

2.3 肝组织病理学改变 光镜下,A组大鼠的肝组织细胞结构完整,排列整齐,着色均匀,细胞没有明显水肿,无变性坏死,肝细胞间质未见炎性细胞浸润;B组可见大量肝细胞明显水肿,中央静脉周围

的肝细胞片状坏死伴有核固缩及炎性细胞浸润,肝血窦淤血;C组大鼠肝组织细胞轻中度水肿,坏死范围较B组小,呈灶状或点状坏死,间质中仅有少量炎性细胞浸润。见图1。

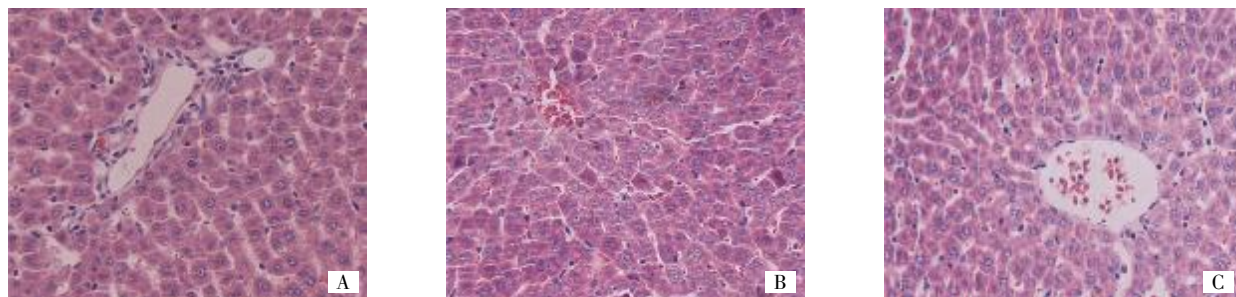


图1 术后12h3组大鼠肝组织形态学改变(HE,×200)

Fig 1 The pathological changes of liver in A, B and C groups(HE,×200)

3 讨论

由于大鼠肝脏移植模型手术操作复杂,创伤较大,病死率较高,所以常用大鼠在体缺血再灌注模型来代替肝移植模型。本研究以冷缺血再灌注模型代替肝移植模型,研究雷帕霉素对肝损伤的保护作用。该模型的优点在于既可以模拟肝移植手术供肝的冷缺血再灌注过程,也可以保持门静脉、下腔静脉和胆管的完整性,操作较简单,术后并发症少,存活率高。

在肝脏冷灌注的过程中缺血缺氧可以引起肝窦水肿、肝细胞水肿及气球样变,并造成肝脏微循环紊乱;复灌后,Kupffer细胞被激活从而释放大量的氧自由基、一氧化氮(NO)和TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎性细胞因子,这些物质入血可导致白细胞尤其中性粒细胞的聚集、黏附、渗出,从而引起局部及全身的炎性损伤,加剧肝脏损害^[4]。TNF- α 是缺血再灌注后炎症反应的核心因子之一,能诱导多种炎症介质的基因表达,从而加重炎症反应^[5]。IL-6可诱导B细胞增殖分化,还可激活T细胞并诱导细胞毒T淋巴细胞增殖和分化,加强白细胞聚集,增强粒细胞抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用从而加重肝损伤。当器官从缺血状态再迅速恢复有氧状态时,会产生活性氧(ROS),与膜多不饱和脂肪酸稳定结合,导致脂质过氧化,扰乱膜流动性,破坏细胞结构,致使组织损伤。SOD是生物体内重要的抗氧化酶,也是体内清除ROS的首要物质,可以对抗及阻断因氧自由基而对细胞造成的损害,并及时修复受损的细胞、复原因自由基造成的细胞伤害,其活性的高低可间接反映机体清除氧自由基的能力。无肝期下腔静脉被完全阻断,导致重要脏器灌注不足,产生的内毒素通过淋巴途径进入血液循环,内毒素在血中形

成脂多糖结合蛋白复合物,炎性细胞大量释放TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等炎性细胞因子,加剧诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的产生^[6],导致NO水平过度升高,使细胞膜发生脂质过氧化反应,膜完整性被破坏,造成肝组织损伤^[7]。

RAPA是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)特异性抑制剂^[8]。mTOR整合细胞外信号,通过多种途径控制转录和翻译过程,对细胞的增殖和分化产生中心调控点作用^[9-10]。RAPA对大鼠缺血再灌注损伤的保护机制为通过抑制mTOR信号通路下游分子p70S6K活性,阻止细胞由G1期向S期转化,抑制细胞增殖,降低iNOS mRNA的稳定性,进而减少细胞内NO的生成^[11],从而抑制炎症过程的启动、进展,降低炎症细胞因子TNF- α 、IL-6的表达水平,还可通过减少NO的生成及提高SOD的活性来抑制细胞膜脂质过氧化反应,产生抗氧化应激的作用。

本研究结果显示,术前给予雷帕霉素组大鼠血清中炎性细胞因子TNF- α 和IL-6的含量降低;肝组织中SOD的活性明显增强,表明术前给予雷帕霉素可清除缺血再灌注过程中产生的ROS,产生抗氧化应激的作用;反映肝功能状态的ALT、AST浓度也明显下降,表明肝功能有所改善;此外肝脏组织的病理学改变明显减轻,炎性渗出液减少,肝细胞水肿坏死程度及范围明显减轻。

综上所述,术前给予雷帕霉素表现出明显的抗氧化和抗炎的作用,可改善肝脏功能,减轻大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤。

参考文献:

- [1] Romanque U P, Uribe M M, Videla L A. Molecular mechanisms in liver ischemic reperfusion injury and ischemic preconditioning[J]. Rev Med Chil, 2005, 133(4):469

(下转第187页)

3 讨论

社区获得性呼吸窘迫综合征毒素是最近几年发现的肺炎支原体体内的唯一的毒力因子,与百日咳毒素的 S1 亚基拥有非常相近的氨基酸序列。CARDs TX 不仅具有 ADP 核糖化作用,而且还有空泡形成毒性,参与到肺炎支原体的整个致病过程中,是肺炎支原体的重要致病因子。

CARDs TX 是一个分子量大小为 68 kDa, 由肺炎支原体 MPN 372 基因编码^[9]。肺炎支原体在转录和翻译过程中以 UGA 为色氨酸的密码子,而我们知道 UGA 在其他的生物体内是终止密码子,并且在 MPN 372 基因序列中有 8 个 UGA 密码子^[9]。因此该基因要想在其他生物体内完全表达必须要将 U-GA 突变成 UGG。

我们以肺炎支原体 MAC 基因组为模板,将 MPN 372 基因扩增出来,将扩增产物克隆入 pET28 α 后进行 8 次点突变,获得可以在 BL21 内完整表达的重组质粒。在 IPTG 的诱导下, BL21 大量表达出 CARDs TX, 我们利用亲和层析技术将 CARDs TX 蛋白成功纯化出来,由图 2 D 可知,纯化蛋白获得率很高且蛋白很纯,很少有其他蛋白的污染。在对蛋白复性的研究中,我们分别利用尿素梯度透析复性法和扩大体积透析复性法对目的蛋白进行复性。结果发现,利用尿素梯度透析法复性时,在复性的最后阶段即将复性蛋白液置于 0 mol/L 尿素溶液中时产生大量沉淀(图 3 A),而利用扩大体积透析法进行复性时很少发现沉淀的产生,因此,初步确定扩大体积透析法在本研究中比尿素梯度透析复性法更有利于蛋白的成功复性。

综上所述,我们成功构建出 pET28 α -CARDs TX 重组质粒,且成功得到 CARDs TX 蛋白,为更深入地研究肺炎支原体的致病机制和 CARDs TX 的生物学功能奠定了基础。

参考文献:

- [1] 袁壮, 陆权, 万莉雅, 等. 肺炎支原体肺炎的诊治[J]. 中国实用儿科杂志, 2008, 23(8): 561
- [2] Waites K B, Talkington D F. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen[J]. Clin Microbiol Rev, 2004, 17(4): 697
- [3] 王晓芳, 洪建国. 肺炎支原体与哮喘的关系[J]. 中国实用儿科杂志, 2009, 24(8): 648
- [4] 张永明, 刘秀云. 肺炎支原体肺炎及其并发症的诊治进展[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(4): 358
- [5] Kannan T R, Coalson J J, Cagle M, et al. Synthesis and distribution of CARDs toxin during mycoplasma pneumoniae infection in a murine model[J]. J Infect Dis, 2011, 204(10): 1596
- [6] 刘洋, 李敏, 徐佩茹. 肺炎支原体肺炎发病机制研究进展 [J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(2): 196
- [7] Hu P C, Collier A M, Baseman J B. Interaction of virulent *Mycoplasma pneumoniae* with hamster tracheal organ cultures [J]. Infect Immun, 1976, 14(1): 217
- [8] Techasaensiri C, Tagliabue C, Cagle M, et al. Variation in colonization, ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin, and pulmonary disease severity among *Mycoplasma pneumoniae* strains [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 182(6): 797
- [9] Kannan T R, Baseman J B. ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of *Mycoplasma pneumoniae* represents unique virulence determinant among bacterial pathogens [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(17): 6724
- [10] Kannan T R, Provenzano D, Wright J R, et al. Identification and characterization of human surfactant protein A binding protein of mycoplasma pneumoniae[J]. Infect Immun, 2005, 73(5): 2828
- [11] Johnson C, Kannan T R, Baseman J B. Cellular vacuoles induced by *Mycoplasma pneumoniae* CARDs toxin originate from Rab9-associated compartments[J]. PLoS One, 2011, 6(7): 308
- [12] Peters J, Singh H, Brooks E G, et al. Persistence of community-acquired respiratory distress syndrome toxin-producing *Mycoplasma pneumoniae* in refractory asthma[J]. CHEST, 2011, 140(2): 401

(2013-11-01 收稿)

+++++

(上接第 183 页)

- [2] Weichhart T, Saemann M D. The multiple facets of mTOR in immunity[J]. Trends Immunol, 2009, 30(5): 218
- [3] Nozato E, Shiraishi M, Miyaguni T, et al. In situ perfusion of the liver under portosystemic shunt in rats: A stable model of cold ischemia for orthotopic liver transplantation[J]. Transplant Proc, 1998, 30(7): 3718
- [4] 安伟, 刘军, 管冬诗, 等. 姜黄素对大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(1): 32
- [5] Jo S K, Sung S A, Cho W Y, et al. Macrophages contribute to the initiation of ischemic acute renal failure in rats[J]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21(5): 1231
- [6] Yüsek Y N, Kologlu M, Daglar G, et al. Intestinal ischemia-reperfusion injury augments intestinal mucosal injury and bacterial translocation in jaundiced rats[J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51(55): 171
- [7] Ginnan R, Guikema B J, Halligan K E, et al. Regulation of smooth

muscle by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase in vascular proliferative diseases[J]. Free Radic Biol Med, 2008, 44(7): 1232

- [8] Pignaturo G, Capone D, Polichetti G, et al. Neuroprotective, immunosuppressant and antineoplastic properties of mTOR inhibitors: current and emerging therapeutic options[J]. Curr Opin Pharmacol, 2011, 11(4): 378
- [9] Kawahara T, Asthana S, Kneteman N M. m-TOR inhibitors: what role in liver transplantation[J]. J Hepatol, 2011, 55(6): 1441
- [10] Iadevaia V, Huo Y, Zhang Z, et al. Roles of the mammalian target of rapamycin, mTOR, in controlling ribosome biogenesis and protein synthesis[J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(1): 168
- [11] Lisi L, Navarra P, Feinstein D L, et al. The mTOR kinase inhibitor rapamycin decreases iNOS mRNA stability in astrocytes[J]. J Neuroinflammation, 2011, 8(1): 1

(2013-10-23 收稿)

文章编号 1006-8147(2014)03-0181-03

论著

雷帕霉素对大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤的保护作用

徐倩¹, 杜洪印², 喻文立², 翁亦齐², 丁梅¹, 王玉亮³

(1.天津医科大学一中心临床学院麻醉科, 天津 300192; 2.天津市第一中心医院麻醉科, 天津 300192; 3.天津市卫生部危重病急救医学重点实验室, 天津 300384)

摘要 目的:评价雷帕霉素(RAPA)对大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤的影响。方法:健康雄性SD大鼠24只随机分为3组,每组8只。假手术组(A组)大鼠仅接受麻醉后开腹,游离肝叶及相关血管后关腹;对照组(B组)采用肝脏冷缺血再灌注模型,分别采用门静脉插管和肝下腔静脉缺口作为灌注道和流出道,用4℃乳酸林格氏液对肝脏进行冷灌注20 min;实验组(C组)大鼠术前连续3 d给予10 mg/(kg·d)雷帕霉素灌胃,手术操作同B组。3组大鼠均于再灌注24 h后经下腔静脉采血离心获取血清,测定血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)浓度及天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)的含量。取血后处死大鼠获取肝脏标本,用于检测肝组织中丙二醛(MDA)的含量及超氧化物歧化酶(SOD)的活性,光镜下观察肝组织病理学改变。结果:B、C组血清中TNF- α 和IL-6的浓度、AST、ALT的含量以及肝组织MDA的水平高于A组,而SOD活性降低($P<0.05$);C组除SOD活性比B组有所升高外,其余指标均低于B组($P<0.05$)。A组肝组织形态结构未见异常,B、C组均见肝细胞损伤,C组损伤较B组减轻。结论:术前给予RAPA能减轻大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤。

关键词 雷帕霉素;肝脏;缺血再灌注损伤;大鼠

中图分类号 R657.3

文献标志码 A

Effects of rapamycin on liver cold ischemia/reperfusion injury in rats

XU Qian¹, DU Hong-yin², YU Wen-li², WENG Yi-qi², DING Mei¹, WANG Yu-liang³

(1.Department of Anesthesiology, The First Central Clinical College, Tianjin Medical University, Tianjin 300192, China; 2.Department of Anesthesiology, The First Center Hospital of Tianjin, Tianjin 300192, China; 3.The Key Laboratory of Critical Care of Medicine Ministry of Health, Tianjin 300384, China)

Abstract Objective: To investigate the protective effects of rapamycin(RAPA) on liver cold ischemia/reperfusion injury in rats. **Methods:** Twenty-four healthy male SD rats were randomly divided into 3 groups. In sham operation group (A group), laparotomy was operated on anesthetized rats which only freed lobe and associated; Hepatic cold ischemia/reperfusion was performed in control group (B group), in which a pipe was put in the portal vein to perfuse the liver using 4℃ common Lactate Ringer's solution, and the perfusion was discharged through a gap of infrahepatic inferior vena cava. After 20 minutes, the interdiction was removed; Rats in RAPA group(C group) were continuously given RAPA lavage with a dose of 10 mg/(kg·d) three days before surgery, the same operation with group B. Blood samples were obtained from the inferior vena cava at 24 h of reperfusion to detect the levels of serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), AST and ALT. Livers of all rats in three groups were removed to determine malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) contents and examine the pathological changes in liver tissues (by light microscopy). **Results:** Compared with A group, the levels of serum TNF- α , IL-6, AST and ALT, and contents of MDA increased statistically in Groups B and C, and the SOD activity decreased ($P<0.05$). The SOD activity in Group C increased while other indices were lower than those in Group B ($P<0.05$). No significant pathological changes were found in liver tissues in Group A. The injuries in Groups B and C were obvious marked with the injury in Group C significantly mitigated compared to Group B. **Conclusion:** RAPA can attenuate liver cold ischemia/reperfusion injury.

Key words rapamycin; liver; ischemia/reperfusion injury; rat

肝脏缺血再灌注损伤是肝移植过程中不可避免的病理过程,影响患者术后肝脏功能的正常恢复,甚至可诱发原发性移植肝无功能从而导致患者死亡。研究表明,冷缺血再灌注损伤的机制与氧自由

基爆发、细胞内钙超载、炎症因子激活、中性粒细胞的浸润及细胞凋亡等密切相关^[1]。雷帕霉素是一种新型大环内酯类免疫抑制剂,临床上常用于抑制器官移植的排斥反应^[2],但是对缺血再灌注损伤的影响方面尚缺乏相关报道。本研究借助大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤的模型,通过观察血清中炎症因子含量、肝功能、肝组织氧化应激反应指标及肝组织病理改变,探讨雷帕霉素对大鼠肝脏冷缺血再灌注损

基金项目 天津市卫生行业重点攻关项目(12KG101);国家高技术研究发展计划项目(2012AA021001)

作者简介 徐倩(1986-),女,硕士在读,研究方向:缺血再灌注肺损伤;通信作者:杜洪印, E-mail: duhongyin@medmail.com.cn。

伤是否具有保护作用及其机制,从而为临床进一步防治肝移植术后并发症,提高术后生存率提供依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 雷帕霉素(成都雅途生物技术有限公司);TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒(北京四正柏公司);丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性试剂盒(南京建成生物工程有限公司);全自动生化分析仪(瑞士 Roche 公司);Microfuge 22R Centrifuge 离心机(美国 Beckman coulter 公司);RM2016 病理切片机(美国 Leica 公司)。

1.2 实验动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 24 只,购于中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心,动物合格证号 SCXK-(军)2007-004,8~10 周龄,体质量 200~250 g。

1.3 实验分组及模型的建立 动物随机分为 3 组,每组 8 只。所有动物术前 12 h 禁食,自由饮水。(1)假手术组(A 组):腹腔注射 5%的水合氯醛溶液(60 mg/kg)麻醉大鼠,腹部脱毛消毒,铺无菌手术单,做上腹部正中切口入腹,暴露肝脏离断肝周围韧带并钝性游离肝上下腔静脉,肝下下腔静脉,门静脉及肝固有动脉后逐层关闭腹腔;(2)对照组(B 组):麻醉方法及开腹操作同 B 组,参照 Nozato 等^[9]建立的大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤模型:用无损伤止血夹阻断门静脉,同时夹闭肝固有动脉,靠近右肾静脉水平阻断肝下下腔静脉从而阻断肝脏血流,在门静脉阻断部位上方用胰岛素针向肝脏内灌注 1 mL 含 30 U 肝素的常温生理盐水,使肝脏血流进入体循环,之后用无损伤止血夹靠近膈肌阻断肝上下腔静脉,此时进入无肝期计时。于门静脉阻断水平以上插入连接灌注液的 1 mL 注射器针头(0.5 mm×25.0 mm)并用止血夹将其固定作为灌注通道,于肝下下腔静脉阻断以上部位穿刺插入 0.9 mm×25.0 mm 的留置针,拔出针芯并固定套管作为流出通道,之后经门静脉灌注通道持续滴注 4℃乳酸林格氏液灌注肝脏,维持滴速 6~8 mL/min,压力 10 kPa(1 kPa=7.5 mmHg),冷灌注时间 20 min,可见肝脏变至土黄色,触之冰凉。停止灌注后,拔出静脉内导管用 8-0 无损伤缝线沿血管方向缝合肝下下腔静脉流出口,棉球压迫门静脉穿刺点止血,依次开放门静脉、肝固有动脉、肝上下腔静脉和肝下下腔静脉恢复肝脏血流。用温生理盐水冲洗腹腔后逐层缝合腹部切口。(3)实验组(C 组):大鼠术前 3 d 连续给予 10 mg/(kg·d)雷帕霉素灌胃,每天灌胃 1 次。麻醉及手术操作同 B 组,按同样方法灌注后关腹。

1.4 样本的采集和观察指标的测定

1.4.1 血清炎症因子和肝功能检测 A 组于游离血管 24 h 后,B 和 C 组于再灌注 24 h 后经下腔静脉采血 3.5 mL,3 000 r/min 离心 10 min,留取上层血清,检测各组大鼠血清 ALT 和 AST 的浓度,并采用 ELISA 测定血清中 TNF- α 和 IL-6 的浓度。

1.4.2 肝组织氧化应激反应指标检测 采血后处死各组大鼠,获取肝脏组织标本制成组织匀浆,采用比色法测定肝组织匀浆中 MDA 的含量及 SOD 的活性以评价氧化应激的水平。

1.4.3 形态学检查 取部分肝组织用 10%甲醛溶液固定后常规石蜡包埋,切成 4 μ m 薄片,行苏木素-伊红(HE)染色后于光学显微镜下观察肝组织形态的改变。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,经过方差齐性检验各组数据方差齐,组间差异采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中炎症因子、肝功能指标水平 与 A 组相比,B、C 组大鼠再灌注后 24 h 血清 TNF- α 、IL-6、ALT 和 AST 的浓度均升高($P<0.05$);与 B 组相比,C 组上述指标均有所降低($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组大鼠血清炎症因子、肝功能指标水平的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Levels of TNF- α , IL-6, AST and ALT in A, B and C groups($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TNF- α / (ng/L)	IL-6/ (ng/L)	AST/ (mmol/L)	ALT/ (mmol/L)
A	8	138.71 \pm 5.27	102.33 \pm 3.43	197.15 \pm 7.21	77.36 \pm 4.77
B	8	283.89 \pm 6.79 ^a	232.90 \pm 2.57 ^a	557.20 \pm 9.01 ^a	149.38 \pm 6.51 ^a
C	8	201.93 \pm 8.28 ^{ab}	168.51 \pm 4.11 ^{ab}	369.17 \pm 8.13 ^{ab}	101.0 \pm 5.13 ^{ab}

与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$

2.2 肝组织氧化应激反应指标水平 与 A 组相比,B 组和 C 组大鼠再灌注后 24 h 肝组织匀浆中 MDA 含量升高,SOD 的活性降低($P<0.05$);与 B 组相比,C 组肝组织中 MDA 含量降低,而 SOD 活性升高($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组大鼠肝组织氧化应激反应指标 MDA、SOD 水平的比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 MDA level and SOD activity in liver tissue in A, B and C groups($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MDA/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)
A	8	19.35 \pm 2.54	4.34 \pm 0.18
B	8	35.57 \pm 2.33 ^a	2.58 \pm 0.34 ^a
C	8	26.17 \pm 3.26 ^{ab}	3.66 \pm 0.21 ^{ab}

与 A 组比较,^a $P<0.05$;与 B 组比较,^b $P<0.05$