维普资讯 http://www.cqvip.com

肝移植. 再灌注损伤、缺血性,

第23卷 第2期 重庆医科大学学报 Vol.23 No.2
1998 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1998

200-203

35

肝移植缺血再灌注损伤

预防医学系 汤 兵* 综述 康格非 吴逸人 审校

R657.3
R363.27

中图分类号 Q593.1

自1955年welch首次报道实验性肝移植以来，全球移植中心名录处1996年公布，至1995年年底已有48967例肝移植，它已成为仅次于肾移植的第二位的大器官移植。供肝保存欠佳及再灌损伤是导致移植肝功能不良的重要因素。因之，寻找一种安全有效的移植肝保存法，肝移植缺血再灌损伤机制已成为重要的研究课题，以往的研究主要集中在肝实质细胞(HC)的氧自由基生成与钙超载方面，近来研究表明，肝窦内的内皮细胞(EC)、Kupffer细胞(KC)及中性粒细胞(PMN)在缺血再灌损伤中有重要作用。现将研究进展综述如下：

1 肝脏的缺血损伤

虽然肝脏的缺血再灌损伤是一个完整的体系，但也可按时间分为缺血期和再灌期损伤。损伤主要表现在再灌期，但以缺血期损伤为基础，缺血期主要是EC和HC的损伤。

1.1 EC的损伤

肝常温缺血15′就有EC早期可逆性损伤[1]。电镜下EC小孔扩大、融合，筛板塌溃、细胞器肿胀。核染色质脓集、细胞回缩。Marzi用Euro－Collins保存液4℃保存鼠肝24h再灌20′，移植后失活的肝虽然不足5%HC失活，但大多数EC失活[2]，通过测EC降解的高分子多糖透明质酸发现EC缺血时间与之损伤呈正相关[3]。可见EC在缺血期发生的可逆性改变与供肝存活密切相关。冷缺血时，EC比HC更易损伤，这对于冷保存作为目前肝移植保存的主要方法尤为重要。Sabine采用铈选择性结合EC染色发现：缺氧时EC中黄嘌呤氧化酶(XOD)活性大大增加，复氧后反而下降[4]Stephen证明Ca^{2+}通道阻滞剂导博停(VP)能阻止冷保存期的肝缺血损伤。VP的保护作用是抑制了黄嘌呤脱氢酶(XDH)向XOD的转化[5]，提示EC在缺血期损伤主要是由Ca^{2+}平衡紊乱引起。当肝缺血时，EC糖原储存量少，能量供应较差，胞内乳酸堆积导致$H^+/Na+$交换增加，此时Na^+/K^+泵活力降低，故胞内$[Na^+]$升高，激活细胞质膜上的Na^+/Ca^{2+}内流便胞内Ca^{2+}超载，加之Ca^{2+}泵作为Ca^{2+}移出细胞的主要转运过程被抑制，Ca^{2+}被动扩散也增加最终使胞内Ca^{2+}超载。从而激活肌球蛋白轻链激酶使EC肌球蛋白轻链磷酸化，引起微丝移动、细胞收缩。胞外因素如低温，细胞因子(TNF、IFN、LT)都与EC细胞骨架有关。Fujii发现非溶酶体酶对EC的缺氧损伤有重要作用[8]。肝移植保存在UW液(University of wisconsion)18h后，EC脱离血窦壁进入血窦腔并伴随贮脂细胞异常。贮脂细胞具有一过性Ca^{2+}通道并与冷保存的EC破坏密切相关[7]。总之，缺血时EC的可逆性损伤是再灌损伤的基础，Ca^{2+}平衡紊乱在EC缺血损伤中具有重要作用。

1.2 HC的缺血损伤

HC的缺血损伤不如再灌损伤严重，此期损伤主要是HC膜起泡突向肝窦腔，线粒体及内质网结构改变乃至整个HC坏死。尤以肝小叶中心区及门脉区损伤为重，伴有LDH活性上升，这主要与能量耗竭和$[N_a^+]$改变有关[8][15]。肝热缺血2h其总腺嘌呤核苷酸下降87%，重建血循后ATP的恢复依赖于HC中原有腺核苷酸总量并与移植成功率密切相关[9]，热缺血时间越长，ATP水平恢复越难。最近采用^{31}P核磁共振(MRS)技术研究发现24h冷保存猪肝时ATP的产生减少40%[10]。经人体和动物研究发现糖酵解底物产生的ATP对保持肝缺血期ATP水平是很重要的[11]。此种ATP参与保护HC膜完整性，如此种ATP不足则HC损伤不可避免[12]。Marsh发现甘氨酸保护HC是使之免于因缺血及线粒体抑剂剂引起的损伤，而对Ca^{2+}和氧应激引起

* 女 1968－01 出生、硕士研究生

维普资讯 http://www.cqvip.com

的损伤无效，提示缺血期HC损伤与线粒体损伤有关，而与Ca^{2+}超载和氧自由基产生关系不大[15]。Brecht采用钙通道阻滞剂利心平和硫氮酮能减轻缺氧损伤并不象以往认为的与Ca^{2+}超载有关，而是提高了缺氧HC的能量水平。缺氧培养HC 5h，胞液中$[N_a^+]$从16±2mμ上升到76±9mμ，而$[Ca^{2+}]$没有改变，提示Ca^{2+}在HC缺血损伤中只起次要作用，而N^+在此过程中起主要的作用。缺血HC损伤的机制是：①肝细胞膜受损。采用^3H花生四烯酸(AA)和^{14}C一亚油酸标记磷脂后发现缺血期HC膜磷脂降解，从而膜通透性增加[14]。此时胞内糖酵解加强使H^+/Na^+交换增多，胞内$[N_a^+]$上升导致细胞水肿。②线粒体受损。线粒体膜受损后水肿，其受损标志酶谷氨酸脱氢酶(GLDH)大量外漏[4]，同时氧化磷酸化脱偶联使ATP合成进一步减少，加重HC损伤。③PH依赖性非溶酶体蛋白水解酶有助于HC最终死亡[16]。Bronk发现鼠HC死亡与此酶有高度线性相关，果糖对HC的保护也是因果糖酵解产生的ATP抑制了此酶活性[17]。

2 肝脏的再灌损伤

以缺血损伤为基础的再灌损伤主要是KC、PMN以及它们的毒性产物发挥了重要作用。

2.1 EC的进一步损伤

EC在再灌后其可逆损伤有逆转现象，但EC损伤引起的胞膜裂隙仍能观察到。特别在血循再建后，这些胞膜裂隙部位有许多炎性细胞粘附。这是由于缺血期EC可逆性损伤导致其表面受体暴露，再灌后使PMN、血小板粘附并释放毒性介质。缺血期EC中ATP快速分解成次黄嘌呤，XOD活性增加，再灌后XOD与O_2共同诱导产生大量O_2^-，破坏EC膜，杀死EC。Fujii研究发现EC死亡与其线粒体功能衰竭直接相关[6]。线粒体呼吸爆发产生氧自由基，激活线粒体膜PLA，膜降解导致环孢素A敏感性通道开放从而使膜去极化，最终EC因线粒体功能衰竭而死亡。EC下面缺乏基底膜，再灌时血流冲击使死亡的EC脱落阻塞血窦，使肝微循环障碍导致部分HC死亡。

2.2 KC的损伤及效应

缺血期KC伪足回缩、胞内溶酶体和内质网缩小。胞膜和细胞器无损害，KC仅是功能降低。再灌后KC体积增大、伪足增多、内质网增大，胞内有吞噬的细胞碎片。再灌5′后KC明显激活并释放多种生理活性物质，如TNF、IL－6、O_2^-和NO[18]。Bzeizi证明人体肝移植再灌后确有氧自由基的增多、此增多程度与移植后肝功能不良密切相关[19]。再灌后O_2^- 1h达峰值。血浆转氨酶活性上升也达峰值，此为肝再灌I相损伤[20]；接着的6～24h转氨酶再次显著升高为II相损伤。最近研究认为细胞内IEGs(immediate early genes)中的e－fos和e－jun的表达与肝这两相损伤有关[21]。再灌期肝窦内存在持久氧应激，而HC内活性氧的形成和灭活与再灌损伤无关[22]。标志氧应激的氧化型谷胱甘肽(GSSG)水平的升高和降低都与KC的激活和灭活相对应而与PMN无关，提示KC是再灌初期活性氧的主要来源[23,24]。Shibuya证明KC可通过NADPH氧化酶和黄嘌呤氧化酶两条途径在冷保存后最先产生O_2^-，且调节着再灌期的早期损伤[25]。同时热缺血再灌后氧自由基的产生也主要通过KC[23]。由于肝再灌期存在补体激活现象，KC暴露于C_{5a}时可产生大量O_2^-，这也可能是KC内$[C_a^{2+}]$上升诱导产生，或是KC吞噬坏死细胞时被激活产生。激活后的KC释放蛋白水解酶和大量细胞因子(TNF、IL－1、IL－6、γ－IFN等)，引起肝组织I相损伤，此时KC对肝组织II相损伤的激发作用尤为重要。

再灌后肝窦内有大量PMN浸润[27]。这是因EC缺血期损伤使其表面受体暴露，再灌后PMN及EC表面粘附蛋白过度表达或构造改变引起二者的粘附。特别是PMN表面的整合蛋白CD_{11}/CD_{18}在粘附中起重要作用[24]。钙超载，活性氧及细胞因子的作用是PMN与EC粘附的主要原因。当EC内$[Ca^{2+}]$升高时，胞内Weible－Palacle小体融合，小体膜内面的GMP_{140}随EC脱颗粒转移到质膜上与PMN膜上LewisYX寡糖结合，导致EC或血小板与PMN的粘附，此过程又能被活性氧激动[28]。KC与EC在I相损伤时就有大量活性氧生成[27]，这主要与PMN和EC粘附的最初4h损伤有关，而KC激活后释放的细胞因子主要引起PMN和EC表面受体表达增加，由此产生的粘附增加是肝再灌II相损伤的

维普资讯 http://www.cqvip.com

激发阶段。KC产生的细胞因子TNF具有重要作用；①TNF既能以多种方式激活EC使粘附增加，又能使PMN释放活性氧增加，同时释放具有Ca^{2+}通道样作用的LT_{B4}，引起EC与PMN速发粘附。TNF还能再激活KC，释放更多的TNF、IL－1、IL－6等形成扩大效应。②TNF能使EC和HC合成IL－8、发挥化学激动PMN作用产生活性氧使粘附增加[29]。③TNF与IL－1、α－IFN一道可改变蛋白酶/抑蛋白酶平衡，导致EC膜蛋白降解。④TNF使EC、PMN产生NO，NO在再灌损伤中有正负双重作用，它既可使血管平滑肌松驰扩张，维持血管壁完整性又能灭活超氧化物抑制CD_{11}/CD_{18}表达从而阻止PMN粘附减轻损伤[30]；但NO在灭活超氧化物时又产生活性极强的超氮阴离子和OH^-，对细胞起毒性作用[31]。除TNF外，KC产生的IL－1可激活EC使之处于促炎症促血栓形成状态[32]，IL－6与肝急性时相蛋白的产生有关[33]，r－IFN还可激活KC使之产生更多的TNF、IL－1使粘附增加。总之，TNF及KC产生的其它细胞因子及它们之间的信号网络调节在肝再灌损伤中起重要作用。

2.3 PMN的损伤及效应

肝再灌的Ⅱ相损伤是由KC激发，经PMN介导的进一步扩大损伤作用。激活后的PMN主要通过产生氧自由基和蛋白水解酶及两者协同作用损伤肝组织。PMN经NADPH氧化酶产生O_2^-和H_2O_2，活化的PMN分泌髓过氧化酶，催化H_2O_2和cl^-生成次氯酸。O_2^-和次氯酸都是强氧化剂可氧化巯基使蛋白质降解，导致肝组织损伤。同时，PMN产生的O_2^-导致生物膜的脂质过氧化[34]，PMN能产生TNF－2，而TNF_{-2}导致的ENA－78(epithelial neutrophil activating protein)表达增加是肝再灌损伤的重要原因[35]。激活的PMN还释放中性及糜蛋白酶，酸性及碱性蛋白酶，核苷酸酶，RNA酶及过氧化物酶，都参与HC损伤。其中糜蛋白酶和中性蛋白酶介导了大部分HC损伤，正常时机体存在大量α_1、一蛋白酶抑制物(α_1、－PI)，激活的PMN分泌氧自由基使α_1—PI失活。可见蛋白酶与氧自由基协同作用使HC坏死，坏死HC又促使补体激活KC及使PMN活化，如此恶性循环使损伤进一步扩大，最终导致肝组织严重损伤。

肝再灌损伤中KC及EC产生的脂类介质介导的损伤也不可忽视。当KC受到活性氧作用或胞内钙超载时，膜降解生成血小板激动因子(PAF)和AA。PAF能再活化KC或通过使PMN、单核细胞和巨噬细胞产生TNT－2和IL－8、IL－6进一步活化PMN[36]。AA代谢产生的前列腺素PGs、血栓素TXs和白三烯LTs三大类物质成为再灌损伤的重要炎症介质。LT_{B4}使Ca^{2+}内流促进PLA_2激活。TX_{B2}和TX_{A2}也是PMN的化学激动剂，TX_{B2}能使PMN与EC表面受体相互作用产生更多的活性氧和蛋白酶，扩大炎症反应。AA代谢产物及PAF还作用于微脉管系统，破坏血管扩张和收缩平衡使通透性改变，促进血小板聚集从而加重微循环障碍引起肝组织损伤。

通过以上二个阶段大量实验证据可认为肝缺血期损伤作为再灌损伤的基础主要是因Ca^{2+}平衡紊乱导致的EC损伤以及因能量耗竭和$[Na^+]$改变导致的HC损伤，再灌损伤又分为由KC激活释放大量活性氧、蛋白酶和细胞因子引起的HCl相损伤以及PMN激活后，PMN的聚集、粘附、释放氧自由基和蛋白酶进一步扩大炎症反应最终导致肝组织损伤的Ⅱ相损伤。其中一些细胞因子，脂类介质发挥着重要的调节作用，构成了肝移植缺血再灌损伤的多细胞参与，多种介质共同发挥作用的网络体系。

1.Fratte S, et al. Hepotology 1991;13(6):1173
2.Marzi I, et al. Transplantation 1989;48(3):463
3.Laurent TC et al. Biochem J 1986;234:653
4.Sabine A et al. Hepotology 1995;21(6):1594
5.Brass CA, Narciso J, Gollan JL.J Clinc Invest 1991;87:424－431
6.Fujii Y, Johnson ME, Gores GJ.Hepotology 1994;20:177－185
7.Ohno A, et al.Dig－Dis－Sci 1994;39(4):861
8.Rosser BG, Gores GJ.Gastroenterology 1995;108:252－275
9.Warnick CT, et al. J Surg Res 1992;52(3):238
10.Changani KK, Fuller BJ, Bryant DJ, et al.J of

维普资讯 http://www.cqvip.com

Hepotology 1997;26:336－342
11.Jaeschke H. J of Hepotology 1996;25:774－780
12.Lefebvre V. et al. Hepotology 1994;20(6):1567
13.Marsh DC. et al.Hepotology 1993;17(10:91)
14.Carini R.et al. Bio－Bio－Res－Com 1995;260(1):180
15.Richter C.Schweizer M.Corssarizza A. et al. FEBS Lett 1996;378:107－110
16.Calmus Y. Cynober L. Donesset B. Gastroenterology 1995;108:1510－1516
17.Bronk s. Am J phsysiol 1993;264(4):G744－G751
18.McCurry KR.et al.J Surg Res 1993;55:49
19.Bzeizi KI. Dawkes R. Dodd NJF. J of Hepotology 1997;26;69－74
20.Jaeschke H. et al. Am J phsysiol 1991;260(3):G355
21.Schlossberg H.Zhang YL. Dudus L.Hepotology 1996;23:1546－1555
22.Caraceni P. et al. Am J phsysiol 1994;266(5):G799
23.Langdal LA. et al. J Leukoc Biol 1993;53(5):511
24.Jaeschke H. et al. Hepotology 1993;17(5):915
25.Shibuya H. Ohkohchi N. Seya K. Hepotology 1997;25:356－360
26.Fukumoto T. et al. Transplant proc 1995;27:1901－1905
27.Clavien PA. et al. Transplantation 1992;53(5):967
28.Geng JG. et al. Nature 1990;343(22):757
29.Thornton AJ. et al.Hepotology 1991;15:1112
30.Alessandro Cc.Elisabetta C. Renata S.Hepotology 1997;25:361－367
31.Stamler JS. et al. Cell 1994;78:931
32.Anolus T. et al. Hepotology 1991;13(2):364
33.Hirano T.et al. Immunol Today 1990;11:443
34.Parola M.Leonareluzzi G.et al.Free Radic Biol Med 1996;20:351－359
35.Lisa MC. Steven LK. Alfred W. Hepotollgy 1996;23:506－514
36.Serizawa A.Nakamura S. Suzuki S. et al. Hepotology 1996;23:1656－1663

(收稿日期 1997－04－01)

203－206 肿瘤 端粒 端粒酶 36

端粒、端粒酶与人体肿瘤

病理生理学教研室 周剑芳* 综述 范维珂 汤为学 审校

R730.2

中图分类号 R730.2

端粒(telomere)是线性染色体末端的特殊异染色质结构，具有保特染色体稳定的功能[1]。1978年Blackburn和Gall测定了第一个端粒序列，基于它自身独特的结构，人们对它的复制方式提出多种假说[2]。1985年Greider与Blackburn解答了这个问题，他们在四膜虫[3]、纤毛虫[4]的细胞提取物S_{100}中发现了一种特殊的核糖核蛋白，即端粒酶(telomerase)，它可以其中的RNA为模板逆转录合成端粒DNA。后又陆续在酵母菌[5]、人类永生化细胞及胚系组织中发现。研究表明人类正常体细胞中端粒酶活性处于低水平，在胚胎组织、永生化细胞及恶性肿瘤中却可测到较高的端粒酶活性，且端粒保持一定长度[6]。这些研究的生物学意义及其在肿瘤生长中的作用，引起人们广泛注意。本文就端粒、端粒酶与人体肿瘤方面的研究动态作简要综述。

1 端粒的结构和功能

1.1 端粒的结构

Blackburn和Szostak将端粒结构分为两类：端粒相关序列(telomere associated sequences)和端粒DNA序列(telomeric DNA sequences)。毗邻染色体末端的端粒相关序列是由长核苷酸序列串联重复形成，参与了染色体间相互作用；位于

* 女，1971－08出生，95级研究生