

閉塞性黄疸における nitric oxide の肝細胞保護作用に関する実験的検討

獨協医科大学第2外科
下 田 貢

閉塞性黄疸(閉黄)時の nitric oxide (NO) の産生および意義に関する報告は少なく、今回閉黄ラットを用いて実験的に検討した。門脈血中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ は閉黄7日まで、増加し、NO合成酵素阻害剤(L-NAME)の投与により有意に抑制された。閉黄後肝組織血流量は有意に低下し、L-NAME投与によりさらに低下した。閉黄7日の肝組織には、誘導型 NOS mRNA が誘導された。胆汁のNO産生の影響を調べるため培養細胞を用いた実験では、黄疸胆汁はNO産生に影響を及ぼさなかったが、非黄疸胆汁はNO産生を有意に抑制した。

閉黄により肝組織血流は低下するが、腸肝循環障害や bacterial translocation による血中エンドトキシン増加などにより、肝類洞や門脈系においてNO産生が亢進し、NOは肝組織血流の低下を抑制し肝保護的作用があると考えられた。また、閉黄胆汁はNO産生を抑制せず、閉黄時の胆汁はNO産生に関して生体に有利に作用することが示唆された。

Key words: nitric oxide, obstructive jaundice, bile acid, endotoxin, peripheral blood flow in the liver

はじめに

閉塞性黄疸(以下、閉黄)時には、胆汁うっ滞により肝細胞機能低下や肝組織の形態的变化、肝小葉血流のうっ滞を主体とした肝組織血流障害が生じ、術後肝不全をはじめ重篤な合併症の原因となっている。胆道系悪性腫瘍においては、術前の減黄処置が一般的とされていたが、欧米を中心に減黄処置は予後に関与しないとの報告も見られる^{1)~4)}。したがって閉黄時の肝病態の解明が予後改善に重要と考えられる。

以前より、閉黄時には肝細胞胆管系の破たんにより血中胆汁酸濃度の上昇と、胆汁中胆汁酸濃度の低下が起こることが知られている⁵⁾。特に、胆汁中胆汁酸濃度の低下は、腸管壁からのエンドトキシンの吸収を促し、門脈血中の高エンドトキシン血症、高サイトカイン血症の原因となり、これが胆汁うっ滞や肝細胞障害、肝組織血流障害の一因ではないかとの報告が見られる⁶⁾。一方で、エンドトキシンやサイトカインは、これまで種々の細胞において血管拡張物質である nitric oxide (以下、NO) 産生に関与していることが明らかにされており、肝実質細胞や Kupffer 細胞を含め、種々の細胞においてNO合成酵素(NO synthase: 以下、NOS)を誘導することが証明⁷⁾⁸⁾されている。しか

しながら、閉黄時におけるNO産生や胆汁酸のNO産生に対する影響を検討した報告は少ない。

今回閉黄ラットモデルを作製し、閉黄時におけるNO産生の有無と肝組織血流量の低下におけるNOの関与、また、閉黄ラット肝実質内の誘導型 NOS mRNA 発現の有無を検討した。NOの発現は数秒と極めて短いため、本実験ではその代謝産物である $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ を測定した。さらに、閉黄時の胆汁がNO産生に影響を与えていると考え、非黄疸ラット胆汁、閉黄ラット胆汁と各種胆汁酸のNO産生に与える影響を、培養マクロファージを用いて検討したので報告する。

方 法

1. 閉黄ラット作製

Wistar系ラット(体重250~350g)を用いネプタール(40mg/kg)腹腔内投与にて麻酔し上腹部中切開で開腹、十二指腸近傍において総胆管を二重結紮切離した。閉黄ラット群として、閉黄3日群(n=14)、5日群(n=8)、7日群(n=15)を作製し、対照群として、単開腹し総胆管の露出のみを行った sham operation ラット(n=7)を作製した。

1) 閉黄ラットにおける門脈血中総ビリルビン値、肝組織血流量とNO代謝産物の測定

門脈血中の総ビリルビン値、肝組織血流量、およびNO産生の指標としてラット門脈血 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ を測定した。

総ビリルビン値はアルカリアゾビリルビン法(日立製作所), 肝組織血流量はレーザードップラー血流計(Periflux System4000: Premid社)を用いて測定した。血流測定用プローブは, 心拍動の影響を避けるため肝中間葉下縁に固定した。NO₂⁻/NO₃⁻の測定は, 自動計測器(Model TIC-NOX1000: 東京化工工業社)を用いて以下のように行った。サンプルの作製は, Greenらの方法⁹⁾に準じて35%スルホサリチル酸0.2mlを加え血漿成分を除去, 遠沈後, 上澄液を5%NH₄Cl/5%NaOHで中和した。その後, 高性能Cd-Cuカラムを用いてNO₃⁻からNO₂⁻に還元し, Griess reagent(1% sulfonamide, 0.1% N-1-naphthyl-ethylene-diamine-dihydro-chloride, 5%H₃PO₄)を加え, 反応後のサンプルの吸光度を分光光度計を使用し540nmの波長で測定した。

2) 閉黄ラットに対するNOS阻害剤, N^o-nitro-L-arginine-methyl-ester(以下, L-NAME; Sigma社)投与の影響

L-NAMEの投与量を決定するために予備実験を行い, 至適投与量を60mg/kg/dayとし閉黄7日群の腹腔内に連日投与したL-NAME投与群(n=5)を作製した。対照は, L-NAMEを投与しない閉黄7日群(非投与群)とした。

2. 閉黄ラット肝組織における誘導体型NOS mRNAの測定

7日間閉黄としたラット, sham operationラット, およびlipopolysaccharide(E. coli type LPS; Sigma社)10mg/kgを静注し, 3時間後に肝臓を摘出したLPS投与群ラットを作製した。それぞれの肝臓を摘出後, acidguanidium-phenol-chloroform法にてtotal RNAを抽出した。それぞれ1μgのtotal RNAを用いて, reverse transcription-polymerase chain reaction(以下, RT-PCR)法で各ラット肝における誘導体型NOSおよびglyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase(以下, GAPDH)のmRNAレベルの検討を行った。RT-PCRはRNA PCR kit(Perkin Elmer)を用いて増幅は30サイクル行った。用いたprimerはNOS forward 21-mer, 5'-CTGCAGGTCCTTTGACGCTCGG-3'; NOS reverse 21-mer, 5'-GTGGAACACAGGGG-TGATGCT-3'; GAPDH forward 21-mer, 5'-GCA-GGTCTTTGACGCTCGG-3'; GAPDH reverse 21-mer, 5'-GTGGAACACAGGGGTGATGCT-3'であった¹⁰⁾¹¹⁾。その生成物を2%アガロースゲルにて電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色し撮影した。

3. 培養細胞を用いたNO産生に及ぼす胆汁および胆汁酸に関する実験

培養細胞実験には, マウスから抽出したマクロファージ様細胞株J774を用いた。J774は10%牛仔血清含有Dulbecco変法, Eagle培地にて37°Cで浮遊培養し, 実験には96-wellプレートに附着させた細胞を用いた。

J774細胞におけるNOSの誘導は1μg/mlのLPSを行い, 24時間培養後, 培養上清中のNO₂⁻濃度をGriess法⁹⁾にて測定し, 以下の検討を加えた。

1) ラット胆汁のNO₂⁻産生および細胞障害に与える影響

LPS刺激と同時に培養液に0.5, 1.25, 2.5, 5%の濃度となるよう対照ラットおよび7日間閉黄ラットの胆汁を加え, そのNO₂⁻産生に与える影響を検索した。さらに細胞呼吸障害についても検討を加えた。胆汁あるいは胆汁酸の細胞障害については, 24時間培養後のミトコンドリア依存的細胞呼吸をNTTアッセイで測定¹²⁾することによって行った。

2) 各種胆汁酸のNO₂⁻産生に与える影響

0.1, 1, 3, 10, 25, 100μMの濃度の5種類の胆汁酸(コール酸: CA, デオキシコール酸: DCA, リトコール酸: LCA, ケノデオキシコール酸: CDCA, Sigma社, およびウルソデオキシコール酸: CDCA, 東京田辺社)を加え, NO₂⁻産生に与える影響を検討した。

4. 統計学的解析

成績はmean±S.E.Mで表し, F検査にて等分散を確認後, Student's t検定を行い, 有意水準(危険度)p<0.05で有意差ありとした。

結 果

1. 閉黄ラットを用いた実験

1) 総ビリルビン値, NO代謝産物, 肝組織血流量の測定

a. 総ビリルビン値

総ビリルビン値は, 閉黄3日群から6.9±0.2mg/dlと対照群に比べ有意に増加を始め, 7日群で8.3±0.5mg/dlと最高値となった(Fig. 1)。

b. NO₂⁻/NO₃⁻値

閉黄3日群ラットでは68.9±6.5μM, 5日群ラット86.4±11.8μM, 7日群ラット120.3±18.2μMと経日的に増加を認め, 対照群に比べ全群有意差を認めた(Fig. 2)。

c. 肝組織血流量

肝組織血流量は閉黄3日群から76.1±8.0perfusion

Fig. 1 Bilirubin concentrations in portal plasma in rats with bile duct ligation. Data are means \pm SEM of n observations. * $p < 0.01$ versus control (sham operation)

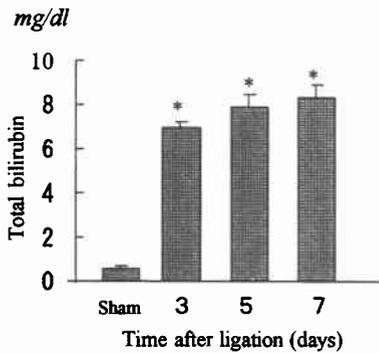
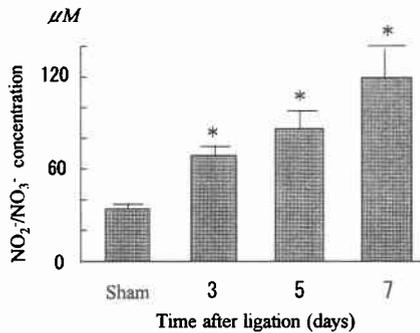


Fig. 2 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ concentrations in portal plasma in rats with bile duct ligation. Data are means \pm SEM of n observations. * $p < 0.01$ versus control (sham operation)



unit (以下, PU) と低下し, 5日群で $67.6 \pm 6.5\text{PU}$ と最低値をとり, 7日群でも有意に低値を示した (Fig. 3).

2) L-NAME 投与による変化

L-NAME 投与群の門脈血中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ は $51.0 \pm 3.1 \mu\text{M}$ と非投与の $115.6 \pm 11.3 \mu\text{M}$ と比べ, 明らかに減少した. 肝組織血流量においても, 投与群では $47.8 \pm 3.1 \text{PU}$ と非投与群の $75.9 \pm 5.9\text{PU}$ に比べ有意な低下を認めた (Fig. 4).

2. 肝組織内誘導型 NOS mRNA

対照ラット肝組織内には誘導型 NOS mRNA は検出されなかったが, LPS 投与ラット肝組織には明白な NOS mRNA が認められた. 7日間閉塞ラットにおいては, LPS 投与ラットよりも低いレベルではあるが,

Fig. 3 Peripheral blood flow of the liver in rats with bile duct ligation. Data are means \pm SEM of n observations. * $p < 0.01$ versus control (sham operation).

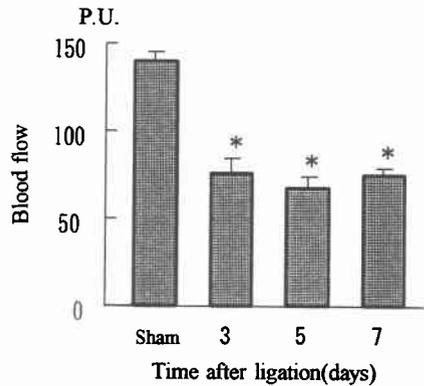


Fig. 4 Effect of L-NAME treatment in vivo on $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ concentration in portal plasma and peripheral blood flow of the liver in rats with bile duct ligation. Data are means \pm SEM of n observations. ** $p < 0.01$ * $p < 0.05$ versus no L-NAME.

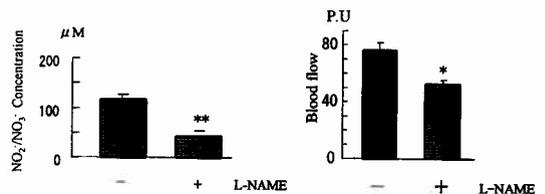
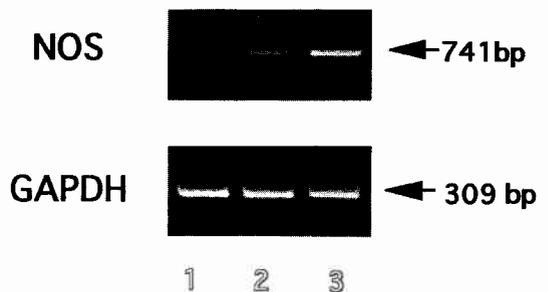


Fig. 5 The inducible NOS mRNA expression in the rat liver. The rats were untreated (1), bile duct ligated for 7days (2), or LPS treated (10mg/kg, IV, 3hs) (3). Arrows indicate the predicted size of the PCR products.



明らかに NOS mRNA の誘導が見られた. 一方, RT-PCR の対照として検討した GAPDH の mRNA レベルには, これらのラット間で差は認められなかった

Fig. 6 Effect of whole bile juice on nitrite production and cellular respiration in LPS-stimulated J774 cells. Cells were treated with LPS (1 μ g/ml) in the presence of various concentrations of bile juice from control rat (■) or bile duct ligated rat (▨) for 24hrs, after which nitrite accumulation in the culture medium (A) and cellular respiration (MTT values) (B) were measured. Data are means \pm SEM of triplicate determinations. ** p <0.01 versus control (no bile juice)

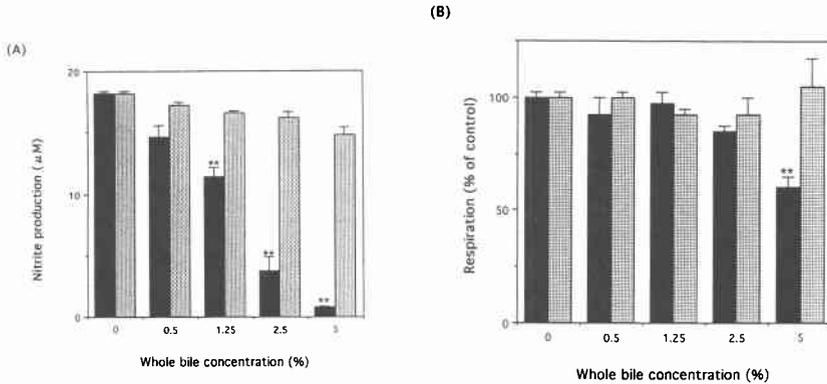
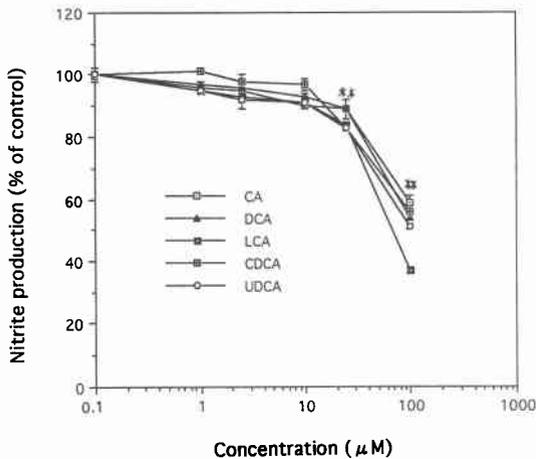


Fig. 7 Effect of bile acids on nitrite production in LPS-stimulated J774 cells. Cells were treated with LPS (1 μ g/ml) in the presence of various concentration of bile acids for 24hrs, after which nitrite accumulation in the culture medium were measured. Data are means \pm SEM of triplicate determinations. ** p <0.05 versus 0.1 μ M



(Fig. 5).

3. 培養細胞を用いた実験

1) ラット胆汁の NO₂⁻産生および細胞障害に与える影響

対照ラット胆汁は、閉黄ラット胆汁に比べ有意に NO₂⁻産生を抑制し、その抑制は濃度依存的であった

(Fig. 6A). 0.5, 1.25, 2.5, 5%の濃度で、閉黄ラット胆汁では細胞呼吸障害は認められなかった。対照ラットでは5%の濃度で閉黄胆汁と比較して有意な細胞呼吸障害を示した (Fig. 6B).

2) 各種胆汁酸の NO₂⁻産生に与える影響

検討した5種類の胆汁酸は、25, 100 μ Mの濃度で NO₂⁻産生を抑制した (Fig. 7).

考 察

NOはL-アルギニンからNOSによって産生されるが、NOSには複数のイソフォームが存在する⁷⁾⁸⁾。すなわち、Ca²⁺によって活性化される構成型NOSとしては脳型および血管内皮型があり、一方、Ca²⁺非依存性である誘導型NOSは、マクロファージをはじめ種々の細胞においてエンドトキシンやサイトカイン刺激によって発現することが知られている⁸⁾。

NOの有する多彩な作用は、広範な臓器組織にわたりその機能や病態に関与していることが明らかにされてきた¹²⁾¹³⁾。特に肝臓においても多くの役割を有することが既に報告されている^{7)14)~19)}。in vivoでは、NOが肝内血栓の形成を抑制したり²⁰⁾、LPS刺激によりNOを産生させたマウスで、NOS阻害剤の投与によりさらに肝障害が増悪した報告¹⁴⁾や、LPSを投与したラットでは、NOの産生は認められるがミトコンドリア機能には低下を来さない報告¹⁶⁾など cytoprotectiveな報告が多い。一方で、in vitroにおいては、肝細胞やマクロファージで産生されたNOが、肝細胞の蛋白合

成能²¹⁾²²⁾やミトコンドリア機能を低下²³⁾させるといった cytotoxic な報告も見られ、NO の評価にはいまだ議論が多い。

閉黄時には胆汁の欠如により腸内細菌の増殖が起これ、腸管壁からのエンドトキシンの吸収が促進される。さらに網内系機能低下による spillover 現象により血中エンドトキシンが出現するものと考えられる。閉黄時には門脈血中エンドトキシンはしばしば高値を示し²⁴⁾²⁵⁾、このエンドトキシンは類洞内 Kupffer 細胞により処理され、この際、Kupffer 細胞は、腫瘍壊死因子 (TNF)、IL-1などのサイトカインや炎症性メディエーターを産生分泌すると考えられている。これらのサイトカインはエンドトキシンと相乗的に作用し、肝組織に NOS を誘導するものと考えられている²⁰⁾。

今回の検討においては、閉黄ラット門脈血中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 濃度は明らかに増加しており、この上昇は NO 合成酵素阻害剤である L-NAME の投与により抑制され、無処置ラットの $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 濃度とほぼ同じであった。このことより、閉黄ラット門脈血中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 濃度上昇は NOS により産生された NO に由来するものと考えられた。L-NAME の投与量については、予備実験を行い決定した。すなわち、それぞれ 100, 80, 60, 40 mg/kg/day を投与したラットを作製したところ、100, 80mg 投与のラットは全例死亡し、60mg 投与ラットは 1 週間の生存が得られ、また、 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 濃度の抑制が認められた。40mg 投与ラットでは、1 週間の生存は得られたが $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 濃度の抑制が認められなかった。以上の結果から、60mg/kg/day を至適投与量として投与した。

閉黄ラット肝組織内には誘導型 NOS mRNA の発現が確認されたことから、門脈血中 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 濃度の経時的増加は構成型 NOS の活性化ではなく、誘導型 NOS によるものと考えられた。ラジカルである NO は発現時間が数秒と極めて短く、そのほとんどの作用は局所で発揮されると考えられるので、閉黄時の肝臓内で NO が役割を果たすとすれば、肝内で合成されることが前提となる。閉黄時のラット肝臓組織に NOS mRNA が誘導されたという事実は、産生された NO が少なくとも肝臓組織内において合成されたものであることを裏づけている。

肝組織血流量を検討すると、閉黄ラット群では、7 日目まで対照群ラットに比べ有意に低下した。閉黄 7 日群ラットに対し L-NAME を投与すると、肝組織血流量は非投与群に比べさらに低下した。このことから、

NO が肝組織血流量においては維持機構の一部を担う細胞保護的な作用があることが示唆された。エンドトキシン血症時の肝障害に、NO が肝組織血流維持機構をはじめとする肝組織の保護、機能改善の方向に作用しているという報告¹⁷⁾²³⁾とを併せると、本病態における NOS 誘導も肝血流保持を含め、肝組織保護に働いている可能性が考えられた。

閉黄による NO 産生について、腸肝循環障害や bacterial translocation などの影響を除いて検討するために in vitro での実験を行った。培養細胞に胆汁を加えることで、胆汁自体の NO 産生に対する効果を検討した。その結果、対照ラットの非黄疸胆汁は、有意差をもって濃度依存的に NO 産生を抑制し、5% の濃度では細胞呼吸も抑制した。それに対し、7 日間閉黄ラットの閉黄胆汁は、NO 産生を抑制せず、また、細胞呼吸の障害も行わなかった。in vitro の条件では、非黄疸胆汁と閉黄胆汁に NO 産生や細胞障害に対する有意な差が認められた。この結果から閉黄の状態では、黄疸胆汁と非黄疸胆汁との間に胆汁成分の差において NO 産生に対する相違があることが示唆された。

この実験で閉黄胆汁として用いたのは、閉黄 7 日目の胆汁である。黄疸胆汁は、非黄疸胆汁と比較して胆汁酸濃度が低いことが考えられる。そのため、胆汁酸の NO 産生に関する影響を in vitro で検討した。その結果、CA, DCA, LCA, CDCA, UDCA のすべての胆汁酸で、25, 100 μM の濃度で NO 産生を抑制した。これより、胆汁酸には NO 産生抑制効果があることが示唆された。前記の培養実験では、閉黄胆汁は非黄疸胆汁と異なり NO 産生を抑制せず、細胞障害の誘導も認めなかった。その原因として、胆汁酸濃度の低下が 1 つの因子になると考えられた。

以上の結果から、閉黄時における肝組織血流量に対しての NO の意義について、以下のように考えられる。すなわち、閉黄時の肝組織血流量は、閉黄 3 日目には対照群の約 50% まで低下した。それに対して、腸間膜の微小循環を含めた門脈系において NO 産生が亢進し、肝臓においても誘導型 NOS mRNA が発現し NO 産生が亢進した。そのため、閉黄による肝組織血流量の低下が阻止され、閉黄後 7 日目まで肝組織血流量は閉黄前の約 50% で維持されると考えられた。また、NO の肝組織血流量に対する維持効果は、L-NAME 投与により肝組織血流量が低下することでも明らかであった。

NO 発現の機序としては、前述したように腸肝循環

障害などに起因する Kupffer 細胞からのサイトカイン分泌が関与していると考えられる。また, *in vitro* において非黄疸胆汁では NO 産生抑制効果があることが認められた。しかし, 閉黄疸胆汁では非黄疸胆汁と異なり, 胆汁酸濃度が低いことなどにより, NO 産生を抑制せず, 細胞呼吸障害も認めなかった。このことから, 閉黄疸胆汁の組成は閉黄時の NO による肝組織血流量維持に対して, 有利に働いていると考えられる。これらの機序により NO はサイトカインネットワークによる生体防御機構の調整因子として, 細胞保護的に存在していると考えられた。

稿を終えるにあたり, 御指導を賜りました獨協医科大学第2外科小暮洋暉教授に深謝致します。また, 終始御指導賜りました同内分科服部良之助手, 中村 勤講師, 第2外科木多秀彰助手に感謝致します。

本論文の要旨は第32回日本臨床代謝学会総会(1995年4月, 大阪), 第46回日本消化器外科学会総会(1995年7月, 福井)において発表した。

文 献

- 1) Hatfield AR, Tobias R, Terblanche J et al: Preoperative external biliary drainage in obstructive jaundice. A prospective controlled clinical trial. *Lancet* 23 : 896-899, 1982
- 2) McPherson GA, Benjamin IS, Hodson HJF et al: Preoperative percutaneous transhepatic biliary drainage: The result of a controlled trial. *Br J Surg* 71 : 371-375, 1984
- 3) Pellegrini CA, Allegre P, Bongard FS et al: Risk of biliary surgery in patients with hyperbilirubinemia. *Am J Surg* 154 : 111-117, 1987
- 4) 井手雄幸: 閉塞性黄疸解除後の黄疸遷延因子としてのエンドトキシン血症に関する実験的検討。日外会誌 8 : 809-815, 1993
- 5) Deitch EA, Sitting K, Li M et al: Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg* 159 : 79-84, 1990
- 6) 初瀬一夫, 斉藤 理, 青笹李文ほか: 閉塞性黄疸の減黄術後黄疸遷延因子に関する臨床的, 実験的検討。日消外会誌 24 : 2517-2522, 1991
- 7) Stark ME, Szurszewski JH: Role of nitric oxide in gastrointestinal and hepatic function and disease. *Gastroenterology* 103 : 1928-1949, 1992
- 8) Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6 : 3051-3064, 1992
- 9) Green LC, Wagner DA, Glogowski J et al: Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 126 : 131-138, 1982
- 10) Lin S, Adcock IM, Old RW et al: Lipopolysaccharide treatment *in vivo* induced widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 3 : 1208-1213, 1993
- 11) Terada Y, Tomita K, Noguchi H et al: Polymerase chain reaction localization of constitutive nitric oxide synthase and soluble guanylate cyclase messenger RNAs in microdissected rat nephron segment. *J Clin Invest* 90 : 659-665, 1992
- 12) Gross SS, Levi R: Tetrahydro-biopterin synthesis: An absolute requirement for cytokine-induced nitric oxide generation by vascular smooth muscle. *J Biol Chem* 267 : 25722-25729, 1992
- 13) Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacol Rev* 2 : 109-142, 1991
- 14) Biliar TR, Curran RD, Harbrecht BG et al: Modulation of nitrogen oxide synthesis *in vivo*: N^G-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin induced nitrite/nitrate bio-synthesis while promoting hepatic damage. *J Leukoc Biol* 48 : 565-569, 1990
- 15) Billiar TR, Curran RD, Ferrari FK: Kupffer cell: Hepatocyte cocultures nitric oxide in response to bacterial endotoxin. *J Surg Res* 48 : 349-353, 1990
- 16) Stadler J, Curran RD, Ochoa JB et al: Effect of endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes *in vitro* and *in vivo*. *Arch Surg* 126 : 186-191, 1991
- 17) Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J et al: Nitric oxide synthesis serves to reduce hepatic damage during acute murine endotoxemia. *Crit Care Med* 20 : 1568-1574, 1992
- 18) Frederick JA, Hasselgren PO, Davis S et al: Nitric oxide may upregulate *in vivo* hepatic protein synthesis during endotoxemia. *Arch Surg* 128 : 152-156, 1993
- 19) Stadler J, Harbrecht BG, Di-Silvio M et al: Endogenous nitric oxide inhibits the synthesis of cyclooxygenase products and interleukin-6 by Kupffer cells. *J Leukoc Biol* 53 : 16-172, 1993
- 20) Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J et al: Inhibition of nitric oxide synthesis during endotoxemia promotes intrahepatic thrombosis and an oxygen radical-mediated hepatic injury. *J Leukoc Biol* 52 : 390-394, 1992

- 21) Curran RD, Billar TR, Stuehr DJ et al: Multiple cytokines are required to induce hepatocyte nitric oxide production and inhibit total protein synthesis. *Ann Surg* 212 : 462—469, 1990
- 22) Billar TR, Curran RD, Stuehr DJ et al: An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis *in vitro*. *J Exp Med* 169 : 1467—1472, 1989
- 23) Curran RD, Ferrari FK, Kispert PH et al: Nitric oxide and nitric oxide generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis. *FASEB J* 5 : 2085—2092, 1991
- 24) Nakagawa K, Matsubara T, Ouchi K et al: Endotoxemia after abdominal surgery. *Tohoku J Exp Med* 150 : 273—280, 1986
- 25) 高木啓介: 閉塞性黄疸における肝流入血行遮断下肝切除後の病態に関する実験的研究. *肝臓* 35 : 39—50, 1994

Experimental Study on Hepatic Cytoprotective Function of Nitric Oxide in Obstructive Jaundice

Mitsugi Shimoda

Second Department of Surgery, Dokkyo University School of Medicine

Obstructive jaundice is closely associated with endotoxemia. Bacterial endotoxin (LPS) and proinflammatory cytokines induce nitric oxide (NO) synthase in various organs *in vivo* as well as in a variety of cells *in vitro*. I investigated whether NO production is increased in obstructive jaundice by determining $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ levels in portal plasma of common bile duct-ligated rats. While the $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ levels in portal plasma of control rats did not change during the observation, a gradual increase up to day 7 was seen after the ligation. Although the NO synthase mRNA in the liver was undetectable before the bile duct ligation, it was substantially induced by day 7 following the ligation. A decreased peripheral blood flow in the liver was observed in the bile duct-ligated rats, which was further reduced by treatment of the rats with the NO synthase inhibitor, L-NAME. I also investigated the effect of bile acids on the induction of NO synthase in LPS-stimulated J774 macrophages. Whole bile from control rats and, to a lesser extent, from the bile duct ligated-rats inhibited NO synthase induction in macrophages. Five different bile acids (cholic acid, lithocholic acid, chenodeoxycholic acid and ursodeoxycholic acid), all inhibited NO synthase with similar dose dependency. In conclusion, obstructive jaundice is associated with increased NO production which is derived from induced NO synthase. Elevated NO may play an important role in obstructive jaundice, especially in the peripheral blood flow in the liver.

Reprint requests: Mitsugi Shimoda Second Department of Surgery, Dokkyo University School of Medicine
880 Kitakobayashi, Mibumachi, Shimotsuga-gun, Tochigi, 321-02 JAPAN