

文章编号:1005-6947(2005)02-0111-03

· 实验研究 ·

# 内皮素1单抗对肝移植缺血再灌注损伤中肝细胞凋亡的影响

黄志恒<sup>1</sup>, 王成友<sup>1</sup>, 倪勇<sup>1</sup>, 张敏杰<sup>1</sup>, 陈规划<sup>2</sup>

(1. 广东省深圳市第二人民医院肝胆外科, 广东深圳518035; 2. 中山大学附属第一医院器官移植中心, 广东广州510080)

**摘要:**目的 探讨细胞凋亡在移植肝缺血再灌注损伤中的作用及内皮素1(ET-1)单克隆抗体对细胞凋亡的影响。方法 应用ET-1单抗灌注移植肝,检测血浆与肝组织中ET-1,检测肝功能,测定移植肝组织的MDA及细胞凋亡。结果 移植肝再灌注后血中ET-1,谷丙转氨酶(ALT)和肝组织中ET-1与MDA均明显升高,肝细胞凋亡明显增加;应用ET-1单抗后,血中ET-1,ALT和肝组织中ET-1及MDA均降低,肝细胞凋亡亦明显减少。结论 ET-1单抗可通过减轻移植肝脂质过氧化反应的作用,从而减少肝细胞凋亡,起减轻到肝细胞损伤,从而保护移植肝。

**关键词:**肝移植;细胞凋亡;缺血再灌注损伤;内皮素1单克隆抗体

中图分类号:R657.3;R619.9 文献标识码:A

## Effect of endothelin-1 monoclonal antibody on apoptosis of hepatocytes during ischemia/reperfusion injury of liver transplantation in rats

HUANG Zhi-heng<sup>1</sup>, WANG Cheng-you<sup>1</sup>, NI Yong<sup>1</sup>, ZHANG Min-jie<sup>1</sup>, CHEN Gui-hua<sup>2</sup>

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, The Second People's Hospital of Shenzhen City, Shenzhen, Guangdong 518035, China; 2. Organ Transplantation Center, The First Affiliated Hospital, Sun Yet-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the role of hepatocyte apoptosis in ischemia/reperfusion injury of grafted liver and the effects of endothelin-1 (ET-1) monoclonal antibody on hepatocyte apoptosis. **Methods** Orthotopic liver transplantation rats were divided into two groups: with and without ET-1 antibody. The concentrations of ET-1 of plasma and liver tissue were measured. The parameters of liver function were determined. The concentration of malondialdehyde (MDA) was measured and the number of apoptotic hepatocytes in grafted liver was determined. **Results** The levels of ET-1, ALT in serum, and ET-1, MDA and apoptotic cells in the grafted liver after ischemia/reperfusion were significantly increased compared with normal values. In the ET-1 antibody group, the levels of ET-1, ALT, MDA and apoptotic cells were significantly decreased. **Conclusions** ET-1 monoclonal antibody can attenuate ischemia/reperfusion injury by decreasing lipid peroxide reaction, and decreasing apoptosis of hepatocytes and thus protect the liver graft.

**Key words:** LIVER TRANSPLANTATION; APOPTOSIS; ISCHEMIA REPERFUSION INJURY; ENDOTHELIN-1 MONOCLONAL ANTIBODY

**CLC number:** R657.3; R619.9

**Document code:** A

细胞凋亡在组织细胞丢失和器官衰竭方面发

挥重要作用<sup>[1]</sup>。内皮素1(ET-1)是一种内皮细胞分泌的,由21个氨基酸组成的强有力且作用时间持久的缩血管多肽,是目前所知的最强的缩血管物质。本实验应用ET-1单抗灌注移植肝,研究细胞凋亡在肝移植缺血再灌注损伤中的作用及ET-1单抗对其影响,报告如下。

**基金项目:**广东省深圳市科技基金资助项目(9904053)。

**收稿日期:**2004-08-16; **修订日期:**2004-11-27。

**作者简介:**黄志恒(1975-),男,山东烟台人,广东省深圳市第二人民医院主治医师,硕士,主要从事肝移植方面的研究。

**通讯作者:**王成友 电话:0755-83366388-8276; E-mail:CST1888

@21cn.com。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物与试剂

实验所用 SD 大鼠均为雌性,体重 220 ~ 250 g,由中山大学实验动物中心提供。

ET-1 单抗及试剂盒购自深圳晶美公司;细胞凋亡试剂盒购自武汉博士德公司;MDA 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;谷丙转氨酶(ALT)检测由中山大学附属一院检验科协助完成。

### 1.2 肝移植动物模型制作及分组

按 Kamada<sup>[1]</sup>方法行双袖套法大鼠原位肝移植术,即肝上下腔静脉用缝合法吻合,肝下下腔静脉与门静脉用套管法吻合,胆总管植管套入吻合,肝动脉结扎不做吻合。热缺血时间为 15 min,冷缺血时间为 40 min,无肝期为 18 min。动物随机分为 3 组:(1)正常对照组(A组),10 只,单纯开腹,游离肝周韧带,不做肝移植。(2)肝移植组(B组,40 只,每时相点 10 只),行同种异体原位肝移植术,分别于肝移植术后 1 h(B1 组),4 h(B2 组),12 h(B3 组)和 24 h(B4 组)处死动物取材。(3)抗 ET-1 抗体组(C组,10 只),冷灌注液中加入稀释浓度为  $1:15 \times 10^3$  的 ET-1 抗体 1 mL,肝移植后 4 h 处死动物取材。

### 1.3 检测指标与检测方法

1.3.1 血浆 ET-1 含量的测定 自下腔静脉采血约 1 mL,加入  $10 \mu\text{L}$  100 g/L 的 EDTA 二钠和  $20 \mu\text{L}$  抑肽酶混匀, $4^\circ\text{C}$  3 000 r/min 离心 10 min,取上清液于  $-70^\circ\text{C}$  保存。测定前将标本置于冷水中复融,再次离心,取上清液。按 ET-1 试剂盒说明书所述方法用放射免疫法测定血浆中 ET-1 的含量。

1.3.2 肝组织中 ET-1 和 MDA 含量的测定 切取活肝组织约 200 mg,加入 1 mol/L 的 HCL 2 mL 碾磨,随后  $100^\circ\text{C}$  水浴 10 min,匀浆, $4^\circ\text{C}$  3 000 r/min 离心 10 min,取上清液于  $-70^\circ\text{C}$  保存。按 ET-1 和 MDA 试剂盒说明书所述方法用放射免疫法和硫代巴比妥酸比色法分别测定肝组织中 ET-1 和 MDA 含量。

1.3.3 肝细胞凋亡的检测 分别取各组实验动物肝左中叶标本,以质量浓度为 100 g/L 的甲醛固定,石蜡包埋备用。各组织切片以原位末端标记法(TUNEL)行细胞凋亡检测。

1.3.4 血浆 ALT 测定 自动生化分析仪(HITA-CHI7170)测定血浆中 ALT 含量。

1.3.5 组织学观察 采取新鲜活肝组织,用质量浓度为 100 g/L 的甲醛溶液固定 24 h,石蜡包埋,连续切片,HE 染色,光学显微镜下观察。

### 1.4 统计学处理

实验所得数据采用均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示;应用方差分析检验各组方差齐性;组间比较用  $t$  检验

## 2 结 果

### 2.1 血浆和肝组织中各项检测指标含量的变化

2.1.1 血浆 ET-1 含量 B 组移植肝再灌注后,血浆 ET-1 迅速升高,4 h 达高峰,此后逐渐下降,但再灌注后 24 h 仍维持在较高水平。各时点与 A 组相比,差异均具有极显著性( $P < 0.01$ );C 组血浆中 ET-1 水平低于 B2 组,差异有极显著性( $P < 0.01$ )(表 1)。

2.1.2 肝组织中 ET-1 含量 移植肝再灌注后,肝组织中 ET-1 明显升高,各时间点检测差异无显著性。其他各组与 A 组相比,差异均有极显著性(均  $P < 0.01$ )。C 组低于 B2 组水平,差异亦具极显著性( $P < 0.01$ )(表 1)。

2.1.3 血中 ALT 水平 移植肝再灌注后血浆 ALT 水平显著升高,与 A 组相比,其他各组差异均具极显著性( $P < 0.01$ );C 组血中 ALT 低于 B2 组水平,差异亦具极显著性( $P < 0.01$ )(表 1)。

2.1.4 肝组织中 MDA 含量 B 组缺血再灌注后,各时点肝组织中 MDA 含量明显升高,其他各组与 A 组相比差异有极显著性( $P < 0.01$ ),C 组肝组织 MDA 水平低于 B2 组,差异有显著性( $P < 0.05$ )(表 1)。

表 1 移植肝再灌注后血浆和/或肝组织中 ET-1,ALT,HA 和 MDA 含量的变化( $\bar{x} \pm s$ )

分组	血浆 ET-1(ng/L)	肝组织 ET-1(ng/g)	血浆 ALT(U/L)	肝组织 MDA(nmol/g)
A	1.3 $\pm$ 0.6	2.1 $\pm$ 1.3	34.2 $\pm$ 6.5	194.0 $\pm$ 24.5
B1	23.0 $\pm$ 5.5 <sup>1)</sup>	14.9 $\pm$ 3.8 <sup>1)</sup>	446.8 $\pm$ 65.4 <sup>1)</sup>	584.9 $\pm$ 143.6 <sup>1)</sup>
B2	35.9 $\pm$ 5.5 <sup>1)</sup>	15.3 $\pm$ 3.8 <sup>1)</sup>	1010.8 $\pm$ 192.4 <sup>1)</sup>	649.3 $\pm$ 40.4 <sup>1)</sup>
B3	21.7 $\pm$ 5.1 <sup>1)</sup>	16.5 $\pm$ 4.2 <sup>1)</sup>	444.2 $\pm$ 63.4 <sup>1)</sup>	500.6 $\pm$ 58.7 <sup>1)</sup>
B4	22.7 $\pm$ 5.3 <sup>1)</sup>	17.3 $\pm$ 5.0 <sup>1)</sup>	1237.1 $\pm$ 395.1 <sup>1)</sup>	435.3 $\pm$ 43.9 <sup>1)</sup>
C	16.4 $\pm$ 3.3 <sup>2)</sup>	7.9 $\pm$ 2.1 <sup>2)</sup>	263.1 $\pm$ 43.1 <sup>2)</sup>	601.8 $\pm$ 24.5 <sup>3)</sup>

注:1)与 A 组相比  $P < 0.01$ ; 2)与 B2 组相比  $P < 0.01$ , 3)  $P < 0.05$

## 2.2 肝组织病理学变化

B组肝脏淤血明显,有不同程度的肝细胞肿胀。肝细胞排列紊乱,细胞浊肿、变性,肝窦变窄并有大量的中性粒细胞附壁、局部有小叶结构的破坏。其中B2组肝小叶破坏最为严重。C组肝脏淤血程度明显减轻,肝细胞轻度水肿,肝窦内渗出较轻,小叶结构基本完好,炎性细胞浸润减少。

## 2.3 细胞凋亡检测

B1组即可检获凋亡细胞,B2组细胞凋亡指数(AI)增加,B3组AI显著增加,B4组AI明显降低,与A组相比差异均有显著性( $P < 0.01$ )。C组AI较B2组显著降低( $P < 0.01$ ),但与A组相比则差异无显著性( $P > 0.05$ )(表2)。

表2 各组细胞凋亡指数(AI)的变化

分组	AI( $\bar{x} \pm s$ )
A	5.1 ± 1.5
B1	12.3 ± 1.8 <sup>1)</sup>
B2	31.2 ± 4.5 <sup>1)</sup>
B3	39.7 ± 4.0 <sup>1)</sup>
B4	25.7 ± 4.7 <sup>1)</sup>
C	5.6 ± 1.8 <sup>2)</sup>

注:1)与A组相比, $P < 0.01$ ; 2)与B2组相比, $P < 0.01$

## 3 讨论

缺血再灌注损伤是肝移植中不可避免的、多因素参与的复杂病理过程,包括缺血、缺氧所致的肝细胞损伤。早在20世纪70年代Kerr等首先发现阻断门静脉的小鼠肝脏中存在细胞凋亡现象。这说明缺血、缺氧可导致肝细胞凋亡。在缺血再灌注损伤中还包括致凋亡因素肿瘤坏死因子(TNF)及脂多糖(LPS)的作用<sup>[2]</sup>,故不难理解缺血再灌注损伤中存在细胞凋亡。

笔者等用TUNEL法检测移植肝细胞凋亡,不仅可以检测到组织学上典型的凋亡细胞,而且可以检测到形态完整而正处于凋亡过程的凋亡细胞<sup>[3]</sup>。本实验结果发现肝移植术后再灌注1h即可检获移植肝细胞的凋亡,随着再灌注时间的延长,细胞凋亡增加,至4h显著升高,24h仍维持在高水平。说明细胞凋亡在肝移植缺血再灌注早期发挥重要作用。从本实验可见,移植肝再灌注前应用ET-1

单抗,细胞凋亡指数明显降低,同时肝组织的淤血和坏死程度明显改善。肝移植后肝细胞凋亡的增加与活性氧的增加有关<sup>[4~7]</sup>。从本实验可以看出,应用ET-1单抗后,脂质过氧化物MDA的生成明显降低,从而减少了引起细胞凋亡的诱因。Feldmann等<sup>[8]</sup>报道,在人同种异体移植肝短暂再灌注的凋亡定量分析中,约有20%的肝细胞发生凋亡。这提示凋亡是一种早期移植物损害的表现。

从本实验结果所示,ET-1单抗可以减轻移植肝缺血再灌注损伤,可能是ET-1单抗通过减轻肝脂质过氧化反应而使肝细胞凋亡减少,从而减轻肝细胞损伤。本结果为临床上应用ET-1保护移植肝提供了实验依据。

## 参考文献:

- [1] Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat [J]. *Surgery*, 1983, 93(1):64-69.
- [2] Fayyazi A, Schlemminger R, Gieseler R, *et al.* Apoptosis in the small intestinal allograft of the rat [J]. *Transplantation*, 1997, 63(5):947-951.
- [3] 郑德生. 细胞凋亡的研究进展[J]. *中华病理学杂志*, 1996, 25(1):50-53.
- [4] Leist M, Gantner F, Bohlinger I, *et al.* Tumor necrosis factor-induced hepatocyte apoptosis precedes liver failure in experimental murine shock models [J]. *Am J Pathol*, 1995, 146(9):1220-1234.
- [5] Servais P, Galand P. Apoptosis. Cell proliferation and c-ras expression during and after cyproterone acetate (CPA) induced liver hyperplasia [J]. *Cell Biol Int Rep*, 1992, 16(3):319-328.
- [6] 曹晖,吴志勇,张效杰,等. 血管活性物质在肝硬化肝移植后血流动力学中的作用[J]. *中华外科杂志*, 2001, 39(2):151-155.
- [7] 田根东,何延政,张艳敏,等. 一氧化氮/内皮素平衡关系与移植肝功能的相关研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(3):199-202.
- [8] Feldmann G. Liver apoptosis [J]. *J Hepatol*, 1997, 26(suppl 2):1-11.