

文章编号:1005-6947(2008)01-0091-03

· 简要论著 ·

正丁酸钠对大鼠肝脏热缺血再灌注损伤保护作用的研究

赵海峰¹, 孔瑞², 孙备², 潘尚哈², 姜洪池²

(1. 哈尔滨医科大学附属第五医院 普通外科, 黑龙江 大庆 163318; 2. 哈尔滨医科大学第一临床医学院 肝胆胰外科, 黑龙江 哈尔滨 163000)

摘要:目的 探讨正丁酸钠拮抗高迁移率族蛋白-1(HMGB-1)表达对大鼠肝脏缺血-再灌注(I/R)损伤的保护作用。方法 建立大鼠肝脏I/R损伤模型。将40只雄性大鼠随机分成5组:假手术组、I/R组、正丁酸钠预处理组、正丁酸钠治疗A组和正丁酸钠治疗B组。预处理组、A组和B组于不同时相经阴茎背静脉注射正丁酸钠(400mg/kg)。每组以I/R后6h作为检测时点,检测血清AST, ALT, TNF- α 浓度及肝脏组织中HMGB-1表达水平;光镜下观察肝组织病理学改变。结果 正丁酸钠预处理组、治疗A组、治疗B组AST, ALT, TNF- α 浓度及HMGB-1表达水平均较I/R组显著降低($P < 0.05$);预处理组的AST和TNF- α 较A组和B组显著降低($P < 0.05$),且肝细胞病理损害较轻。结论 正丁酸钠对肝脏缺血再灌注损伤具有确切的保护作用,尤以预处理组的保护效果为佳。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(1):91-93]

关键词: 肝/血液供给; 高迁移率族蛋白-1; 缺血再灌注损伤

中图分类号: R 657.3 **文献标识码:** B

肝脏缺血再灌注损伤(IRI)在肝脏外科中具有重要意义。近年来发现,高迁移率族蛋白-1(HMGB-1)作为细胞因子在多个水平参与并介导了IRI,而正丁酸钠作为HMGB-1抑制剂可有效抑制HMGB-1释放。本实验通过制作大鼠肝脏热IRI的动物模型,从细胞因子角度探讨正丁酸钠对肝脏IRI的保护作用及可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物模型制作及分组

雄性Wistar大鼠40只,体重(220 \pm 30)g,由本校第一临床医学院动物中心提供。10%水合氯醛(3mL/kg)行腹腔内注射麻醉,开腹显露第一肝门,用无损伤血管钳夹闭肝蒂,阻断入肝血流30min后,恢复血流行再灌注,即制成常温下大

鼠肝脏热I/R动物模型。S组仅开腹显露肝门而不阻断。随机分成5组:假手术组(S组)、缺血再灌注组(I/R组)、预处理组(T组,肝门阻断前20min注射正丁酸钠)、治疗A组(A组,再灌注前20min注射正丁酸钠)和治疗B组(B组,再灌注后20min注射正丁酸钠)。每组将再灌注后6h作为检测时点($n = 8$),预处理组及治疗A、B组分别于相应时点经大鼠阴茎背静脉注射10%正丁酸钠400mg/kg(购自美国Sigma公司)。I/R组于肝门阻断前20min经阴茎背静脉注射生理盐水4mL/kg。

1.2 血标本的采集与检测

经腹主动脉采血,离心(3000r/min, 10min)分离血清,将血清分装于2枚试管内, -20 $^{\circ}$ C贮存,以备全自动生化仪检测谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)及酶联免疫吸附试验(ELISA法)检测肿瘤坏死因子 α (TNF- α)(ELISA试剂盒购自森雄公司)。

1.3 肝组织标本处理

取肝左叶组织于10%甲醛溶液中固定24h,常规蜡块包埋、切片,HE染色,光镜下观察病理

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(D200539),黑龙江省教育厅科学技术研究项目(11521127)。

收稿日期:2007-08-28; **修订日期:**2007-12-29。

作者简介:赵海峰,男,哈尔滨医科大学附属第五医院副主任医师,主要从事肝胆胰外科方面的研究。

通讯作者:孙备 E-mail:sunbei70@tom.com

改变;取肝右叶组织经液氮处理后置 -80°C 冰箱保存,以备免疫印迹法(Western blot)检测 HMGB-1 表达水平(HMGB-1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司)。

1.4 统计学处理

计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。数据统计使用 SPSS13.0 软件进行。组间差异进行 q 检验及方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 AST, ALT 和 TNF- α 浓度

T 组, A 组及 B 组的血清 AST, ALT 和 TNF- α 浓度均低于 I/R 组($P<0.05$), T 组的 AST, TNF- α 浓度低于 A 组和 B 组($P<0.05$)。

2.2 镜下所见病理变化

光镜下 S 组肝组织结构规则, 细胞形态正常。I/R 组肝组织结构即发生明显的病理改变, 肝小

叶结构紊乱, 细胞质降解明显, 核仁缩小、凝集, 肝细胞索紊乱, 内皮细胞及肝细胞明显水肿变性, 肝血窦和中央静脉有程度不同的炎症细胞浸润和瘀血。T 组肝组织细胞水肿明显减轻, 肝组织汇管区炎症细胞明显减少, 肝血管瘀血及肝窦内红细胞淤积亦明显减轻, 核仁明显增大(图 1)。

表 1 血清 AST, ALT, TNF- α 浓度($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)	TNF- α (pg/mL)
S	184.88 \pm 20.03	55.88 \pm 10.23	6.74 \pm 2.71
I/R	627.86 \pm 101.70	193.00 \pm 48.12	32.38 \pm 5.60
T	308.25 \pm 50.60 ^{1),2)}	113.00 \pm 13.70 ¹⁾	20.01.83 \pm 5.29 ^{1),2)}
A	374.63 \pm 59.33 ¹⁾	143.38 \pm 41.19 ¹⁾	26.27 \pm 6.17 ¹⁾
B	364.75 \pm 48.94 ¹⁾	130.00 \pm 29.93 ¹⁾	26.01 \pm 6.25 ¹⁾

注:1)与 I/R 组比较,均为 $P<0.05$; 2)与 A, B 组比较, $P<0.05$

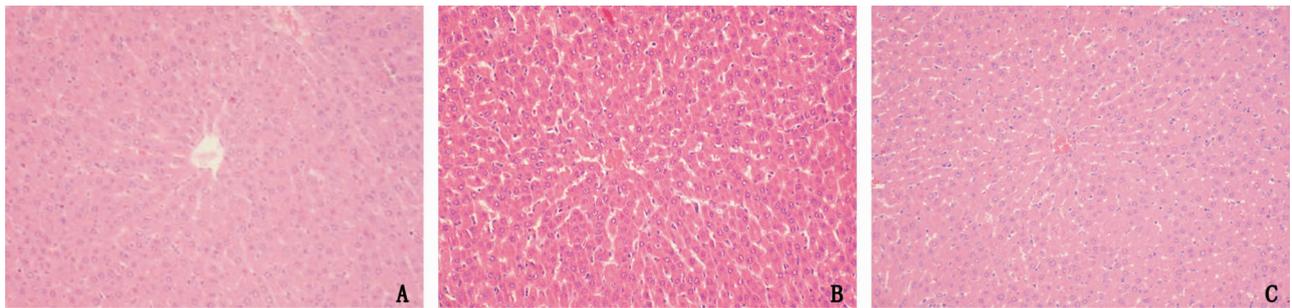


图 1 肝组织形态学变化(HE \times 100) A:S组; B:I/R组; C:T组

2.3 Western blot 法检测 HMGB-1 表达水平

S 组中不表达; I/R 组 HMGB-1 的表达水平最高; T 组, A 组及 B 组的 HMGB-1 表达水平均较 I/R 组低, 且 T 组低于 A 组和 B 组(图 2)。



图 2 各组肝脏 HMGB-1 表达水平

3 讨论

肝脏 IRI 是肝脏外科中常见的病理过程, 对其损伤机制的研究已成为肝外科特别是肝移植外科的研究热点之一^[1-2]。

血清 TNF- α 作为炎症反应的始发细胞因子。

大量研究资料表明, 肝脏 I/R 后可以通过坏死和凋亡两条途径引起细胞死亡, TNF- α 在此过程中起着十分重要的作用。HMGB-1 是一种存在于真核生物细胞内的非组蛋白染色体结合蛋白, 位于大多数细胞的细胞核^[3]。作为一种重要的晚期炎症介质参与了脓毒症的病理生理过程, 并介导了内毒素的致死效应。HMGB-1 可通过与 TNF- α , 白细胞介素 1(IL-1), 白细胞介素 6(IL-6) 等多种炎症介质复杂的相互作用, 引起 TNF- α 及 IL-1 等细胞因子的“瀑布式”释放, 从而介导肝细胞损害的发生。用纯化的 HMGB-1 处理人外周血单核细胞, 可以明显刺激 TNF- α , IL-1, IL-6 等炎症介质产生^[4], 本实验中各组 TNF- α 浓度变化趋势与 HMGB-1 表达大致相同, 可见在肝脏 IRI 中 HMGB-1 是作为 TNF- α 的上游炎症因子而发挥作用的。研究发现, 与脓毒症中 HMGB-1 作为晚期

炎症介质不同,在肝脏 IRI 中 HMGB-1 可作为炎症和器官损害的早期介质而发挥作用^[5-6]。本实验中早期给予正丁酸钠预处理可显著改善肝脏 IRI,且保护作用优于其他治疗组亦证实了这一结论。

肝脏 IRI 时, NF- κ B 激活并进入细胞核内,与一些炎症因子基因启动子区特异序列结合,上调 TNF- α 和细胞黏附分子-1 (ICAM-1) mRNA 表达,从而引起肝脏 IRI^[7]。正丁酸钠是一种天然存在于动物脂肪中的短链 4 碳脂肪酸盐,它可以抑制脱乙酰基酶引起的染色质高乙酰化组蛋白、高迁移率族蛋白的积蓄,这在真核基因调控研究中具有重要意义^[8]。HMGB-1 可通过主动和被动运输方式跨核膜运动,乙酰化后其向核外胞浆转运增强。正丁酸钠抑制 NF- κ B 信号转导是阻止 HMGB-1 释放的重要途径,其机制可能是正丁酸钠对去乙酰化的抑制效应^[9]。

本实验表明, I/R 6h 时 I/R 组血清 TNF- α , AST, ALT 含量及肝组织中 HMGB-1 水平均明显高于 S 组; T 组, A 组及 B 组相应时点的各项指标均较 I/R 组低,其中 T 组更低于 A 组及 B 组,并与相应时点的病理形态学改变相一致。上述结果证明,正丁酸钠对肝脏 IRI 具有明显保护作用,并以正丁酸钠预处理组对肝脏的保护作用为最佳。但其确切作用机制尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Fondevila C, Busuttill R W, Kupiec-Weglinski J W. Hepatic ischemia/reperfusion injury-a fresh look [J]. *Exp Mol Pathol*, 2003, 74(2):86-93.
- [2] Donckier V, loi P, Closset J, *et al.* Preconditioning of donors with interleukin-10 reduces hepatic ischemia reperfusion injury after liver transplantation in pigs [J]. *Transplantation*, 2003, 75(6):902-904.
- [3] 吴佳捷,姚志韬,李宜雄. HMGB1 的肿瘤生物学效应 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(6):584-586.
- [4] Andersson U, Wang H, Palmblad K, *et al.* High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(4):565-570.
- [5] Tsung A, Sahai R, Tanaka H, *et al.* The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion [J]. *J Exp Med*, 2005, 201(7):1135-1143.
- [6] Watanabe T, Kubota S, Nagaya M, *et al.* The role of HMGB1 on the development of necrosis during hepatic ischemia/reperfusion injury in mice [J]. *J Surg Res*, 2005, 124(1):59-66.
- [7] 徐钧,解军,鲍民生,等. 核因子- κ B/I- κ B 传导通路在肝脏缺血再灌注损伤中的作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(7):614-615.
- [8] 张立天,姚咏明,陆家齐,等. 正丁酸钠对脓毒症大鼠高迁移率族蛋白 B1 表达的拮抗作用 [J]. *解放军医学杂志*, 2005, 30(10):45-47.
- [9] Quivy V, Van Lint C. Regulation at multiple levels of NF- κ B mediated transactivation by protein acetylation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 68(6):1221-1229.

本刊启事

由国家科技部中国科学技术信息研究所主办的中国科技论文统计结果发布会于 2007 年 11 月 15 日在北京国际会议中心举行。与其同时,中国科学技术信息研究所出版的 2006 年版《中国科技期刊引证报告》(核心版),对 1 723 种中国科技论文统计源期刊的引文数据进行了统计分析。我刊 2006 年总被引用频次为 1 100,影响因子为 0.625,分别居 1 723 种统计源期刊的第 269 位和第 341 位;5 年影响因子为 0.804。