DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.06.014

急性胆道感染时肝细胞线粒体损害的实验研究*

罗 丁 韩本立 龚建平 段恒春 李 昆 （第三军医大学西南医院 肝胆外科）630038

提 要 为探讨急性胆道感染时肝损害机制，本实验观察了大鼠实验性急性胆道感染对肝细胞线粒体的影响，以及伴随的肝脏储备功能改变。通过对肝细胞线粒体Ca^{2+}含量、溶酶体膜脆性、肝组织过氧化脂质含量、血清OCT、m-GOT酶活性和HPT试验的检测，发现急性胆道感染时肝细胞内存在着线粒体Ca^{2+}超载、溶酶体酶释放、脂质过氧化等，这些均可导致线粒体受累；血清OCT、m-GOT活性升高提示线粒体受损；HPT持续下降，表明线粒体受损同时，肝储备功能进行性受累。

关键词 胆道疾病；肝/病理学；线粒体；钙；溶酶体；过氧化脂质类

胆道感染引起的胆道高压、胆汁淤滞、胆源性败血症、甚至感染性休克，常导致全身多个重要脏器尤其是肝脏的严重损害。肝功能衰竭是造成重症胆道感染预后不良的一个重要原因。然而人们对胆道感染造成肝损害之确切机制尚不完全清楚。近年来人们已认识到能量代谢与受损器官的功能状态及伤后恢复有密切关系。作为肝细胞供能部位的线粒体，在胆道感染时有何病理生理变化，尚未见文献报道。本实验在大鼠实验性胆道感染模型上，对参与肝细胞线粒体损害的若干因素及线粒体损害后果作了动态观察，希望对胆道感染时肝细胞的损害机制能有更进一步的认识。

1 材料与方法

动物模型

健康Wistar大白鼠60只，雌雄不拘，平均体重180±20g，随机分为2组：（1）单纯胆道梗阻组（BDL），此组作为对照组；（2）胆道感染组(BS)，此组即实验组。以1%戊巴比妥钠经腹腔麻醉，剂量为30mg/kg体重。腹正中切口开腹，分离出胆总管，BDL组在左右肝管汇合处以下1cm处以细线双重结扎胆总管后关腹。BS组分离出胆总管后，在上述结扎部位稍靠远端以细针穿刺胆总管，注入0.2ml浓度为0.5×10^9/ml的产毒型大肠杆菌$O_{111}B_4$，拔针后穿刺点稍近端双重结扎胆总管后关腹。整个手术按无菌操作原则进行。分别于术后0、6、12、24、48h活杀各组动物，取血和肝组织做下述指标分析。

1.1 血液和肝组织匀浆细菌培养

1.2 线粒体Ca^{2+}含量

大鼠断头处死后，立即剪取肝脏，浸入0～4℃、pH7.5的0.25mol/L蔗糖-tris分离介质中，将肝组织剪成肝糜并尽量洗净血液，冰浴下用玻璃匀浆器制成1/5(w/v)的肝匀浆，差速离心法分离线粒体。成品线粒体用介质将其吹散成悬液，加入1mol/L HCl，消化线粒体，消化液上清部份在1%$LaCl_3$保护下用原子吸收分光光度计测定其中的Ca^{2+}含量，结果以nmol/mg线粒体蛋白质表示。

1.3 溶酶体的膜脆性

上述方法制备肝匀浆，以相同温度和分离介质差速法分离溶酶体。分3步：①500×g离心5min，留取上清；②16 000×g离心20min，上清部分测定游离型组织蛋白酶D（Cath-D，S_2部分），沉淀部分加入0.2%的TritonX-100 6ml，37℃水浴中保温30min，以充分破坏溶酶体；③破坏后的溶酶体再以16 000×g离心20min，上清部分测定结合型Cath-D（S_3部分）。游离型和结合型Cath-D之比S_2/S_3作为溶酶体膜脆性指标。Cath-D之测定按改良的Anson法。

*国家自然科学基金资助项目

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

1.4 肝组织过氧化脂质（LPO）含量

按Ohkawa建立的TBA法[1]，测定肝组织中丙二醛（MDA）水平间接表示组织中LPO含量。结果以nmol/mg肝组织蛋白质表示。蛋白质定量测定采用Lowry法[2]。

1.5 血清鸟氨酸氨甲酰转移酶（OCT）和线粒体谷草转氨酶（m-GOT）

分别按Masaru和大久保建立的方法[3][4]。

1.6 肝促凝血活酶试验（HPT）

采用南京医学院提供的试剂，以正常大鼠混合硫酸钡吸附血浆制作标准曲线。测定程序按试剂说明书进行。

2 结　果

2.1 血和肝组织匀浆细菌学培养

BDL组各时相点血和肝组织匀浆细菌培养均为阴性，而BS组术后各时相点血和肝组织匀浆培养均为阳性，提示胆源性败血症的存在。

2.2 动物存活率

BDL组各时相点存活率均为100%，BS组术前及术后6h存活率亦为100%，术后12、24、48h存活率分别为93.3%、66.7%、53.9%。

2.3 线粒体内Ca^{2+}含量

BS组术后线粒体内Ca^{2+}含量进行性升高，48h达最高峰。术后6h较术前（16.5±2.5nmol/mg线粒体蛋白）增加了49%（$P<0.01$），但与BDL组相比无显著差异．术后其他时相点BS组线粒体Ca^{2+}含量均显著高于BDL组（$P<0.05$或$P<0.01$），见图1。

2.4 溶酶体膜脆性

BS组术后6h溶酶体膜脆性即显著增加，与术前相比（0.22±0.01）增加了45.5%（$P<0.01$），术后48h膜脆性达高峰，术后各时相点BS组均显著高于BDL组，见图2。

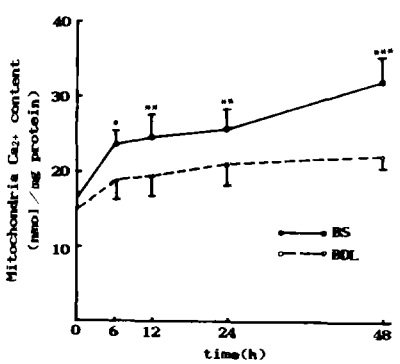


图1 肝细胞线粒体Ca^{2+}含量的改变

Fig. 1 Changes of mitochondria Ca^{2+} content of the hepatocytes

*~ $P<0.01$, compared with the preoperative value

** $P<0.05$, compared with the BDL group

***$P<0.01$, compared with the BDL group

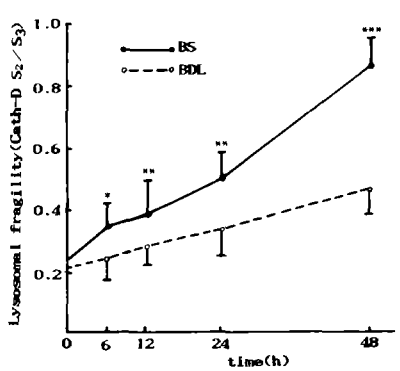


图2 肝细胞溶酶体膜脆性的改变

Fig. 2 Changes of lysosomal fragility of the hepatocytes

* $P<0.01$, compared with the preoperative value

** $P<0.05$, compared with the BDL group

***$P<0.01$, compared with the BDL gorup

2.5 肝组织LPO含量

两组动物术后LPO均显著上升，BS组术后6h较术前（2.5±0.4nmol／mg肝组织蛋白质）增加了108%（$P<0.01$），术后12、24h继续升高，术后48h有所回落，术后各时相点BS组LPO含量均显著地高

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

于BDL组（$P<0.05$或$P<0.01$），见图3。

2.6 血清OCT和m-GOT活性

BS组OCT、m-GOT活性术后持续升高，术后6h较术前（OCT：9.9±3.2u/ml；m-GOT：12.7±6.5u/ml）分别增加了785%和514%，增加显著（$P<0.01$），术后48h均达高峰，除术后6h外，术后其他时相点BS组OCT活性均显著高于BDL组，而术后各个时相点BS组m-GOT活性均显著高于BDL组（$P<0.05$或$P<0.01$），同时，OCT、m-GOT和线粒体Ca^{2+}含量、溶酶体膜脆性之间有显著的正相关（OCT-Ca^{2+} $r=0.960$；OCT-S_2/S_3 $r=0.982$；m-GOT-Ca^{2+} $r=0.974$；m-GOT-S_2/S_3 $r=0.976$），见图4、5。

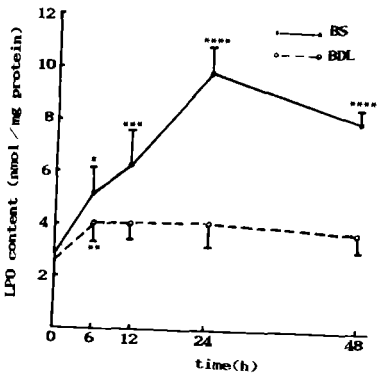


图3 肝组织LPO的改变

Fig. 3 Changes of LPO of the liver tissue

* $P<0.01$, compared with the preoperative value

** $P<0.05$, compared with the preoperative value

*** $P<0.05$, compared with the BDL group

**** $P<0.01$, compared with the BDL group

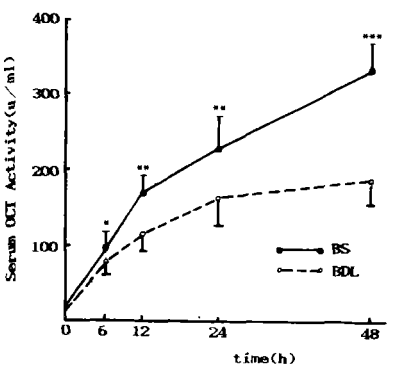


图4 血清OCT活性的改变

Fig. 4 Changes of serum OCT activity

* $P<0.01$, compared with the preoperative value

** $P<0.05$, compared with the BDL group

*** $P<0.01$, compared with the BDL group

2.7 肝促凝血活酶试验

两组动物术后均有下降。BS组术后6h较术前（189±3.6%）下降28.6%（$P<0.05$），随时间延长，HPT持续下降，术后48h降至最低点。术后各时相点BS组HPT均显著低于BDL组（$P<0.01$）。见图6。

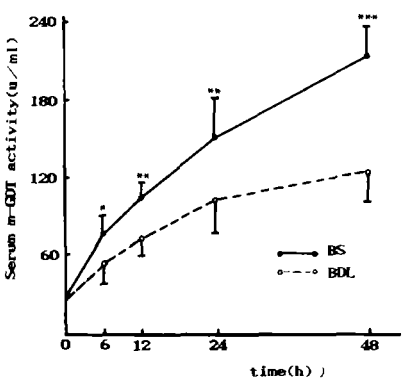


图5 血清m-GOT活性的变化

Fig. 5 Changes of serum m-GOT activity

* $P<0.01$, compared with the preoperative value

** $P<0.05$, compared with the BDL group

*** $P<0.01$, compared with the BDL group

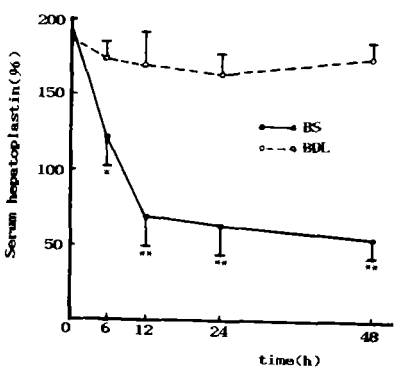


图6 血清肝促凝血活酶

Fig. 6 Changes of serum hepatoplastin

* $P<0.05$, compared with the preoperative value

** $P<0.01$, compared with the BDL group

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

统计学处理表明：BS组m-GOT、OCT和HPT之间有显著的负相关，r值分别为－0.888、－0.909。

3 讨　论

胆道感染时的胆道高压、胆源性败血症及感染性休克，可引起肝脏有效血流量减少[5]，导致肝细胞缺氧。内毒素除能诱发感染性休克外尚可直接损害肝细胞和线粒体。本实验动态观察了胆道感染时引起肝细胞线粒体损害的若干因素以及线粒体损伤后的表现，发现胆道感染时肝细胞内线粒体损伤因素明显增强，同时肝细胞功能有进行性受累。

3.1 致线粒体损伤的因素

3.1.1 线粒体内Ca^{2+}超载

线粒体Ca^{2+}超载对线粒体的损害已得到多方面的证实。用钌盐引起肝细胞和线粒体Ca^{2+}超载，可使线粒体膜电位减低，同时组织的ATP含量减少[6]。Nayler证明Ca^{2+}通道阻滞剂可阻止缺血引起的线粒体内Ca^{2+}含量升高，同时保护了线粒体生成ATP的能力[7]。实验结果表明，胆道感染时肝细胞线粒体内Ca^{2+}含量较术前及对照组明显增高，提示线粒体内存在着Ca^{2+}超载。

3.1.2 溶酶体酶释放

已证明感染、缺血情况下，细胞特别是肝细胞内存在着溶酶体膜脆性增加，水解酶逸出等现象[8]。而严重感染和缺血又导致细胞乏氧代谢，胞内乳酸等酸性物质堆积，胞内pH下降，接近溶酶体水解酶的最适pH(pH 4～5)，于是漏出的水解酶激活，造成细胞内成分如线粒体的严重损害[9]。本实验发现胆道感染可引起肝细胞内溶酶体膜脆性增加、水解酶释放。胆源性败血症、感染性休克等又可导致肝细胞缺氧和酸中毒，肝细胞内pH下降，溶酶体酶激活，这时线粒体的损伤将难以避免。

3.1.3 肝细胞内脂质过氧化

本实验观察到胆道感染时肝组织的过氧化脂质水平增高，提示线粒体已受到脂质过氧化损害。线粒体脂质过氧化，可使膜流动性和通透性发生改变；膜上的离子泵之脂质微环境失常，导致膜离子转运紊乱；过氧化脂质还能与膜上参与氧化生能的酶分子中的巯基产生交联，酶活性丧失；过氧化脂质作用于膜蛋白，使之对蛋白水解酶敏感性增加而发生降解。

线粒体Ca^{2+}超载、溶酶体酶释放，脂质过氧化之间有着密切联系。细胞和线粒体内Ca^{2+}浓度升高可加重脂质过氧化对线粒体的损害[10]；激活溶酶体磷脂酶使溶酶体膜破坏，水解酶释出；膜的脂质过氧化和溶酶体酶又可损伤膜结构，加重细胞和线粒体内Ca^{2+}堆积，导致恶性循环。

3.2 线粒体损伤的表现

OCT及m-GOT均主要来源于肝细胞线粒体，故血中这两个酶的活性可作为肝细胞线粒体损伤程度的判断标准。实验结果表明：胆道感染一开始，血清OCT及m-GOT活性就进行性升高，说明胆道感染时肝细胞线粒体的损害是严重而持续的。血中OCT、m-GOT活性和线粒体Ca^{2+}含量、溶酶体膜脆性有显著的正相关，进一步证实了OCT、m-GOT活性与线粒体损伤的内在联系。线粒体结构上的损伤预示着其功能上的受累。

3.3 线粒体损伤时肝功能的改变

血浆中凝血因子的活性可反映肝脏的储备功能和损伤程度。HPT可敏感而特异地反映Ⅱ、Ⅶ、X因子特别是半衰期最短的Ⅶ因子的变化，因此HPT被认为是反映肝储备功能和损

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

伤程度的较好指标。本实验发现胆道感染时HPT进行性下降。HPT与OCT、m-GOT之间显著的负相关关系提示：线粒体损伤后，肝细胞储备功能出现了严重障碍。

参 考 文 献

1. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95(2):351
2. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193 (1) :265
3. Masaru O, Takeda H, Kamiyama Y, et al. A direct method for the estimation of ornithine carbamoytransferase activity in serum. Clin Chim Acta 1976; 67(2):145
4. 大久保 昭行。GOT, GPT。临床病理 1983; 特刊55号: 115
5. Machiedo GW, Hurd T, Rush BF, et al. Temporal relationship of hepatocelluar dysfunction and ischemia in sepsis. Arch Sury 1988; 123(4):424
6. Richelmi P, Mirabelli F, Salis A, et al. On the role of mitochondria in cell injury caused by vanadate-induced Ca^{2+} overload. Toxicology 1989; 57(1):29
7. Nayler WG, Ferrari DR, Williams A, et al. Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine, and propranolol on mitochondrial function in the ischemia and reperfused myocardium. Am J Cardiol 1980; 46(2):242
8. 汪江淮 陈惠孙 刁有芳, 等。内毒素休克时自由基对肝脏细胞和亚细胞的损伤。中国病理生理杂志 1990; 6(1):28
9. Mela L, Miller L, Nicholas G, et al. Influence of cellular acidosis and altered cation concentration on shock-induced mitochondrial damage. Surgery 1972; 72(1):102
10. Malis CD, Bonventre JV. Mechanism of calcium potentiation of oxygen free radical injury to renal mitochondria. J Biol Chem 1986; 261(30):14201

(收稿: 1990-10-30; 修回: 1991-03-30)

An experimental study on hepatocyte mitochondrium damage during acute biliary sepsis*

Luo Ding, Han Benli, Gong Jianping, et al (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract In order to elucidate the mechanism of liver damage due to acute biliary sepsis, the changes of hepatocyte mitochondria were observed during biliary sepsis in the rat. The accompanied liver function changes were also studied. Mitochondrial calcium content, and lysosome fragility of the hepatocytes, lipid peroxide (LPO) level of liver tissue, ornithine carbamoytransferase (OCT), mitochondrial glulamicoxloacetic transaminase (m-GOT), and hepatoplastin were determined. It was found that there were overloading of calcium in mitochondria, increase of lysosome fragility, and accumulation of LPO in the liver. These events would result in adverse effects on mitochondrial function. The activity of serum OCT and m-GOT was significantly increased, which suggests that mitochondria are seriously damaged since the 2 enzymes mainly come from hepatocyte mitochondria. And the liver reserving function declined progressively.

Our study indicates that mitochondrial damage does exist during acute biliary sepsis, which might play an important role in liver damage.

Key Words biliary tract diseases; liver/PA; mitochondria, calcium; lysosomes; lipid peroxides;

* This study is supported by National Natural Science Foundation of China, NSFC 38870770

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