维普资讯 http://www.cqvip.com



论 著 文章编号:0253-3626(2008)04-0428-04

# 参附注射液对大鼠移植肝脏缺血再灌注损伤的保护作用

张义彬,涂 兵,龚建平,刘长安,陈蓁臻,郝荣涛

(重庆医科大学附属第二医院肝胆外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究参附注射液(Shenfu injection,SF)对大鼠移植肝脏在缺血再灌注损伤中的保护作用及其具体机制。方法:选用体重 200~230g 的雄性 SD 大鼠 48 只,随机分为对照组和 SF 组,进行肝脏移植。分别于肝移植完成后 2、4、6h 测定大鼠的胆汁分泌量,血清丙氨酸转移酶(ALT)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平,肝脏组织中核因子(NF-κB)的表达,以及肝脏组织的形态学观察(光镜、电镜)。结果:在各个时间点,SF 组的胆汁分泌量明显高于对照组($P<0.05$),ALT、TNF-α 含量明显低于对照组($P<0.05$),肝脏组织中 NF-κB 的表达较对照组明显减弱($P<0.05$)。光镜和电镜下,SF 组各时间点肝组织的损伤均较对照组明显减轻。结论:SF 能明显减轻移植后肝脏结构和功能上的破坏,提高机体耐受缺血再灌注损伤的能力。

【关键词】参附注射液;肝脏移植;缺血再灌注损伤

【中国图书分类法分类号】R256.49 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-17

# Investigation of protective role of Shenfu injection in ischemia-reperfusion injury of transplanted livers in rats

*ZHANG Yi-bin, et al*

(*Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the protective role of Shenfu injection (SF) in ischemia-reperfusion injury of transplanted livers in rats. *Methods*: 48 male SD rats, weighted 200~230g, were selected and divided into control group and SF group at random. All of them were performed liver transplantation. 2h, 4h and 6h after the transplantation, they were analyzed for level of biliation, serum alanine aminotransferase, tumor necrosis factor-α (TNF-α), NF-κB expression in hepatic tissue and the morphological observation of hepatic tissue under light/electron microscope. *Results*: At each phase, biliation in SF group was significantly higher than in control group ($P<0.05$); serum levels of ALT and TNF-α, NF-κB expression in hepatic tissue of SF group were significantly lower than in control group ($P<0.05$). At each phase, hepatic injury in SF group was significantly lighter than in control group under light/electron microscope. *Conclusion*: Shenfu injection can significantly palliate the injury of liver structure and function after liver transplantation, and enhance the tolerance of organism to ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 SF injection; Liver transplantation; Ischemia-reperfusion injury

近年来,肝脏移植作为治疗良性终末期肝病和部分恶性肝脏病变的主要手段已经得到确认。而移植后患者的存活率及生活质量既与免疫因素有关,又与非免疫因素有关。在众多非免疫因素中,肝脏缺血再灌注损伤占有极其重要的地位。

SF 为中医"回阳救逆"参附汤的中药配方,其主要成分是人参皂苷和乌头类生物碱。其基本药理作用为增加冠脉血流及血管灌注量,延长动物耐缺氧时间,保护缺血心肌等。

作者介绍:张义彬(1982- ),女,硕士,研究方向:肝脏移植。

通讯作者:涂 兵,男,副教授,E-mail:bing_tu@163.com。

迄今为止,关于 SF 在器官缺血再灌注损伤方面的保护作用有一些报道。主要涉及心、脑、肾、肺、胃肠、骨骼肌等。但是关于 SF 在肝脏缺血再灌注损伤方面的保护作用,目前还少见报道。因此,本实验通过建立大鼠原位肝移植模型,探讨 SF 是否能够保护移植肝脏,提高其耐受缺血再灌注损伤的能力,从而为临床应用 SF,进一步提高肝移植的质量提供一条新的途径。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及所用试剂

维普资讯 http://www.cqvip.com



健康雄性 SD 大鼠，体重 200～230g，购于重庆医科大学实验动物中心。SF（批号 031001）由雅安三九药业有限公司提供。ELISA 检测试剂盒、免疫组化染色试剂盒（StreptAvidin-Biotin Complex，SABC）、DAB 显色试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 大鼠原位肝移植模型制备

方法参照 Kamada 二袖套法[1]。在 1 组连续 39 例行原位肝移植的大鼠，无肝期在 20min 以内，供肝冷保存时间在 60min 以内，1 周存活率达到 95%（37/39）以后，进入实验阶段。采用成组设计，取 48 只雄性健康 SD 大鼠，随机分成对照组和 SF 组（植入肝脏的血流再通以后即刻经大鼠的尾静脉一次性注射，以注射 SF 为 SF 组，注射生理盐水者为对照组，剂量均为 2ml/100g），每组 12 对，分别在移植肝脏完成再灌注 2、4、6h 后取受体的血清和肝组织做检查。

1.3 胆汁分泌量的测定

恢复移植肝脏门静脉血流 2h、4h、6h 后，分别测量内径为 0.7mm 的胆总管插管中在 5min 内所分泌的胆汁量。

1.4 血清学检测

各组大鼠分别于肝脏再灌注 2、4、6h 后经下腔静脉抽血 5ml，血样离心（4℃，4 000r/min，10min），取上清液置于 -70℃ 冰箱保存待后备测。血清 ALT 的测定：使用全自动生化分析仪（BECKMAN CX7）检测 ALT。血清 TNF-α 的测定：本试剂盒检测采用的是典型的夹心法酶联免疫吸附（Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay），预报被抗体和检测相抗体皆为多克隆抗体，检测抗体经生物素（biotin）标记。主要操作程序按说明书进行。

1.5 组织学检测

各组大鼠分别于肝脏再灌注 2、4、6h 后取左肝叶组织，分别用作如下检测。

1.5.1 HE 染色 将保存于 10% 的甲醛液中的肝脏组织进行石蜡包埋，制成 4μm 厚的切片，HE 染色，由重庆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室行光镜观察。

1.5.2 电镜观察 将保存于 3% 的戊二醛液中的肝脏组织取出，制备染色后，H-600 型透射电镜观察并拍照，由第三军医大学电镜教研室完成。

1.5.3 肝脏组织中 NF-κB 的表达的测定 采用免疫组织化学染色（SABC）法测定 NF-κB 的表达。主要操作程序按说明书进行。

1.6 统计学处理

全部数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间均数的两两比较用 $t$ 检验，组内均数的两两比较用 $q$ 检验。全部数据采用 SPSS10.0 软件进行处理，以 $P<0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结 果

2.1 胆汁分泌量

SF 组移植肝脏再灌注后各时间点的胆汁分泌量均高于对照组，差异有显著性（$P<0.05$）。其中，又以再灌注 2h 后的胆汁分泌量最多（$P<0.05$），再灌注 4h 和 6h 后的胆汁分泌量并没有明显差别（$P<0.05$）（表 1）。

2.2 血清学检测

2.2.1 血清 ALT 随着肝移植后再灌注时间的延长，两组 ALT 呈进行性升高（$P<0.05$），提示在再灌注的早期，移植肝脏所受到的损伤会随着再灌注时间的延长而加重。但是在 SF 组，ALT 的同期指标均较对照组明显下降，差异有显著性（$P<0.05$）（表 1）。

2.2.2 血清 TNF-α 从实验中可以看出，TNF-α 在移植肝脏再灌注 2h 后即达到峰值，而后逐渐下降，但仍然维持在一个较高的水平。SF 组在各个时间点的 TNF-α 值明显低于对照组，差异有显著性（$P<0.05$）（表 1）。

2.3 组织学检测

2.3.1 HE 染色 随着再灌注时间的延长，肝脏组织的损伤呈进行性加重，但 SF 组各时间点肝组织的损伤均较对照组轻。其中，再灌注 2h 后 SF 组的肝脏组织小叶结构基本正常，肝细胞仅见轻微的肿胀，再灌注 4h 及 6h 后，可见逐渐增多的肝细胞浊肿、空泡变性，少量的肝细胞坏死，肝血窦变窄、淤血。再灌注 2h 后对照组的肝脏组织即可见到肝细胞的浊肿及轻微的空泡样变，再灌注 4h 及 6h 后，

表 1 对照组和 SF 组胆汁分泌量、血清 ALT、血清 TNF-α、NF-κB 表达的比较

| 检测指标（对照组 / SF 组） | 2h | 4h | 6h |
|---|---|---|---|
| 胆汁分泌量 | 3.73 ± 1.11[2]/7.89 ± 1.98[1,2] | 2.35 ± 0.92[3]/4.35 ± 1.23[1,3] | 2.23 ± 0.81/4.08 ± 1.08[1] |
| 血清 ALT | 468 ± 36[4]/265 ± 23[1,4] | 619 ± 49[4]/387 ± 29[1,4] | 820 ± 65[4]/522 ± 34[1,4] |
| 血清 TNF-α | 831 ± 65[4]/576 ± 60[1,4] | 715 ± 69[4]/518 ± 52[1,4] | 598 ± 66[4]/421 ± 35[1,4] |
| NF-κB 表达 | 23.5 ± 1.9/12.3 ± 1.5[1] | 43.8 ± 3.8[5]/32.9 ± 3.4[1,5] | 48.6 ± 5.1[6]/37.5 ± 3.3[1,6] |

注：组间同期比较，1. $P<0.05$；与再灌注 4h、6h 比较，2. $P<0.05$；与再灌注 6h 比较，3. $P>0.05$；组内不同时点前后比较，4. $P<0.05$；与再灌注 2h 比较，5. $P<0.05$；与再灌注 4h 比较，6 $P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com



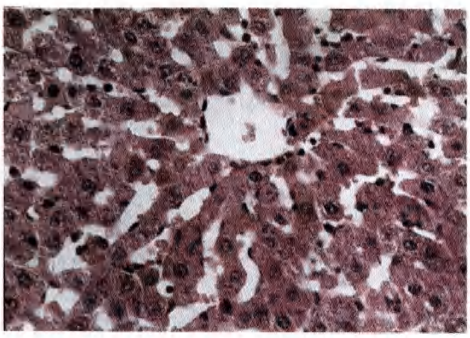


图 1 对照组(2h),HE 染色,×400

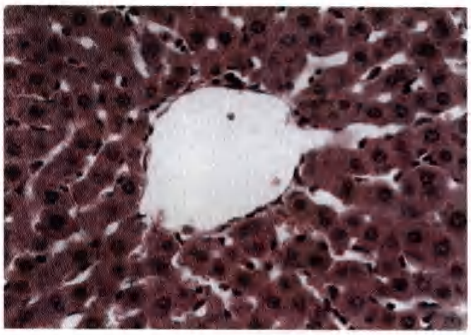


图 2 SF(2h),HE 染色,×400

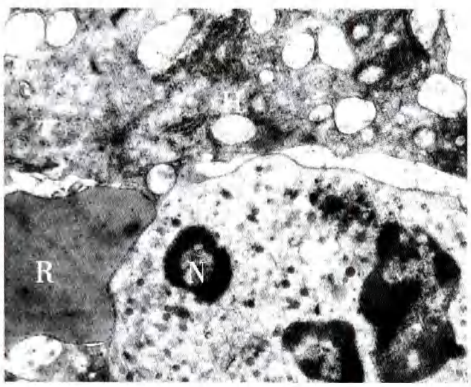



图 3 对照组(4h),电镜,×4 200

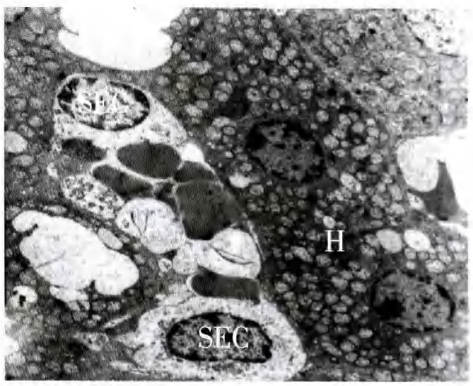



图 4 SF(4h),电镜,×4 200

病变进一步加重,肝细胞的坏死也增多(图 1、2)。

2.3.2 电镜 再灌注后的各个时间点上,SF 组肝细胞和 SEC 的损伤与对照组相比都明显减轻。再灌注后 2h,SF 组 SEC 仅见轻度肿胀,肝细胞线粒体肿胀较轻,血窦也维持比较好的轮廓;对照组的 SEC 和肝细胞的肿胀也更加明显,线粒体呈轻中度肿胀。再灌注 4h 后(图 3、4),SF 组 SEC 肿胀加重,并可见中性粒细胞与 SEC 的粘附,肝细胞内的线粒体和内质网的肿胀、扩张更明显;而对照组的组织损伤则较之更严重,可见散在的肝细胞坏死。再灌注 6h 后,除了前述的一些表现以外,SF 组可见到部分血窦的 SEC 消失,肝细胞大部分膜结构的破坏,直接完全暴露的肝细胞坏死,对照组的损伤更为严重。

2.3.3 肝脏组织中 NF-κB 的表达 在各相应的时间点,SF 组 NF-κB 的活性均明显低于对照组,差异有显著性($P<0.05$)。其中,再灌注 2h 后,SF 组仅表现为中央静脉周围少量细胞胞质的着色,而对照组已经可见有少量的细胞核着色;再灌注 4h 后,2 组 NF-κB 的活性均较本组再灌注 2h 后明显增强($P<0.05$),同时可见肝血窦细胞着色加深;但是再灌注 6h 后,在 SF 组和对照组,NF-κB 的活性较本组再灌注 4h 并没有进一步的增强($P>0.05$)(表 1,图 5~10)。

## 3 讨 论

目前,如何提高肝移植患者术后生存率和生存质量,成为了肝胆外科医生越来越关注的问题。在影响肝移植预后的各种因素中,缺血再灌注损伤作为非免疫因素的一种,对移植肝脏有着不可忽视的负面作用。因此如何减轻肝脏缺血再灌注损伤从而改善肝移植患者的术后情况,已逐渐成为目前研究的一个热点。

SF 为中医"回阳救逆"参附汤的中药配方,主要成分是人参皂苷和乌头类生物碱。其基本药理作用为增加冠脉血流及血管灌注量,延长动物耐缺氧时间,保护缺血心肌等。人参皂苷还可明显减少细胞内游离钙浓度,防止"钙超载"发生,同时降低再灌注时增加的 $Ca^{2+}$ 的内向电流,具有钙通道阻断作用[2]。

维普资讯 http://www.cqvip.com



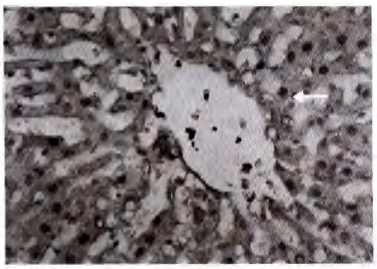


图 5 对照组(2h),免疫组化(SABC)染色,×400

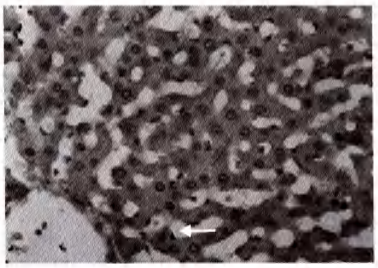


图 6 SF 组(2h),免疫组化(SABC)染色,×400

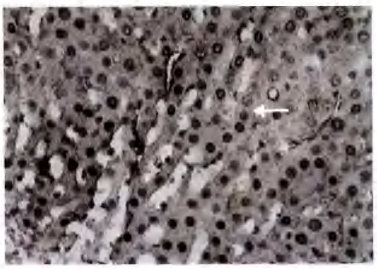


图 7 对照组(4h),免疫组化(SABC)染色,×400

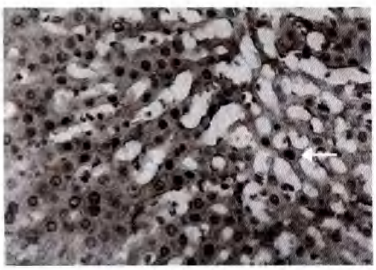


图 8 SF(4h),免疫组化(SABC)染色,×400

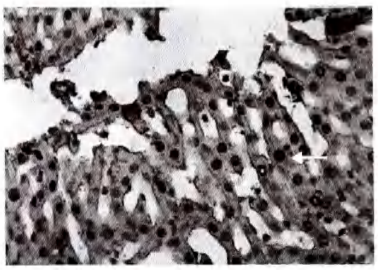


图 9 对照组(6h),免疫组化(SABC)染色,×400

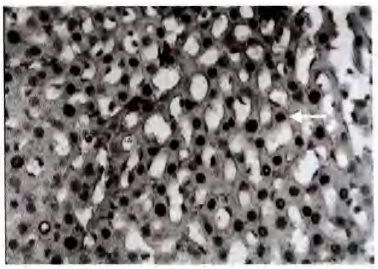


图 10 SF(6h),免疫组化(SABC)染色,×400

关于 SF 在组织器官缺血再灌注损伤的保护作用有较多相关报道,主要涉及心、脑、肾、肺、胃肠、骨骼肌等,其作用机制主要为促进 Bcl-2 表达上调和 Bax 与 c-fos 表达下调,使细胞免于凋亡而长期存活[3];清除氧自由基,提高组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性,提高机体的抗氧化能力[4];减少 TNF-α 和 NF-κB 的表达,抑制血栓烷 A2 的生成,降低外周血管阻力[5,6]等。但目前关于 SF 在肝脏的作用还缺乏相关研究。

本实验通过建立大鼠肝移植模型来探讨 SF 对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用,所选取的各个时间点可反应肝脏损伤逐渐加重达到峰值,而后保持平衡状态的过程。由于肝功酶学和胆汁分泌量是评价急性期肝脏功能受损的重要指标,因此取受体的血清和肝组织进行相应测定可以反应肝脏受损情况。我们发现随着肝移植后再灌注时间的延长,对照组和 SF 组 ALT 呈进行性升高,胆汁分泌量逐渐降低,提示在观察期内,缺血再灌注对肝脏的损害进行性加重。但 SF 组 ALT 的同期指标均较对照组明显下,而且在各时间点 SF 组胆汁分泌量均明显高于对照组,同时,通过对肝脏组织的形态学观察,发现 SF 组在各时间点肝组织的损伤均较对照组轻,损伤的内皮细胞也较少,说明 SF 可以显著减轻缺血再灌注对肝脏的损伤并延缓其进程。

NF-κB 是肝细胞损伤过程中的主要介质,通过对相关靶基因的转录调控而参与机体的免疫反应和炎症反应。在上游因子如 IL-1、TNF-α 等作用下,NF-κB 的诱导激酶 NIK 被激活,激活的 NIK 通过相应途径释放并活化 NF-κB。而 NF-κB 的诱导激活又可以上调诸多细胞因子如 TNF-α 的表达[7,8]。TNF-α 是一种单核因子,主要由单核细胞和巨噬细胞产生,可以损伤血管内皮细胞,造成血管功能紊乱和血栓形成。NF-κB 和 TNF-α 相互作用,可造成缺血再灌注时肝脏损伤的恶性循环[9]。

本实验运用免疫细胞化学染色法测定 NF-κB 的表达,发现在各相应的时间点,SF 组 NF-κB 的活性均明显低于对照组。同时,通过 ELISA 法检测 TNF-α 含量,发现 SF 组在各个时间点的 TNF-α 水平均明显低于对照组,提示 SF 可能通过在肝脏损伤时抑制巨噬细胞分泌 TNF-α,阻断 NF-κB 的激活过程,同时抑制 NF-κB 上调 TNF-α 的表达,从而减轻肝脏的损伤。

因此,我们得出,SF 对肝脏缺血再灌注损伤有明显的保护作用,能减少炎症因子和炎症介质的分泌,减轻肝实质细胞和内皮细胞的损伤,显著延缓和改善肝脏结构和功能上的破坏。SF 在临床肝移植的应用,将为防治移植术后肝功能不全,提高术后

(下转第 445 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com



能不同[8]。作为免疫反应的第一道防线，腹膜巨噬细胞（PMo）和多核中性粒细胞（PMNs）在保护机体不受微生物侵袭方面有重要作用。实验表明，开腹手术组的 PMNs 较 $CO_2$ 气腹组的多，且凋亡率下降，巨噬细胞的比例相对低[10]。

3.3 结论

在裸鼠体内，$CO_2$ 气腹有促进卵巢肿瘤细胞 $SKOV_3$ 生长的作用，且该效应随压力的增高而明显增强。其原因可能是 $CO_2$ 气腹通过破坏宿主的腹膜结构，干扰了局部微环境的抗瘤机能。因此，在恶性肿瘤根治手术时，术者应具备熟练的操作技术，以减少气腹作用时间，并避免采用高气腹压力，从而减少肿瘤转移的发生。

## 参 考 文 献


[1] Suematsu T,Shiromizu A,Yamaguchi K,et al.Convenient murine pneumoperitoneal model for the study of laparoscopic cancer surgery [J]. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech,1999;9(4):279-281.

[2] Wu JS,Brasfield EB,Guo LW,et al,Implantation of colon cancer at rocar sites is increased by low pressure pneumoperitoneum[J]. Surgery,1997;122(1):1-6.

[3] Bouvy ND,Marquet RL,Hamming JF,et al. Laparoscopic surgery in the rat:beneficial effect on body weight and tumor take[J]. Surg Endosc,1996;10(5):490-497.

[4] Gupta A,Wat son I,Ellis T,et al. Tumour implantation following laparoscopy using different insufflation gases[J]. ANZ J Surg,2002;72(4):254-259.

[5] Jacobi CA,Sabat R,Bvohm B,et al. Pnemumoperitoneum with carbon dioxide stimulates growth of malignant colonic cells[J]. Surgery,1997;121(1):72-76.

[6] Molinas CR,Binda MM,Carmeliet P,et al. Role of vascular endothelial growth factor receptor 1 in basal adhesion formation and in carbon dioxide pneumoperitoneum enhanced adhesion formation after laparoscopic surgery in mice[J]. Fertil Steril,2004;82(3):1149-1153.

[7] Tan BJ,Dy JS,Chiu PY,et al. Effects of pneumoperitoneal gases and pressures on transitional cell carcinoma adhesion,growth, apoptosis and necrosis:an in vitro study[J]. J Urol,2005;174(4):1463-1467.

[8] Lee SW,Feingold DL,Carter JJ,et al. Peritoneal macropHage and blood monocyte functions after open and laparoscopic-assisted cecectomy in rats[J]. Surg Endosc,2003;17(2):62-68.

[9] Moehrlen U,Ziegler U,Boneberg E,et al. Impact of carbon dioxide versus air pneumoperitoneum on peritoneal cell migration and cell fate,Surg Endosc,2006;20(10):1607-1613.

[10] Hanly EJ,Aurora AR,Fuentes JM,et al. Abdominal insufflation with $CO_2$ causes peritoneal acidosis independent of systemic pH[J]. J Gastrointest Surg,2005;9(9):1245-1251.


（责任编辑：冉明会）

（上接第 431 页）

生存率，改善患者生存质量开辟一条新的途径。

## 参 考 文 献


[1] Kamada N,Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat[J]. Surgery,1983;93(1):64-69.

[2] Kamada M,Irahara M,Maegawa M,et al. Effect ofhormone replacement therapy on post-menopausal changes of lymphocytes and Tcell subsets[J]. Endocfinol Invest,2000;23(6):376-382.

[3] 陈玉培，牟崇明，季道如，等. 参附注射液对大鼠缺血再灌注心肌 Bcl-2、Bax 与 c-fos 基因蛋白表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2006;28(19):1939-1941.

[4] 戴晓明，吴慧平，蒋凤荣，等. 参附注射液对大鼠肾缺血再灌注损伤作用的研究[J]. 南京中医药大学学报，2006;22(6):380-381.

[5] 邵 丰，郑世营，赵 军，等. 参附注射液对兔离体肺缺血/再灌注保护作用的实验研究[J]. 中国急救医学，2006;26(3):195-197.

[6] 孙艳玲，刘先义. 参附注射液对肾缺血再灌注损伤大鼠 P38 MAPK、TNF-α 表达的影响[J]. 武汉大学学报（医学版），2006;27(3):385-388

[7] Beraza N,L ü dde T,Assmus U,et al. Hepatocyte-specific IKKgamma/NEMO expression determines the degree of liver injury[J]. Gastroenterology,2007;132(7):2504-2517.

[8] George A,Harald C,Rune B. Strong in vivo activation of NF-κB in mouse lenses by classic stressors[J]. Investigative Oph-Thalmology and Visual Science,2003;44(6):2683-2688.

[9] Evans R,Kamdar SJ,Duffy TM. Tumor-derived products induce Il-1 a,Il-1 b,Tnf a,and Il-6 gene expression in murine macrophages: distinctions between tumor- and bacterial endotoxin-induced gene expression[J]. J. Leukoc. Biol,1991;49(5):474.


（责任编辑：冉明会）