

抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体对阻塞性黄疸大鼠 肝脏保护作用的实验研究

邱兆磊¹, 王振杰¹, 刘牧林², 黄建康¹, 董慧明³, 郑士友¹

[摘要]目的: 探讨肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor α , TNF- α)在阻塞性黄疸大鼠肝损伤中的作用及抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体 (anti-TNF- α McAb)的保护作用。方法: 将雄性SD大鼠 24只随机分为胆总管结扎组 (BDL)、BDL+ anti-TNF- α McAb组、假手术组 (SO)。BDL+ anti-TNF- α McAb组治疗于胆总管结扎后第3天开始经尾静脉注射 anti-TNF- α McAb (1 mg/kg), 连用5天; BDL组和SO组以同样的方法注射等量的生理盐水。分别检测各组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)和 TNF- α 水平, 并在光镜和电镜下观察各组大鼠肝组织的病理变化。结果: BDL组及 BDL+ anti-TNF- α McAb治疗组大鼠血清 ALT、AST和 TNF- α 水平均高于SO组 ($P < 0.01$), 但 BDL+ anti-TNF- α McAb治疗组增高的程度均低于BDL组 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 并且肝组织病理改变也较轻。SO组肝组织无明显病理改变。结论: TNF- α 可能是阻塞性黄疸时肝损伤的重要介导因子, 使用抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体, 可以减轻阻塞性黄疸时肝损伤。

[关键词] 胆管阻塞, 肝外; 黄疸; 肿瘤坏死因子- α ; 抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体; 肝损伤; 大鼠

[中国图书资料分类法分类号] R 575.63 R 442.4 [文献标识码] A

Experimental study about the protective effect of anti-TNF- α McAb on liver of rats with obstructive jaundice

QIU Zhao-lei, WANG Zhen-jie, LIU Mu-lin, HUANG Jian-kang, DONG Hui-ming, ZHENG Shi-you

(1 Department of Emergency Surgery, 2 Department of Gastrointestinal Surgery, 3 Department of Surgical Oncology
Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China)

[Abstract] Objective: To investigate the role of tumor necrosis factor α (TNF- α) in liver damage in rats with obstructive jaundice and the protective effect of anti-TNF- α McAb. Method: Twenty-four male Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups: bile duct ligation (BDL) group, bile duct ligation+ anti-TNF- α McAb (BDL+ anti-TNF- α McAb) group and sham operation (SO) group. BDL+ anti-TNF- α McAb group was subjected to damage with intravenous administration of anti-TNF- α McAb (1 mg/kg) for five days starting from the 3rd day after bile duct ligation. BDL group and SO group were administered with saline in the same manner. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and TNF- α were detected in each group. The histopathology was observed by light and electron microscopy in the liver of rats with obstructive jaundice. Results: The levels of serum ALT, AST and TNF- α in BDL group and BDL+ anti-TNF- α McAb group were markedly higher than those in SO group ($P < 0.01$), and the levels of serum ALT, AST and TNF- α in BDL+ anti-TNF- α McAb group were much lower than those in BDL group ($P < 0.05 \sim P < 0.01$), the changes of liver histopathology were minor in BDL+ anti-TNF- α McAb group. SO group had no apparent change. Conclusions: TNF- α may be one of the most important mediators in liver damage induced by obstructive jaundice, and the use of anti-TNF- α McAb can relieve the liver damage.

[Key words] bile duct obstruction; jaundice; tumor necrosis factor α ; anti-TNF- α monoclonal antibody; liver damage; rats

阻塞性黄疸 (obstructive jaundice, OJ)是肝胆外科常见的临床综合征。阻塞性黄疸存在内毒素血症,其毒性作用主要是通过诱生的细胞因子尤其是肿瘤坏死因子- α (TNF- α)而发挥的。本文通过结扎大鼠胆总管制作阻塞性黄疸的动物模型,研究大鼠

在急性胆道阻塞时肝脏病理学改变与 TNF- α 浓度之间的关系,并观察抗肿瘤坏死因子- α 单克隆抗体 (anti-TNF- α McAb)对阻塞性黄疸肝损伤的防治效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物及动物模型的分组 成年雄性SD大鼠 24只,体重 250~300 g (由蚌埠医学院实验动物中心提供)。将 24只SD大鼠随机均分为胆总管结扎组 (BDL)、BDL+ anti-TNF- α McAb组和假手术组 (SO)3组。

[收稿日期] 2005-10-24

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目 (2002kz19)

[作者单位] 蚌埠医学院附属医院 1. 急诊外科, 2. 胃肠外科, 3. 肿瘤外科, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 邱兆磊 (1976-), 男, 硕士研究生。

[通讯作者] 王振杰, 主任医师, 副教授。

1.2 动物模型制作 术前不禁食, 1%硫喷妥钠 0.3 ml/100 腹腔注射麻醉, 待麻醉满意后, 在无菌条件下经正中切口入腹, 解剖肝十二指肠韧带, 并游离出胆总管, 于十二指肠上缘给予双重结扎, 制作阻塞性黄疸动物模型。假手术仅游离胆总管而不结扎之, 逐层关腹。术后分笼饲养, 自由进食水。

1.3 动物给药 制成模型 48 h后, 每天定时经尾静脉向 BDL+ anti-TNF- α McAb治疗组大鼠注射 anti-TNF- α McAb 1 mg/kg(购于上海森雄科技实业有限公司), 连续 5天。向 BDI组、SO组大鼠以同样的方法注射等量生理盐水。

1.4 检测指标及方法 第 8天经腹主动脉采血, 取肝右叶固定部位肝组织备检。

1.4.1 血清 TNF- α 测定 采用双抗体夹心 ABC-ELISA法(试剂盒购于上海森雄科技实业有限公司)。

1.4.2 血清肝功能测定 采用全自动生化分析仪测定。

1.4.3 肝组织病理学检查 (1)光镜形态学检查: 肝组织标本以 10%甲醛溶液内固定, 石蜡包埋, 常规制片, 苏木素-伊红染色, 在光镜下观察。(2)电镜超微结构检查: 取 1 mm \times 1 mm \times 1 mm肝组织标本 3~5块, 以 2.5%戊二醛和 1%锇酸(四氧化锇)双重固定, 环氧树脂包埋, 铀铅双层染色, 在电镜下观察(安徽省立医院病理科提供)。

1.5 统计学方法 采用方差分析和 $^{\circ}$ 检验。

2 结果

2.1 一般情况 大鼠胆总管双层结扎 24 h后, 尿液颜色明显加深, 约 48 h开始出现鼠尾及耳尖黄染。随胆道梗阻时间延长黄染逐渐加重, 大鼠食欲精神状态逐渐变差, anti-TNF- α McAb治疗组大鼠术后精神状态及食欲均好于 BDI组大鼠。SO组大鼠无明显上述表现。

2.2 肝脏及胆管大体病理改变 大鼠胆总管双层结扎 7天后取标本时发现胆总管近端明显扩张, 且张力很高, 肝脏肿大并有淤胆表现。

2.3 各组大鼠肝功能和血清 TNF- α 的变化 BDL组及 BDL+ anti-TNF- α McAb治疗组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)和 TNF- α 均明显高于 SO组($P < 0.05$), 但 BDL+ anti-TNF- α McAb治疗组血清 ALT、AST和 TNF- α 均较 BDI组减少($P < 0.05 \sim P < 0.01$) (见表 1)。

2.4 肝脏病理学检查 (1)光镜检查: BDI组大鼠肝细胞出现点状坏死, 部分区域出现灶状坏死, 少量纤维组织增生, 部分肝窦内可见少量胆栓。BDL+

anti-TNF- α McAb治疗组大鼠肝细胞变性、坏死较 BDI组轻。SO组大鼠无明显变化。(2)电镜检查: BDI组肝细胞胞质颗粒增多, 线粒体肿胀变性, 线粒体嵴变形甚至破坏, 内质网扩张, BDL+ anti-TNF- α McAb治疗组大鼠肝细胞超微结构变化较 BDI组轻。SO组大鼠无明显变化。

表 1 各组大鼠肝功能指标和血清 TNF- α 含量的变化比较 ($n_1=8 \bar{x} \pm s$)

分组	ALT(μ /L)	AST(μ /L)	TNF- α (pg/ml)
SO	48.37 \pm 11.07	135.47 \pm 26.72	27.14 \pm 8.79
BDL	284.52 \pm 78.71**	748.63 \pm 114.03**	69.18 \pm 10.67**
BDL+ anti-TNF- α McAb	147.75 \pm 44.87** _{##}	375.50 \pm 134.32** _{##}	40.89 \pm 9.60** _{##}
F	41.12	72.14	38.93
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01
MS _{组内}	2777.042	10586.221	94.424

$^{\circ}$ 检验: 与 SO组比较 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 BDI组比较 _{##} $P < 0.01$

3 讨论

目前研究认为, 阻塞性黄疸时引起机体并发症的主要原因是内毒素血症的发生及由其所诱发的细胞介质 TNF- α 浓度升高所造成的损伤有关^[1]。内毒素血症是造成阻塞性黄疸患者术后并发症和死亡率高的一个主要原因^[2], 其损伤作用主要是 TNF- α 为“中介”而实现的。本实验发现 BDI组及 BDL+ anti-TNF- α McAb治疗组大鼠血清 TNF- α 明显高于 SO组 ($P < 0.05$), 说明阻塞性黄疸是引起内毒素血症和 TNF- α 水平升高的重要原因。

阻塞性黄疸时, 内毒素血症的发生与许多因素有关。如胆道梗阻后, 胆汁的肠肝循环减少, 胆汁对细菌的抑制作用减弱, 使得肠内细菌过度繁殖, 内毒素产生及释放增多; 肝脏屏障功能破坏, 免疫功能发生变化, 免疫细胞功能受损, 不能有效的清除血中的细菌和内毒素; 阻塞性黄疸时出现门体静脉分流, 部分被吸收的内毒素避开了库普弗细胞(Kupffer cell)的作用, 从而发生内毒素血症^[3]。肝脏库普弗细胞是体内产生 TNF- α 的主要部位。内毒素是目前刺激 TNF- α 产生最强的物质之一。阻塞性黄疸时, 内毒素刺激肝脏库普弗细胞释放更多的 TNF- α ^[4], 肝细胞受到 TNF- α 的攻击, 导致功能障碍的发生。研究发现, 给动物注射放射性标记的 TNF- α 后, 分布于肝内的 TNF- α 明显高于其它外周组织, 说明肝内具有丰富的 TNF- α 受体, 是 TNF- α 的重要靶器官。

TNF- α 是一种促炎性细胞因子, 具有防御和致

损伤的双重作用, 适量分泌时具有抗感染、杀伤肿瘤细胞、免疫调节等作用, 当分泌过多时, 则参与机体的多种病理生理改变, 甚至造成多器官损伤。在阻塞性黄疸内毒素血症时, $TNF-\alpha$ 被认为是机体炎症反应的启动物质。 $TNF-\alpha$ 损伤机制是复杂的、多方面的: (1) $TNF-\alpha$ 能够激活多形粒细胞 (Polymorphonuclear neutrophil PMN) 使其释放多种致损伤物质如各种氧化剂、蛋白水解酶等, 进入血循环而造成多器官损害。(2) $TNF-\alpha$ 与相应受体结合后向细胞内移, 被靶细胞溶酶体摄取导致溶酶体稳定性降低, 各种酶外泄, 引起细胞溶解。(3) $TNF-\alpha$ 作用并损伤血管内皮细胞导致微血栓形成、微观血流动力学紊乱和 DIC 的发生^[5]。(4) $TNF-\alpha$ 能诱导 IL-1、IL-6、 $IFN-\gamma$ 、粒-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 等基因表达, 活化磷脂酶 A_2 (PLA₂), 使花生四烯酸分解, 产生血小板活化因子、白三烯、血栓素等炎症介质, 这些炎症介质组成复杂的网络系统, 加剧炎症反应, 造成组织损伤, 严重者可导致多系统器官衰竭。(5) $TNF-\alpha$ 能破坏电子转运系统和线粒体功能产生氧自由基。(6) $TNF-\alpha$ 能诱导 NO 的产生, 特别是当它们与内毒素共同作用时, NO 生成量最大^[6]。大量生成的 NO 具有直接细胞毒性作用。

$TNF-\alpha$ 是阻塞性黄疸发生肝损伤的重要介导因子。 $TNF-\alpha$ 的生物学活性是通过与 $TNF-\alpha$ 受体 ($TNF-R$) 结合而发挥的。抗 $TNF-\alpha$ McAb 能中和循环中的 $TNF-\alpha$, 阻断 $TNF-\alpha$ 的作用。卞建民等^[7] 实验发现, $TNF-\alpha$ 不但能使肝细胞 DNA 复制受阻, 造成肝细胞损害, 并且 $TNF-\alpha$ 对肝细胞的致伤作用与

其浓度成正比。在本实验中, BDL + anti- $TNF-\alpha$ McAb 治疗组与 BDL 组比较, 循环中 $TNF-\alpha$ 明显下降 ($P < 0.01$), 肝功能有所好转 ($P < 0.01$), 肝组织损伤较轻。这表明 anti- $TNF-\alpha$ McAb 能够降低循环中的 $TNF-\alpha$ 含量, 可减轻阻塞性黄疸时肝组织的损伤, 对肝组织具有一定的保护作用。为临床防治阻塞性黄疸引起的多器官功能障碍提供了一种新的思路和方法。同时我们应该看到, 阻塞性黄疸时, 引起肝功能障碍是多种因素共同作用的综合结果, 单一药物治疗不能完全阻止肝功能障碍的发生, 而只有在解除胆道梗阻基础上的综合治疗才是最为有效的方法。

[参 考 文 献]

- [1] Csipo J, Kawaii K, Iss E, et al. Serum complement activation of SLE patients during plasmapheresis. *J. Autoimmunity* 1997; 25 (3): 139-146
- [2] Inan M, Savak L, Teftic E, et al. Role of endotoxin and nitric oxide in the pathogenesis of renal failure in obstructive jaundice. *J. Br J Surg* 1997; 84 (7): 943-947
- [3] 黄洁夫. 腹部外科 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 1 082-1 083
- [4] Kennedy JA, Clements WD, Kirk SJ, et al. Characterization of the Kupffer cell response to exogenous endotoxin in a rodent model of obstructive jaundice. *J. Br J Surg* 1999; 86 (5): 628-633
- [5] 李端阳. 肿瘤坏死因子 α 与梗阻性黄疸 [J]. 临床肝胆病杂志, 1999; 15 (3): 138-141
- [6] Nussler AK, Disilvio M, Liu ZZ, et al. Further characterization and comparison of inducible nitric oxide synthase in mouse rat and human hepatocytes. *J. Hepatology* 1995; 21 (6): 1 552-1 560
- [7] 卞建民, 陈易人, 胡振雄, 等. 肿瘤坏死因子对肝细胞的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 1995; 12 (6): 358-359

常用药物标准名称摘编 (十九)

宜用	不宜用	宜用	不宜用	宜用	不宜用
洛莫司汀	环己亚硝脲	环磷酰胺	环磷氮芥	阿义马林	缓脉灵
青蒿素	黄蒿素	美芬丁胺	恢压敏	茴香烯	茴香脑
非格司亭	惠尔血	异氟烷	活宁	卡立普多	肌安宁
氯氮草	甲氨二氮卓	依托咪唑	甲苄咪唑	美普他酚	甲氨卓酚
碘赛罗宁	甲碘安	甲基多巴	甲多巴	克拉霉素	甲红霉素
索他洛尔	甲磺胺心定	磺胺米隆	甲磺灭脓	头孢曲松	茵必治
可待因	甲基吗啡	卡比马唑	甲亢平	甲氯芬那酸	甲氯灭酸
酮替芬	甲哌噻庚酮	托哌酮	甲哌酮	达卡巴嗪	甲嗪咪唑胺
快诺孕酮	甲炔诺酮	美噻他嗪	甲噻吩嗪	氮甲	甲酰溶肉瘤素
雷尼替丁	甲硝咪胍	甲硝唑	甲硝基羟乙唑	甲氧明	甲氧胺

[摘自:《国家基本药物(西药)》(1999年版)、《中国药典》(1995年版)和药典委员会《药名词汇》]