维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2005)01-0001-04

人离体睾丸缺血再灌注损伤的实验性研究

李 明[1], 蒋红梅[2], 李幼平[3]

(1.重庆医科大学临床学院普外科,重庆 400016;2.四川大学基础医学与法医学院免疫学教研室;
3.四川大学华西医院移植工程和移植免疫实验室,成都 610041)

【摘 要】目的:探讨人离体睾丸的缺血再灌注损伤变化规律,为临床行睾丸移植提供理论依据。方法:采用 13 人捐赠尸睾,用 250ml 0℃~4℃高渗枸橼酸盐嘌呤液(HCA 液)灌洗后冷存,再以 500ml 37℃该液再灌注,不同时间点取材作组织学及酶组织化学检查。结果:冷缺血 18 小时开始出现血管内皮细胞肿胀变圆、空泡样变,24 小时内皮细胞变性脱落,睾丸曲细精管基膜与生精上皮剥离,生精细胞变性脱落,间质水肿等,病变随冷缺血时间延长而加重;酶组化结果显示单纯冷保存 18 小时后睾丸组织乳酸脱氢酶(LDH)活性升高,琥珀酸脱氢酶(SDH)活性 24 小时后升高。经 37℃复温再灌注后损伤明显加重。结论:人睾丸对缺血再灌注损伤较敏感,冷保存 18 小时内仅有血管内皮细胞轻微损伤,睾丸组织 LDH 和 SDH 活性分别在冷保存 1 小时和 24 小时后升高,以上变化经 37℃复温再灌注后明显加重。

【关键词】睾丸;缺血再灌注损伤;移植;酶组织化学
【中国图书分类法分类号】R657.3 【文献标识码】A 【收稿日期】2004-04-28

Experimental study on isolated human testes with ischemia-reperfusion injury

LI Ming, et al

(*Department of General Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the injury on isolated cadaver testes induced by ischemia-reperfusion (I/R). *Methods*: 13 isolated cadaver testes contributed by 13 persons were preserved under 0℃~4℃ hypothermia and then reperfused under 37℃. Histology and histochemical changes were observed. *Results*: 4℃ cold ischemia in 18 hours only could induce trivial swelling and vascular degeneration of endothelial cells(ECs). Obvious pathologic changes occurred after 24 hours, including detachment of ECs, separation between basement membrane and seminiferous epitelium, malalignment of spermatogenous cell and edema of mesenchyme. Injury was worse along with the prolongation of cold preservation time. Changes of LDH and SDH activities were found by histochemical staining. Reperfusion following 6 hours ischemia induced tissue injury and unusual enzyme activity. All changes were more obvious after reperfusion following 12, 18, 24 or 36 hours of cold ischemia. *Conclusion*: HCA can preserve testes for 18 hours. Testes can't keep normal histological and histochemical structure beyond 24 hours of preservation under 4℃ hypothermia, and 37℃ reperfusion can make injury worse.

【Key words】Testes; Ischemia-reperfusion injury; Transplant; Enzyme histochemical staining

同种睾丸移植术为治疗先天性或外伤性无睾丸症、双侧睾丸萎缩或发育不良伴有雄激素不足等疾病的重要手段。国内外部分学者进行了与睾丸移植相关的实验与临床研究。但其研究多采用与人类亲缘关系较远的动物如大鼠和狗的睾丸为研究对象;对睾丸缺血再灌注损伤(Ischemia Reperfusion Iniury, I/R 损伤)的研究,实质仅为睾丸的冷缺血损伤,并未涉及到再灌注损伤;所用保存液多为自制的睾丸保存液,保存效果难以重复。鉴于此,我们选择人离体睾丸为研究对象,通过小型蠕动泵建立了离体睾丸的再灌注损伤模型,保存和灌注液采用价廉易得的高渗枸橼酸盐嘌呤液(HCA 液),以期能为临床睾丸移植提供有益依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

高渗枸橼酸盐嘌呤液(HCA 液,规格 500ml/袋,上海市

作者介绍:李 明(1973-),男,主治医师,博士,
主要研究方向:肝胆外科及器官移植。

基金项目:国家自然科学基金重大项目资助(批准号 39993430)

维普资讯 http://www.cqvip.com

血液中心)，SDJ－2 型精密输液器即蠕动泵(浙江新昌国康仪器厂)，小型三用水浴箱(温度范围 0℃－100℃，温波 1℃，北京市医疗设备厂)，LDH 和 SDH 测定试剂(四川大学华西医学中心公共卫生学院提供)。

1.2 方法

1.2.1 标本制备 标本来源于行肾移植和肝移植的脑死亡患者，死因主要是头部损伤，其余脏器情况正常，共 13 人。捐赠尸睾丸离体后立即置 0℃－4℃ 高渗枸橼酸盐缓冷液中，冰瓶中保存，回实验室后，剔除睾丸鞘膜及多余结缔组织，用细硬膜外麻醉用导管行精索动脉插管并固定，每只睾丸用 0℃－4℃ HCA 液进行灌洗，压力为 40－50cm H_2O，直至精索静脉流出液清亮为止。从患者身上取下睾丸的时间平均约 10min，从取下标本到正式灌注期间的时间平均约 1h。

1.2.2 冷保存实验 灌洗完毕后，将睾丸置于 0℃－4℃ HCA 液 250ml 中，置 4℃ 冰箱保存。于冷保存 6、12、18、24、36、48、60 和 72h 取材，分别用组织学及组织化学方法进行观察。

1.2.3 体外 I/R 实验 采用 Langendorff 模型于不同冷保存时间点(6、12、18、24 和 36h)以 500mlHCA 液复温至 37℃，并用蠕动泵行循环灌注，流量 5.5ml/min，温度维持在 37℃，并持续通入 95%O_2＋5%CO_2，于再灌注后 6h 和 12h 取材作组织学和组织化学检测。

1.2.4 检测指标 所取标本除常规石蜡切片 HE 染色，光镜观察睾丸组织学结构外，并行新鲜冰冻切片按 NBT 组织化学法[1]染色显示乳酸脱氢酶(LDH)及琥珀酸脱氢酶(SDH)，阳性反应均为蓝色沉淀。以－(阴性)、＋(可疑阳性)、＋(弱阳性)、＋＋(阳性)、＋＋＋(强阳性)表示酶活性强弱。

2 结 果

2.1 单纯冷缺血对睾丸组织的影响

2.1.1 组织学变化 冷保存 6h 睾丸呈正常组织学图象(图 1)；冷保存 12h 和 18h 见血管内皮细胞开始出现肿胀变圆和空泡样变；冷保存 24h 血管内皮细胞变性脱落，睾丸组织曲细精管基膜与生精上皮剥离，管腔闭合并有假腔形成，生精细胞变性脱落，且随时间延长，间质水肿愈明显，以上改变持续至 48h 内保持相对稳定。

2.1.2 酶组织化学染色 4℃ 冷存 6h，睾丸组织 LDH(图 2)和 SDH(图 3)染以呈弱阳性(＋)。4℃ 冷保存 24h 后升高，染色呈阳性(＋＋)见表 1。



图 1 冷保存 6h 未灌注，睾丸组织学形态正常。(HE×100)

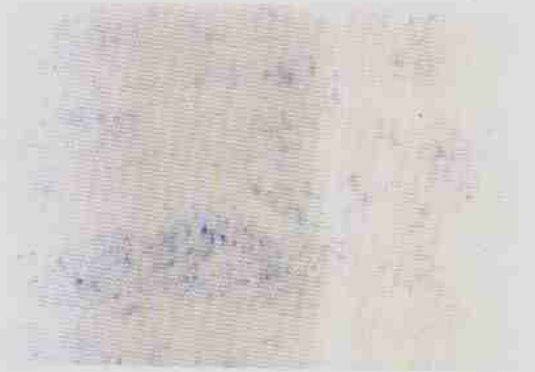


图 2 冷保存 6h，睾丸组织 LDH 染色呈弱阳性(＋)。(LDH×200)



图 3 冷保存 6h，睾丸组织 SDH 染色呈弱阳性(＋)。(SDH×200)



图 4 冷保存 6h 再灌注 6h，睾丸曲线精管基膜与生精上皮分离，生精细胞变性脱落，间质水肿。(HE×100)

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 5 冷保存 6h 再灌注 6h，睾丸组织 LDH 染色呈阳性 (++)。(LDH×200)

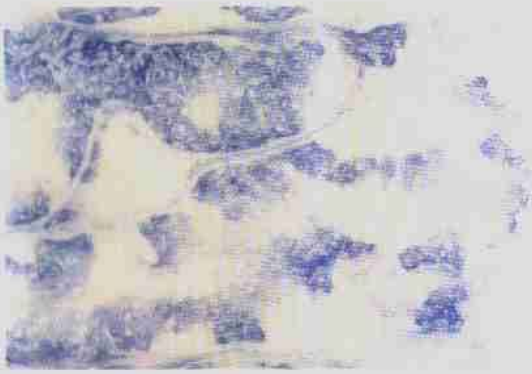


图 6 冷保存 6h 再灌注 12h，睾丸组织 SDH 染色呈阳性 (++)。(SDH×200)

2.2 离体缺血再灌注对睾丸组织的影响

2.2.1 组织学变化 人离体睾丸 I/R=6/6(即：冷缺血 6h 再灌注 6h，下同)睾丸曲细精管基膜与生精上皮明显分离，生精细胞变性脱落，间质水肿(图 4)；I/R=6/12 精索血管 EC 出现肿胀变性、脱落，睾丸曲细精管改变较 6h 重。I/R=12/6 睾丸曲细精管基膜与生精上皮明显分离，生精细胞脱落于管腔中，间质水肿；I/R=12/12 血管 EC 有较明显肿胀变圆、空泡性变、脱落，睾丸组织改变较 6h 反而减轻；I/R=18/12 血管 EC 脱落加重；冷缺血 24h 再灌注后精索血管、曲细精管及间质病理改变加重，且灌注 6h 损伤强于灌注 12h；冷缺血 36h 再灌注后损伤极重，内皮细胞广泛脱落，曲细精管基膜与生精上皮间充液，管腔压闭，生精细胞排列极紊乱，间质高度水肿。

2.2.2 酶组织化学染色 冷保存 6、12h 再灌注后，睾丸组织 LDH 和 SDH 活性增强(图 5，图 6)，冷保存 18、24、36h 再灌注酶学变化紊乱，但仍可见 LDH 活性多于灌注 12h 时增强，SDH 活性灌注 6h 或 12h 增强。见表 2。

表 1 冷缺血不同时间睾丸组织酶活性的改变

Cold ischemia time(h)	LDH	SDH
6	+	−
12	−	+
18	+ +	+
24	− −	+ +
36	+ +	+ +
48	+ +	− −
60	+ +	+ +
72	+ −	+ +

注：+ 表示酶活性为弱阳性，+ + 表示酶活性为阳性，+ + + 表示酶活性为强阳性。

表 2 缺血再灌注不同时间所致睾丸组织酶活性变化

Cold ischemia Time(h)	Reperfusion Time(h)	LDH	SDH
6	0	+	+
	6	+	+
	12	+	+
12	0	−	−
	6	+ +	+ +
	12	− +	− +
18	0	+	+
	6	+	+
	12	+ +	+ +
24	0	+ +	+
	6	+	+ +
	12	+ + +	+ + +
36	0	+	+
	6	+	+
	12	+ +	+ +

注：+ 表示酶活性为弱阳性，+ + 表示酶活性为阳性，+ + + 表示酶活性为强阳性。

3 讨 论

睾丸虽然被认为是免疫特惠器官，但同种移植术后移植睾丸长期存活同样面临着移植物慢性失功(Chronic Graft Failure，CGF)威胁。随着对 CGF 机理了解的深入，非抗原依赖性因素在其中的作用越来越受到重视，移植后不可避免地存在的 I/R 正是最早期、最重要的非抗原依赖性因素之一[12]。由于目前对 CGF 中的非免疫学因素的作用机理还不是十分清楚，故缺乏对 CGF 的规范化治疗，使得移植物的长期存活始终停留于较低的水平[13]，因此对 I/R 的研究显得日益重要。

供睾离体后冷保存与移植后 I/R 损伤密切相关，冷缺血时限一直是被关注的焦点，不少研究者作

维普资讯 http://www.cqvip.com

过该方面的探索。Attaraan 曾观察到离体睾丸不灌注置于常温下保存,超过 2h 后即有明显的病理组织学的改变。Smith 经动物实验证实睾丸可耐受 2～4h 的冷缺血时间而不至于严重损害。孙瑜等认为在 4℃条件下保存的人和狗的离体睾丸 24h 内无明显组织结构及酶学改变,48h 后仅有轻度的改变。高治中等应用不灌洗法低温保存发现 24h 内未见不可逆组织学损害。丁亮华等[4]发现大鼠离体睾丸冷存 24h 后组织结构开始出现变化,SDH 活性降低,随冷存时间延长损害加剧。我们的结果显示,人睾丸离体冷保存 6h 睾丸呈正常组织学图象;冷保存 12h 和 18h 见血管内皮细胞开始出现肿胀变圆和空泡样变;冷保存 24h 血管内皮细胞变性脱落,睾丸组织曲细精管基膜与生精上皮剥离,管腔闭合并有假腔形成,生精细胞变性脱落,且随时间延长,间质水肿愈明显,以上改变持续至 48h 内保持相对稳定,与文献报道不尽相符。LDH 活性在冷存 18h 后就增高,可见冷缺血可导致睾丸组织结构的损伤和酶学改变,且在酶学水平更显敏感。LDH 是糖酵解途径中关键酶,SDH 是生物氧化途径中重要的线粒体酶,它们影响着组织细胞的能量代谢,缺氧刺激使组织细胞发生应激性反应,LDH、SDH 等活性代偿性增高。人睾丸 4℃冷保存后行 37℃复温再灌注,我们观察到睾丸的组织学损伤更明显,且冷保存 6h 后再灌注即有此变化,这表明缺血后的再灌注损伤比缺血性损伤的危害更大,因此,如能有效地抑制再灌注损伤,将会明显降低移植器官功能不良和 CGF 的发生。

在睾丸保存液的选择上,UW (University of Wisconsin)液价格昂贵,且购买困难;国内多采用自制睾丸灌注保存液 1 号,该液可保存离体睾丸 24h,但配制繁琐,不易推广。本实验中,我们采用国内最常用的肾移植灌洗保存液——HCA 液,其可保存离体肾长达 72h,且价廉易得。从本实验中可见,HCA 液同样可保存离体睾丸达 24h,因此完全可取代睾丸保存液 1 号。

实验中,睾丸组织光镜、LDH 及 SDH 活性检测结果表明,单纯冷缺血组人睾丸组织冷缺血 12h、18h 见血管内皮细胞开始出现肿胀变圆、空泡样变;24 小时后内皮细胞变性脱落,睾丸曲细精管基膜与生精上皮剥离,生精细胞变性脱落,间质水肿等;睾丸组织 LDH 活性 18h 后升高,SDH 活性 24h 后升高,以上改变表明单纯冷缺血组睾丸发生了缺血性睾丸损伤。缺血再灌注损伤组,人离体睾丸 I/R = 6/6(即:冷缺血 6 小再灌注 6 小时,下同)睾丸曲细精管基膜与生精上皮明显分离,生精细胞变性脱落,间质水肿;I/R = 6/12,精索血管 EC 出现肿胀变性、脱落,睾丸曲细精管改变较 6h 重。I/R = 12/6,睾丸曲细精管基膜与生精上皮明显分离,生精细胞脱落于管腔中,间质水肿;I/R = 12/12,血管 EC 有较明显肿胀变圆、空泡性变、脱落,睾丸组织改变较 6h 反而减轻;冷保存 6、12h 再灌注后 LDH 和 SDH 活性增强;以上改变表明 IR 组发生了缺血再灌注性睾丸损伤。由此可见该模型既能反映缺血性睾丸损伤又能反映再灌注性睾丸损伤,故本模型制备是成功的。

有研究者曾建立离体大鼠心肌缺血再灌注 Langendorff 模型于体外探讨药物对 I/R 损伤的保护作用[5,6],因此,人离体睾丸的 I/R 损伤模型同样可用于研究 I/R 损伤机理及药物干预机理,由于为人体器官,其结果更具指导意义。

参 考 文 献

[1] 朱新生,王伯纶,李 青. 细胞和组织化学[M]. 见:王伯纶,李玉松,黄高异,等. 病理学技术,第 1 版. 北京:人民卫生出版社,2000;236.

[2] Azuma H, Nadaeu K, Takada M, et al. Celluar and molecular predictors of chronic renal dysfunction after initial ischemia/reperfusion injury a single kidney[J]. Transplantation, 1997; 64(2):190.

[3] 王庆文. 移植肾慢性排斥反应的发病机制和治疗[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志,2000;9(2):181.

[4] 丁亮华,郭彩霞,夏兆骥. 大鼠睾丸灌注冷存的实验观察[J]. 内蒙古医学杂志,1996;16(6):338.

[5] 袁 彪,朱朗标,王冬青,等. 外源性磷酸肌酸对离体鼠心能量代谢及线粒体功能的影响[J]. 中国胸心血管外科临床杂志,2000;7(3):178.

[6] 欧阳碧山,陈启智,徐军美. 甘利欣对大白鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中华麻醉学杂志,1999;19(6):381.