文章编号:1000-5404(2010)12-1325-04

论著

辛伐他汀对大鼠移植肝胆管损伤的防治作用

蒋卫伟,王曙光,陈 耿,张玉君 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所)

[摘要] **目的** 探索辛伐他汀对大鼠移植肝胆管损伤的防治作用。**方法** 建立重建肝动脉的大鼠肝移植模型,设置实验组、对照组和假手术组,应用高效液相色谱法、生化、组织病理、免疫组化及RT-PCR方法检测胆汁胆盐的成分的变化,观察肝脏组织的病理学变化。**结果** ① 辛伐他汀能明显增加大鼠胆汁中磷脂分泌,实验组[(3.874 8±1.414 8)mg/dl]、假手术组[(1.982 1±0.413 5)mg/dl]与对照组[(1.428 5±0.538 7)mg/dl]比较差异有统计学意义($P<0.05$)。② 对照组胆管损伤严重,而实验组的病理学变化则较对照组轻微;胆管损伤严重程度评分(bile duct injury severity score, BDISS):对照组为(8±1)分,明显高于实验组[(4±2)分]和假手术组(0分)($P<0.05$)。③ 磷脂转运蛋白(Mdr2 P-糖蛋白)及Mdr2 mRNA的表达,实验组较对照组有明显增强($P<0.05$)。**结论** 辛伐他汀能增加大鼠移植术后胆汁中磷脂成分的分泌,对移植肝胆管及肝脏组织有一定保护作用。

[关键词] 肝移植;胆道疾病;胆汁酸类和盐类;辛伐他汀
[中图法分类号] R657.306; R657.405; R977.3 **[文献标志码]** A

Simvastatin prevents and treats ischemic-type biliary lesion in rats after liver transplantation

Jiang Weiwei, Wang Shuguang, Chen Geng, Zhang Yujun (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To explore the preventive effects of simvastatin on ischemic-type biliary lesion (ITBL) after liver transplantation. **Methods** Totally 90 female SD rats, 6 to 8 weeks old, weighing 200 to 250 g, were randomly divided into 3 groups, sham-operation group ($n=10$), control group ($n=40$, including 20 donors and 20 receipts), and experimental group ($n=40$, including 20 donors and 20 receipts). Rat liver transplantation was established by reconstructing hepatic artery. The rats of experimental group were fed with a normal chow containing 0.1% simvastatin for 1 week before operation and for 2 weeks after operation. The donor liver was stored in the University of Wisconsin solution at 4 ℃ for 12 h followed by transplantation. The animals were killed in 2 weeks after operation and the bile, bile duct and liver tissue were taken. High performance liquid chromatography (HPLC) was used to detect the concentrations of bile salts. Biochemistry, histopathology, immunohistochemistry and RT-PCR were employed to measure the level of phospholipids C, observe the pathological changes of liver, detect the protein and mRNA expressions of phospholipid transfer protein (Mdr2 P-glycoprotein). **Results** The biliary phospholipid composition of rats in the experimental group (3.874 8±1.414 8 mg/dl) was significantly increased, compared with the sham-operation group (1.982 1±0.413 5 mg/dl) and the control group (1.428 5±0.538 7 mg/dl) ($P<0.05$); HE staining showed that the liver bile duct in the control group was severely damaged, while pathological changes in the experimental group were lighter than that of the control group. Bile duct injury severity score (BDISS) showed the score was (8±1) in the control group and (4±2) in the experimental group, significantly higher than that in the sham-operation group (0, $P<0.05$). The expression of Mdr2 mRNA in experimental group was increased more significantly than that of the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Simvastatin can effectively increase the phospholipid level in bile of rats after transplantation, which attenuates the pathological changes of liver tissue and effectively protects the transplanted bile duct and liver.

[Key words] liver transplantation; biliary tract diseases; bile acids and salts; simvastatin; phospholipid; multidrug resistance 2

Corresponding author: Wang Shuguang, Tel: 86-23-68754181, E-mail: sgwang90@yahoo.com

[通信作者] 王曙光,电话:(023)68754181,E-mail:sgwang90@yahoo.com

胆道并发症是严重影响肝移植受者生存及生活质量的常见并发症之一,被公认为肝移植的薄弱环节。以胆管上皮细胞损伤为中心环节、以广泛胆管树毁损为特征的缺血型胆道病变(ischemic-type biliary lesion, ITBL)则成为肝移植术后胆道并发症的主要临床病理表现。移植肝ITBL的发生机制尚不明确,一般认为与胆管周围血管丛微循环障碍、细胞骨架破坏、ATP耗竭及炎性细胞介导的胆管上皮细胞受损有关[1]。近年来,疏水性胆盐在胆道损伤中的作用受到人们的重视。Hertl等[2]发现疏水性胆盐对缺血状态下的胆管上皮具有毒性作用,并且其程度与胆盐的浓度及组成有关。我研究所发现肝移植术后存在胆汁成分失衡的现象[3]。移植肝术后失衡的胆汁成分在冷保存/再灌注损伤(cold preservation and reperfusion injury, CPRI)的机制中发挥着重要的作用。经历CPRI后,移植肝会形成以富含疏水性胆盐和磷脂匮乏为特征的"毒性胆汁",最终导致广泛的继发性胆管树损伤。最近一些研究发现,他汀类药物[3-羟-3-甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶抑制剂]对大鼠肝胆管磷脂的分泌有显著性影响,但对胆盐的分泌没有影响[4]。综合国内外研究结果,移植肝术后胆汁成分失衡是CPRI的重要原因,是肝移植术后ITBL发生的机制之一。因此,针对已经失衡的胆汁成分进行调控,可能成为移植肝胆管损伤的一种有效的防治策略。因此,本研究应用辛伐他汀可以有效降低胆汁内胆固醇成分减少胆管内胆固醇沉积;同时提高胆汁中的磷脂成分,中和疏水性胆盐中的去垢作用,有效防止或减轻疏水性胆盐对移植肝胆管上皮细胞的损伤,对ITBL防治可能有着重要的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

6~8周龄雄性Sprague-Dawley(SD)大鼠共90只,体质量200~250 g,购于第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心,供、受体体质量相差≤10 g。大鼠饲养于恒温、清洁环境,维持12 h昼夜节律,遵守实验动物使用及管理原则。采用单位组随机分组法将大鼠分为3组:A组:假手术组(n=10),标准饲料喂养1周,只进行麻醉和开、关腹操作,不行肝移植术。B组:对照组(n=40),供体和受体各20只,标准饲料喂养1周;供肝获取后UW液(the university of Wisconsin solution)4 ℃保存12 h后行重建肝动脉的原位肝移植。术后标准饲料喂养,术后14 d处死动物,获取标本。C组:实验组(n=40),供体和受体各20只,含有0.1%辛伐他汀的标准饲料喂养1周。供肝获取后UW液4 ℃保存12 h后行重建肝动脉的原位肝移植。术后0.1%辛伐他汀的标准饲料喂养,术后14 d处死动物,获取标本。

1.2 动物模型的建立

我们在原位肝移植动物模型(orthotopic liver transplantation in rat, ROLT)的基础上采用了改良的Gao氏支架法[5]重建受体鼠肝动脉。这一方法具有简便、快速、术后通畅率高等优点。可有效缩短供肝获取时间和肝动脉吻合时间,胆道的热缺血时间明显缩短,术后肝功能损害轻,并具有较高的重复性和稳定性,可操作性强。

1.3 观察指标

1.3.1 术后一般情况 存活时间至术后14 d,术后存活时间超过24 h则视为手术成功。

1.3.2 胆汁中胆盐和磷脂成分的测定 应用高效液相色谱法(HPLC)检测胆汁各个胆盐成分的变化。采用日本和光纯药株式会社的Phospholipids C磷脂检测试剂盒,利用酶比色法来检测胆汁中的磷脂。

1.3.3 胆管组织光学显微镜下病理学观察

1.3.3.1 HE染色 石蜡切片,HE染色观察胆管组织。

1.3.3.2 Masson三色染色 评分标准参考Geuken等[6]在Banff标准基础上提出的胆管损伤严重程度评分(bile duct injury severity score, BDISS)对胆管损伤的程度进行评估,最低为0分,最高为9分。同时,将分数<5分者定为轻度损伤,将分数>5分者定为重度损伤。所有评分操作均由同一病理医师实施。

1.3.4 免疫组织化学染色 肝脏标本4 μm厚冰冻切片,-20 ℃丙酮浸泡15 min,采用Envision法检测组织中Mdr2的表达,一抗为小鼠抗人MDR3多克隆抗体(P_3Ⅱ-26),稀释比例为1∶50,显色为DAB显色液。评价方法:免疫组织化学阳性信号为棕黄色细小颗粒状染色,每张切片选择10个高倍视野,每个视野记数50个细胞,结果判断参考Nakajima等[7]的方法,细胞膜呈淡棕黄色至深棕黄色颗粒者为阳性细胞。以大于20%的肝细胞的膜染色为阳性表达,否则为阴性表达。

1.3.5 实时定量PCR检测Mdr2 mRNA的表达 对于RT引物的选择,所有基因均采用Oligo^{dT} Primer;在普通PCR仪上设置反转录条件:37 ℃×15 min→95 ℃×5 min→4 ℃×∞;完成反转录操作,cDNA产物-20 ℃冻存备用。PCR引物的设计与合成目的基因Mdr2采用ABI设计并经实践证实成功的引物序列:Mdr2 正义链:5′-AGTTCACGGCGCATCAA-3′,反义链:5′-AAAAGACACTGGTGGCACGTT-3′; GAPDH 正义链:5′-CAAGTTCAACGGCACAGTCAA-3′, 反义链:5′-TGGTGAAGACGCCAGTAGACTC-3′。引物由美国ABI公司合成。Real-time PCR反应采用两步法进行PCR扩增反应,反应条件设置如下:95 ℃ 10 min/95 ℃ 30 s/60 ℃ 1 min。循环次数为40次。我们采用了*Taq* Man探针法,经过反复优化实验条件,最终结果令人满意。采用相对定量法,以Mdr2 mRNA/GAPDH mRNA定量分析来观察不同组别Mdr2 mRNA变化情况。

1.4 统计学分析

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,所有数据应用SPSS 13.0软件进行统计分析,组间均数比较采用单因素方差分析,总体均值的比

较采用 t 检验。

2 结果

2.1 一般情况

我们完成了 40 例大鼠原位肝移植。B 组大鼠手术成功率 90%(18/20),术后 14 d 动物存活率 60%(12/20);C 组大鼠手术成功率 85%(17/20),术后 14 d 动物存活率 65%(13/20)。死亡原因为麻醉意外 1 例,肝动脉吻合口出血 1 例,肝下下腔静脉出血 1 例,胆管梗阻 1 例,供体肝功能损伤 3 例,术后管理不善死亡 2 例,不明原因 4 例,另外肝上下腔静脉畸形所致供肝切除失败 2 例。经统计学分析,2 组大鼠生存率差异无统计学意义($P>0.05$)。总体供肝切取时间为(33.25 ± 1.84) min,肝脏修剪时间为(12.22 ± 1.62) min,受体肝脏切除时间为(14.17 ± 1.25) min,肝上下腔静脉吻合时间为(9.33 ± 1.31) min,门静脉重建时间为(5.39 ± 0.69) min,无肝期时间为(14.56 ± 1.13) min,肝下下腔静脉重建时间为(2.00 ± 1.00) min,动脉吻合时间为(8.58 ± 1.55) min,供受体手术总耗时时间为(103.36 ± 5.04) min。各组大鼠原位肝移植手术主要步骤的时间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 大鼠移植肝胆汁中胆盐组分的变化

各组大鼠术后 14 d 抽取胆汁检测共发现牛磺熊脱氧胆酸(TUDCA)、牛磺胆酸(TCA)、甘氨胆酸(GCA)、牛磺鹅脱氧胆酸(TCDCA)、牛磺脱氧胆酸(TDCA)、甘氨鹅脱氧胆酸(GCDCA)、甘氨脱氧胆酸(GDCA)7 种胆盐成分。分析各组胆盐的组成情况后,我们发现大鼠胆汁胆盐以 TCA 和 TCDCA 为主。大鼠 14 d 时胆盐分泌水平,对照组[(46.993 3 ± 11.640 3) mg/dl]与实验组[(54.781 8 ± 24.366 9) mg/dl]比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.3 胆汁磷脂分泌量

不同组别的移植肝术后胆汁中磷脂分泌量显著不同。假手术组为(1.982 1 ± 0.413 5) mg/dl,对照组为(1.428 5 ± 0.538 7) mg/dl,实验组为(3.874 8 ± 1.414 8) mg/dl。对照组磷脂分泌量显著下降,而实验组磷脂分泌量上升,不同组别间差异均有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 血清中 TBA 的变化

假手术组的血清 TBA 为(0.161 5 ± 0.025 4) μmol/L,对照组为(0.442 9 ± 0.273 8) μmol/L,实验组为(0.330 4 ± 0.195 9) μmol/L。假手术组与对照组和实验组之间差异有统计学意义($P<0.05$);而对照组和实验组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.5 胆汁中胆盐/磷脂的变化

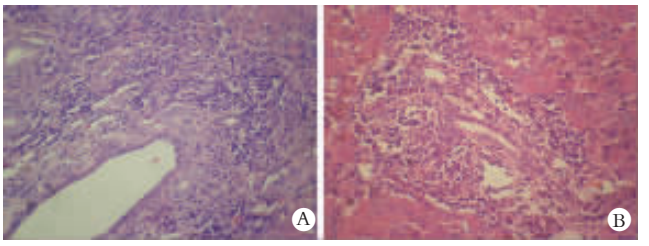
对照组和实验组大鼠移植肝在 CPRI 后,实验组的胆盐/磷脂比与对照组比较显著下降(15.73 ± 7.51 *vs* 39.59 ± 25.93,$P<0.05$)。

2.6 胆管组织形态学观察

组织病理学观察汇管区的肝内小胆管,结果发现假手术组肝脏组织结构清晰,无明显异常变化。对照组术后 14 d 胆管上皮受损严重,细胞形态失去正常,出现片状坏死,中性粒细胞浸润,汇管区可见大量新生的小胆管,较多胶原纤维环绕(图 1A)。实验组术后 14 d 胆管上皮受损程度较轻,主要表现为细胞质疏松、空泡化及点状坏死和局灶性坏死,胆管附近可见中性粒细胞浸润,小胆管增生较轻,少量胶原纤维增生(图 1B)。将 3 组各 10 个标本,通过对胆道损伤严重程度进行评分,结果发现对照组[(8 ± 1)分]和实验组[(4 ± 2)分]的评分明显高于假手术组(评分为 0)($P<0.05$),对照组和实验组的评分差异也有统计学意义($P<0.05$)。

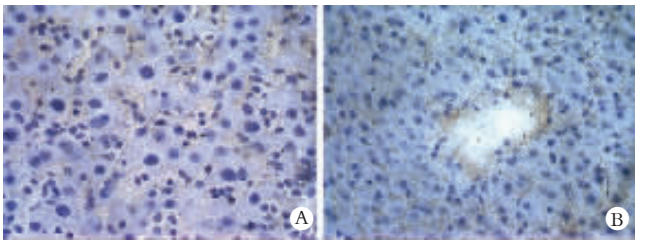
2.7 磷脂转运蛋白 Mdr2 P-糖蛋白的原位表达

免疫组织化学结果显示,术后 14 d 对照组大鼠肝脏 Mdr2 P-糖蛋白未见明显表达(图 2A);而实验组术后 Mdr2 P-糖蛋白的表达明显增强(图 2B),主要表达在肝细胞膜上,亦是在静脉周围表达明显。



A:对照组;B:实验组

图 1 移植后 14 d 大鼠胆管组织 HE 染色观察 (×400)



A:对照组;B:实验组

图 2 免疫组化检测移植后 14 d 大鼠肝脏中 Mdr2 的表达 (Envision ×400)

2.8 磷脂转运蛋白 Mdr2 mRNA 的表达情况

Mdr2 mRNA /GAPDH mRNA 相对定量结果显示,对照组的 Mdr2 mRNA 表达显著低于实验组(0.74 ± 0.32 *vs* 2.10 ± 0.68,$P<0.05$)。

3 讨论

CPRI 在 ITBL 的发生中扮演着重要角色,但其具体机制并不清楚。综合近年来的研究结果,我们认为,CPRI 对胆管上皮细胞的损伤,除了其在术后早期的直接作用外,更多的可能是触发了某种继发性的损伤因素,正是这种继发性损伤因素的持续存在导致了术后延迟性的胆管树损伤。胆汁在肝脏的生理及病理过程中历来扮演着重要的角色,其成分的失衡可以导致胆管及一系列的继发性疾病[8]。既往对胆结石的形成、原发性硬化性胆管炎、原发性胆汁性肝硬化、遗传性胆汁淤积性疾病及药物胆管损害的研究业已证实了这一点。

值得注意的是,最近研究发现人肝移植术后早期微胆管的损伤与以高胆盐/磷脂比值为特征的毒性胆汁成分密切相关。Hoekstra 等[9]应用 Mdr2 基因(多药耐药蛋白 2,编码向胆汁内分泌磷脂的转运蛋白)缺失

的杂合子小鼠动脉化肝移植模型,这些小鼠胆汁中的磷脂分泌量大约为正常小鼠的一半,导致异常高的胆盐/磷脂比,在没有手术的情况下,肝脏组织学没有明显变化;然而,将 Mdr2 杂合子的供肝经过短时间的冷保存后植入野生型受体内后,肝脏组织就出现严重的胆管损伤。这一证据显示,内源性胆盐协同 CRPI 在活体内胆管损伤的机制中扮演着重要的作用。另外一些结果提示,肝内胆汁淤积和细胞内胆盐潴留可能是一个触发肝移植后肝胆管损伤的关键性机制[10,11]。

本研究发现,实验组胆汁中磷脂成分较对照组和假手术组明显增加($P<0.05$),对照组胆汁磷脂较假手术组明显下降($P<0.05$)。提示在经历 CPRI 后大鼠胆汁中磷脂分泌明显受到抑制;而辛伐他汀可以显著增加胆汁磷脂的分泌,对抗由于 CPRI 导致的磷脂抑制效应,并将胆汁中磷脂提高到一个更高的水平。与此同时,胆汁中胆盐成分的变化检测结果显示对照组和实验组胆盐没有明显变化($P>0.05$),提示辛伐他汀对胆汁中胆盐成分没有影响,使胆盐/磷脂比值明显减小,较对照组下降明显($P<0.05$)。提示经辛伐他汀处理后,在移植肝胆管损伤中起关键作用的胆盐/磷脂比值较没有经过辛伐他汀处理的大鼠明显下降,减轻了这一损害因素的作用,可能对移植肝胆管损伤的保护发挥一定的作用。这一变化在病理组织学观察中得到验证。假手术组肝脏组织结构清晰,无明显异常变化;而对照组术后 14 d 胆管上皮受损严重,细胞形态失去正常,出现片状坏死,中性粒细胞浸润,汇管区可见大量新生的小胆管,较多胶原纤维环绕;实验组术后 14 d 胆管上皮受损程度较轻,主要表现为细胞质疏松、空泡化及点状坏死和局灶性坏死,胆管附近可见中性粒细胞浸润,小胆管增生较轻,少量胶原纤维增生。通过对胆道损伤严重程度进行评分,结果发现对照组和实验组的评分明显高于假手术组($P<0.05$);同时,对照组和实验组的评分差异也有统计学意义($P<0.05$)。提示辛伐他汀可以明显减轻经历 CPRI 后胆盐对胆管的损伤作用,有效的保护移植后的大鼠肝脏。

胆汁磷脂的分泌是一个复杂的过程,具体机制尚不完全清楚。Kamisako 等[4]研究证实,肝细胞小管面质膜上的 Mdr2 P-糖蛋白的功能对于磷脂的分泌至关重要。Mdr2 基因敲除小鼠的胆汁中完全缺失磷脂成分。Rosmorduc 等[12]在 60 例低磷脂型胆石症(Low phospholipid associated cholelithiasis, LPAC)患者基因检测中发现,MDR3/ABCB4(鼠类 Mdr2 基因的人类同系物)点突变导致的功能缺陷,致使胆汁中较低的磷脂成分,增高的胆盐/磷脂比率及胆盐的去垢作用导致胆管上皮细胞的损伤。本研究免疫组化结果显示,辛伐他汀处理的大鼠 Mdr2 P-糖蛋白表达显著增强,提示辛伐他汀能有效增强 Mdr2 P-糖蛋白表达,通过调节 Mdr2 P-糖蛋白的增强表达,促进胆汁磷脂的分泌;而对照组表达明显减弱可能与经历 CPRI 有关,CPRI 明显抑制 Mdr2 P-糖蛋白的表达。实时定量 PCR 检测 Mdr2 mRNA 的表达结果显示,实验组 Mdr2 mRNA 的表达较对照组显著增强($P<0.05$)。提示辛伐他汀可以显著提高 Mdr2 基因的转录水平,证实了 Mdr2 基因和 Mdr2 P-糖蛋白在胆汁磷脂分泌中的重要作用。

综上所述,辛伐他汀能有效的增加大鼠胆汁中磷脂成分的分泌,而对胆汁中胆盐及胆汁酸成分没有影响,并能显著降低胆汁胆盐/磷脂比率;胆汁中磷脂成分的增加显著改善了移植肝脏的功能,减少了肝脏组织的病理改变,有效保护了胆管及肝脏组织;这一增加磷脂分泌的机制可能是通过 Mdr2 基因以及 Mdr2 P-糖蛋白表达的调节来实现的。

参考文献:

[1] Jagannath S, Kalloo A N. Biliary complications after liver transplantation[J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2002, 5(2): 101-112.

[2] Hertl M, Clausnitzer N, Hertl M C, *et al*. Effect of ursodeoxycholate in University of Wisconsin solution on long term preservation of rat livers [J]. Eur J Surg, 2001, 167(6): 438-442.

[3] 陈耿. 移植肝"毒性胆汁"形成及导致胆管损伤机制的实验研究[D]. 重庆: 第三军医大学全军肝胆外科研究所, 2006.

[4] Kamisako T, Ogawa H. Effects of pravastatin and bezafibrate on biliary lipid excretion and hepatic expression of Abcg5 and Abcg8 in the rat [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2004, 19(8): 879-883.

[5] Gao W, Lemasters J J, Thurman R G. Development of a new method for hepatic rearterialization in rat orthotopic liver transplantation. Reduction of liver injury and improvement of surgical outcome by arterialization[J]. Transplantation, 1993, 56(1): 19-24.

[6] Geuken E, Visser D, Kuipers F, *et al*. Rapid increase of bile salt secretion is associated with bile duct injury after human liver transplantation[J]. J Hepatol, 2004, 41(6): 1017-1025.

[7] Nakajima S, Doi R, Toyoda E, *et al*. N-cadherin expression and epithelial-mesenchymal transition in pancreatic carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(12Pt1): 4125-4133.

[8] 王曙光. 肝移植术后胆道并发症的发生原因与对策[J]. 中华消化外科杂志, 2007, 6(2): 86-88.

[9] Hoekstra H, Porte R J, Tian Y, *et al*. Bile salt toxicity aggravates cold ischemic injury of bile ducts after liver transplantation in mdr2 +/- mice [J]. Hepatology, 2006, 43(5): 1022-1031.

[10] 张雷达, 王曙光, 杨占宇, 等. 原位肝移植术后肝内胆管狭窄的病因及诊治[J]. 第三军医大学学报, 2008 , 30(1): 84-87.

[11] Buis C I, Hoekstra H, Verdonk R C, *et al*. Causes and consequences of ischemic-type biliary lesions after liver transplantation[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2006, 13(6): 517-524.

[12] Rosmorduc O, Poupon R. Low phospholipid associated cholelithiasis: association with mutation in the MDR3/ABCB4 gene[J]. Orphanet J Rare Dis, 2007, 2: 29.

(**收稿**:2010-05-10;**修回**:2010-05-26)

(编辑 张 维)