文章编号:1000-5404(2009)11-1017-04

论著

牛磺酸预处理抑制 IRAK-4 信号通路对大鼠移植肝脏再灌注损伤的保护机制

孙 科,陈 勇,刘作金,陈臻蓁,李金政,黄庆勇,龚建平,刘 川 (重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400010)

摘 要:目的 观察牛磺酸预处理后SD大鼠移植肝脏的白细胞介素-1受体相关激酶-4(interleukin-1 receptor associated kinase-4,IRAK-4)表达水平的变化,探讨牛磺酸预处理抑制肝脏缺血再灌注损害的相关机制。**方法** 雄性SD大鼠128只,完全随机化分为生理盐水对照组(NS组)和牛磺酸预处理组(TA组),每组64只,用Kamada's袖套法经行肝移植。NS组切取供肝前10 min经腰静脉注射生理盐水1.5 ml,TA组切取供肝前10 min经腰静脉注射牛磺酸(300 mmol/L)1.5 ml。于再灌注后0、60 min及180 min,蛋白免疫印记法及实时荧光定量PCR测定肝组织中IRAK-4 mRNA和蛋白表达水平;凝胶电泳迁移率分析法(EMSA)检测肝组织NF-κB活性及血清TNF-α含量;全自动血清自动生物化学仪检测血清转氨酶;光镜切片检测肝脏组织学。**结果** 牛磺酸预处理能明显提高大鼠1周生存率($P<0.01$),改善肝功能,减轻肝组织病理学改变。再灌注后0 min,血清转氨酶、IRAK-4 mRNA与蛋白表达水平、NF-κB活性以及TNF-α含量2组间比较差异无统计学意义($P>0.05$);NS组各项指标水平于再灌注60 min出现峰值,但TA组各项指标水平明显低于NS组($P<0.01$);再灌注后180 min,2组IRAK-4 mRNA与蛋白表达水平、NF-κB活性以及TNF-α含量均较60 min时有所下降,且TA组下降水平较NS组更为明显($P<0.01$)。**结论** 牛磺酸对大鼠移植肝脏的缺血再灌注损伤有明显抑制作用,抑制IRAK-4及其下游的NF-κB、TNF-α表达是牛磺酸预处理减轻肝脏缺血再灌注损害的重要机制之一。

关键词: 肝移植;缺血再灌注损伤;牛磺酸;白细胞介素-1受体相关激酶-4;NF-κB
中图法分类号: R364.12; R657.3; R977 **文献标识码:** A

Protective mechanisms of IRAK-4 inhibited by taurine preconditioning in liver graft ischemia/reperfusion injury in rats

SUN Ke, CHEN Yong, LIU Zuo-jin, CHEN Zhen-zhen, LI Jin-zheng, HUANG Qing-yong, GONG Jian-ping, LIU Chuan (Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To observe the changes in interleukin-1 receptor associated kinase-4 (IRAK-4) in ischemia/reperfusion (I/R) liver preconditioned with taurine and to explore the protective mechanisms of taurine preconditioning against hepatic I/R injury after liver transplantation. **Methods** Male Sprague-Dawley rats, weighing 180 – 220 g, were randomized into two groups in a blind fashion: control, normal saline group (NS group), and taurine preconditioning group (TA group). After organ harvest, standardized liver transplantation was performed. At 0, 60 min and 180 min after reperfusion, and the liver tissue IRAK-4 gene and protein level were determined by real-time quantitative fluorogenic PCR (FQ-PCR) and Western blotting. The activity of NF-κB in liver tissue was determined by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). The serum tumor necrosis factor-α (TNF-α) level was detected by ELISA. Serum transaminases, liver histology, graft and animal survivals were also investigated. **Results** Taurine preconditioning greatly enhanced the one-week survival rate ($P<0.01$), improved graft function, and ameliorated the histopathologic signs of injury. The liver tissue IRAK-4 mRNA expression level, NF-κB binding activity, and TNF-α production in TA group were signifi-

基金项目: 国家自然科学基金(30500473,30801126)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30500473,30801126)
作者简介: 孙 科,男,四川省邛崃市人,硕士研究生,医师,主要从事肝移植方面的研究。E-mail:sunke711@vip.qq.com
通信作者: 刘 川,E-mail:gongjianping11@126.com
收稿日期: 2008-11-19;**修回日期:** 2008-12-14

cantly lower than those in NS group ($P<0.01$). **Conclusion** The findings from our study suggest that taurine can protect hepatic I/R injury after liver transplantation and the protective effects may be *via* down-regulation of IRAK4 and its downstream NF-κB and TNF-α expression.

Key words: liver transplantation; ischemia reperfusion injury; taurine; interleukin-1 receptor associated kinase-4; NF-κB

缺血再灌注损伤是导致肝移植后供肝功能低下甚至原发性无功能的主要原因之一。减轻器官缺血再灌注损伤是目前的主要发展方向,也是当前器官移植领域研究的热点问题。牛磺酸是一种含硫的β-氨基磺酸,易溶于水,为游离氨基酸,无毒副作用,广泛存在于人和动物的各种组织。主要生理功能:抗氧化、解毒、调节渗透压、稳定细胞膜、调节细胞内钙的水平、结合胆汁酸、调节线粒体等[1]。本研究旨在观察大鼠肝移植缺血再灌注后肝脏的损伤性变化及牛磺酸对肝的保护作用,为进一步阐明牛磺酸的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

雄性 Spraque Dawley 大鼠 128 只(购于重庆医科大学实验动物中心),体质量 180~220 g;牛磺酸(Sigma 公司),Trizol 试剂盒(Life Technologies 公司),RT-PCR 试剂盒(Roche 公司),兔抗大鼠 IRAK-4 多克隆抗体(IMG-441,Imgenx 公司),His 蛋白 Western blot 检测试剂盒(Pierce 公司),核蛋白抽提试剂盒、TNF-α ELISA 测定试剂盒均购自美国 Active Motif 公司。常规显微手术器械购自上海医疗器械有限公司手术器械厂。

1.2 实验分组及肝移植模型制备

将 SD 大鼠完全随机化分为:生理盐水对照组(NS 组),供体 32 只,受体 32 只,给予无牛磺酸及其前体物质饮食喂养;牛磺酸预处理组(TA 组),供体 32 只,受体 32 只,给予常规饮食喂养。大鼠原位肝移植模型采用 Kamada's 袖套法改良技术,术前 12 h 禁食但不禁饮。采用原位灌注切取术,经门静脉灌注 0~4 ℃生理盐水 20 ml(含肝素 100 U),肝脏中心温度为 0~4 ℃。乙醚吸入麻醉,肝上下腔静脉用 7-0 带线缝合针连续缝合,肝下下腔静脉重建采用套管法(内经 0.3 cm 的聚乙烯管),门静脉重建采用套管法(内经 0.2 cm 的聚乙烯管),胆总管重建采用插管法(0.5 cm 长的硬膜外导管),肝动脉不予重建。供肝的热缺血时间 0 min,冷缺血时间 60 min,无肝期为(18.31±2.41)min。TA 组:于切取供肝前 10 min 经腰静脉注射牛磺酸(300 mmol/L)1.5 ml[2];NS 组:于切取供肝前 10 min 经腰静脉注射生理盐水 1.5 ml。分别于大鼠肝移植供肝再灌注后或术后 0、60、180 min 处死动物,每组每个时间点 8 只。另每组留 8 只大鼠术后观察 1 周生存情况,并处死存活 7 d 的大鼠取肝脏标本做 HE 染色检查。

1.3 肝组织病理学变化的观察

石蜡包埋的肝组织行连续切片,HE 染色,普通光学显微镜下观察肝组织的情况。

1.4 血清 ALT、AST 含量的检测

从下腔静脉采血 2 ml,使用全自动血清自动生物化学仪(CX7,Beckman 公司)测血清谷丙转氨酶(ALT)与谷草转氨酶(AST)含量。

1.5 TNF-α 活性的测定

取上述各时间点下腔静脉血液 2 ml,按 ELISA 试剂盒说明方法检测血清 TNF-α 含量。

1.6 实时荧光定量 PCR 测定 IARK-4 mRNA

采用 Trizol 试剂盒提取大鼠肝脏组织总 RNA。取 0.5 ml RNA 产物,用 RT-PCR 试剂盒将其逆转录为互补 DNA(cDNA),-70 ℃保存待用。采用 Primer Express 2.0 软件设计引物探针,IRAK4 引物正义链:5′-CTGCTGCCAGATGCTGTTCC-3′,反义链:5′-ACGGTTGTCCTGTTCTTTTCC-3′,产物长度 107 bp;β-actin 引物正义链:5′-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3′,反义链:5′-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3′,产物长度 150 bp。然后将引物和 Sybr Green Ⅰ荧光染料进行荧光定量 PCR。RT-PCR 在荧光定量 PCR 仪 FTC 2000(Funglyn 公司,加拿大)上进行,反应条件为:94 ℃ 4 min;然后 94 ℃ 20 s,60 ℃ 25 s,72 ℃ 25 s,共 35 个循环。实验结果表示为:IARK-4 平均相对拷贝数/内参平均相对拷贝数。

1.7 Western blot 测定 IRAK-4 蛋白量

提取肝脏组织蛋白经 SDS-PAGE 电泳后,电转移到硝酸纤维素滤膜,分别加入兔抗大鼠 IRAK-4 多克隆抗体及 HPP 标记的羊抗兔 IgG 孵育,化学发光、显影、定影。用 UVP 凝胶图像处理系统 Labworks 4.6 软件分析目的条带的灰度值。

1.8 EMSA 测定 NF-κB 活性

应用凝胶迁移变动分析法检测肝脏组织细胞 NF-κB 蛋白活性[3]。提取肝脏组织细胞核蛋白,NF-κB 寡核苷酸探针序列为 5′-GCCTCCAATGTTCGCGAACTTTCG-3′(Promega 公司合成),P 和 T_4 多聚核苷酸激酶标记,进行凝胶阻滞分析,放射自显影。450 nm 下测定每条电泳滞后带的吸光度值[$D(450)$],所得结果表示 NF-κB 的相对活性。

1.9 统计学分析

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 SPSS 10.0 软件进行统计,两样本均数间比较用 t 检验,组间比较用方差分析。

2 结果

2.1 肝移植后 1 周存活率

移植术后 24 h 内,2 组大鼠均全部存活,从第 2 天开始,NS 组开始有大鼠死亡,到第 7 天,NS 组共死亡 4 只,1 周存活率为 50%;而 TA 组无 1 例死亡,1 周存活率为 100%,2 组相比差异有统计学意义($P<0.05$),表明牛磺酸能提高大鼠 1 周生存率。

2.2 牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后肝组织的影响

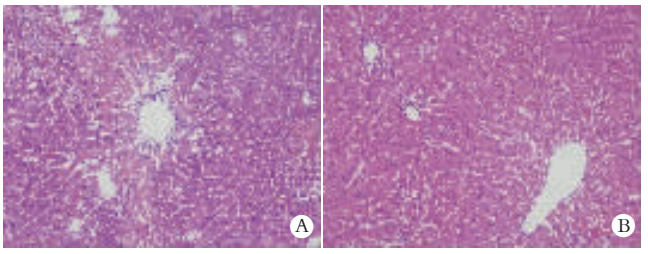
术后第 7 天,NS 组肝小叶内有大量肝细胞坏死,肝小叶结

表 1　牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后各时相点血清 ALT、AST 的影响（$n=64$，U/L，$\bar{x}\pm s$）

组别	ALT			AST		
	0 min	60 min	180 min	0 min	60 min	180 min
NS 组	110.00 ± 19.54	652.88 ± 162.76	986.25 ± 173.59	212.50 ± 38.37	1 578.00 ± 369.64	2 125.30 ± 303.46
TA 组	105.50 ± 17.20	434.25 ± 112.27[a]	535.38 ± 183.23[a]	197.00 ± 48.05	1 088.38 ± 258.73[a]	1 201.63 ± 298.67[a]

a：$P<0.01$，与 NS 组比较

构明显凌乱，出现空泡样变，汇管区可见炎症细胞浸润（图 1A）。而 TA 组肝组织学损害明显改善，仅少量肝细胞脂肪样变和坏死，肝小叶结构轻度凌乱（图 1B）。



A：NS 组；B：TA 组

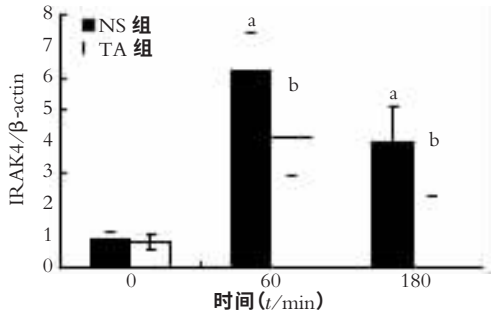
图 1　牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后 7 d 肝脏组织的影响　（HE×200）

2.3　牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后各时相点血清 ALT、AST 的影响

再灌注后 0 min，2 组血清 ALT、AST 水平比较差异无统计学意义（$P>0.05$）；再灌注后 60 min 2 组 ALT、AST 都明显升高，但 TA 组血清 ALT、AST 升高水平明显低于 NS 组（$P<0.01$）；再灌注后 180 min，2 组 ALT、AST 均继续升高，但 TA 组升高程度较低，且明显低于 NS 组（$P<0.01$，表 1）。

2.4　牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后肝脏 IRAK-4 mRNA 表达水平的影响

实时荧光定量 PCR 结果显示：再灌注后 0 min，NS 组与 TA 组 IRAK-4 mRNA 表达处于较低水平，TA 组的表达水平轻度低于 NS 组（$P>0.05$）；再灌注后 60 min，NS 组与 TA 组 IRAK-4 mRNA 表达水平明显升高并处于峰值，但 TA 组的表达水平明显低于 NS 组（$P<0.01$）；再灌注后 180 min，2 组的 IRAK-4 mRNA 表达水平开始下降，且 TA 组的表达水平明显低于 NS 组（$P<0.01$，图 2）。

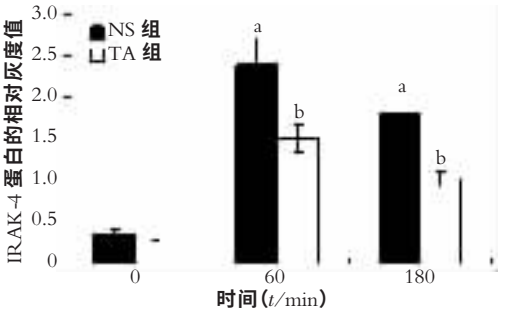


a：$P<0.01$，与 NS 组 0 min 比较；b：$P<0.01$，与同时相点 NS 组比较

图 2　牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后肝脏 IRAK-4 mRNA 表达水平的影响

2.5　牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后肝脏 IRAK-4 蛋白表达水平的影响

Western blot 结果表明：再灌注后 0 min，2 组的 IRAK-4 蛋白表达都处于低水平，2 组相比差异无统计学意义（$P>0.05$）；随着再灌注时间的延长，2 组的 IRAK 蛋白表达水平均明显升高，再灌注后 60、180 min，NS 组 IRAK-4 蛋白水平较 0 min 明显升高（$P<0.01$），但 TA 组在同时相点表达水平均明显低于 NS 组（$P<0.01$，图 3）。

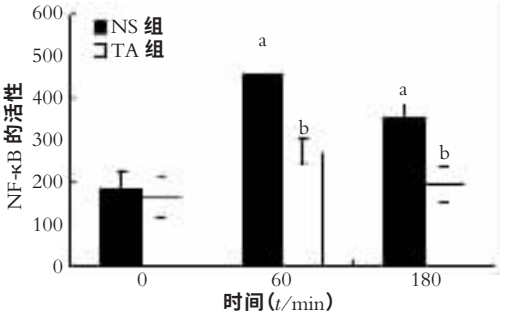


a：$P<0.01$，与 NS 组 0 min 比较；b：$P<0.01$，与同时相点 NS 组比较

图 3　牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后肝脏 IRAK-4 蛋白表达水平的影响

2.6　牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后肝脏 NF-κB 活性的影响

EMSA 显示，在肝移植再灌注后 0 min，2 组的 NF-κB 活性均有部分表达，但是 2 组之间表达差异无统计学意义（$P>0.05$）；随着再灌注时间的延长，NS 组的 NF-κB 活性升高，于 60 min达到高峰，后缓慢下降；再灌注 60、180 min，NS 组 NF-κB 活性均明显高于再灌注 0 min（$P<0.01$），而同时相点 TA 组 NF-κB 活性均明显低于 NS 组（$P<0.01$，图 4）。



a：$P<0.01$，与 NS 组 0 min 比较；b：$P<0.01$，与同时相点 NS 组比较

图 4　牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后肝脏 NF-κB 活性的影响

2.7　牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后各时相点血清 TNF-α 含量的影响

ELISA 测定结果表明：再灌注后 0 min，NS 组与 TA 组的 TNF-α 活性差异无统计学意义（$P>0.05$）；NS 组于再灌注后 60 min 迅速上升达高峰，180 min 时已迅速下降，但仍处于较高水平，并且再灌注 60 min 和 180 min NS 组的 TNF-α 含量均明显高于同时相点的 TA 组（$P<0.01$，表 2）。

表2 牛磺酸预处理对肝移植缺血再灌注后各时相点血清 TNF-α 含量的影响(pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 min	60 min	180 min
NS 组	7.61 ± 0.46	2 108.76 ± 316.95	426.68 ± 59.37
TA 组	7.38 ± 0.59	1 382.13 ± 269.34[a]	86.94 ± 11.61[a]

a:$P<0.01$,与 NS 组比较

3 讨论

牛磺酸即 2-氨基乙酰磺酸($H_2N\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}SO_3H$)广泛分布在动物机体的组织细胞内,具有广泛的生物学效应。它几乎全部以游离形式存在,属于含硫的 β-氨基酸,易溶于水,是一种细胞保护剂,具有重要的生物学作用[1]:清除氧自由基,抗脂质过氧化损伤,抑制细胞凋亡和直接的膜保护作用,调节细胞钙稳态,稳定线粒体结构和功能,维持细胞内外渗透压平衡,抑制细胞因子的产生。国外实验证明牛磺酸预处理可以减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤,提高肝移植的存活率[2],但是具体机制并不是很清楚。

缺血再灌注损伤是肝移植物早期无功能的主要原因之一,缺血再灌注(I/R)损伤不可避免地存在于移植过程中。IRI 的确切机制目前尚未完全明了[4],其发生与钙超载、氧自由基及其引发的脂质过氧化反应等有关[5]。多数学者认为,肝脏的缺血再灌注损伤其核心仍然是炎症反应[6],主要由炎症细胞介导。在缺血期,门静脉阻断造成内毒素(LPS)等有害物质蓄积性升高,此时缺乏门静脉血供的 Kuppfer 细胞(KCs)又对 LPS 高度敏感,因此再灌注期 KCs 极易被 LPS 激活[7]。而 KCs 的激活是造成肝脏 IRI 的重要原因。LPS 主要通过与单核-巨噬细胞的 LPS 膜受体 CD14 及跨膜蛋白 Toll 样受体-4(toll like receptor 4,TLR4)等相结合而诱导相应的生物效应[8]。结合 LPS 后,TLR4 胞内段与髓性分化蛋白-88 的 TLR 结构域相作用,进而 IRAK-1、IRAK-4 均结合到该受体复合物,并导致 IRAK-1 磷酸化(活化)。活化后的 IRAK-1 与肿瘤坏死因子受体相关因子-6 形成复合物,最终激活核转录因子 NF-κB 等,导致 TNF-α 等一系列炎症细胞因子的转录和表达。由于 IRAK-4 不仅是 IRAK-1 活化的必要条件,还是 IRAK-1 募集于受体复合物的必要条件,故 IRAK-4 是 TLR4 信号通路中的关键位点[9],磷酸化激活后诱导 NF-κB、TNF-α 等促炎因子的释放,引起炎性因子的级联放大反应,导致肝脏的损伤。在本实验中我们观察到,NS 组在再灌注 60 min 后 IRAK-4 mRNA、蛋白的表达明显上升并达到一个高峰。随着 IRAK-4 的升高,NF-κB、TNF-α 的表达量也急剧上升,形成炎症因子的级联放大体系,导致移植肝脏的肝细胞水肿、肝窦淤血、炎症细胞的浸润等急性再灌注损伤,表现出血清转氨酶的急剧升高。再灌注后 180 min,IRAK-4 mRNA 和蛋白量的表达开始下降,同时 NF-κB、TNF-α 的表达量也开始下降,但因其炎症级联放大效应已经开始,导致移植肝脏继续受损,血清转氨酶也继续上升。而 TA 组因牛磺酸的预处理,在 60 min和 180 min 时 IRAK-4 mRNA 和蛋白的表达、NF-κB、TNF-α 均明显低于 NS 组,血清转氨酶在这 2 个时相点均明显低于 NS 组,且 60 ~ 180 min 的升高趋势也明显低于 NS 组。

通过本实验可以看到牛磺酸预处理明显抑制了肝移植缺血再灌注损伤,其保护肝移植缺血再灌注损伤的机制与抑制 IRAK-4、NF-κB 这条炎症通路有关。因 IRAK-4 在肝脏主要存在于 KCs 上的 TLR4 通路上[10,11],我们预测牛磺酸预处理抑制肝移植缺血再灌注损伤主要与抑制 KCs 的 IRAK-4 信号通路明显有关。

参考文献:

[1] Brosnan J T, Brosnan M E. The sulfur-containing amino acids: an overview[J]. J Nutr, 2006, 136(6 Suppl): 1636S - 1640S.

[2] Schemmer P, Liang R, Kincius M, *et al*. Taurine improves graft survival after experimental liver transplantation[J]. Liver Transpl, 2005, 11(8): 950 - 959.

[3] Chen Y, Liu Z, Liang S, *et al*. Role of Kupffer cells in the induction of tolerance of orthotopic liver transplantation in rats[J]. Liver Transpl, 2008, 14(6): 823 - 836.

[4] Vardanian A J, Busuttil R W, Kupiec-Weglinski J W. Molecular mediators of liver ischemia and reperfusion injury: a brief review[J]. Mol Med, 2008, 14(5 - 6): 337 - 345.

[5] Nieuwenhuijs V B, De-Bruijn M T, Padbury R T, *et al*. Hepatic ischemia-reperfusion injury: roles of Ca^{2+} and other intracellular mediators of impaired bile flow and hepatocyte damage[J]. Dig Dis Sci, 2006, 51(6): 1087 - 1102.

[6] Tomiyama K, Ikeda A, Ueki S, *et al*. Inhibition of Kupffer cell-mediated early proinflammatory response with carbon monoxide in transplant-induced hepatic ischemia/reperfusion injury in rats[J]. Hepatology, 2008, 48(5): 1608 - 1620.

[7] 林 峰,郭闻渊,慕 宁,等. 青藤碱对大鼠肝脏缺血再灌注后树突状细胞功能的影响[J]. 中华消化外科杂志, 2008, 7(5): 360 - 362.

[8] Zhai Y, Qiao B, Shen X D, *et al*. Evidence for the pivotal role of endogenous toll-like receptor 4 ligands in liver ischemia and reperfusion injury[J]. Transplantation, 2008, 85(7): 1016 - 1022.

[9] Kim T W, Staschke K, Bulek K, *et al*. A critical role for IRAK4 kinase activity in Toll-like receptor-mediated innate immunity[J]. J Exp Med, 2007, 204(5): 1025 - 1036.

[10] Isogawa M, Robek M D, Furuichi Y, *et al*. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*[J]. J Virol, 2005, 79(11): 7269 - 7272.

[11] Seki E, De-Minicis S, Osterreicher C H, *et al*. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis[J]. Nat Med, 2007, 13(11): 1324 - 1332.

(编辑 张 维)