文章编号:1000-5404(2006)19-1931-04

论著

脂多糖预处理对大鼠肝移植再灌注期肝脏的保护作用及机制

李 洋,刘作金,龚建平 (重庆医科大学附属第二医院普通外科,重庆 400010)

提 要:目的 探讨脂多糖LPS预处理对大鼠肝移植再灌注期肝脏的保护作用及机制。**方法** 90只雄性SD大鼠,分为假手术组(Sham组)、原位肝移植组(OLT组)和原位肝移植+LPS预处理组(LPS组)。Sham组只开腹分离肝十二指肠韧带,OLT组和LPS组按两袖套法进行肝移植。Sham组于分离肝十二指肠韧带后0、60、180 min,OLT组和LPS组于门静脉血流恢复后0、60、180 min分别测定各时相点血清TNF-α、ALT、AST水平及肝组织NF-κB活性,并取肝组织行光镜、电镜检查。**结果** 再灌注后0、60、180 min,OLT组与LPS组的NF-κB活性、TNF-α含量均高于Sham组($P<0.01$);再灌注后60、180 min,OLT组的NF-κB活性以及TNF-α含量均明显高于LPS组($P<0.01$),且OLT组的ALT、AST水平明显高于LPS组($P<0.01$),光镜及电镜下观察OLT组肝组织损害较LPS组重。**结论** 肝移植再灌注期内毒素信号转导通路的NF-κB活性增强,产生炎性介质对移植肝造成损害;LPS预处理可降低肝移植再灌注期肝脏NF-κB活性和炎性介质的产生,从而减轻肝脏的损害。

关键词: 肝移植;再灌注损伤;脂多糖
中图法分类号: R392.11;R392.12;R631 **文献标识码:** A

Protective effect of lipopolysaccharide preconditioning on ischemia/reperfusion injury of rat graft liver

LI Yang, LIU Zuo-jin, GONG Jian-ping (Department of General Surgery, The Affiliated Second Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and the possible mechanism of lipopolysaccharide (LPS) preconditioning on ischemia/reperfusion injury of rat graft liver. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were divided into three groups ($n=30$ in each group): sham operation group (Sham group), orthotopic liver transplantation group (OLT group) and LPS preconditioning group (LPS group). Only dissecting hepatoduodenal ligament was perfomed in Sham group. On day one, 0.1 mg/kg LPS and on day 2, 3, 4, 5, 0.5 mg/kg LPS for LPS rats and 0.5 ml PBS pathogen-free solution for OLT rats was injected through caudal vein before OLT was performed by two-cuff method in the two group rats on day 8. The levels of tumor necrosis factor-α (TNF-α), ALT, AST in inferior caval vein blood and the activities of NF-κB in hepatic tissue were detected at 0, 60, 180 min after dissecting hepatoduodenal ligament in Sham group and after portal vein reperfusion in OLT group and LPS group. The morphological changes of hepatic tissue were observed through light microscope and electron microscope at different time points. **Results** As compared with Sham group at the different time points respectively, the activities of NF-κB and the levels of TNF-α were higher in OLT group and LPS group ($P<0.01$). These indexes were evidently higher in OLT group than in LPS group ($P<0.01$) at 60 min and 180 min after reperfusion. Furthermore, the levels of ALT and AST in OLT group were significantly higher than in LPS group ($P<0.01$) at 60 min and 180 min after reperfusion. Similarly, the histologic damage in the hepatic tissue in OLT group was more serious than in LPS group. **Conclusion** The activities of NF-κB in endotoxin signaling pathways were enhanced and the numerous inflammatory mediators were released to damage the graft liver. LPS preconditioning could decrease the activities of NF-κB and the release of inflammatory mediators to protect the graft liver against ischemia/reperfusion injury.

Key words: liver transplantation; reperfusion injury; lipopolysaccharide

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471696);重庆市自然科学基金资助项目(2005BB5242);中国高校博士学科点专项基金资助项目(20050631001)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30471696) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5242) and the Funds of Doctor Cultivation of Colleges and Universities (20050631001)

作者简介: 李 洋(1968-),男,重庆市人,博士,讲师,主要从事肝移植缺血再灌注损伤方面的研究。电话:13896024450, E-mail: liyang_68813@126.com

收稿日期: 2006-07-12;**修回日期:** 2006-09-16

肝移植再灌注期，大量肠源性内毒素进入门静脉血流，血循环中的脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）经内毒素信号转导通路激活 Kupffer 细胞核因子-κB（nuclear factor-κB，NF-κB）活性，产生 TNF-α、ICAM-1 等炎症介质造成机体损害。研究表明，预先接受小剂量 LPS 刺激后，机体或培养的单核巨噬细胞在再次受 LPS 刺激时，应答炎症反应明显减弱，这一现象称为内毒素耐受（endotoxin tolerance，ET）。ET 是机体对 LPS 刺激产生的一系列复杂的适应性调节反应，并非应答耗竭，而是和 LPS 的相关信号转导蛋白及下游的 NF-κB、TNF-α、IL-6 和 ICAM-1 等炎症因子表达改变密切相关[1]。本研究观察 LPS 预处理对大鼠肝移植再灌注期肝脏组织学、功能及肝组织 NF-κB 活性、血清 TNF-α 水平的影响，探讨 LPS 预处理对大鼠肝移植再灌注期肝脏的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性 SD 大鼠 90 只，鼠龄 10～12 周，体质量 240～280 g，购自重庆医科大学实验动物中心；脂多糖（lipopolysaccharide，LPS）；大肠杆菌 *coli* O111：B4（美国 Sigma 公司）；核蛋白抽提试剂盒（No. 40010）、TransAm™ NF-κB（No. 40096）购自美国 Active motif 公司；TNF-α ELISA 检测试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠原位肝移植模型的建立及分组 SD 大鼠，分为假手术组（Sham 组）、原位肝移植组（OLT 组）和原位肝移植 + LPS 预处理组（LPS 组），每组各 30 只。Sham 组只开腹分离肝十二指肠韧带；LPS 组供体第 1 天经尾静脉给予 LPS 0.1 mg/kg，第 2、3、4、5 天给予 0.5 mg/kg，OLT 组给予等体积 0.5 ml 无菌 PBS 液。第 8 天，OLT 组和 LPS 组以未予任何处理的正常 SD 大鼠为受体，参照本实验室改进的 Kamada 两袖套法[2]进行大鼠原位肝移植，受体门静脉阻断时间为（19.2 ± 2.5）min。Sham 组于分离肝十二指肠韧带后 0、60、180 min、OLT 组和 LPS 组于移植肝门静脉恢复再灌注后 0、60、180 min 3 个时段（每组每时段 10 只），抽取下腔静脉血 2 ml 并切取肝左外叶组织备检。

1.2.2 肝组织 NF-κB 活性测定 采用 Active Motif 公司提供的 NF-κB p65 ELISA 检测试剂盒检测 NF-κB 活性。根据试剂盒说明，提取不同时相的肝组织核蛋白，经蛋白质定量后，按 5 μg 核蛋白/孔加入预先处理的 96 孔酶联板（已包被含 NF-κB 结合位点的寡聚核苷酸），野生型及突变型寡核苷酸同源序列为对照，置 100 r/min 低速摇床室温孵育 1 h；用 200 μl/孔清洗缓冲液洗涤 3 次后，加入 100 μl/孔 1∶1 000 的抗 NF-κB p65 亚单位的抗体，静置室温孵育 1 h；洗涤 3 次后，再加入 100 μl/孔 1∶10 000 的辣根过氧化物酶标记的二抗，静置室温孵育 1 h；每孔加入显色液 100 μl，避光反应 10 min 后，再以 100 μl/孔加入终止液（0.5 mol/L 的 H_2SO_4），5 min 内用全自动酶标仪在 450 nm 波长下测定 $D(450)$ 值，NF-κB 活性以 $D(450)$ 值表示。

1.2.3 血清 TNF-α 含量检测 抽下腔静脉血 1 ml，根据 ELISA 试剂盒说明，测定各时段血清 TNF-α 含量。

1.2.4 肝功能检测 各组均取下腔静脉血 1 ml，以 Beckman CX7 型全自动生化分析仪测定 ALT、AST。

1.2.5 肝组织病理学观察 取下肝组织，在 1 min 内用干净锐利的剪刀、双面刀片将所取样品组织块修切成 1 mm^3，并放入装有 4% 戊二醛固定液（预冷）的干净小瓶中后，立即放在 4 ℃冰箱内保存，待全部样品取材完毕后送电镜检查；另取标本用 10% 甲醛固定，石蜡包埋，4 μm 厚连续切片并进行 HE 染色，作光镜观察。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析和 LSD-t 检验。

2 结果

2.1 内毒素预处理对肝移植再灌注后肝脏 NF-κB 活性的影响

再灌注后 0、60、180 min，Sham 组、OLT 组与 LPS 组肝脏 NF-κB 活性总体均数不相等，差异有统计学意义（F 值分别为 121.71、2 595.42、1 630.93，$P<0.01$）；再灌注后 0 min，OLT 组、LPS 组与 Sham 组比较差异有统计学意义（t 值分别为 12.90、13.98，$P<0.01$），但 LPS 组与 OLT 组比较差异无统计学意义（t 值为 1.08，$P>0.05$）；OLT 组、LPS 组再灌注后 60 min NF-κB 活性显著升高达到高峰，180 min 稍下降但仍保持在较高的状态，并明显高于同时相点的 LPS 组，且 180 min 时 LPS 组已迅速下降，再灌注后 60、180 min，LPS 组与 OLT 组比较差异有统计学意义（t 值分别为 12.67、42.47，$P<0.01$）。见表 1。

表 1 LPS 预处理对肝移植再灌注后肝脏 NF-κB 活性的影响[$D(450)$]

组别	再灌注时间（t/min）		
	0	60	180
Sham 组	0.19 ± 0.015	0.19 ± 0.014	0.20 ± 0.016
OLT 组	0.31 ± 0.019[a]	0.80 ± 0.016[ab]	0.60 ± 0.019[ab]
LPS 组	0.32 ± 0.024[a]	0.46 ± 0.023[a]	0.29 ± 0.011[a]

a：$P<0.01$，与 Sham 组比较；b：$P<0.01$，与 LPS 组比较

2.2 内毒素预处理对肝移植再灌注后血清 TNF-α 含量的影响

结果表明：LPS 组与 OLT 组在各时相点血清 TNF-α 含量均明显高于 Sham 组（$P<0.01$）；再灌注后 0 min，LPS 组与 OLT 组的 TNF-α 活性无显著性差异（$P>0.05$）；OCT 组、LPS 组的 TNF-α 含量于再灌注后 60 min 迅速上升达高峰，180 min 时已迅速下降，但 OLT 组仍处于较高水平，并且均明显高于同时相点的 LPS 组（$P<0.01$）。见表 2。

表 2 LPS 预处理对肝移植再灌注后血清 TNF-α 含量的影响（ρ_B/pg·ml^{-1}，$n=30$，$\bar{x} \pm s$）

组别	再灌注时间（t/min）		
	0	60	180
Sham 组	2.16 ± 0.65	2.73 ± 0.58	2.43 ± 0.71
OLT 组	8.15 ± 0.54[a]	2653.49 ± 419.66[ab]	731.56 ± 85.74[ab]
LPS 组	8.50 ± 0.62[a]	1548.60 ± 213.87[a]	56.18 ± 16.68[a]

a：$P<0.01$，与 Sham 组比较；b：$P<0.01$，与 LPS 组比较

2.3 内毒素预处理对肝移植再灌注后肝功能的影响

再灌注后 0 min，ALT、AST 开始升高，再灌注后 60、180 min 迅速上升，但 OLT 组上升幅度较大，LPS 组上升幅度较小。再

灌注后 0 min，OLT 组与 LPS 组的 ALT、AST 水平无显著性差异（$P>0.05$），但均明显高于 Sham 组（$P<0.01$）。再灌注后 60、180 min，OLT 组与 LPS 组内各时相点比较，ALT、AST 水平有显著性差异（$P<0.01$）。见表 3。

表 3　LPS 预处理对肝移植再灌注后 ALT 和 AST 的影响（U/L，$\bar{x}\pm s$）

组别	ALT			AST		
	0 min	60 min	180 min	0 min	60 min	180 min
Sham 组	43 ± 13	47 ± 15	44 ± 12	161 ± 21	165 ± 26	166 ± 19
OLT 组	251 ± 62[a]	540 ± 83[b]	742 ± 98[b]	347 ± 98[b]	631 ± 98[b]	876 ± 96[b]
LPS 组	257 ± 67	348 ± 42[a]	485 ± 87[a]	351 ± 94[a]	513 ± 83[a]	663 ± 91[a]

a：$P<0.01$，与 Sham 组比较；b：$P<0.01$，与 LPS 组比较

2.4　内毒素预处理对肝移植再灌注后肝组织病理学的影响

HE 染色结果显示：再灌注后 0 min，LPS 组和 OLT 组镜下结构大致正常；再灌注后 60 min 及 180 min，LPS 组出现轻度肝细胞、窦内皮细胞肿胀和少量炎症细胞浸润；再灌注后 60 min 及 180 min，OLT 组肝细胞中-重度肿胀，可见大量气球样变、血窦扩张，汇管区有大量炎症细胞浸润。见图 1、2。

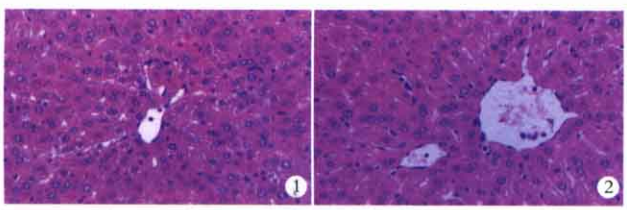
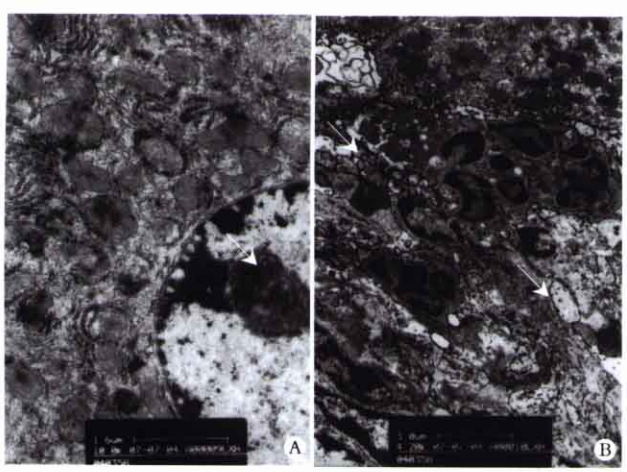


图 1　再灌注 180 min OLT 组肝组织光镜观察　（HE×200）
图 2　再灌注 180 min LPS 组肝组织光镜观察　（HE×200）

电镜结果表明：再灌注后 180 min，OLT 组可见明显的肝细胞核固缩坏死，血窦显著扩张，内有较多 Kupffer 细胞和中性粒细胞浸润，内质网及线粒体扩张明显；再灌注后 180 min，LPS 组仅见肝细胞线粒体轻-中度肿胀，内质网轻度扩张，少量炎性细胞浸润。见图 3。



A：肝细胞核固缩坏死（↑）；B：内质网扩张及线粒体肿胀明显（↑）
图 3　再灌注 180 min OLT 组肝组织电镜观察　（TEM × 4 200）

3　讨论

缺血再灌注损伤（ischemia/reperfusion injury，I/RI）仍是肝移植无法避免的问题，它是导致移植肝功能不良或无功能、进而造成移植失败，机体死亡的重要原因之一，对此目前仍无有效的治疗对策。I/RI 是一系列相互依赖的复杂机制共同作用的结果，但 Kupffer 细胞（KCs）过度激活导致 NF-κB 活性增加、TNF-α 大量释放是引发肝脏 I/RI 的关键因素。因此，克服 KCs 在缺血再灌注期的过度激活已成为肝移植外科必须面对的挑战之一[3]。

已证实 LPS 是肝脏再灌注时 KCs 过度激活，进而导致 I/RI 瀑布效应的重要原因之一。受体门静脉阻断造成门静脉血液的内毒素含量蓄积性升高，缺乏门静脉血供的供肝 KCs 又对 LPS 刺激特别敏感，其 LPS 膜受体表达明显增强[4]，因此 KCs 于再灌注期极易被内毒素诱导而过度激活。肝移植再灌注期，大量肠源性内毒素进入门静脉血流，血循环中的 LPS 经内毒素信号转导通路激活 Kupffer 细胞 NF-κB 活性，产生 TNF-α 等炎症介质，TNF-α 可诱导黏附因子产生、补体激活、触发中性粒细胞过氧化呼吸爆发反应等造成肝脏损害。但用小剂量（亚致死剂量）LPS 预处理后，机体或培养的单核巨噬细胞在再次 LPS 刺激时，炎症应答反应明显减弱，这一现象被称为内毒素耐受（endotoxin tolerance，ET）。ET 是机体对损伤刺激产生的一系列复杂的反向调节性适应反应，就本质而言，ET 并非机体的应答耗竭，而是通过下调 NF-κB、TNF-α，IL-6 和 NO 等的表达体现一种重要的调节机制[1]。此外，ET 作为一种干预措施不仅可防止再次 LPS 刺激后机体出现过度的炎症反应，而且还能诱导出机体对 I/RI 的交叉耐受作用[3]。

本实验结果表明，在缺血期（再灌注 0 min），LPS 组和 OLT 组的 NF-κB 活性、血清 TNF-α 含量、ALT、AST 水平均明显高于正常对照组，显然门静脉血流阻断还诱导 KCs 的 LPS 胞内信号转导通路的 NF-κB 活性增强、炎性介质 TNF-α 产生增加以及缺血氧化应急反应等机制造成肝脏损害。NF-κB 与 TNF-α 是一种普遍存在的转录调控因子与促炎症因子，为多种信号转导途径的汇聚点，缺血所诱发的多种其他病理状态（除内毒素外）必然导致 LPS 组和 OLT 组的 NF-κB 活性与 TNF-α 水平均高于正常对照组。不过 NF-κB 与 TNF-α 均属于早期反应因子，数天低剂量内毒素预处理所诱导的升高效应已恢复至正常水平，因此 LPS 组和 OLT 组在再灌注前的差异并无显著性。再灌注期，OLT 组的 NF-κB 活性与 TNF-α 含量迅速升高并明显高于 LPS 组，尤其是再灌注 180 min 时分别为 LPS 组的 2 倍和 16 倍，这可能是由于 LPS 预处理抑制再灌注期内毒素信号转导通路的相关信号转导蛋白白细胞介

素-1受体相关激酶-4（interleukin-1 receptor associated kinase-4，IRAK-4）所致，IRAK-4是位于NF-κB上游的调节内毒素信号转导的最关键因子[5]。

因此，我们认为对大鼠肝移植供体进行LPS预处理，可以对肝移植再灌注期肝脏具有保护作用，其机制可能是LPS预处理抑制内毒素信号转导通路的相关信号转导蛋白IRAK-4的表达，从而导致其下游的NF-κB活性降低、TNF-α等炎症介质产生减少，使肝脏损害减轻。

参考文献：

[1] FAN H, COOK J A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance [J]. J Endotoxin Res, 2004, 10(2): 71-84.

[2] 彭 勇，龚建平，涂 兵，等. 改良"二袖套法"制备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): 86-89.

[3] KARIKO K, WEISSMAN D, WELSH F A. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling—a unifying theme in ischemic tolerance [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2004, 24(11): 1288-1304.

[4] PENG Y, GONG J P, LIU C A, *et al*. Expression of toll-like receptor 4 and MD-2 gene and protein in Kupffer cells after ischemia-reperfusion in rat liver graft [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(4): 2890-2893.

[5] LYE E, MIRTSOS C, SUZUKI N, *et al*. The role of interleukin 1 receptor-associated kinase-4 (IRAK-4) kinase activity in IRAK-4-mediated signaling[J]. J Biol Chem, 2004, 279(39): 40653-40658.

（编辑 汪勤俭）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2006)19-1934-01

腰大池持续外引流术治疗蛛网膜下腔出血56例的临床分析

何 欣，刘晓化，吕芙蓉 （武警黑龙江省总队医院神经外科，哈尔滨 150076）

我科自2002年5月至2005年4月对收治的56例蛛网膜下腔出血（subarachnoid hemorrhage，SAH）患者行腰大池持续外引流术治疗，获得满意疗效，现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取本科收治的56例SAH患者，男性37例，女性19例，年龄8～75岁，平均45岁。颅脑损伤后患者38例（开颅手术13例），其中颅内血肿19例，脑挫裂伤10例，单纯SAH 9例；高血压脑出血破入脑室8例（手术6例）；动脉瘤及脑血管畸形破裂5例（手术3例）；脑肿瘤术后5例。所有患者均经头颅CT检查证实为SAH患者，且均无腰穿禁忌证。

1.2 方法

于腰2、3或腰3、4椎间隙用17 G硬膜外穿刺针常规穿刺，穿刺见脑脊液流出后，将19 G硬膜外导管（内径0.5 mm，总长91 cm）通过穿刺针在椎管内向腰骶方向置入蛛网膜下腔，边推进导管边拔除穿刺针，深度约5 cm，导管末端接硬膜外导管连接器并与引流袋连接。通过调节引流袋位置高低控制流速及引流量。早期引流袋固定于腋中线下0～5 cm，3 d后可调至腋中线下5～10 cm，引流量控制在约350 ml/24 h，定期测量颅内压，根据颅内压高低随时调整引流袋位置，颅内压控制在100 mmH_2O左右。留管至脑脊液常规及生化检查基本正常，一般为3～14 d。引流同时给予止血、脱水、脑细胞保护、抗癫痫、预防血管痉挛药物、控制血压、血糖、水电解质平衡及凝血机制，预防应激性溃疡、应用广谱抗生素预防感染、营养支持等治疗。

2 结果

本组56例患者引流术后平均3～10 d脑脊液明显转清亮，14 d脑脊液常规及生化检查基本正常。本组患者无死亡病例，无感染病例，无再出血病例，6例（10.7%）有脑血管痉挛（CVS）发生，出现意识水平下降或头痛加重或迟发性神经系统功能障碍或复查头颅CT显示有新的脑缺血改变。2例（3.6%）出现交通性脑积水，行脑室-腹腔分流术后恢复良好。

3 讨论

SAH最主要的危害就是导致CVS，继而导致缺血性脑损害，其次是致使蛛网膜颗粒黏连造成交通性脑积水。SAH后CVS的发生率高达42%～79%[1]。尽早清除蛛网膜下腔积血成为预防CVS及脑积水发生的一种有效途径。开颅手术虽然可以去除原发病灶及手术区蛛网膜下腔内血块，但手术彻底清除SAH及其分解产物十分困难，有增加脑水肿、脑损伤的危险。本组患者均于脑池内放引流管术中、术后应用血浆纤维蛋白溶解药物冲洗并引流，但脑内引流管不宜留置超过1周，否则可能引起颅内感染，所以在1周内脑脊液未变清亮时也得拔除脑内引流。加之有部分患者无手术指征或无手术条件，就需要采用其他方法治疗SAH患者。

（下转1938页）

作者简介：何 欣（1971-），男，黑龙江省哈尔滨市人，主治医师，主要从事临床神经外科方面的研究。电话：(0451)86983651，E-mail：hexin_1971@163.com

收稿日期：2005-06-23；修回日期：2005-09-13