

文章编号:1005-6947(2008)08-0773-04

· 基础研究 ·

冷缺血与热缺血对大鼠肝细胞凋亡的影响

宋忠于, 元文勇, 叶启发, 任祖海, 刘海, 明英姿, 蒋圣军

(中南大学湘雅三医院 器官移植医学研究院, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 观察冷保存与热缺血对大鼠肝细胞凋亡的影响。方法 用流式细胞检测技术, 分组检测冷保存时和热缺血时的肝细胞凋亡率与增殖率。结果 冷保存时各组之间的肝细胞凋亡率与增殖率差异无显著性($P > 0.05$); 随着热缺血时间的延长, 细胞凋亡率明显加重($P < 0.05$), 但细胞增殖率的改变不明显($P > 0.05$)。结论 大鼠肝脏冷保存/再灌注时肝细胞凋亡可能在有氧再灌注后加重; 大鼠肝脏热缺血/再灌注时肝细胞凋亡可能在缺血时和再灌注后均可加重。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(8):773-776]

关键词: 肝脏/血液供给; 缺血再灌注损伤; 细胞凋亡; 大鼠

中图分类号: R 364.2

文献标识码: A

The impact of cold preservation and warm ischemia on hepatocytes apoptosis in rats

SONG Zhongyu, YUAN Wenyong, YE Qifa, REN Zuhai, LIU Hai, MING Yingzi, JIANG Shengjun

(Xiangya Institute of Organ Transplantation, the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of cold preservation and warm ischemia on apoptosis of hepatocytes in rats. **Methods** The hepatocyte apoptosis rate and regenerative rate of cold preservation group and warm ischemia group were detected and compared through flow cytometry. **Results** There was no difference in the hepatocyte apoptosis rate and regenerative rate ($P < 0.05$) at different time points during cold preservation. The hepatocyte apoptosis rate increased as the warm ischemia with time increased ($P < 0.05$); whereas there was no difference in regenerative rate ($P > 0.05$). **Conclusions** The hepatocyte apoptosis of rats is more severe after aerobic reperfusion during cold preservation/reperfusion. It is more severe after ischemia and reperfusion during warm ischemia/reperfusion periods.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(8):773-776]

Key words: liver/ blood supply; Ischemia Reperfusion Injury; Apoptosis; Rats

CLC number: R 364.2

Document code: A

以往研究认为, 细胞坏死是器官移植缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤的主要病理改变。近年来大量实验证实, 细胞凋亡也参与肝脏的 I/R 损伤。而且在肝脏 I/R 损伤后, 肝细胞的凋亡与增殖同时存在, 说明肝组织的重塑受到两者的双重调控。在肝脏遭受 I/R 打击时, 组织

受损不仅来自 I/R 的直接作用, 同时凋亡机制的启动与放大后所造成的组织坏死同样也参与肝组织的损伤过程, 使肝组织的修复达到增殖与凋亡处于平衡状态^[1]。研究表明, 这种改变可能在冷保存和早期的热缺血时已开始存在。因此, 本实验用流式细胞检测技术中常用的细胞凋亡 (PI 染色后在 G_0/G_1 峰下的阳性细胞率, 即早期活细胞凋亡率, 简称 PI 阳性率) 和细胞增殖 (细胞增殖期特异性核抗原 Ki-67 的 FITC 标记抗体染色阳性细胞率, 简称 Ki-67 阳性率) 的检测方法, 分别观察冷保存和热缺血对肝细胞早期凋亡与增殖的影响。

收稿日期: 2008-03-17; 修订日期: 2008-07-09。

作者简介: 宋忠于, 男, 中南大学湘雅三医院博士研究生, 从事肝肾移植的临床和实验方面的研究。

通讯作者: 元文勇 E-mail: yuan_521@tom.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验动物及分组 雄性 Wistar 大鼠36只, 购于湖南农业大学实验动物中心, 体重250~300 g, 动物术前12 h 禁食, 术前6 h 禁食水。将动物随机分为冷缺血和热缺血2个大组。第一组再分为用保存液(4℃ -6℃的HTK溶液)冷缺血0, 24 h 和48 h; 第二组分为用磷酸盐缓冲液(PBS溶液)常温下(25℃)缺血0, 60 min 和90 min组。每小组6只。

1.1.2 主要试剂 PI溶液(碘化丙啶, 分析纯, 美国BD公司)的配置方法: 储存母液 = PI粉剂5 mg + 0.15 mol/L PBS 10 mL + Triton X100 0.1 mL + EDTA 0.7 mg; 临用时配制成子液(子液 = 母液10 μL + 0.15 mol/L PBS 500 μL)。FITC标记羊抗鼠Ki-67抗体(美国BD公司)。HTK溶液(德国DR. Franz Koehler Chemie GmbH公司生产), 根据Bretschneider配方制成组氨酸-色氨酸-酮戊二酸保存液(histidine-tryptophan-ketoglutarate solution)。

1.1.3 主要仪器 FACS Calibur型流式细胞仪(美国BD公司); Centrifuge 5415R型低温变速离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 冷缺血组 动物麻醉后, 切断肝上下腔静脉将动物处死, 经门静脉注入冷HTK溶液约20 mL冲洗后, 切取左中叶肝脏组织, 放入冷HTK液中, 于4℃冰箱中保存0, 24, 48 h 以备制成细胞悬液用。

1.2.2 热缺血组 动物麻醉后, 正中切开腹壁, 于双侧膈下及肝下滴入10%水合氯醛1~2 mL(根据术中麻醉效果可补加药量)。用无菌纱布保护切口, 向两侧拉开腹壁, 剪断肝周各韧带及肝胃韧带, 用眼科镊分离左中肝叶的胆管及动脉、门静脉。用无损伤血管夹阻断左中肝叶的动脉及门静脉血流(不夹闭胆管), 建立大鼠肝脏局部缺血模型。于阻断0, 60, 90 min时, 切断肝上下腔静脉将动物处死, 经门静脉注入冷0.15 mol/L磷酸盐缓冲液(PBS)约20 mL冲洗后, 切取左中叶肝脏组织, 放入冷0.15 mol/L PBS中, 以备进一步制成细胞悬液用。

1.2.3 流式细胞仪检测 (1)细胞悬液的制备: 将各组肝组织块放入4℃0.15 mol/L PBS中, 清除多余组织和血块后, 置于玻璃皿中用眼科剪刀剪碎成0.1 mm × 0.1 mm × 0.1 mm, 再放入4℃0.15 mol/L PBS中, 用200目滤网过滤, 将滤液以1 000 r/min离心5 min, 收集沉淀。吹打, 并放入4℃0.15 mol/L PBS 10 mL, 用400目滤膜过滤;

将滤液1 000 r/min离心5 min, 取沉淀, 放入80%乙醇2~3 mL稀释, 存放于-20℃冰箱中过夜。冰箱中的标本加入4℃0.15 mol/L PBS 10 mL, 洗2次, 取沉淀用4℃0.15 mol/L PBS 10 mL稀释, 用400目滤膜再次过滤; 将滤液1 000 r/min离心5 min, 取沉淀加入4℃0.15 mol/L PBS 1~3 mL稀释(细胞数达到 1×10^6 /mL)。(2)阳性细胞的检测: 按照试剂盒说明, 取各组细胞悬液样本20 μL, 分别加入FITC标记的Ki-67抗体和已配制的PI溶液各30 μL, 混匀后在常温下避光反应30 min染色; 加入300 μL 0.15 mol/L PBS液, 振荡混匀后上机检测每 10^4 个细胞中的阳性细胞率(图1-2)。

1.3 统计学处理

所有数据用SPSS12.0.1 Windows中文版软件处理, 行方差分析和t检验。数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结 果

2.1 冷缺血对大鼠肝细胞PI及Ki-67表达的影响

各组之间的PI及Ki-67差异无显著性, 但随着冷保存时间的延长细胞增殖率有上升的趋势; 细胞凋亡率在冷保存24 h组有所上升, 但不明显(表1)。

2.2 热缺血对大鼠肝细胞PI及Ki-67表达的影响

结果表明, 热缺血时间延长时细胞凋亡明显加重($P < 0.05$), 但细胞增殖的改变不明显(表2)。

表1 冷保存后大鼠肝细胞Ki-67阳性率与PI阳性率的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ki-67阳性率(%)	PI阳性率(%)
冷保存0 h	6	1.9067 ± 0.82286 ¹⁾	2.6500 ± 0.88654
冷保存24 h	6	1.7817 ± 2.52372 ¹⁾	3.3133 ± 4.33438
冷保存48 h	6	4.0867 ± 5.82160	2.7217 ± 3.85486

注:1)与48h组比较 $P > 0.05$

表2 热缺血后大鼠肝细胞Ki-67阳性率与PI阳性率的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ki-67阳性率(%)	PI阳性率(%)
热缺血0 min	6	7.9533 ± 5.19233	4.0767 ± 1.76479
热缺血60 min	6	6.0100 ± 5.80069	1.4983 ± 0.33427
热缺血90 min	6	6.3067 ± 6.00245	6.1000 ± 3.88642 ¹⁾

注:1)与热缺血0min组比较(LSD法) $P < 0.05$ 。

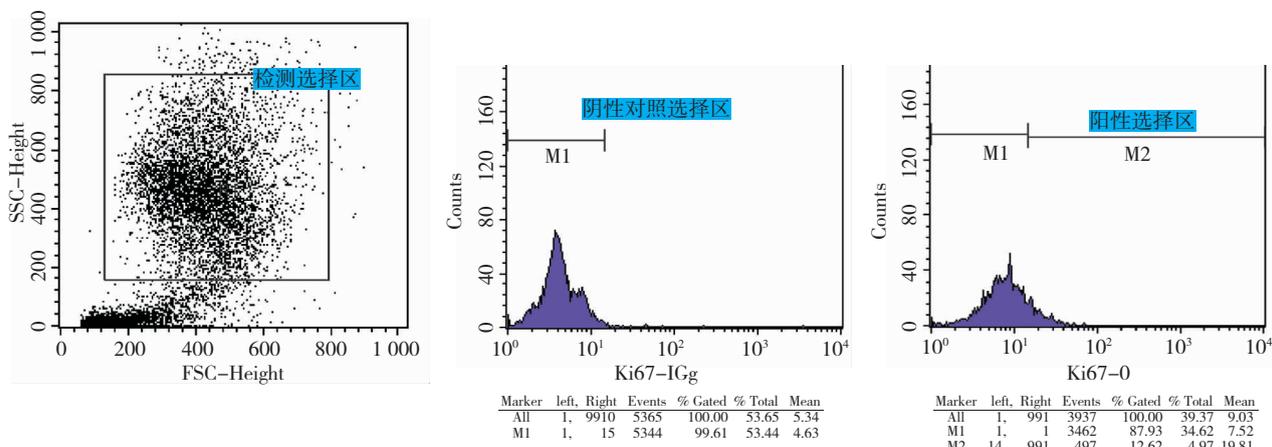


图1 Ki-67 阳性率检测示意图(取 M2 % Total 统计)

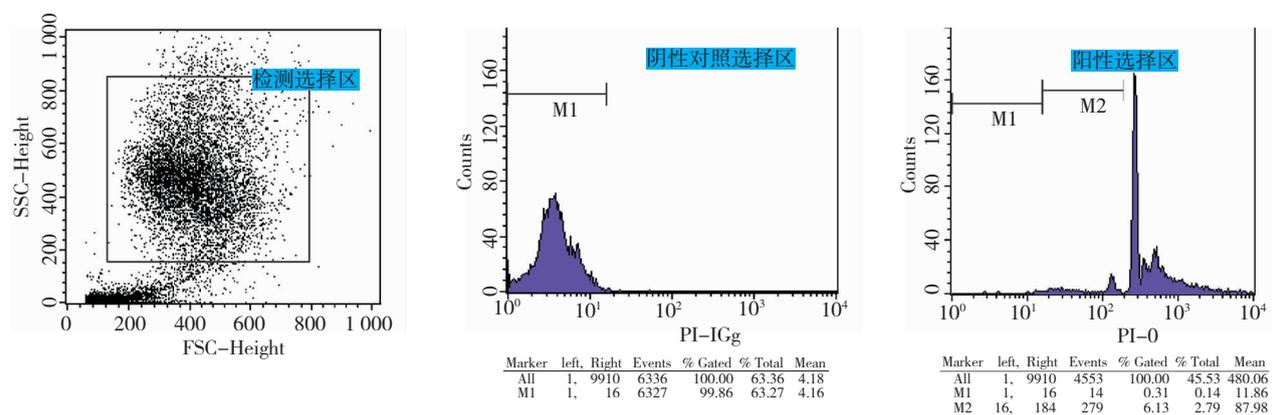


图2 PI 阳性率检测示意图(取 M2 % Total 统计)

3 讨论

3.1 冷保存损伤与再灌注的关系

移植肝脏原发性无功能是肝移植术后死亡的主要原因,认为与肝移植低温保存再灌注损伤密切相关^[2];肝脏冷保存时,肝窦内皮细胞、Kupffer(库普弗)细胞最早出现受损。Mckeown 等^[3-4]对长时间冷保存引起的无功能大鼠肝脏进行形态学检查,未发现肝细胞有明显变化,但肝窦内皮细胞出现核变性,细胞肿胀、脱落并游离到肝窦腔内,最终肝窦壁正常结构遭到破坏。此外临床上用 UW 液保存并于移植后保持良好功能的肝脏,移植前行组织学检查,发现无明显细胞死亡,但均有肝窦内皮细胞和 Kupffer 细胞变性和活化,而且这种形态变化在再灌注后仍然存在,相反肝细胞几乎无明显组织形态学改变^[5]。还有报道称,在小鼠原位肝移植模型中,随着移植肝在冷

UW 液中保存时间的延长,移植后动物长期生存率逐渐降低;当保存时间 ≥ 16 h 时,长期生存率为 0%^[6]。提示虽然在低温保存期间并未发生细胞坏死等明显的组织学改变,但其对肝脏的损伤,如细胞凋亡等是有影响的^[7]。

本实验结果显示,冷保存 24 h 内的 PI 阳性率(反映肝细胞凋亡率)和 Ki-67 阳性率(反映细胞增殖率)无明显变化,但冷保存 48 h 时肝细胞有增殖的趋向。因为细胞增殖相对反映细胞死亡后“应激”情况,因此可认为冷保存对肝细胞有损伤作用;但对活动相对静止的肝细胞,暂未见其相对应的明显反应。这种外界刺激会在受刺激细胞“苏醒”后使其作出明显的反应,如肝脏低温保存后再灌注时。研究结果表明,低温保存时间越长的供肝,再灌注后凋亡细胞数量越多,而且导致细胞凋亡的关键因素是冷缺血后的有氧再灌注^[8]。

3.2 热缺血对大鼠肝细胞的影响

一般认为,热缺血造成的损伤直接影响供肝的活力及移植后肝功能的恢复。热缺血对肝细胞的损伤主要是缺氧引起的。缺氧时,线粒体内的氧化磷酸化受到抑制,ATP主要来源于糖酵解。由于无氧代谢细胞内乳酸堆积以及线粒体氧化磷酸化低下,导致pH值降低,加重磷脂酶、蛋白酶等对细胞的损伤。当糖酵解产生的ATP不足时,依赖ATP的各种细胞活动将停止。缺氧时,首先线粒体功能受到影响,线粒体电子传递链的终末阶段,接受电子氧的供应停止。当组织缺血30 min时线粒体形态发生改变,基质颗粒消失,2~4 h内细胞明显肿胀,线粒体膜通透性突然增大,粗面内质网破裂。随着缺氧时间的延长,线粒体出现不可逆的损伤。线粒体内Ca²⁺的聚集、氧自由基的生成、线粒体外膜的窗孔变大,引起线粒体肿胀,外膜破裂,胞浆内释出细胞色素C(cytochrome C, cytC)等诱导凋亡的物质^[9-10],导致细胞的程序性死亡或坏死^[11-12]。

本实验发现,大鼠肝脏缺血60 min时(此时肝脏处于损伤可复性阶段^[13-14])未见到细胞凋亡与增殖的明显变化,但缺血90 min时细胞凋亡明显加重,而细胞增殖不明显。说明随着热缺血时间的延长,肝细胞的凋亡也加重;细胞增殖反应也许是凋亡引起的连锁反应、是“适应性细胞保护机制”的一种元素之一。因此发生明显改变出现的时间相对较晚。

总之,大鼠肝脏冷保存后的肝细胞凋亡,可能在有氧再灌注后加重;大鼠肝脏热缺血/再灌注时肝细胞凋亡可能在缺血时和再灌注后均可加重。

参考文献:

[1] Ronco MT, de Alvarez ML, Monti J, *et al.* Modulation of balance between apoptosis and proliferation by lipid peroxidation (LPO) during rat liver regeneration [J]. *Mol Med*, 2002, 8 (12): 808 - 817.

[2] Yuxin C. Perfusion and cold injury play an important role in

liver preservation [J]. *Transplantation Proceeding*, 1998, 30 (6): 3688 - 3691.

- [3] McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, *et al.* Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat [J]. *Transplantation*, 1988, 46 (2): 178 - 191.
- [4] 武钧, 毛恩强, 李建芳, 等. 肝缺血/再灌注损伤时内皮祖细胞的变化 [J]. *肝胆外科杂志*, 2006, 14 (3): 228 - 231.
- [5] Carles J, Fawaz R, Hamoudi NE, *et al.* Preservation of human liver grafts in UW solution. Ultrastructural evidence for endothelial and Kupffer cell activation during cold ischemia and after ischemia-reperfusion [J]. *Liver*, 1994, 14 (1): 50 - 56.
- [6] Que X, Debonera F, Xie J, *et al.* Pattern of ischemia reperfusion injury in a mouse orthotopic liver transplant model [J]. *J Surg Res*, 2004, 116 (2): 262 - 268.
- [7] 林民专, 夏穗生, 姜汉英, 等. 大鼠肝脏保存中不同器官保存液对肝细胞凋亡的影响 [J]. *中华器官移植杂志*, 2000, 21 (1): 42 - 43.
- [8] 董树虹, 董家鸿, 张玉君, 等. SWH液对大鼠肝脏保存中肝细胞凋亡的影响 [J]. *消化外科*, 2004, 3 (5): 355 - 359.
- [9] Lemasters JJ, Qian T, He L, *et al.* Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis, and autophagy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4 (5): 769 - 781.
- [10] Hatano E, Bradham CA, Stark A, *et al.* The mitochondrial permeability transition augments Fas-induced apoptosis in mouse hepatocytes [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275 (16): 11814 - 11823.
- [11] Kim JS, Qian T, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in the switch from necrotic to apoptotic cell death in ischemic rat hepatocytes [J]. *Gastroenterology*, 2003, 124 (2): 494 - 503.
- [12] 牛英, 叶启发, 肖建生, 等. 缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤后c-fos和c-jun蛋白表达的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, (5): 388 - 390.
- [13] 何晓顺, 马毅, 陈规划, 等. 大鼠肝脏热缺血损伤后组织学与超微结构变化的动态观察 [J]. *中华实验外科杂志*, 2002, 19 (3): 249 - 251.
- [14] 张岚, 杨侠, 杨宪法, 等. 缺血再灌注对肝癌组织及正常肝组织的损伤 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, (8): 783 - 785.