基础研究 文章编号:0253-3626(2009)07-0884-05

脂多糖预处理对大鼠肝移植缺血再灌注期肝脏 NF-κB 活性和 ICAM-1/LFA-1 分子表达的影响

李 洋,朱继芳,刘作金,龚建平
(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)预处理对大鼠肝移植缺血再灌注(Ischemia/Reperfusion,I/R)损伤中肝脏核因子 -κB(Nu clear factor-κB,NF-κB)活性和细胞间粘附分子 -1/淋巴细胞功能相关抗原(Intercellular adhension molecule-1/Lymphocyte function associated antingen-1,ICAM-1/LFA-1)分子表达的影响及意义。方法:雄性 SD 大鼠,分为假手术组(Sham 组)、原位肝移植组(OLT 组)和原位肝移植 +LPS 预处理组(LPS 组)。Sham 组只开腹分离肝十二指肠韧带,OLT 组和 LPS 组按两袖套法进行肝移植。Sham 组于分离肝十二指肠韧带后 0、60、180 min、OLT 组和 LPS 组于门静脉血流恢复后 0、60、180 min 分别测定各时相点肝组织 NF-κB 活性、ICAM-1/LFA-1 分子表达及血清 ALT、AST 水平。结果:再灌注后 0、60、180 min,OLT 组与 LPS 组的 NF-κB 活性、ICAM-1/LFA-1 分子表达均高于 Sham 组 ($P<0.01$);再灌注后 0 min,OLT 组与 LPS 组的 NF-κB 活性、ICAM-1/LFA-1 分子表达和 ALT、AST 水平差异无统计学意义 ($P>0.05$);再灌注 60、180 min,OLT 组的 NF-κB 活性,ICAM-1/LFA-1 分子表达,ALT、AST 水平均明显高于 LPS 组($P<0.01$)。结论:大鼠肝移植再灌注期内毒素信号转导通路的 NF-κB 活性增强,上调 ICAM-1/LFA-1 分子表达对移植肝造成损害;脂多糖预处理可有效抑制大鼠肝移植 I/R 中肝脏 NF-κB 活性、下调 ICAM-1/LFA-1 分子表达,对大鼠移植肝的缺血再灌注损伤有明显保护作用。

【关键词】肝移植;缺血再灌注损伤;脂多糖;核因子 -κB;细胞间粘附分子 -1;淋巴细胞功能相关抗原 -1
【中国图书分类法分类号】R392.11;R392.12 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-10

Effects of lipopolysaccharide preconditioning on the activities of nuclear factor kappa-B and the expression of intercellular adhension molecule-1/lymphocyte function associated antigen-1 in rats graft with liver ischemia/reperfusion injury

LI Yang, et al
(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects and significances of lipopolysaccharide preconditioning on the activities of NF-κB and the expression of ICAM-1/LFA-1 in rats graft liver ischemia/reperfusion injury. *Methods*: Male Sprague-Dawley rats were divided into three groups: sham operation group (Sham group), orthotopic liver transplantation group (OLT group) and LPS preconditioning group (LPS group). Only dissecting hepatoduodenal ligament was perfomed in Sham group. Experiments of OLT were performed by two-cuff method in OLT group and LPS group. The activities of NF-κB and the expression of ICAM-1/LFA-1 in hepatic tissue, the levels of ALT, AST in inferior caval vein blood were detected at 0, 60, 180 min after dissecting of hepatoduodenal ligament in Sham group and after portal vein reperfusion in OLT group and LPS group. *Results*: Compared with those in Sham group at the different time points respectively, the activities of NF-κB and the expression of ICAM-1/LFA-1 were higher in OLT group and LPS group ($P<0.01$). Although the activities of NF-κB, the expression of ICAM-1/LFA-1 and the levels of ALT and AST had no significant difference between OLT group and LPS group ($P>0.05$) at 0 min after reperfusion, they were evidently higher in OLT group than in LPS group ($P<0.01$) at 60 min and 180 min after reperfusion. *Conclusion*: The activities of NF-κB were enhanced and the expression of ICAM-1/LFA-1 was upgraded in endotoxin signaling pathways during ischemia/reperfusion injury caused by liver transplantation in rat, resulting in rats graft liver ischemia/reperfusion injury. Lipopolysaccharide preconditioning can protect the rats graft liver against ischemia/reperfusion injury by significantly decreasing the activities of NF-κB and degrading the expression of ICAM-1/LFA-1.

作者介绍:李 洋(1968-),男,副主任医师,博士,研究方向:肝移植。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471696)。

【Key words】Liver transplantation; Reperfusion Injury; Lipopoly saccharide; Nuclear factor-κB; Intercel lular adhension molecule -1; Lymphocyte function associated antigen-1

肝缺血再灌注损伤(Ischemia/reperfusion injury，I/RI)是导致肝移植术后原发性移植物无功能的重要原因之一。核因子-κB(Nuclear factor-κB，NF-κB)作为一种转录因子，可调节多种炎症相关蛋白基因的表达，参与 I/RI 的炎症反应。细胞间粘附分子-1(Intercellular adhension molecule-1，ICAM-1)及淋巴细胞功能相关抗原-1(Lymphocyte function associated antigen-1，LFA-1)均受 NF-κB 调控[1]，在 I/RI 时介导白细胞粘附到内皮细胞引起组织损害起到了很重要的作用[2,3]。研究表明，机体或培养的单核巨噬细胞预先接受小剂量脂多糖(Lipopolysacchride，LPS)刺激后，和 LPS 的相关信号转导蛋白及下游的 NF-κB 活性受抑制[4]，再次受致死剂量 LPS 刺激时，应答炎症反应明显减弱，这一现象称为内毒素耐受(Endotoxin tolerance，ET)。我们采用大鼠原位肝移植模型，观察 LPS 预处理对肝移植再灌注期肝脏 NF-κB 活性变化、ICAM-1、LFA-1 分子表达的影响以及血清 ALT、AST 水平的改变，以探讨 LPS 预处理对大鼠肝移植再灌注期肝脏的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性 SD 大鼠，鼠龄 10~12 周，体重 240~280 g，购自重庆医科大学实验动物中心；LPS（Escherichia coli 0111：B4，美国 Sigma 公司）；核蛋白抽提试剂盒(NO.40010)、TransAm TM NF-κB (NO.40096)购自美国 Active motif 公司；免疫组化所用小鼠抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体(1A29)购自 Immunokontact 公司，小鼠抗大鼠 LFA-1 单克隆抗体(CD11a)购自 Pharmingen 公司，免疫组化 SP 法试剂盒购自武汉博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 大鼠原位肝移植模型的建立及分组 SD 大鼠，随机分为假手术组(Sham 组)、原位肝移植组(OLT 组)和原位肝移植 +LPS 预处理组(LPS 组)，每组各 30 只。Sham 组只开腹分离肝十二指肠韧带；LPS 组供体第 1 d 经尾静脉给予 LPS 0.1 mg/kg，第 2、3、4、5 d 给予 0.5 mg/kg；OLT 组给予等体积 0.5 ml 无菌 PBS 液。第 8 d，OLT 组和 LPS 组以未予任何处理的正常 SD 大鼠为受体，参照本实验室改进的 Kamada 两袖套法进行大鼠原位肝移植[5]，受体门静脉阻断时间为(19.2 ± 2.5) min。sham 组于分离肝十二指肠韧带后 0、60、180 min，OLT 组和 LPS 组于移植肝门静脉恢复再灌注后 0、60、180 min 3 个时段(每组每时段 10 只)抽取下腔静脉血 2 ml 并切取肝左外叶组织备检。

1.2.2 肝组织 NF-κB 活性测定 采用 Active Motif 公司提供的 NF-κB p65 ELISA 检测试剂盒检测 NF-κB 活性。根据试剂盒说明，提取不同时相的肝组织核蛋白，经蛋白质定量后，按 5 μg 核蛋白/孔加入预先处理的 96 孔酶联板(已包被含 NF-κB 结合位点的寡聚核苷酸)，野生型及突变型寡核苷酸同源序列为对照，置 100 r/min 低速摇床室温孵育 1 h；用 200 μl/ 孔清洗缓冲液洗涤 3 次后，加入 100 μl/ 孔 1:1 000 的抗 NF-κB p65 亚单位的抗体，静置室温孵育 1 h；洗涤 3 次后，再加入 100 μl/ 孔 1:10 000 的辣根过氧化物酶标记的二抗，静置室温孵育 1 h；每孔加入显色液 100 μl，避光反应 10 min 后，再以 100 μl/ 孔加入终止液(0.5 mol/L 的 H_2SO_4)，5 min 内用全自动酶标仪在 450 nm 波长下测定 OD 值，NF-κB 活性以 OD 值表示。

1.2.3 肝组织 ICAM-1、LFA-1 分子表达的测定 取肝组织一快立即放入液氮中，然后将肝组织制成 6 μm 厚的冰冻切片，冷丙醛固定 10 min 后取出，在空气中干燥 20 min。采用免疫组化 SP 法测定 ICAM-1、LFA-1 分子表达。ICAM-1 和 LFA-1 的阳性染色为棕黄色颗粒，定位于细胞膜或胞浆。其结果判断：在 400 倍光镜下，用 HPIAS-1000 型医学彩色图像分析系统测量光密度值，每组选 20 个视野(每组 10 只大鼠各取 1 张片，每张切片取 2 个视野)分别测量，然后计算光密度值的均值作为此组的代表值。

1.2.4 肝功能检测 各组均取下腔静脉血 1 ml，以 Beckman CX7 型全自动生化分析仪测定 ALT(谷丙转氨酶)、AST(谷草转氨酶)。

1.2.5 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS10.0 软件进行方差分析，两组之间比较用 LSD-t 检验，$P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 LPS 预处理对肝移植再灌注后肝脏 NF-κB 活性的影响

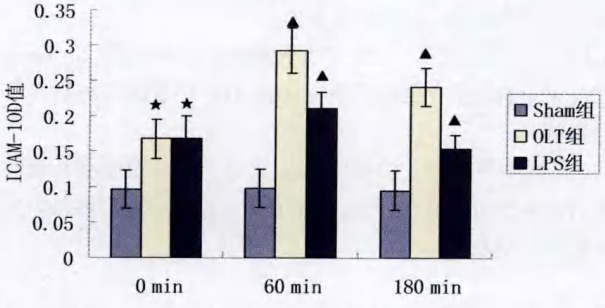
ELISA 结果表明：再灌注后 0 min，LPS 组与 OLT 组的肝脏 NF-κB 活性差异无统计学意义($P>0.05$)，但均明显高于 Sham 组；OLT 组的 NF-κB 活性于再灌注后 60 min 显著升高达到高峰，180 min 稍下降但仍保持在较高的状态，并明显高于同时点的 LPS 组，且180 min 时 LPS 组已迅速下降，再灌注后 60、180 min，LPS 组与 OLT 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)，见图 1。

2.2 LPS 预处理对肝移植再灌注后肝脏 ICAM-1、LFA-1 分子表达的影响

ICAM-1 Sham 组肝组织基本无表达(部分内皮细胞和 Kupffer 细胞有低水平的 ICAM-1 分子表达)；而 OLT 组、LPS 组再灌注后 0、60、180 min 于肝

细胞、内皮细胞和 Kupffer 细胞呈阳性表达，以灌注后 60 min 表达最强。再灌注后 0、60、180 min，OLT 组、LPS 组分别与 Sham 组比较差异有统计学意义（$P<0.01$）；但再灌注后 0 min LPS 组与 OLT 组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）；再灌注后 60、180 min，LPS 组与 OLT 组比较差异有统计学意义（$P<0.01$），见图 2、图 4。

LFA-1 Sham 组肝组织 Kupffer 细胞、肝窦及门管区有较弱的 LFA-1 表达；而 OLT 组、LPS 组再灌注后 0、60、180 min 于肝窦、门管区及 Kupffer 细胞呈阳性表达，以灌注后 60 min 表达最强。再灌注后 0、60、180 min，OLT 组、LPS 组分别与 Sham 组比较差异有统计学意义（$P<0.01$）；但再灌注后 0 min LPS 组与 OLT 组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）；再灌注后 60、180 min，LPS 组与 OLT 组比较差异有统计学意义（$P<0.01$），见图 3、图 5。

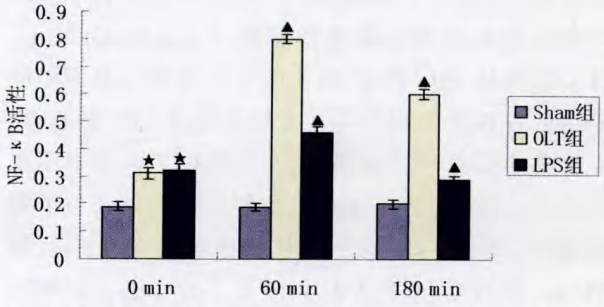


★ $P>0.05$ 再灌注后 0 min OLT 组与 LPS 组比较；▲ $P<0.01$ 再灌注后 60、180 min，OLT 组与 LPS 组比较

图 2 LPS 预处理对肝移植再灌注后肝脏 ICAM-1 分子表达的影响

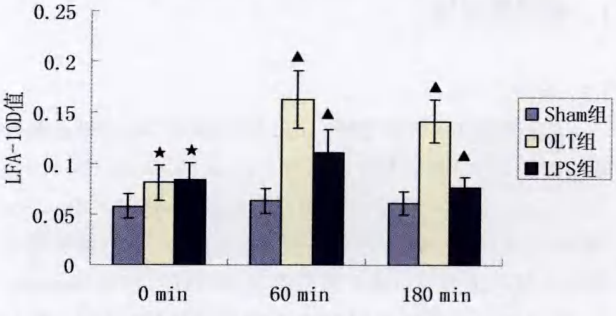
2.3 LPS 预处理对肝移植再灌注后肝功能的影响

ALT、AST 于再灌注后 0 min 开始升高，再灌注后 60、180 min 迅速上升，但 OLT 组上升幅度较大，LPS 组上升幅度较小。再灌注后 0、60、180 min，OLT 组、LPS 组分别与 Sham 组比较差异有统计学意义（$P<0.01$）；但再灌注后 0 min LPS 组与 OLT 组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）；再灌注后 60、180 min，LPS 组与 OLT 组比较差异有统计学意义（$P<0.01$），见表1。



★ $P>0.05$ 再灌注后 0 min OLT 组与 LPS 组比较；▲ $P<0.01$ 再灌注后 60、180 min，OLT 组与 LPS 组比较

图 1 LPS 预处理对肝移植再灌注后肝脏 NF-κB 活性的影响



★ $P>0.05$ 再灌注后 0 min OLT 组与 LPS 组比较；▲ $P<0.01$ 再灌注后 60、180 min，OLT 组与 LPS 组比较

图 3 LPS 预处理对肝移植再灌注后肝脏 LFA-1 分子表达的影响

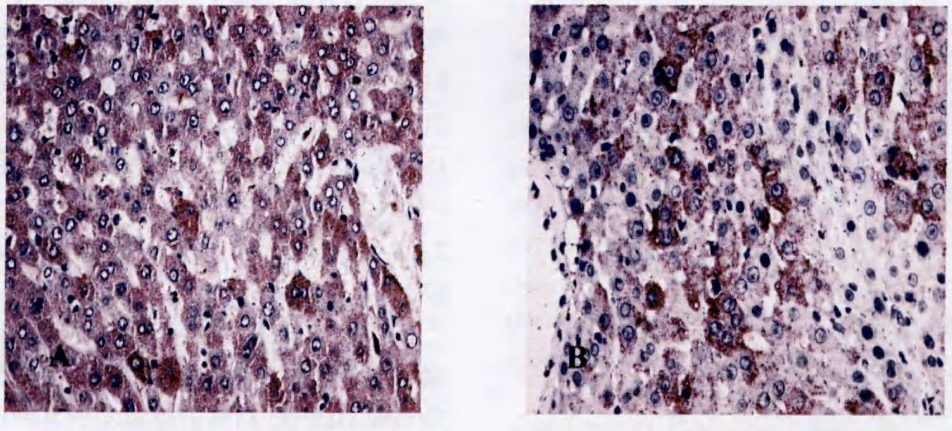


图 4 A、B 分别为再灌注 60 min OLT 组与 LPS 组肝脏 ICAM-1 分子表达（HE 染色，×400）

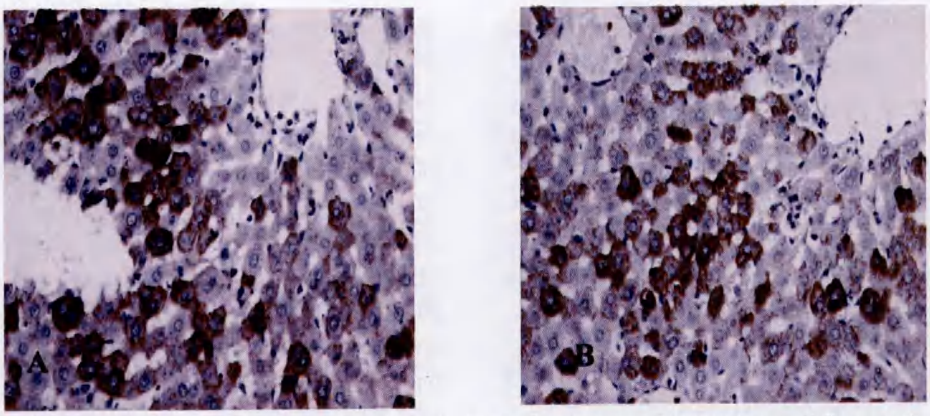


图 5 A、B 分别为再灌注 60 min OLT 组与 LPS 组肝脏 LFA-1 分子表达（HE 染色，×400）

表 1 LPS 预处理对肝移植再灌注后 ALT 和 AST 的影响（U/L，$\bar{x}\pm s$）

组 别	ALT			AST		
	0 min	60 min	180 min	0 min	60 min	180 min
Sham 组	43 ± 13	47 ± 15	44 ± 12	161 ± 21	165 ± 26	166 ± 19
OLT 组	251 ± 62[a]	540 ± 83[b]	742 ± 98[b]	347 ± 98[a]	631 ± 98[b]	876 ± 96[b]
LPS 组	257 ± 67[a]	348 ± 42[b]	485 ± 87[b]	351 ± 94[a]	513 ± 83[b]	663 ± 91[b]

a：$P>0.05$ 再灌注后 0 min OLT 组与 LPS 组比较；b：$P<0.01$ 再灌注后 60、180 min，OLT 组与 LPS 组比较

3 讨 论

I/RI 仍是导致移植肝功能不良或无功能、进而造成移植失败，机体死亡的重要原因之一，对此，目前仍无有效的治疗对策。许多研究证实，Kupffer 细胞（Kupffer cells，KCs）过度激活导致 NF-κB 活性增加，TNF-α、ICAM-1 等炎症介质大量释放是引发肝脏 I/RI 的关键因素。因此，克服 KCs 在缺血/再灌注期的过度激活已成为肝移植外科必须面对的挑战之一[6]。

NF-κB 具有多亚基、多向性调节作用，对再灌注期间诱导表达的诸多炎症介质编码基因具有转录调控作用，可能是一个共同的转录主通道和防治新靶位[7]。目前比较明确的受 NF-κB 调控的靶基因包括细胞因子、急性期反应蛋白、粘附分子等[8]。肝移植期间细胞因子、粘附分子等炎症介质的诱导表达是供肝的冷保存损伤在再灌注阶段迅速放大的重要环节，这些炎症介质编码基因的调控区域多含有 κB 位点，并受NF-κB 的转录调控。研究表明，供肝组织中的 NF-κB 在移植后再灌注早期迅速被诱导激活，伴有炎症介质如 TNF-α、ICAM-1 等的转录表达，并且 NF-κB 的激活程度与供肝组织的损伤有着良好的相关性[9]；抑制 NF-κB 活性可以下调 TNF-α、ICAM-1 等的转录表达，对再灌注早期供肝损伤具有保护作用[10]。

ICAM-1、LFA-1 分别属于细胞粘附分子中的免疫球蛋白超家族和整合素家族，均受 NF-κB 调控。本研究证实：在正常肝组织，内皮细胞和 KCs 有低水平的 ICAM-1 分子表达，KCs 有较弱的 LFA-1 分子表达（LFA-1 主要表达于外周血白细胞表面）；在缺血再灌注 60、180 min，内皮细胞、KCs 和肝细胞却出现 ICAM-1 的强表达，门管区大量浸润的炎症细胞 LFA-1 染色阳性。目前，多数学者认为，肝脏的缺血再灌注损伤的核心仍然是炎症反应，主要由炎症细胞介导。肝脏缺血再灌注后，激活 KCs NF-κB 活性，释放炎性细胞因子（如 TNF-α），细胞因子激活窦内皮细胞和肝细胞，一方面使它们在细胞膜表面表达 ICAM-1；另一方面使其释放白细胞激活因子（如 IL-1、血小板激活因子 PAF），后者诱导中性粒细胞表达 LFA-1。ICAM-1 通过与其配体 LFA-1 结合，启动细胞粘附和活化，使中性粒细胞牢固地粘附于血管壁；ICAM-1 还介导中性粒细胞通过内皮细胞全层，迁移至肝实质细胞，释放蛋白酶和反应性氧原子，造成肝细胞损伤[3]。

已证实 LPS 是肝脏再灌注时 KCs 过度激活，进而导致 I/RI 瀑布效应的重要原因之一。肝移植再灌注期，大量肠源性内毒素进入门静脉血流，血循环中的 LPS 经内毒素信号转导通路激活 KCs NF-κB 活性，产生 TNF-α、ICAM-1 等炎症介质，诱导粘附因子产生、补体激活、触发中性粒细胞过氧化呼吸爆发反应等造成肝脏损害。但用小剂量（亚致死剂量）LPS

预处理后,机体或培养的单核巨噬细胞在再次 LPS 刺激时,炎症应答反应明显减弱,这一现象被称为ET。ET 是机体对损伤刺激产生的一系列复杂的反向调节性适应反应,就本质而言,ET 并非机体的应答耗竭,而是通过下调 NF-κB、TNF-α、IL-6 和 NO 的表达等,体现了一种重要的调节机制[4]。Lush 等[11]的研究表明,内毒素耐受的单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞的 NF-κB 不能转位入核;体外的实验也表明,LPS 预处理可抑制小鼠巨噬细胞 I-κB(NF-κB 的抑制蛋白)的降解及 LPS 再次刺激时 NF-κB 的激活[12]。刘贵明等[13]研究大鼠内毒素血症肺损伤时,发现 LPS 预处理可显著抑制 ICAM-1 的产生,从而减少中性粒细胞的浸润,且这种抑制作用是发生在转录前水平。

本实验结果表明,在缺血期(再灌注 0 min),LPS 组和 OLT 组的 NF-κB 活性、ICAM-1/ LFA-1 分子表达、ALT 和 AST 水平均明显高于 Sham 组,显然门静脉血流阻断还诱导 KCs 的 LPS 胞内信号转导通路的 NF-κB 活性增强、产生炎性介质和粘附分子以及缺血氧化应急反应等机制造成肝脏损害;再灌注 60、180 min,OLT 组的 NF-κB 活性、ICAM-1/ LFA-1 分子表达、ALT 和 AST 水平迅速升高,说明供肝组织中的 NF-κB 在移植后再灌注早期迅速被诱导激活,上调 ICAM-1/ LFA-1 分子表达,介导中性粒细胞粘附和活化对肝脏造成损害;而再灌注 60、180 min LPS 组的上述指标虽然也有所升高,但较 OLT 组有明显下降, 说明 LPS 预处理可通过抑制 NF-κB 活性,下调 ICAM-1/ LFA-1 分子表达途径来减轻大鼠肝移植再灌注早期肝损伤, 对临床肝移植保护肝 I/RT 具有重要意义。

参 考 文 献

[1] Schmidt K N,Traenckner E B,Meier B,et al. Induction of oxidative stress by okadaic acid is required for activation of transcription factor NF-kappa [J]. J Biol Chem,1995,270(45): 27136-27142.

[2] El-Wahsh M,Seifaliam A M,Fuller B J,et al. Induction of adhesion molecule expression in liver ischemia-reperfusion injury is associated with impaired hepatic parenchymal microcirculation[J]. Br J Surg,2004,91(8): 1034-1039.

[3] 张宝良,刘 彤,朱理玮,等.实验性大鼠原位肝移植供肝热缺血损伤研究[J].天津医科大学学报,2006,12(1): 8-10.

[4] Fan H,Cook J A. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance [J]. J Endotoxin Res,2004,10(2): 71-84.

[5] 彭 勇,龚建平,涂 兵,等. 改良"二袖套法"制备大鼠原位肝移植动物模型[J].中国现代普通外科进展,2003,6(2):87-89.

[6] Karikó K,Weissman D,Welsh F A. Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling-a unifying theme in ischemic tolerance [J]. J Cereb Blood Flow Metab,2004,24(11): 1288-1304.

[7] Zwacka R M,Zhou W,Zhang Y,et al. Redox gene therapy for ischemia/reperfusion injury of the liver reduces AP1 and NF-kappaB activation [J]. Nat Med,1998,4(6): 698-704.

[8] Lee J I,Burckart G J. Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target [J]. J Clin Pharmacol,1998,38(11): 981-993.

[9] Serracino-Inglott F,Habib N A,Mathie R T. Hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. Am J Surg,2001,181(2): 160-166.

[10] 俞卫锋,曹云飞,朱海英,等. 核因子 κB 活性抑制对再灌注早期供肝损伤的保护作用[J]. 第二军医大学学报,2002,23(7):741-744.

[11] Lush C W,Cepinskas G,Kvietys P R. LPS tolerance in human endothelial cells: reduced PMN adhension,E-selection expression,and NF-kappa B mobilization [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2000,278(3): H853-861.

[12] Medvedev A E,Kopydlowski K M,Vogel S N. Inhibition of lipopolysaccaride-induced signal transduction in endotoxin-tolerized mouse macrophages: dysregulation of cytokine,chemokine,and toll-like receptor 2 and 4 gene expression[J]. J Immunol,2000,164(11): 5564-5574.

[13] 刘贵明,丁学琴,许国忠,等. 内毒素预处理对内毒素血症大鼠肺的作用及机制探讨[J]. 中华外科杂志,2003,41(11): 856-860.

(责任编辑:冉明会)

本刊作者署名须知

医学论文作者署名的条件是:①必须参与本研究课题的实验设计和开创工作,若在后期参加工作,则必须赞同该研究的设计。②必须参加论文中某项观察和获取数据的工作。③必须参与过观察所见和取得数据的解释,并从中导出论文的结论。④必须参加过论文的撰写。⑤必须阅读论文的全文,并同意其发表。本刊要求作者署名应按其贡献的大小、工作的多少依次排列,最多不得多于 6 名,作者单位用角码注于作者姓名下另起一行。作者单位要求写全称,第一作者要求注明其所在的市名及邮政编码。第一作者须提供出生年份、性别、学位(硕士及以上)、职称以及通讯作者等信息。请作者来稿时遵照执行。