

文章编号:1005-6947(2007)03-0240-05

· 基础研究 ·

# 供肝缺血预处理对大鼠肝移植缺血再灌注损伤的保护性作用

屈新才<sup>1</sup>, 王继亮<sup>1</sup>, 秦涛<sup>2</sup>, 郑启昌<sup>1</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 普通外科, 湖北 武汉 430022; 2. 河南省人民医院 普通外科, 河南 郑州 450003)

**摘要:**目的 探讨供肝热缺血预处理对大鼠供肝冷缺血再灌注(I/R)损伤中的保护作用及其机制。方法 采用SD大鼠建立原位肝移植动物模型,供肝冷缺血期为120 min,受体无肝期16~20 min。随机分为3组:假手术组,获取供肝前仅作肝脏周围韧带的解剖;肝移植组,获取供肝前不作肝门阻断;缺血预处理(IPC)组,获取供肝前阻断肝门5 min,再灌注5 min。术后2,4,24,72 h检测血清ALT、抗氧化酶活力、血清NO水平及细胞因子TNF- $\alpha$ 。结果 肝移植组及IPC组术后ALT及过氧化物含量均明显高于假手术组,而IPC组低于肝移植组( $P < 0.05$ ),其抗氧化酶活力较移植组明显升高( $P < 0.05$ );NO水平在IPC术后2,4,24,72 h均显著高于假手术组,72 h时肝移植组明显高于IPC组及假手术组( $P < 0.05$ ),而IPC组高于假手术组;肝移植组血清中TNF- $\alpha$ 释放明显高于假手术组( $P < 0.05$ );IPC组TNF- $\alpha$ 的释放显著低于肝移植组( $P < 0.05$ )。结论 供肝热缺血预处理对大鼠供肝冷缺血I/R损伤具有明显保护作用;其机制可能是IPC快速提高并稳定了血清中NO水平,降低了炎性细胞因子TNF- $\alpha$ 的产生,从而减少移植肝细胞的损害。

[中国普通外科杂志,2007,16(3):240-244]

**关键词:** 肝移植; 缺血预处理; 缺血再灌注; 一氧化氮; 肿瘤坏死因子 $\alpha$ ; 鼠科

中图分类号:R333.4

文献标识码:A

## Protective effect of ischemic preconditioning on liver ischemic-reperfusion injury of liver transplant in rats

QU Xin-cai<sup>1</sup>, WANG Ji-liang<sup>1</sup>, QIN Tao<sup>2</sup>, ZHENG Qi-chang<sup>1</sup>

(1. Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430022, China; 2. Department of General Surgery, Henan Province People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

**Abstract: Objective** To investigate the protective effect and mechanism of warm ischemic preconditioning of on liver cold ischemic-reperfusion injury of donor liver in rats. **Methods** Male Sprague Dawley rats were used as donors and recipients of orthotopic liver transplantation, the cold ischemia period and anhepatic phase was 120 min and 16~20 min respectively. Rats were randomly divided into 3 groups: sham-operation group, liver transplantation group, and ischemic pre-conditioning (IP) group. IP was performed with 5-min ischemia followed by 5-min reperfusion. **Results** After operation, the serum levels of ALT and superoxide were significantly higher in the groups of liver transplantation and IP group than in the sham-operation group ( $P < 0.05$ ), and they were lower in IP group than those in liver transplantation group ( $P < 0.05$ ), but activity of anti-oxidase was higher in IP group ( $P < 0.05$ ). Plasma NO concentrations were marked higher in the groups of liver transplantation and IP at 2 h, 4 h, 24 h and 72 h after operation than those in sham-

收稿日期:2005-12-12; 修订日期:2007-01-05。

**作者简介:**屈新才,男,湖北汉川人,华中科技大学同济医学院附属协和医院副教授,主要从事肝胆外科及乳腺甲状腺外科方面的研究。

**通讯作者:**郑启昌 E-mail:quxc2000@yahoo.com.cn。

operation group ( $P < 0.05$ ), and at 72 h were higher in liver transplantation than those in IP and sham-operation group, and higher in IP group than in sham-operation group. Serum TNF- $\alpha$  levels were obviously increased in liver transplantation than those in IP and sham-operation groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Warm IP for donor liver could obviously protect rat liver graft from cold ischemic-reperfusion injury, its mechanism might be that IP can rapidly increase serum NO level, maintain a steady level of serum NO, decrease TNF- $\alpha$  generation from inflammatory cells and thus diminish cellular injury of liver graft.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16 (3) : 240 - 244 ]

**Key words:** Liver transplantation; Ischemic preconditioning; Ischemic-reperfusion; Nitric oxide; TNF- $\alpha$ ; Muridae

**CLC number:** R333.4

**Document code:** A

缺血再灌注 (ischemia reperfusion, I/R) 损伤在移植肝脏原发性无功能或功能不全及非吻合口因素造成的胆道狭窄中起着重要作用。肝移植不仅经受缺血过程,器官保存阶段还有较长的冷缺血期,缺血预处理这种热缺血期的保护性措施在经历了长时间的冷缺血后,是否对移植肝有保护作用? 本文就此问题作一探讨。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物与材料

雄性健康 SD 大鼠 75 只,体重约 200 ~ 250 g,受体比供体约重 10 ~ 30 g,由本校同济医学院实验动物中心提供。肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 试剂盒购自北京北方生物技术研究所;丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、一氧化氮 (NO) 检测试剂盒购自天津 TBD 生物工程有限责任公司。

### 1.2 方法

1.2.1 实验分组 根据随机表将配对的大鼠分为 3 组。假手术组 (I 组),肝移植组 (II 组),供肝缺血预处理 (IP) 组 (III 组)。每组各 15 只大鼠。I 组十字切口进腹,仅离断肝周韧带后关腹。II 组行原位肝移植,切取供肝前,供肝不作缺血预处理。III 组行原位肝移植,切取供肝前对供肝进行缺血预处理。各组手术均采用乙醚半开放麻醉。

1.2.2 建立大鼠原位肝移植模型 在 Kamada 二袖套法的基础上改进移植模型术式。显微镜下经腰静脉注入肝素生理盐水行全身肝素化。先不解剖肝周韧带,显露腹主动脉,解剖腹主动脉,行腹主动脉插管及固定,复位肠管,经腹主动脉注入冷林格液灌注,获取供肝。供、受体肝上下腔静脉行直接缝合,门静脉和胆管在横杆支架的帮助下行

套管或支撑管吻合,肝下下腔静脉行套管吻合。供肝冷缺血时间为 120 min,受体无肝期 16 ~ 20 min。IP 组在切取供肝前,用无损伤动脉夹靠近十二指肠处阻断肝门 5 min;移除动脉夹,恢复肝脏再灌注 5 min;立即剪开胸腔,阻断胸主动脉,剪断胸部的下腔静脉,开始腹主动脉灌注。

1.2.3 标本收集 分别于手术后 2, 4, 24, 72 h 分批采集大鼠下腔静脉血液。血标本经低速离心 10 min 获取血清, - 70 $^{\circ}$ C 深低温冰箱保存,留待相关检测。同时采集相应时点的大鼠肝脏组织, 10% 多聚甲醛溶液固定,制成组织蜡块保存。

1.2.4 观察指标及测定方法 (1) 肝功能:将采集的血标本离心,获取血清后,送本院生化室全自动生化仪检测谷丙转氨酶 (ALT)。(2) 血清检测:将冻存分装的血浆置室温解冻,采用相应试剂盒测定 TNF- $\alpha$ , NO, SOD 及 MDA。(3) 肝脏病理学检查:将大鼠各时点采集的肝脏组织送本院病理科制成石蜡切片,常规 HE 染色,光镜检查。

### 1.3 统计学处理

统计处理使用 SSPS 12.0 软件。结果用 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,组间比较用方差分析或 t 检验。 $P < 0.05$  差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 血清 ALT 的变化

IP 组及肝移植组血浆 ALT 水平在术后 2 h 即迅速升高,4 h 达高峰,24 h 时后逐渐恢复。在 2 h 时点,IP 组及肝移植组 ALT 浓度显著高于假手术组,但明显低于肝移植组。24 h 时,IP 组显著低于肝移植组,但明显高于假手术组 (表 1)。

表1 各组大鼠术后 ALT 的变化(U/L,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	2h	4h	24h	72h
假手术组(I)	51.33 ± 8.41	53.83 ± 14.63	52.83 ± 14.61	50.23 ± 9.43
肝移植组(II)	535.15 ± 78.26 <sup>1)</sup>	976.80 ± 92.47 <sup>1)</sup>	881.12 ± 136.26 <sup>1)</sup>	681.12 ± 133.44 <sup>1)</sup>
IP组(III)	317.78 ± 67.34 <sup>1),2)</sup>	575.46 ± 81.79 <sup>1),2)</sup>	501.04 ± 60.21 <sup>1),2)</sup>	441.26 ± 65.25 <sup>1),2)</sup>

注:1)与I组比较, $P < 0.05$ ;2)与II组比较, $P < 0.05$

## 2.2 血浆 MDA 及 SOD 的变化

(表2),而对应的脂质过氧化产物明显减少

IP组血浆抗氧化酶活力较移植组明显升高(表3),但均高于假手术组。

表2 各组大鼠术后血清 SOD 的变化(NU/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	2h	4h	24h	72h
假手术组(I)	631.12 ± 69.78	583.45 ± 35.41	610.76 ± 59.45	563.12 ± 33.31
肝移植组(II)	470.87 ± 47.48 <sup>1)</sup>	389.81 ± 31.65 <sup>1)</sup>	328.62 ± 33.87 <sup>1)</sup>	318.52 ± 33.27 <sup>1)</sup>
IP组(III)	541.78 ± 27.19 <sup>1),2)</sup>	467.49 ± 51.89 <sup>1),2)</sup>	421.04 ± 35.73 <sup>1),2)</sup>	455.36 ± 38.27 <sup>1),2)</sup>

注:1)与I组比较, $P < 0.05$ ;2)与II组比较, $P < 0.05$

表3 各组大鼠术后血清 MDA 的变化(nmol/mL,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	2h	4h	24h	72h
假手术组(I)	7.39 ± 1.77	6.54 ± 1.26	7.35 ± 1.64	6.26 ± 1.68
肝移植组(II)	23.34 ± 4.92 <sup>1)</sup>	32.53 ± 6.42 <sup>1)</sup>	28.43 ± 5.88 <sup>1)</sup>	25.63 ± 5.21 <sup>1)</sup>
IP组(III)	17.41 ± 3.63 <sup>1),2)</sup>	25.64 ± 5.11 <sup>1),2)</sup>	21.17 ± 7.07 <sup>1),2)</sup>	18.61 ± 3.43 <sup>1),2)</sup>

注:1)与I组比较, $P < 0.05$ ;2)与II组比较, $P < 0.05$

## 2.3 血浆 NO 的变化

IP组及肝移植组血浆NO水平在术后2h即迅速升高,24h达高峰,72h开始下降;但72hIP组仍维持在较高水平,假手术组逐渐回落至正常,肝移植组始终呈缓慢上升趋势。在2,4h时点,IP组NO浓度显著高于假手术组和肝移植组,

肝移植组显著高于假手术组;24h时点,IP组显著高于假手术组和肝移植组,肝移植组显著高于假手术组;72h时点,IP组及肝移植组均显著高于假手术组,IP组低于肝移植组,其差异有显著性(表4)。

表4 各组大鼠术后血清 NO 的变化( $\mu\text{mol/L}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	2h	4h	24h	72h
假手术组(I)	14.67 ± 5.89	16.68 ± 6.14	18.75 ± 4.17	12.38 ± 5.27
肝移植组(II)	28.89 ± 7.12 <sup>1)</sup>	35.43 ± 11.47 <sup>1)</sup>	45.12 ± 12.26 <sup>1)</sup>	66.16 ± 15.45 <sup>1)</sup>
IP组(III)	39.78 ± 10.34 <sup>1),2)</sup>	55.46 ± 15.73 <sup>1),2)</sup>	58.04 ± 12.21 <sup>1),2)</sup>	48.63 ± 16.24 <sup>1),2)</sup>

注:1)与I组比较, $P < 0.05$ ;2)与II组比较, $P < 0.05$

## 2.4 血清 TNF- $\alpha$ 的变化

手术组相比差异有显著性;IP组与肝移植组相比,前者显著低于后者(表5)。

肝移植组血清中TNF- $\alpha$ 释放明显增加,与假

表5 各组大鼠术后血清中 TNF- $\alpha$  浓度( $\mu\text{g/ml}$ ;  $\bar{x} \pm sd$ )

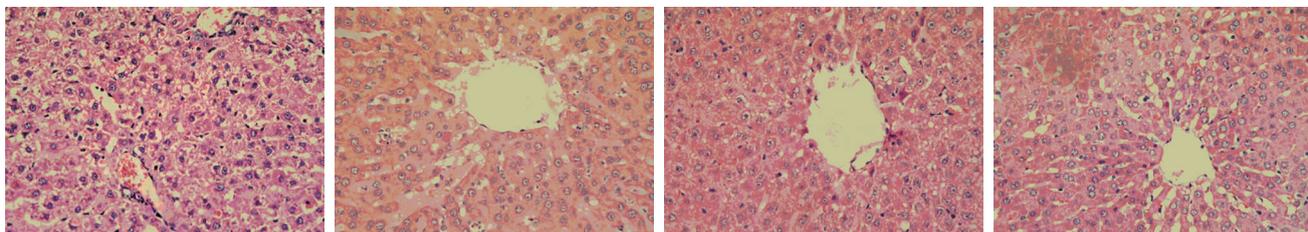
分组	2h	4h	12h	24h	72h
假手术组(I)	45.13 ± 10.12	37.68 ± 8.97	52.67 ± 13.32	40.61 ± 9.78	30.02 ± 13.35
肝移植组(II)	182.56 ± 34.67 <sup>1)</sup>	236.65 ± 56.78 <sup>1)</sup>	256.78 ± 45.12 <sup>1)</sup>	186.23 ± 37.12 <sup>1)</sup>	188.23 ± 35.17 <sup>1)</sup>
IP组(III)	61.12 ± 7.33 <sup>1),2)</sup>	82.15 ± 12.86 <sup>1),2)</sup>	88.22 ± 11.26 <sup>1),2)</sup>	55.63 ± 16.53 <sup>1),2)</sup>	45.66 ± 15.56 <sup>1),2)</sup>

注:1)与I组比较, $P < 0.05$ ;2)与II组比较, $P < 0.05$

## 2.5 病理学改变

肝移植组术后 2h 时肝脏颜色红润,外观无明显异常;4h 时肝脏肿胀较明显,边缘变钝,质地变软;24h 肝脏肿胀明显减退。光镜下发现肝移植组肝细胞明显肿胀,呈气球样变,部分呈空泡化,部分肝细胞坏死;坏死的部分主要位于小叶中央

静脉周围;肝窦扭曲、闭塞、狭窄,有中性粒细胞浸润。这种病理改变在 4h 最高,24h 基本恢复正常。缺血预处理后术后对应时点的病理改变与移植组比,肝细胞仅轻度肿胀,肝细胞呈灶状坏死(附图)。假手术组肝脏无明显变化。



附图 肝移植组和缺血预处理组肝组织病理学改变(HE×200) A:肝移植 4h; B:IP 4h; C:肝移植 12h; D:IP 12h

## 3 讨论

组织缺血缺氧达到一定程度和持续一定的时间后将导致细胞损伤,而在缺血缺氧组织再获得血液供应时往往并不使损伤减轻或恢复,反而加速组织细胞死亡;这种加重损伤的现象,即 I/R 损伤。I/R 损伤是肝移植中需要解决的重要课题。在肝移植时,I/R 损伤常不能避免,涉及到供体、手术技术、受体等多方面;其与移植物早期、晚期存活密切相关。肝 I/R 的严重性也与手术持续的时间,术中低血压的发生以及内脏缺血的程度有关。供体器官的短缺,使得非最佳器官(如非心跳骤停的供体肝)的使用成为必要。而这种器官对于缺血再灌注损伤更为敏感。

肝脏 I/R 损伤包括肝窦内皮细胞和肝脏实质细胞损伤。肝窦内皮细胞对低温保存及再灌注损伤较为敏感,是肝脏损伤的始动因子。目前认为过度的炎症反应是 I/R 损伤的主要机制之一。在再灌注早期阶段,多种细胞因子参与 I/R 损伤,其中 TNF- $\alpha$  是参与炎症损伤过程的重要细胞因子<sup>[1-2]</sup>。研究表明,抑制 I/R 过程中 TNF- $\alpha$  的产生,可明显减轻肝脏结构与功能的损伤;而诱导 TNF- $\alpha$  的产生,可导致肝脏损伤<sup>[3-4]</sup>。本研究中,肝移植前的冷保存及移植后的再灌注,导致了 AST 升高,引起移植肝脏损伤;这种损伤在病理学上得到证实。供肝进行 IP 后尽管血清中 TNF- $\alpha$  浓度升高,但显著低于未经预处理的肝移植组,表明缺血预处理后血清中 TNF- $\alpha$  水平的上升受到明显抑制。提示缺血预处理的保护效应

可能与血清中 TNF- $\alpha$  水平的下调有关。

IP 即经短暂缺血再灌注后,组织对随后的严重缺血有抵抗力,其具有器官普遍性。IP 引起的这种保护作用常在再灌注后 60 ~ 120min 后消失。然而,有报告显示这种保护作用在 IP 后 24h 又出现,并可延续到 72h<sup>[5]</sup>。此现象称为 IP 的第二个保护窗。这是 IP 启动了细胞内源性保护机制的结果,也具有器官普遍性。尽管有研究显示腺苷、自由基<sup>[6]</sup>及蛋白激酶 C<sup>[7]</sup>等参与了激活 IP 的这种保护作用,但目前主要认为是 IP 过程中器官释放的一些介质参与了 IP 保护机制的信号传导过程,其中腺苷和 NO 扮演了重要角色<sup>[5]</sup>。

IP 对器官的保护机制还不是很明了。根据对肝脏的热缺血模型的研究,现在比较普遍地认为,IP 主要是通过增加细胞外的腺苷含量,激活腺苷 A2 受体,诱导内皮细胞 NO 的合成而发挥保护作用<sup>[5]</sup>。通过应用腺苷脱氨酶或腺苷 A2 受体拮抗剂可以消除缺血预处理对于肝组织的保护性作用。应用 NO 合酶抑制剂也可消除其保护作用<sup>[8]</sup>。因此推测腺苷的有益作用是由 NO 所介导。腺苷在肝脏的 IP 中所起的保护作用是通过它激活腺苷 A2 受体,促进 NO 的合成来实现的。

第二保护窗和传统的保护作用可能有共同的信号传导途径,但这两种保护作用的机制可能并不一致。NO 是一种信号传递分子,I/R 时 NO 的产生增加,NO 在 IP 第二保护窗中的作用是目前研究的热点。一般认为,在静息状态下结构型 NOS 产生的 NO 是一种血管扩张剂、氧自由基清除剂、血小板凝聚和白细胞黏附抑制剂,可以减

轻 I/R 损伤<sup>[9]</sup>。而诱导型 NOS 合成的高浓度 NO 可以通过自由基的活动导致 I/R 损伤<sup>[10]</sup>。而诱导型 NOS 则是在缺血后 6 ~ 8h 才开始表达增强,其合成的 NO 在后期主要作为氧自由基的来源,参与了机体的损伤。本实验也证实 IP 可早期提高 NO 的含量,且下降缓慢,其浓度维持在较稳定水平,从而减少了氧自由基的产生。这可能与 IP 第二保护窗的形成有关。而未预处理组则 NO 的峰值延迟出现,持续缓慢上升。因此认为短期快速升高的低水平 NO 对移植肝脏具有保护作用,维持较稳定的 NO 水平可能有利于产生 IP 延迟保护效应;而长期高水平的 NO 可能加重肝脏的损伤。

据此笔者认为,供肝热缺血预处理对大鼠供肝冷 I/R 损伤具有明显的保护作用,其机制可能是 IP 能快速提高并稳定了血清中 NO 水平,抑制了 TNF- $\alpha$  等炎症因子的大量释放,减少了脂质过氧化,从而减轻了移植肝细胞的损害。

#### 参考文献:

- [1] Wanner GA, Ertel W, Muller P, *et al.* Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation [J]. *Shock*, 1996, 5 (1): 34 - 40.
- [2] 詹勇强,吕新生,郑凯,等. 大鼠肝缺血预处理对肝缺血再灌注所致肝外脏器官损伤的保护作用,中国普通外科杂志,2003,12(9):663 - 666.
- [3] Mosher B, Dean R, Harkema J, *et al.* Inhibition of Kupffer cells reduced CXC chemokine production and liver injury [J]. *J Surg Res*, 2001, 99(2): 201 - 210.
- [4] Wanner GA, Muller PE, Ertel W, *et al.* Differential effect of anti-TNF- $\alpha$  antibody on proinflammatory cytokine release by Kupffer cells following liver ischemia and reperfusion [J]. *Shock*, 1999, 11(6): 391 - 395.
- [5] Dana A, Baxter GF, Yellon DM. Delayed or second window preconditioning induced by adenosine A1 receptor activation is independent of early generation of nitric oxide or late induction of inducible nitric oxide synthase [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2001, 38(2): 278 - 287.
- [6] Kaeffert N, Richard V, Thuillez C. Delayed coronary endothelial protection 24 hours after preconditioning: role of free radicals [J]. *Circulation*, 1997, 96(7): 2311 - 2316.
- [7] Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Involvement of protein kinase C in the delayed cytoprotection following sublethal ischemia in rabbit myocardium [J]. *Br J Pharmacol*, 1995, 115(2): 222 - 224.
- [8] 涂兵,龚建平,曾勇,等. 一氧化氮在缺血预处理保护大鼠移植肝脏再灌注损伤中的作用 [J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(4): 313 - 315.
- [9] Koboyashi H, Nomami T, Kurokawa T, *et al.* Role of endogenous nitric oxide in ischemia reperfusion injury in rat liver [J]. *J Surg Res*, 1995, 59(6): 772 - 779.
- [10] Yasmin W, Strvnadka KD, Schulz R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia reperfusion injury in isolated rat hearts [J]. *Cardiovasc Res*, 1997, 33(2): 432 - 442.

· 读者 · 作者 · 编者 ·

## 本刊对来稿中统计学处理的有关要求

1. 统计研究设计: 应交代统计研究设计的名称和主要做法。如调查设计(分为前瞻性、回顾性或横断面调查研究); 实验设计(应交代具体的设计类型,如自身配对设计、成组设计、交叉设计、正交设计等); 临床试验设计(应交代属于第几期临床试验,采用了何种盲法措施等)。主要做法应围绕 4 个基本原则(随机、对照、重复、均衡)概要说明,尤其要交代如何控制重要非试验因素的干扰和影响。

2. 资料的表达与描述: 用  $\bar{x} \pm s$  表达近似服从正态分布的定量资料,用  $M(Q_R)$  表达呈偏态分布的定量资料; 用统计表时,要合理安排纵横标目,并将数据的含义表达清楚; 用统计图时,所用统计图的类型应与资料性质相匹配,并使数轴上刻度值的标法符合数学原则; 用相对数时,分母不宜小于 20,要注意区分百分率与百分比。

3. 统计分析方法的选择: 对于定量资料,应根据所采用的设计类型、资料所具备的条件和分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用  $t$  检验和单因素方差分析; 对于定性资料,应根据所采用的设计类型、定性变量的性质和频数所具备条件以分析目的,选用合适的统计分析方法,不应盲目套用  $\chi^2$  检验。对于回归分析,应结合专业知识和散布图,选用合适的回归类型,不应盲目套用简单直线回归分析,对具有重复实验数据的回归分析资料,不应简单化处理; 对于多因素、多指标资料,要在一元分析的基础上,尽可能运用多元统计分析方法,以便对因素之间的交互作用和多指标之间的内在联系进行全面、合理的解释和评价。

4. 统计结果的解释和表达: 当  $P < 0.05$  (或  $P < 0.01$ ) 时,应说明对比组之间的差异有统计学意义,而不应说对比组之间具有显著性(或非常显著性)的差别; 应写明所用统计分析方法的具体名称(如:成组设计资料的  $t$  检验、两因素析因设计资料的方差分析、多个均数之间两两比较的  $q$  检验等),统计量的具体值(如  $t = 3.45$ ,  $\chi^2 = 4.68$ ,  $F = 6.79$  等)应可能给出具体的  $P$  值(如  $P = 0.0238$ ); 当涉及到总体参数(如总体均数、总体率等)时,在给出显著性检验结果的同时,再给出 95% 置信区间。