

文章编号:1005-6947(2004)03-0199-04

· 实验研究 ·

一氧化氮/内皮素平衡关系与移植肝功能的相关研究

田根东¹, 何延政¹, 张艳敏², 杨辉¹, 曾宏¹, 钟武¹

(1. 泸州医学院附属医院 血管外科, 四川 泸州 646000; 2. 山东大学医学院 组胚教研室, 山东 济南 250012)

摘要:目的 研究大鼠肝移植术后早期一氧化氮(NO)/内皮素(ET)平衡关系的改变,探讨其与肝功能的相关性,观察前列腺素E₁(PGE₁)的干预作用。方法 大鼠随机分为4组(各组n=8):(1)正常对照组(A组);(2)手术对照组(B组);(3)实验组(C组);(4)PGE₁干预组(D组)。采用“双袖套法”建立肝移植模型。检测和比较受体术后6h血液ALT,AST,NO和ET水平,观察肝脏组织学改变。结果 术后6h B, D组全部存活(100%),C组存活5只(62.5%)。与C组比较, D组ALT,AST,ET明显降低(P<0.05),NO明显升高(P<0.05)。NO,ET及NO/ET值与ALT呈现明显的相关性(依次为r=-0.681,0.793和-0.732)。C组肝脏见明显的组织学损害,B,D组组织结构基本保存完好。结论 肝移植术后早期血液NO,ET水平及NO/ET比例关系,较好地反映了肝脏内皮细胞的功能状况。PGE₁可减轻肝血窦内皮细胞的损害,保护了移植肝功能。

关键词:肝移植;肝/病理生理学;一氧化氮;内皮素

中图分类号:R657.3 **文献标识码:**A

Correlation of the ratio of nitric oxide/endothelin and liver graft function

TIAN Gen-dong¹, HE Yan-zheng¹, ZHANG Yan-min², YANG Hui¹, ZENG Hong¹, ZHONG Wu¹

(1. Department of Vascular Surgery, The Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China; 2. Department of Histology and Embryology, Shandong University School of Medicine, Jinan, Shandong 250012, China)

Abstract: Objective To study the alternation of nitric oxide(NO)/endothelin(ET) ratio in early stage of liver transplantation in rats, to investigate its correlation with liver function, and to observe the effect of prostaglandin E₁(PGE₁) on the graft function. **Methods** Wister rats randomly divided into 4 group (n=8 in each group):(1) Normal control group(group A);(2) Operative control group (group B);(3) Experimental group(group C);(4) PEG₁ treatment group (group D). Orthotopic liver transplantation(OLT) model was set up by "two-cuff" method. ALT, AST, NO and ET level in blood and histological change of liver graft were detected and compared at 6th hour postoperatively. **Results** All the rats survived 6h in group B and D(100%),but only 5 survived in group C(62.5%). Comparing with group C, ALT, AST and ET decreased and NO increased significantly (P<0.05) in group D. The levels of NO and ET, and NO/ET ratio were correlated with ALT closely (r=-0.681,0.793 and -0.732 respectively). Obviously histological injury was observed in group C, while morphological appearance was better preserved in group B and D. **Conclusions** Concentration of NO, ET and NO/ET ratio in recipient blood more correctly reflect the function of sinusoid endothelial cell of the graft. PGE₁ can relieve endothelial injury and maintains the function of liver graft.

收稿日期:2003-01-08; 修订日期:2003-12-17。

作者简介:田根东(1976-),男,山东枣庄人,泸州医学院附属医院(现在山东省千佛山医院)住院医师,主要从事器官移植基础与临床方面的研究。

Key words: LIVER TRANSPLANTATION; LIVER/physiopathol; OXIDE; ENDOTHELIN

CLC number: R657.3

Document code: A

移植肝再灌注过程会造成一定程度的移植物功能损伤,其机制还不完全清楚,可能涉及肝移植全过程和多方面的分子细胞学机制。最近的研究表明,微循环紊乱是影响再灌注早期肝功能的主要因素之一。本实验建立大鼠休克性供体原位肝移植模型(rat orthotopic liver transplantation model, ROLT),研究术后早期血液中血管舒张因子一氧化氮(nitric oxide, NO)和血管收缩因子内皮素(endothelin, ET)水平及其比例关系的改变,探讨其与肝功能的相关性,以及前列腺素 E_1 (prostaglandin E_1 , PGE_1)的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

一级 Wistar 封闭群大鼠(四川大学华西医学院实验动物中心提供)56只,体重(280 ± 20)g,雌雄不限,标准颗粒饲料、清洁级环境分笼喂养。其中8只作为正常对照组(A组),余48只随机分为3组,每组16只,各组内随机组合为8对,以体重较轻者为供体进行24次ROLT。B组(无特别说明均指受体,下同)为正常供体肝移植对照组;C组为休克性供体肝移植实验组;D组为给予 PGE_1 的休克性供体肝移植组。各亚组动物8只。

1.2 主要设备和试剂

显微外科手术器械包(上海医疗器械有限公司)。XTS-4B型手术显微镜(镇江光学仪器厂)。双通道生理压力记录仪(复旦大学电子工程系)。3600型微量麻醉泵(英国Graseby公司)。7060型全自动生化分析仪(日本日立电器公司)。722型光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。CG-1200型 γ 放射免疫计数器(中国科技大学中佳光电公司)。 PGE_1 针剂(白求恩医科大学制药厂)。NO检测试剂盒(南京建成生物工程公司)。ET放射免疫检测试剂盒(北京东亚免疫技术研究所)。

1.3 移植模型制作

参照 Kamada 等^[1]创立的“袖套法”建立“双袖

套法”ROLT模型,并作以下处理:各移植组供体以22G静脉留置针行右颈外静脉插管备补液;左髂总动脉插管接三通开关备放血制作休克模型、监测平均动脉压(MAP)和灌注供肝;受体只行右颈外静脉插管备补液。C、D组供体经放血控制MAP 40~45 mmHg(1 mmHg = 0.133 kPa)30 min后,以4℃含肝素12.5 U/ml 乳酸钠平衡盐液于80 cm高度经动脉重力灌注供肝。D组供体制作休克模型同时开始输入含 PGE_1 1 μ g/ml平衡盐液,先快速泵入负荷量2 μ g/kg,继之以0.2 μ g/(kg·min)量持续输入,容量速度3 ml/h。切取供肝后以4℃含 PGE_1 1 μ g/ml平衡盐液置换出肝内的冷灌注液;受体无肝期开始同供体一样输入含 PGE_1 1 μ g/ml平衡盐溶液,持续至无肝期后1h。C组供、受体围手术期补充平衡盐液,方法同D组供、受体。B组供、受体静脉插管不补充任何液体。各组受体术毕经尾静脉补充生理盐水2 ml,并保温至复苏。供、受体术前均禁食12 h,不禁水,术前30 min肌内注射阿托品0.03 mg。供体以氯胺酮70~100 mg/kg腹腔注射麻醉,受体行开放性乙醚吸入麻醉。清洁手术。单人裸眼操作,必要时借助手术显微镜。

1.4 观测指标和统计学处理

观察各移植组术后一般情况。B、C、D组于术后6 h处死(或自然死亡时)取血。生化分析仪检测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST);比色法检测血清NO,放射免疫法检测血浆ET,均参照试剂盒说明进行。取肝中叶组织作HE染色常规病理学观察。所有计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计分析使用单因素方差分析和 q 检验, $P < 0.05$ 为组间差别具有显著性意义。并行NO、ET和NO/ET值与ALT的相关性分析。

2 结果

2.1 一般情况

各移植组供肝冷保存时间和无肝期相近,总均值为(2.0 ± 0.5)h和(15.0 ± 3.0)min。B、D组术后6 h全部存活(8/8),成活率100%。C组术后

6h 存活 5 只(5/8),成活率 62.5%;3 只早期死亡受体包括:1 只死于无肝期后心跳骤停,另 2 只术后 2h 和 3h 死于原发性移植肝无功能。术后 B, D 组苏醒迅速,醒后即可自行翻身走动;C 组苏醒延迟或不能完全苏醒。无肝期结束恢复门静脉血供后, B, D 组肝脏复色均匀红润,发绀时间短,为(4.0 ± 1.0) min 和(3.6 ± 1.5) min,很快即可见金黄色胆汁流出,肝包膜渗出少;C 组复色差,发绀时间长,存活者为(7.0 ± 2.0) min,早期死亡者肝脏

呈持续紫绀状态,肝脏灌注不均匀,胆汁分泌少,颜色浅淡,肝包膜渗液较多。

2.2 血液学检查结果

与 A 组比较, B, C, D 3 组 ALT, AST, ET 均明显升高($P < 0.05$); B, C 组 NO 明显降低($P < 0.05$),但 D 组 NO 与 A 组无明显差异。与 C 组相比, D 组 ALT, AST, ET 明显降低($P < 0.05$), NO 明显升高($P < 0.05$); B, D 组各项指标值接近(表 1)。

表 1 ALT, LDH, MDA, NO, ET 和 NO/ET 值结果

组别	n	ALT(U/L)	AST(U/L)	NO(μmol/L)	ET(pg/ml)	NO/ET 值
A	8	96.53 ± 27.55	198.20 ± 38.39	35.26 ± 8.52	219.80 ± 24.79	0.1644 ± 0.0506
B	8	799.06 ± 325.31 ¹⁾	878.14 ± 344.03 ¹⁾	20.56 ± 8.39 ¹⁾	310.18 ± 24.67 ¹⁾	0.0672 ± 0.0305 ¹⁾
C	8	1961.35 ± 627.21 ¹⁾²⁾	1647.50 ± 621.69 ¹⁾²⁾	15.37 ± 5.71 ¹⁾	378.77 ± 31.17 ¹⁾²⁾	0.0417 ± 0.0194 ¹⁾
D	8	906.25 ± 367.52 ¹⁾³⁾	849.25 ± 424.95 ¹⁾³⁾	29.55 ± 14.22 ³⁾	340.71 ± 50.42 ¹⁾³⁾	0.0909 ± 0.0591 ¹⁾³⁾

注:1)与 A 组比较, $P < 0.05$;2)与 B 组比较, $P < 0.05$;3)与 C 组比较, $P < 0.05$

2.3 常规病理学检查结果

肝组织病理切片见: B 组肝细胞稍肿胀,肝血窦间隙变窄,肝实质内偶见中性粒细胞; C 组肝血窦间隙明显狭窄,部分呈闭塞状态,中央静脉淤血,肝实质片状坏死,有较多中性粒细胞浸润; D 组镜下改变近似于 B 组,有时见肝细胞点状坏死。

2.4 NO, ET, NO/ET 值与 ALT 相关性分析结果

结果显示 NO, ET, NO/ET 值与 ALT 均呈现明显的相关性(表 2)。

表 2 NO, ET, NO/ET 值与 ALT 值相关性分析结果

相关分析指标	r 值	P 值
NO 与 ALT	-0.681	<0.001
ET 与 ALT	0.793	<0.001
NO/ET 值与 ALT	-0.732	<0.001

3 讨论

肝血窦内皮细胞是移植肝再灌注过程的第一道屏障,内皮细胞损害不仅是再灌注损伤的结果,其引起的微循环障碍又成为移植肝损伤加重的中介环节。探讨可靠的微循环和内皮细胞功能状态评价方法,研究其与移植肝功能的相关性,进行有

效的保护性干预,是肝移植的重要研究课题。

研究^[2]表明,肝脏再灌注期间产生的结构型 NO 对组织起保护作用,并没有有害的诱导型 NO 合成。ET 由血管内皮细胞合成,有三种异构体,其中 ET-1 是现知体内最强的缩血管物质。再灌注后产生的氧自由基使肝脏 ET 合成与释放增加,而移植肝对其清除能力不足,肝星形细胞 ET 受体表达上调,使肝脏血管系统对 ET 的收缩反应性增强^[3]。ET 与其受体结合后,能引起肝血窦前、后微血管和肝血窦本身收缩,还可增加肝实质内中性粒细胞浸润^[4]。

移植肝复流后的微循环障碍可表现为“无复流(no-reflow)”现象或“复流奇相(the reflow paradox)”。二者与肝血窦内皮细胞功能状态和 NO/ET 的比例紧密相关。抑制 NO 合成,可明显加重移植肝再灌注损伤^[5];而拮抗 ET 作用,则可明显减轻肝脏的微循环紊乱^[6],表现为肝血窦直径基本恢复,血流阻力下降,白细胞滞留减少,肝功能恢复。

本实验中再灌注 6h 各移植组血清 NO 均降低, ET 升高。Mehrabi 等^[7]发现在组织乏氧性改变的病理过程中, ET 表达释放增加。移植肝再灌注后早期,由于肝血窦内皮细胞功能障碍、能源物质和代

谢底物缺乏, NO 的合成与释放不能很快增加, 使二者的不平衡关系继续保持。结果肝血窦微循环持续收缩, 使肝组织仍处于相对缺血、缺氧状态。血清 ET 含量与肝功能恢复呈负相关, NO/ET 值体现了二者相对关系的改变, 较单一指标更能反映移植后早期肝血窦内皮细胞损伤的情况, 与 ALT 有较好的相关性, 故可作为一个有价值的监测指标。

Itasaka 等^[8]认为 PGE₁ 对移植肝再灌注早期微循环障碍和肝功能的保护作用主要是通过保护内皮细胞而间接实现的。给予 PGE₁ 的实验组, ALT, AST 及 ET 均较实验对照组显著降低 ($P < 0.05$), NO 和 NO/ET 值较实验对照组升高 ($P < 0.05$)。PGE₁ 提高内源性 NO 含量的分子机制还不清楚, 可能也是其内皮保护作用的间接结果。PGE₁ 抑制了肝脏缺血和再灌注期间氧自由基和肿瘤坏死因子介导的 ET 过度表达, 从而维持了近于正常的 NO/ET 平衡关系。NO 与 ET 的半衰期极短, 更可能作为一种局部的调节因子, 维持肝血窦腔隙的相对口径^[9]。PGE₁ 可改善微循环, 抑制微血栓形成, 有较好的保护内皮细胞和肝功能的作用。

参考文献:

[1] Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Techniques using cuff for portal vein anastomosis and biliary

drainage [J]. *Transplantation*, 1979, 28(1): 47-54.

- [2] 吕平, 陈道达, 田源, 等. 一氧化氮/内皮素失衡与大鼠肝脏缺血再灌注损伤的关系 [J]. *中华普通外科杂志*, 2000, 15(8): 494-495.
- [3] Gabriel A, Kuddus RH, Rao AS, *et al.* Superoxide-induced changes in endothelin (ET) receptors in hepatic stellate cells [J]. *J Hepatol*, 1998, 29(4): 614-627.
- [4] Mitsuoka H, Suzuki S, Sakaguchi T, *et al.* Contribution of endothelin-1 to microcirculatory impairment in total hepatic ischemia and reperfusion injury [J]. *Transplantation*, 1999, 67(4): 514-520.
- [5] Yagnik GP, Takahashi Y, Tsoulfas G, *et al.* Blockade of the L-arginine/NO synthase pathway worsens hepatic apoptosis and liver transplant preservation injury [J]. *Hepatology*, 2002, 36(3): 573-581.
- [6] Zhang XY, Francis RJ, Sun CK, *et al.* Endothelin receptor A blockade ameliorates hypothermic ischemia-reperfusion-related microhemodynamic disturbances during liver transplantation in the rat [J]. *J Surg Res*, 2002, 102(2): 63-70.
- [7] Mehrabi A, Kraus TW, Klar E, *et al.* Analysis of extravascular endothelin levels in UW solution and rinsing effluent of porcine liver grafts after cold storage [J]. *Transplant Proc*, 1995, 27(5): 2613-2615.
- [8] Itasaka H, Suehiro T, Wakiyama S, *et al.* The mechanism of hepatic graft protection against reperfusion injury by prostaglandin E₁ [J]. *Surg Today*, 1999, 29(6): 526-532.
- [9] Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, *et al.* Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion [J]. *Shock*, 1997, 8(2): 80-85.

第二届全国普通外科主任论坛会议征文通知

首届全国普通外科主任论坛以其新颖的内容获得了巨大成功, 受到与会者的高度评价。会议期间成立了全国普通外科主任联谊会, 并决定 2004 年 12 月上旬在武汉召开第二届全国普通外科主任论坛。会议将由裘法祖院士任名誉主席, 吴孟超、刘允怡、汤钊猷、黎介寿、黄志强和郑树森等六位院士以及黄洁夫副部长、陈汉教授任顾问。全国普通外科主任联谊会会长冷希圣教授任大会主席, 常务副会长陈孝平教授任大会执行主席。

本次会议特邀请国内外著名专家对普通外科领域的前沿问题、有争议的问题进行综述、评点, 介绍普通外科疾病的新进展、新技术, 同时仍将邀请专家介绍外科行政管理、学科建设、课题申报、论文(特别是英文)撰写及投稿技巧、医疗纠纷防范与处理的经验。

欢迎各位同道就上述领域撰稿。稿件要求寄全文及 500~800 字论文摘要, 同时寄论文的软盘一份或发电子邮件。截稿日期 2004 年 8 月 30 日。稿件请寄: 武汉华中科技大学同济医院肝胆胰外科研究所 陈孝平所长或黄志勇副所长收, 邮编: 430030; 联系电话: 027-83662599; Email: Chenxp_53@163.com

全国普通外科主任联谊会
中华外科学会肝脏学组

2004 年 2 月 16 日