

亚低温对肝脏缺血再灌注损伤的防护作用研究

叶啟发 胡龙 夏志平 王伟 王彦峰 熊艳 涂强

【摘要】 目的 研究亚低温预处理对肝脏缺血再灌注损伤的防护作用。方法 雄性 BALB/c 小鼠(8 周大小, $n = 15$) 随机分成 3 组。缺血再灌注组:5 只小鼠夹闭肝脏门静脉和肝动脉第三分叉以上血管, 肝脏在常温下($37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) 缺血 35 min 再灌注 24 h。亚低温预处理组:5 只小鼠肝脏缺血再灌注前亚低温($32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) 预处理 2 h。假手术组:5 只小鼠开腹和肝脏操作与缺血再灌注组相同但是没有夹闭血管。检测各组血浆谷氨酸氨基转移酶(AST)和天门冬氨酸氨基转移酶(ALT)变化、肝脏组织病理变化及细胞凋亡情况。检测亚低温 2 h 后冷诱导 RNA 结合蛋白(CIRP)的表达。结果 实验显示亚低温预处理组 ALT 和 AST 平均值明显低于缺血再灌注组。病理检测显示亚低温预处理组肝细胞水肿程度明显低于缺血再灌注组。凋亡检测显示缺血再灌注组凋亡细胞数量明显高于亚低温预处理组凋亡细胞数。蛋白免疫印迹试验显示肝脏 CIRP 的表达在小鼠亚低温 2 h 后逐渐升高。结论 亚低温预处理对肝脏缺血再灌注损伤具有预防保护作用, CIRP 可能参与其中。

【关键词】 亚低温; 肝脏缺血再灌注损伤; 冷诱导 RNA 结合蛋白

Moderate hypothermia reduces hepatic ischemia-reperfusion injury Ye Qifa, Hu Long, Xia Zhiping, Wang Wei, Wang Yanfeng, Xiong Yan, Tu Qiang. Department of Transplantation, Third Xiangya Hospital of Zhongnan University; Institute of Hepatobiliary Diseases, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Changsha, Hunan 410013, China

Corresponding author: Ye Qifa, Email: yqf_china@163.com

【Abstract】 **Objective** To explore the effect of moderate hypothermia (MH) in liver ischemia-reperfusion (IR) injury. **Methods** Male BALB/c mice (8 weeks old, $n = 15$) were randomly divided into three groups; IR group: five mice subjected to 70% hepatic IR (hepatic vascular triad above the bifurcation occlusion for 35 min before 24 h reperfusion) in normal temperature condition ($37 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$); MH + IR group: five mice were treated with MH ($32 \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) for 2 h before 70% hepatic IR was performed; sham group: the other five mice were subjected to laparotomy and liver manipulations without vascular occlusion. AST and ALT in plasma were detected in all mice, and the morphological changes, cell apoptosis and the cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) expression after MH in liver tissues were detected. **Results** Compared with IR group, the ALT and AST levels in MH + IR group were significantly decreased. In IR group, the liver morphology deteriorated with more severe hydropic degeneration and more cell apoptosis. In MH + IR group, the expression of CIRP began to increase after MH preconditioning. **Conclusion** MH preconditioning could protect against the liver ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 Moderate hypothermia; Hepatic ischemia-reperfusion injury; Cold-inducible RNA-binding protein

缺血再灌注损伤是肝脏手术面临的重要问题, 在肝移植和肝切除手术中更易出现。目前, 由于供体短缺导致扩大标准供体的利用逐渐增多。这种情况使供肝更容易遭受缺血再灌注损伤, 从而影响供

体的功能及存活^[1]。在缺血再灌注期间, Kupffer 细胞和迁徙性中性粒细胞释放前炎症因子进入循环系统。这些因子不但介导了一个复杂的级联炎症反应并且可触发活性氧的产生从而影响细胞的氧化还原状态^[3-4]。亚低温能够防止或改善再灌注相关的 DNA 损伤、脂质过氧化和白三烯的产生^[5-6]。另外, 亚低温还能阻断细胞凋亡途径^[7]。

自从研究首次证明温和亚低温($32 \sim 35\text{ }^{\circ}\text{C}$)对缺血再灌注后神经元细胞损伤的效果以来^[8], 迄今已有很多研究证实温和的亚低温能够防止脑外伤后

DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-8118.2015.08.012

基金项目:中央高校基本科研基金(303274022);国家自然科学基金(U1403223)

作者单位:410013 长沙,中南大学湘雅三医院器官移植科(叶啟发、胡龙、夏志平、王伟);武汉大学中南医院肝胆疾病研究院(叶啟发、王彦峰、熊艳、涂强)

通信作者:叶啟发,电子邮箱:yqf_china@163.com

心脏停跳、爆发性肝炎和器官衰竭的发生^[9-14]。为此,我们研究观察了温和亚低温预处理对小鼠肝脏缺血再灌注的保护作用。

材料与方 法

1. 动物: BALB/c 小鼠(8 周大小)从武汉大学动物实验中心(国家 A3 实验室,武汉)获取并且饲养。用于本实验的所有动物均经中南大学伦理委员会同意。

2. 材料和仪器: ALT 和 AST 检测试剂盒购于南京建成公司。凋亡试剂盒购于 Roche 公司。免疫印迹实验冷诱导 RNA 结合蛋白(cold-inducible RNA-binding protein, CIRP)一抗、二抗和 β -肌动蛋白(β -actin)购于 Boster 公司。组织裂解液(RIPA)购于碧云天公司。光学显微镜购于 OLYMPUS 公司。低速离心机购于湘仪公司。酶标仪购于北京普天公司。

3. 小鼠肝脏缺血再灌注模型的建立及实验分组: BALB/c 小鼠(20~25 g)随机分 3 组,每组 5 只: 缺血再灌注组、亚低温预处理组、假手术组。动物 1% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉(50 mg/kg)。小鼠缺血再灌注模型的建立参考 Kim 等^[17-18]的报道进行。小鼠固定于 37 °C 加热板上,行腹中线纵行切口暴露肝脏。用微小动脉夹将肝脏第三分叉以上的肝动脉和门静脉夹闭,使肝中叶和左叶缺血。肝脏保持在原位并在其表面覆盖生理盐水湿纱布。小鼠的体温用加热板维持在 37 °C,35 min 后松开动脉夹,造成 70% 肝脏的缺血再灌注模型。亚低温预处理组缺血再灌注前将小鼠麻醉后置于 32 °C 的环境中使小鼠体温维持在 32 °C 2 h。小鼠恢复体温到 37 °C 后,再实施肝脏的缺血再灌注。假手术组小鼠除了未夹闭肝脏动静脉外,其他操作与缺血再灌注组相同。再灌注 24 h 后,获取各组小鼠肝脏组织标本、血液标本做分子生物学检测。

4. 检测项目: (1) 血 ALT 和 AST 检测: 用采血管取血 1 ml,于低速离心机中离心(2000 转 15 min)取血清,按照南京建成公司转氨酶试剂盒中说明书进行操作,并且在酶标仪中 340 nm 处读取 OD 值,推测 ALT 和 AST 的改变。(2) 肝脏组织病理学检测: 肝脏组织 10% 甲醛固定后,做成 HE 切片,在光学显微镜下观察肝小叶及肝细胞变化情况。(3) 肝组织细胞凋亡检测: 各组标本获取后用甲醛固定后,按照 Roche 公司 TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labelling) 凋亡试剂盒中说明书的流程操作。切片用乙醇和二甲苯脱

蜡,在抗原修复液(0.1 mol/L, pH6.0)中洗约 5 min,用 3% 的过氧化氢清除内源性的过氧化物酶。切片浸没在 TUNEL 反应液中在 37 °C 下孵育 1 h。封闭后切片中加入过氧化物酶在 37 °C 条件下静置 30 min 后用 DAB 试剂盒进行染色。最后,在光学显微镜 400 倍放大倍数下盲选 10 个视野观察切片中凋亡细胞的数量。(4) 亚低温 2 h 后肝脏组织 CIRP 表达的检测: 采用蛋白免疫印迹法。肝脏组织获取后迅速放入液氮中。称取 100 mg 肝组织加入 1 ml 裂解液进行碾磨,离心后取上清。大约 30 mg 的蛋白加入 SDS-PAGE(10%)分离胶中进行电泳分离,转印到 PVDF 膜上。用 5% 的脱脂牛奶在常温下封闭 2 h, CIRP 一抗(1: 1 000)和 β -actin 4 °C 孵育过夜(>15 h)。二抗常温下孵育 2 h,用 ECL 在暗室中显影。

5. 统计学处理: 采用 SPSS 19.0 统计学软件。所得结果采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。先进行单因素方差分析再进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组血清 ALT 和 AST 比较: 与假手术组中 ALT(70 ± 6 U/L, $n = 5$) 和 AST(40 ± 5 U/L, $n = 5$) 比较,缺血再灌注组 ALT(269 ± 4 U/L, $n = 5$) 和 AST(163 ± 20 U/L, $n = 5$) 明显增高($P < 0.05$)。这表明肝脏缺血再灌注 35 min 能明显损伤肝功能。与缺血再灌注组比较,亚低温组 ALT(241 ± 9 U/L, $n = 5$) 和 AST(92 ± 11 U/L, $n = 5$) 明显减低($P < 0.05$)。这表明亚低温预处理对肝脏缺血再灌注具有保护作用。

2. 各组肝组织病理改变: 假手术组病理切片检测可见肝脏小叶结构正常,没有水肿及坏死。亚低温预处理组可见少数肝细胞水样变性,而缺血再灌注组则可看见明显的肝细胞水样变性(图 1)。肝组织病理检测与肝功能结果相符合,说明亚低温预处理对肝脏缺血再灌注具有保护作用(图 1)。

3. 各组肝组织中细胞凋亡情况: 缺血再灌注组细胞凋亡数(4.6 ± 1.7 , 10 个视野,放大 400 倍)显著多于假手术组(0.7 ± 0.5),差异有统计学意义($P < 0.05$);亚低温预处理组细胞凋亡数(0.8 ± 0.4)显著少于缺血再灌注组,差异亦有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

4. 亚低温 2 h 后 CIRP 蛋白的表达: 小鼠亚低温 2 h 后肝组织中 CIRP 蛋白表达较正常肝组织明

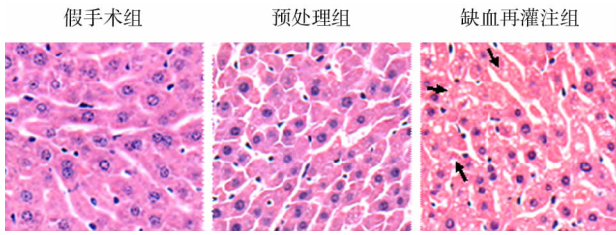
显增高。由此推断 CIRP 蛋白在亚低温保护肝脏的过程中可能起到重要的作用(图 3)。

讨 论

本实验的主要发现有:(1)亚低温预处理对缺血再灌注具有保护作用;(2)CIRP 蛋白在亚低温保护缺血再灌注过程可能扮演着重要的作用。

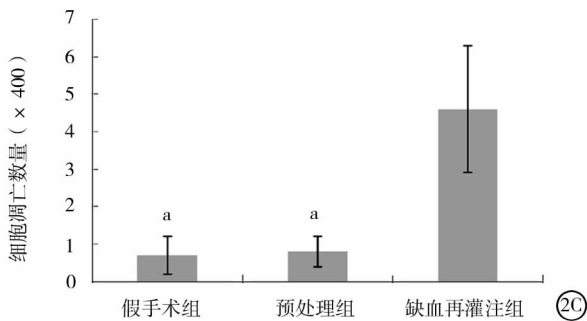
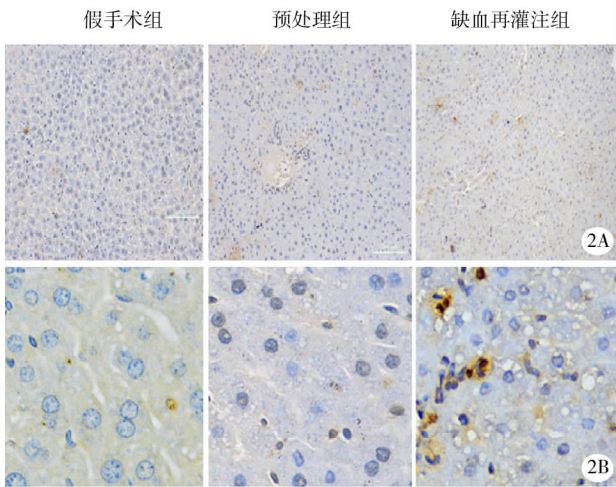
不管是在肝移植手术还是在供体肝的保存过程中,缺血再灌注损伤均为急需解决的问题。特别是边缘性供肝的使用增多,使得肝移植或供肝保存过程更易遭受到缺血再灌注损伤。缺血再灌注损伤的病理生理改变包括先天性免疫系统的激活、活性氧的释放和肝细胞的损伤^[19]。目前的研究显示很多因素可以减轻缺血再灌注损伤,例如氮氧化物-2 抑制剂、 α -生育酚、植物抗氧化剂、线粒体渗透性转换抑制剂等^[3,11,20-23]。但是,调查显示目前使用最普遍的对缺血再灌注损伤有预防保护作用的预处理方法是缺血预处理,亦即在真正缺血之前使肝脏处于一个短暂的缺血状态^[24]。查阅文献我们发现:亚低温能够干扰细胞凋亡途径,抑制缺血再灌注过程中的有害刺激,抑制缺血介导的炎症反应和减少炎症因子释放。而且,深度的亚低温($<30\text{ }^{\circ}\text{C}$)比温和的亚低温有更多的负面作用^[8]。为此,在本实验,我们采用温和和亚低温($32\text{ }^{\circ}\text{C}$)作为预处理手段,研究其对肝脏缺血再灌注的保护作用。研究显示,亚低温预处理组 AST 和 ALT 平均值明显低于缺血再灌注组,由此可以推测亚低温预处理对肝脏肝功能具有一定的保护作用。为了进一步证明亚低温对肝脏缺血再灌注的保护作用,我们还做了肝组织的病理切片检测。结果显微镜下观察各组均未发现有细胞的坏死。由此我们推断缺血再灌注 35 min 并不足以引起肝细胞的坏死,这个发现与肝脏具有强大的代偿功能相符合。本文亚低温预处理组中细胞水样变性的数量和面积明显少于缺血再灌注组,且与肝功能检测结果相符合。这说明亚低温预处理对肝脏缺血再灌注具有保护作用。而且肝组织细胞凋亡检测结果亦显示亚低温预处理组细胞凋亡数量明显少于缺血再灌注组。这进一步证明了亚低温预处理对肝脏具有保护作用。

哺乳动物细胞在亚低温环境下蛋白的合成下降,但是亦会导致少量冷休克蛋白的合成增加,冷诱导 RNA 结合蛋白就是其中一种。已有研究表明 CIRP 能保护细胞免受遗传毒性应激、肿瘤坏死因子、隐睾症带来的损伤^[25-27]。还有研究表明 CIRP 对睾丸缺血再灌注具有保护作用^[16,28]。我们的研究显示小鼠在亚低温 2 h 后肝脏 CIRP 的表达逐渐



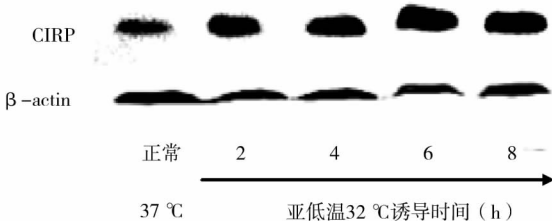
缺血再灌注组肝细胞水样变性明显多于假手术组和亚低温预处理组;假手术组和预处理组中没有明显的水样变性(箭头所示)。三组中均未发现肝细胞坏死(HE $\times 400$)

图 1 各组小鼠肝组织病理切片



2A 放大 200 倍,2B 放大 400 倍;2C 为各组肝组织在 400 倍显微镜下 10 个视野观察到的细胞凋亡数均数。^a与缺血再灌注组比较, $P < 0.05$

图 2 各组小鼠肝组织中细胞凋亡的比较



注:CIRP:冷诱导 RNA 结合蛋白; β -actin: β -肌动蛋白

图 3 亚低温条件下小鼠肝脏冷诱导 RNA 结合蛋白的表达

升高,由此我们推断 CIRP 可能参与了亚低温对肝脏缺血再灌注的保护作用。

参 考 文 献

- [1] Pratschke SI, Eder M, Heise M, et al. Protocol TOP-study (tacrolimus organ perfusion): a prospective randomized multicenter trial to reduce ischemia reperfusion injury in transplantation of marginal liver grafts with an ex vivo tacrolimus perfusion [J]. *Transplant Res*, 2013, 2(1):3.
- [2] Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(8):891-902.
- [3] Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 284(1):15-26.
- [4] Jaeschke H. Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning [J]. *J Invest Surg*, 2003, 16(3):127-140.
- [5] Globus MY, Busto R, Lin B, et al. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intraischemic brain temperature modulation [J]. *J Neurochem*, 1995, 65(3):1250-1256.
- [6] Dempsey RJ, Combs DJ, Maley ME, et al. Moderate hypothermia reduces postischemic edema development and leukotriene production [J]. *Neurosurgery*, 1987, 21(2):177-181.
- [7] Povlishock JT, Buki A, Koizumi H, et al. Initiating mechanisms involved in the pathobiology of traumatically induced axonal injury and interventions targeted at blunting their progression [J]. *Acta Neurochir Suppl*, 1999, 73:15-20.
- [8] Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia [J]. *Crit Care Med*, 2009, 37(7):186-202.
- [9] Fröhlich MI, Hildebrand F, Weuster M, et al. Thermia reduces the hepatic inflammatory response in a swine multiple trauma model [J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2014, 76(6):1425-1432.
- [10] Leonov Y, Sterz F, Safar P, et al. Moderate hypothermia after cardiac arrest of 17 minutes in dogs: effect on cerebral and cardiac outcome: a preliminary study [J]. *Stroke*, 1990, 21(11):1600-1606.
- [11] Leonov Y, Sterz F, Safar P, et al. Mild cerebral hypothermia during and after cardiac arrest improves neurologic outcome in dogs [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 1990, 10(1):57-70.
- [12] Chatauret N, Zwingmann C, Rose C, et al. Effects of hypothermia on brain glucose metabolism in acute liver failure: a H/C-nuclear magnetic resonance study [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125:815-824.
- [13] Vaquero J, Blei AT. Mild hypothermia for acute liver failure: a review of mechanisms of action [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2005, 39(4):S147-157.
- [14] Sakurai T, Kudo M, Watanabe T, et al. Hypothermia protects against fulminant hepatitis in mice by reducing reactive oxygen species production [J]. *Dig Dis*, 2013, 31(5-6):440-446.
- [15] Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, et al. Cirp protects against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via activation of extracellular signal-regulated kinase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(3):290-295.
- [16] Xia ZP, Zheng XM, Zheng H, et al. Downregulation of cold-inducible RNA-binding protein activates mitogen-activated protein kinases and impairs spermatogenic function in mouse testes [J]. *Asian J Androl*, 2012, 14(6):884-889.
- [17] Kim J, Kim M, Song JH, et al. Endogenous A1 adenosine receptors protect against hepatic ischemia reperfusion injury in mice [J]. *Liver Transpl*, 2008, 14(6):845-854.
- [18] 刘平果, 李敏, 王效民, 等. 甲状腺素预处理对 Pringle 法诱导小鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2013, 17(7):593-594.
- [19] Jiang WW, Kong LJ, Ni QF, et al. miR-146a ameliorates liver ischemia/reperfusion injury by suppressing IRAK1 and TRAF6 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7):e101530.
- [20] Theruvath TP, Zhong Z, Padiaditakis P, et al. Minocycline and N-methyl-L-isoleucine cyclosporin (NIM811) mitigate storage/reperfusion injury after rat liver transplantation through suppression of the mitochondrial permeability transition [J]. *Hepatology*, 2008, 47(1):236-246.
- [21] Zhong Z, Ramshesh VK, Rehman H, et al. Activation of the oxygen-sensing signal cascade prevents mitochondrial injury after mouse liver ischemia-reperfusion [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008, 295(4):823-832.
- [22] Hassan-Khabbar S, Cottart CH, Wendum D, et al. Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery [J]. *Liver Transpl*, 2008, 14(4):451-459.
- [23] Marubayashi S, Dohi K, Ochi K, et al. Role of free radicals in ischemic rat liver cell injury: prevention of damage by alpha-tocopherol administration [J]. *Surgery*, 1986, 99(2):184-192.
- [24] Jaeschke H, Woolbright BL. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species [J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2012, 26(2):103-114.
- [25] Artero-Castro A, Callejas FB, Castellvi J. Cold-inducible RNA-binding protein bypasses replicative senescence in primary cells through extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 activation [J]. *Mol Cell Biol*, 2009, 29(7):1855-1868.
- [26] Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, et al. Cirp protects against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via activation of extracellular signal-regulated kinase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1763(3):290-295.
- [27] Zhou KW, Zheng XM, Yang ZW, et al. Overexpression of CIRP may reduce testicular damage induced by cryptorchidism [J]. *Clin Invest Med*, 2009, 32(2):103-111.
- [28] Xia Z, Jiang K, Liu T. The protective effect of Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) on testicular torsion/detorsion: an experimental study in mice [J]. *J Pediatr Surg*, 2013, 48(10):2140-2147.

(收稿日期:2015-02-18)