



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.013
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.013
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(7):990-995.

· 基础研究 ·

牛磺熊去氧胆酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用

何宗全, 章安庆, 叶显道, 胡磊, 朱文俊

(安徽省铜陵市人民医院 肝胆一科, 安徽 铜陵 244000)

摘要

目的: 探讨牛磺熊去氧胆酸(TUDCA)抗大鼠肝脏缺血再灌注(HIRI)损伤的作用及机制。

方法: 将20只雄性SD大鼠随机均分为假手术组、TUDCA组、HIRI组、TUDCA+HIRI组, 分别行假手术、TUDCA+假手术、HIRI造模、TUDCA+HIRI造模; TUDCA(250 mg/kg)于术前1 h灌胃给予, HIRI造模采用Pringle法(缺血60 min, 再灌注12 h)。再灌注12 h后处死各组大鼠取材, 观察肝组织病理学改变, 检测血清谷丙转氨酶(ALT)水平, TUNEL法检测肝细胞凋亡, Western blot技术检测肝组织内质网应激分子糖调节蛋白78(GRP78)、p-真核细胞翻译起始因子2 α (p-eIF2 α)和C-EBP同源蛋白(CHOP)的表达。

结果: 除假手术组与TUDCA组外, HIRI组与TUDCA+HIRI组大鼠肝组织均出现明显肝损伤病理改变, 但TUDCA+HIRI组的损伤程度明显轻于HIRI组。与假手术组比较, HIRI组与TUDCA+HIRI组大鼠血清ALT水平明显升高, 肝细胞凋亡和内质网应激分子GRP78、p-eIF2 α 和CHOP蛋白水平均明显升高(均 $P<0.05$), 但TUDCA+HIRI组各项指标升高幅度均明显低于HIRI组(均 $P<0.05$); TUDCA组各项指标未见改变(均 $P>0.05$)。

结论: TUDCA有抗大鼠肝HIRI的作用, 其机制可能与抑制内质网应激反应有关。

关键词

肝; 再灌注损伤; 凋亡; 内质网应激
中图分类号: R657.3

Protective effect of tauroursodeoxycholic acid against hepatic ischemia reperfusion injury in rats

HE Zongquan, ZHANG Anqing, YE Xiandao, HU Lei, ZHU Wenjun

(First Department of Hepatobiliary Surgery, Tongling People's Hospital, Tongling, Anhui 244000, China)

Abstract

Objective: To investigate the protective effect of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA) against hepatic ischemia reperfusion injury (HIRI) in rat and the mechanism.

Methods: Twenty male SD rats were equally randomized into sham operation group, TUDCA group, HIRI group and TUDCA plus HIRI group, and underwent sham operation, TUDCA treatment plus sham operation, HIRI model induction, and TUDCA treatment plus HIRI model induction, respectively. TUDCA (250 mg/kg) was administered by gavage 1 h before operation, and HIRI rat model was induced by Pringle maneuver (60-min hepatic ischemia followed by 12-h reperfusion). Rats in each group were sacrificed after 12-h reperfusion

基金项目: 安徽省铜陵市卫生局科研资助项目(卫科研[2012]10)。

收稿日期: 2015-05-15; **修订日期:** 2015-06-14。

作者简介: 何宗全, 安徽省铜陵市人民医院副主任医师, 主要从事普外临床与基础方面的研究。

通信作者: 何宗全, Email: hezongquan@126.com

and the hepatic samples were collected; the pathological changes in liver tissues were observed, serum alanine aminotransferase (ALT) level was measured, apoptosis of hepatic cells was determined by TUNEL staining, and the proteins associated with endoplasmic reticulum (ER) stress which included glucose regulate protein 78 (GRP78), p-eukaryotic translation initiation factor-2 α (p-eIF2 α) and C-EBP response element binding protein (CHOP) were determined by Western blot analysis.

Results: Except in sham operation group and TUDCA group, the liver tissues in either HIRI group or TUDCA plus HIRI group presented the evident pathological changes associated with liver injury, but the degree of injury in TUDCA plus HIRI group was milder than that in HIRI group. Compared with sham operation group, the serum ALT levels, hepatic cell apoptosis and the protein expression levels of GRP78, p-eIF2 α and CHOP in liver tissues were significantly increased in both HIRI group and TUDCA plus HIRI group (all $P < 0.05$), but the increasing amplitudes of all these parameters in TUDCA plus HIRI group were significantly less than those in HIRI group (all $P < 0.05$); all the parameters in TUDCA showed no significant alteration (all $P > 0.05$).

Conclusion: TUDCA has protective effect against HIRI in rats, and the mechanism may probably be associated with its suppression of ER stress response.

Key words Liver; Ischemia Reperfusion Injury; Apoptosis; Endoplasmic Reticulum Stress

CLC number: R657.3

在肝外科手术中阻断肝脏血流后发生肝脏缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI) 是常见的病理现象, 也是造成肝外科手术患者并发症的重要原因之一^[1-2]。近年来, 尽管在HIRI临床和基础研究方面取得了一定的进展, 如发现氧化应激、炎症、内质网应激和细胞凋亡等相关的机理在HIRI中起重要作用, 但其确切机制及防治仍未解决, HIRI仍然是临床肝脏手术和疾病治疗过程中面临的棘手问题, HIRI严重者可能发生不可逆性的肝功能衰竭甚至全身多脏器功能衰竭^[3-6]。因此, 进一步研究HIRI分子机制并寻找新的药物是亟待解决的问题。临床研究和动物实验均已证实细胞凋亡在HIRI过程中起重要作用, 而内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 可介导肝脏细胞凋亡, 在肝脏疾病中发挥重要作用^[7-10]。本文拟在大鼠HIRI模型的基础上, 观察ERS抑制剂牛磺熊去氧胆酸 (tauroursodeoxycholic acid, TUDCA) 干预的作用, 并探讨ERS参与HIRI的相关机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性成年SD大鼠(250~300 g) 20只, 从安徽省实验动物中心购买。

1.1.2 实验试剂 内质网应激抑制剂TUDCA (滔

罗特) 购于意大利贝斯迪大药厂; ALT检测试剂盒从南京建成生物工程研究所购买; TUNEL凋亡检测试剂盒从Promega公司购买; 糖调节蛋白78 (glucose regulate protein 78, GRP78)、p-真核细胞翻译起始因子2 α (p-eukaryotic translation initiation factor-2 α , p-eIF2 α) 抗体从Cell Signaling公司购买, C-EBP同源蛋白 (C-EBP response element binding protein, CHOP) 抗体从Santa Cruz公司购买, ECL试剂盒从Thermo公司购买; 其它生化试剂均从Sigma公司购买或为国产分析纯。

1.2 实验方法

将SD大鼠随机分为假手术组、HIRI组、TUDCA组及TUDCA+HIRI组, 每组5只。所有动物在术前均禁食12 h, 自由饮水, 用戊巴比妥钠 (40 mg/kg) 经腹腔注射麻醉, 自阴茎背静脉注射肝素钠600 U, 固定动物后常规脱毛并消毒。在上腹部正中做约3 cm切口, 进入腹腔分离肝脏周围诸韧带, 暴露肝门部。(1) 假手术组: 仅在麻醉后剖腹牵拉分离肝十二指肠韧带, 在与HIRI组相同开腹时间后关腹。(2) HIRI组: 参照Pringle法制备模型, 游离肝周韧带后解剖肝门, 使用无创血管夹夹闭第一肝门以100%阻断入肝血流30 min, 再撤除血管夹以恢复肝脏血流, 最后关腹。(3) TUDCA组: 在肝脏假手术前1 h经灌胃单次给予TUDCA (250 mg/kg) 处理。

(4) TUDCA+HIRI组: 在HIRI手术前1h给予TUDCA处理。所有大鼠均于再灌注12 h后剖杀取材。收集血液和肝脏组织。

1.3 检测指标

1.3.1 肝脏的组织病理学观察 取受试动物部分肝脏, 置于4%多聚甲醛溶液中固定12 h。经梯度乙醇脱水和二甲苯透明后用石蜡进行包埋, 制备4 μm 连续切片, 用HE进行常规染色, 在光学显微镜下观察大鼠肝脏组织病理学变化并拍照。

1.3.2 血清肝功能水平检测 采集实验大鼠血样并分离血清, 按试剂盒说明书测定血清ALT水平, 以评价大鼠肝功能水平。

1.3.3 TUNEL检测 将肝脏石蜡切片脱蜡水化, 加平衡液进行平衡后, 再加TUNEL反应混合液于标本上, 置于湿盒中在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。浸入 $2 \times \text{SSC}$ 溶液中15 min以终止反应, 浸洗后封闭过氧化物酶, 接着进行酶标记反应30 min, 然后用DAB进行显色, 在苏木素复染后经梯度酒精脱水和二甲苯透明后用中性树胶封片。用光学显微镜观察肝脏切片凋亡情况并拍照。

1.3.4 Western blot检测蛋白表达 取部分肝脏用RIPA裂解液制备组织匀浆, 提取总蛋白用Western blot技术检测肝脏总蛋白GRP78、

p-eIF2 α 和CHOP蛋白水平。

1.4 统计学处理

所有计量资料均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TUDCA对大鼠HIRI的肝脏保护作用

HE染色结果显示, 假手术组和TUDCA组肝脏细胞及排列规律、肝细胞呈索状结构, 细胞无明显变性和坏死, 中央静脉和汇管区结构清晰(图1A、C); HIRI组肝细胞出现明显肿胀, 肝血窦存在明显淤血, 局部有炎性细胞浸润, 肝脏结构能见到明显破坏(图1B); 与HIRI组比较, TUDCA+HIRI组肝窦索结构较清晰, 肝脏淤血减轻, 肝小叶基本结构与正常接近(图1D)。

血清ALT检测结果如图2所示, 与假手术组比较, TUDCA组ALT水平无明显影响, HIRI明显升高ALT水平 ($P < 0.05$), 而与HIRI组比较, TUDCA干预明显降低了HIRI对ALT的升高作用 ($P < 0.05$)。

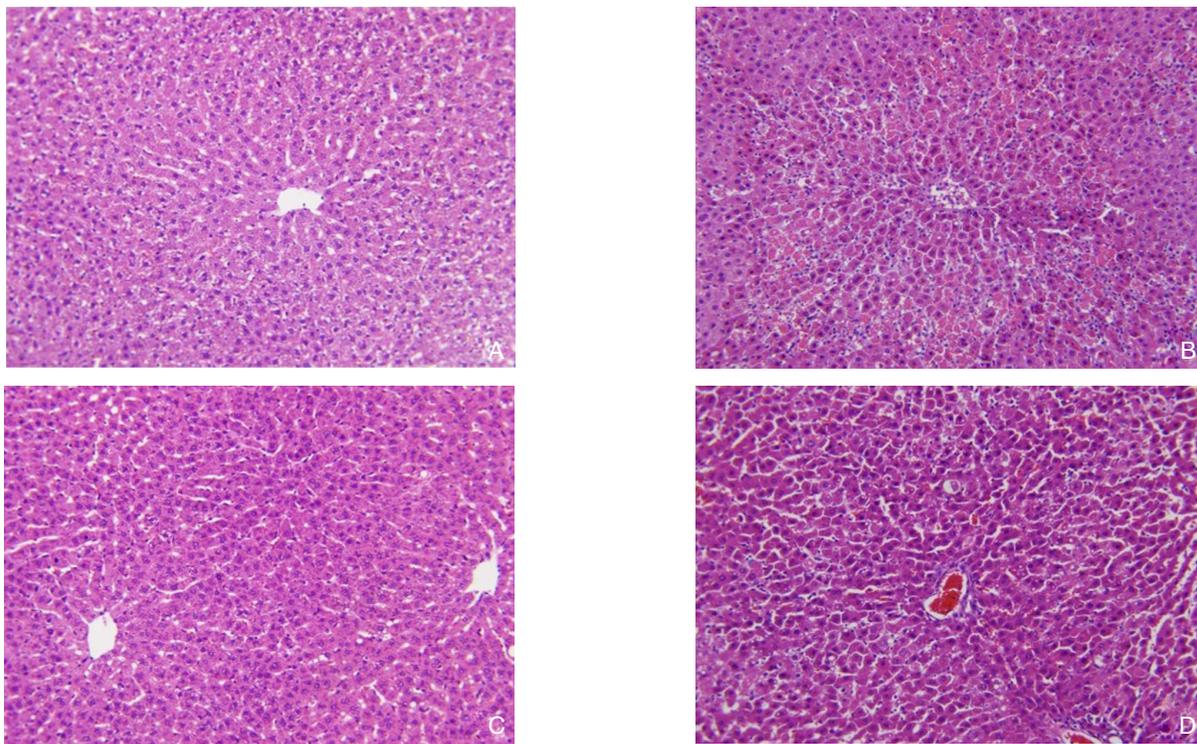


图1 肝脏病理学改变 (HE $\times 100$) A: 假手术组; B: HIRI组; C: TUDCA组; D: TUDCA+HIRI组

Figure 1 Pathological changes of the liver tissues (HE $\times 100$) A: Sham operation group; B: HIRI group; C: TUDCA group; D: TUDCA+HIRI group

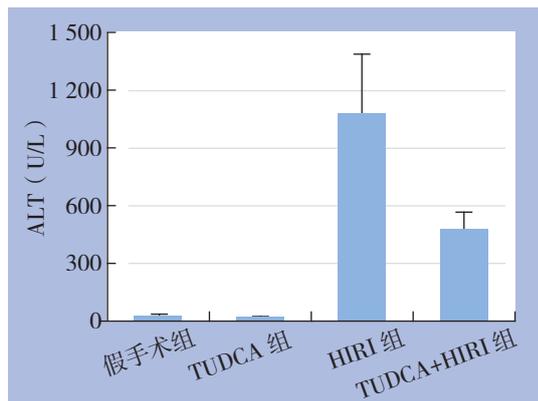


图2 各组血清ALT水平
Figure 2 The serum levels of ALT in each group

2.2 TUDCA对肝脏细胞凋亡的影响

TUNEL染色结果显示, 假手术组和TUDCA组

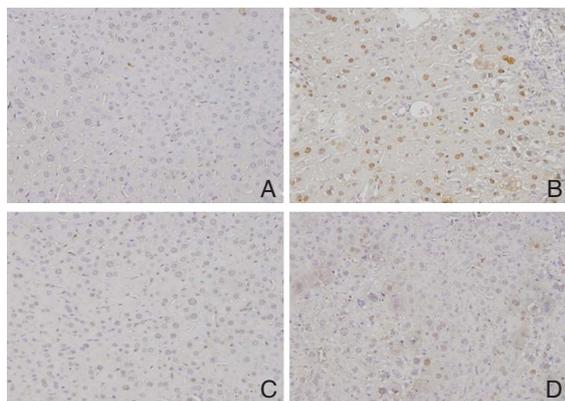
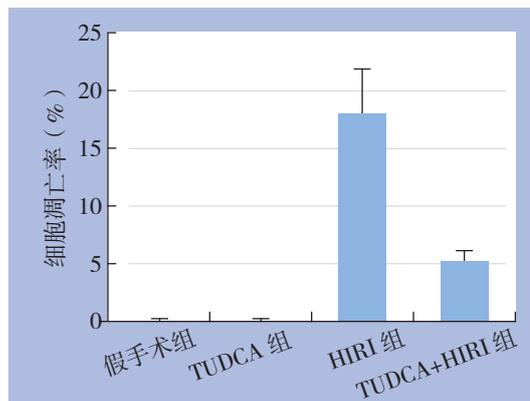


图3 各组肝细胞凋亡情况 (TUNEL 组肝细胞)
Figure 3 Hepatic cell apoptosis in each group (TUNELch group)

均无明显凋亡, 与假手术组比较, HIRI组肝细胞出现明显细胞凋亡 ($P < 0.05$), 而与HIRI组相比较, TUDCA显著抑制了HIRI引起的肝脏细胞凋亡 ($P < 0.05$) (图3)。

2.3 TUDCA对肝脏ERS的影响

Western blot结果显示, 内质网应激信号分子GRP78、CHOP和p-eIF2 α 蛋白表达水平, 与对照组比较, TUDCA组GRP78、CHOP和p-eIF2 α 蛋白水平无明显影响, HIRI模型组GRP78、CHOP和p-eIF2 α 蛋白水平明显升高 (均 $P < 0.05$), 与HIRI组比较, TUDCA显著降低了GRP78、CHOP蛋白水平和p-eIF2 α 蛋白磷酸化水平 (均 $P < 0.05$) (图4)。



A: 假手术组; B: HIRI组; C: TUDCA组; D: TUDCA+HIRI组
A: Sham operation group; B: HIRI group; C: TUDCA group; D: TUDCA+HIRI group

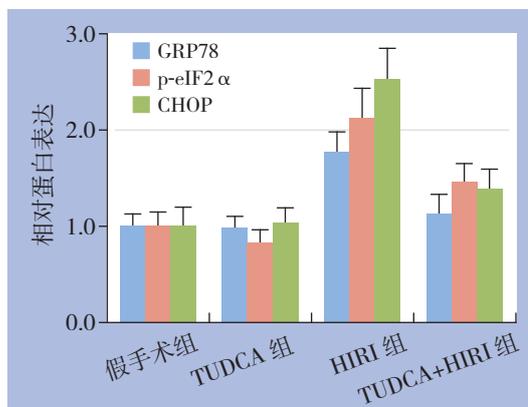
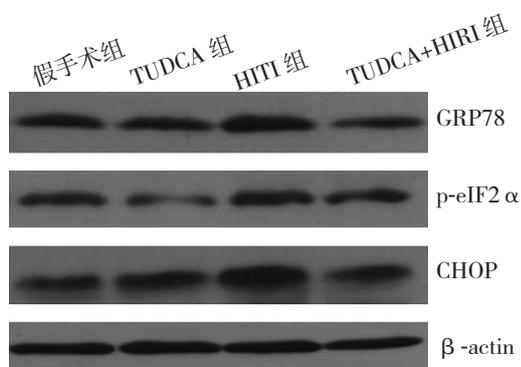


图4 各组肝组织内质网应激相关蛋白表达情况
Figure 4 Expressions of ER stress response-related proteins in the liver tissues of each group

3 讨论

细胞凋亡是机体为适应机体内环境刺激而发生的一种细胞主动的程序性死亡,在生理和病理情况下均能发生,越来越多的研究证实肝细胞凋亡在HIRI发挥重要作用^[3,9,11]。本研究结果显示,大鼠肝脏缺血再灌注后12 h,血清ALT显著升高,肝脏出现明显的急性肝损伤病理学改变,大量肝细胞出现凋亡,TUDCA单纯TUDCA处理对肝脏病理组织无明显改变,对ALT和细胞凋亡无明显影响,这与相关文献的报道相一致^[12-13],而TUDCA干预能有效保护大鼠肝损伤,减少肝细胞凋亡,这为肝细胞凋亡可能在HIRI发病过程中起重要作用提供了新的证据。

已知诱发机体细胞凋亡的途径除死亡受体和线粒体途径等经典的凋亡信号通路外,近年来又发现了ERS可引起细胞凋亡,在众多疾病发生过程中起重要作用,已成为新的药物开发靶点^[7-8]。内质网是哺乳动物细胞重要的Ca²⁺贮存器,同时也是蛋白质合成与翻译后修饰、多肽链正确折叠与装配的重要场所。低氧、高糖、化学毒物或突变等多种因素均能诱导ERS。ERS可促进ER对腔内聚集的未折叠或错误折叠蛋白质产生应答反应(unfolded protein response, UPR),恢复细胞环境内稳态以维持细胞存活,但持续或高强度的ERS则会诱导细胞凋亡,在急慢性肝脏疾病的发生过程中起重要作用^[7-8]。最近的研究表明,ERS是HIRI细胞凋亡调节中的重要途径,HIRI导致的缺氧、酸中毒、ATP耗竭、钙超载及大量自由基生成等均可作为诱导ERS的刺激因素,ERS可特异性激活CHOP等信号分子导致细胞凋亡^[10,14-16]。其中,ERS感受蛋白双链RNA依赖的蛋白激酶样内质网激酶(PKP-like ER kinase, PERK)通路被激活后,可使eIF2 α 发生磷酸化,继而抑制翻译起始因子的功能,导致大部分mRNA翻译受抑制并减少蛋白质的合成,最终使内质网的负荷减轻,以恢复内质网中蛋白质的折叠和内质网的内稳态^[17]。而CHOP/GADD153(growth arrest and DNA damage inducible gene 153)属于C/EBP转录因子家族成员,是内质网应激的一个特异性转录因子,在ERS介导的细胞凋亡效应中发挥重要作用^[18]。ERS三种感受蛋白PERK、激活转录因

子6(activating transcription factor 6, ATF6)以及肌醇酶1 α (inositol-requiring enzyme 1 α , IRE1 α)在激活后均可能通过不同途径诱导CHOP的转录,其中PERK-eIF2 α -ATF4信号通路是调控CHOP蛋白表达的重要途径^[13]。本研究发现HIRI能明显诱导内质网应激标志物GRP78,升高ERS下游信号分子eIF2 α 磷酸化水平和CHOP蛋白水平,表明在HIRI过程中发生ERS。TUDCA是美国FDA于1996年批准的治疗因氨基甲酰磷酸合成酶、鸟氨酸氨甲酰转移酶或精氨酸琥珀酸合成酶缺乏而导致的慢性脉循环紊乱疾病的一种药物,最近的动物研究发现其能通过抑制ERS有效改善糖尿病与急慢性肝病等疾病状态,目前已成为公认的ERS抑制剂^[19-21]。本研究发现TUDCA干预在有效保护HIRI引起的肝损伤并降低肝细胞凋亡的同时,也能明显抑制HIRI诱导的ERS,降低ERS标志物GRP78、下游信号分子eIF2 α 磷酸化水平和CHOP蛋白水平,进一步提示ERS可能通过介导肝细胞凋亡在HIRI过程中发挥重要作用。

综上所述,内质网应激抑制剂TUDCA可能抑制ERS有效保护HIRI引起的肝损伤,有进一步应用于临床防治HIRI的前景,值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Weigand K, Brost S, Steinebrunner N, et al. Ischemia/Reperfusion injury in liver surgery and transplantation: pathophysiology[J]. *HPB Surg*, 2012;176723. doi: 10.1155/2012/176723.
- [2] 陶立德, 薛同敏, 张杰, 等. 缺血预处理对大鼠缺血再灌注肝组织NF- κ B表达、炎症及氧化应激反应的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(1):70-74.
- [3] Ye Z, Chen O, Zhang R, et al. Methane Attenuates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Rats through Anti-apoptosis, Anti-inflammatory and Anti-oxidative[J]. *Shock*, 2015, [Epub ahead of print]
- [4] Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, et al. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(2):79-89.
- [5] Rao J, Yue S, Fu Y, et al. ATF6 mediates a pro-inflammatory synergy between ER stress and TLR activation in the pathogenesis of liver ischemia-reperfusion injury[J]. *Am J Transplant*, 2014, 14(7):1552-1561.
- [6] Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, et al. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*,

- 2014, 2014: 906965. doi: 10.1155/2014/906965.
- [7] Sano R, Reed JC. ER stress-induced cell death mechanisms[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12):3460-3470.
- [8] Malhi H, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress in liver disease[J]. *J Hepatol*, 2011, 54(4):795-809.
- [9] Li B, Chen B, Zhang G, et al. Cell apoptosis and Fas gene expression in liver and renal tissues after ischemia-reperfusion injury in liver transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(5):1550-1556.
- [10] Liu J, Ren F, Cheng Q, et al. Endoplasmic reticulum stress modulates liver inflammatory immune response in the pathogenesis of liver ischemia and reperfusion injury[J]. *Transplantation*, 2012, 94(3): 211-217.
- [11] 李冲, 赵海芳. 抗凋亡策略在肝脏缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2014, 43(7):183-185.
- [12] Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes[J]. *Science*, 2006, 313(5790):1137-1140.
- [13] Cho EJ, Yoon JH, Kwak MS, et al. Tauroursodeoxycholic acid attenuates progression of steatohepatitis in mice fed a methionine-choline-deficient diet [J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(7):1461-1474.
- [14] Dong B, Zhou H, Han C, et al. Ischemia/reperfusion-induced CHOP expression promotes apoptosis and impairs renal function recovery: the role of acidosis and GPR4[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110944. doi: 10.1371/journal.pone.0110944. eCollection 2014.
- [15] Rao J, Qin J, Qian X, et al. Lipopolysaccharide preconditioning protects hepatocytes from ischemia/reperfusion injury (IRI) through inhibiting ATF4-CHOP pathway in mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e65568. doi: 10.1371/journal.pone.0065568.
- [16] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4):381-389.
- [17] Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, et al. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response[J]. *Mol Cell*, 2000, 5(5):897-904.
- [18] Li Y, Guo Y, Tang J, et al. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2014, 46(8):629-640.
- [19] Maestri NE, Brusilow SW, Clissold DB, et al. Long-term treatment of girls with ornithine transcarbamylase deficiency[J]. *N Engl J Med*, 1996, 335(12):855-859.
- [20] Jiménez-Castro MB, Elias-Miro M, Mendes-Braz M, et al. Tauroursodeoxycholic acid affects PPAR γ and TLR4 in Steatotic liver transplantation[J]. *Am J Transplant*, 2012, 12(12):3257-3271.
- [21] Wu H, Wei L, Fan F, et al. Integration of Hippo signalling and the unfolded protein response to restrain liver overgrowth and tumorigenesis [J]. *Nat Commun*, 2015, 6:6239. doi: 10.1038/ncomms7239.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 何宗全, 章安庆, 叶显道, 等. 牛磺熊去氧胆酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(7):990-995. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.013

Cite this article as: HE ZQ, ZHANG AQ, YE XD, et al. Protective effect of tauroursodeoxycholic acid against hepatic ischemia reperfusion injury in rats[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(7):990-995. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.013



微信扫一扫
关注该公众号

敬请关注《中国普通外科杂志》官方微信平台

《中国普通外科杂志》官方公众微信正式上线启动(微信号: ZGPTWKZZ), 我们将通过微信平台定期或不定期推送本刊的优秀文章、工作信息、活动通知等, 以及国内外最新研究成果与进展等。同时, 您也可在微信上留言, 向我们咨询相关问题, 并对我们的工作提出意见和建议。《中国普通外科杂志》公众微信号的开通是我们在移动互联微时代背景下的创新求变之举, 希望能为广大读者与作者带来更多的温馨和便利。

欢迎扫描二维码, 关注《中国普通外科杂志》杂志社官方微信服务平台。

中国普通外科杂志编辑部