

文章编号:1005-6947(2008)07-0709-03

· 简要论著 ·

腺苷 A2 受体激动剂对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时细胞凋亡的影响

宋少伟, 刘永锋

(中国医科大学附属第一医院 普通外科教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 研究腺苷 A2 受体激动剂对大鼠缺血再灌注损伤(I/R)时肝细胞凋亡的影响。方法 通过门静脉插管,分别用 60 mL 4℃ HTK 保存液和含有腺苷 A2 受体激动剂 CGS21680 (30 μg/100 mL) HTK 保存液灌注大鼠肝脏,然后切取肝脏 4℃ HTK 液中保存 24 h, Krebs-Henseleit 缓冲液常温连续再灌注 45 min。检测灌注期间丙氨酸氨基转移酶(ALT)和谷氨酸乳酸脱氢酶(GLDH)及门静脉压力(PVP)的变化。灌注结束时检测灌洗液中细胞凋亡、脂质过氧化物(LPO)和胆汁分泌量的变化。结果 与对照组相比,CGS21680 组大鼠灌洗液中 ALT, GLDH 和 PVP 明显降低(均 $P < 0.01$),胆汁分泌量明显增加($P < 0.01$),LPO 含量明显降低($P < 0.05$),细胞凋亡明显减少($P < 0.05$)。结论 腺苷 A2 受体激动剂可减轻离体大鼠肝脏 I/R 损伤和细胞凋亡的发生率,其作用机制可能与氧自由基的减少有关。
[中国普通外科杂志, 2008, 17(7):709-711]

关键词: 肝/血液供给;缺血再灌注损伤;腺苷 A2 受体激动剂;细胞凋亡;氧自由基

中图分类号: R 657.3

文献标识码: B

肝脏缺血再灌注(I/R)损伤是造成移植物无功能的主要原因。腺苷通过其受体可以防止肝脏 I/R 损伤。越来越多的研究表明,细胞凋亡和氧自由基在器官 I/R 损伤中发挥重要作用,其影响冷热缺血后移植器官的活性。本实验观察腺苷 A2 受体激动剂 CGS21680 对大鼠肝脏 I/R 损伤时细胞凋亡的影响,旨在探讨腺苷受体激动剂对肝 I/R 损伤是否有保护作用。

1 材料与方 法

辽宁省生物医药科技发展战略研究及药物创新技术、品种研究资助课题,编号是 2006226031-216

1.1 实验动物分组

雄性 Wistar 大鼠(250~300 g),随机分成对照组和实验组(均为 $n = 6$)。腹部大“十”字切口。游离肝脏周围韧带后,胆总管插管以便再灌注时收取胆汁。对照组门静脉插管后用 60 mL 4℃ HTK 液灌注肝脏;试验组灌注液为 HTK 液中含有 A2 受体激动剂 CGS21680 (30 μg/100 mL)

(美国 Sigma 公司)。灌注结束后快速切取肝脏置于 4℃ HTK 液保存 24 h 后,体外经门静脉 Krebs-Henseleit 缓冲液(95% O₂/5% CO₂) 37℃ 再灌注 45 min。再灌注 5, 15, 30, 45 min 留取灌注液检测。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 检测灌洗液中谷丙转氨酶(ALT)和谷氨酸乳酸脱氢酶(GLDH) 采用分光光度计(德国 Boehringer 公司)检测。灌注结束时检测灌洗液中细胞凋亡的变化和脂质过氧化物(LPO)及胆汁分泌量,以 μL/(g·45 min)表示。

1.2.2 门静脉的压力 通过门静脉插管监测门静脉的压力(PVP),以 cmH₂O(1 cmH₂O = 0.098 kPa)表示。

1.2.3 LPO 检测 取 0.2 mL 灌洗液与 1/12 mol/L 硫酸混合,滴加 10 g/dL 钨酸钠 0.5 mL,剧烈振荡后离心 2 000 r/min, 10 min;弃上清液在沉淀中加 1/12 mol/L 硫酸 2 mL 和 10 g/dL 钨酸钠 0.3 mL,混匀再离心 10 min,取沉淀加 2 mL 蒸馏水和 5 g/L 硫代巴比妥酸(TBA) 0.5 mL,煮沸 60 min,冷却后加 15:1 的正丁醇液 2 mL,离心取上清液比色,波长 535 nm。

1.2.4 灌洗液中细胞凋亡检测 采用酶联免疫吸附实验(ELISA)法测定与组蛋白相关的 DNA 片段(德国 Boehringer Mannheim GmbH)。方法如下:

收稿日期:2007-11-26; 修订日期:2008-03-03。

作者简介:宋少伟,男,中国医科大学附属第一医院副教授,主要从事肝脏缺血再灌注损伤方面的研究。

通讯作者:宋少伟 E-mail:songsw10@hotmail.com

将1/20体积的抗DNA过氧化酶+1/20体积的抗组蛋白生物素+18/20体积的反应缓冲液制成免疫反应剂后,向包被链霉素亲合素的培养孔板中加入标本20 μL /孔。再加入80 μL /孔的免疫反应剂。将培养板置入震荡器中(500 rpm/min)室温下反应2 h。吸取上清液,用缓冲液250 μL 反复冲洗3次。加底物显色液100 μL /孔,反应10~20 min后,在酶标仪上作比色分析,检测波长为405 nm。聚集值(Arbitrary Unit AU)=标本的吸光率-空白对照吸光率/阴性对照的吸光率-空白对照吸光率。

1.3 统计学处理

结果以平均数 \pm 标准误($\bar{x}\pm s$)表示。样本间

均数比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

与对照组比较,再灌注过程中实验组PVP明显降低($P<0.01$);ALT和GLDH明显降低($P<0.05$)(表1)。再灌注结束时实验组胆汁分泌量为(7.74 ± 0.88) $\mu\text{L}/(\text{g}\cdot 45\text{ min})$ 较对照组的(4.11 ± 0.19) $\mu\text{L}/(\text{g}\cdot 45\text{ min})$ 明显增加($P<0.01$);灌洗液中细胞凋亡AU(0.32 ± 0.26)较对照组(0.55 ± 0.08)明显减少,差异有显著性($P<0.05$)。实验组中LPO的含量[(5.51 ± 1.38) $\mu\text{mol}/\text{L}$]较之对照组[(7.25 ± 1.15) $\mu\text{mol}/\text{L}$]明显减少($P<0.01$)。

表1 再灌注期间PVP,ALT,GLDH的变化($\bar{x}\pm s$)

再灌注时间(min)	PVP(cmH_2O)			ALT(IU)			GLDH(IU)		
	对照组	实验组	P 值	对照组	实验组	P 值	对照组	实验组	P 值
5	5.9 \pm 0.9	3.5 \pm 0.9	<0.01	17.2 \pm 1.3	13.0 \pm 3.1	<0.05	3.4 \pm 0.9	0.4 \pm 0.3	<0.05
15	4.3 \pm 0.3	3.0 \pm 1.1	<0.01	28.2 \pm 4.0	13.8 \pm 3.0	<0.05	5.1 \pm 1.3	1.4 \pm 0.6	<0.05
30	4.0 \pm 0.4	2.5 \pm 0.8	<0.01	40.2 \pm 6.0	15.8 \pm 3.3	<0.05	7.4 \pm 2.0	2.7 \pm 1.2	<0.05
45	4.0 \pm 0.4	2.4 \pm 0.9	<0.01	50.0 \pm 7.6	19.0 \pm 3.7	<0.05	9.4 \pm 2.2	5.0 \pm 2.7	<0.05

注:1 $\text{cmH}_2\text{O}=0.098\text{ KPa}$

3 讨论

细胞凋亡在移植后再灌注的早期即可发生,细胞凋亡是造成肝脏I/R损伤的主要机制之一^[1]。移植物再灌注过程即是氧自由基产生的过程;大量氧自由基可以通过直接损伤DNA膜、脂质过氧化和上调凋亡基因导致细胞凋亡的发生^[2]。氧自由基除直接损害外,还可以间接激活细胞内核酸内切酶,导致I/R时的细胞凋亡。研究表明,再灌注时氧自由基对腺粒体的损害可产生凋亡诱导因子^[3]。本实验发现对照组再灌注结束时,脂质过氧化物生成增多,而细胞凋亡也随之增加。说明氧自由基与肝脏I/R损伤时的细胞凋亡密切相关。

腺苷及其受体在I/R损伤防治中的作用是目前研究的热点^[4]。腺苷受体分为A₁,A_{2A},A_{2B}和A₃4种,其中A₁和A₂在I/R损伤中发挥重要作用。肝脏缺血后,细胞内ATP大量消耗,并在5'核苷酸酶的作用下,形成腺苷,致使细胞外的腺苷浓度增加。腺苷可兴奋A₂受体刺激一氧化氮合酶(NOS)使肝组织内一氧化氮(NO)水平上升;组织内的腺苷和NO水平提高后,可通过多种方式对抗I/R损伤,如强烈抑制再灌注后血管收缩因子内皮素的生成,抑制Kuffer细胞释放肿瘤坏死因子,同时抑制黄嘌呤氧化酶的活性,减少各种活性氧自由基的生成^[5]。本资料中实验组LPO明显减少,说明腺苷受体激动剂有抗氧自由

基的生成的作用,利于缺血组织的保护。腺苷受体激动剂的作用如同缺血预处理的机制^[6]。本实验发现在缺血前灌洗液中加入腺苷A₂受体激动剂CGS21680明显减少了再灌注时细胞凋亡的发生。这可能是通过腺苷A₂受体激活,阻止肝窦内皮细胞NO合成酶下调,下调凋亡基因caspaase-3,Bax活性和上调了抑制细胞凋亡基因bcl-2的结果^[7]。

再灌注后血管阻力的增加代表了器官保存早期改变,并可导致移植器官的活力丧失。本研究采用离体再灌注模型,排除了由于红细胞堵集及白细胞间相互作用和微血栓形成所造成血管阻力增加的因素。表明非实质性细胞——肝窦内皮细胞的损害是再灌注后血管阻力的增加因素,肝窦内皮细胞凋亡是肝移植I/R损伤造成移植物失功的主要原因。本实验中实验组再灌注期间PVP和GLDH的降低说明腺苷A₂受体激动剂可减轻肝窦内皮细胞的损伤。再灌注后胆汁分泌量是肝细胞损伤非常敏感的指标^[8],它代表离体再灌注肝脏的活性。胆汁产生极易受冷热缺血损伤的影响,是能量依赖性的过程。本文结果显示,实验组胆汁分泌量明显增加,其机制可能与腺苷A₂受体激活后使一磷酸腺苷(CAMP)增加,利于离体大鼠肝脏的保存有关^[9]。

本实验提示腺苷A₂受体激动剂可减轻离体大鼠肝脏I/R损伤和细胞凋亡的发生,其作用机制可能与氧自由基的减少有关。

文章编号:1005-6947(2008)07-0711-03

· 简要论著 ·

肝癌组织中 Livin 蛋白的表达及其与临床病理特征的关系

崔东旭, 魏晰麟, 刘宝林, 孙韶龙, 刘臻, 张小薄

(中国医科大学附属盛京医院 肝胆胰肿瘤外科, 辽宁 沈阳 110004)

摘要:目的 探讨 Livin 蛋白在肝癌组织中的表达及其意义。方法 采用免疫组化 SP 法检测 78 例肝癌及 33 例肝血管瘤旁正常肝组织中 Livin 蛋白的表达;光镜下计数阳性细胞数并根据不同临床特征进行统计学分析。结果 肝癌组织中 Livin 蛋白的表达明显高于正常肝组织($P < 0.001$);Livin 蛋白的表达与患者的性别、年龄以及是否患有乙肝、丙肝、TNM 临床分期均无明显关系,而与肝癌是否发生转移有明显关系;肝癌发生转移者 Livin 蛋白的表达率明显高于未转移者($P < 0.05$)。结论 Livin 蛋白的过度表达可能在肝癌的发生、发展中起重要作用,并与肝癌的转移密切相关。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(7):711-713]

关键词: 癌, 肝细胞; Livin 蛋白; 细胞凋亡

中图分类号: R 735.7

文献标识码: B

Livin 是人类抑制凋亡蛋白(inhibitor of apoptosis protein, IAP)家族的新成员,最初从人类胚肾 cDNA 文库中克隆获得,故曾称 KIAP(kidney inhibitor

of apoptosis protein)^[1]。由于该基因在黑色素瘤细胞高度表达,故又称 ML-IAP(melanoma inhibitor of apoptosis protein)^[2]。其特异性高表达于肿瘤组织如黑色素瘤、宫颈癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌、白血病、淋巴瘤以及肺癌等^[3-6],而受到广泛关注。然而目前 Livin 在肝癌组织中表达的相关研究尚少。本研究旨在进一步探讨肝癌组织中 Livin 蛋白的表达及其与临床病理特征的关系。

收稿日期:2008-02-22; **修订日期:**2008-05-12。

作者简介:崔东旭,男,中国医科大学附属盛京医院肝胆胰肿瘤外科副教授,主要从事肝胆胰肿瘤外科及器官移植的临床及实验方面的研究。

通讯作者:崔东旭 E-mail:cuidongxu@hotmail.com

参考文献:

- [1] Zhu J, Wang S, Bie P. *et al.* Apoptosis and regeneration of sinusoidal endothelial cells after extended cold preservation and transplantation of rat liver [J]. *Transplantation*, 2007, 84(11):1483-1491.
- [2] Choi SI, Jeong CS, Cho SY. *et al.* Mechanism of apoptosis induced by apigenin in HepG2 human hepatoma cells: involvement of reactive oxygen species generated by NADPH oxidase [J]. *Arch Pharm Res*, 2007, 30(10):1328-1335.
- [3] Czaja MJ. Induction and regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4(5):759-767.
- [4] 原春辉,刘永锋,赵宁,等.腺苷对移植胰腺再灌注损伤保护作用的实验研究[J].中国普通外科杂志,2005,(5):351-354.
- [5] 于昕,陈炜,罗蒙,等.腺苷 A2 型受体在肝窦内皮细胞

- of apoptosis protein)^[1]。由于该基因在黑色素瘤细胞高度表达,故又称 ML-IAP(melanoma inhibitor of apoptosis protein)^[2]。其特异性高表达于肿瘤组织如黑色素瘤、宫颈癌、结肠癌、膀胱癌、前列腺癌、白血病、淋巴瘤以及肺癌等^[3-6],而受到广泛关注。然而目前 Livin 在肝癌组织中表达的相关研究尚少。本研究旨在进一步探讨肝癌组织中 Livin 蛋白的表达及其与临床病理特征的关系。
- 一氧化氮生成中的作用[J].外科理论与实践,2004,9(40):310-313.
- [6] Peralta C, Hotter G, Closa D, *et al.* The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors [J]. *Hepatology*, 1999, 29(1):126-132.
- [7] Rivo J, Zeira E, Galun E. *et al.* Attenuation of reperfusion lung injury and apoptosis by A2A adenosine receptor activation is associated with modulation of Bcl-2 and Bax expression and activation of extracellular signal-regulated kinases [J]. *Shock*, 2007, 27(3):266-273.
- [8] 宋少伟, Gulik TM van, 刘永锋, 等.大鼠肝脏缺血再灌注损伤后 5'核苷酸酶和乳酸脱氢酶活性变化的研究 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2001, 7(8):484-486.
- [9] Arai M, Thurman RG, Lemasters JJ. Contribution of adenosine A2 receptor and cyclic adenosine monophosphate to protective ischemic preconditioning of sinusoidal endothelial cell against storage/reperfusion injury in rat liver [J]. *Hepatology*, 2000, 32(2):297-302.