论著

文章编号:1000-5404(2008)17-1654-04

血红素加氧酶-1在大鼠原位肝移植急性排斥反应中的作用

范 伟[1],张 莹[1],伍晓汀[2] ([1]贵州省人民医院肝胆外科,贵阳 550002;[2]四川大学华西医院普通外科,成都 610041)

摘 要:目的 探讨血红素加氧酶-1(hemooxygenase-1,HO-1)在大鼠原位肝移植急性排斥反应中的作用。方法 建立大鼠原位肝移植排斥模型后分为3组:对照组(A组),ZnPP组(B组)和CoPP组(C组)。3组分别于3、7 d处死,取血及肝脏标本。进行肝功测定(AST、ALT、TBIL、ALB);肝组织HE染色;荧光RT-PCR检测HO-1表达。结果 ①3组肝功能3、7 d时比较有明显的统计学意义($P<0.05$)。②HE染色:A组3 d出现Ⅰ、Ⅱ级为主的排斥反应,7 d时出现Ⅱ级为主的排斥反应;B组3 d出现Ⅱ级为主的排斥反应,7 d时出现Ⅱ、Ⅲ级为主的排斥反应;C组3 d出现排斥反应0~Ⅱ级,以Ⅰ级为主,7 d时出现排斥反应0~Ⅱ级,以Ⅰ、Ⅱ级为主。③HO-1在C组表达明显升高,B组不明显,A组介于两组之间。结论 血红素加氧酶-1(HO-1)过表达能减轻急性排斥反应。

关键词:血红素加氧酶-1;原位肝移植;大鼠
中图法分类号:R345;R392.4;R657.3 文献标识码:A

Role of HO-1 in acute rejection after orthotopic liver transplantation in rats

FAN Wei[1], ZHANG Ying[1], WU Xiao-ting[2] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial Hospital, Guiyang 550002; [2]Department of General Surgery, West China University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of HO-1 on acute rejection after orthotopic liver transplantation (OLT) in rats. Methods Taking dark agouti (DA) rats as donors and Lewis rats as recipients, OLT was performed. Before OLT, the DA rats and Lewis rats were matched in pairs, and divided into control group, ZnPP group and CoPP group, the paired rats of which intraperitoneally received normal saline, 20 mg/kg ZnPP and 5 mg/kg CoPP respectively 24 h before OLT. Ten pairs of rats were in each group. On day 3 or 7 after OLT, recipient rats were killed, then blood sample and liver specimen were collected. Plasm levels of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TBIL), albumin (ALB) were measured; HE staining and MPO staining were performed; The expression of HO-1 was detected by the fluorence real time RT-PCR. Results On day 3 and 7 after OLT, AST, ALT and TBIL showed significant statistical significance among the three groups; ALB was highest in CoPP group, then in control group, lowest in ZnPP group. On day 3 after OLT, control group had acute rejection of degree one to degree two, ZnPP group had acute rejection of degree two; CoPP group mainly had acute rejection of degree one; On day 7 after OLT, control group mainly had acute rejection of degree two; ZnPP group had acute rejection of degree two to degree three; CoPP group had acute rejection of degree one to two. The expression of HO-1 was highest in CoPP group, then control group, and lowest in ZnPP group. Conclusion The expression of HO-1 in OLT with acute rejection in rats can palliate the acute rejection.

Key words: hemooxygenase-1; orthotopic liver transplantation; rat

血红素加氧酶(hemooxygenase, HO)是由Tenhunen等于1968年在动物肝脏微粒体中发现的,后来被命名为HO-1。HO-1多分布于脾脏和肝脏,属诱导型酶。多种因素,包括钴原卟啉(CoPP)、重金属等可诱导HO-1的大量表达[1]。而锌原卟啉(ZnPP)则阻止HO-1的表达。HO-1及其下游的代谢产物,包括胆绿素,CO和Fe^{2+},对许多移植模型,包括抗原非依赖性缺血再灌注损伤,急、慢性移植物排斥,异种移植等

作者简介:范 伟,男,四川省彭山县人,博士,副主任医师,主要从事肝胆、肝移植方面的研究,发表论文20余篇。电话:(0851)5620221,E-mail:zhuyufanwei@126.com

收稿日期:2007-08-30;修回日期:2008-03-25

产生有益作用。本实验旨在通过大鼠原位肝移植排斥动物模型,探讨 HO-1 在大鼠原位肝移植急性排斥反应的作用。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物　　供者为近交系 DA(dark agouti)大鼠,雄性,50 只,体质量 230 ~ 250 g,购于哈尔滨医科大学第二附属医院实验动物中心。受者为近交系 LEW(Lewis)大鼠,雄性,50 只,体质量 230 ~ 260 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.1.2　实验试剂　　钴原卟啉(CoPP,USA),锌原卟啉 (Zn-PP,USA)。

1.1.3　实验仪器　　图像分析系统(Image-Pro Plus 图像分析软件,美国 Media Cybernetics 公司),全自动化生化分析仪(美国),iCycler IQ RT-PCR 扩增仪(美国)。

1.2　实验方法

1.2.1　模型组及分组　　采用显微外科技术,按改良‘二袖套法’建立大鼠原位肝移植模型[2]。实验分组:①对照组(A 组):术前 24 h 腹腔注射生理盐水,10 对;②ZnPP 拮抗组(B 组):术前 24 h 腹腔注射 ZnPP,10 对(20 mg/kg);③CoPP 诱导组(C 组):术前 24 h 腹腔注射 CoPP 10 对(5 mg/kg)。

1.2.2　标本采集　　3 组于移植术后第 3、7 d 将受体大鼠(每组各 5 只)处死,取部分肝组织标本固定于 10% 中性甲醛中备用,另取一部分新鲜肝组织做冰冻切片备用。穿刺肝下下腔静脉抽血 3 ~ 5 ml,2 000 r/min 离心 10 min,取上清液,-70℃保存待测。

1.3　观察项目

观察各组大鼠手术时间、冷保存时间、无肝期、术后一般状况、并发症、生存率等。全自动生化分析仪测定各组大鼠术后各时相血浆中总胆红素(TBIL)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)及白蛋白(ALB)水平。

1.4　荧光 RT-PCR 检测 HO-1 的表达

Trizole(GIBCO)液提取总 RNA,操作按说明书进行。紫外分光光度计[$D(260)/D(280)$]检测 RNA 纯度。逆转录反应(MBI 公司产品):RNA 5 μl,Random hexamer primer 1 μl,ddH_2O 6 μl 混匀,离心,70 ℃ 5 min;立即冰水浴,离心;5 × M-MLV Buffer 4 μl,dNTP mix 2 μl,Ribonuclease inhibitor 1 μl,M-MLV reverse transcriptase (Fermentas,USA) 1 μl。总体积 20 μl,混匀,离心,42 ℃ 60 min;70 ℃ 10 min(破坏 MLV);合成的 cDAN 4 ℃ 保存用于荧光 RT-PCR。HO-1 上游引物:5′-TGCTCGCATGAACACTCTG-3′,下游引物:5′-TCCTCTGTCAG-CAGTGCCT-3′,扩增产物片段长度为 123 bp。R-GAPDH 为内参照,上游引物:5′-CCTCAAGATTGTCAGCAAT-3′,下游引物:5′-CCATCCACAGTCTTCTGAGT-3,扩增产物片段长度为 143 bp(上述引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成)。染料 SYBR Green Ⅰ(MBI 公司)。荧光 PCR 扩增(MBI 公司产品):PCR 反应体系 30 μl,,加入 cDNA 1 μl,10 × buffer(Mg^{2+} free) 3 μl,$MgCl_2$(25 mmol/L)6 μl,dNTP(2.5 mmol/L)3.6 μl,上游引物(20 μmol/L)0.5 μl,下游引物(20 μmol/L)0.5 μl,染料(10 μmol/L)0.5 μl,*Taq* 酶(5 U/μl)0.2 μl(TaKaRa,Dalian),ddH_2O 17.4 μl,Calibration dye 0.3 μl。扩增条件为:94 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s,55 ℃(可变) 30 s,72 ℃ 30 s,40 个循环。通过荧光分析得到的样品 CT 值与内参照 GAPDH 所得 CT 值相减得到△Ct,用以统计学分析。

1.5　统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 10.0 软件进行 t 检验和单因素方差分析。

2　结果

2.1　大鼠肝移植模型建立

3 组均采用相同的手术方式(改良 Kamada 两袖套法)建立动物模型,3 组在供受体手术时间、供肝冷保存时间、无肝期 3 组间无明显差异。

2.2　术后一般状况

A 组大鼠术后 3 d 内精神稍差。3 d 时处死的 5 只大鼠出现黄疸的腹腔内有少量的腹水,肝脏轻度肿大,颜色黄,肝脏质稍硬,7 d 时处死的大鼠腹腔内腹水明显增多,肝脏肿胀明显。

B 组大鼠术后第 2 天即出现精神差,活动量减少。3 d 时全部大鼠开始出现黄疸。3 d 时处死的大鼠腹腔内有较多腹水,肝脏肿胀明显,质硬。7 d 时处死的 5 只大鼠腹腔内有多量腹水,肝脏肿胀进一步明显,黄疸进一步加深。

C 组大鼠术后由于手术创伤打击,精神稍差。7 d 时大鼠的精神、食欲尚可,整体状况较前两组好。处死时腹腔内有少量腹水,肝脏肿胀不明显,色泽较红润。

2.3　肝功能检测

A 组大鼠术后大部份肝功能改变主要表现为 TBIL、AS、ALT 升高,ALB 降低。随着术后时间延长,上述变化加重。B 组大鼠术后 TBIL、AST、ALT 升高明显,ALB 降低更多,随着术后时间延长,上述变化更加明显。C 组术后大部份大鼠肝功能异常,第 7 天时肝功能仍有升高,但增加不是太明显。见表 1。

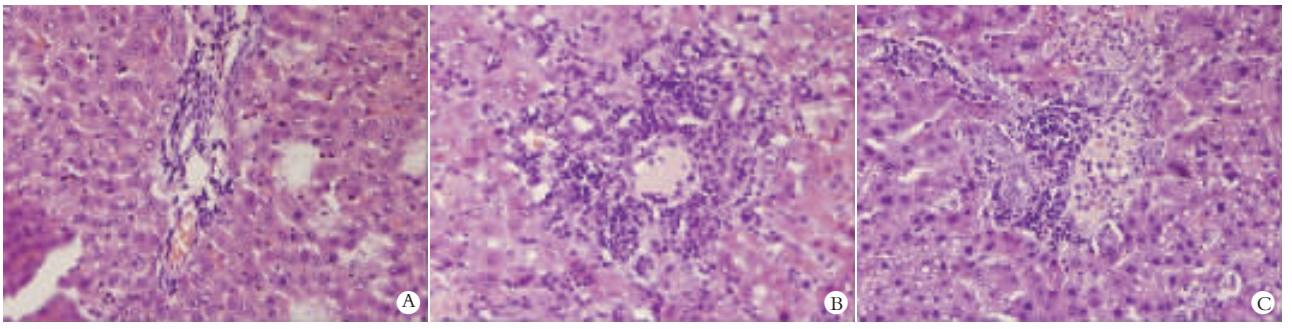
表 1　移植后 3 组 TBIL、ALT、AST、ALB 不同时间测定值($\bar{x} \pm s$)

组别	TBIL(μmol/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)	ALB(g/L)
A 组				
POD3	61.7 ± 3.0[a]	84.1 ± 1.9[a]	476.2 ± 47.3[a]	28.8 ± 3.0
POD7	111.9 ± 12.0	314.7 ± 11.0	872.0 ± 18.1	23.5 ± 1.4[a]
B 组				
POD3	75.5 ± 75.5[b]	98.0 ± 2.9[b]	552.7 ± 4.6[b]	28.5 ± 1.7
POD7	173.0 ± 1.1	480.0 ± 6.1	1068.1 ± 132.8	22.8 ± 1.1[b]
C 组				
POD3	28.2 ± 6.3	58.2 ± 1.8	383.3 ± 4.2	30.7 ± 3.2
POD7	54.3 ± 8.1	117.1 ± 20.8	802.0 ± 269.4	29.3 ± 1.6

a:$P < 0.05$,b:$P < 0.05$,与 C 组比较

2.4　肝脏组织 HE 染色观察

正常的大鼠肝脏,可见肝小叶结构清晰,汇管区胆管完整,有极少量淋巴细胞。A 组大鼠术后 3 d 肝细胞有部份肿胀变性,



A：A 组术后7 d，Ⅰ～Ⅱ级排斥；B：B 组术后7 d，Ⅲ级排斥；C：C 组术后7 d，Ⅱ级排斥

图1 3组大鼠的肝脏组织病理观察 （HE×400）

内皮细胞肿胀，肝血窦扩张充血，汇管区增宽，有炎性细胞浸润，可见部分小胆管和中央静脉有炎性细胞浸润，出现Ⅰ～Ⅱ级排斥反应（Banff 评分3～7 分，平均分5.1）。术后7 d 上述变化进一步加重（图1A），出现Ⅱ级为主的排斥反应（Banff 评分7～9 分，平均7.3 分）。B 组大鼠术后3 d 发现肝细胞有较弥漫的肿胀变性，内皮细胞肿胀较明显，肝血窦扩张充血显著，汇管区增宽，有明显的炎性细胞浸润，可见较多的小胆管和中央静脉有炎性细胞浸润，出现Ⅰ～Ⅱ级（以Ⅱ级为主）排斥反应（Banff 评分4～7 分，平均6.3 分）。术后7 d 上述变化更进一步明显（图1B），出现了Ⅱ～Ⅲ排斥反应，Banff 评分为7～9 分，平均为8.5 分。C 组为 CoPP 组，术后3 d 可见肝细胞轻度肿胀，肝窦扩张充血，但肝小叶结构尚清晰，汇管区可见较多淋巴细胞浸润，排斥反应0～Ⅱ级，以Ⅰ级为主（Banff 评分0～5 分，平均4.2 分）。7 d 时 Banff 评分5～7 分，平均6.5 分（图1C）。各组大鼠排斥反应的病理表现情况详见图1、表2。

表2 各组大鼠排斥反应的病理表现情况（例数）

组别	术后时间(d)	排斥级别			
		0级	Ⅰ级	Ⅱ级	Ⅲ级
A 组	3	0	3	2	0
	7	0	1	3	1
B 组	3	0	1	4	0
	7	0	0	2	3
C 组	3	1	3	1	0
	7	1	2	2	0

2.5 肝组织中淋巴细胞免疫组化染色

C 组术后3 d 1 例大鼠（1/5）肝组织、汇管区仅见少量散在的淋巴细胞，4 例大鼠（4/5）可见肝组织、多数汇管区、胆管周围和门静脉或肝静脉内皮下出现淋巴细胞浸润（Ⅰ～Ⅱ级排斥）术后7 d 大鼠，1 例（1/5）汇管区见少量散在的淋巴细胞浸润，有2 例（2/5）汇管区、胆管周围和门静脉或肝静脉内皮下出现淋巴细胞浸润（Ⅰ级排斥），另有2 例（2/5）汇管区、胆管周围、门静脉或肝静脉内皮下出现混合炎症细胞浸润（Ⅱ级排斥）。A 组术后3 d 大鼠肝组织、汇管区可见部分阳性淋巴细胞表达，术后7 d 肝组织、汇管区可见较多染色阳性的淋巴细胞。而 B 组术后3、7 d 所有大鼠汇管区和肝组织可见染色阳性的淋巴细胞浸润，7 d 时汇管区、胆管周围和门静脉或肝静脉旁淋巴细胞表达更为明显，数量更多。各组3、7 d 肝组织中淋巴细胞免疫组化染色阳性面积百分率比较见表3。

表3 肝组织中淋巴细胞免疫组化染色阳性面积百分率[($\bar{x}\pm s$)%]

组别	POD3	POD7
A 组	4.8 ± 0.5^{a}	8.8 ± 1.5^{a}
B 组	5.8 ± 0.3^{b}	13.9 ± 1.0^{b}
C 组	2.3 ± 0.2	5.2 ± 0.7

a：$P<0.05$，b：$P<0.05$，与 C 组比较

2.6 肝组织中中性粒细胞髓过氧化酶染色（MPO）

C 组术后3、7 d 分别有4 只大鼠的病理切片中可见阳性中性粒细胞表达，7 d 时中性粒细胞表达比3 d 时增加。A 组、B 组在3、7 d 中可见阳性中性粒细胞表达，7 d 时表达明显增加。各组3、7 d 肝组织中中性粒细胞髓过氧化酶染色阳性面积百分率比较见表4。

表4 肝组织中中性粒细胞髓过氧化酶染色阳性面积百分率[($\bar{x}\pm s$)%]

组别	POD3	POD7
A 组	1.3 ± 0.4^{a}	4.1 ± 0.3^{a}
B 组	2.0 ± 0.3	5.4 ± 0.5
C 组	1.6 ± 0.5^{a}	3.7 ± 1.3^{a}

a：$P<0.05$，与 B 组比较

2.7 荧光 RT-PCR 检测 HO-1 的表达

本实验 A、B、C 3 组分别在3、7 d 取移植后肝组织对 HO-1 mRNA 进行实时荧光 RT-PCR 定量检测，并进行统计学分析，见表5。

表5 移植后3组 HO-1 不同时段 RT-PCR 测定值（ΔCt 值，$\bar{x}\pm s$）

组别	3 d	7 d
A	7.48 ± 3.04	8.98 ± 2.62
B	9.86 ± 2.10	12.48 ± 2.01^{a}
C	4.02 ± 1.53^{ab}	5.72 ± 2.36^{ab}

a：$P<0.05$，与 A 组比较；b：$P<0.05$，与 B 组比较

3 讨论

近年的研究表明，HO-1 系统是血红素代谢中的限速酶，在细胞应激时有重要的细胞保护作用。它能催化血红素在机体内氧化降解，生成胆绿素、CO 和 Fe^{2+}。HO-1 及其下游产物具有4 方面的作用[3-5]：①抗氧化作用；②维持微循环；③调节细胞循环的功能；④抗炎功能。

HO-1 的过表达对多种移植模型有细胞保护功能，通过基因工程和药物的方法诱导 HO-1 维护组织结构，保护器官功能起到延长移植物生存的作用。用病毒载体将 HO-1 基因转到肥胖大鼠和应用于小体积肝移植，预防缺血再灌注损伤，明显延长移植物的生存，预防和减轻了排斥反应的发生[6,7]。

Martins 等[8] 报道，用供体 DA 大鼠的肾脏移植到 Lewis 大鼠，供体动物用钴原卟啉（CoPP 5 mg/kg），在移植前 24 h 注射，诱导 HO-1 的产生，对照组用锌原卟啉（ZnPP 20 mg/kg），阻断 HO-1 的表达。本研究也证明，术前在供体大鼠（C 组）腹腔内注入 HO-1 诱导剂（CoPP 5 mg/kg），术后 3、7 d 在受体肝组织中发现 HO-1 表达增加，3 d 时表达特别明显（$P<0.05$）；术前在供体大鼠（B 组）腹腔内注入 HO-1 抑制剂（ZnPP 20 mg/kg），与 C 组相比，术后 3、7 d 在受体肝组织中 HO-1 表达不明显（$P<0.05$）；从表 4 中可以看出，3 d 时 C 与 A 或 B 组相比较有明显的统计学意义（$P<0.05$），A 组和 B 组相比没有统计学意义（$P>0.05$）；7 d 时 3 组互相比较都有明显的统计学意义（$P<0.05$）。对照组 A 组术后 3、7 d HO-1 有表达，这可能与术后炎症和排斥反应诱导产生 HO-1 有关，但与 C 组相比 HO-1 的表达少，两组相比 3 d 和 7 d 都有统计学意义（$P<0.05$）。而 B 组 3 d 和 7 d 基本上没有 HO-1 的表达。本实验表明，CoPP 诱导 HO-1 的过表达，而 ZnPP 抑制 HO-1 的产生。

肝脏的排斥反应一般以肝脏的酶学变化及肝脏汇管区炎性细胞浸润的严重程度来衡量，从表 2 可以看出，A 组、B 组和 C 组的肝功能（TBIL、ALT、AST）随时间延长逐渐升高，B 组的肝功能随时间延长增加最为明显，而 A 组肝功能随时间延长增加值在 B 组和 C 组之间，3 组相比有明显统计学意义（$P<0.05$）；3 组的 ALB 则随时间延长逐渐下降，C 组的下降最慢，B 组的 ALB 下降最为明显，7 d 时 C 组与另外两组相比有明显的统计学意义（$P<0.05$）。从术后各组大鼠恢复情况来看，C 组大鼠有 2 只（3 d 大鼠 1 只，7 d 大鼠 1 只）没有出现明显的排斥反应或极轻微，其余的大鼠出现了程度不等的排斥反应，但与另外两组相比程度较轻；C 组大鼠术后大部份精神、饮食和一般情况好于另外两组，只有 3 只（3 d 大鼠 1 只，7 d 大鼠 2 只）出现较重的排斥反应，HE 染色也证明了 C 组排斥反应最轻。B 组大鼠术后恢复情况最差，大鼠出现黄疸进行性加重，精神、饮食越来越差，7 d 处死时腹腔内有大量腹水，黏连，HE 染色证明有明显的排斥反应，术后 3 d 肝细胞有较粥漫的肿胀变性，内皮细胞肿胀较明显，肝血窦扩张充血显著，汇管区增宽，有明显的炎性细胞浸润，可见较多的小胆管和中央静脉有炎性细胞浸润，出现Ⅰ～Ⅱ级排斥反应（Banff 评分 4～7 分，平均 6.3 分）；7 d 时上述变化进一步加重，汇管区显著增宽，小叶间动静脉和中央静脉周围出现以淋巴细胞为主的大量炎性细胞浸润，几乎所有的小胆管上皮有大量的炎性细胞浸润，多数小胆管上皮细胞变性、脱落，胆管结构被破坏，肝小叶结构完全不清晰，可见肝细胞明显的变性坏死。A 组术后恢复情况介于 C 组和 B 组之间。

以上实验结果提示：CoPP 诱导 HO-1 表达，HO-1 表达对大鼠术后肝功能有明显的保护作用，能够减轻大鼠术后炎症和排斥反应，对大鼠术后的恢复有较为明显的作用；ZnPP 抑制 HO-1 产生，对大鼠术后肝功能没有明显的保护作用，可能加重大鼠术后的炎症和排斥反应，对大鼠术后的恢复不利。

参考文献：

[1] McNally S J, Harrison E M, Ross J A, *et al*. Curcumin induces heme oxygenase-1 in hepatocytes and is protective in simulated cold preservation and warm reperfusion injury[J]. Transplantation, 2006, 81(4): 623－626.

[2] 范　伟，伍晓汀，谢建国. 大鼠原位肝移植中血红素加氧酶-1 表达对细胞因子的影响[J]. 四川大学学报：医学版，2008，39(1)：146－148.

[3] Franco-Gou R, Rosello-Catafau J, Casillas-Ramirez A, *et al*. How ischaemic preconditioning protects small liver grafts[J]. J Pathol, 2006, 208(1): 62－73.

[4] Su H, Van-Dam G M, Buis C I, *et al*. Spatiotemporal expression of heme oxygenase-1 detected by *in vivo* bioluminescence after hepatic ischemia in HO-1/Luc mice[J]. Liver Transpl, 2006, 12(11): 1634－1639.

[5] Kobayashi T, Sato Y, Yamamoto S, *et al*. Augmentation of heme oxygenase-1 expression in the graft immediately after implantation in adult living-donor liver transplantation[J]. Transplantation, 2005, 79(8): 977－980.

[6] Wang X H, Wang K, Zhang F, *et al*. Alleviating ischemia-reperfusion injury in aged rat liver by induction of heme oxygenase-1[J]. Transplant Proc, 2004, 36(10): 2917－2923.

[7] Wang X H, Wang K, Zhang F, *et al*. Heme oxygenase-1 alleviates ischemia/reperfusion injury in aged liver[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(5): 690－694.

[8] Martins P N, Kessler H, Jurisch A, *et al*. Induction of heme oxygenase-1 in the donor reduces graft immunogenicity[J]. Transplant Proc, 2005, 37(1): 384－386.

（编辑　王　红）