



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.013
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.013
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(1):70-74.

· 基础研究 ·

缺血预处理对大鼠缺血再灌注肝组织 NF- κ B 表达、炎症及氧化应激反应的影响

陶立德, 薛同敏, 张杰, 张培建

(扬州大学附属第二临床医院 普通外科研究室, 江苏 扬州 215000)

摘要

目的: 探讨缺血预处理 (IP) 减轻大鼠肝缺血再灌注 (I/R) 损伤的作用及机制。

方法: 将 15 只雄性 SD 大鼠随机均分为假手术组、I/R 组、IP+I/R 组, 采用 Pringle 法制作肝 I/R 模型 (缺血 30 min+ 再灌注 3 h), IP 采用 I/R 前肝缺血 10 min+ 再灌注 10 min 诱导。各组大鼠于再灌注 3 h 后处死取材, 行肝组织病理学、血清谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 检测, 同时检测肝组织 NF- κ B 蛋白的表达, 以及炎性细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 与氧化应激指标丙二醛 (MDA)、髓过氧化物酶 (MPO) 水平。

结果: 除假手术组外, I/R 组与 IP+I/R 组大鼠肝组织均出现肝损伤是病理学改变, IP+I/R 组的损伤程度明显轻于 I/R 组; 与假手术组比较, I/R 组与 IP+I/R 组大鼠血清 AST、ALT 水平明显升高, 肝组织 NF- κ B 蛋白表达、IL-1 β 与 TNF- α 水平、MDA 与 MPO 浓度均明显升高 (均 $P < 0.05$), 但 IP+I/R 组的各指标的升高幅度均明显小于 I/R 组 (均 $P < 0.05$)。

结论: IP 减轻大鼠肝 I/R 损伤的作用与抑制 NF- κ B 活性, 从而减轻炎症与氧化应激反应有关。

关键词

肝; 再灌注损伤; 缺血预处理; NF- κ B
中图分类号: R657.3

Influence of ischemic preconditioning on NF- κ B expression, and inflammatory and oxidative stress responses in rat liver tissue following ischemia-reperfusion

TAO Lide, XUE Tongmin, ZHANG Jie, ZHANG Peijian

(Institute of General Surgical Research, Second Affiliated Hospital, Yangzhou University, Yangzhou 215000, China)

Abstract

Objective: To investigate the alleviation effect of ischemic preconditioning (IP) on hepatic ischemia-reperfusion (I/R) injury in rats and the mechanism.

Methods: Fifteen male SD rats were equally randomized into sham operation group, I/R group and IP plus I/R group, respectively. I/R injury model was created by Pringle maneuver (30-min hepatic ischemia followed by 3-h reperfusion), and IP was induced by 10-min hepatic ischemia followed by 10-min reperfusion prior to I/R. Rats in each group were sacrificed and samples were collected after 3-h reperfusion, liver specimen pathological examination and measurement of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were performed, and meanwhile, the NF- κ B protein expression, and the levels of inflammatory cytokines (IL-

基金项目: 江苏省扬州市自然科学基金面上资助项目 (YZ2014064)。

收稿日期: 2014-09-05; 修订日期: 2014-12-07。

作者简介: 陶立德, 扬州大学附属第二临床医院主治医师, 主要从事普外临床与基础方面的研究。

通信作者: 张培建, Email: yzu.edu.pjz@163.com

1 β and TNF- α) as well as oxidative stress indexes that included malondialdehyde (MDA) and myeloperoxidase (MPO) in the liver tissues were determined.

Results: Except in sham operation group, the liver tissues from either I/R group or IP plus I/R group showed pathological changes of liver injury, but the injury was milder in IP plus I/R group than that in I/R group. In both I/R group and IP plus I/R group compared with sham operation group, the serum AST and ALT levels, and liver tissue levels of NF- κ B protein expression, IL-1 β , TNF- α , MDA and MPO were all significantly increased (all $P < 0.05$), but the increasing amplitudes of all these parameters in IP plus I/R group were significantly less than those in I/R group (all $P < 0.05$).

Conclusion: IP lessens hepatic I/R through inhibiting NF- κ B activity, and thereby reduces inflammatory and oxidative stress responses.

Key words Liver; Reperfusion Injury; Ischemic Preconditioning; NF- κ B

CLC number: R657.3

肝大部分切除或肝移植中供肝不可避免的要经历缺血再灌注的过程,而缺血再灌注损伤一直是影响肝移植效果的重要因素之一,如何减轻肝缺血再灌注(I/R)损伤是迫切需要解决的问题。肝脏缺血预处理(IP)是指一次或多次短暂性肝脏缺血再灌注后,诱导肝脏组织产生内源性保护机制,使其对以后较长时间的缺血性损伤产生显著的耐受。然而IP减轻肝I/R损伤相关机制并不清楚。本实验旨在观察IP减轻大鼠肝脏I/R损伤的作用,以及对肝组织NF- κ B、炎症细胞因子、氧化应激指标的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性SD纯系大鼠,15只,鼠龄10~12周,体质量250~300g,由扬州大学动物实验中心提供。

1.1.2 实验试剂 NF- κ B抗体(Santa Cruz公司); β -actin(Santa Cruz公司);ELISA检测试剂盒(Bio-Swamp);2%戊巴比妥钠(北京普博斯生物科技有限公司);丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 实验方法

将SD大鼠随机均分为假手术组、I/R组、IP+I/R组。所有动物术前12h禁食,自由进水,采用戊巴比妥麻醉,固定动物,常规脱毛消毒。取上腹部正中直切口约3cm,进腹后找到肝十二指肠韧带。各组大鼠处理:(1)假手术组仅行麻醉、剖腹,只牵拉分离肝十二指肠韧带后关腹,保持开腹时间与I/R组相同。(2)I/R组

游离肝周韧带,解剖肝门,完成Pringle法,用无创血管夹夹闭第一肝门,完全阻断入肝血流,持续30min后撤除血管夹,恢复入肝血流,记时间点,逐层关腹,术后自由饮食。(3)IP+I/R组在I/R前先阻断肝左、叶血流10min,然后开放血流10min,其余步骤同I/R模型组。各组均在灌注3h后取材检测。

1.3 检测指标

1.3.1 肝组织病理学观察 取鼠肝右叶约5mm \times 10mm \times 3mm大小组织置于10%中性甲醛溶液中固定,常规石蜡包埋,片厚6 μ m连续切片,HE染色,光镜下观察肝组织形态学改变。

1.3.2 血清酶检测 取血后送扬州大学第二临床医院检验科,采用生化分析仪检测谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)水平。

1.3.3 Western blot法检测肝组织NF- κ B表达 取各组大鼠肝组织100mg,充分剪碎,低温液氮研磨后,加入含PMAF的裂解液中,匀浆后充分裂解,4 $^{\circ}$ C 13 000 r/min,离心10min,弃除沉淀,采用Bradford法蛋白定量测定法对上清液进行蛋白定量。样品分装,贮存于-70 $^{\circ}$ C中备检。取70 μ g蛋白样品,经SDS-PAGE电泳,湿电转移,PVDF膜在5%脱脂奶粉封闭液中封闭过夜(4 $^{\circ}$ C)。用一抗NF- κ B(1:10 000),4 $^{\circ}$ C孵育过夜,TBST漂洗滤膜4次,每次10min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗兔IgG 1:5 000)室温下摇荡孵育2h,洗脱,染色,脱色,最后进行显影和图像分析,洗片机中显影、洗像。调整曝光时间,直至出现最佳条带。结果用Image Tool进行分析,测量阳性面积和灰度值。灰度值代表蛋白表达的多少。计算各组的净灰度值,并计算阳性灰度积。净灰度值=阳性平均灰度-背景灰度,阳性灰度积=净灰度值 \times

阳性面积。最后用各组的阳性灰度积与对应的内参灰度积相比得到目标蛋白的相对表达。

1.3.4 IL-1 β 、TNF- α 、MDA、MPO 测定 取各组组织约 0.1 g 加入 800 μ L 裂解液匀浆后,充分裂解。离心: 4 $^{\circ}$ C, 13 000 \times g, 10 min。将上清分装。其余步骤按照试剂说明书进行。

1.4 统计学处理

计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 15.0 进行单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

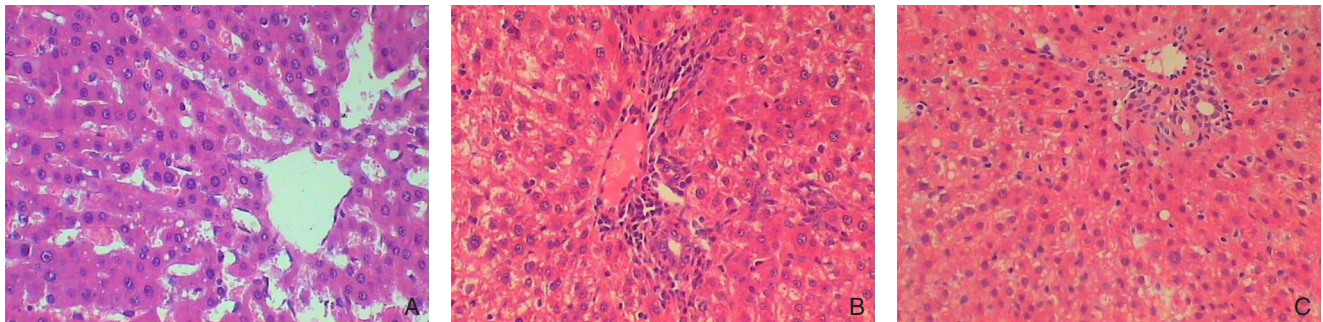


图 1 各组肝脏病理学改变 (HE \times 400) A: 假手术组; B: I/R 组; C: IP+I/R 组

Figure 1 Pathological changes of liver tissues of each group (HE \times 400) A: Sham operation group; B: I/R group; C: IP+I/R group

2.2 血清 AST、ALT 水平

与假手术组比较, I/R 组与 IP+I/R 组大鼠血清 ALT、AST 水平均明显升高 (均 P < 0.05), 但 IP+I/R 组两者的升高幅度明显小 I/R 组 (均 P < 0.05) (表 1)。

2.3 各组大鼠 NF- κ B 蛋白表达

与假手术组比较, I/R 组与 IP+I/R 组大鼠肝组织 NF- κ B 蛋白表达明显增加。以 β -肌动蛋白为内参照, 统计分析结果显示, 各组 NF- κ B 蛋白相对表达量差异有统计学意义 (P < 0.05); I/R 组与 IP+I/R 组 NF- κ B 蛋白相对表达量均高于假手术

2 结果

2.1 肝组织理学变化

光镜下观察肝组织结构术后变化, 假手术组见肝细胞及肝窦内皮细胞无明显变性、坏死, 中央静脉、汇管区结构清晰 (图 1A); I/R 组肝细胞明显肿胀, 细胞核轮廓改变, 肝血窦明显淤血, 炎性细胞浸润, 可见肝脏结构破坏 (图 1B); IP+I/R 组见肝脏淤血较 I/R 组减轻, 肝小叶结构基本正常, 肝血窦淤血明显减轻, 肝窦索结构清晰, 肝细胞轻度肿胀 (图 1C)。

组, 但 IP+I/R 组低于 I/R 组, 差异均有统计学意义 (均 P < 0.05) (图 2)。

表 1 各组血清 AST、ALT 水平比较 (n=5)

Table 1 Comparison of the serum AST and ALT levels (n=5)

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)
假手术组	59.8 \pm 18.9	224.1 \pm 25.9
I/R 组	1 498.9 \pm 198.8 ¹⁾	1 732.1 \pm 94.8 ¹⁾
IP+I/R 组	973.1 \pm 123.9 ^{1),2)}	1 363.1 \pm 176.1 ^{1),2)}

注: 1) 与假手术组比较, P < 0.05; 2) 与 I/R 组比较, P < 0.05

Note: 1) P < 0.05 vs. sham operation group; 2) P < 0.05 vs. I/R group

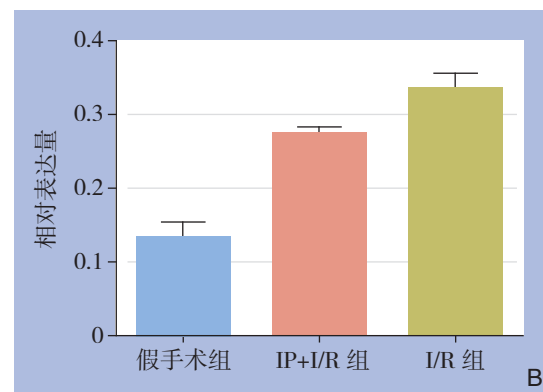
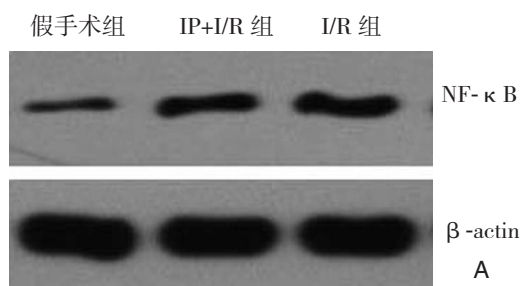


图 2 各组大鼠肝组织 NF- κ B 蛋白表达情况 A: Western blot 检测 NF- κ B 蛋白表达; B: 各组 NF- κ B 蛋白相对表达量

Figure 2 NF- κ B protein expression in the liver tissues of each group of rats A: NF- κ B protein expression detected by Western blot analysis; B: NF- κ B protein relative expression levels of each group

2.4 各组大鼠肝组织IL-1β、TNF-α、MDA、MPO水平

与假手术组比较, I/R组与IP+I/R组大鼠肝组

织IL-1β、TNF-α及MDA、MPO水平均明显升高(均 $P<0.05$), 但IP+I/R组各指标的升高幅度均明显小I/R组(均 $P<0.05$)(表2)。

表2 各组炎症细胞因子及氧化应激指标比较($n=5$)

Table 2 Comparison of the inflammatory cytokine levels and oxidative stress indexes ($n=5$)

组别	TNF-α (pg/mg)	IL-1β (pg/mg)	MDA (nmol/mg 蛋白)	MPO (U/g)
假手术组	31.21 ± 2.98	14.96 ± 1.59	1.35 ± 0.30	0.087 ± 0.009
I/R组	72.90 ± 3.02 ¹⁾	39.97 ± 2.27 ¹⁾	7.67 ± 0.13 ¹⁾	0.354 ± 0.065 ¹⁾
IP+I/R组	39.28 ± 1.98 ^{1,2)}	20.89 ± 3.33 ^{1,2)}	5.11 ± 0.56 ^{1,2)}	0.221 ± 0.017 ^{1,2)}

注: 1) 与假手术组比较, $P<0.05$; 2) 与I/R组比较, $P<0.05$

Note: 1) $P<0.05$ vs. sham operation group; 2) $P<0.05$ vs. I/R group

3 讨论

原发性肝癌是我国肿瘤相关死亡的主要病因之一^[1]。现今肝癌的治疗方法多种多样, 然而肝切除仍然是原发性和转移性肝癌主要的治疗方法^[2]。肝脏手术过程中不可避免的要进行肝脏血流的阻断, 常伴随着肝脏的缺血再灌注, 常导致部分剩余肝组织不同程度地产生肝I/R损伤。研究发现I/R损伤的机制可能与氧自由基^[3]、炎性损伤、钙超载、细胞凋亡等多种因素有关^[4-5], 在全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS)发病中发挥重要作用^[5-6]。因此, 如何减轻肝脏I/R肝功能的损害是目前亟待解决的问题之一。

肝脏IP是指一次或多次短暂性肝脏缺血再灌注后, 诱导肝脏组织产生内源性保护机制, 使其对以后较长时间的缺血性损伤产生显著的耐受^[7]。相关实验和临床研究表明, IP在防止肝I/R损伤发展方面有较好的作用^[8], 但机制目前仍不十分清楚, 研究表明耐受是涉及递质、受体、通道、基因表达、蛋白质合成的多环节调控的复杂生物学过程^[9]。进一步了解IP相关保护机制, 将促进其在肝切除、肝移植等治疗方面的应用^[10]。

细胞核因子NF-κB与肝细胞损伤的关系一直是肝脏疾病研究中的热点, NF-κB是一种广泛存在于体内多种细胞的核转录因子, 参与多种疾病的病理生理过程, 在机体的免疫和炎症反应及凋亡调控等方面发挥着重要作用^[11]。NF-κB是一种多极性基因调控蛋白, 它能影响细胞因子、炎症趋化因子、细胞黏附分子、急性期蛋白及抗菌肽的基因表达从而控制它们的生物合成^[12]。研究证实急性肝损伤时伴随着NF-κB的活化, 其活化可

通过NF-κB依赖性通路激活肝脏内的Kupffer细胞, 从而造成Fas、TNF-α、IL-1β基因的表达上调, 导致肝细胞炎症, 诱发肝细胞凋亡, 造成肝功能损害^[13]。在肝脏缺血再灌注中, NF-κB被激活后, 转移到细胞核内进而激活靶基因转录, 促进TNF-α、IL-1β等大量促炎性因子的释放, 并相互诱生, 进一步放大炎症反应, 导致肝内白细胞募集、浸润, 加重微循环障碍; 释放活性氧产物和蛋白酶; 增加血管通透性, 引起组织水肿等机制引起肝组织损伤^[14]。研究表明在肝脏I/R后2~3 h, NF-κB与其特异调节基因序列的结合活性最高, 表明NF-κB确实参与肝脏I/R时一些细胞因子的表达调控, 其特异调控基因序列的结合活性与肝脏缺血再灌注时损伤程度有直接关系。

本研究对各组各进行了NF-κB蛋白的检测, 结果显示, I/R组较假手术组肝组织中NF-κB表达活性明显增强, 而IP+I/R组与I/R相比表达减低, 表明IP预处理可以减低NF-κB蛋白的表达。同时可观察到, 与假手术组比较, I/R组中TNF-α、IL-1β的表达明显增强, 同样的IP+I/R组表达较I/R组降低, 减轻肝脏的炎症反应。光镜下观察肝组织结构术后变化, I/R组肝细胞明显肿胀, 细胞核轮廓改变, 肝血窦明显淤血, 炎性细胞浸润, 可见肝脏结构破坏, IP+I/R组见肝脏淤血较I/R组减轻, 肝小叶结构基本正常, 肝血窦淤血明显减轻, 肝窦索结构清晰, 肝细胞轻度肿胀, 肝损伤明显减轻。MPO是中性粒细胞的功能标志和激活标志, 外界刺激可导致中性粒细胞聚集, 释放MPO^[15], 中性粒细胞浸润在I/R损伤中起重要作用^[16-17], I/R后MPO、MDA活性明显增加^[18-19]。MPO的作用是通过把H₂O₂和Cl⁻转换为次氯酸, 并形成氧自由基, 进而造成细胞和组

织损害。MPO活性的高低，可间接反映组织损伤程度。MDA含量可以反映机体内脂质过氧化的程度，间接反映细胞损伤的程度^[20-22]。本研究结果显示，IP能够使大鼠肝I/R损伤后肝脏组织MDA含量和MPO活性增加的幅度减少。I/R组的血清ALT和AST水平在术后高于假手术组、IP+I/R组。以上结果提示肝脏组织的IP可明显降低肝组织NF- κ B转录激活，同时抑制了下游的炎症因子TNF- α 、IL-1 β 的表达，降低MDA含量和MPO活性增加的幅度，最终减轻了肝组织的损伤。

综上，IP可以抑制肝脏I/R损伤后NF- κ B蛋白的表达，降低炎症介质的释放，减轻肝切除或肝移植后肝功能的损伤。这些有助于进一步了解IP的作用机制，且对于寻找肝缺血再灌注损伤后肝功能保护的有效途径具有积极意义，其机制值得进一步研究。

参考文献

- [1] Chen JG, Zhang SW. Liver cancer epidemic in China: past, present and future[J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21(1):59-69.
- [2] Hammond JS, Guha IN, Beckingham IJ, et al. Prediction, prevention and management of postresection liver failure[J]. *Br J Surg*, 2011, 98(9):1188-1200.
- [3] 孟中良, 张培建. 肝窦内皮细胞缺血再灌注损伤防治的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2009, 18(9):976-978.
- [4] Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, et al. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo[J]. *Shock*, 2002, 18(6):529-535.
- [5] 蒋凯, 张靖岩, 劳华毅, 等. 氨溴索对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(1):49-53.
- [6] Liu KX, Li YS, Huang WQ, et al. Immediate but not delayed preconditioning during reperfusion attenuates acute lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: comparison with ischemic preconditioning[J]. *J Surg Res*, 2009, 157(1):e55-e62.
- [7] 蒋高霞, 徐桂华, 孟娣娟. 肢体缺血预处理缓解缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(7):877-880.
- [8] 吕海涛, 李冠华. 预处理对气腹致肝脏缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. *中南医学科学杂志*, 2009, (5):547-549.
- [9] 胡跃强, 唐农, 董少龙, 等. 缺血预处理对大鼠脑缺血再灌注损伤神经细胞的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(8):1630-1631.
- [10] 洪芬芳, 张大雷, 涂桂林, 等. 缺血预处理通过抑制白三烯C4生成减轻大鼠肝缺血再灌注损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(3):537-540.
- [11] 贺凯, 苏松, 倪建斌, 等. 胆道梗阻肝损伤早期NF- κ B活性变化的影响及意义[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2013, 25(6):477-479.
- [12] 文秀玉, 席宏杰. NF- κ B信号转导与肝脏疾病关系的研究进展[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2014, 23(2):127-130.
- [13] Zhao J, Zheng H, Liu Y, et al. Anti-inflammatory effects of total alkaloids from *Rubus alceifolius* Poir [corrected]. on non-alcoholic fatty liver disease through regulation of the NF-kappaB pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(4):931-937.
- [14] Shin T, Kuboki S, Lentsch AB. Roles of nuclear factor-kappaB in posts ischemic liver[J]. *Hepatol Res*, 2008, 38(5):429-440.
- [15] 殷霞丽, 李勇, 吴瑶, 等. CB2受体激动剂对肝脏I/R小鼠肝功能及肝组织MPO及MDA表达的影响[J]. *山东医药*, 2014, 54(38):35-36.
- [16] Sayan H, Ozacmak VH, Sen F, et al. Pharmacological preconditioning with erythropoietin reduces ischemia-reperfusion injury in the small intestine of rats[J]. *Life Sci*, 2009, 84(11/12):364-371.
- [17] Sukhotnik I, Slijper N, Pollak Y, et al. Parenteral omega-3 fatty acids (Omegaven) modulate intestinal recovery after intestinal ischemia-reperfusion in a rat model[J]. *J Pediatr Surg*, 2011, 46(7):1353-1360.
- [18] Pacher P, Nivorozhkin A, Szabó C. Therapeutic effects of xanthine oxidase inhibitors: renaissance half a century after the discovery of allopurinol[J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(1):87-114.
- [19] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1):315-424.
- [20] 王红军, 庄贵华, 郑见宝. 缺血预处理对大鼠小肠移植后肠黏膜的保护作用[J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2012, 33(2):185-189.
- [21] 李洪, 杨天德, 陶军, 等. 自由基在心肌细胞缺氧性DNA损伤和凋亡中的作用[J]. *重庆医学*, 2003, 32(8):963-964.
- [22] 唐决, 王东平, 鞠卫强, 等. Genistein预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2011, 20(1):53-57.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 陶立德, 薛同敏, 张杰, 等. 缺血预处理对大鼠缺血再灌注肝组织NF- κ B表达、炎症及氧化应激反应的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(1):70-74. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.013

Cite this article as: TAO LD, XUE TM, ZHANG J, et al. Influence of ischemic preconditioning on NF- κ B expression, and inflammatory and oxidative stress responses in rat liver tissue following ischemia-reperfusion[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(1):70-74. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.01.013