DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.09.020
第22卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 9
868 2000年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)09-0868-04

肝脏低温保存-再灌注期间肝细胞凋亡及其与氧自由基变化的关系

汤礼军,田伏洲,王 雨,李晓军 (成都军区成都总医院全军普外中心实验室,成都 610083)

提 要:目的 研究临床肝移植过程中离体供肝低温保存-再灌注期间肝实质细胞凋亡及其相关机制。方法 应用细胞凋亡原位末端标记法并结合电镜观察,检测低温保存时间分别为0、3、6、及9 h的4组兔肝脏在低温保存-再灌注过程中肝细胞凋亡发生情况。同时,对4组肝脏再灌注前、后组织内氧自由基相关指标进行测定。结果 各组肝脏于低温保存后的再灌注期间,组织内可见明显的肝实质细胞凋亡现象,且低温保存时间越长的肝脏,再灌注后凋亡细胞数量越多;但各组肝脏于低温保存末,组织内则未见或仅偶见肝实质细胞凋亡。此外,4组肝脏实质细胞凋亡数量与相应组织内氧自由基含量间呈显著的正相关关系。结论 肝实质细胞凋亡显著参与了肝脏低温保存-再灌注损伤过程,组织内氧自由基的过量产生可能是肝实质细胞凋亡的重要机制。

关键词:肝脏;保存-再灌注损伤;凋亡;氧自由基;兔
中图法分类号:R657.3 文献标识码:A

Study of hepatocellular apoptosis during cold preservation-reperfusion of isolated livers and its mechanism

TANG Li-jun, TIAN Fu-zhou, WANG Yu, LI Xiao-jun (PLA Centre of General Surgery, Chengdu General Hospital, Chengdu 610083, China)

Abstract: Objective To study hepatocytic apotosis during cold preservation-reperfusion of isolated liver and its mechanism during liver transplantation. Methods Four groups of rabbit livers, which had been preserved in cold storage for 0、3、6、9 h respectively, were observed during reperfusion with TdT-mediated dUTP-biotion nickend labeling and electron microscope. Besides, SOD, GSH and MDA in liver tissue were observed at the time points before and after reperfusion. Results Apoptotic hepatocyces were obviously observed in reperfusec livers after cold storage. Furthermore, the longer the cold storage, the greater the number of apoptotic cells. On the contrary, no or a few apoptotic hepatocytes appeared in all the livers preserved in low temperature. In addition, there was significant positive correlation between the numbers of apoptotic hepatocytes and contents of oxygen free radicals. Conclusion Apoptosis of hepatocyts occurred markedly in the donor liver after cold preservation-reperfusion, and increased oxygen free radicals may play a rale to induce hepatocytic apoptosis .

Key words: liver; preservation-reperfusion injury; apoptosis; oxygen free radicals; rabbit

临床肝移植过程中,离体肝脏(供肝)低温保存-再灌注损伤一直是影响肝移植术后效果的重要原因。既往人们的研究大多数集中于对供肝组织细胞坏死性改变的认识上。近年来发现,组织细胞除坏死以外尚存在着另一种死亡形式——凋亡,在供肝低温保存-再灌注损伤过程中,肝细胞凋亡是否也参与其中?澄清这一问题将有助于进一步阐明供肝低温保存-再灌注损伤机制,为寻找更好的供肝保护措施提供实验依据。

作者简介:汤礼军(1965—),男,安徽省和县人,博士,主治医师,主要从事肝脏移植方面的研究,发表论文18篇。电话:(028)6570353

收稿日期:1999-11-17;修回日期:2000-05-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1　材料与方法

1.1　动物分组与模型制备

健康成年新西兰大耳白兔 40 只, 雌雄不拘, 体重 2.1～2.6 kg, 随机分为供体组(20 只)及受体组(20 只)。两组动物分别作下列处理。

① 供体组: 供体组兔肝脏(供肝)的原位灌注及切取按 Jamieson 等[1] 介绍的方法进行。将切取的供肝立即置于 4℃ Eurocollins 液中低温保存, 依据保存时间的长短又将其平均分为下列 4 组, A 组: 供肝切取后, 立即进行再灌注, 即低温保存时间为零; B 组: 低温保存 3 h; C 组: 低温保存 6 h; D 组: 低温保存 9 h。上述方法处理供肝后, 即按下文方法进行再灌注。

②受体组: 动物麻醉后切开腹腔, 游离并显露左肾动、静脉。将两根长 12 cm、内径 3 mm 充满肝素盐水的硅胶管分别由左肾动、静脉插入腹主动脉及下腔静脉内, 钳夹游离端, 备用。

将上述待灌注供肝的门静脉及肝下下腔静脉分别与受体兔的肾动、静脉插管连接(此前已结扎供肝的肝动脉及肝上下腔静脉), 恢复供肝血流。有关离体肝脏保存-再灌注损伤模型制备的具体方法详见文献[2]。

1.2　观测指标及方法

分别于各组供肝离体前、低温保存末及再灌注 60 min 时, 自左侧叶前缘获取肝组织标本, 标本分 3 套, 分别用于电镜观察、细胞凋亡原位末端标记检测(TdT-mediated dUTP-biotion nick-end labeling, TUNEL)及氧自由基相关指标测定。

1.2.1　透射电镜观察　　将获取的肝组织切成约 1 mm^3 小块, 立即置 3%戊二醛中固定, 后经 1%四氧化锇固定, 梯度乙醇脱水, EPON812 环氧树脂浸透包埋, 超薄切片, 醋酸铀-柠檬酸铅双重染色后, 透射电镜下观察。

1.2.2　供肝组织内肝细胞凋亡检测　　肝组织标本经 10%福尔马林固定后, 常规石蜡包埋。每个标本切取 4 张切片(5 μm), 采用 TUNEL 方法[3] 检测组织内肝细胞凋亡情况。步骤如下: 切片常规脱蜡脱水, PBS 漂洗(5 min×3), 20 μg/ml 蛋白酶 K 消化(37 ℃, 10 min), 0.3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶(37 ℃, 10 min), PBS 漂洗后加含 TdT 的 TUNEL 反应液于湿盒中孵育(37 ℃, 2 h), 1%BSA 漂洗(37 ℃, 20 min), 加抗荧光素抗体后再于湿盒中孵育(37 ℃, 2 h), PBS 漂洗(5 min×3), 0.05%DAB-0.01% H_2O_2-TBS 显色(37℃, 10 min), PBS 漂洗(5 min×3)后, 脱水, 透明、DPX 封片。每张切片摄取 6 个视野, 应用图像分析系统计数单位面积内阳性细胞数。

1.2.3　供肝组织氧自由基相关指标测定　　将约 100 mg 肝组织经生理盐水冰浴匀浆后, 4℃, 3 000 r/min 离心 20 min, 取上清液分别作下列指标测定: ①谷胱甘肽(GSH)含量测定: 采用二硫代二硝基苯甲酸法; ②超氧化物歧化酶(SOD)活性测定: 采用亚硝酸盐法; ③丙二醛(MDA)含量测定: 采用硫代巴比妥酸法。具体操作方法按南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书进行。

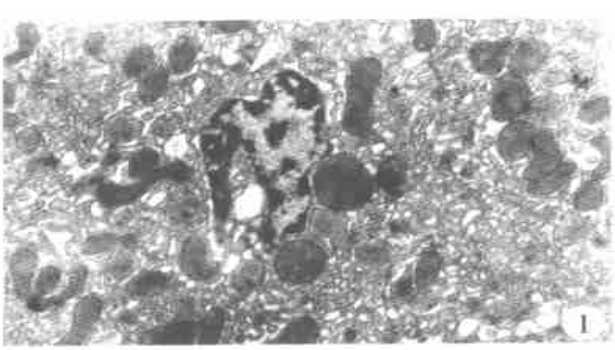
1.3　统计学处理

采用 SPSS 6.0 软件进行 t 检验、方差分析及数据间相关分析。

2　结果

2.1　电镜观察结果

再灌注 60 min 时, B、C、D 3 组供肝组织内可见明显的肝实质细胞凋亡形态特征。表现为细胞核体积缩小且皱缩变形, 染色质凝结成块并聚集于胞核边缘形成环状, 见图 1, 且细胞浆内可见典型的凋亡小体, 见图 2。上述凋亡细胞于再灌注 60 min 时的 A 组供肝内未能观察到。此外, 4 组供肝于离体前及低温保存末, 组织内也均未见细胞凋亡的形态学改变。



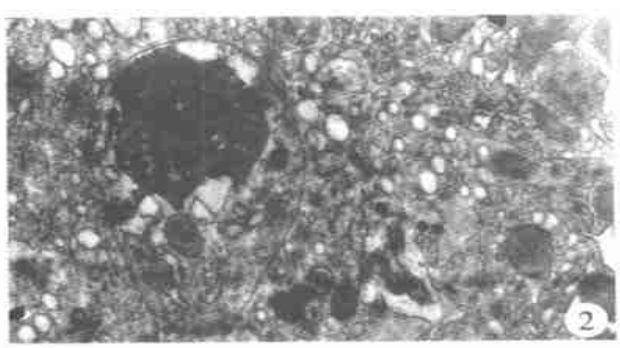


图 1　再灌注 60 min 时, 供肝内可见肝实质细胞核体积缩小且皱缩变形, 染色质凝结成块并聚集于胞核边缘形成环状 (TEM× 10 000)

Fig 1　Nucleus shrunken, wrinkled and deformed with consolidation of chromosome in the donor hepatic parenchymal cells (HPCs) at 60 min reperfusion (TEM× 10 000)

图 2　再灌注 60 min 时, 供肝肝实质细胞内可见胞膜完整的凋亡小体 (TEM× 15 000)

Fig 2　Apoptotic body with intact cell membrane in donor HPCs at 60 min of reperfusion (TEM× 15 000)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 肝细胞凋亡检测(TUNEL)结果

各组供肝于再灌注60 min时组织内均可见散在分布的胞核染色阳性的肝实质细胞,其中以低温保存9 h的D组尤为多见,见图3。图像分析结果发现,低温保存时间越长的供肝,单位面积内阳性细胞数量越多,再灌注60 min时每100 μm^2面积的凋亡细胞数量,A组1.2±0.84;B组4.4±1.14;C组7.2±2.39;D组11.4±2.36。且各组间差异均显著($P<0.05$, $P<0.01$)。而各组供肝于离体前及低温保存末,组织内未见或仅偶见核染色阳性的肝实质细胞,见图4。

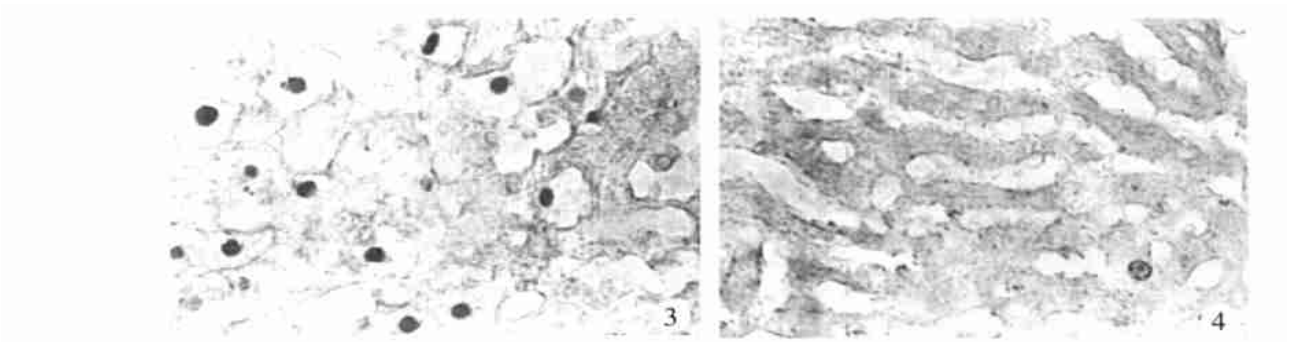


图3 再灌注60 min时,D组供肝内TUNEL阳性肝实质细胞呈散在分布(细胞核着色) (TUNEL× 400)

Fig 3 TUNEL positive HPCs scattered in the donor livers of group D at 60 min reperfusion (TUNEL× 400)

图4 各组供肝于离体前及低温保存末,组织内未见或偶见TUNEL阳性的肝实质细胞核(此照片来自D组供肝低温保存末) (TUNEL× 400)

Fig 4 No or rare HPCs with TUNEL positive staining in all groups before harvest or after being cold preserved (Figure from cold preserved donor livers of group D) (TUNEL× 400)

2.3 氧自由基相关指标测定结果

再灌注60 min时,4组供肝组GSH含量及SOD活性大小均表现为A组> B组> C组> D组,且各组间差异显著;而MDA含量则依次是D组> C组> B组> A组,各组间差异也有显著性。此外,B、C、D 3组供肝低温保存末的GSH、SOD及MDA值与相应再灌注60 min时比较差异均有显著性;但其中,MDA含量与离体前比较差异不显著,见表1~3。

表1 供肝再灌注前、后组织GSH含量变化[ω(GSH)/$\mu g \cdot mg^{-1}$]

Tab 1 Hepatic tissue GSH contents of donor livers in pre-reperfusion and post-reperfusion [ω(GSH)/$\mu g \cdot mg^{-1}$]

Group	Pre-harvestion	Post-preservation	Reperfusion 60 min
A	19.99±3.42	—	19.50±3.56
B	20.18±3.46	19.10±3.34*	15.21±2.42[a]
C	20.00±3.14	18.50±3.01*	12.12±1.80[ab]
D	19.81±3.52	17.67±3.25*	7.60±1.53[abc]

a, b, c: $P<0.05$ or $P<0.01$ *vs* 60 min reperfusion group A, B, C respectively; *: $P<0.05$ or $P<0.01$ *vs* reperfusion 60 min in the same group

表2 供肝再灌注前、后组织SOD活性变化(IU/mg)

Tab 2 Hepatic tissue SOD activities of donor livers in pre-reperfusion and post-reperfusion (IU/mg)

Group	Pre-harvestion	Post-preservation	Reperfusion 60 min
A	100.50±16.94	—	96.54±13.93
B	100.93±16.91	95.66±13.82*	80.05±12.58[a]
C	99.51±14.51	89.04±11.49*	67.49±8.29[ab]
D	100.53±17.61	80.07±9.21*	56.82±8.06[abc]

a, b, c: $P<0.05$ or $P<0.01$ *vs* 60 min reperfusive group A, B, C respectively; *: $P<0.05$ or $P<0.01$ *vs* reperfusion 60 min in the same group

表3 供肝再灌注前、后组织MDA含量变化[m(MDA)/$nmol \cdot mg^{-1}$]

Tab 3 Hepatic tissue MDA contents of donor livers in pre-reperfusion and post-reperfusion[m(MDA)/$nmol \cdot mg^{-1}$]

Group	Pre-harvestion	Post-preservation	Reperfusion 60 min
A	1.11±0.09	—	1.13±0.10
B	1.09±0.09	1.12±0.09*	1.27±0.14[a]
C	1.10±0.11	1.10±0.10*	1.56±0.15[ab]
D	1.12±0.10	1.13±0.08*	1.90±0.18[abc]

a, b, c: $P<0.05$ or $P<0.01$ *vs* 60 min reperfusive group A, B, C respectively; *: $P<0.05$ or $P<0.01$ *vs* reperfusion 60 min in the same group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4 MDA、GSH 含量及 SOD 活性与肝实质细胞凋亡数量间的相关性分析

再灌注 60 min 时, 供肝组织内肝实质细胞凋亡数量为 MDA 含量间呈显著的正相关关系(r=0.990, P< 0.05); 而与 SOD 活性及 GSH 含量间则均呈显著的负相关关系(r 值分别为 −0.986, −0.998, P< 0.05, P< 0.01)。

3 讨论

3.1 供肝低温保存-再灌注期间肝细胞凋亡的意义

自 1992 年 Gavrieli 等[3] 建立了 TUNEL 方法检测细胞凋亡以来, 由于该方法能结构完好地原位显示凋亡细胞并能进行阳性细胞计数, 因而目前得以广泛应用。本实验采用 TUNEL 方法对 4 组供肝再灌注前、后组织细胞凋亡情况进行了研究。结果发现, 各组供肝于再灌注 60 min 时组织内可见数量不等的核染色阳性肝实质细胞, 且低温保存时间越长者, 阳性细胞数量越多。电镜观察也进一步证实了供肝再灌注期间组织内存在核固缩、染色质凝结成块并聚集于核边缘形成环状的凋亡肝实质细胞, 且此类细胞的胞浆内尚可见凋亡特征性形态改变—凋亡小体。上述结果提示, 供肝低温保存可显著促使再灌注后肝实质细胞凋亡的发生。本实验中各组供肝于低温保存末组织内均无明显的肝细胞凋亡现象, 其内在机制尚有待于进一步研究。

毫无疑问, 肝实质细胞凋亡作为细胞死亡的一种形式其本身即可引起肝脏功能单位的丧失, 造成对肝功能的影响。除此, 近年来的研究表明肝实质细胞凋亡另一重要病理意义在于尚可引发肝脏组织细胞一系列坏死性改变。如 Gantner 等[4] 在对肝细胞凋亡的研究中发现, 凋亡的肝实质细胞能诱导肝窦内皮细胞及血液中血小板的促凝血活性, 最终将使凝血酶沉积于肝窦内并导致肝窦充血及继后的肝实质坏死性变化。对此, 国内印彤等[5] 最近的研究也得出了类似的结论。可见, 供肝低温保存-再灌注期间肝实质细胞凋亡与坏死之间可能存在一定的内在联系, 也即凋亡的肝实质细胞尚可能进一步引发肝细胞坏死性改变。综上, 肝实质细胞凋亡参与了供肝低温保存-再灌注损伤过程, 从而更正了坏死是供肝低温保存-再灌注期间肝实质细胞唯一死亡形式的传统观点。

3.2 氧自由基在肝实质细胞凋亡中的作用

研究证实, 细胞内氧自由基含量增多或拮抗氧自由基相关酶含量下降除可引起细胞坏死性改变外, 也是细胞发生凋亡的重要诱发因素[6,7]。本实验发现, 各组供肝在经历不同时间的低温保存后, 组织内 SOD 活性及 GSH 含量均有不同程度的下降, 但 MDA 含量则无明显变化。GSH 及 SOD 是细胞内天然的氧自由基清除剂, 而 MDA 则是氧自由基与细胞膜表面多不饱和脂肪酸反应(脂质过氧化反应)的产物, 因此当过量的氧自由基产生于组织细胞并对其发生损伤时, 势必将造成细胞内 SOD 及 GSH 水平下降, MDA 含量升高[8]。可见, 本实验中各组供肝在低温保存期间未发生明显的脂质过氧化反应, SOD 活性及 GSH 含量下降可能与低温保存时肝细胞合成蛋白(如 SOD、GSH)能力下降有关。为了探讨实验中肝实质细胞凋亡的发生机制, 本研究分别将再灌注 60 min 时测得的氧自由基相关指标(SOD、GSH、MDA)与相应肝实质细胞凋亡数量间作了相关性分析, 结果表明供肝组织内氧自由基含量与肝实质细胞凋亡数量间呈显著的正相关关系。即氧自由基含量越高的供肝, 实质细胞凋亡数量越多。提示, 供肝低温保存后的再灌注期间组织内氧自由基的过量产生可能是肝实质细胞凋亡的重要机制。

参考文献:

[1] Jamieson N V, Lindell S, Sundberg R, *et al*. An analysis of the components in UW solution using the isolated perfused rabbit liver [J]. Transplantaion, 1988, 46(4): 512−516.

[2] 汤礼军, 田伏洲, 王　雨, 等. 兔肝脏保存-再灌注损伤模型的建立及评价[J]. 肝胆外科杂志, 1998, 6(2): 123−125.

[3] Gavrieli Y, Sherman Y, BEN-Sasson S A. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation[J]. J Cell Biol, 1992, 119(2): 493−501.

[4] Gantner F, Leist M, Jilg S, *et al*. Tumor necrosis factor-induced hepatic DNA fragmentation as an early marker of T cell-dependent liver injury in mice[J]. Gastroenterology, 1995, 109(1): 166−176.

[5] 印　彤, 童善庆, 谢玉才, 等. 超抗原 SEB 和 D-氨基半乳糖对小鼠肝细胞的观察[J]. 免疫学杂志, 1998, 14(1): 36−39.

[6] Satch T, Sakai N, Enodido Y, *et al*. Free radical-independent protection by nerve growth factor and bcl-2 of PC12 cell from hydrogen peroxide-triggered apoptosis[J]. J Biochem, 1996, 120(2): 540−546.

[7] Troy C M, Shelanski M L. Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase cause apoptotic death in PC12 neuronal cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(14): 6 384−6 387.

[8] Braum K, Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases: Threat and defense[J]. Acta Physiol Scand, 1980, 429(1): 9−18.

(编辑　陈聪连)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net