

• 基础研究 •

肿瘤坏死因子 α 抗体对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用

杨雁灵 曹华梁 徐小平 岳树强

[摘要] 目的 探讨肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 抗体对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用。方法 雄性 SD 大鼠 120 只分为正常对照组(A组,40只)、缺血再灌注组(B组,40只)和 TNF- α 抗体处理组(C组,40只),于肝脏缺血 60 分钟(再灌注开始)及再灌注 1 h、3 h、6 h、12 h 后,检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、丙二醛(MDA)含量及观察肝组织病理学变化。结果 肝脏缺血再灌注后,肝脏瘀血明显,B组血清 ALT 和 MDA 含量均较 A 组明显增高($P < 0.01$);与 B 组相比,C组肝组织瘀血减轻,血清 ALT 和 MDA 含量明显降低($P < 0.01$)。结论 TNF- α 抗体可以抑制大鼠肝脏缺血再灌注所致的炎症反应,对缺血再灌注损伤有保护作用。

[关键词] 肿瘤坏死因子 α ;缺血再灌注;围手术期处理;大鼠

Protective effects of tumor necrosis factor α antibody on liver ischemia reperfusion injury in rats YANG Yan-ling, CAO Hua-liang, XU Xiao-ping, et al. Department of Hepatobiliary Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China

[Abstract] Objective To study the protective effects of tumor necrosis factor α (TNF- α) antibody on liver ischemia reperfusion injury in rats. Methods 120 SD rats were randomly divided into three groups, the normal control group (Group A, $n = 40$), ischemia group (Group B, $n = 40$) and TNF- α antibody group (Group C, $n = 40$). After 60 minutes ischemia and followed reperfusion, the animals were killed at 0, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, serum concentration of alanine aminotransferase (ALT), malondialdehyde (MDA) was measured and liver histopathology was observed. Results After ischemia reperfusion, the serum concentration of ALT and MDA in Group B significantly increased ($P < 0.01$), and the hepatic congestion was obvious compared with Group A. Treatment of TNF- α antibody could significantly decrease serum concentration of ALT and MDA in Group C compared with Group B ($P < 0.01$), and relieve hepatic congestion. Conclusion TNF- α antibody can suppress the inflammatory reaction, and protect injury induced by hepatic ischemia reperfusion in rats.

[Key words] tumor necrosis factor α (TNF- α); ischemia reperfusion; perioperative management; rat

中图分类号:R657.3, R730.51 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2003)11-0664-02

肝脏对缺血缺氧非常敏感,肝脏缺血再灌注损伤是现代肝脏外科常见的病理过程。细胞因子是具有广泛生物学活性的多肽物质,具有重要免疫调节功能,在机体对疾病的防御及损伤修复过程中起着重要作用,但细胞因子产生过多又可导致或加重组织损害^[1]。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 是参与肝脏缺血再灌注损伤的重要细胞因子^[2],本研究采用 TNF- α 抗体,拟探讨其在肝脏缺血再灌注损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性 SD 大鼠 120 只,体重(230 \pm 20)g,由第四军医大学实验动物中心提供。TNF- α 单抗(武汉博士德公司),实验前用生理盐水 1:100 稀释。动物随机分为 3 组:①正常对照组(A组, $n = 40$,每时间点 8 只),只行假手术,给予开腹及暴露左、中肝叶肝蒂处

理,不阻断肝叶供血;②缺血再灌注组(B组, $n = 40$,每时间点 8 只),阻断入肝血流 60 min 后松开无创动静脉夹,恢复入肝血流,于所需时相点活杀动物取材;③ TNF- α 抗体组(C组, $n = 40$,每时间点 8 只),再灌注前 5 min 自阴茎背静脉注射稀释成 1 ml 的 TNF- α 单抗(2.0 mg/Kg)。各组动物分别在再灌注后 0、1 h、3 h、6 h、12 h 分批通过肝上下腔静脉取血约 2 ml,并取肝脏标本,之后处死。

1.2 模型制备 术前动物禁食 12 h,自由进水,戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔内注射麻醉后取上腹部正中切口,切开腹壁各层,显露第一肝门部,暴露肝脏左、中叶之肝蒂,离断肝至横膈及腹壁的韧带,用无损伤血管夹将供应肝左叶、中叶血的门静脉和肝动脉分枝阻断 60 min,使约 70% 的肝脏缺血,以防止发生严重肠系膜静脉淤血,然后取下血管夹恢复肝脏血供。

1.3 血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、丙二醛(MDA)的检测 将血液标本注入离心管,静置 20 min,2000 r/min 离心 10 min,提取血清标本, - 80℃ 保存。用全自动生化分析仪检测血清 ALT 水平,MDA 检测采用 Mourek 介绍的方法^[3],试剂盒购自南京聚力生物医学工程研究所。

作者单位:1. 710032 陕西西安市,第四军医大学西京医院肝胆外科(杨雁灵、岳树强);2. 710003 陕西西安市,西安市中心医院普通外科(曹华梁);3. 510282 广东广州市,第一军医大学珠江医院普通外科(徐小平)。作者简介:杨雁灵(1974-),男,湖北应城市人,博士,主治医师,主要研究方向:器官移植和普外科基础。

1.4 肝组织病理学变化的观察 切取新鲜肝组织,用 100g/L 的甲醛溶液固定 24h,按病理学常规制片,HE 染色,光学显微镜观察。

1.5 统计学处理 各实验组数据以($\bar{x}\pm s$)表达,并采用 SPSS 10.0 软件作统计学处理。

2 结果

表 1 大鼠血清 ALT 各时间点水平 (U/L)

组别	0	1 h	3 h	6 h	12 h
A	40.52±8.33	40.28±10.14	42.36±3.71	43.19±7.64	42.66±9.27
B	263.92±16.90 ^a	293.47±12.22 ^a	315.61±21.02 ^a	374.26±19.56 ^a	257.94±27.41 ^a
C	238.73±10.62 ^b	247.46±22.13 ^b	254.06±13.78 ^b	204.17±18.29 ^b	172.53±36.46 ^b

注:a:与 A 组相比, $P<0.01$;b:与 B 组相比, $P<0.01$ 。

表 2 大鼠血清 MDA 各时间点含量 (mmol/L)

组别	0	1 h	3 h	6 h	12 h
A	7.82±0.17	7.73±0.29	7.91±0.08	8.11±0.13	7.93±0.41
B	13.81±4.19 ^a	17.22±5.17 ^a	38.65±4.73 ^a	34.36±2.54 ^a	17.09±3.20 ^a
C	10.71±2.52 ^b	12.38±1.63 ^b	18.23±3.58 ^b	13.31±4.49 ^b	11.26±3.16 ^b

注:a:与 A 组相比, $P<0.01$;b:与 B 组相比, $P<0.01$ 。

大鼠肝左、中叶血流阻断 60 min 后再灌注 1 h,B 组肉眼见肝左、中叶较肝右叶明显肿胀,颜色发暗,HE 染色发现肝小叶结构紊乱、广泛肝细胞水肿、界限不清,并可见程度不等的空泡变性、水肿及少量灶状坏死。TNF- α 抗体处理组肉眼见肝左、中叶较肝右叶轻度肿胀,颜色与肝右叶比较无明显异常,染色见少量肝细胞水肿和空泡变性,未见片状或点状坏死。

3 讨论

TNF- α 主要由激活的巨噬细胞、内皮细胞、中性粒细胞及 B 淋巴细胞分泌,是具有多功能的多肽,它在炎症反应过程中起着较重要的作用^[4]。肝脏为体内最大的固定巨噬细胞池,是产生 TNF- α 的主要器官。肝脏富含 TNF- α 受体,是 TNF- α 作用的主要靶器官。TNF- α 通过多种机制诱导肝脏损伤^[5-7]。

本研究结果显示,大鼠肝脏缺血再灌注经 TNF- α 抗体处理后血清 ALT、MDA 明显降低,说明 TNF- α 抗体可以对大鼠缺血再灌注后肝脏起到保护作用。对于应用时最佳浓度以及其对全身免疫系统的影响,尚有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine-producing cells in reperfusion injury to the liver[J]. Semin Liv-

大鼠血清 ALT、MDA 各时间点水平见表 1、2。结果显示,B 组再灌注后各时间点血清 ALT、MDA 水平明显高于 A 组($P<0.01$)。再灌注后血清 ALT、MDA 水平逐渐升高,6h 后达到峰值,之后下降。而 C 组血清 ALT、MDA 水平明显低于 B 组($P<0.01$)。

er Dis,1999,19(2):171—187.

[2] Ben-Ari Z, Hochhauser E, Burstein I, et al. Role of anti-tumor necrosis factor-alpha in ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver in a blood-free environment[J]. Transplantation, 2002,73(12):1875—1880.

[3] Mourek J, Koudelova J. Adrenergic tocolytics—their effects on lipoperoxidation in the brain[J]. Ceska Gynekol,1997,62(1):15—18.

[4] Sack M. Tumor necrosis factor-alpha in cardiovascular biology and the potential role for anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in heart disease[J]. Pharmacol Ther, 2002,94(1—2):123—126.

[5] Ohkohchi N, Shibuya H, Tsukamoto S, et al. Kupffer's cells modulate neutrophil activity by superoxide anion and tumor necrosis factor delta in reperfusion injury of liver transplantation mechanisms of radical generation and reperfusion injury after cold ischemia[J]. Transplant Proc,1999,31(2):1055—1058.

[6] Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, et al. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning[J]. Free Radic Biol Med, 2002,33(9):1200—1208.

[7] Liu ZG, Han J. Cellular responses to tumor necrosis factor[J]. Curr Issues Mol Biol,2001,3(4):79—90.