

## • 研究报告 •

## 肝脏缺血/再灌注损伤对大鼠瘦素蛋白及 mRNA 表达水平的影响

张磊 林季 颜光涛 冯泽国

【关键词】 缺血预处理; 缺血/再灌注损伤, 肝脏; 瘦素; 放射免疫分析法; 逆转录-聚合酶链反应

研究发现,瘦素(Leptin)不仅作用于体重平衡调控环路和能量代谢反馈调节过程,还能作为炎症细胞因子在急性应激反应中发挥一定的作用<sup>[1]</sup>。探讨大鼠肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤时血清 Leptin 蛋白及脂肪组织 Leptin mRNA 水平的变化规律,报告如下。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料:雄性 SD 大鼠 45 只,体重 200~240 g,由解放军总医院实验动物中心提供。<sup>125</sup>I 标记物购自 Amersham 公司, Sephadex G-25 葡聚糖凝胶、焦碳酸二乙酯(DEPC)、琼脂糖、溴乙吡啶均购自 Sigma 公司,鸟髓母细胞过多症病毒(AMV)逆转录酶、寡聚脱氧胸腺核苷酸[Oligo(dT)<sub>15</sub>]引物购自 Promega 公司,总 RNA 抽提试剂(Trizol)、RNA 酶抑制剂、水生嗜热的脱氧核糖核酸(Taq DNA)聚合酶、脱氧核苷酸三磷酸(dNTPs)及 β-actin 引物购自北京鼎国生物技术公司。Leptin 引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2 大鼠肝脏 I/R 损伤模型建立:按随机数字表法将大鼠分为假手术组(Sham 组)、肝脏缺血 60 min 再灌注 60 min 组(I60R60 组)、I60R150 组、I60R240 组和 I60R360 组,每组 9 只。腹腔注射质量分数为 1%的戊巴比妥钠 60 mg/kg (1.5 ml)麻醉大鼠,右季肋下切口开腹,显露大鼠肝脏,游离肝周韧带,将大鼠肝左叶、中叶及右叶翻起,暴露肝门。在门静脉分出发向肝脏尾叶的分支上,以动脉夹夹闭肝动脉、门静脉及胆管,建立大鼠肝脏 70%I/R 损伤模型。动脉夹置入后,关闭腹腔,缺血 60 min 后取出动脉夹进行再灌注。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970717)

作者单位:100853 北京,解放军总医院  
通讯作者:颜光涛,教授,博士生导师,研究员(Email:YAN301@263.net)

作者简介:张磊(1982-),女(汉族),山东省人,硕士研究生(Email:squirrelyuki@126.com)。

表 1 PCR 引物序列及反应条件

引物名	核苷酸序列及 PCR 反应条件	预期大小	GeneBank 编号
Leptin	上游引物:5'-CCTGTGGCTTGGTCCTATCGG-3'	420 bp	RATOBESE
	下游引物:5'-CTGCTCAAAGTCACCACCTCGG-3'		
β-actin	上游引物:5'-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3'	318 bp	BC063166
	下游引物:5'-ATCATGTTGAGACCTCAACA-3'		
P:94 °C 5 min;D:94 °C 45 s;A:60 °C 45 s;E:72 °C 60 s;C:35			
P:94 °C 5 min;D:94 °C 45 s;A:55 °C 45 s;E:72 °C 45 s;C:30			

注:P 为预变性;D 为变性;A 为退火;E 为延伸;C 为循环数

1.3 血清及脂肪组织样品制备:实验时由心脏抽取血标本。血样置于 37 °C 水浴 20 min 后,在 4 °C 下 3 000 r/min(离心半径 15 cm)离心 20 min,吸取上层血清,-20 °C 下冻存待测。抽血后迅速取出大鼠左侧附睾体部脂肪垫(属白色脂肪组织),立即投入液氮速冻后转移到 -80 °C 冻存。

1.4 放射免疫分析方法:设  $1.1 \times 10^{-3}$ 、 $3.3 \times 10^{-3}$ 、 $11.0 \times 10^{-3}$ 、 $33.0 \times 10^{-3}$ 、 $100.0 \times 10^{-3}$  和  $300.0 \times 10^{-3}$  mg/L 6 个点,测量时加血清 100 μl,将标准品、样品与 100 μl 兔抗血清、100 μl <sup>125</sup>I-Leptin 混匀,4 °C 24 h。加免疫分离剂 500 μl,室温反应 15 min,2 830 r/min(离心半径 15 cm)离心 20 min(4 °C),弃上清,测量沉淀物的计数值并绘制标准曲线。

1.5 总 RNA 提取及逆转录反应:采用 Trizol 试剂提取脂肪组织总 RNA,以三蒸水作为空白对照,测量波长 260 nm 处的吸光度(A)值并计算总 RNA 浓度。逆转录体系(20 μl)包括:2.5 μg 总 RNA,40 U AMV 逆转录酶,1 μg Oligo(dT)<sub>15</sub> 引物,4 μl 逆转录缓冲液 × 5,1 mmol/L dNTPs,20 U RNA 酶抑制剂,体积分数为 0.1%的 DEPC 水。将逆转录样品置于 37 °C 水浴 2 h,95 °C 水浴 5 min 灭活 AMV 酶,4 °C 下 10 000 r/min(离心半径 9.2 cm)离心 5 min,-20 °C 下保存 cDNA 样品。

1.6 聚合酶链反应(PCR):以 β-actin mRNA 水平作为 cDNA 合成及 PCR 的内源性参照。Leptin PCR 体系(50 μl)包括:4 μl cDNA,0.5 μmol/L 上游及下游引物,0.8 mmol/L dNTPs,2 U Taq

酶,5 μl PCR 缓冲液(含 20 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) × 10,灭菌去离子水。β-actin 反应体系上下游引物的量为 0.2 μg,其余与 Leptin 反应体系相同。Leptin 引物序列参考 Jaworek 等<sup>[2]</sup>介绍的方法。PCR 所需的引物序列及反应条件见表 1。PCR 产物于质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶(含 0.5 mg/L 溴乙吡啶)进行电泳检测。以 Gel-pro 软件对 Leptin 及 β-actin 的电泳条带进行灰度值分析,灰度比值为同组标本 Leptin 灰度值/β-actin 灰度值。

1.7 统计学方法:实验数据符合正态分布、方差齐性,以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS11.0 统计分析软件进行单因素方差分析,组间比较采用 SNK 法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 标准曲线和抗体滴度(图 1):所用 Leptin 抗体工作滴度为 1:1 000,测量血清样品时最终稀释度为 1:3 000。在 Leptin 为 1.1~300.0 μg/L 时,兔抗血清与 Leptin 标记物的最高结合率保持在 36%~40%,能获得良好的标准曲线。

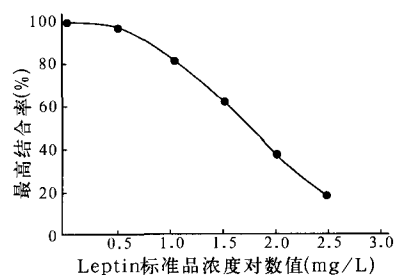


图 1 Leptin 放射免疫竞争抑制曲线

2.2 各组血清 Leptin 蛋白水平比较(表 2):与 Sham 组比较,I60R60 组和

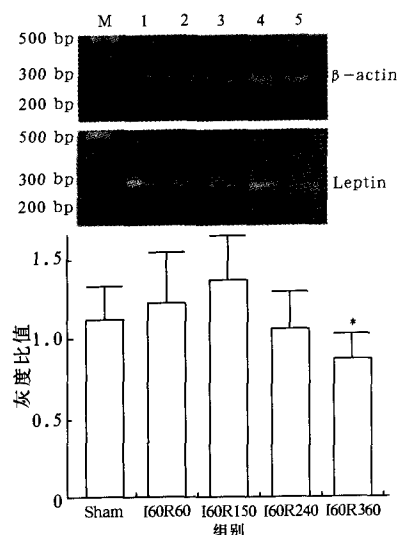
I60R150 组血清 Leptin 蛋白水平即出现增高趋势; I60R360 组血清 Leptin 蛋白水平显著增高 ( $q=4.39, P<0.05$ )。

表 2 各组血清 Leptin 蛋白比较 ( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	Leptin 蛋白( $\times 10^{-3}$ mg/L)
Sham 组	9	12.01 $\pm$ 2.73
I60R60 组	9	17.77 $\pm$ 5.61
I60R150 组	9	17.26 $\pm$ 6.13
I60R240 组	9	13.54 $\pm$ 4.39
I60R360 组	9	19.54 $\pm$ 6.04*

注:与 Sham 组比较; \* $P<0.05$

2.3 各组脂肪组织 Leptin mRNA 表达量(图 2):与 Sham 组比较, I60R60 组、I60R150 组和 I60R240 组 Leptin mRNA 表达无明显改变, I60R360 组则表达降低(灰度比值  $q=4.56, P<0.05$ )。



M: Marker; 1~5 依次为: Sham 组、I60R60 组、I60R150 组、I60R240 组和 I60R360 组; 与 Sham 组比较: \* $P<0.05$

图 2 各组脂肪组织 Leptin mRNA 表达比较

### 3 讨论

肝脏 I/R 损伤常见于肝叶切除、肝移植、低血容量性休克、严重肝外伤、静脉闭塞性疾病、肝静脉血栓形成(Budd-Chiari 综合征)等,具有典型的病理生理改变<sup>[3]</sup>。本研究选择肝脏 70% I/R 损伤模型,避免了全肝阻断后肠道淤血引起的细菌移位和内毒素释放对 Leptin 水平的影响。研究显示, Leptin 在胃黏膜、肾脏及小肠的 I/R 损伤过程中不但呈现了时间依赖性的变化规律,还证实其对重要脏器具有明显的保护作用<sup>[4-6]</sup>。

本研究结果显示,与 Sham 组比较, I60R60 组和 I60R150 组血清 Leptin 蛋白水平均增高, I60R360 组增高更显著,表明 Leptin 参与了早期(再灌注 2 h 内)

和中期(再灌注 2~6 h)肝脏 I/R 损伤过程,对于维持机体自稳态可能具有一定作用。但在 I60R360 组 Leptin mRNA 表达降低,说明肝脏 I/R 损伤后期(再灌注 6 h 后)Leptin 蛋白水平呈下降趋势。有研究显示,在脓毒症患者应激反应过程中,急性期血清 Leptin 水平升高,后期则呈明显的下降趋势<sup>[7]</sup>,在肝移植患者术后也观察到血清 Leptin 水平显著升高<sup>[8]</sup>。推测产生这一变化规律的原因有:①肝脏缺血预处理时局部缺血、缺氧, pH 值降低,刺激全身性 Leptin 释放<sup>[9]</sup>;②手术创伤和应激状态使血清游离脂肪酸水平剧烈上升,诱发 Leptin 释放增加;③肝脏 I/R 损伤中期,库普弗细胞(Kupffer's cell)激活,肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )和糖皮质激素的协同作用,使血清 Leptin 水平增高<sup>[10]</sup>;④血清高水平 Leptin 通过下丘脑的反馈抑制,使脂肪组织 Leptin mRNA 合成减低;⑤应激状态下拟交感神经的释放、寒冷暴露和空腹刺激白色脂肪组织内交感神经兴奋,减少 ob 基因表达和 Leptin 产生<sup>[11]</sup>。

因此我们推测, Leptin 在肝脏 I/R 损伤过程中的变化规律对于机体具有重要意义,依据如下:①Leptin 可通过增加组织中组胺水平,维持局部微循环的血流量<sup>[4]</sup>;②肾脏 I/R 损伤过程中,外源性给予 Leptin,可显著降低 TNF- $\alpha$  水平,增加血清亚硝酸盐浓度,从而发挥保护作用<sup>[5]</sup>;③Leptin 可阻断脂肪酸合酶(FAS),下调过氧化物酶增殖体激活受体- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ )和线粒体解耦联蛋白 2 (UCP2),使 ATP 水平上升,对肝脏 I/R 损伤和肝移植起保护作用<sup>[12]</sup>;④Leptin 可激活其下游蛋白酪氨酸激酶/信号转导子和转录激活子(JAK/STAT)途径、丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)和磷脂酰肌醇-3 激酶(PI3-K),发挥抗细胞凋亡作用<sup>[13]</sup>;⑤外源性给予 Leptin 可使烧伤引起的大鼠单核细胞和中性粒细胞的破坏程度减低,减轻继发的炎症反应和多脏器功能障碍<sup>[14]</sup>。国外相关研究也显示, ob 基因敲除(ob/ob)小鼠具有全身性肥胖、肝脏脂肪变性、ATP 水平降低、对内毒素敏感以及肝脏 I/R 损伤后存活率低的特点<sup>[15]</sup>,也提示 Leptin 在肝脏 I/R 损伤过程中发挥了作用。

### 参考文献:

1 Stryjewski G, Dalton H J. Circulating Leptin: mediator or marker of the neu-

roendocrinological stress response [J]? Crit Care Med, 2001, 29 (12): 2397 - 2398.

2 Jaworek J, Bonior J, Pierzchalski P, et al. Leptin protects the pancreas from damage induced by caerulein overstimulation by modulating cytokine production [J]. Pancreatolgy, 2002, 2(2): 89 - 99.

3 林科灿, 刘景丰. 肝脏热缺血再灌注损伤的病理生理学机制 [J]. 福建医科大学学报, 2005, 39(增刊): 50 - 52.

4 Erkasap N, Uzun K, Serteser M, et al. Gastroprotective effect of leptin on gastric mucosal injury induced by ischemia-reperfusion is related to gastric histamine content in rats [J]. Peptides, 2003, 24(8): 1181 - 1187.

5 Erkasap S, Erkasap N, Koken T, et al. Effect of Leptin on renal ischemia-reperfusion damage in rats [J]. J Physiol Biochem, 2004, 60(2): 79 - 84.

6 林季, 颜光涛, 王录焕, 等. 肠缺血/再灌注损伤对 Leptin 蛋白质及 mRNA 水平的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(11): 651 - 655.

7 Tzanela M, Orfanos S E, Tsirantonaki M, et al. Leptin alterations in the course of sepsis in humans [J]. In Vivo, 2006, 20 (4): 565 - 570.

8 颜光涛, 薛辉, 林季. 肝移植术后患者血清 Leptin 浓度变化及其意义 [J]. 标记免疫分析与临床, 2006, 13(2): 65 - 67.

9 Takahashi Y, Yokoyama Y, Kawabata I, et al. Leptin as an acute stress-related hormone in the fetoplacental circulation [J]. Obstet Gynecol, 2002, 100(4): 655 - 658.

10 Trujillo M E, Lee M J, Sullivan S, et al. Tumor necrosis factor alpha and glucocorticoid synergistically increase Leptin production in human adipose tissue: role for p38 mitogen-activated protein kinase [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(4): 1484 - 1490.

11 姚辉, 林汉华. 瘦素与交感神经系统 [J]. 国外医学·儿科学分册, 2002, 29(4): 205 - 207.

12 Chavin K D, Fiorini R N, Shafizadeh S, et al. Fatty acid synthase blockade protects steatotic livers from warm ischemia/reperfusion injury and transplantation [J]. Am J Transplant, 2004, 4 (9): 1440 - 1447.

13 Russo V C, Metaxas S, Kobayashi K, et al. Antiapoptotic effects of Leptin in human neuroblastoma cells [J]. Endocrinology, 2004, 145 (9): 4103 - 4112.

14 Cakir B, Cevik H, contuk G, et al. Leptin ameliorates burn-induced multiple organ damage and modulates postburn immune response in rats[J]. Regul Pept, 2005, 125

(1-3):135-144.

15 Fiorini R N, Shafizadeh S F, Polito C, et al. Anti-endotoxin monoclonal antibodies are protective against hepatic

ischemia/reperfusion injury in steatotic mice[J]. Am J Transplant, 2004, 4(10): 1567-1573. (收稿日期:2006-12-14)

(本文编辑:李银平)

## • 病例报告 •

# 抢救肾移植术后感染患者 1 例

戴文森 詹庆元

【关键词】 肾移植； 发热； 诊治； 感染

报告 1 例肾移植术后抢救体会。

### 1 病历简介

患者男性, 41 岁, 因同种异体肾移植术后 3 个月, 发热 5 d 于 2006 年 4 月 6 日入院。入院前 3 个月因慢性肾功能不全尿毒症期行同种异体肾移植术, 术后肾功能逐渐恢复, 可排尿, 出院时血肌酐  $238.68 \mu\text{mol/L}$ 。入院前 5 d 受凉后出现发热, 最高体温  $38^\circ\text{C}$ , 偶有干咳伴呼吸困难, 尿量  $1600 \text{ ml/d}$ 。规律口服免疫抑制药物他克莫司(FK506)、骁悉及泼尼松。既往有糖尿病史 7 年、高血压病史 5 年, 自肾移植术后血压下降至正常。入院时体温  $36.6^\circ\text{C}$ , 脉搏 80 次/min, 呼吸频率 28 次/min, 血压  $140/80 \text{ mm Hg}$  ( $1 \text{ mm Hg}=0.133 \text{ kPa}$ ), 双肺呼吸音粗, 肺底湿啰音, 叩诊浊音, 心律齐, 无病理杂音, 移植肾质韧, 无压痛。血: 红细胞  $3.1 \times 10^{12}/\text{L}$ , 血小板  $280 \times 10^9/\text{L}$ , 白细胞  $18 \times 10^9/\text{L}$ , 中性粒细胞 0.81, 血红蛋白  $93 \text{ g/L}$ , 尿素氮  $5.85 \text{ mmol/L}$ , 肌酐  $310 \mu\text{mol/L}$ ; pH 7.45, 二氧化碳分压  $34.2 \text{ mm Hg}$ , 氧分压  $41.3 \text{ mm Hg}$ , 剩余碱  $6.1 \text{ mmol/L}$ ,  $\text{HCO}_3^-$   $22.5 \text{ mmol/L}$ , 脉搏血氧饱和度 0.69; X 线胸片显示双肺弥漫性渗出性病变; 巨细胞病毒抗体(-)。初步诊断: 重症肺炎, 急性呼吸窘迫综合征, 肾移植术后, 高血压病 3 级, 2 型糖尿病。

### 2 诊疗经过

第一阶段: ①抗感染: 入院后 2 周体温  $38 \sim 39^\circ\text{C}$ , 确诊肺部感染(卡氏肺孢子虫、白色念珠菌、屎肠球菌、G<sup>-</sup>杆菌)。

作者单位: 351100 福建省莆田学院附属医院(戴文森); 100025 北京朝阳医院北京呼吸疾病研究所(詹庆元)

作者简介: 戴文森(1973-), 男(汉族), 福建省人, 主治医师(E-mail: daiwensen120@163.com)。

抗感染治疗使用美罗培南、替考拉宁、磺胺类、更昔洛韦、大扶康、两性霉素 B。

②呼吸支持: 入院后即予双水平正压通气(BiPAP)呼吸机无创通气, 9 d 后氧合改善仍差, 予气管插管行有创通气, 模式压力支持或持续气道正压通气, 入院 16 d 改为 BiPAP 无创呼吸机自主呼吸定时模式辅助通气。③肾功能支持: 入院后 7 d 因无尿行左股静脉置管, 连续性静-静脉血液滤过。④免疫治疗: 甲基泼尼松(甲强龙)抗炎, 口服免疫抑制药, 他克莫司、骁悉逐渐减量。移植肾 B 超示肾动脉主干与髂外动脉吻合后血管迂曲, 血供欠丰富, 动脉阻力指数稍减低。反复发热不能排除移植肾感染和(或)排斥反应的可能, 病情危重, 于 21 d 行移植肾切除, 停口服免疫抑制药。术后出现切口水肿, 给予局部热敷处理。⑤加强营养支持、严格液体管理, 严格控制血糖、血压, 监测心、肝、肾消化道等脏器功能等。经上述处理后, 患者体温下降至  $37.5^\circ\text{C}$  左右, 肺部感染得到有效控制。

第二阶段: 入院 23 d 出现昏迷和休克, 会诊后考虑患者昏迷原因为感染中毒性休克、多器官功能衰竭, 毒素蓄积刺激损伤及血流动力学不稳定, 脑灌注减少综合作用。予催醒、清除氧自由基、营养神经等治疗, 休克, 考虑有效循环血量不足、感染中毒性休克、心功能不全、肾上腺功能差等, 予改善肾上腺功能、扩容、升压维持。因昏迷和休克予气管插管并于入院 27 d 行气管切开。术后体温再次上升, X 线胸片示右上肺渗出明显增多, 根据细菌培养结果和临床表现考虑呼吸机相关性肺炎。继续上述抗感染治疗。2 周后体温下降, 胸片显示好转, 休克纠正, 意识逐渐恢复, 并于入院 42 d 撤机成功。51 d 已无卡氏肺囊虫性肺炎感染证据, 停用磺胺类药, 入院 64 d 拔

除气管套管。入院 75 d 又开始间断发热, 行 X 线胸片、心脏和腹部 B 超、颅脑 CT, 血、尿、粪培养等检查均无明显异常, 更换静脉留置针头位置及拔除尿管和鼻饲管等排除导管侵入性感染, 加用头孢吡肟加强抗感染。行血肿清除术, 并根据细菌培养结果继续使用抗感染治疗, 1 周后体温降至正常范围。入院 96 d 转泌尿外科继续隔日血液滤过等治疗。

### 3 讨论

由于基础疾病及原发病的长期消耗, 使肾移植受者术前的体质明显减弱, 肾移植手术的创伤, 尤其是手术前后大量激素及免疫抑制剂的使用, 使其免疫功能处于极度低下状态。术后半年, 特别是术后 3 个月是感染的好发阶段。据报道, 移植后免疫抑制最严重的时间大致是术后 80~130 d, 为保证移植肾功能正常、不出现急性排斥反应, 患者所用免疫抑制剂剂量最大也是最易导致肺部感染的阶段<sup>[1]</sup>。如果此时患者出现发热, 除考虑排斥反应、药物等非感染因素外, 应首先考虑感染的可能<sup>[2]</sup>。通过对本例患者的处理, 我们体会到, 该类患者病情重、治疗周期长、经济负担重, 治疗应尽早明确感染灶及病原学, 合理选用抗生素, 加强支持治疗和多功能支持以及应加强院内感染的预防和治疗。

### 参考文献:

- 1 Sarmiento T M, Dockrell D H, Schwab T R, et al. Mycophenolate mofetil increases cytomegalovirus in vasive organ disease in renal transplant patients[J]. Clin Transplant, 2000, 14(2): 136-138.
- 2 Kotloff R M, Ahya V N, Crawford S W, et al. Pulmonary complications of solid organ and hematopoietic stem cell transplantation[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170(1): 22-48.

(收稿日期: 2007-01-20)

(本文编辑: 李银平)