论著

文章编号:1000-5404(2005)02-0136-03

SWH液对大鼠肝脏能量代谢的影响

董树虹,董家鸿,张玉君,李 昆 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 通过与UW液进行比较,探讨SWH液对SD大鼠肝脏能量代谢的影响。**方法** 应用大鼠原位肝移植模型,通过高效液相色谱法(HPLC),检测肝组织ATP、ADP、AMP,计算总腺苷酸含量(TAN)及Atkinson's能量转换(EC);肝脏低温保存8、12、18 h后行原位肝移植,观察移植术后7 d动物存活率。**结果** 保存18 h组的ATP、TAN、EC恢复水平明显低于保存8 h组,相差显著,保存12 h组与保存8 h组比较相差不显著;SWH液组移植术后7 d动物存活率有高于UW液组的趋势。肝脏ATP、TAN含量及EC水平与大鼠术后生存率的变化趋势相同。**结论** 肝脏ATP、TAN含量及EC水平与大鼠术后生存率密切相关,采用SWH液保存肝脏,能够有效的保护肝脏能量代谢功能。

关键词:肝脏;能量代谢;大鼠

中图法分类号:R322.47; R333.6; R944.1 **文献标识码**:A

Effects of SWH solution on hepatic energy metabolism in rats

DONG Shu-hong, DONG Jia-hong, ZHANG Yu-jun, LI Kun (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of SWH solution on hepatic energy metabolism in SD rats compared with UW solution. **Methods** Levels of ATP, ADP, and AMP in hepatic tissues were examined by high performance liquid chromatography (HPLC) while ALT, AST, and LDH were examined and the 7-day survival rate of animals was observed with orthotopic liver transplantation model in rats. **Results** Levels of ATP, TAN, and EC in 18-h group were significant lower than those in 8-h group. No significant difference was found between 12-h group and 8-h group. AST, ALT, and LDH were significantly increased after preservation for 18-h than preservation for 8-h. No significant difference was found between 12-h group and 8-h group. The 7-d survival rate of animals in SWH group was higher than that in UW group. The change tendency of ATP, TAN, and EC was the same as the tendency of 7-d survival rate of animals. **Conclusion** These results suggest that levels of ATP, ADP, and AMP in hepatic tissues are closely associated with the survival rate, and SWH solution is effective in protecting hepatic energy metabolism.

Key words: liver; energy metabolism; rat

UW(University of Wisconsin)液是目前世界上许多器官移植中心广泛采用的灌注保存液,它可以有效保存肝脏24~30 h。最近我们研制出一种新的仿细胞外液型肝脏保存液——SWH(Southwest Hospital)液。本研究通过与UW液进行比较,探讨SWH液对SD大鼠肝脏能量代谢的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组

健康SD大鼠324只,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供,体质量200~230 g,雌雄不限。根据使用保存液的种类将大鼠分为SWH液组和UW液组。再将SWH液组、UW液组各分为6个亚组,其中单纯保存8、12、18 h为3个亚组,每个亚组8只大鼠;供肝保存8、12、18 h移植,术后1 h为3个亚组,每个亚组16只大鼠。观察移植术后7 d动物存活率时,SWH液组和UWS液组各分为肝脏保存8、12、18 h 3个亚组,每个亚组15只大鼠。

1.2 肝脏保存液

UW液购于美国Dupont Critical Care公司,SWH液成分为Na^+ 100 mmol/L、K^+ 15 mmol/L、组氨酸30 mmol/L、乳糖醛酸80 mmol/L、三磷酸腺苷5 mmol/L、低分子右旋糖酐25 g/L、1,6-二磷酸果糖5 mmol/L、还原型谷胱甘肽3 mmol/L、药物S 2 mmol/L、药物W 25 mg/L、药物H 40 mmol/L,pH值为7.9±0.1,渗透浓度为340 mmol/L。

1.3 动物模型

采用双袖套法建立大鼠原位肝移植模型,清洁手术。

1.4 检测方法

1.4.1 肝脏能量代谢的研究 利用高效液相色谱法(HPLC),检测肝组织ATP、ADP、AMP,计算总腺苷酸含量(TAN)及Atkinson's能量转换(EC)。按照预定分组,取肝脏标本

作者简介:董树虹(1969-),男,天津市人,博士,主治医师,主要从事肝脏缺血和移植方面的研究。电话:(023)68754016

收稿日期:2004-07-13;修回日期:2004-10-12

1～2 g，立即投入含冰渣的生理盐水中冲洗去血迹，随后移入液氮中速冻保存，待测。称取 100 mg 左右冰冻保存肝组织于预冷至4 ℃盛有 2 ml 0.4 mol/L $HCLO_4$ 溶液的试管内，用微量匀浆器制成匀浆，置高速冷冻离心机内 15 000 r/min离心 15 min，取上清液 0.2 ml 加入 0.5 mol/L Na_2CO_3 溶液 100 μl，充分混匀，15 000 r/min离心 15 min，20 μl 取样分析，测定 ATP、ADP、AMP 含量，以 μmol/g 湿重表示。

1.4.2　观察移植术后动物存活率　　按照预定分组，供肝低温保存后进行原位肝移植术，观察各组动物术后 1、2、3、7 d 的存活率。

1.5　统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用方差分析，计数资料采用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　肝脏能量代谢的观察

随着保存时间的延长，SWH 液组和 UW 液组肝脏 ATP、TAN 及 EC 水平均迅速下降，保存 18 h 组与保存 8 h 组比较相差显著（$P<0.05$），SWH 液组和 UW 液组相差不显著（$P>0.05$）；移植后，各组 ATP 及 EC 水平均迅速升高，较移植前相差非常显著（$P<0.01$），TAN 水平变化不大，但是保存 18 h 组 ATP、TAN、EC 恢复水平明显低于保存 8 h 组，相差显著（$P<0.05$），保存 12 h 组与保存 8 h 组相差不显著（$P>0.05$）；各时相点 SWH 液组均较 UW 液组 ATP、EC 水平略低，但是统计学差异不显著（$P>0.05$）。见表 1～3。

表 1　肝移植前后 ATP 含量的变化（μmol/g，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1　Changes of ATP contents before and after liver transplantation（μmol/g，$\bar{x} \pm s$）

Group		n	Preservation for 8 h	Preservation for 12 h	Preservation for 18 h
SWH solution	Cold preservation	8	1.40±0.17	1.08±0.10	0.36±0.14*
	Post-operation 1 h	16	2.85±0.12△△	2.49±0.12△△	1.15±0.11*△
UW solution	Cold preservation	8	1.32±0.14	0.98±0.12	0.45±0.13*
	Post-operation 1 h	16	2.83±0.10△△	2.54±0.19△△	1.20±0.10*△

△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$，*vs* cold preservation；*：$P<0.05$，*vs* preservation for 8 h

表 2　肝移植前后 TAN 含量的变化（μmol/g，$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　Changes of TAN contents before and after liver transplantation（μmol/g，$\bar{x} \pm s$）

Group		n	Preservation for 8 h	Preservation for 12 h	Preservation for 18 h
SWH solution	Cold preservation	8	4.74±0.09	4.62±0.12	2.59±0.12*
	Post-operation 1 h	16	4.71±0.08	4.35±0.08	2.76±0.16*
UW solution	Cold preservation	8	4.65±0.12	4.53±0.09	2.75±0.10*
	Post-operation 1 h	16	4.65±0.09	4.31±0.16	2.85±0.14*

*：$P<0.05$，*vs* preservation for 8 h

2.2　肝移植术后 7 d 动物存活率

各组动物手术均是同一操作者完成，手术操作及各组间供、受体手术均无差异，无肝期时间（12±2）min，术后长期存活的大鼠，多数在术后第 2 天恢复术前状态，而短期内死亡的大鼠，早期恢复尚好，濒死前眼结膜及消化道出血、摄食减少、毛发蓬松、活动减少，失去警觉性。

大鼠肝脏低温保存 8 h、SWH 液组肝移植术后 7 d 存活率达到 100%，与 UW 液组（100%）比较差异不显著；保存 12 h，SWH 液组肝移植术后 1、2、3、7 d 存活率分别为 93.3%、93.3%、86.7%、86.7%，1 只于术后 1 d 死于腹腔出血，1 只于术后 3 d 死于肝功能衰竭；UW 液组分别为 100%、93.3%、86.7%、86.7%，2 只分别于术后 2、3 d 死于肝功能衰竭，两组比较无显著差异（$P>0.05$）；保存 18 h、SWH 液组肝移植术后 1、2、3、7 d 存活率分别为 80%、60%、60%、60%，UW 液组分别为 73.3%、53.3%、46.7%、46.7%，两组比较无显著性差异，但是在保存 18 h 后，SWH 液组的存活率有高于 UW 液组的趋势。两组肝脏保存 18 h 后大鼠存活率明显低于保存 8 h 后的，差异显著（$P<0.05$）；保存 12 h 与保存 8 h 组统计学差异不显著（$P>0.05$）。见表 4。

表 3　肝移植前后 EC 水平的变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 3　Changes of TAN levels before and after liver transplantation（$\bar{x} \pm s$）

Group		n	Preservation for 8 h	Preservation for 12 h	Preservation for 18 h
SWH solution	Cold preservation	8	0.45±0.02	0.38±0.04	0.25±0.03*
	Post-operation 1 h	16	0.74±0.02△	0.69±0.10△	0.55±0.04△△
UW solution	Cold preservation	8	0.44±0.03	0.36±0.03	0.27±0.04*
	Post-operation 1 h	16	0.73±0.06△	0.69±0.02△	0.56±0.04△△

△：$P<0.05$，△△：$P<0.01$，*vs* cold preservation；*：$P<0.05$，*vs* preservation for 8 h

表 4　肝移植术后 7 d 动物存活情况（$n=15$）

Tab 4　7-day survival rates after liver transplantation（$n=15$）

Group	Preservation time (h)	POD 1	POD 2	POD 3	POD 7
SWH solution	8	15(100%)	15(100%)	15(100%)	15(100%)
	12	14(93.3%)	14(93.3%)	13(86.7%)	13(86.7%)
	18	12(80.0%)	9(60.0%)*	9(60.0%)*	9(60.0%)*
UW solution	8	15(100%)	15(100%)	15(100%)	15(100%)
	12	15(100%)	14(93.3%)	13(86.7%)	13(86.7%)
	18	11(73.3%)	8(53.3%)*	7(46.7%)*	7(46.7%)*

POD：Postoperative day；*：$P<0.05$，*vs* preservation for 8 h

3　讨论

目前认为[1]，理想的器官灌注保存液应满足下列 5 个要求：①减少由于低温保存导致的细胞水肿；②防止细胞的酸化作用；③防止灌洗保存过程中细胞间隙的膨胀；④防止缺血-再灌注损伤；⑤提供再生高能磷酸化合物的底物。根据以上原则研制的 UW 液是目前世界范围内应用最为广泛的一种多器官灌注保存液，已被证明能够有效地保存肾脏 72 h、胰腺 72 h、肝脏 30 h、心脏 24 h。但是它仍然有许多不足，它的高渗性引起细胞皱缩，高粘滞性影响原位灌注，高钾不符合生理，缺乏保护肝脏低温保存的药物，价格昂贵。通过对 UW 液的分析研究认为，改变其某些成分而制成改进

型UW液或仿UW液更为有效[2~4]。为此，我们研制了一种新的肝脏灌注保存液——SWH液，克服了UW液的上述缺点。SWH液的pH值调定为7.9±0.1，有研究表明[5,6]，保存液的pH值在7.9~8.3，能够更好地保存肝脏。

1974年Calman[7,8]用监测细胞内ATP浓度预测器官的存活力。目前大多数学者认为，低温保存阶段肝细胞内ATP、ADP、AMP和TAN浓度对于预测肝脏存活力无指导价值，肝脏再灌注后肝细胞内ATP、ADP、AMP恢复状况可以预测肝脏存活力[9,10]。Norden等[11]证实保存的肝脏中ATP、TAN含量及EC水平与术后生存率成正比。本研究亦发现，随着保存时间的延长，SWH液组和UW液组肝脏ATP、TAN及EC水平均迅速下降，移植后各组ATP及EC水平均迅速升高，较移植前相差非常显著，但是保存18 h组ATP、TAN、EC恢复水平明显低于保存8 h组，保存12 h组与保存8 h组无显著性差异；同时可见，随着保存时间的延长，无论是SWH液组还是UW液组，大鼠术后存活率均明显下降，保存18 h组低于保存8 h组，保存12 h组与保存8 h组无显著性差异，SWH液组较UW液组术后7 d动物存活率略高。由此提示，肝脏ATP、TAN含量及EC水平与大鼠术后生存率的变化趋势相同，两者之间密切相关；采用SWH液保存肝脏，能够有效的保护肝脏能量代谢功能。

参考文献：

[1] Southard J H, Belzer F O. Organ preservation[J]. Annu Rev Med, 1995, 46: 235-247.

[2] Sumimoto R, Jamieson N V, Kamada N. Examination of the role of the impermeants lactobionate and raffinose in a modified UW solution[J]. Transplantation, 1990, 50(4): 573-576.

[3] Yu W M, Coddington D, Bitter Suermann H. Rat liver preservation. I. The components of UW solution that are essential to its success[J]. Transplantation, 1990, 49(6): 1060-1066.

[4] Sumimoto R, Kamada N, Jamieson N V, *et al*. A comparison of a new solution combining histidine and lactobionate with UW solution and eurocollins for rat liver preservation[J]. Transplantation, 1991, 51(3): 589-593.

[5] Busza A L, Fuller B J, Lockett C J, *et al*. Maintenance of liver adenine nucleotides during cold ischemia. The value of a high-pH, high-pK flush [J]. Transplantation, 1992, 54(3): 562-565.

[6] Ahmed I, Attia M S, Corps C L, *et al*. Comparison of two preservation solutions in the protection of the pH regulation mechanism of perfused rat livers after 24 hours of cold storage[J]. Transplant Proc, 2001, 33(1-2): 886-888.

[7] Calman K C. The prediction of organ viability. I. An hypothesis[J]. Cryobiology, 1974, 11(1): 1-6.

[8] Calman K C. The prediction of organ viability. Ⅱ. Testing an hypothesis [J]. Cryobiology, 1974, 11(1): 7-12.

[9] Kamiike W, Burdelski M, Steinhoff G, *et al*. Adenine nucleotide metabolism and its relation to organ viability in human liver transplantation[J]. Transplantation, 1988, 45(1): 138-143.

[10] Harvey P R, Iu S, Mckeown C M, *et al*. Adenine nucleotide tissue concentrations and liver allograft viability after cold preservation and warm ischemia[J]. Transplantation, 1988, 45(6): 1016-1020.

[11] Norden M A, Rao V K, Southard J H. Improved preservation of rat hindlimbs with the University of Wisconsin solution and butanedione monoxime [J]. Plast Reconstr Surg, 1997, 100(4): 957-965.

（编辑 张大春）

（上接135页）

核，核仁突出，胞浆嗜酸性。

2.2 免疫组化观察

S-100和HMB-45是诊断恶性黑色素瘤的重要标记物，本组病例S-100检查均呈阳性反应，89.1%恶性黑色素瘤对HMB-45呈阳性反应。

3 讨论

提示有恶性黑色素瘤的病理组织表现为细胞核的异型性，即核体积大、不规则形状、常出现"八"字核，核仁突出，染色质增多，不典型的核分裂，出现大量不规则分布的黑色素。本病应与交界痣鉴别，特别是浅表扩展性黑色素瘤[2]，痣细胞的核无异型性。肉瘤型恶性黑色素瘤要与软组织肉瘤鉴别，恶性黑色素瘤病灶表浅，细胞无特定分化依据，而软组织肉瘤可找到分化依据。免疫组织化学对恶性黑色素瘤的鉴别诊断有重要价值[3]。S-100阳性率高，但特异性差。HMB-45是恶性黑色素瘤的特异性抗体，能识别与酪氨酸有关的前黑色素糖蛋白，而抗体与正常组织及非黑色素细胞不反应，且阳性率高，具有高敏感性和特异性，对恶性黑色素瘤有诊断价值。Achilles等[4]报道：HMB-45在原发性恶性黑色素瘤中的表达率为97%。在诊断上皮型恶性黑色素瘤时，可使用细胞角蛋白和上皮膜抗原。

关键词：黑色素瘤；颌面部；病理学

中图法分类号：R739.5 文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘复生. 中国肿瘤病理学分类[M]. 北京：科学技术文献出版社，2001. 379-381.

[2] 陈 艳，何志秀，吴兰雁，等. 口腔粘膜原发恶性黑色素瘤的临床病理学研究[J]. 华西口腔医学杂志，2003，21(1)：31-33.

[3] 赖日权，罗祝泉，李 雯，等. 免疫组织化学在恶性黑色素瘤诊断中的价值[J]. 中华病理学杂志，1993，22(3)：178-180.

[4] Achilles E, Schroder S. Positive cytokeratin results in malignant melanoma. Pitfall in differential immunohistologic diagnosis of occult neoplasms[J]. Pathologe, 1994, 15(4): 235-241.

（编辑 陈聪连）