

文章编号:1005-6947(2008)01-0045-03

· 基础研究 ·

大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤后 B7 表达的研究

李蕊^{1,2}, 米曰堂^{1,2}, 冯吉煊², 孙晓铮³, 李强⁴, 刘军¹

(1. 山东大学附属山东省立医院 普通外科, 山东 济南 250000; 山东省聊城市人民医院 2. 普通外科
3. 手术室 4. 肛肠科, 山东 聊城 252000)

摘要: **目的** 探讨 B7-1 和 B7-2 在大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤时的表达及其免疫学意义。**方法** 将30只大鼠随机分为3组: A组为假手术组(对照组); B组为冷缺血20min再灌注24h组; C组为冷缺血30min再灌注24h组。分别取各组之肝脏, 采用实时反转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测肝组织中 B7-1 和 B7-2 mRNA 的表达。**结果** B7-1 mRNA 在 B, C 组表达为 0.529 ± 0.089 和 0.618 ± 0.074 , 均较 A 组 (0.131 ± 0.012) 明显增高 ($P < 0.01$)。B7-2 mRNA 在 B, C 组表达为 0.474 ± 0.132 和 0.682 ± 0.095 , 均较 A 组 (0.163 ± 0.054) 明显增高 ($P < 0.01$)。并且 B7-1 和 B7-2 在 C 组表达明显高于 B 组 ($P < 0.05$)。**结论** 冷缺血再灌注时肝脏 B7-1 和 B7-2 表达上调, 增加了肝脏的免疫原性。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(1): 45-47]

关键词: 肝/血液供给; 缺血再灌注损伤; 冷缺血; B7; 大鼠

中图分类号: R 657.3

文献标识码: A

Experimental study on expression of B7 in cold ischemia/reperfusion injury of the rat liver

LI Rui^{1,2}, MI Yuetang^{1,2}, FENG Jihuan², SUN Xiaozheng³, LI Qiang⁴, LIU Jun¹

(1. Department of General Surgery, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Ji'nan 250000, China; 2. Department of General Surgery 3. Operation Room 4. Department of Anorectal Disease, Liaocheng City Hospital, Liaocheng, Shandong 252000, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression of B7-1 and B7-2 in cold ischemia/reperfusion (I/R) injury in the rat liver and its immunological role. **Methods** Thirty rats were divided into three groups randomly. Group A: sham operation group; group B: cold ischemia for 20 minutes and reperfusion; and group C: cold ischemia for 30 minutes and reperfusion. The expression of B7-1 and B7-2 mRNA in the livers was analyzed by real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** B7-1 mRNA expressions in group B and C were 0.529 ± 0.089 and 0.618 ± 0.074 respectively, which were significantly higher than those in group A (0.131 ± 0.012 , $P < 0.01$). B7-2 mRNA expressions in group B and C were 0.474 ± 0.132 and 0.682 ± 0.095 respectively, which were significantly higher than those in group A (0.163 ± 0.054 , $P < 0.01$). In addition, both B7-1 and B7-2 levels were higher in group C than group B. **Conclusions** Cold ischemia/reperfusion injury may increase the immunogenicity of the liver by upregulating B7-1 and B7-2.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(1): 45-47]

Key words: Liver/blood supply; Ischemia-reperfusion Injury; Cold Ischemia; B7; Rat

CLC number: R 657.3

Document code: A

收稿日期: 2007-04-25; 修订日期: 2007-11-19。

作者简介: 李蕊, 女, 山东大学附属山东省立医院硕士研究生, 主要从事普通外科方面的研究。

通讯作者: 李蕊 E-mail: lirui007@yahoo.com.cn

低温灌注技术是肝脏移植手术中的重要环节,其在切除位于肝门区或微侵袭下腔静脉等处肿瘤时的运用也日益增多^[1]。研究发现,T淋巴细胞共刺激通路参与了肾脏缺血再灌注(I/R)损伤^[2],共刺激分子在器官冷I/R损伤中的表达已引起广泛关注。本实验原位模拟肝脏冷I/R,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测共刺激分子B7在肝组织中的表达,分析其变化规律,以期进一步揭示低温灌注与急性排斥反应的联系,探讨冷I/R时移植器官损害的机制。

1 材料和方法

1.1 模型建立、动物分组及取材

雄性Wistar大鼠30只,体重200~250g,由山东大学动物实验中心提供。随机分为3组,每组10只。A组为假手术组(对照组);B组为冷缺血20min再灌注24h组;C组为冷缺血30min再灌注24h组。动物模型参照胡建平^[3]的方法:脾静脉插管作为肝脏冷I/R的流入道,右肾上腺静脉作为肝灌注液流出道。向肝脏灌注2mL含肝素常温生理盐水,使全肝处于无血流状态;夹闭肝上、下腔静脉,活结结扎肝动脉、幽门静脉,使全肝处于血流阻断状态,以20cmH₂O压力(1cmH₂O=0.098kPa)经导管持续滴4℃冷灌注液,冷灌注时间为20min和30min。停止灌注后,结扎右肾上腺静脉流出道,切除脾脏,随即恢复肝脏血流,恢复肝血流24h后切取肝脏。

1.2 肝脏组织B7-1和B7-2 mRNA表达水平的检测

肝脏组织总RNA提取及cDNA合成:采用Trizol试剂盒(加拿大BBI公司产品)提取组织标本总RNA;取0.5μL RNA产物,用RT-PCR试剂盒(Roche公司)将其逆转录为互补DNA(cDNA)。(2)PCR反应:以β-actin作为内参对照。B7-1, B7-2及β-actin引物由山东省医学科学院合成。

β-actin上游引物为5'-ATGGARTCCTGTGGCATCCA-3',下游引物为5'-CGCTCAGGAGGAGCAATGAT-3';B7-1上游引物为5'-GGCATTGCTGTCCTGTGATTAC-3',下游引物为5'-ACTCAGTTATGTTGGGGTAGG-3';B7-2上游引物为5'-GCTCGTAGTATTTTGGCAG-GACC-3',下游引物为5'-CGGGTATCCTTGCT-TAGATGAGC-3'。1%琼脂糖凝胶电泳PCR产物,EB染色,Alpha Imager TM 2200凝胶成像系统观察电泳条带存入图像。以系统的SPOT DENSITY软件分别测量内参照和B7-1, B7-2基因扩增条带的灰度。结果以B7-1/β-actin及B7-2/β-actin mRNA的灰度比值表示。

1.3 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据应用SPSS 13.0软件进行分析。样本均数比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 B7-1, B7-2 mRNA的表达水平

B7-1 mRNA在A组几乎不表达,而在B组和C组则明显表达($P < 0.01$);B7-2 mRNA在A组几乎不表达,而在B组和C组则明显表达($P < 0.01$)。B组B7-1, B7-2 mRNA的表达水平显著低于C组,差异均有显著性($P < 0.05$) (图1-2)(表1)。

表1 各组B7-1和B7-2表达水平的比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

分组	B7-1	B7-2
A组	0.131 ± 0.012	0.163 ± 0.054
B组	0.529 ± 0.089 ¹⁾	0.474 ± 0.132 ¹⁾
C组	0.618 ± 0.074 ^{1),2)}	0.682 ± 0.095 ^{1),3)}

注:1)与A比较, $P < 0.01$;2)与B组比较, $P < 0.05$;3)与B组比较, $P < 0.01$

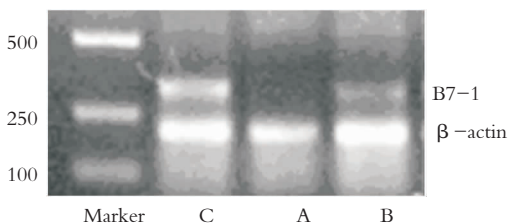


图1 B7-1mRNA的表达

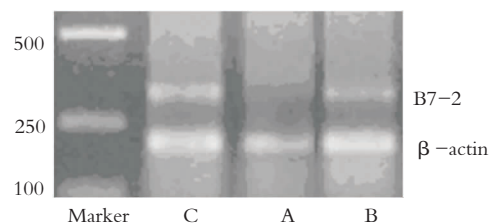


图2 B7-2mRNA的表达

3 讨论

I/R 损伤是肝脏移植过程中不可避免的病理过程,它存在于肝脏的切取、保存以及移植手术的各个环节。I/R 损伤影响移植物术后的功能,更为严重的是与原发无功能有密切关系,并且增加了发生急性排斥反应的几率^[4-5]。T 细胞介导的免疫反应在急性排斥反应中起主要作用。T 细胞活化与增殖依赖于双信号。一是抗原呈递细胞呈递的抗原肽 - MHC 复合物,此信号对 T 细胞活化是必需的,但不引起 T 细胞增殖和分泌细胞因子。二是共刺激信号,即第二信号,为 T 细胞抗原特异性激活所必需;它们启动、维持并调节活化级联反应。其中主要的共刺激因子是 B7 家族成员(B7-1 和 B7-2)。

本实验模型包含冷灌注、再复流过程,较好地模拟肝移植供肝灌注及移植后的复流过程。其特点在于:利用门静脉和腔静脉固有分支作为灌注液流入和流出道,避免了在门静脉和腔静脉壁上切开和修补,保持了门静脉和腔静脉主干结构的完整性;术后无狭窄或栓塞发生;手术创伤小,动物成活率高,较好地模拟出大鼠肝脏的冷 I/R 过程。

De Greef^[6]运用肾脏 I/R 损伤模型发现 B7 分子表达增加。在大鼠肝脏冷 I/R 模型中,笔者观察到实验组共刺激分子 B7-1, B7-2 mRNA 表达较假手术组明显上调,并且随着缺血时间的延长, B7-1, B7-2 水平进一步增高。说明发生了冷 I/R 损伤,与采用肾脏模型观察到的结果^[7]一致。明英姿^[8]观察到 I/R 损伤导致主要组织相容性抗原复合物(MHC)表达增高,进而增加了供肝的免疫原性。本研究结果表明,供肝的免疫原性在经

过冷 I/R 打击后还可通过 B7-1 和 B7-2 表达上调而增高。

故笔者认为在肝脏移植过程中,可通过检测 B7-1, B7-2 的表达来预测 I/R 损伤的程度,对排斥反应的监测有一定帮助。另一方面 B7-1 和 B7-2 可能成为抑制与肝移植相关的肝脏 I/R 损伤后早期排斥反应的新靶点。

参考文献:

- [1] 叶启发,任祖海,明英姿,等. 半离体肝切除自体肝移植治疗肝细胞癌:附 1 例报告[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(7): 551 - 553.
- [2] Wu CJ, Sheu JR, Chen HH, *et al.* Modulation of monocyte - derived dendritic cell differentiation is associated with ischemic acute renal failure [J]. *J Surg Res*, 2006, 132(1): 104 - 111.
- [3] 胡建平,钱建民,王学浩,等. 大鼠原位肝脏低温灌注和复流模型的建立及意义[J]. 中华实验外科杂志, 2001, 18(4): 366 - 367.
- [4] 屈新才,王继亮,秦涛,等. 供肝缺血预处理对大鼠肝移植缺血再灌注损伤的保护性作用[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(3): 240 - 244.
- [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] De Greef KE, Ysebaert DK, Dauwe S, *et al.* Anti - B7-1 blocks mononuclear cell adherence in vasa recta after ischemia [J]. *Kidney Int*, 2001, 60(4): 1415 - 1427.
- [7] Takada M, Chandraker A, Nadeau KC, *et al.* The role of the B7 costimulatory pathway in experimental cold ischemia/reperfusion injury [J]. *J Clin Invest*, 1997, 100(5): 1199 - 1203.
- [8] 明英姿,叶启发. 缺血再灌注前后 MHC I, II 类抗原表达的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(24): 38 - 43.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊决定采用汉语拼音姓名的新写法

编辑学报 2007 年第 5 期刊登了我国台湾省留美学者许仲平教授提出的中国人汉语拼音姓名写法的建议:姓在前,名在后,姓的字母全大写,名只首字母大写,双名间不加连接号,名字不缩写。

例如:“杨为民”写作“YANG Weimin”,不写作“Yang Weimin”或“YANG Wei - min”或“YANG W M”或“YANG W”。这是一个有助于解决西方人对中国人姓名误解的好建议。

这一建议符合中国人的姓名习惯,与现行有效的国家标准的规范也基本一致,差别只在于建议的姓字母全大写,而国家标准仅规定姓的首字母大写,而这样做确实便于西方人清楚区别中国人的姓和名。目前本刊实行的是姓字母全大写,双名间加连接号。经慎重研究,决定从 2008 年起采用姓的字母全大写、双名间不加连接号的建议。