肿瘤坏死因子-α 预处理与缺血预处理在减轻肝脏缺血再灌注损伤的作用

郭怀斌[1],赵 炎[2],刘 峰[1],岳立辉[3],张万星[1] (1. 河北省人民医院普外三科,河北 石家庄 050051;2. 河北省人民医院基建处,河北 石家庄 050051;3. 河北省人民医院麻醉科,河北 石家庄 050051)

[摘 要] **目的** 研究采用肿效瘤坏死因子-α(TNF-α)预处理与采用缺血预处理两种方法对减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤(IRI)的作用效果,并探讨采用 TNF-α 预处理减轻大鼠肝脏 IRI 的机制。**方法** 将 40 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组:假手术组(SO 组)仅行开腹及游离肝十二指肠韧带;缺血再灌注组(IR 组)采用 Pringle's 法阻断肝门 30 min,再灌注 6 h;缺血预处理组(IPC 组)采用 Pringle's 法阻断肝门 10 min,开放血流 10 min,此后操作同 IR 组;TNF-α 预处理组(TPC 组),术前 30 min 给予 TNF-α 1μg/kg 腹腔注射,此后操作同 IR 组。检测血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST),采用免疫组织化学检测 Bcl-2 蛋白和 NF-κB p65 蛋白表达情况,以及肝细胞凋亡指数(AI)。**结果** IPC 组血清 ALT、AST 水平为(316.4 ± 90.6)U/L、(316.4 ± 90.6)U/L,TPC 组为(336.8 ± 79.4)U/L、(392.7 ± 109.3)U/L,与 IR 组(642.8 ± 149.3)U/L、(730.6 ± 103.0)U/L 比较明显降低,$P < 0.05$ 差异有统计学意义;肝细胞凋亡评分 AI 在 IPC 组(4.36 + 0.88)和 TPC 组(4.94 + 2.04)明显降低,与 IR 组(9.48 + 2.42)比较,$P < 0.05$ 差异有统计学意义;肝组织内 Bcl-2 蛋白阳性表达在 IPC 组(62.30 + 9.20)和 TPC 组(60.99 + 6.30)升高,与 IR 组(11.45 + 11.97)比较,有显著性差异($P < 0.05$);NF-κB p65 阳性表达在 IPC 组(31.56 + 4.85)和 TPC 组(32.80 + 5.30)明显降低,与 IR 组(68.33 + 6.07)比较,有显著性差异($P < 0.05$)。上述各项指标在 IPC 组与 TPC 组间,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 采用 TNF-α 预处理与缺血预处理对减轻大鼠肝脏 IRI 的效果一致,TNF-α 预处理通过抑制 NF-κB p65 蛋白表达、激活凋亡抑制基因 Bcl-2 蛋白表达,减轻了大鼠肝脏 IRI。

[关键词] 肝脏;缺血再灌注损伤;肿瘤坏死因子-α;缺血预处理
[中图分类号] R36;R657.3 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)01-0070-03

Effect of tumor necrosis factor-alpha preconditioning and ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats

GUO Huai-bin[1], ZHAO Yan[2], LIU Feng[1], YUE Li-hui[3], ZHANG Wan-xing[1] (1. Department of General Surgery, Hebei Provincial General Hospital, Shijiazhuang Hebei 050051, China; 2. Infrastructure Department, Hebei Provincial General Hospital, Shijiazhuang Hebei 050051, China; 3. Department of Anesthesiology, Hebei Provincial General Hospital, Shijiazhuang Hebei 050051, China)

Abstract: Objective To compare the effect of TNF-α preconditioning and ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury (IRI) and investigate the underlying mechanisms of TNF-α preconditioning. **Methods** Fourty healthy male Wistar rats were randomly divided into four groups which were Sham-operated group (SO), ischemia-reperfusion group (IR group: produced by total inflow occlusion for 30 min), ischemic preconditioning group (IPC group: induce with 10 min hepatic ischemic and open 10 min before IR) and TNF-α preconditioning group (TPC group: intraperitoneal injection with 1 μg/kg TNF-a 30 min prior to IR). The sample of blood and hepatic tissue of all groups were taken after experiment. The protein levels of NF-κBp65 and Bcl-2 in the hepatic tissue were detected by immunohistochemistry. **Results** There was significant difference ($P < 0.05$) between IR group and IPC group, TPC group on the level of ALT, AST and the

doi:10.11659/jjssx.09E014026
[收稿日期] 2014-09-29 [修回日期] 2014-10-24

[5] 颜玉胜,谢小青,邹 萍. 羟基磷灰石义眼台植入术及其术后并发症的临床分析[J]. 中国现代医生,2009,47(33):130 - 131.
[6] 聂玉红,怡 桥,郭 颖,等. 羟基磷灰石义眼台植入后暴露原因分析及处理[J]. 眼科新进展,2006,26(9): 691 - 693.
[7] 林 伟,樊映川,罗又蓉. 羟基磷灰石义眼台植入后暴露原因分析及处理[J]. 眼外伤职业眼病杂志,2010,32(6):453 - 455.
[8] 韩 非,吴 燕,邱 敏,等. 高密度多孔聚乙烯义眼台在眼部整形中的临床应用[J]. 局解手术学杂志,2013,22(6):599 - 603.
[9] 韩 非,吴 燕,邱 敏,等. 暴露的羟基磷灰石义眼台常压高温灭菌后重新植入临床分析[J]. 临床眼科杂志,2013,21(2):109 - 110.
[10] 张 黎,邢 枫,戴淑真,等. 较大范围义眼台暴露三层修补的临床观察[J]. 眼科新进展,2014,34(1):72 - 74.
[11] 廖晓燕,黄丹平. 改良自体巩膜包裹羟基磷灰石义眼台植入术后疗效及并发症及原因分析[J]. 实用医学杂志,2012,28(21):3604 - 3606.

(编辑:魏 源)

expression of NF-κBp65 and Bcl-2, apoptosis index in hepatic tissue. There was no significance difference ($P > 0.05$) between IPC group and TPC group. **Conclusion** TNF-α preconditioning decreased the intensity of hepatic IRI, just as ischemic preconditioning, by induces an decrease in the NF-κBp65 expression and an increase in the Bcl-2 expression.

Keywords: liver; ischemia-reperfusion injury; TNF-α; ischemic preconditioning

肝脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)在肝脏外科非常常见,导致肝脏缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)过程中肝细胞损伤的因素是多样和复杂的。缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)能减轻大鼠肝脏 IRI,对肝脏 IRI 有保护作用,其机制与抑制核因子 NF-κB 在肝组织中的表达,减少细胞因子、活性氧和氮化物、钙、补体等的表达,以及激活凋亡抑制基因 Bcl-2,减少肝脏 IRI 导致的肝细胞凋亡有关[1]。

肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor alpha, TNF-α)作为一个重要的细胞因子,在肝脏热缺血再灌注损伤过程发挥着重要作用[2-6]。在大鼠肝脏 IRI 过程中,采用 TNF-α 预处理的方法能明显减轻大鼠肝脏 IRI 程度[7]。我们研究采用 TNF-α 预处理能否对肝脏 IRI 产生保护作用,以及与 IPC 的保护效果作比较,为临床上减轻肝脏 IRI 探索一条新的途径,并通过观察凋亡抑制基因 Bcl-2 及核因子 NF-κB 在肝组织中的表达情况,初步探讨采用 TNF-α 预处理对减轻肝脏 IRI 的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康清洁级 Wistar 大鼠 40 只(河北医科大学动物中心提供),体质量 250 ~ 300 g, TNF-α(美国 Santa Cruz 公司); Bcl-2 免疫组化试剂盒(美国 Santa Cruz 公司); NF-κB p65 免疫组化试剂盒(美国 Santa Cruz 公司); DAB 显色试剂盒(美国 Zymed 公司);原位细胞凋亡检测试剂盒(美国 Roche 公司);蛋白酶 K(美国 Amresco 公司)。

1.2 动物分组与模型制备

随机分为假手术对照组(SO 组, $n = 10$);缺血再灌注组(IR 组, $n = 10$);缺血预处理组(IPC 组, $n = 10$); TNF-α 预处理组(HTPC 组, $n = 10$)。实验前大鼠禁食 12 h,自由饮水。腹腔注射氯胺酮麻醉,取上腹正中切口,向上牵开肝脏,显露并游离肝十二指肠韧带。IR 组,小号无损伤血管夹夹闭肝十二指肠韧带致肝缺血 30 min,然后松开血管夹恢复灌注,检查确切开放血流后关闭腹腔。腹腔内给予庆大霉素 0.3 g,并向腹腔内注射 2 mL 生理盐水补液。单独笼养,禁食、禁水。IPC 组,小号无损伤血管夹夹闭肝十二指肠韧带致肝缺血 10 min,然后松开血管夹恢复灌注 10 min,随后操作同 IR 组。TPC 组,术前 30 min 给予 TNF-α 腹腔注射预处理,剂量 1 μg/kg,其余操作同 IR 组。SO 组,仅游离肝十二指肠韧带,不再做任何处理,然后关闭腹腔。各组大鼠于再灌注 6 h 后再次麻醉,经心脏采血 5 mL,不加抗凝剂,静置 10 min,离心后取上层血清用于检测肝功变化。取肝右叶肝组织迅速切成 0.5 cm × 0.5 cm × 0.1 cm 大小的组织块置于 4% 中性多聚甲醛溶液中及时固定,做石蜡切片后行 HE 染色及免疫组织化学检测。

1.3 血清谷草转氨酶、谷丙转氨酶的测定

利用日立全自动生化分析仪,按说明书测定血清谷草转氨酶、谷丙转氨酶。

1.4 Bcl-2 蛋白和 NF-κB p65 蛋白表达的检测

采用免疫组织化学检测各组 Bcl-2 蛋白和 NF-κB p65 蛋白的表达。Bcl-2 蛋白表达以细胞浆内呈棕黄色或黄色的颗粒或团块为阳性细胞。NF-κB p65 蛋白表达以细胞浆呈棕黄色着染为阳性细胞。每组内每张切片随机挑选 10 个 200 倍视野进行拍照,对每张照片计算阳性指数(PI)。$PI = (N1 + N2 + \cdots + Nn)/n$ ($n = 10$)。

1.5 细胞凋亡检测

采用原位细胞凋亡检测,阳性凋亡细胞表现为细胞核呈棕黄色着染。方法同上,计算凋亡指数(AI)。$AI = (A1 + A2 + \cdots + An)/n$ ($n = 10$)。

1.6 统计学处理

各项指标测定结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数差异性比较用单因素方差分析(one-way ANOVA),两两比较用 SNK-q 检验。全部数据利用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ALT、AST 水平

IR 组、IPC 组和 TPC 组血清 ALT、AST 水平明显升高,与 SO 组比较,$P < 0.05$ 差异有统计学意义。其中 IR 组升高最明显,与 IPC 组、TPC 组比较,$P < 0.05$ 差异有统计学意义。IPC 组与 TPC 组比较,$P > 0.05$ 差异无统计学意义(表 1)。

2.2 Bcl-2 蛋白的表达

Bcl-2 蛋白阳性表达在 IPC 组和 TPC 组表达明显,而在 SO 组、IR 组较少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。SO 组与 IR 组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。IPC 组与 TPC 组比较,$P > 0.05$差异无统计学意义(表 2)。

2.3 NF-κB p65 蛋白的表达

NF-κB p65 蛋白阳性表达在 IR 组、IPC 组和 TPC 组表达明显,在 SO 组较少,$P < 0.05$ 差异均有统计学意义,其中 IPC 组、TPC 组 NF-κB p65 阳性表达较 IR 组减低,$P < 0.05$ 差异有统计学意义。IPC 组与 TPC 组比较,$P > 0.05$ 差异无统计学意义(表 2)。

表 1 各组血清 ALT、AST 水平($\bar{x} \pm s$, $n=10$, U/L)

组别	ALT	AST
SO	61.6 ± 11.3	75.8 ± 46.6
IR	642.8 ± 149.3 *	730.6 ± 103.0 *
TPC	336.8 ± 79.4 *#	392.7 ± 109.3 *#
IPC	316.4 ± 90.6 *#△	376.4 ± 127.0 *#△

*:与 SO 组比较,$P<0.05$;#:与 IR 组比较,$P<0.05$;△:与 TPC 组比较,$P>0.05$

表 2 各组 Bcl-2 和 NF-κB p65 的阳性表达情况($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	Bcl-2 PI(%)	NF-κB PI(%)
SO	12.99 ± 3.21	10.15 ± 4.42
IR	11.45 ± 11.97	68.33 ± 6.07 *
TPC	60.99 ± 6.30 *#	32.80 ± 5.30 *#
IPC	62.30 ± 9.20 *#△	31.56 ± 4.85 *#△

*:与 SO 组比较,$P<0.05$;#:与 IR 组比较,$P<0.05$;△:与 TPC 组比较,$P>0.05$

2.4 细胞凋亡检测

凋亡细胞在 SO 组罕见,IR 组、IPC 组和 TPC 组都有明显增加。凋亡指数(AI)在 IR 组(9.48 ± 2.42)、IPC 组(4.36 ± 0.88)和 TPC 组(4.94 ± 2.04),与 SO 组(1.29 ± 2.67)比较,$P<0.05$差异均有统计学意义,其中 IR 组 AI 增加最明显,与 IPC 组、TPC 组比较,$P<0.05$ 差异有统计学意义。IPC 组与 TPC 组比较,$P>0.05$ 差异无统计学意义。

3 讨论

肝脏 IRI 是多种因素以时间为顺序先后作用的结果,细胞因子在肝脏 IRI 中有重要作用,其中 TNF-α 的作用,尤为重要[2-6]。TNF-α 在肝脏 IR 过程中介导了导致肝细胞损伤的多形核粒细胞浸润、释放 ROS、TNF-α 和多种蛋白酶,以及激活枯否细胞,并诱导枯否细胞释放 ROS 和 TNF-α,导致更多多形核粒细胞浸润,加重肝细胞损伤[2]。核因子 kappa-B(NF-κB)是一个多种基因的快速反应转录因子,在肝脏 IRI 发挥调解中心的作用[2]。IPC 能减轻大鼠肝脏 IRI,与抑制核因子 NF-κB 在肝组织中的表达,减少细胞因子、活性氧和氮化物、钙、补体等的表达有关[1]。

本实验结果显示,肝脏在遭受缺血 30 min,再灌注后发生了明确的再灌注损伤,采用 TNF-α 预处理后,明显的减轻了肝脏 IRI。TNF-α 预处理后,抑制了 NF-κB p65 蛋白表达。NF-κB p65 蛋白高表达与肝脏 IRI 严重程度密切相关,NF-κB p65 蛋白表达被抑制,则肝脏 IRI 减轻[1,6-7]。本实验结果显示 TNF-α 预处理抑制了 NF-κB p65 蛋白表达,减轻了肝脏 IRI。

在肝脏 IRI 中,肝脏细胞大量死亡和凋亡,凋亡和死亡的比例,与肝脏 IRI 严重程度并不成比例关系,而与肝脏细胞脂肪含量有关[2]。在肝脏 IR 过程中,TNF-α 可激活凋亡相关蛋白的表达,诱导肝脏细胞凋亡,加重肝脏 IRI[2]。但 TNF-α 预处理可以减少肝脏细胞凋亡[8]。减少肝脏细胞凋亡可以减轻肝脏 IRI,IPC 能减少肝脏 IRI 过程中肝脏细胞凋亡,从而减轻大鼠肝脏 IRI[1,9]。本实验结果显示,TNF-α 预处理后,在随后的 IR 阶段,大鼠肝脏细胞 AI 明显低于 IR 组,而 Bcl-2 蛋白表达明显增高,显著高于 IR 组。本实验结果提示,TNF-α 不但激活了凋亡诱导基因的表达,也激活了凋亡抑制基因 Bcl-2 的表达,TNF-α 预处理后,在随后的 IR 过程中,Bcl-2 高表达,抑制了 IR 后大鼠肝脏细胞凋亡。以及激活凋亡抑制基因 Bcl-2,减少肝脏 RI 导致的肝细胞凋亡。

两种方法的预处理(TNF-α 预处理和 IPC),无论血清酶学检查,还是肝细胞坏死、凋亡检查角度上分析,对减轻肝脏 IRI 的程度上没有显著差别。两种方法的预处理抑制 NF-κB p65 蛋白表达程度相似,在激活凋亡抑制基因 Bcl-2 表达程度上亦相似。

综上所述,TNF-α 预处理对大鼠肝脏 RI 造成的肝损伤有保护作用[8],与 IPC 效果相似。TNF-α 预处理通过抑制 NF-κB p65 蛋白表达、激活凋亡抑制基因 Bcl-2 蛋白表达,减轻了 IR 后大鼠肝脏 IRI。

[参考文献]

[1] Zhang WX, Yin W, Zhang L, et al. Precondioning and postconditioning reduce hepatic ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2009, 8(6): 586 – 590.

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

[3] 白 丽,任 锋,郑素军,等. 抑制 PTEN 对小鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. 中华肝脏病杂志, 2014, 22(6): 451 – 455.

[4] 任 锋,张海燕,朴正福,等. 抑制糖原合成酶激酶 3 活性对 Toll 样受体 4 介导肝脏炎症反应的调节作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2012, 20(9): 693 – 697.

[5] Gao Z, Li YH. Antioxidant Stress and Anti-Inflammation of PPARα on Warm Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury[J]. PPAR Res, 2012, 12: 738 – 785.

[6] Jaeschke H, Woolbright BL. Role of heme oxygenase 1 in TNF/TNF receptor-mediated apoptosis after hepaticischemia/reperfusion in rats[J]. Shock, 2013, 40(1): 75 – 6.

[7] Arii S, Monden K, Adachi Y, et al. Pathogenic role of Kupffer cell activation in the reperfusion injury of cold-preserved liver[J]. Transplantation, 1994, 58(10): 1072 – 1077.

[8] Feng M, Wang Q, Wang H, et al. Tumor necrosis factor-alpha preconditioning attenuates liver ischemia/reperfusion injury through preserving sarco/endoplasmic reticulum calcium-ATPase function[J]. J Surg Res, 2013, 184(2): 1109 – 1113.

[9] 张智勇,卢绮萍,陈孝平. 丹参预处理对肝脏缺血再灌注后胃肠激素的影响[J]. 中华消化外科杂志, 2014, 13(3): 213 – 217.

(编辑:左艳芳)