

炎症性细胞因子致肝脏缺血再灌注损伤 和丹参单体的保护作用^{*}

王洪超[△] 张 华 周童亮 乔 军 胡晓明 赵武述

内容提要 目的 探讨肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和白细胞介素 8 (IL-8) 在肝脏缺血再灌注损伤中的变化以及水溶性丹参单体 MP-1 (简称 MP-1) 的作用。方法 建立人肝窦内皮细胞体外低温缺氧再氧化模型和大鼠离体肝脏缺血再灌注损伤模型,以台盼蓝染色观察细胞损伤情况,用放免法分析透明质酸吸收率来反映肝窦内皮细胞的功能,用 ELISA 方法检测肝窦内皮细胞产生的 TNF α 和 IL-8 水平,以胆汁流出速率和 ALT、AST、LDH 的变化反映肝脏功能。结果 低温缺氧再氧化期间,肝窦内皮细胞的死亡率随着时间的增加而增加, TNF α 和 IL-8 的释放也随之增加,但肝窦内皮细胞的功能下降,肝窦内皮细胞死亡率分别与 TNF α 和 IL-8 的释放呈正相关 ($r = 0.949, P < 0.05$ 和 $r = 0.892, P < 0.05$)。加入 TNF α 抗体低温缺氧再氧化 6h 的内皮细胞死亡率降低,重组 TNF α 处理的肝窦内皮细胞死亡率明显增加,离体大鼠肝脏的功能随低温保存和再灌注时间的增加而降低,MP-1 能明显降低人肝窦内皮细胞的死亡率及 TNF α 和 IL-8 的释放,同时可以减轻离体大鼠肝脏的缺血再灌注损伤。结论 TNF α 直接参与肝窦内皮细胞的缺血再灌注损伤,MP-1 可能通过抑制 TNF α 和 IL-8 的途径来减轻肝脏缺血再灌注损伤。

关键词 缺血再灌注损伤 人肝窦内皮细胞 肿瘤坏死因子 α 白细胞介素-8 丹参单体

Protective Effect of Hydrophilic Salvia Monomer on Liver Ischemia/Reperfusion Injury Induced by Pro-inflammatory Cytokines WANG Hong-chao, ZHANG Hua, ZHOU Tong-liang, et al *Department of Immunology, China-Japan Friendship Hospital, Beijing (100029)*

Objective: To observe the changes of tumor necrosis factor α (TNF α), interleukin 8 (IL-8) in liver ischemia/reperfusion injury and the protective effect of hydrophilic Salvia monomer MP-1 on them. **Methods:** Hypothermic hypoxia reoxygenation model of human liver sinusoidal endothelial cell line and ischemia/reperfusion model of isolated rat liver were used. TNF α and IL-8 were measured with ELISA kits. Cell injury was excluded by trypan blue stain, sinusoidal endothelial cell function was assessed by hyaluronic acid uptake rate through RIA. Liver function was assayed by alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) release as well as output of bile flow. **Results:** During hypoxia reoxygenation, sinusoidal endothelial cell injury, TNF α and IL-8 increased significantly in time-dependent manner, while sinusoidal cell function decreased. Cell injury was positively correlated to the released amount of TNF α ($r = 0.949, P < 0.05$) and IL-8 ($r = 0.892, P < 0.05$), respectively, the mortality could be reduced within 6 hrs by adding anti-TNF α monoclonal antibody and increased by treating with recombinant human TNF α . Function of isolated rat liver lowered along the increasing of low temperature ischemia/reperfusion time. MP-1 could markedly lower the mortality of endothelial cells and TNF α and IL-8 release, it also could alleviate ischemia/reperfusion injury to isolated rat liver. **Conclusion:** TNF α participated in liver ischemia/reperfusion injury directly, and MP-1 might alleviate the injury through inhibiting TNF α and IL-8.

Key words ischemia/reperfusion injury, human liver sinusoidal endothelial cell, tumor necrosis factor α , interleukin 8, salvia monomer

肝移植手术后最严重的一种并发症是原发性移植

肝脏功能障碍,产生这种并发症的主要原因是缺血再灌注损伤,其中肝窦内皮细胞是肝脏缺血再灌注损伤的主要靶细胞^[1]。丹参作为一种重要的活血化瘀药,在缺血再灌注损伤中清除自由基、拮抗钙离子、保护线粒体功能等作用虽有很多报道,但在肝脏缺血再灌注

^{*} 国家自然科学基金资助课题 (No. 30070723)

中日友好医院临床医学研究所 (北京 100029)

[△] 现为协和医科大学中西医结合基础专业在读博士

损伤中丹参制剂与肿瘤坏死因子 α (TNF α) 和白细胞介素-8 (IL-8) 的关系国内外尚未见报道。本研究观察肝脏缺血再灌注损伤中 TNF α 和 IL-8 是否发生变化,水溶性丹参单体 MP-1 (简称 MP-1) 是否可以保护肝脏缺血再灌注损伤及可能的作用途径。

材料和方法

1 动物 健康 SD 雄性大鼠 (2 级) 20 只, 体重 (220 ± 25) g, 购自北京实验动物中心。

2 药品与试剂 MP-1 由中国医学科学院血液病研究所刘杰文研究员提供; LPS 为 Sigma 产品; RPMI-1640 干粉为 Gibco 产品; 人重组 TNF α 和抗人 TNF α 抗体为 R&D 产品 (210-TA-010 和 MAB610)。

3 肝窦内皮细胞缺血再灌注实验模型制备及分组

3.1 人肝窦内皮细胞系 由本所姜晋宁博士提供。此细胞系经 80 次以上的传代, 仍保留有肝窦内皮细胞特有的形态和功能特征⁽²⁾, 这种细胞系与原代肝窦内皮细胞一样, 对缺血再灌注损伤的敏感性很高。

3.2 实验分组 将肝窦内皮细胞接种在 24 孔培养板中, 细胞长满后, 换用无胎牛血清、无酚红的培养液, 内含透明质酸 1 ng/ml。实验设阴性对照组 (简称 R 组)、低温缺氧组 (简称 H 组)、复温再氧化组 (简称 H-R 组) 其中 H-R 组按再氧化时间的不同又分为 2、4、6 h 的 3 个亚组 (简称 H-R 2h 组、H-R 4h 组、H-R 6h 组) 以及 MP-1 组 (给 MP-1 30 μ g/ml), 另外 H-R 组换用的培养液中加入 TNF α 的抗体 (1 μ g/ml), 以便验证 TNF α 在冷缺血再灌注损伤中的作用。在 R 组加入重组人 TNF α (500 pg/ml), 观察 TNF α 对肝窦内皮细胞的毒性作用。R 组继续在 37℃ 温箱内培养 30 h; 其他组则进入低温缺氧和再氧化条件 (将培养板转入 4℃ 冰箱内密闭的干燥器中, 利用烛火耗尽氧气以造成低温缺氧环境并维持 24 h, 取出培养板后立即转入 37℃, 通有 95% O₂、5% CO₂ 的培养箱来模拟再灌注条件)。实验结束后, 取培养上清分别用于 TNF α 和 IL-8 以及透明质酸的检测, 另取培养上清 500 μ l 用于粒细胞游走实验。

4 肝窦内皮细胞损伤的观察和功能测定

4.1 内皮细胞损伤的观察 用 0.5% 台盼蓝染色来区别细胞的死活, 死亡细胞被染成蓝色, 而存活细胞不被染色, 5 min 后镜下计数。

4.2 内皮细胞的功能测定 透明质酸广泛分布在全身结缔组织中, 代谢产生的透明质酸可以特异性地被肝窦内皮细胞摄取并利用 (利用这一特点, 可以用透明质酸吸收率很好地反映肝窦内皮细胞的功能), 采

用上海海军医学研究所提供的透明质酸及其放免试剂盒检测透明质酸的浓度, 严格按说明书进行, 用 LKB 1272 型 γ 计数器进行检测。透明质酸吸收率 (pg $\cdot$ ml⁻¹ $\cdot$ h⁻¹) = (实验前透明质酸浓度 - 实验后透明质酸浓度) $\cdot$ 培养时间。

5 TNF α 和 IL-8 的测定 使用 R&D 公司的 ELISA 试剂盒, 按说明书进行测定, 用 MTP-32 酶标仪检测各组的 OD 值。

6 粒细胞游走实验 取健康成人外周血, 以明胶沉降红细胞, 按密度梯度离心方法分离粒细胞, 混杂的红细胞用注射用水来破坏, 最后用培养液悬起粒细胞并计数。台盼蓝染色证明粒细胞存活率大于 95%; 37℃、5% CO₂ 培养 3 h 未见存活率的降低; Giemsa 染色鉴定粒细胞的纯度大于 90%。取各组培养上清各 0.5 ml 加入 24 孔板, 然后将滤膜孔径为 3 μ m 的细胞培养插入器 (Costar) 放入 24 孔板, 再将 2×10^5 的粒细胞接种到细胞培养插入器, 37℃、5% CO₂ 培养 1 h 后, 取出 24 孔板内的所有培养液, 离心后计数各孔内粒细胞的数量。

7 离体大鼠肝脏缺血再灌注实验

7.1 肝脏的获得和实验分组 实验大鼠随机分为缺血再灌注对照组 (简称对照组) 和 MP-1 处理组 (简称 MP-1 组), 每组 10 只。腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠后, 按常规方法⁽³⁾ 分离肝脏, 小心获得大鼠肝脏并称重。对照组的离体肝脏直接以 KHB 缓冲液来保存和灌流; MP-1 组则在实验前 3 天连续每天腹腔注射 MP-1 80 mg/kg, 实验中将 MP-1 加入 KHB 缓冲液至 30 μ g/ml, 用于低温保存和再灌注。

7.2 肝脏的低温保存和复温再灌注 离体大鼠肝脏在含有或不含有 MP-1 的 4℃ KHB 缓冲液内保存 24 h, 然后移入 37℃ 温箱中, 用 95% O₂ 和 5% CO₂ 饱和的 KHB 缓冲液 1000 ml, 以非循环方式经门静脉灌注 (1 ml $\cdot$ g⁻¹ $\cdot$ min⁻¹); 复温再灌注期间分别于 30 和 60 min 取灌流液 1 ml, 用 HITACHI 7170A 自动生化分析仪检测谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 及乳酸脱氢酶 (LDH) 的变化。在灌注液剩余 100 ml 时, 加入台盼蓝, 并继续灌注。实验结束后, 迅速以福尔马林固定, 用于形态学检查。

8 统计学方法 各组均数差异的显著性用 Student 双尾 t 检验。两组数据进行 Pearson 相关分析。

结 果

1 人肝窦内皮细胞缺血再灌注损伤的变化以及 MP-1 的保护作用

1.1 各组肝窦内皮细胞死亡情况 见表 1。肝窦内皮细胞死亡率随低温缺氧和再氧化时间的增加而增加,呈明显的时间依赖性。MP-1 组内皮细胞死亡率显著降低(与 H-R 6h 组比较, $P < 0.01$)。

1.2 各组肝窦内皮细胞功能(以透明质酸吸收率表示)的测定结果 见表 1。肝窦内皮细胞的透明质酸吸收率在低温缺氧保存时即开始降低,复温再氧化期间更加明显。MP-1 组透明质酸吸收率明显提高(与 H-R 6h 组比较, $P < 0.05$)。

1.3 各组肝窦内皮细胞中 $\text{TNF}\alpha$ 和 IL-8 测定结果 见表 1。低温缺氧再氧化以时间依赖的方式诱导肝窦内皮细胞释放 $\text{TNF}\alpha$ 和 IL-8。MP-1 组 $\text{TNF}\alpha$ 和 IL-8 的释放明显减少(与 H-R 6h 组比较, $P < 0.05$)。

内皮细胞死亡率的平均数分别与 $\text{TNF}\alpha$ 和 IL-8 释放的平均数之间呈正相关($r = 0.949$, $P < 0.05$ 和 $r = 0.892$, $P < 0.05$, 见图 1 和图 2)。

1.4 各组粒细胞游走数量的测定结果 见表 1。R 组跨膜游走的粒细胞数量很少, H-R 各时间段组游走的粒细胞随时间的增加而增加($P < 0.05$), MP-1 组游走的粒细胞显著减少(与 H-R 6h 组比较, $P < 0.05$)。

1.5 $\text{TNF}\alpha$ 在肝窦内皮细胞缺血再灌注损伤中的作用 加入抗人 $\text{TNF}\alpha$ 单克隆抗体后 H-R 6h 组的细胞死亡率由 $(75.3 \pm 9.2)\%$ 降低到 $(36.5 \pm 5.2)\%$, 两者比较差异有显著性($P < 0.01$)。重组人 $\text{TNF}\alpha$ (500pg/ml) 可使 87% 的肝窦内皮细胞死亡。

2 离体大鼠肝脏缺血再灌注损伤和 MP-1 的保护作用

2.1 各组离体大鼠肝脏损伤的病理形态 对照

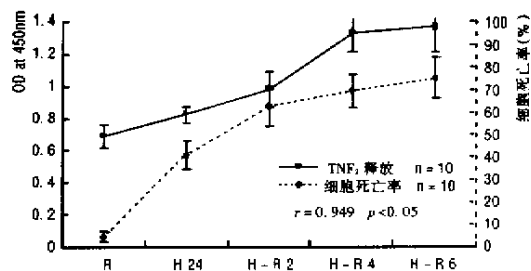


图 1 $\text{TNF}\alpha$ 释放的平均数与肝窦内皮细胞死亡率关系

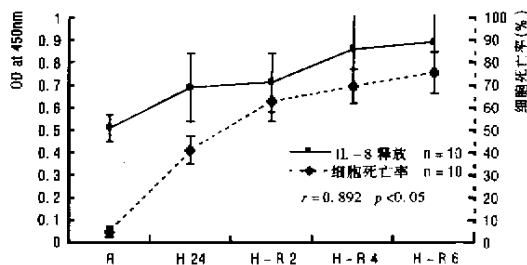


图 2 IL-8 释放的平均数与肝窦内皮细胞死亡率关系

组肝组织损伤严重,肝窦内皮细胞脱落明显,肝细胞水样变性和小叶周边区的肝细胞脂肪变性明显,少部分区域出现肝板破坏,肝细胞坏死,死亡的肝窦内皮细胞和肝细胞数量较 MP-1 组明显增多。MP-1 组的肝组织结构保存良好,部分内皮细胞变圆,少数发生脱落,每个高倍视野中的内皮细胞数量高于对照组(图略)。

2.2 两组离体大鼠肝脏功能的测定结果 见表 2。MP-1 组的 AST、ALT 和 LDH 释放量明显低于同期对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。60min 时胆汁流出速率 MP-1 组明显高于同期对照组($P < 0.05$)。

2.3 两组大鼠灌流液 $\text{TNF}\alpha$ 和 IL-8 测定结果 见表 2。MP-1 组的灌流液中 $\text{TNF}\alpha$ 和 IL-8 含量明显低于同期对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 1 各组肝窦内皮细胞缺血再灌注损伤的变化和 MP-1 的保护作用 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	内皮细胞死亡率 (%)	透明质酸吸收率 ($\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	内皮细胞 $\text{TNF}\alpha$ (OD 值)	内皮细胞 IL-8 (OD 值)	游走的粒细胞数 ($\times 10^4$)
R	10	4.8 ± 2.3	10.6 ± 0.6	0.51 ± 0.06	0.69 ± 0.07	0.81 ± 0.22
H	10	$41.0 \pm 6.2^{**}$	$8.8 \pm 0.9^*$	0.69 ± 0.15	0.83 ± 0.05	$3.47 \pm 1.06^*$
H-R 2h	10	$62.8 \pm 9.1^{**}$	$8.2 \pm 0.9^*$	0.71 ± 0.13	$0.98 \pm 0.11^*$	$4.33 \pm 1.78^*$
H-R 4h	10	$69.5 \pm 7.5^{**}$	$8.4 \pm 0.9^*$	$0.86 \pm 0.16^*$	$1.33 \pm 0.12^*$	$5.65 \pm 1.93^*$
H-R 6h	10	$75.3 \pm 9.2^{**}$	$8.2 \pm 0.9^*$	$0.89 \pm 0.15^*$	$1.37 \pm 0.16^{**}$	$7.50 \pm 1.21^*$
MP-1	10	$19.3 \pm 5.2^{\Delta\Delta}$	$9.9 \pm 1.3^{\Delta}$	$0.64 \pm 0.13^{\Delta}$	$0.79 \pm 0.11^{\Delta}$	$1.17 \pm 0.16^* \Delta$

注:与 R 组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 H-R 6h 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表 2 两组离体大鼠肝脏功能的变化及灌流液中 TNF α 和 IL-8 测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n		胆汁流出速率	AST	ALT	LDH	灌流液中 TNF α	灌流液中 IL-8
			($\mu\text{l} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)		(U/L)		(OD 值)	
对照	10	30min	0.14 $\pm$ 0.01	71.3 $\pm$ 8.2	67.1 $\pm$ 6.3	100.3 $\pm$ 8.1	0.68 $\pm$ 0.09	1.69 $\pm$ 0.31
		60min	0.08 $\pm$ 0.01	87.5 $\pm$ 7.3	83.9 $\pm$ 6.4	810.5 $\pm$ 98.3	0.85 $\pm$ 0.17	1.94 $\pm$ 0.38
MP-1	10	30min	0.19 $\pm$ 0.03	29.4 $\pm$ 3.6 *	39.8 $\pm$ 7.2 *	41.7 $\pm$ 5.6 **	0.42 $\pm$ 0.05 *	1.13 $\pm$ 0.16 *
		60min	0.15 $\pm$ 0.02 *	48.7 $\pm$ 6.2 *	41.8 $\pm$ 5.6 *	393.6 $\pm$ 76.9 **	0.51 $\pm$ 0.09 **	1.32 $\pm$ 0.21 *

注 :与对照组同期比较 , * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论

微血管内皮细胞有一定的组织特异性 ,以往用脐静脉内皮细胞来笼统地替代各种组织的内皮细胞进行研究缺乏特异性 ,因此利用特定的微血管内皮细胞来研究特定组织或器官的病变有独特的优势。

肝脏的枯否氏细胞是 TNF α 产生的主要来源 ,但缺血再灌注损伤可以诱导内皮细胞释放 TNF α ,TNF α 一方面通过受体直接介导细胞的损伤 ,另一方面会进一步诱导内皮细胞表达 IL-8 和多种粘附分子 ,从而有利于白细胞与内皮细胞的粘附和跨膜游走。IL-8 作为重要的趋化因子 ,它几乎可以趋化任何可游走的免疫细胞。

中性粒细胞表面经常表达一定数量的选择素 ,借助这些分子 ,中性粒细胞随血液流动时可以和活化的内皮细胞粘附 ,但由于结合松弛和血流的冲击 ,粒细胞边滚动边移行 ,在缺血再灌注期间 ,活化的内皮细胞通过受体与 IL-8 结合 ,中性粒细胞与结合 IL-8 的内皮细胞接触 ,进一步表达淋巴细胞功能抗原和巨噬细胞表面抗原等粘附分子 ,这些粘附分子与相应的配体细胞间粘附分子 1 牢固结合 ,使中性粒细胞停止滚动 ,这时在趋化因子的作用下 ,粒细胞便可穿过内皮细胞进入趋化因子表达区域。本灌注实验中虽然没有中性粒细胞的参与 ,但在实际肝脏移植过程中 ,就很可能因为 IL-8 的趋化作用使粒细胞游走到相应部位 ,并在局部

释放基质蛋白酶和丝氨酸蛋白酶以及自由基而加重肝组织的损伤。

本实验结果显示 :TNF α 和 IL-8 释放是肝脏缺血再灌注损伤的重要因素 ,加入 TNF α 的单克隆抗体 ,可见内皮细胞死亡率明显地下降 ,而重组人 TNF α 可促使内皮细胞死亡 ,说明 TNF α 是导致缺血再灌注损伤的直接原因之一。抑制 TNF α 和 IL-8 的表达或释放将成为减轻肝脏缺血再灌注损伤的重要靶点。水溶性丹参单体 MP-1 通过抑制 TNF α 和 IL-8 的释放来减轻肝脏缺血再灌注损伤。

(致谢 :感谢姜晋宁博士提供的人肝窦内皮细胞系及刘杰文研究员的鼎立相助)

参 考 文 献

1.Chavien PA , Harvey PR , Strasherg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies. Transplantation 1992 53(5):957—978.
2.Lou J , Buhler L , Deng S , et al Inhibition of leukocyte adherence and transendothelial migration in cultured human liver vascular endothelial cells by prostaglandin E $_1$. Hepatology 1998 27(3):822—828.
3.Rodriguez JV , Guibert EE , Quintana A , et al. Role of sodium nitroprusside in the improvement of rat liver preservation in University of Wisconsin solution : A study in the isolated perfused liver model. J Surg Res 1999 87(2):201—208.

(收稿 2001 - 09 - 12 修回 2001 - 12 - 14)

(上接 195 页)

ter focal cerebral ischemia : hemodynamic and histological correlates. Brain Res Mol Brain Res 1998 53(1):79—97.
8.Nowak TR , Jacewicz M. The heat shock stress response in focal cerebral ischemia. Brain Pathol 1994 4:67—76.
9.Sharp FR , Kinouchi M , Jacewicz M , et al. HSP70 heat shock gene regulation during ischemia. Stroke 1993 24:172—175.
10.Tomimoto H , Takemoto O , Akiguchi I , et al. Immunoelectron microscopic study of c-fos , c-jun and heat shock protein after transient cerebral ischemia in gerbils. Acta Neuropathol 1999 ;97(1):

22—30.
11.Nowak TR , Junichi I , Nakajima T. 70KDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. Stroke 1990 ;21 (Suppl 11):107—111.
12.Lee TS , Kato H , Chen ST , et al. Expression of nerve growth factor and trk A after transient focal cerebral ischemia in rats. Stroke 1998 29:1687—1697.

(收稿 2001 - 03 - 10 修回 2001 - 10 - 23)