显高于P组, 差异有非常显著性 ($P < 0.01$) (表2)。

表1 大鼠移植肝再灌注后各时点血清ALT及AST水平(U/L)

组别	n	ALT			AST		
		2h	6h	24h	2h	6h	24h
S	6	59.75 ± 7.75	63.50 ± 7.72	60.75 ± 6.08	148.75 ± 23.03 ¹⁾	150.25 ± 14.08	141.25 ± 13.52
N	6	1039.50 ± 146.39 ¹⁾	1578.67 ± 266.43	463.67 ± 131.39 ¹⁾	1124.17 ± 165.09 ¹⁾	1742.00 ± 307.23 ¹⁾	622.83 ± 178.46 ¹⁾
P	6	526.83 ± 165.86 ^{1),2)}	1079.17 ± 93.60 ^{1),2)}	187.67 ± 39.63 ^{1),2)}	511.83 ± 131.01 ^{1),2)}	1232.67 ± 194.75 ^{1),2)}	408.33 ± 57.50 ^{1),3)}

注:1)与S组比较均为 $P < 0.01$;2)与N组比较 $P < 0.01$;3)与N组比较 $P < 0.05$

表2 免疫组化显示各组caspase-3和TNF- α 情况的表达¹⁾

组别	ALT			AST		
	2h	6h	24h	2h	6h	24h
S	0.1401 ± 0.0698	0.1478 ± 0.0542	0.1521 ± 0.0643	0.1183 ± 0.0253	0.1198 ± 0.0232	0.1267 ± 0.0274
N	0.5088 ± 0.1874	0.4906 ± 0.0982	0.3930 ± 0.0748	0.3349 ± 0.0375	0.3076 ± 0.0356	0.2277 ± 0.0340
P	0.3179 ± 0.0994	0.3011 ± 0.0865	0.3519 ± 0.0588 ²⁾	0.2772 ± 0.0202	0.2446 ± 0.0213	0.2164 ± 0.0458 ²⁾

注:1)结果以平均吸光度值表示;2)与N组比较 $P > 0.05$,其它各组间比较 $P < 0.01$

2.4 各组肝组织细胞的AI

S组大鼠各时点肝组织中仅见极少量凋亡细胞。供肝再灌注后2,24h N组AI明显高于P组, 差异有显著意义 ($P < 0.05$); 供肝再灌注后6h肝细胞凋亡最严重, N组AI明显高于P组, 差异有非常显著性 ($P < 0.01$) (表3)。

表3 大鼠移植肝再灌注后各时点肝组织的AI(%)变化

组别	鼠数	2h	6h	24h
S	6	3.45 ± 0.57 ¹⁾	3.72 ± 0.71 ¹⁾	3.65 ± 0.64 ¹⁾
N	6	26.83 ± 5.71	38.33 ± 4.93	33.33 ± 6.09
P	6	19.83 ± 3.66 ³⁾	26.33 ± 6.68 ²⁾	24.17 ± 4.88 ³⁾

注:1)与N组及P组比较 $P < 0.01$;2)与N组比较 $P < 0.01$;3)与N组比较 $P < 0.05$

图1 再灌注6h P组大鼠肝组织HE染色($\times 400$)

图2 再灌注6h N组大鼠肝组织HE染色($\times 400$)

3 讨论

对于移植肝而言, IR损伤是不可避免的。再

灌注损伤一方面可加重缺血引起的细胞坏死, 另一方面又可导致细胞凋亡, 而早期以细胞凋亡为主。肝脏IR后细胞凋亡的启动是由一系列受体

被激活而触发的,其中 TNF 受体基因家族编码的蛋白质在此过程中起了重要的作用^[3-5], Fas 与 FasL 系统是细胞凋亡中最主要的途径之一,通过 caspase 途径、核转录因子 NF- κ B 途径调控细胞凋亡^[6-9]。其中 caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的必经之路,也是凋亡的关键酶和执行者。在正常组织中, caspase-3 以酶原(pro-caspase-3)的形式存在,主要分布于胞浆,少量在线粒体、细胞核内,并不具有生物学功能,激活后才能发挥其生物学功能。 caspase-3 是细胞凋亡的效应分子,它在各种生理和病理因素刺激下,通过其家族成员的级联放大,实施细胞的凋亡^[10-12]。 IR 损伤时细胞凋亡相关基因的调控可通过以下方式:(1)受凋亡促进基因和凋亡抑制基因的双重调控,(2)受细胞凋亡与细胞增殖的双重调控,(3)受细胞周期的调控^[13-15]。本研究结果证实,在供肝再灌注后 6h 肝细胞凋亡最明显,该时点的凋亡指数明显高于其它时点。免疫组化检测肝组织中的 caspase-3 和 TNF- α 表达的结果显示,供肝再灌注后早期(2h) caspase-3 和 TNF- α 的表达高于后期(24h)。血清酶学检测也提示供肝再灌注后 6h 转氨酶最高,因为肝细胞与其它细胞不同,凋亡的肝细胞胞浆内的酶(如转氨酶)会释放到血循环中。这说明肝细胞凋亡在肝移植后再灌注早期即可发生,并可能参与肝移植后 IR 早期损伤过程, caspase-3 和 TNF- α 是促进细胞凋亡的基因,移植肝组织中 caspase-3 和 TNF- α 的表达与肝细胞凋亡正相关。

大鼠肝移植是研究移植肝 IR 损伤和免疫排斥最基本的模型。本实验首先建立大鼠移植肝 IR 模型,在切取供肝前用 PNS 预处理,通过其拮抗钙离子、减少自由基的产生,保护线粒体的功能等以达到阻遏或延迟细胞凋亡的发生,保护移植肝的功能。

许多疾病的发生与细胞凋亡失控有关。细胞凋亡功能亢进将导致组织损伤和器官衰竭,尽管 caspase 在调控细胞凋亡方面的重要性已被确认,但凋亡过程中蛋白水解酶被激活的实例大多是通过抑制剂和底物裂解的研究所得出的,直接的生化证据很少。相信随着对 caspase 研究的不断深

入,细胞凋亡信号转导的机制会更加清楚,也必将推动细胞凋亡有关疾病的治疗取得新的进展。

参考文献:

- [1] Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat, technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage [J]. *Transplantation*, 1979, 28(1): 47-50.
- [2] Reed JC. Apoptosis-based therapies [J]. *Nat Rev Drug Dis*, 2002, 1(2): 111-121.
- [3] 吴刚,刘永峰,成东华,等. 己酮可可碱对肝脏缺血再灌注损伤保护作用的实验研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(5): 353-356.
- [4] Hatano E, Tanaka A, Kanazawa A, *et al.* Inhibition of tumor necrosis factor-induced apoptosis in transgenic mouse liver expressing creatine kinase [J]. *Liver Int*, 2004, 24(4): 384-393.
- [5] 金中奎,张水军,程香普,等. 大鼠供肝冷缺血再灌注损伤中 TNF 的作用及己酮可可碱预处理的效果 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(11): 692-694.
- [6] Yano Y, Hayashi Y, Teramoto T, *et al.* Apoptotic pathway related to oval cell proliferation [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 19(8): 866-872.
- [7] Persad R, Liu C, Wu TT, *et al.* Overexpression of caspase-3 in hepatocellular carcinomas [J]. *Mod Pathol*, 2004, 17(7): 861-867.
- [8] Nakamoto Y, Kaneko S, Fan H, *et al.* Prevention of hepatocellular carcinoma development associated with chronic hepatitis by anti-fas ligand antibody therapy [J]. *J Exp Med*, 2002, 196(8): 1105-1111.
- [9] 陈能志,吕新生,魏尚典. 缺血预处理和 Caspase 抑制剂对缺血再灌注损伤保护作用的比较 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(11): 827-830.
- [10] Bertolaccini L, Olivero G. The role of apoptosis in hepatic graft rejection [J]. *Minerva Chir*, 2002, 57(5): 587-595.
- [11] Zhang H, Taylor J, Luther D, *et al.* Antisense oligonucleotide inhibition of Bcl-xL and Bid expression in liver regulates responses in a mouse model of Fas-induced fulminant hepatitis [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307(1): 24-33.
- [12] Ribeiro PS, Cortez-Pinto H, Sola S, *et al.* Hepatocyte apoptosis, expression of death receptors, and activation of NF- κ B in the liver of nonalcoholic and alcoholic steatohepatitis patients [J]. *Am J Gastroenterol*, 2004, 99(9): 1708-1717.
- [13] Lombard C, McKallip RJ, Hylemon PB, *et al.* Fas Ligand-dependent and -independent mechanisms of toxicity induced by T cell lymphomas in lymphoid organs and in the liver [J]. *Clin Immunol*, 2003, 109(2): 144-153.
- [14] 邵堂雷,蔡伟耀,李宏为. 移植肝再灌注损伤的发生机制 [J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10(2): 173-175.
- [15] Arikawa N, Morimoto Y, Yagi T, *et al.* Activated T cells and soluble molecules in the portal venous blood of patients with cholestatic and hepatitis C virus-positive liver cirrhosis. Possible promotion of Fas/FasL-mediated apoptosis in the bile-duct cells and hepatocyte injury [J]. *J Int Med Res*, 2003, 31(3): 170-180.