文章编号:1000-5404(2006)19-1959-03

论著

# 不同冷保存时间对大鼠移植肝脏能量代谢的影响

张 莹,别 平,吴 乔,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** 探讨移植肝能量改变与再灌注损伤的关系以及早期肝功能恢复的机制。**方法** 供肝分别于4 ℃ UW液冷保存30 min、6、12 h,"二袖套法"建立大鼠原位肝移植模型,分别于术后12、24 h、3、5、7 d处死大鼠,测定血清ALT、AST、肝组织SOD、ATP酶和ATP含量,并观察肝脏病理改变。**结果** 各组大鼠术后12 h ALT、AST明显升高($P<0.01$),SOD、ATP酶活性和ATP含量降低($P<0.01$);术后3 d ALT、AST显著降低($P<0.05$),SOD、ATP酶和ATP含量逐渐升高($P<0.05$)。肝脏病理改变逐渐减轻。**结论** 移植肝冷保存/再灌注早期SOD、ATP酶和ATP含量下降,细胞能量匮乏,导致肝功能损伤。冷保存时间的延长,再灌注后肝脏损伤加重。随着肝脏SOD水平的升高,氧自由基的清除,ATP酶和ATP含量升高,保证细胞能量供给,从而恢复正常的细胞功能。

**关键词**:肝移植;缺血-再灌注损伤;大鼠
**中图法分类号**:R333.4;R617;R657.3 **文献标识码**:A

# Effect of different cryopreservation time on energy metabolism in rat liver transplantation

ZHANG Ying, BIE Ping, WU Qiao, LI Kun (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of different cryopreservation time on energy metabolism and reperfusion injury in rat to rat liver transplantation and the mechanism of liver function recovery in early period after operation. **Methods** The cryopreservation time of donor livers from 90 Wistar rats were 30 min, 6 or 12 h in 4 ℃ UW solution. Then orthotopic liver transplantation were performed in another 90 Wistar rats. Another 6 rats served as normal controls. At 12 h, 24 h, 3 d, 5 d, 7 d after portal vein reperfusion, blood and liver tissue were obtained to determine the levels of ALT, AST, SOD, ATPase and ATP, and the pathologic changes of liver tissue were observed. **Results** At 12 h after operation, the levels of ALT and AST were significantly higher ($P<0.01$), and SOD, ATPase and ATP were remarkly lower ($P<0.01$) than the normal control rats; at 3 d after operation, ALT, AST were decreased ($P<0.05$), SOD, ATPase and ATP were increased ($P<0.05$) and the pathologic changes of liver was improved. **Conclusion** The decreased levels of SOD, ATPase and ATP in early time of cryopreservation-reperfusion in donor liver and the lack of energy lead to liver injury that gets more severe along with the prolongation of cryopreservation. The oxygen free radical clearance and the increasing levels of SOD, ATPase and ATP can effectively reduce liver injury during cryopreservation-reperfusion and improve hepatic function after liver transplantation.

**Key words**: liver transplantation; ischemia/reperfusion injury; rat

当前肝脏移植亟待解决的问题之一是在供肝切取、保存、植入等过程中产生的缺血再灌注损伤导致的供肝无功能及功能不全等。本实验采用大鼠肝移植模型,研究冷缺血再灌注对肝脏能量代谢与移植肝再灌注损伤的关系,旨在探讨移植肝能量改变与再灌注损伤的关系,以及早期肝功能恢复的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

标准ATP(Sigma公司),超氧化物歧化酶(SOD)、ATP酶和考马斯亮蓝试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

作者简介:张 莹(1974-),男,陕西省铜川市人,博士研究生,医师,主要从事肝移植和重症胰腺炎方面的研究。电话:(023)68754169,E-mail:zhangyingdoc@163.com

收稿日期:2005-10-28;修回日期:2005-12-19

### 1.2 动物模型制备

186只清洁级Wistar大鼠(购自第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),6~8周龄,体质量220~250 g,雌雄各半。取180只Wistar大鼠按随机数字表法分为3组:冷保存30 min组(A组),即供肝切取后置于4 ℃ UW液保存,待受体肝脏切除后立即将供肝植入受体;冷保存6 h组(B组),即切取供肝,4 ℃ UW液保存6 h后行肝移植术;冷保存12 h组(C组),即切取供肝,4 ℃ UW液保存12 h后行肝移植术。每组供、受体各30只,雌性为供体,雄性为受体。其余6只作为正常对照(NC组)。供体术前不禁食,受体术前禁食12 h,自由饮水,采用乙醚吸入麻醉。供体采用腹主动脉灌注法,热缺血时间接近0 min,供肝切取后立即保存于4 ℃ UW液中。按"二袖套法"建立肝移植模型。受体手术无肝期为(11±3) min。

### 1.3 观察指标及方法

每组于移植后(门静脉开放)各取12、24 h、3、5、7 d 5个时相点开腹经下腔静脉抽血2 ml,离心3 000 r/min,10 min取血清-70 ℃保存,成批检测。在动物死亡前快速取肝中叶、肝右叶置于液氮保存。取肝左外叶切成1 cm×0.5 cm×0.5 cm大小固定于4%多聚甲醛溶液。每个时相点6只肝移植大鼠。血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平:TECHNICONRA-1000全自动生化分析仪上采用速率法检测血清ALT、AST;肝脏SOD、ATP酶、ATP含量检测:将液氮保存的肝组织制成组织匀浆,取上清液按试剂盒说明操作采用比色法测定SOD和ATP酶含量;用化学发光法测定ATP含量。光镜检查:肝组织石蜡包埋,常规切片,HE染色。

### 1.4 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件进行方差分析和$q$检验。

## 2 结果

### 2.1 肝脏ALT、AST变化

A、B、C 3组肝脏ALT、AST早期升高(12 h),并且冷保存时间越长水平越高($P<0.05$,$P<0.01$),门静脉开放24 h后开始降低,术后5 d组间比较无差异($P>0.05$)。A、B、C 3组组内比较可见各组术后12、24 h比较无差异($P>0.05$),术后3 d明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),ALT术后7 d无差异($P>0.05$)。AST术后7 d与术后5 d比较仍下降显著($P<0.05$)。见表1。

### 2.2 肝组织SOD、ATP酶、ATP含量变化

A、B、C 3组肝组织SOD、ATP酶、ATP含量早期降低(12 h),并且冷保存时间越长,下降越显著($P<0.05$,$P<0.01$),门静脉开放24 h后,SOD、ATP酶、ATP含量逐渐升高。术后5 d B、C组ATP含量仍显著升高($P<0.05$,$P<0.01$)。ATP酶术后5 d组间比较无差异($P>0.05$),术后7 d SOD、ATP酶、ATP含量组间比较无差异($P>0.05$)。A、B、C 3组组内比较可见术后3 d SOD、ATP酶、ATP含量明显升高($P<0.05$,$P<0.01$)。A组术后5 d ATP仍显著升高($P<0.05$),SOD、ATP酶无差异($P>0.05$),术后7 d SOD、ATP酶、ATP含量均无差异($P>0.05$),B组术后5 d SOD、ATP酶、ATP含量均显著升高($P<0.05$,$P<0.01$),术后7 d ATP酶含量仍明显升高($P<0.01$);C组术后5、7 d SOD、ATP酶、ATP含量均显著升高($P<0.05$,$P<0.01$)。见表2。

**表1 3组动物不同时相点血清ALT、AST变化($\bar{x}\pm s$)**

| 组别 | ALT(U/L) | AST(U/L) |
|---|---|---|
| A组 | | |
| 12 h | 433.5±211.49 | 631.2±242.41 |
| 24 h | 393.8±204.42 | 618.3±166.45 |
| 3 d | 165.3±102.78[a] | 293.0±147.90[b] |
| 5 d | 122.8±74.13 | 228.2±115.17 |
| 7 d | 64.5±36.21 | 69.3±17.27[a] |
| B组 | | |
| 12 h | 753.0±118.31[d] | 1 109.3±286.26[c] |
| 24 h | 699.7±103.33[c] | 985.5±293.67 |
| 3 d | 355.8±133.12[bc] | 533.8±149.63[ac] |
| 5 d | 207.2±130.22 | 319.17±140.88[a] |
| 7 d | 116.0±81.72 | 107.5±30.98[a] |
| C组 | | |
| 12 h | 1 189.5±133.69[d] | 1 602.67±120.58[d] |
| 24 h | 1 055.2±235.31[d] | 1 524.3±565.6[d] |
| 3 d | 499.6±132.14[bd] | 721.3±148.98[ad] |
| 5 d | 262.17±165.30[a] | 424.2±238.67[a] |
| 7 d | 125.2±78.29 | 152.3±65.90[ad] |
| NC组 | 58.83±21.24 | 55.83±22.89 |

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$, 与组内前一时间点比较;c:$P<0.05$, d:$P<0.01$, 与A组比较

**表2 3组动物不同时相点肝组织SOD、ATP酶、ATP变化($\bar{x}\pm s$)**

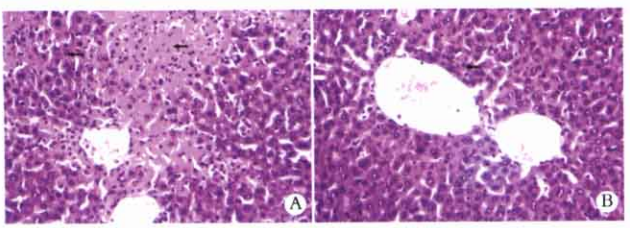
| 组别 | SOD(U/mg) | ATP酶(nmol·mg$^{-1}$·h$^{-1}$) | ATP(μmol/g) |
|---|---|---|---|
| A组 | | | |
| 12 h | 89.14±13.92 | 6.50±0.46 | 0.70±0.11 |
| 24 h | 107.22±7.61[a] | 7.08±0.72 | 1.19±0.17[a] |
| 3 d | 151.17±18.4[b] | 8.96±1.65[a] | 1.59±0.21[b] |
| 5 d | 165.81±18.19 | 10.45±1.49 | 1.90±0.16[a] |
| 7 d | 175.80±16.68 | 10.79±1.42 | 2.05±0.22 |
| B组 | | | |
| 12 h | 69.91±6.44 | 5.22±0.79[c] | 0.55±0.08[c] |
| 24 h | 82.70±16.45[c] | 5.97±0.87 | 0.70±0.1a[d] |
| 3 d | 115.01±17.07[bc] | 7.12±0.72[a] | 1.33±0.18[bc] |
| 5 d | 142.70±23.31[a] | 9.13±1.27[b] | 1.67±0.13[bc] |
| 7 d | 166.67±14.29 | 10.36±1.39 | 1.95±0.17[b] |
| C组 | | | |
| 12 h | 52.95±10.03[d] | 4.02±0.56[d] | 0.44±0.05[d] |
| 24 h | 57.06±8.46[d] | 4.22±0.67[d] | 0.53±0.08[d] |
| 3 d | 90.68±7.14[bd] | 6.38±0.39[bc] | 1.23±0.19[bc] |
| 5 d | 127.10±13.67[bd] | 8.53±1.38[a] | 1.48±0.15[ad] |
| 7 d | 160.45±11.66[b] | 10.63±1.68[a] | 1.85±0.15[b] |
| NC组 | 180.91±9.43 | 11.92±0.80 | 2.27±0.19 |

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$, 与组内前一时相点比较; c:$P<0.05$, d:$P<0.01$, 与A组比较

### 2.3 病理检查

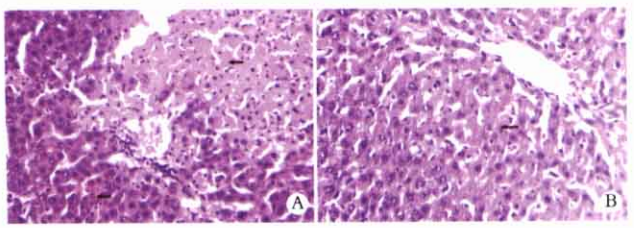
A组术后12 h肝细胞、内皮细胞轻度肿胀,水肿变性,间质

血管扩张，炎症细胞浸润；中央静脉周围肝细胞有少量空泡样变性改变；术后 5 d 肝小叶、中央静脉、汇管区结构清晰，无明显炎性细胞浸润。B 组术后 12 h 肝细胞、内皮细胞肿胀，水肿变性明显，间质血管扩张，炎症细胞浸润；中央静脉周围肝细胞空泡样变性改变（图 1A 左侧箭头示），肝小叶内及靠近汇管区内可见灶性坏死（图 1A，右侧箭头示）；术后 5 d 肝细胞损伤明显减轻，肝汇管区中央静脉结构清晰，炎性细胞浸润明显少于 12 h（图 1B，箭头示）。C 组术后 12 h 肝细胞、内皮细胞明显肿胀，间质血管扩张，炎症细胞大量浸润（图 2A，左下箭头示）；中央静脉周围肝细胞空泡样变性明显，肝小叶内及靠近汇管区内可见多发性灶性坏死（图 2A，右上箭头示）；术后 5 d 肝细胞损伤明显减轻，肝汇管区中央静脉结构清晰，炎性细胞浸润明显少于 12 h（图 2B，箭头示）。




A：术后 12 h；B：术后 5 d

**图 1　冷保存 6 h 组术后 12 h、15 d 肝组织学观察**　（HE×250）




A：术后 12 h；B：术后 5 d

**图 2　冷保存 12 h 组术后 12 h、5 d 肝组织病理学观察**　（HE×250）

## 3　讨论

同系大鼠肝移植术后无排斥反应，其肝功能变化主要与术后缺血再灌注损伤等因素有关[1,2]，本实验采用 Wistar 大鼠建立动物肝移植模型能够比较客观的反映冷保存再灌注损伤过程中肝脏功能的变化。

供肝冷保存再灌注损伤细胞机制尚未完全阐明，可能涉及多种因素，氧自由基被认为是最重要的损伤因素[3]。当再灌注后，次黄嘌呤可通过激活的黄嘌呤氧化酶合成 ROS；并且氧自由基抑制线粒体的氧化磷酸化，使能量物质生成减少，进而加剧细胞损伤[4]。同时缺血使内源性抗氧化剂 SOD 失活或耗尽[5]。SOD 是体内清除氧自由基最重要的酶，对机体的氧化和抗氧化的平衡起至关重要的作用，SOD 降低使超氧化物的清除减少[6]。另外 ATP 不仅能提供修复细胞损伤所需的能量，而且能增强内源性 SOD 活性，加速对氧自由基的清除。

本研究通过观察各组实验动物血清和供肝组织中多项生化指标变化以及供肝组织细胞形态学改变，分析冷保存再灌注损伤中肝脏能量合成的变化。结果显示，肝移植组术后早期肝脏中 SOD 明显降低，说明肝细胞抗氧化能力下降，同时 ATP 酶、ATP 含量减少，血清 ALT、AST 显著升高，说明供肝 ATP 储备耗竭、SOD 活性降低，氧自由基和脂质过氧化产物清除减少，造成细胞损伤，导致肝功能障碍。术后 3 d 肝脏 ATP 酶、ATP 含量的显著升高，SOD 也显著升高，肝功能亦逐渐恢复。光镜肝组织细胞形态学观察也显示肝组织损伤随着 ATP 酶、ATP 和 SOD 升高而减轻，表明 SOD 和 ATP 酶在肝移植肝功能恢复中起重要作用，这可能与 SOD 清除肝组织中氧自由基，减轻对线粒体的损伤，从而使线粒体功能得以修复，恢复氧化磷酸化，使 ATP 酶发挥功能，ATP 合成得以顺利进行。

本实验结果提示：在肝移植冷缺血再灌注过程中能量合成不足致使能量代谢障碍，能量代谢障碍和自由基损伤互为因果，能量代谢障碍是氧自由基产生的物质基础，而自由基又加重能量代谢障碍。可见能量代谢障碍是再灌注损伤的始动环节，而氧自由基是直接引起损伤的主要因素。保证细胞基本的能量供给对维持细胞结构和功能稳定起重要作用，并对移植后供肝功能的恢复具有积极作用。

**参考文献：**

[1] PLOEG R J, D' ALESSANDRO A M, KNECHTLE S J, *et al*. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis[J]. Transplantation, 1993, 55(4): 807 - 813.

[2] 张　莹，别　平，石承先，等. “二袖套法”制备大鼠原位肝移植模型的方法改进[J]. 消化外科，2005，4(6)：444 - 446.

[3] 马　凯，卜献民，戴显伟，等. 山莨菪碱对大鼠移植肝脏保护作用的实验研究[J]. 中华器官移植杂志，2000，21(2)：86 - 88.

[4] VYATKINA G, BHATIA V, GERSTNER A, *et al*. Impaired mitochondrial respiratory chain and bioenergetics during chagasic cardiomyopathy development[J]. Biochim Biophys Acta, 2004, 1689(2): 162 - 173.

[5] MIZUNUMA K, OHDAN H, TASHIRO H, *et al*. ROCK inhibitor Y-27632 prevents primary graft non-function caused by warm ischemia/reperfusion in rat liver transplantation[J]. Transpl Int, 2002, 15(12): 623 - 629.

[6] 王胜智，马庆久，褚延魁，等. 肝移植对胃粘膜损伤的影响及意义[J]. 解放军医学杂志，2002，27(11)：1004 - 1005.

（编辑　陈聪连）