

苦参碱对大鼠小体积肝移植缺血再灌注损伤的保护作用

刘浩, 仇毓东, 毛凉, 朱新华, 丁义涛

刘浩, 仇毓东, 毛凉, 朱新华, 丁义涛, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科 江苏省南京市 210008

刘浩, 2005级南京大学硕士, 主要从事肝脏移植方面的研究。

作者贡献分布: 此课题由丁义涛和仇毓东设计; 研究程序由刘浩, 毛凉及朱新华操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由仇毓东提供; 数据分析由刘浩, 毛凉及朱新华完成; 本论文写作由刘浩, 毛凉, 朱新华及仇毓东完成。

通讯作者: 仇毓东, 210008, 江苏省南京市, 南京大学医学院附属鼓楼医院肝胆外科。yudongqiu510@163.com

电话: 025-83594913

收稿日期: 2008-03-14 修回日期: 2008-04-30

Protective effect of matrine against ischemia and reperfusion injury in rat partial liver transplantation

Hao Liu, Yu-Dong Qiu, Liang Mao, Xin-Hua Zhu, Yi-Tao Ding

Hao Liu, Yu-Dong Qiu, Liang Mao, Xin-Hua Zhu, Yi-Tao Ding, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China

Correspondence to: Yu-Dong Qiu, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, Jiangsu Province, China. yudongqiu510@163.com

Received: 2008-03-14 Revised: 2008-04-30

Abstract

AIM: To investigate the protective effect of matrine against ischemia and reperfusion injury in rats with partial liver transplantation.

METHODS: Using the 30% small-for-size liver transplantation (SLT) model, 322 male SD rats were randomly divided into sham operation group, SLT group, SLT+low-dose matrine (40 mg/kg) group and SLT+high-dose matrine (80 mg/kg) group. Serum samples were collected to measure the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) at 2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d and 7 d after reperfusion of the portal vein. The one-week survival rate was observed in each group. Tissue samples were collected for observation of the morphologic changes under optical and electron microscope and detection of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) expression using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: In comparison with those in the SLT group, the one-week survival rates were increased markedly in the low- and high-dose matrine treatment groups (80%, 70% vs 50%, both $P < 0.05$). The levels of ALT, AST and LDH as well as the expression of IL-6 and TNF- α were decreased significantly in the low- and high-dose matrine treatment groups at 2 h, 4 h, and 1 d post-transplantation. The rats in matrine-treated groups showed reduced severity of ultrastructural changes in both hepatic cells and sinusoidal endothelial cells (SEC).

CONCLUSION: Matrine can prevent hepatic cells and SEC from ischemia and reperfusion injury during partial liver transplantation in rats, and the mechanism is associated with the release inhibition of inflammatory cytokines such as IL-6 and TNF- α .

Key Words: Matrine; Partial liver transplantation; Ischemia and reperfusion injury; Enzyme-linked immunosorbent assay

Liu H, Qiu YD, Mao L, Zhu XH, Ding YT. Protective effect of matrine against ischemia and reperfusion injury in rat partial liver transplantation. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(15): 1617-1621

摘要

目的: 探讨苦参碱对大鼠小体积肝移植缺血再灌注损伤的保护作用及机制。

方法: 采用大鼠30%小体积肝移植模型, 322 SD大鼠322只随机分为假手术组、小体积肝移植对照组和高、低剂量苦参碱治疗组(60、40 mg/kg)。观察术后1 wk生存率, 检测移植术2h、4h、1d、2d、3d、7d后ALT、AST及LDH值。光镜及电镜下评估移植肝病理形态学改变, ELISA法检测肝脏IL-6、TNF- α 表达。

结果: 与对照组比较, 苦参碱高、低剂量治疗组术后1 wk生存率显著增加(80%, 70% vs 50%, 均 $P < 0.05$)。术后2h、4h、1d ALT、AST及LDH明显降低($P < 0.01$)。苦参碱治疗组中肝细胞和肝窦内皮细胞凋亡减少、细胞形态明显改善, 苦参碱治疗组术后2h、4h、1d肝脏

■背景资料

肝移植作为治疗终末期肝病的最为有效的手段, 挽救了大量重症肝病患者的生命。然而, 供肝的匮乏已成为制约肝移植发展的重要因素, 许多患者在等待供体中死亡。以劈离式肝移植、活体肝移植为代表的部分肝移植技术的成熟和推广, 在一定程度上缓解了供肝短缺的矛盾。

■同行评议者

王学美, 研究员, 北京大学第一医院中西医结合研究室

■相关报道

本课题组前期研究中发现,苦参碱可以在一定程度上对全肝移植的冷保存缺血再灌注损伤有保护作用。

组织中IL-6, TNF- α 水平明显降低($P<0.01$)。

结论:苦参碱可减轻肝细胞及肝窦内皮细胞的损伤,改善小体积肝移植术后缺血再灌注损伤,其机制可能与苦参碱抑制肝移植术后IL-6、TNF- α 等炎症因子的释放有关。

关键词:苦参碱;小体积肝移植;缺血再灌注损伤;酶联免疫吸附实验

刘浩, 仇毓东, 毛凉, 朱新华, 丁义涛. 苦参碱对大鼠小体积肝移植缺血再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2008; 16(15): 1617-1621

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/1617.asp>

0 引言

近年来,活体肝移植(living donor liver transplantation, LDLT)技术逐渐成熟,临床应用日益广泛,已经成为尸体全肝移植的重要补充。但由于供肝体积小于受体原肝,他所承受的缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)较全肝移植更为严重,并且直接影响到移植物和患者的存活。因此,对小体积供肝IRI的保护已经成为基础和临床研究的重要课题。本研究选择具有抗炎、抗氧化、免疫抑制和保肝等作用的中药单体苦参碱(matrine)^[1-2],采用大鼠30%的小体积肝移植模型^[3],探讨其对小体积肝移植IRI的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 δ SD大鼠322只购于南京军区总医院动物实验中心,体质量210-230 g。苦参碱购自广州明兴制药厂,均选择同一批号的药物,ELISA试剂盒购于博士德公司。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模:实验大鼠随机分为假手术组(46只)、对照组(92只)和苦参碱治疗组(184只)。假手术组仅行单纯的开关腹手术,对照组行30%的小体积肝移植术;苦参碱治疗组依据苦参碱剂量不同治疗组又分为低剂量(40 mg/kg)苦参碱治疗组(92只)、高剂量(60 mg/kg)苦参碱治疗组(92只)。治疗组受体在术前30 min ip相应剂量的苦参碱,然后再行供肝植入术。移植术后2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d共6个时间点,每组每时间点设6个样本行肝功能、光镜和电镜检查。各组另设10个样本用于观察1 wk生存率。

大鼠小体积肝移植模型基本参照Man *et al*^[3]所采用的小体积肝移植方法进行。应用规则性肝切除技术,切除大鼠肝脏的左叶和中叶,保留

右叶和尾状叶作为供肝行小体积肝移植术。整个手术中,供体手术时间约30 min,后台时间约30 min,受体手术时间约为1 h。手术无肝期约为17-19 min,模型稳定率为95%。

1.2.2 生存率统计:对假手术组(10只),小体积肝移植对照组、低剂量苦参碱治疗组(40 mg/kg)和高剂量苦参碱治疗组(60 mg/kg)(各10对)小体积肝移植后的1 wk生存率进行统计。

1.2.3 肝功能测定:各组分别于移植术后2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d经大鼠腹主动脉抽取1 mL血液,离心后取血清标本来测定大鼠ALT、AST、LDH(生化测定在南京市鼓楼医院检验科使用多功能生化分析仪进行)。

1.2.4 病理学检测:各组分别于移植术后2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d各取20 g大鼠肝右叶组织,置于40 g/L的甲醛中,再取10个1 mm³大小的大鼠肝右叶组织置于电镜保存液中后,制作成光镜和电镜标本,在光镜(BX-50)和透射电镜(JEM-1200EX)下观察移植肝脏组织病理形态学改变的情况。

1.2.5 肝脏IL-6, TNF- α 的表达:各组分别于移植术后2 h, 4 h, 1 d, 2 d, 3 d, 7 d取10 g左右肝脏组织冻存于液氮罐中,取0.1 g的肝脏组织加入1 ml的PBS溶液中做成组织匀浆,ELISA法检测肝脏IL-6, TNF- α 表达水平。

统计学处理 计量资料用mean \pm SD表示,多组样本均数比较采用单因素方差分析,先进行方差齐性检验,然后采用Student-Newman-Keuls检验进行两两比较,以双侧 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,全部统计分析采用SPSS15.0软件实现。

2 结果

2.1 1 wk生存率比较 小体积肝移植术后,对照组大鼠的1 wk生存率为50%。与对照组比较,苦参碱低剂量治疗组术后的1 wk生存率为70%,高剂量治疗组术后的1 wk生存率为80%,统计学差异显著($P<0.05$)。苦参碱治疗组之间比较,无明显统计学差异(图1)。

2.2 肝功能变化 术后2 h, 4 h和1 d的ALT、AST、LDH值:小体积肝移植各组与假手术组比较均增高,统计学差异极显著($P<0.01$),苦参碱治疗组与对照组比较均降低,统计学差异极显著($P<0.01$),高剂量治疗组与低剂量治疗组比较也有所降低,统计学差异显著($P<0.05$,图2)。

2.3 病理学改变 小体积肝移植后,光镜下观察发现,对照组可见以小叶中央静脉为中心的灶状凝固性坏死,伴大量炎性细胞浸润;而小剂量苦参碱治疗组可见肝小叶结构基本正常,少数肝

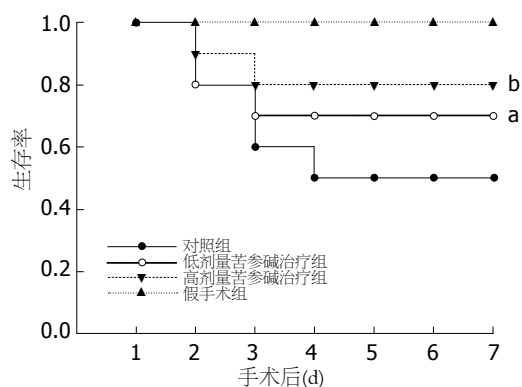


图 1 实验大鼠的1wk生存率比较。* $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组。

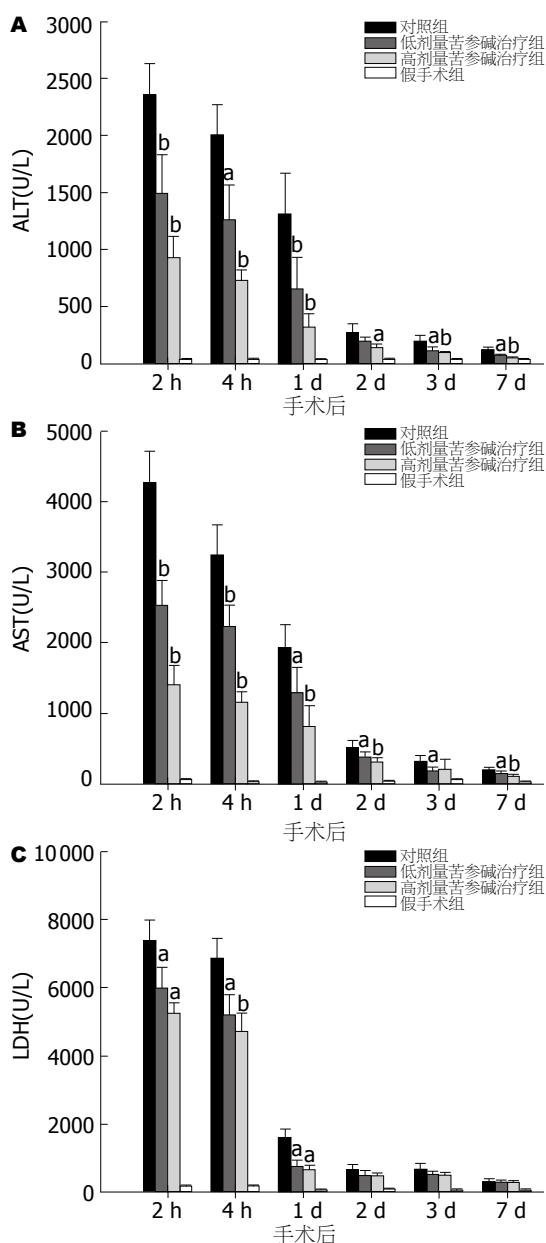


图 2 肝功能变化。A: ALT; B: AST; C: LDH; * $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs 对照组。

细胞呈空泡变性, 很少有肝细胞坏死, 炎症反应明显减少。大剂量治疗组与小剂量组组织学改

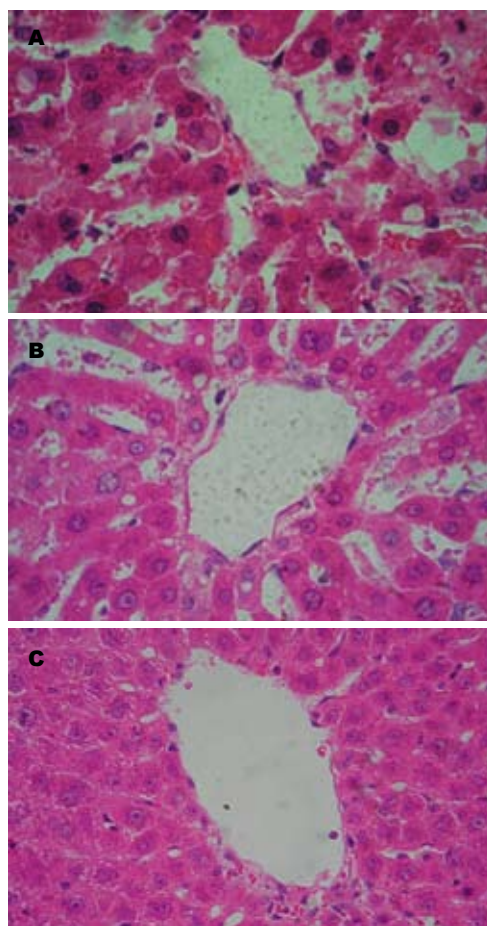


图 3 移植后1 d肝脏组织学切片光镜观察(HE染色, $\times 400$)。A: 对照组; B: 低剂量苦参碱治疗组; C: 高剂量苦参碱治疗组。

变基本相似(图3)。

小体积肝移植后, 电镜下观察发现, 对照组肝细胞核皱缩, 染色质浓集, 线粒体空泡化明显, 粗面内质网扩张, 肝窦内皮细胞不连续, 高度肿胀, 核膜不完整, 可见凋亡的内皮细胞; 而小剂量苦参碱治疗组肝细胞膜完整, 细胞核圆居中, 肝窦内皮细胞内皮轻度水肿, 血窦腔内炎症细胞的浸润程度明显轻于对照组, 未见凋亡的内皮细胞。大剂量治疗组与小剂量组组织学改变相似(图4)。

2.4 IL-6和TNF- α 的活性 与对照组比较, 苦参碱治疗组术后各时间点IL-6和TNF- α 值均降低, 统计学差异极显著($P<0.01$)。与低剂量治疗组比较, 高剂量治疗组术后各时间点IL-6和TNF- α 值也有所降低, 统计学差异显著($P<0.05$, 图5)。

3 讨论

当前, 肝移植已成为治疗终末期肝病的最为有效的手段, 挽救了大量重症肝病患者的生命。然而, 供肝的匮乏已成为制约肝移植发展的重要

■创新盘点

本研究采用保留大鼠右叶和双尾叶的方式成功建立了30%的大鼠小体积肝移植这个肝衰模型。

■应用要点

本研究为进一步研究苦参碱在小体积肝移植“小肝综合征”防治中的应用奠定了理论基础。

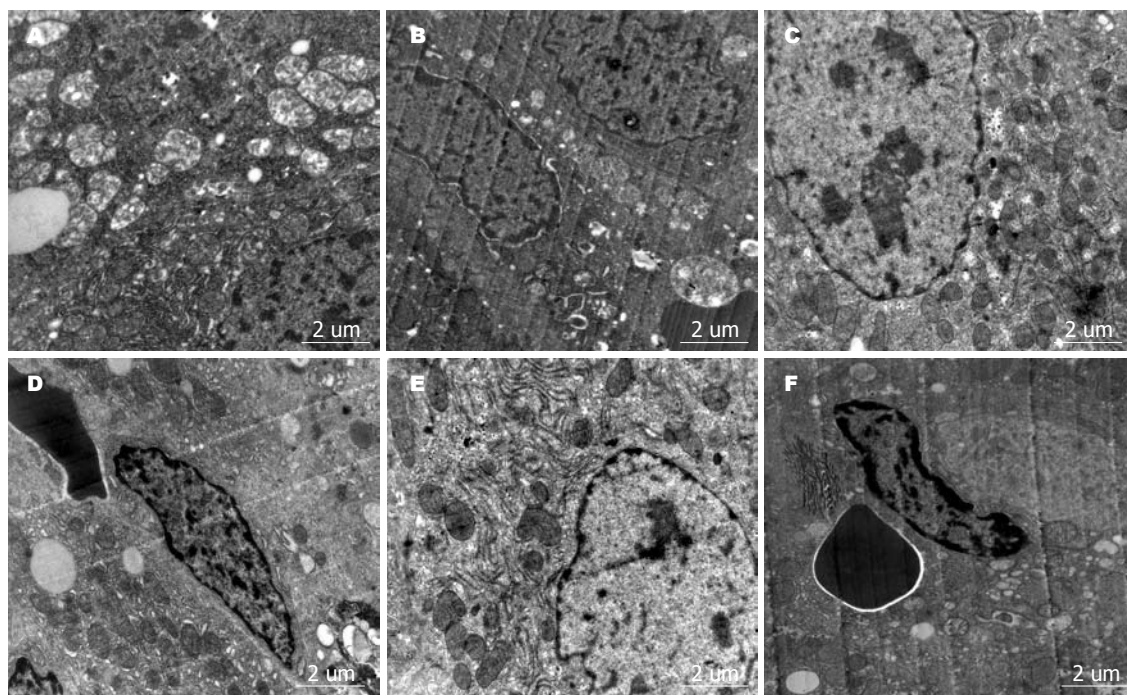


图4 移植后1 d肝脏组织电镜观察(EM, ×12000). A: 对照组; B: 小体积肝移植组肝窦内皮细胞; C: 低剂量苦参碱治疗组肝细胞; D: 低剂量苦参碱治疗组肝窦内皮细胞; E: 高剂量苦参碱治疗组肝细胞; F: 高剂量苦参碱治疗组肝窦内皮细胞。

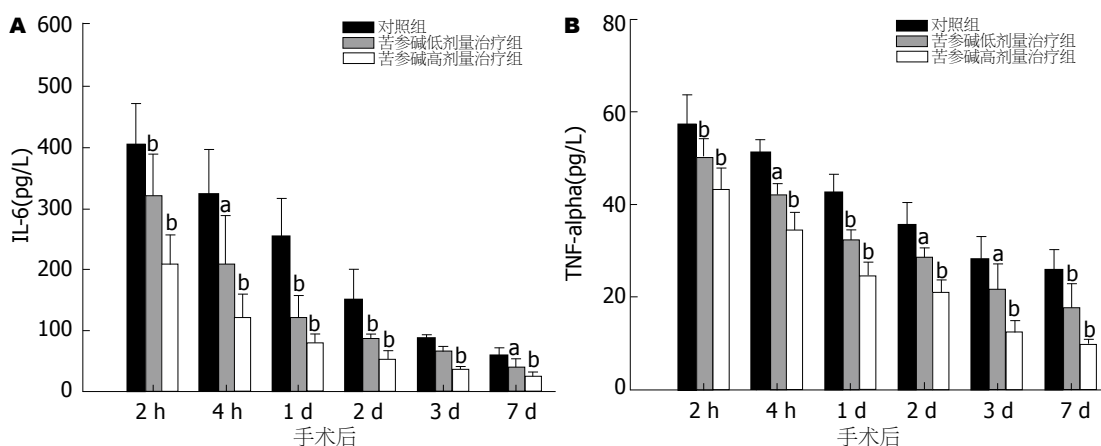


图5 IL-6和TNF-α的活性. A: IL-6; B: TNF-α; ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组。

因素,许多患者在等待供体中死亡.以劈离式肝移植、活体肝移植为代表的部分肝移植技术的成熟和推广,在一定程度上缓解了供肝短缺的矛盾.但是,由于移植肝体积的减小,他所承受的门静脉高灌注压更高、遭受的IRI更严重^[4-8],这在一定程度上增加了部分肝移植术后并发症的发生率,影响了治疗效果.近年来,人们进行了大量的实验和临床研究,采用了诸如缺血预处理、药物干预、术式的改进等^[9-10]方法预防和治疗部分肝移植的IRI.我们通过前期的研究,建立了大鼠30%小体积肝移植模型,术后1 wk生存率约为50%,与梁廷波 *et al*^[11]和叶晟 *et al*^[12]报道相类似.在此基础上,选择药物干预的手段,初

步探讨了对大鼠小体积移植肝IRI的保护作用.

苦参碱是从中药苦参中提取的具有苦参次碱-15-酮基本结构的化合物,具有抗炎、抗氧化、保肝等作用,已经广泛应用于各类项肝病的临床治疗.我们在前期的研究中发现苦参碱可以在一定程度上改善全肝移植过程中的IRI^[13-15].本实验重点观察了苦参碱在小体积肝移植中对移植肝的IRI有无保护作用,以及不同剂量苦参碱的疗效差别.研究结果显示:与对照组50%的1 wk生存率相比,苦参碱低剂量治疗组术后1 wk生存率为70%,高剂量治疗组术后的1 wk生存率为80%,苦参碱低剂量与高剂量治疗组均未发生明显的毒性反应.通过肝功能检测

发现,苦参碱治疗组术后各时间点ALT、AST及LDH值较对照组均显著降低,提示治疗组术后肝功能有明显的改善,而高剂量治疗组肝功能指标的改善更加明显。病理学检测发现,对照组移植肝组织学标本在光镜下可见以多处灶状坏死,伴大量炎性细胞浸润;而苦参碱治疗组的肝小叶结构基本正常,很少有肝细胞坏死,炎症反应明显减少。电镜观察发现,对照组肝细胞线粒体空泡化明显,内质网扩张,肝窦内皮细胞肿胀,并可见凋亡的内皮细胞。苦参碱治疗组肝细胞膜完整,肝窦内皮细胞内皮轻仅度水肿,血窦腔内炎性细胞的浸润程度明显轻于对照组,未见凋亡的内皮细胞。我们又通过ELISA法对炎症因子IL-6、TNF- α 表达水平的检测发现,苦参碱治疗组术后各时间点IL-6和TNF- α 值较对照组均显著降低,提示治疗组术后IL-6和TNF- α 的释放减少,而高剂量治疗组术后IL-6和TNF- α 水平表达减少得更加明显。由此可见,苦参碱在一定程度上可以减轻肝内实质细胞和非实质细胞的损伤,对肝细胞、肝窦内皮细胞有较好地保护作用。初步的形态学检查发现肝细胞和内皮细胞的凋亡减少。通过减轻肝窦内皮细胞的炎症损伤,可有效改善肝脏的微循环障碍,减轻小体积肝移植术后的IRI。我们认为,苦参碱可通过抑制肝脏组织中IL-6、TNF- α 等炎症因子的释放,减轻移植肝内细胞的炎症损伤,降低肝脏的酶学指标,达到改善术后移植肝功能的目的,最终提高小体积肝移植的生存率。以往有文献报道,苦参碱减轻移植IRI可能通过IL-6、TNF- α 通路;苦参碱还能作用于NO途径,清除氧自由基、减少钙超载从而保护细胞结构^[16]。而以上的研究为我们进一步探讨苦参碱减少IRI、保护小体积移植肝功能的具体机制提供了思路。

总之,本实验在大鼠30%的小体积肝移植模型的基础上,采用术前给予苦参碱药物干预的方法,通过1 wk生存率统计,肝脏酶学指标和炎症因子表达水平的检测以及光镜和电镜观察肝细胞和肝窦内皮细胞形态,阐明了苦参碱对于小体积肝移植术后移植肝IRI具有良好的保护作用。实验结果为进一步研究苦参碱在小体积肝移植“小肝综合征”防治中的应用奠定了理论基础。

4 参考文献

1 Lin W, Zhang JP, Hu ZL, Qian DH. Inhibitory effect

- of matrine on lipopolysacchride-induced tumor necrosis factor and interleukin-6 production from rat Kupffer cells. *Yaoxue Xuebao* 1997; 32: 93-96
- 2 Zhang JP, Zhang M, Zhou JP, Liu FT, Zhou B, Xie WF, Guo C. Antifibrotic effects of matrine on in vitro and in vivo models of liver fibrosis in rats. *Acta Pharmacol Sin* 2001; 22: 183-186
- 3 Man K, Lo CM, Ng IO, Wong YC, Qin LF, Fan ST, Wong J. Liver transplantation in rats using small-for-size grafts: a study of hemodynamic and morphological changes. *Arch Surg* 2001; 136: 280-285
- 4 Selzner N, Selzner M, Tian Y, Kadry Z, Clavien PA. Cold ischemia decreases liver regeneration after partial liver transplantation in the rat: A TNF- α /IL-6-dependent mechanism. *Hepatology* 2002; 36: 812-818
- 5 Franco-Gou R, Peralta C, Massip-Salcedo M, Xaus C, Serafin A, Roselló-Catafau J. Protection of reduced-size liver for transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 1408-1420
- 6 Palmes D, Budny TB, Dietl KH, Herbst H, Stratmann U, Spiegel HU. Detrimental effect of sinusoidal overperfusion after liver resection and partial liver transplantation. *Transpl Int* 2005; 17: 862-871
- 7 Glanemann M, Eipel C, Nussler AK, Vollmar B, Neuhaus P. Hyperperfusion syndrome in small-for-size livers. *Eur Surg Res* 2005; 37: 335-341
- 8 Zhong Z, Schwabe RF, Kai Y, He L, Yang L, Bunzendahl H, Brenner DA, Lemasters JJ. Liver regeneration is suppressed in small-for-size liver grafts after transplantation: involvement of c-Jun N-terminal kinase, cyclin D1, and defective energy supply. *Transplantation* 2006; 82: 241-250
- 9 朱应乾,覃云,王茂旭,杜富波,刘厚东,李素芝.缺血预处理对高原大鼠肝脏缺血/再灌注损伤早期的影响. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 287-289
- 10 吕平,刘芳,王春友,姚忠,陈道达,田源,张锦辉,吴毅华.亚硝酸盐还原成一氧化氮保护肝脏对抗缺血再灌注损伤. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 346-350
- 11 梁廷波,郑树森,徐骁,范上达.两种不同方法的大鼠小体积肝移植模型建立比较. *中华肝胆外科杂志* 2004; 10: 320-322
- 12 叶晟,韩本立,董家鸿.大鼠系列减体积原位肝移植的实验研究. *肝胆外科杂志* 2003; 11: 220-223
- 13 Zhu XH, Qiu YD, Shi MK, Wu B, Zheng XG, Ding YT. Effect of matrine on cold ischemia and reperfusion injury of sinusoidal endothelial cells in rat orthotopic liver transplantation. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 169-174
- 14 Zhu XH, Qiu YD, Shen H, Shi MK, Ding YT. Effect of matrine on Kupffer cell activation in cold ischemia reperfusion injury of rat liver. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 1112-1116
- 15 Zhu X, Qiu Y, Shi M, Ding Y. Matrine protects sinusoidal endothelial cells from cold ischemia and reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation. *Ann Clin Lab Sci* 2003; 33: 216-225
- 16 Essani NA, Fisher MA, Jaeschke H. Inhibition of NF-kappa B activation by dimethyl sulfoxide correlates with suppression of TNF- α formation, reduced ICAM-1 gene transcription, and protection against endotoxin-induced liver injury. *Shock* 1997; 7: 90-96

■同行评价

本研究内容新颖,实验对照设计合理,统计学方法恰当,符合伦理学要求,具有较好的可读性。

编辑 李军亮 电编 吴鹏联