

• 论 著 •

肝 X 受体激动剂 GW3965 预处理对大鼠肝移植再灌注期 肝脏保护作用的实验研究

胡相友¹, 刘长安²

(1. 宣汉县人民医院肝胆外科, 四川宣汉 636150; 2. 重庆医科大学附属第二医院肝胆外科, 重庆 400000)

摘要:目的 探讨经过 GW3965 预处理激动肝 X 受体(LXR)后对 SD 大鼠肝移植缺血再灌注损伤(IRI)的保护作用及其机制。方法 70 只雄性、健康的 SD 大鼠,分为假手术组(SO 组,14 只)GW3965 预处理组(GW3965 组,14 对)和原位肝移植组(OLT 组,14 对);术后分别检测各时相点的血清转氨酶、肝组织病理改变、血浆炎症因子(TNF- α 、IL-1)水平,肝病理组织中 NF- κ B 表达水平。结果 再灌注 6、24 h 后原位肝移植组与 GW3965 组血浆炎症因子表达水平、血清转氨酶、肝脏组织病理损伤程度、核因子 κ B (NF- κ B)表达水平均高于 SO 组;而再灌注 6、24 h 后,GW3965 组血清转氨酶、血浆炎症因子表达水平、肝脏组织病理损伤、NF- κ B 表达水平低于 OLT 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 预先经过 GW3965 激动供肝的 LXR 后可以有效降低肝移植再灌注期肝脏内毒素信号通路中的核因子 κ B NF- κ B 表达和其下游炎症肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 1(IL-1)因子的产生,从而有效保护移植供肝缺血再灌注的损伤。

关键词:肝移植; 再灌注损伤; 肝 X 受体

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.047

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)15-2237-03

The experimental research on the protective effect of SD rats' liver transplantation reperfusion ischemia-reperfusion injury(IRI) after GW3965 activation of liver X receptor preprocessing

Hu Xiangyou¹, Liu Chang'an²

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Xuanhan County, Xuanhan, Sichuan 636150, China;

2. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Hospital Affiliated to

Chongqing Medical University, Chongqing 400000, China)

Abstract: Objective To study the protective effect and mechanism of SD rats' liver transplantation reperfusion ischemia-reperfusion injury(IRI) after GW3965 activation of liver X receptor preprocessing. **Methods** Separated Male SD(Sprague-Dawley) 70 rats into 3 groups which were sham operation group(SO group, 14 rats), orthotopic liver transplantation group(OLT group, 28 rats), and GW 3965 preprocessing group(GW 3965 group 28rats). The levels of serum transaminase, plasma inflammatory factors (TNF- α , IL-1), the changes of hepatic pathology and inflammatory factor mRNA, and the activities as well as its expressions of NF- κ B in hepatic tissue were observed, after the operation. **Results** After 6 and 24 hours perfusion, the levels of plasma inflammatory factors was expression, serum transaminase, the liver pathological injury degree and the activities as well as its expressions of NF- κ B in OLT group and GW3965 group were higher than those in SO group. While after reperfusion for 6 and 24 hours, the levels of serum transaminase, plasma inflammatory factors expression, the liver pathological injury degree, inflammatory factor and the activities as well as its expressions of NF- κ B in GW3965 group were much lower than those in OLT group, there were obvious differences ($P < 0.05$). **Conclusion** After GW3965 activation of liver X receptor preprocessing, the activities of NF- κ B and the emerging of downstream inflammatory mediator factors are reduced effectively and protect the liver after the ischemia reperfusion.

Key words: liver transplantation; ischemia-reperfusion injury; liver X receptor

目前肝移植手术已经成为终末期肝病治疗的有效方法,但是在肝移植过程中缺血再灌注损伤仍然是难以避免的问题,由肝移植引发的缺血再灌注损伤(IRI)是成为移植肝脏肝功能不全导致移植手术失败的元凶。肝脏缺血再灌注后让肝脏组织受到损伤的因素是多样且复杂的,包括急性排斥反应、微循环障碍、枯否细胞(KCs)、中性粒细胞等炎症细胞激活并释放诸多炎性介质致多种酶活性失活和能量代谢障碍,最终造成肝细胞凋亡和坏死^[1]。普遍认为移植早期过度的炎症应答在 IRI 中是起主要角色。研究发现,肝 X 受体(LXR)能够负性调控炎症反应^[3],因此利用 LXR 为靶点保护移植肝 IRI 成为可能。LXR 激动剂目前有 GW3965 和 T0901317,而这两种配体并无特异性选择。证据表明:激动 LXR 能抑制细菌、脂多糖(LPS)等刺激所产生的炎症因子;在肝脏是 LXR 表达最丰富,有理由

相信激动肝脏的 LXR 能够有更好保护效果。本研究从抑制内毒素诱导 KCs 过度活化的通路中炎症因子 NF- κ B 和其下游因子,初步探讨 GW3965 预处理对 SD 大鼠肝移植缺血再灌注期肝脏的保护作用和机制。

1 材料与方 法

1.1 材料 雄性、健康的 Sprague Dawley(SD)大鼠 70 只,选取鼠龄在(85 \pm 3)d,其 SD 大鼠在 200~220 g。

1.2 仪器与试剂 LXR 激动剂 GW 3965 HYDROCHLORIDE 购于美国(SIGMA; MDL Number: MFCD08276920); Millipore 公司提供; Milli-Q 超纯水制备系统;全自动生化分析仪-CX7, Beckman, USA。

1.3 方法 分为假手术组(SO 组,14 只)、GW3965 预处理组(GW3965 组)和原位肝移植组(OLT 组)每组各 14 对。术前

准备:(1)SD 大鼠术前禁食水;(2)手术 2 h 前 GW3965 组供体经尾静脉给予 GW3965 0.5 mg/kg,而 OLT 组和 SO 组给予相同体积生理盐水 0.6 mL 尾静脉注入。麻醉和手术:(1)各组大鼠用半开放式供氧和乙醚混合吸入麻醉;(2)正常 SD 大鼠被作为受体,参照实验室改进的 Kamada 两袖套方法进行大鼠的原位肝移植从而建立模型^[4];(3)将 SO 组只经开腹后解剖到十二指肠韧带和游离肝周韧带完成手术;(4)原位肝移植组和原位肝移植+GW3965 预处理组(GW3965 组):开腹分离肝上、肝下下腔静脉及胆总管活体胆管用自备的支架管插管备用;热缺血供肝的时间低于 2 min;将游离下的肝脏置于 4 °C 林格式液中将门静脉、肝下下腔静脉用导管袖套好后备用。(5)受体手术:无损伤血管夹阻断门静脉后用 0.9% 生理盐水 1.5 mL 驱血来自体血回输,解剖游离肝脏后切除原肝,供肝放入腹腔行原位法植入供肝;无肝期时间控制在(17±4)min 之内,超过此时间的就弃用;重建胆道。获取肝组织:SO 组 SD 大鼠在分离解剖十二指肠韧带和肝脏周围的韧带后 6、24 h;OLT 组和 GW3965 组把移植肝完成后门静脉血流恢复血供的 6、24 h 两个时段(每组每时段 7 只),在抽取下腔静脉血约 2 mL 后处死大鼠取右肝组织,肝组织迅速置于-70 °C 液氮灌中备检。检测肝功能:全自动生化分析仪测定其 ALT、AST 的值。

1.4 肝组织 HE 染色 在 HE 染色高倍光镜下通过双盲法 Suzuki 评分的标准对各病理组织切片进行评分^[5];其分值越高肝脏组织受损伤的程度越重。

1.5 ELISA 检测血浆中 TNF-α、IL-1 水平 ELISA 检测血浆中炎症因子 TNF-α、IL-1 水平。严格按照 ELISA 试剂盒说明书使用;于 450 nm 光波波长下测定每孔的 OD 值;样品中的 TNF-α、IL-1 水平可以根据其 OD 值在标准曲线上经过换算得到相应的浓度。检测值范围:0~400 pg/mL。NF-κB/P65 测定:经病理切片免疫组化半定量检测 NF-κB/P65 的表达。

1.6 统计学处理 将每份样本检测 3 次的结果取其平均数作为该样本观察值;以 $\bar{x} \pm s$ 来表示各组实验数据,使用 SPSS 19.0 统计软件分析所得数据;ANOVA 进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝功能酶学指标 再灌注 6、24 h 血浆中的 ALT、AST 水平在 SO 组最低,SO 组因为无可以使肝功受损的明显因素,因而 ALT、AST 水平显然会低于 OLT 组和 GW3965 组;而 GW3965 和 OLT 组比较,GW3965 组肝功 ALT、AST 水平明显要低于 OLT 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 肝移植后恢复灌注 6、24 h 血清 ALT、AST 水平比较(U/L)

组别	ALT		AST	
	6 h	24 h	6 h	24 h
SO 组	47.9±9.1	41.2±7.6	46.7±10.4	42.4±6.6
GW3965 组	530.5±43.7*	452.6±33.1*	625.6±59.3*	563.1±40.5*
OLT 组	907.2±98.2	786.6±86.5	1 024.3±108.7	834.4±87.6

*: $P < 0.05$, 与 OLT 组比较。

2.2 肝组织病理变化和光镜 Suzuki 评分 与肝功能酶学变化的指标相似,GW3965 在很大程度上可以减轻肝脏实质细胞和非实质细胞的损害,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”);对肝细胞和肝窦内皮细胞也有很好的保护作

用因而 Suzuki 评分得分也低。肝移植后恢复灌注 6 h 后其 Suzuki 评分得分分别为 SO 组(3.20±0.23)分;GW3965 组(9.71±0.31)分;OLT 组(14.09±0.60)分。

2.3 血流灌注后 6、24 h 血浆中 TNF-α、IL-1 水平 肝移植完成恢复血液灌注后 6、24 h 内的 TNF-α、IL-1($\bar{x} \pm s$)值,从表 2 中可以明显看出,TNF-α、IL-1 变化值水平趋势是和肝功转氨酶一致的,在 6 h 较高,24 h 回落;在 GW3965 组的炎症因子 TNF-α、IL-1 水平明显低于 OLT 组,两组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 肝移植恢复血流灌注后 6、24 h 血浆中的 TNF-α、IL-1 水平比较(pg/mL)

组别	TNF-α		IL-1	
	6 h	24 h	6 h	24 h
OLT 组	276.4±22.5	228.7±35.0	212.8±31.4	204.4±26.2
GW3965 组	131.7±16.3*	114.8±15.9*	122.5±18.7*	94.9±17.9*
SO 组	37.6±4.9	34.5±3.3	29.7±7.7	23.4±6.0

*: $P < 0.05$, 与 OLT 组比较。

2.4 肝组织中 NF-κB/P65 半定量 NF-κB 在炎症信号通路中起着“开关”效应,它上调或下调决定其下游炎症因子,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”),在 SO 组中可以看到其 NF-κB 仅有少量的表达,GW3965 组相对 SO 组讲其表达是增多,但是 OLT 组相对于 SO 组和 GW3965 组来讲 NF-κB 的表达是明显增多,尤其是在胞浆中表达显著增加的。

3 讨 论

经过 GW3965 预处理激动供肝的 LXR 建立 SD 大鼠肝移植模型,血清转氨酶 GW3965 组低于 OLT 组,肝组织病理损伤 GW3965 组轻于 OLT 组,炎症因子 NF-κB 和其下游炎症因子 TNF-α、IL-1 的表达水平 GW3965 组低于 OLT 组,表明 LXR 激动剂 GW3965 预处理减轻肝移植后 IRI 是有效的。LXR 起初称核孤儿受体,因在肝脏中表达最丰富而称为肝 X 受体^[6],本研究 GW3965 预处理激动 LXR 后,在供体的肝脏内可以抑制 NF-κB 的活性从而导致其下游的炎症 TNF-α、IL-1 等因子产生减少;TNF-α 是巨噬细胞产生的,淋巴细胞、中性粒细胞也是可以产生的,能够直接损伤内皮细胞,使其通透性增高而使得炎症细胞聚集造成肝细胞损伤;IL-1 主要是单核巨噬细胞分泌产生,与肝细胞膜特异性受体相结合具有广泛的诱导炎症和免疫作用导致肝细胞受损,严重会使细胞坏死^[7],最终可能导致肝衰手术失败。通过检测受体大鼠在肝移植后早期血浆中 ALT、AST 水平也显著降低,转氨酶的指标是肝细胞是否受损的表现之一;光镜下也见较轻的肝细胞坏死、气球样变及肝血窦阻塞等造成的损伤,因而也同时获得有较低 Suzuki 评分。通过这些改变初步地说明了 GW3965 预处理激动 LXR 是可以减轻肝移植后早期 IRI;而有研究表明,活化的 NF-κB 促进损伤性炎症因子过度表达是肝移植后 IRI 的主要原因之一^[8],NF-κB 介导的肝移植后 IRI 的主要信号通路具有重要作用。经过次实验发现,肝移植后再灌注 6 h 为 NF-κB 活化高峰,再灌注在 6 h 组织损伤最明显;在两个活化高峰期大量促炎性介质,如 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 和 ICAM-1 等表达增加^[9],这些细胞因子虽有些不直接引起肝组织和细胞损伤,但可使炎症细胞趋化聚集并释放破坏性的细胞因子如 CAM、GM-CSF 等^[10];而 TNF-α、IL-1 等因子会反作用于 LXR 使其形成恶性循环和瀑布式效应损伤肝脏细胞,并进一步吸引炎症

细胞聚集,堵塞肝血窦从而破坏肝组织^[11]。经检测肝移植后再灌注 6 h 和 24 h 血浆 TNF- α 、IL-1 水平;发现 GW3965 组两时间点其炎症因子均明显低于 OLT 组;说明在肝移植中 LXR 被激动后炎症因子表达也会受到抑制,也正是利用了 LXR 的负性炎症效应。NF- κ B 在细胞中主要以 P65 异源聚体形式存在,并与其抑制剂 I κ B 结合保留在细胞浆中^[12];当受到炎症因子 TNF- α 、IL-1、ICAM-1 等的刺激,I κ B 被泛素化降解,被释放的 NF- κ B 进入细胞核与核酸结合诱导引起基因转录。LXR 被激动后可能会产生下游因子,阻止 I κ B 被泛素化降解,因而 NF- κ B 不能与 DNA 有效结合并启动相关基因转录。通过检测 NF- κ B P65/P50 在肝组织中再灌注后 6 h 的表达,结果表明,通过 GW3965 预处理激动 LXR 后 NF- κ B 表达受到明显抑制。本实验经过 GW3965 预处理激动供肝的 LXR,建立 SD 大鼠肝移植模型,检测 SD 大鼠肝移植手术结束后血清转氨酶、肝组织病理学改变、主要炎症因子 NF- κ B 和其下游炎症因子 TNF- α 、IL-1 的表达水平,发现 GW3965 预处理组肝移植后 IRI 的损伤轻于对比 OLT 组,表明 LXR 激动剂 GW3965 预处理减轻肝移植后 IRI 是有效的,本实验结果经 GW3965 预处理可以降低 SD 大鼠肝移植术后的血清转氨酶;减轻移植肝的病理损伤;降低内毒素信号通路的主要炎症因子 NF- κ B 和其下游炎症因子 TNF- α 、IL-1 的表达水平。通过以上几方面从而有效保护移植供肝缺血再灌注损伤。

参考文献

[1] Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA, et al. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury[J]. Surg Res, 2011, 147(1): 153-159.

[2] Quillorn, Tonery ZP. Liver x receptors as integrators of metabolic and inflammatory signaling[J]. Cilt Invest, 2010, 114(1): 607-618.

(上接第 2236 页)

among parents and siblings of patients with schizophrenia[J]. Br J Psychiatry, 2007, 190(1): 156-161.

[9] Catts VS, Catts SV, O'Toole BI, et al. Cancer incidence in patients with schizophrenia and their first-degree relatives - a meta-analysis[J]. Acta Psychiatr Scand, 2008, 117(5): 323-336.

[10] Cohen M, Dembling B, Schorling J. The association between schizophrenia and cancer a population-based mortality study [J]. Schizophr Res, 2002, 57(2/3): 139-146.

[11] Park J. Differences in p53 gene polymorphisms between Korean schizophrenia and lung cancer patients[J]. Schizophr Res, 2004, 67(1): 71-74.

[12] Yang Y, Xiao Z, Chen W, et al. Tumor suppressor gene TP53 is genetically associated with schizophrenia in the Chinese population[J]. Neurosci Lett, 2004, 369(2): 126-131.

[13] Catts VS, Catts SV. Apoptosis and schizophrenia is the tumour suppressor gene, p53, a candidate susceptibility gene[J]. Schizophr Res, 2000, 41(3): 405-415.

[14] Waddington JL, Lane A, Scully PJ, et al. Neurodevelopmental and neuroprogressive processes in schizophrenia. Antithetical or complementary, over a lifetime trajectory of disease[J]. Psychiatr Clin North Am, 1998, 21(1): 123-149.

[15] Andreasen NC. The lifetime trajectory of schizophrenia and the concept of neurodevelopment[J]. Dialogues Clin Neurosci, 2010, 12(3): 409-415.

[3] Collins JL, Fivish BM, Wastion MA, et al. identification of a non-steroidal LRXs agonist through parallel synthesis of tertiary amines[J]. Med Chem, 2011, 45(1): 1963-1967.

[4] 彭勇, 龚建平. 改良的“二袖套法”建立大鼠原位肝移植动物模型[J]. 中国现代普通外科进展, 2003, 6(2): 87.

[5] Linferty D, Choudiriy T, Rabb H. Lymphocytes and ischemia-reperfusion injury[J]. Transplant Rev, 2010, 23(1): 1-11.

[6] Rimontiy E, Chinetti-Gbaguidi G. Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXR in mice and men [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 28(6): 1050-1059.

[7] Ambristy G, Adiday C, Altieri DC, et al. A novel anti-apoptosis gene IL-1, expressed in cancer and lymphoma[J]. Nat Med, 2011, 20(3): 917-921.

[8] Altieri DC, Valideting A. NF- κ B as a cancer therapeutic target [J]. Nature, 2005, 22(3): 45-52.

[9] Mary H, Leeyi KS. Diferential roles for the coactivators CBP and p300 on TCF/beta-catenin-med iated NF- κ B expression[J]. Oncngene, 2010, 24(1): 3519-3531.

[10] Sun C, Nettesheimri D, Lu Z, et al. Solution structure of human LXR and its binding interfacewith Smac/Diablo[J]. Biochemistry, 2012, 44(2): 11-17.

[11] Li F. Role of LXR and its splice varian in tumorigenesis[J]. Br J Cancer, 2011, 92(1): 212-216.

[12] McNeish IA, Lope SR, Bell SJ, et al. IRI interacts with Smac/DI-ABLO in ovarian carcinoma cells but is redundan t in Smacmediatedapoptosis[J]. Exp Ceu Res, 2010, 302(2): 69-82.

(收稿日期: 2015-02-08)



[16] Lewis DA, Levitt P. Schizophrenia as a disorder of neurodevelopment[J]. Annu Rev Neurosci, 2002, 25(1): 409-432.

[17] Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex[J]. Nat Rev Cancer, 2009, 9(10): 749-758.

[18] Walker EF, Savoie T, Davis D. Neuromotor precursors of schizophrenia[J]. Schizophr Bull, 1994, 20(3): 441-451.

[19] Schiffman J, Walker E, Ekstrom M, et al. Childhood videotaped social and neuromotor precursors of schizophrenia: a prospective investigation[J]. Am J Psychiatry, 2004, 161(11): 2021-2027.

[20] Freedman R, Leonard S, Olincy A, et al. Evidence for the multi-genic inheritance of schizophrenia[J]. Am J Med Genet, 2001, 105(8): 794-800.

[21] Ni X, Trakalo J, Valente J, et al. Human p53 tumor suppressor gene (TP53) and schizophrenia: case-control and family studies [J]. Neurosci Lett, 2005, 388(3): 173-178.

[22] Shi YY, He L. SHEsis, a powerful software platform for analyses of linkage disequilibrium, haplotype construction, and genetic association at polymorphism loci[J]. Cell Res, 2005, 15(2): 97-98.

(收稿日期: 2015-03-14)

