论著

文章编号:1000-5404(2014)19-2016-05

NBD多肽预处理改善大鼠肝移植缺血再灌注损伤的研究

成名翔[1],李 青[2],梁绍勇[3],郝涌刚[4],袁智斌[5],涂 兵[6],刘长安[6],龚建平[6],游海波[7] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:肝胆外科[1];麻醉科[4];710004 西安,西安交通大学第二附属医院心血管内科[2];400014 重庆,重庆市第四人民医院创伤外科[3]; 441000 湖北 襄阳,湖北医药学院附属襄阳医院普外科[5];400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科[6];401220 重庆,重庆市长寿区人民医院肝胆外科[7])

[摘要] **目的** 采用SD-SD大鼠原位肝移植模型,观察NBD多肽预处理供肝对术后肝脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury,IRI)的影响,并探讨其可能的保护机制。**方法** 105只SD大鼠采用抽签法随机分为3组,NBD预处理组(24对动物,供体术前2 h经腹腔注射8 mg/kg的NBD多肽并建立原位肝移植模型)、移植组(24对动物,注射同体积的生理盐水作为对照)和假手术组(9只动物)。术后3、6、24 h分别处死动物,检测3组中ALT水平,ELISA检测血清中TNF-α含量。取NBD预处理组和移植组肝脏组织,HE染色观察肝脏病理学改变。采用TUNEL检测肝细胞凋亡,EMSA检量NF-κB转录活性,Western blot检测p-IKK-2和IκBα在肝组织的表达。**结果** NBD预处理组和移植组术后各时间点的ALT水平、TNF-α含量均明显高于假手术组。NBD预处理组中ALT水平、NF-κB活性、p-IKK-2表达、TNF-α含量较移植组均明显降低($P<0.05$);IκBα表达则较移植组明显增强($P<0.05$);术后6 h, NBD预处理组中病理损伤、凋亡细胞较移植组明显减轻。**结论** NBD多肽预处理供体可通过抑制供肝中NF-κB活性,有效改善肝移植IRI。

[关键词] NBD多肽;NF-κB;缺血再灌注损伤;肝移植

[中图法分类号] R322.47; R617; R977.6 [文献标志码] A

NBD peptides pretreatment protects rats against ischemia reperfusion injury after orthotopic liver transplantation

Cheng Mingxiang[1], Li Qing[2], Liang Shaoyong[3], Hao Yonggang[4], Yuan Zhibin[5], Tu Bing[6], Liu Chang'an[6], Gong Jianping[6], You Haibo[7] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, [4]Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Cardiovascuology, Second Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi Province, 710004; [3]Department of Trauma Surgery, Chongqing Fourth People's Hospital, Chongqing, 400014; [5]Department of General Surgery, Xiangyang Hospital, Hubei University of Medicine, Xiangyang, Hubei Province, 441000; [6]Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [7]Department of Hepatobiliary Surgery, Changshou District People's Hospital, Chongqing, 401220, China)

[**Abstract**] **Objective** NF-κB essential modulator binding domain peptides (NBD peptides) interfere the formation of IκB kinase complex (IKK) and down-regulate the classical NF-κB signaling pathway. The aim of this study was to determine the effects of NBD peptides pretreatment on ischemia reperfusion injury (IRI) after orthotopic liver transplantation in rats. **Methods** A total of 105 Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into 3 groups, NBD group (donors were given 8 mg/kg NBD peptides intra-peritoneally in 2 h before surgery and performed orthotropic liver transplantation according to the Kamada technique, totally 24 pairs), control group (treated with the same volume of physiological saline, totally 24 pairs) and sham-operation group ($n=9$). Animals were sacrificed at 3, 6, and 24 h after surgery. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and tumor necrosis factor (TNF-α) were measured in the 3 groups. The levels of IKK phosphorylation and IκBα degradation, NF-κB transcriptional activity and cell apoptosis were detected by

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTCjjA10013)

[通信作者] 游海波,电话:(023)40400232,E-mail: 13452337634@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140807.1603.014.html(2014-08-07)

Western blotting, EMSA and TUNEL respectively. Morphological changes of liver tissues were observed after HE staining. **Results** The levels of ALT and TNF-α in the both NBD group and control group were significantly higher than that of sham-operation group ($P < 0.05$). Compared with the control group, pretreatment with NBD peptides had significantly lower ALT level, NF-κB transcriptional activity, IKK complex phosphorylation, and TNF-α levels ($P<0.05$), while enhanced IκBα expression ($P<0.05$). NBD peptides pretreatment also ameliorated the pathological damages and cell apoptosis in 6 h after operation. **Conclusion** NBD peptides pretreatment attenuates hepatic IRI by preventing NF-κB activation.

[**Key words**] NF-κB essential modulator binding domain peptides; NF-κB; ischemia reperfusion injury; liver transplantation

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTCjjA10013). Corresponding author: You Haibo, Tel: 86-23-40400232, E-mail: 13452337634@163.com

肝移植是治疗终末期肝病的有效手段,但缺血再灌注仍然无法避免,移植肝的缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是造成植入肝脏功能不良或无功能的原因,从而最终导致移植失败[1]。IRI是一个复杂的过程,其中包括微循环障碍、激活炎症细胞、钙超载、能量代谢障碍等多种现象[1],但研究认为过度的炎症反应是IRI发生、发展的重要原因[2]。作为炎症因子的调控枢纽,核因子Kappa B (nuclear factor κB, NF-κB)在缺血再灌注过程中被激活,进而导致下游炎症因子的产生。大量的研究证明,抑制NF-κB的活性能改善肝脏IRI[3-5]。而如何有效地干扰NF-κB的转录活性仍待解决。

NF-κB的活化需受IKK复合物(IκB kinase complex)调控。无活性的NF-κB和抑制蛋白IκB结合在一起,广泛存在于真核细胞的细胞质。IKK复合物可抑制蛋白IκB被磷酸化而降解,这样活化后的NF-κB进入细胞核,结合靶基因的启动序列,从而进一步调控下游因子的表达。IKK复合物由3个亚基组成:IKKα、IKKβ、NF-κB必须调节器(NF-κB essential modulator, NEMO),其中NEMO无催化活性,而IKKα、IKKβ具有磷酸化活性。IKKα和IKKβ的C端通过6个氨基酸的NBD区域(NEMO binding domain, NBD),即IKKα(L738-L743)和IKKβ(L737-L742)区域,与NEMO结合,且两者序列完全一致,均为LDWSWL。NBD多肽(氨基酸序列:TALDWSWLQTE)是针对这一区域设计的小分子多肽,能有效进入细胞,从而抑制NEMO与IKKα、IKKβ结合,干扰IKK复合物的形成,进一步抑制NF-κB的激活[6]。对慢性结肠炎、急性胰腺炎及类风湿性关节炎的研究发现,NBD多肽可抑制NF-κB的激活,减轻炎症反应[7-9]。本实验采用大鼠原位肝移植模型,观察预处理NBD多肽能否改善肝移植IRI,并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

健康雄性Sprague Dawley(SD)大鼠,鼠龄12~14周,体质量200~250 g,购于重庆医科大学实验动物中心。供体质量略轻于受体(<10%)。纯度95%的NBD多肽(氨基酸序列:TALDWSWLQTE)购于西安联美生物公司;大鼠TNF-α ELISA检测试剂盒购于北京四正柏生物公司;EMSA试剂盒购于凯基生物公司;TUNEL试剂盒购于凯基生物公司;NF-κB p65生物素标记探针NF-κB p65生物素标记探针(5′-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3′ 3′-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5′)购于碧云天生物公司;IKK-1(Ser^{180})/IKK-2(Ser^{181})一抗、IκBα一抗购于Santa Cruz公司。

1.2 实验分组

采用抽签法随机分为3组:①NBD预处理组:共24对大鼠,以8 mg/kg的NBD多肽术前2 h经腹腔注射预处理供体,再行原位肝移植手术;②缺血再灌注损伤组(移植组):共24对大鼠,供体经腹腔注射相同体积的生理盐水作为对照;③假手术组:共9只动物,麻醉后仅行开关腹。术后3、6、24 h,NBD预处理组和移植组各处死受体动物8只,假手术组处死动物3只。

1.3 动物模型的建立

大鼠原位肝移植模型的建立采用Kamada两袖套法[10]。①供肝的获取:依次分离肝下下腔静脉、门静脉、肝动脉及胆管,经肝动脉灌注供肝后,连同以上血管一起切取供肝。在0 ℃ UW液中完成门静脉、肝下下腔静脉袖套的套入、胆管内支架插管;②植入供肝:切除受体肝脏,原位植入供肝,连续缝合肝上下腔静脉,袖套套入法吻合门静脉,结束无肝期,开始再灌注。完成肝下下腔静脉袖套吻合,肝动脉结扎不吻合,插入胆管内支架完成胆道重建。供肝于0~4 ℃的UW液中保存18 h,无肝期时间控制在25 min以内。

1.4 肝功能检测

采用BeckmnaCX7全自动生化分析仪测定肝移植后3、6、24 h血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotmnsferase, ALT)水平。

1.5 HE染色

获取移植术后6 h肝脏组织,10%甲醛溶液内固定24 h后,切片行HE染色,观察肝脏病理学变化。

1.6 TNF-α水平测定

采用ELISA检测试剂盒(北京四正柏生物公司)检测肝移植后3、6、24 h血清中TNF-α水平。

1.7 TUNEL染色检测切片中凋亡细胞

空白切片脱蜡及水合,加入蛋白酶K工作液室温反应30 min,PBS漂洗后浸入封闭液中,室温封闭10 min;每个样本滴加50 μL TdT酶反应液,置于湿盒内37 ℃避光反应60 min,根据试剂盒说明书进行显色。

1.8 EMSA检测移植肝组织中NF-κB转录活性

按照试剂盒说明书提取组织核蛋白并配制4%的聚丙烯酰胺凝胶并加样进行结合反应。以10 V电压电泳,温度低于30 ℃,等蓝色染料移至凝胶下缘时结束电泳。转膜结束后,距离膜5~10 cm,以紫外灯照射3~15 min。交联结束后,化学发光检测标记的探针,具体步骤参照说明书进行。

1.9 Western blot检测组织中IκBα和p-IKK-2的表达

根据说明书提取总蛋白,按照说明配制8% SDS-PAGE分离胶15 mL,在各泳道中分别加入Marker 5 μL和样本20 μL。以120 V电压,待染料到达胶下部,终止电泳。转膜后分别加入IKK-1(Ser^{180})/IKK-2(Ser^{181})一抗(1∶100)和IκBα一抗(1∶100),4 ℃过夜。以TBST洗涤数次后加入羊抗兔二抗(均为1∶1 000)室温孵育1 h。加入DAB显色。采用软件Image Pro Plus 6.0分析目的条带和内参IOD参数比值。

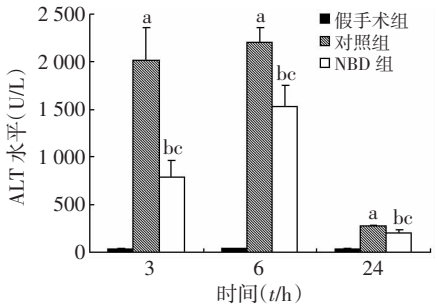
1.10 统计学分析

以$\bar{x} \pm s$表示实验所得数据,采用SPSS 17.0统计软件进行分析,组间比较行方差分析检验。

2 结果

2.1 移植术后ALT的变化

移植组和NBD预处理组的ALT值明显高于假手术组($P<0.05$),且两组的ALT值均于术后3 h开始明显增高,于6 h达峰值,至24 h明显回落;但与移植组相比,NBD预处理组各时间点的ALT值明显降低($P<0.05$,图1)。

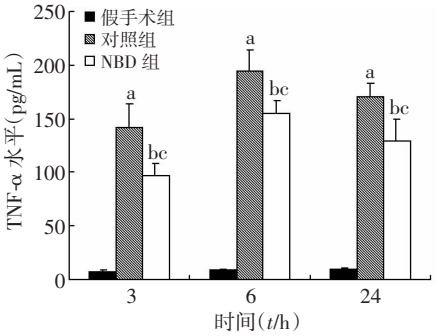


a: $P<0.05$, 与假手术组比较;b: $P<0.05$, 与假手术组比较;c: $P<0.05$, 与移植组比较

图1 各组大鼠肝移植后各时相点血清ALT水平比较

2.2 移植术后血清中TNF-α的含量

实验结果显示,移植组和NBD预处理组的TNF-α值明显高于假手术组($P<0.05$),两组的TNF-α水平于术后6 h达峰值;但与移植组相比,NBD预处理组各时间点的TNF-α值明显降低($P<0.05$,图2)。

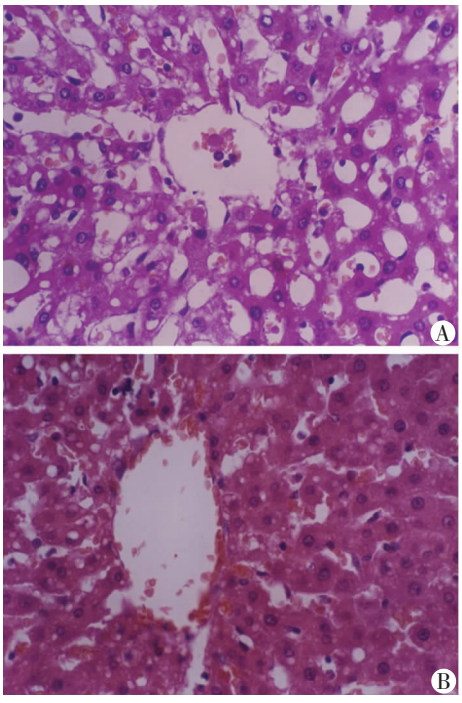


a: $P<0.05$, 与假手术组比较;b: $P<0.05$, 与假手术组比较;c: $P<0.05$, 与移植组比较

图2 各组大鼠肝移植后各时相点血清中TNF-α的含量比较

2.3 HE染色结果

从ALT值的变化可看出,肝移植术后6 h肝功能损害最为严重,故取移植术后6 h比较移植组和NBD预处理组移植肝脏组织形态学变化。结果发现移植组肝细胞条索萎缩;肝细胞边界形态不清,轮廓模糊,胞质内见大量空泡,嗜酸性增加,细胞核固缩明显;肝血窦扩张充血明显,肝小叶界板处见较多炎症细胞浸润。而NBD预处理组肝细胞条索形态结构存在;肝细胞略肿胀,局灶肝细胞内见空泡;肝血窦扩张不明显,肝小叶内见少量炎症细胞浸润(图3)。

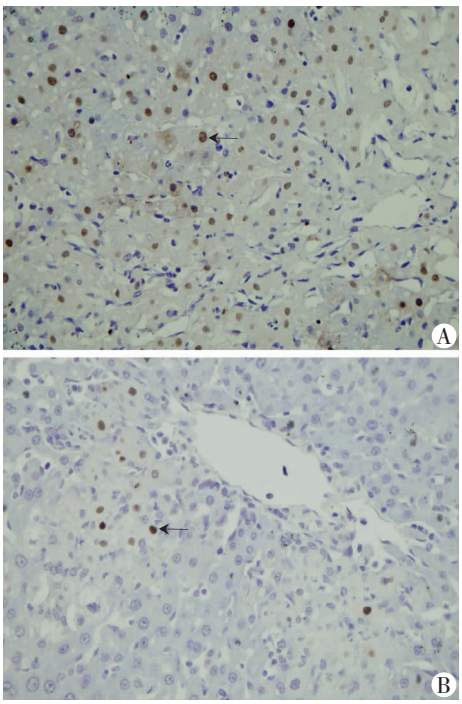


A:移植组;B:NBD预处理组

图3 HE染色观察肝移植6 h后各组肝组织病理学变化 (×400)

2.4 TUNEL 染色

取术后 6 h 移植组和 NBD 预处理组移植肝脏进行比较，移植组中可见较多棕黄色染色的凋亡细胞，而 NBD 预处理组中凋亡细胞明显减少（图 4）。

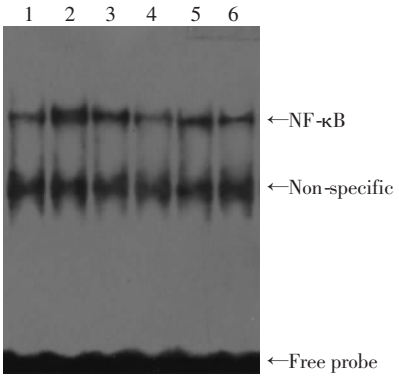


A：移植组；B：NBD 预处理组 ↑：示阳性细胞

图 4 TUNEL 染色观察肝移植 6 h 后各组肝组织病理学变化 （×400）

2.5 EMSA 检测组织中 NF-κB 活性

实验结果显示，移植组和 NBD 预处理组中 NF-κB 转录活性于术后 6 h 达峰值，至 24 h 明显回落；但与移植组相比，NBD 预处理组各时间点的 NF-κB 活性明显降低（图 5）。

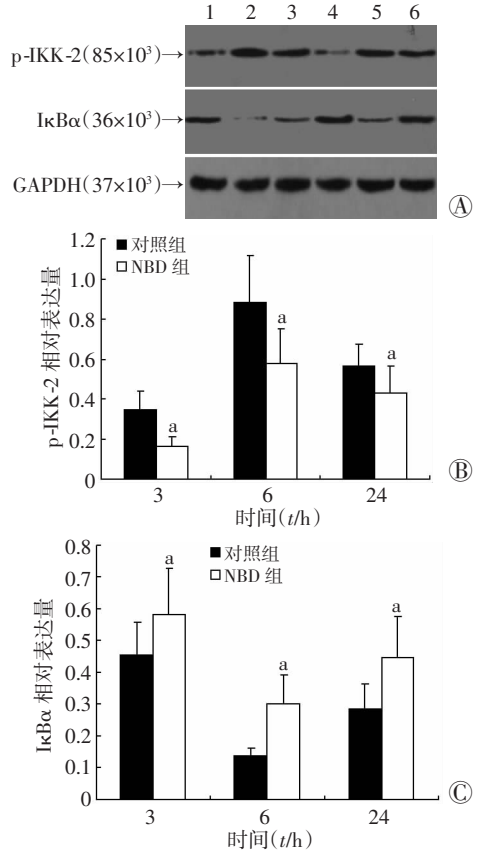


1～3：移植组术后 3、6、24 h；4～6：NBD 预处理组术后 3、6、24 h

图 5 EMSA 检测各组大鼠术后各时相点肝组织 NF-κB 转录活性

2.6 Western blot 检测 p-IKK-2 及 IκBα 的表达

IKKβ 的磷酸化在激活 NF-κB 经典通路的过程中发挥着重要作用[6]，其磷酸化的主要位点是 Ser^{181}[7]。结果显示，移植组和 NBD 预处理组中 p-IKK-2 表达于术后 6 h 达峰值；NBD 预处理组较移植组各时间点均明显降低（$P<0.05$）；相反，IκBα 的表达于术后 6 h 达最低值；NBD 预处理组较移植组各时间点均明显增高（$P<0.05$，图 6）。



1～3：移植组术后 3、6、24 h；4～6：NBD 预处理组术后 3、6、24 h A：Western blot 检测结果；B：各组中 p-IKK-2 的灰度值变化；C：各组中 IκBα 的灰度值 a：$P<0.05$，与移植组比较

图 6 Western blot 检测各组大鼠术后各时相点肝组 p-IKK-2 和 IκBα 的表达

3 讨论

目前改善肝脏 IRI 的研究包括舒张肝血窦，改善微循环障碍；抑制 Kupffer 细胞、内皮细胞的激活；减轻中性粒细胞、血小板的浸润和聚集；减轻 TNF-α、IL-1 等细胞因子的释放，抑制活性氧族、活性氮族的产生等[1]。但由于肝脏 IRI 发生、发展的复杂性，尚未取得理想的效果。研究发现 NBD 多肽通过抑制 NF-κB 经典途径的激活，减轻炎症因子的释放，可改善脑组织、肺组织的 IRI[11-12]。本研究以 NBD 多肽预处理肝脏供体可显著改善肝移植后 IRI。肝功能检测结果显示：肝移植后血清 ALT 水平于术后 3 h 开始增高，6 h 达峰值，24 h 明显回落，表明肝脏 IRI 是一急性损伤过程，而各个时间 NBD 预处理组的 ALT 水平明显低于移植组水平。HE 染色也同样证实，NBD 多肽预处理可明显减轻术后肝脏组织损伤程度。作为 IRI 最终的

转归方式之一,NBD 多肽明显减少了移植肝脏组织中细胞的凋亡。以上结果说明预处理 NBD 多肽对移植肝脏 IRI 具有保护作用。

我们在实验中观察到,与 ALT 变化趋势大致相同的是移植组和 NBD 预处理组中 NF-κB 活性于术后 3 h 明显增高,6 h 达峰值,24 h 明显回落。而预处理 NBD 多肽明显抑制了术后各时间点 NF-κB 的活性。TNF-α 是肝脏 IRI 过程中的重要促炎因子,其产生受 NF-κB 转录调控。增高的 TNF-α 一方面与肝细胞表面 TNF 受体(TNF-receptor, TNF-R)结合,诱导产生活性氧(reactive oxygen species, ROS)和趋化因子上皮中性粒细胞活化肽-78(epithelial neutrophil activating protein-78, ENA-78);另一方面通过正反馈作用,激活 NF-κB、丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)及 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)[13],增强细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecules 1, ICAM-1)、血管细胞黏附分子(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)以及 P 选择素(P-selectin)的表达[14-15]。通过以上分子机制,激活并诱导中性粒细胞向损伤肝组织浸润,进而放大炎症级联效应,与 HE 染色中移植组肝小叶界板处见较多炎症细胞浸润相符合。而在 NBD 预处理组中,由于 NF-κB 活性受抑制,各时间点血清中 TNF-α 水平均明显降低,肝小叶内见少量炎症细胞浸润。

NF-κB 的转录活性受 IKK 复合物的调控。IKKα、IKKβ、NEMO 三者形成 IKK 复合物后,在磷酸化作用下,降解抑制蛋白 IκB,从而使无活性的 NF-κB 从细胞质进入细胞核,参与靶基因的转录调控。其中催化亚单位 IKKβ 的磷酸化对 NF-κB 经典途径的激活起着重要作用[6]。实验中我们观察到,与 NF-κB 活性相对应,移植组和 NBD 预处理组中 p-IKK-2 的表达于术后第 6 小时达峰值,24 h 明显降低;相反,IκBα 蛋白的表达于术后 6 h 达最低值,24 h 明显增强。两组相比较,预处理 NBD 多肽通过抑制 IKK 复合物磷酸化,降低了 IκBα 的降解。

综上所述,我们采用 NBD 多肽预处理供体肝脏,通过抑制 IKK 复合物对 IκB 被磷酸化降解,进而抑制了 NF-κB 的活性及其下游炎症因子 TNF-α 的产生,可有效改善肝移植 IRI。如能进一步探索预处理 NBD 多肽的最佳剂量及药代动力学,将为临床改善肝脏 IRI 提供新的治疗思路。

参考文献:

[1] Montalvo-Jave E E, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado J A, *et al*. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury[J]. J Surg Res, 2008, 147(1): 153-159.

[2] Abu-Amara M, Yang S Y, Tapuria N, *et al*. Liver ischemia/reperfusion injury: processes in inflammatory networks--a review[J]. Liver Transpl, 2010, 16(9): 1016-1032.

[3] Matsui N, Kasajima K, Hada M, *et al*. Inhibiton of NF-kappaB activation during ischemia reduces hepatic ischemia/reperfusion injury in rats [J]. J Toxicol Sci, 2005, 30(2): 103-110.

[4] Wu C, Wang P, Rao J, *et al*. Triptolide alleviates hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress and inhibiting NF-κB activity in mice[J]. J Surg Res, 2011, 166(2): e205-e213.

[5] Giakoustidis D E, Giakoustidis A E, Iliadis S, *et al*. Attenuation of liver ischemia/reperfusion induced apoptosis by epigallocatechin-3-gallate *via* down-regulation of NF-kappaB and c-Jun expression[J]. J Surg Res, 2010, 159(2): 720-728.

[6] May M J, D'Acquisto F, Madge L A, *et al*. Selective inhibition of NF-kappaB activation by a peptide that blocks the interaction of NEMO with the IkappaB kinase complex[J]. Science, 2000, 289(5484): 1550-1554.

[7] Baima E T, Guzova J A, Mathialagan S, *et al*. Novel insights into the cellular mechanisms of the anti-inflammatory effects of NF-kappaB essential modulator binding domain peptides[J]. J Biol Chem, 2010, 285(18): 13498-13506.

[8] Dave S H, Tilstra J S, Matsuoka K, *et al*. Amelioration of chronic murine colitis by peptide-mediated transduction of the IkappaB kinase inhibitor NEMO binding domain peptide[J]. J Immunol, 2007, 179(11): 7852-7859.

[9] Long Y M, Chen K, Liu X J, *et al*. Cell-permeable Tat-NBD peptide attenuates rat pancreatitis and acinus cell inflammation response[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(5): 561-569.

[10] Desai A, Singh N, Raghubir R. Neuroprotective potential of the NF-κB inhibitor peptide IKK-NBD in cerebral ischemia reperfusion injury [J]. Neurochem Int, 2010, 57(8): 876-883.

[11] Kamada N. Animal models of hepatic allograft rejection[J]. Semin Liver Dis, 1992, 12(1): 1-15.

[12] Huang H J, Sugimoto S, Lai J, *et al*. Maintenance of IKKbeta activity is necessary to protect lung grafts from acute injury[J]. Transplantation, 2011, 91(6): 624-631.

[13] Schwabe R F, Brenner D A. Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290(4): G583-G589.

[14] Peralta C, Fernandez L, Panes J, *et al*. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat[J]. Hepatology, 2001, 33(1): 100-113.

[15] Rajesh M, Pan H, Mukhopadhyay P, *et al*. Cannabinoid-2 receptor agonist HU-308 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by attenuating oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis [J]. J Leukoc Biol, 2007, 82(6): 1382-1389.

(**收稿**:2014-03-21;**修回**:2014-09-04)

(编辑 郭建秀)