

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01438

短时间多次缺血预处理对大鼠移植肝缺血再灌注损伤的保护作用

庞利群¹, 房平承², 刘大彪², 郑建明^{3*}

1. 徐州医学院附属淮安医院普通外科, 淮安 223002

2. 江苏大学附属第四医院普通外科, 镇江 212000

3. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433

[摘要] **目的:**探讨短时间多次缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)对大鼠移植肝脏缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)的保护作用。**方法:**采用SD大鼠原位肝移植动物模型,供肝冷保存120 min,无肝期14 min。54只SD大鼠随机分成5组:对照组(A组, $n=6$),不做肝脏移植手术;肝移植组(B组, $n=12$),供体大鼠肝脏4℃乳酸林格液保存2 h后,采用双袖套法行原位肝移植;缺血预处理肝移植组(C1、C2、C3组,每组12只):将供肝进行缺血预处理后切除供体大鼠肝脏,4℃乳酸林格液保存2 h,行原位肝移植,根据阻断第一肝门5 min,开放再灌注5 min为1个循环,处理1~3个循环分别命名为C1、C2和C3组。术后检测各组血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)活性,每分钟胆汁量,免疫组化检测肝细胞Bcl-2表达,TUNEL法检测细胞凋亡,电镜观察细胞超微结构的改变。**结果:**术后B组血清ALT、AST、LDH活性明显高于A组,每分钟胆汁量明显低于A组($P<0.01$);C组ALT、AST、LDH活性虽明显高于A组($P<0.01$),但比B组明显降低($P<0.05$);随着IP次数增加,C1、C2、C3组ALT、AST、LDH活性递减,而每分钟胆汁量逐渐增加。细胞形态学检查发现,与B组比较,C组供肝组织细胞结构改变较小,Bcl-2表达增加,凋亡指数降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。**结论:**IP对大鼠供肝缺血再灌注损伤具有保护作用,短时间多次IP对肝脏的保护作用更强。

[关键词] 再灌注损伤;缺血预处理;肝移植

[中图分类号] R 657.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1438-04

Repeated ischemic preconditioning in a short time protects rat liver graft from ischemic reperfusion injury

PANG Li-qun¹, FANG Ping-cheng², LIU Da-biao², ZHENG Jian-ming^{3*}

1. Department of General Surgery, Affiliated Huaian Hospital of Xuzhou Medical College, Huaian 223002, China

2. Department of General Surgery, Fourth Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000

3. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the protective effect of repeated ischemic preconditioning (IP) in a short period on rat liver graft from ischemic reperfusion injury (IRI). **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were used as donors and recipients for orthotopic liver transplantation. The period of cold preservation and anhepatic phase were 120 min and 14 min, respectively. Fifty-four rats were randomly divided into 5 groups. Control group (group A, $n=6$) received no operation of liver transplantation; liver transplantation group (group B, $n=12$) received orthotopic liver transplantation by the cuff technique with donor livers preserved for 2 h in 4℃ Ringer's lactate solution before transplantation; and ischemic precondition group included three subgroups: group C1, C2, and C3 ($n=12$). For group C, the grafts were harvested and then preserved for 2 h in 4℃ Ringer's lactate solution after ischemic preconditioning, and then used for orthotopic liver transplantation. An IP cycle included 5 min interruption of the portal veins and hepatic arteries of liver, and reflow for 5 min. The C1, C2, and C3 animals were subjected to one, two and three circles, respectively. The activities of AST, ALT and LDH in the sera were examined and the capacity of bile per min was examined 6 hours after operation. The expression of Bcl-2 protein in hepatic tissue was determined with immunohistochemistry. Moreover, the hepatocellular apoptosis were detected by TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) and the changes of liver ultrastructure were observed under electron microscope. **Results:** The activities of ALT, AST, and LDH in group B were significantly higher and the capacity of bile per min was significantly lower than those in group

[收稿日期] 2008-05-03 **[接受日期]** 2008-10-02

[基金项目] 镇江市科技计划资助(SH2005037). Supported by Foundation of Science and Technology Plan of Zhenjiang(SH2005037).

[作者简介] 庞利群, 博士, 副主任医师, 硕士生导师. E-mail: panglq@163.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-25074037, E-mail: jmzheng1962@163.com

A ($P < 0.01$). The activities of ALT, AST, and LDH in group C were significantly higher than those of group A ($P < 0.01$), but were significantly lower than those of group B ($P < 0.05$), and decreased with the increase of IP cycle. Cell morphology examination showed that the changes of graft structure was slighter in group C than in group B, and the expression of Bcl-2 was increased and the apoptotic index was lowered ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion:** Ischemic precondition can relieve IR-induced injury of the donor liver. The protective effect is more potent with repeated IP cycles in a short time.

[KEY WORDS] reperfusion injury; ischemic preconditioning; liver transplantation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1438-1441]

缺血预处理(ischemia preconditioning, IP)是指预先给机体的组织或者器官一次或多次短暂性缺血-再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)后,能够诱导机体组织产生内源性保护,增强组织对随后较长时间缺血损伤的耐受性。在肝移植过程中,缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)所致的术后供肝原发无功能是肝移植失败的主要原因^[1]。在肝脏移植的过程中,不可避免地要承受较长时间的热缺血,手术中是否可以反复短时间分次阻断供肝的血液循环,从而最大限度地减轻组织的缺血损伤,并诱导肝脏对 IRI 的耐受,其可行性目前尚无定论。本研究将供肝经短时间多次 IP 后建立大鼠原位肝移植模型,通过观察移植肝 IRI 后肝细胞 Bcl-2 表达、细胞凋亡水平,血清学指标和肝脏超微结构的变化,探讨短时间多次 IP 对供肝的保护作用,为临床肝脏手术中防治肝脏缺血再灌注损伤及其他研究提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物 供、受体均为健康雄性 SD 大鼠(购自苏州大学实验动物中心),共计 54 只,体质量 220~260 g,受体体质量等于或略大于供体。

1.2 实验方法 大鼠术前禁食 12 h,自由饮水,阴茎背静脉注射肝素使全身肝素化。氯胺酮 80~100 mg/kg 腹腔内注射麻醉。分组情况如下:对照组(A 组, $n=6$),上腹肋缘下切口进腹,游离肝周韧带,不进行阻断肝门及其他手术处理;肝移植组(B 组, $n=12$),切除供体大鼠肝脏,4℃ 乳酸林格液保存 2 h 后,采用双袖套法将供肝对受体进行原位肝移植(无肝期约 14 min)^[2];缺血预处理肝移植组(C 组):将供肝进行 IP 后切除供体大鼠肝脏,4℃ 乳酸林格液保存 2 h,行原位肝移植。以阻断第一肝门 5 min、开放再灌注 5 min 为 1 个循环,根据预处理循环数不同分成 3 个亚组,处理 1~3 个循环分别命名为 C1、C2 和 C3 组($n=12$)。术后 6 h 取标本检测各项指标。

1.3 生化指标及胆汁量检测 生化指标检测:取下腔静脉血 1 ml,全自动生化分析仪测定血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)活性;硬膜外导管测量胆汁分泌量:向胆总

管近端插入硬膜外导管,测量每分钟胆汁引流量。

1.4 细胞凋亡检测 取动物肝脏标本,按照 TUNEL 试剂盒(上海晶美公司)的操作要求进行检测。光镜下每例标本切片随机选取 5 个 400 倍视野,计算出平均每 100 个细胞中的凋亡细胞数,并以百分数表示作为凋亡指数(apoptotic index, AI)。

1.5 肝细胞 Bcl-2 表达 取动物肝脏标本,免疫组化 S-P 法(武汉博士德公司)检测,高倍镜下,胞质呈棕色着染者为 Bcl-2 表达阳性细胞。采用 Image-Pro Plus 图像分析软件,切片组织在 400 倍光学显微镜下,摄取图像并输入分析系统,选择并测量染色阳性面积与视野面积。每张切片随机选 5 个视野,将 Bcl-2 表达的阳性面积除以视野面积,取其均值作为阳性区域面积(%)。

1.6 肝组织形态学观察 切取肝脏右前叶,置入 10% 中性甲醛溶液,石蜡包埋后常规 H-E 染色,光镜观察病理形态。另取 1 mm³ 肝组织,4% 戊二醛固定,送电镜室观察。

1.7 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 统计软件进行方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ALT、AST、LDH 活性和胆汁量变化 结果如表 1 所示。B 组血清 ALT、AST、LDH 活性明显高于 A 组,每分钟胆汁量明显低于 A 组 ($P < 0.01$),C2、C3 组各指标与 B 组相比明显改善 ($P < 0.01$),但 C1 组与 B 组相比差异无统计学意义;在 C 组间,随着 IP 次数的增加,各项检测指标明显好转 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。具体数据见表 1。

2.2 细胞凋亡和肝组织中 Bcl-2 表达检测 B 组 AI 明显高于 A 组 ($P < 0.01$),C1 组 AI 与 B 组相比无显著差异,C2 和 C3 组 AI 与 B 组相比明显降低 ($P < 0.01$),但仍高于 A 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。B 组肝组织 Bcl-2 表达高于 A 组 ($P < 0.01$),在 C 组中,随 IP 次数增加 Bcl-2 蛋白表达逐渐上升,C1 组与 B 组比较无明显差异,C2 组和 C3 组则比 B 组明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。具体数据见表 2。

表 1 血清 ALT、AST、LDH 活性和胆汁量变化

Tab 1 Bile capacity and activity analysis of serum ALT,AST, and LDH in different groups

($\bar{x} \pm s$)

Group	n	ALT $z_B / (U \cdot L^{-1})$	AST $z_B / (U \cdot L^{-1})$	LDH $z_B / (U \cdot L^{-1})$	Bile $v / (\mu l \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1} \text{ liver})$
A	6	32.32 ± 8.76	198.67 ± 15.49	2 563.58 ± 246.27	9.52 ± 1.38
B	12	1 636.73 ± 215.39**	2 833.54 ± 294.76**	5 970.89 ± 475.37**	3.12 ± 0.79**
C1	12	1 458.55 ± 264.62**	2 485.56 ± 252.28**	5 446.42 ± 340.68**	3.79 ± 0.93**
C2	12	797.63 ± 163.75**△	1 978.68 ± 270.52**△	4 945.27 ± 383.89**△	5.18 ± 1.12**△
C3	12	187.16 ± 63.08**△△▲▲	756.28 ± 96.35**△△▲▲	3 567.27 ± 195.36**△△▲	8.72 ± 1.16△△▲

A: Control group, without operation of liver transplantation. B: Liver transplantation group, after donor livers were preserved for 2 h in 4°C Ringer's lactate solution, the rat orthotopic liver transplantation (ROLT) was performed using the cuff technique. C1, C2, C3: Ischemic precondition groups, the grafts receiving ischemic precondition were harvested and then preserved for 2 h in 4°C Ringer's lactate solution before orthotopic liver transplantation. The portal veins and hepatic arteries of rat liver were interrupted for 5 min and then reflow was initiated for another 5 min, which was regarded as one circle. The C1, C2, and C3 groups were subjected to one, two and three circles, respectively. ** $P < 0.01$ vs group A; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs group B; ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$ vs group C2

表 2 细胞凋亡指数和 Bcl-2 表达结果

Tab 2 Apoptotic index and Bcl-2 expression in liver of different groups

(%, $\bar{x} \pm s$)

Group	n	Apoptotic index	Bcl-2 expression
A	6	1.87 ± 0.63	0.17 ± 0.05
B	12	22.78 ± 4.56**	1.18 ± 0.76**
C1	12	18.35 ± 3.66**	1.85 ± 0.89**
C2	12	11.17 ± 2.07**△△	2.35 ± 1.12**△
C3	12	3.68 ± 1.37*△△▲▲	5.26 ± 1.57**△△▲▲

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs group A; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs group B; ▲▲ $P < 0.01$ vs group C2

2.3 肝组织病理形态学观察

2.3.1 光镜观察 A 组肝细胞及肝窦内皮细胞均正常,肝小叶、中央静脉、汇管区结构清晰(图 1A);B 组肝小叶中央静脉和肝血窦淤血、狭窄,肝细胞可见不同程度的肿胀变性(图 1B);C3 组肝脏淤血较 B 组减轻,肝小叶结构基本正常,汇管区中央静脉结构正常清晰,无变形,肝窦索结构清晰,肝细胞轻度肿胀(图 1C)。

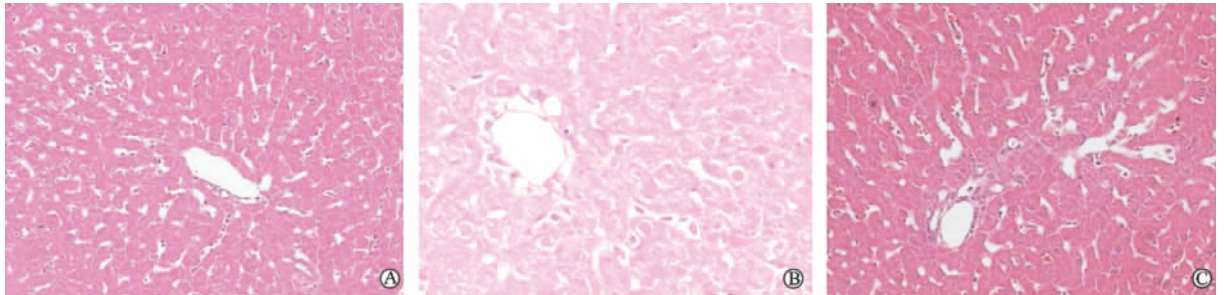


图 1 各组肝组织病理形态学观察

Fig 1 Pathology of liver tissues in each group (H-E)

A: Normal hepatic cells in group A; B: Hepatocellular swollen and transformation of vacuoles in group B; C: Hepatic tissue is basically normal in group C3. Original magnification: ×200

2.3.2 透射电镜观察 A 组细胞器结构完整,线粒体排列整齐(图 2A)。B 组肝细胞线粒体肿胀,嵴减少,排列紊乱,胞质疏松,溶酶体增多,核染色体边聚,细胞膜和核膜变形,可见凋亡细胞及凋亡小体(图 2B、2C)。C3 组肝细胞损伤明显减轻,细胞超微结构形态基本正常,线粒体轻度肿胀,偶见胞质空泡(图 2D、2E)。

3 讨论

IRI 是导致器官移植后脏器失活的重要原因之一。在移植肝的 IRI 过程中,肝实质细胞和窦内皮细胞不仅表现为水肿、变性、坏死等改变,同时也存在显著的细胞凋亡现象^[3-4]。目前研究^[5-6]发现,在供肝获取前,对肝脏 IP 可以减轻手术后肝脏组织的

细胞凋亡,从而减轻移植肝的再灌注损伤。本研究设计了短时间内对供肝进行多次肝门阻断,然后进行肝移植的动物模型,通过观察肝移植组术后血清

ALT、AST、LDH 活性,每分钟胆汁量,并观察了肝组织的细胞凋亡情况及病理学变化,探讨该设想的可行性。

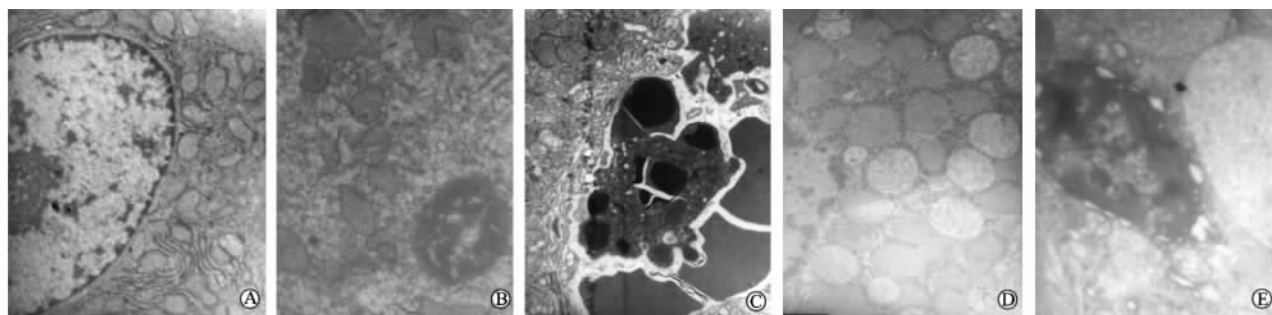


图 2 各组肝组织超微结构观察

Fig 2 SEM results of liver tissues

A: Normal hepatic cells in group A; B: Hepatocellular apoptosis in group B; C: Endothelial cell apoptosis in group B; D: Mitochondria swelling in group C3; E: Chromosome border, transformation of vacuoles in group C3. Original magnification: $\times 15\ 000$

本研究结果发现,经 IP 1、2、3 次处理后,随着 IP 次数增加,肝移植大鼠血清 ALT、AST、LDH 活性逐渐递减,细胞凋亡指数亦逐渐降低,肝组织的细胞结构病理改变也逐渐减轻。实验结果表明,对供肝进行多次 IP 可以明显减轻供肝 IRI,维持细胞基本结构和功能稳定,对 IRI 可能导致移植后肝功能障碍具有预防作用。但是,对供肝缺血-再灌注预处理的循环次数及其时间有无最佳的选择,在实际临床工作中是否需要结合患者全身和肝脏的病理情况进行调整,尚有待于进一步研究探索。

目前,IP 对移植肝缺血再灌注损伤的保护机制尚未完全阐明^[6-7]。有研究^[8]认为,移植肝再灌注后,Bcl-2 随着时间的延长表达逐渐减低,在手术后 6 h,Bcl-2 表达达到最低点。而缺血预处理可以诱导肝脏组织中的 Bcl-2 表达,但是随着缺血时间的延长,Bcl-2 表达逐渐降低^[9]。但对供肝反复进行缺血-再灌注预处理后,移植肝脏的 Bcl-2 表达情况缺乏进一步研究。本研究发现,在正常肝脏组织仅见 Bcl-2 少量表达,在正常肝脏移植后,Bcl-2 表达增加,其机制可能是肝脏组织自身的保护反应。在 IP 组,Bcl-2 的表达水平随着预处理次数的增加而上升,提示在肝脏 IRI 的病理过程中,对移植肝缺血预处理多次的 IP 可以诱导 Bcl-2 的过表达。Bcl-2 基因处于细胞凋亡调控的终末部分,是人体内最重要的凋亡抑制基因,其表达的蛋白能阻止多种因素介导的凋亡^[10-11],多次 IP 能够上调移植肝 Bcl-2 的表达水平,这可能是其减少细胞凋亡,增强对移植肝保护作用的重要机制之一。

综上所述,在手术前对供肝短时间多次的 IP 既

可以避免因缺血时间过长引起的肝细胞损伤,又可以诱导肝细胞 Bcl-2 基因的高表达,从而抑制移植再灌注后各种病理因素引起的细胞凋亡,可供临床借鉴。

[参考文献]

- [1] Kupiec-Weglinski J W, Busuttill R W. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37: 1653-1656.
- [2] 庞利群, 房平承, 刘大彪, 钱海鑫. 双袖套法大鼠原位肝移植模型的技术改进[J]. *徐州医学院学报*, 2007, 27: 368-370.
- [3] Kaszaki J, Wolfárd A, Szalay L, Boros M. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury[J]. *Transplant Proc*, 2006, 38: 826-828.
- [4] Huet P M, Nagaoka M R, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet M P, et al. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver[J]. *Hepatology*, 2004, 39: 1110-1119.
- [5] Teoh N, Dela Pena A, Farrell G. Low-dose TNF-alpha protects against hepatic ischemia reperfusion injury in mice; implications for preconditioning[J]. *Hepatology*, 2003, 37: 118-128.
- [6] Zhang S J, Chen S. The role of ischemic preconditioning in rat liver graft[J]. *Transplant Proc*, 2004, 36: 1970-1972.
- [7] Lee W Y, Lee S M. Synergistic protective effect of ischemic preconditioning and allopurinol on ischemia/reperfusion injury in rat liver[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 349: 1087-1093.
- [8] 孙 凯, 刘志苏, 孙 权. 大鼠肝脏缺血再灌注时肝细胞凋亡与 Bcl-2 蛋白表达的关系[J]. *肝脏*, 2003, 8: 13-15.
- [9] 刘 洪, 宫念樵, 李岗山, 叶启发. Bcl-2 蛋白在肝脏缺血再灌注损伤后表达的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2002, 12: 16-18.
- [10] Mueller T, Kienle K, Beham A, Geissler E K, Jauch K W, Rentsch M. Caspase 3 inhibition improves survival and early graft function after ischemia and reperfusion in rat liver transplantation[J]. *Transplantation*, 2004, 78: 1267-1271.
- [11] Gapano C, Zhao M, Zimmermann A. The apoptosis protector, bcl-2 protein, is downregulated in bile duct epithelial cells of human liver allografts[J]. *J Hepatol*, 1997, 26: 535-542.