

上海多器官保存液保存离体大鼠肝脏的实验研究

周智华¹, 崔心刚¹, 韩秋成¹, 张 纯², 李朴清², 朱有华^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院器官移植科, 解放军器官移植研究所, 上海 200003; 2. 第二军医大学长征医院药学部)

[摘要] **目的:** 观察上海多器官保存液(Shanghai-mutil-organ solution, SMO 液)对离体大鼠肝脏的保存效果, 探讨应用 SMO 液保存离体供肝的可行性。 **方法:** SD 大鼠随机分为 SMO 液、UW 液和 HTK 液保存组, 建立离体肝脏单纯低温保存模型, 保存液保存 8、16、24、36 h 分析肝脏组织能量代谢情况, 观察肝组织形态学改变和肝脏细胞凋亡情况。 **结果:** 保存 16、24、36 h, SMO 液组肝组织三磷酸腺苷(ATP)、磷酸腺苷总量(TAN)及 Atkinson 能荷(AEC)均明显高于同时点 HTK 液组 ($P < 0.05$), 与同时点 UW 液组无显著差异; 形态学检查见 SMO 液组组织损伤较同时点 HTK 液组轻, 除细胞肿胀较同时点 UW 液组明显外, 其余表现基本一致。保存 24、36 h, SMO 液组凋亡指数明显低于 HTK 液组 ($P < 0.05$), 而与 UW 液组无明显差异。 **结论:** SMO 液对大鼠离体肝脏的保存效果总体上与 UW 液相当, 优于 HTK 液, 仅在防止细胞水肿方面较 UW 液稍差。

[关键词] 肝移植; 器官保存液; 肝**[中图分类号]** R 657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)02-0122-05

Shanghai-mutil-organ solution in preservation of rat liver: an experimental study

ZHOU Zhi-hua¹, CUI Xin-gang¹, HAN Qiu-cheng¹, ZHANG Chun², LI Pu-qing², ZHU You-hua^{1*} (1. Department of Organ Transplantation, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Organ Transplantation Institute of PLA, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pharmacy, Changzheng Hospital, Second Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the preservative effect of Shanghai-mutil-organ (SMO) solution on rat liver and to assess the feasibility of SMO solution in preserving isolated human livers. **Methods:** SD rats were randomly divided into 3 groups according to the preservation solutions: SMO group, UW (University of Wisconsin Solution) group, and HTK (Histidinetryptophan-ketoglutarate solution) group. The simple cold storage liver model was established with isolated rat liver and the liver samples from each group were preserved with the 3 solutions for 8 h, 16 h, 24 h and 36 h. The energy metabolism was analyzed in all the samples and the morphological changes and hepatocytes apoptosis were observed after different preservation periods. **Results:** The liver tissue contents of ATP, TAN, and AEC in SMO group were significantly higher than those in HTK group at 16 h, 24 h, and 36 h ($P < 0.05$); the contents in SMO group were similar to those in UW group. Histological examination showed that the tissue damage in SMO group was milder than that in HTK group; the damages in SMO group and UW group were similar except that the swelling of cells in SMO group was severer than that in UW group. Apoptosis index in SMO group was lower than that in HTK group at 24 h and 36 h ($P < 0.05$); there was no significant difference in apoptosis index between SMO group and UW group. **Conclusion:** SMO solution has a similar preservative effect on rat liver to that of UW solution, only with more severe cell swelling than the latter. The effect of SMO solution is better than that of HTK solution.

[KEY WORDS] liver transplantation; organ preservation solutions; liver

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(2): 122-126]

肝移植是目前治疗终末期肝病的有效手段之一, 而肝移植术后疗效明显受离体供肝保存效果的影响^[1]。理想的器官保存液应减少或减轻器官保存过程中的各种损伤, 较长时间地保存器官而很少影响移植重要生理功能。UW 液和 HTK 液是目前世界上许多器官移植中心广泛采用的器官保存液, 能较大程度地保护移植器官, 但二者制备成本较高, 费用昂贵, 且不利于运输、储存和使用。为弥补这些缺陷, 我科在 UW 液和 HTK 液的基础上, 结合传统中药优势, 制备出一种新的多器官保存液——上海

多器官保存液(Shanghai-mutil-organ solution, SMO 液), 并将其应用于临床肾脏移植, 取得较好的疗效^[2]。前期研究^[3]已证实其在低温下保存离体肾脏的效果优于 HC-A 液。然而, 其对离体肝脏的保存

[基金项目] 上海市科技发展基金(024919006)。Supported by the Key Project of Science Committee of Shanghai Municipal Government (024919006)。

[作者简介] 周智华, 博士。现在上海交通大学附属仁济医院器官移植中心, 上海 200127。E-mail: popzhihua@126.com

* Corresponding author. E-mail: zhuyouhua@126.com

效果目前还不很明确,这大大限制了其在肝脏移植中的应用。本研究在前期研究的基础上,根据肝脏代谢的特点,对SMO液成分进行了微调,将其应用于离体大鼠肝脏保存,并与UW液、HTK液保存效果作比较,探讨应用SMO液保存离体供肝的可行性,为将其应用于临床肝脏移植奠定基础。

1 材料和方法

1.1 动物分组及试剂来源 健康、成年、清洁级SD大鼠购自第二军医大学实验动物中心,体质量250~300 g,雌雄不限,随机分为SMO液保存组(SMO液组)、UW液保存组(UW液组)和HTK液保存组(HTK液组),每组24只;每组大鼠根据离体肝脏保存的不同时间(8、16、24、36 h)再均分为4个亚组($n=6$),分别测定、观察各项指标。HPLC级三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、腺苷酸(AMP)钠盐购自Sigma公司;AgilentC 180DS'反向色谱柱和Agilent1100型化学工作站购自Agilent公司。TUNEL法细胞凋亡试剂盒和蛋白酶K购自南京建成生物公司。UW液和HTK液均购自美国Bristol-Myers Squibb公司,SMO液由本院药学部制剂中心配制,各保存液组成成分见表1。

表1 UW、HTK、SMO保存液组分

Tab 1 Components of UW, HTK and SMO solution

Components	UW	HTK	SMO
Mannitol($\rho_B/g \cdot L^{-1}$)	-	30	12.5
Lactobionic acid($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	100	-	-
Hydroxyethyl starch($\rho_B/g \cdot L^{-1}$)	50	-	-
Raffinose($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	30	-	-
Histidine($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	-	180	150
Histidine hydrochloride($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	-	18	15
$H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$	25	-	-
OH^- ($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	-	-	-
Na^+ ($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	25-30	15	80
K^+ ($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	125-130	10	10
Mg^{2+} ($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	5	4	5
Ca^{2+} ($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	-	0.015	-
Cl^- ($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	-	50	-
SO_4^{2-} ($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	5	-	5
Glutathion($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	3	-	-
Allopurinol($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	1	-	-
Adenosine($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	5	-	5
A-ketoglutarate($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	-	1	-
Ryptophan($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	-	2	2
Citrate($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	-	-	55
Xylite($\rho_B/g \cdot L^{-1}$)	-	-	3.25
Arginine($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	-	-	2
pH	7.40	7.20	7.30
Osmotic pressure($c_B/mmol \cdot L^{-1}$)	320	310	380

1.2 大鼠离体肝脏单纯低温保存模型的制备 大鼠肝脏离体灌注模型的制备参照文献^[4]进行,大鼠禁食12 h,腹腔注射3%戊巴比妥钠(30 mg/kg体质量)麻醉,仰卧位固定。取腹部“十”字切口进腹。将肠管压向左下腹,经下腔静脉注入25 U/ml肝素生理盐水2 ml,分离切断肝脏周围韧带,解剖肝门,游离门静脉、胰胆管和肝上、下腔静脉,在距肝门1 cm处切开胰胆管并向其近端置管并固定,门静脉置管、固定。在右肾平面上切断肝下腔静脉,经门静脉置管原位灌注4℃的保存液,以5 ml/min的流速行肝脏原位灌注30 min至肝脏变为土黄色,然后将肝脏连同部分膈肌一并切下,置于4℃保存液中保存。

1.3 离体肝脏组织能量物质的测定 利用快速等浓度高效液相色谱技术^[5]检测不同保存时间肝组织中ATP、ADP、AMP含量;计算磷酸腺苷总量(TAN)和Atkinson能荷(AEC), $TAN = ATP + ADP + AMP$, $AEC = (ATP + 0.5ADP) / TAN$ 。

1.4 离体肝脏组织形态学观察

1.4.1 光镜观察 取肝中叶组织约1.0 cm×0.5 cm×0.5 cm投入20倍于肝体积的10%甲醛溶液中固定,常规脱水、透明、石蜡包埋、切片及H-E染色,光镜观察并各行凋亡检测。

1.4.2 电镜观察 在蜡板上将肝组织用锐利刀片切成约1 mm³小块,立即放入3%戊二醛中固定,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-柠檬酸铅重染色后,行透射电镜观察。

1.5 TUNEL法检测细胞凋亡情况 石蜡切片(4 μm)常规脱蜡水化,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,加蛋白酶K(20 mg/L,Tris-HCl浓度为10 mmol/L,pH 8.0)37℃消化30 min;PBS洗涤,3 g/L的H₂O₂甲醇液封闭,室温下置30 min;PBS洗涤,加入TUNEL反应液50 μl,37℃30 min;PBS洗涤,加入转换剂POD 50 μl,37℃30 min;PBS洗涤,DAB显色5 min;蒸馏水洗涤,苏木精复染;脱水、透明、封片,光镜下观察,细胞核中有棕色颗粒者为凋亡细胞。每例切片在放大100倍镜下计数10个视野,计算凋亡指数(AI)即每100个细胞中凋亡细胞所占比例。

1.6 统计学处理 用SAS统计软件包进行分析,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间行单因素方差分析。

2 结果

2.1 保存液对离体大鼠肝组织能量代谢的影响 如表2所示,随着保存时间的延长,各组肝组织

ATP、TAN 及 AEC 均逐渐降低,HTK 液组更明显。保存 16、24、36 h,SMO 液组肝组织中 ATP、

TAN 及 AEC 均明显高于同时点 HTK 液组 ($P < 0.05$),而与同时点 UW 液组无显著差别。

表 2 肝组织保存不同时间的能量物质含量

Tab 2 Contents of energy substances in hepatic tissues in different solutions

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Storage periods	Contents of energy($m_B/\mu\text{mol} \cdot g^{-1}$)				
		ATP	ADP Δ	AMP Δ	TAN	AEC
HTK	8 h	6.58±0.79	4.85±0.58	4.18±0.43	16.15±2.41	0.60±0.08
	16 h	4.08±0.40*	4.12±0.48	5.37±0.45	14.47±1.91*	0.42±0.06*
	24 h	3.03±0.31*	3.84±0.34	4.98±0.53	12.38±1.67*	0.24±0.03*
	36 h	2.38±0.41*	2.41±0.34	5.03±0.73	10.08±1.36*	0.18±0.04*
UW	8 h	6.81±0.80	4.83±0.60	4.13±0.38	16.83±2.06	0.61±0.08
	16 h	4.96±0.72	4.19±0.64	6.17±0.79	15.37±1.98	0.54±0.06
	24 h	4.06±0.38	4.14±0.50	5.45±0.48	14.91±2.01	0.45±0.05
	36 h	3.06±0.29	3.94±0.30	5.66±0.63	11.27±1.72	0.38±0.03
SMO	8 h	6.57±0.82	4.84±0.61	4.24±0.49	16.76±2.42	0.61±0.07
	16 h	4.81±0.53	4.08±0.54	6.09±0.89	15.31±2.23	0.58±0.05
	24 h	3.54±0.39	3.79±0.40	5.88±0.73	14.67±1.87	0.45±0.04
	36 h	3.08±0.32	3.87±0.33	5.58±0.69	12.57±1.42	0.44±0.03

* $P < 0.05$ vs SMO or UW group; Δ : The data of ADP and AMP were not compared between 3 groups

2.2 保存液对离体大鼠肝组织形态结构的影响

2.2.1 光镜观察结果 保存 8 h 各组肝细胞形态基本正常;保存 16 h 出现细胞肿胀、脂肪变性,随保存时间延长,变性程度和范围加重,并出现散在的点状坏死及灶性坏死,较多肝窦受压狭窄,甚至消失;保存 36 h 可见肝细胞肿胀、变性程度和范围加重,点状坏死和灶性坏死增多,肝窦淤血明显,且见染色质固缩的凋亡细胞。保存 16、24、36 h,SMO 液、UW 液组肝细胞损伤程度明显轻于同时点 HTK 液组;SMO 液组除细胞肿胀较同时间点 UW 液组明显外,其余光镜下表现基本一致。详见图 1。

2.2.2 电镜观察结果 保存 8 h 各组肝细胞形态基本正常,细胞连接完好,线粒体、内质网及毛细胆管未见扩张;保存时间超过 16 h 后,随着时间延长,各组肝细胞损伤加重,具体表现为:肝细胞肿胀增

加,表面微绒毛减少,狄氏间隙扩大,细胞连接疏松,可见髓鞘样变,胞质内可见中等密度的匀质脂肪滴,线粒体肿胀,内质网扩张,毛细胆管扩张,腔内微绒毛形态异常。保存 16、24、36 h,同一时间点下,SMO 液、UW 液组电镜下表现基本一致,HTK 液组损伤相对重于前两者。详见图 2。

2.3 保存液对离体大鼠肝细胞凋亡程度的影响

各组肝脏细胞均出现凋亡现象,随保存时间的延长,凋亡细胞逐渐增多,其凋亡细胞主要分布在小叶中央静脉和门静脉周围的肝窦内皮细胞(SEC)和肝细胞,保存 24、36 h,同时点 SMO 液、UW 液组凋亡细胞少于 HTK 液组(图 3)。保存 16 h 各组间 AI 无显著差异;保存 24、36 h,SMO 液组 AI 明显低于同时点 HTK 液组 ($P < 0.05$),高于同时点 UW 液组,但无显著差异(表 3)。

表 3 不同保存液对肝脏细胞 AI 的影响

Tab 3 Changes of apoptosis index of liver cells in different solutions

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Storage periods			
	8 h	16 h	24 h	36 h
HTK	0.12±0.07	0.19±0.11	0.32±0.14*	0.58±0.12*
UW	0.08±0.03	0.11±0.04	0.13±0.05	0.18±0.08
SMO	0.09±0.06	0.15±0.08	0.17±0.13	0.23±0.09

* $P < 0.05$ vs SMO or UW group

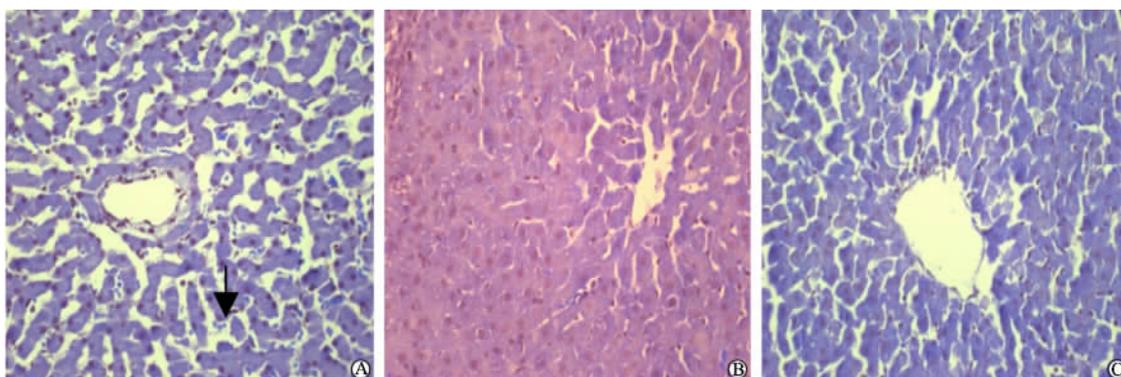


图 1 HTK 液!A" #UW 液!B" #SMO 液!C"保存 24 h 大鼠肝脏组织学变化

Fig 1 Histological changes of rat liver tissues after 24 h-cold storage in HTK solution! A" \$ UW solution! B" \$ and SMO solution! C" ! H-E \$ \times 200\$ "

Arrow indicating focal necrosis

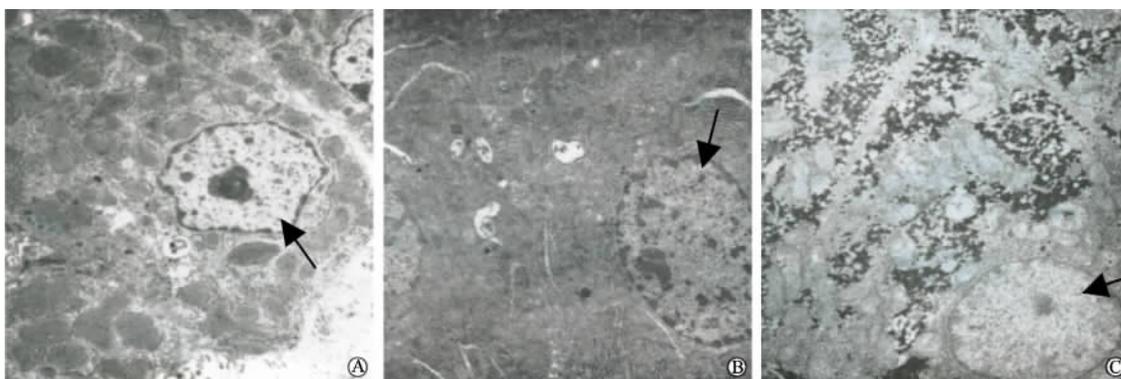


图 2 HTK 液!A" #UW 液!B" #SMO 液!C"保存 24 h 大鼠肝脏细胞超微结构变化

Fig 2 Ultrastructural changes of rat liver cells after 24 h-cold storage in HTK solution! A" \$ UW solution! B" \$ and SMO solution! C" ! \times 10 000\$ "

Arrow indicating mitochondrion

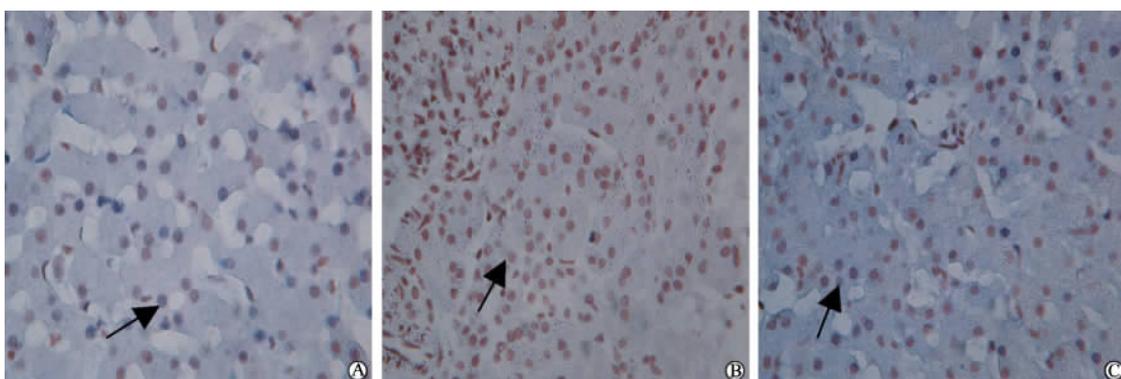


图 3 HTK 液!A" #UW 液!B" #SMO 液!C"保存 24 h 大鼠肝脏细胞凋亡情况

Fig 3 Apoptosis of liver cells after 24 h-cold storage in HTK solution! A" \$ UW solution! B" \$ and SMO solution! C" ! Haematoxylin \$ \times 100\$ "

Arrow indicating apoptosis

3 讨论

Belzer 等^[6]认为理想的器官保存液应满足 5 个要求:减少因低温保存导致的细胞水肿;防止细胞酸化;防止灌注保存过程中细胞间隙膨胀;防止氧自由基损伤,尤其在再灌注过程中;提供再生高能磷酸化化合物的底物。目前常用的肝脏保存液包括 UW 液和 HTK 液。UW 液是目前最为成功的一种长效多器官保存液,但仍存在一些缺陷:高黏滞性影响原位灌注效果;高钾不符合生理;缺乏保护肝脏低温保存的药物。HTK 液使用组氨酸缓冲对,以色氨酸和 α -酮戊二酸作为细胞膜稳定剂和能量底物的补充,成分更为简单有效,在低温保存时间不太长的情况下,HTK 液肝脏保存效果与 UW 液相当^[7]。但 HTK 液对肝脏的灌注量是 UW 液的 2 倍,灌注时间延长^[8],且长时间保存肝脏效果并不理想。

SMO 液是在全面分析 UW 液和 HTK 液配方的基础上,结合了器官保存领域的新进展,简化改良上述两种先进保存液的成分,经过反复配制而制备成功的。其对离体肾脏的保存已取得较好效果^[9]。与 UW 液和 HTK 液相比,其改进之处包括:(1)去除羟乙基淀粉,以木糖醇代替木棉糖作为保存液中的主要非通透成分来抑制细胞水肿,既减少了液体的非通透性成分,避免细胞脱水,又降低了液体黏滞度,并且木糖醇可在不依赖胰岛素情况下提供能量;(2)添加川芎有效成分川芎嗪,充分发挥川芎嗪的细胞保护作用;(3)应用枸橼酸盐-枸橼酸缓冲对代替 HTK 液中组氨酸-盐酸组氨酸,缓冲能力明显增强,使肝脏保存过程中保持相对稳定的 pH 值;(4)改变 UW 液的高 K^+ 低 Na^+ 组成,更符合生理;(5)去除 UW 液中青霉素、复方磺胺增效剂、地塞米松、胰岛素等添加剂,以色氨酸作为细胞膜稳定剂;保留 HTK 液中 L-精氨酸。

SMO 保存液的上述改进具有重要的意义。低黏滞度有利于肝脏原位灌注,尤其有利于复灌后胆管血管的血流通畅,有望减轻肝移植术后的胆道并发症;肝移植过程中开放血流后大量 K^+ 进入血液循环,易诱发术中心跳骤停,低钾会降低这种可能。川芎嗪主要影响血栓素 A_2 的合成,而对其他花生四烯酸代谢产物无明显影响;同时其具有钙拮抗作用,避免了细胞内钙超载引起的细胞损伤^[9]。SMO 液中含有的 L-精氨酸可以加强 NO 生物合成途径 (NOSP)^[10],对供肝的保存及再灌注损伤时移植肝

具有重要的保护作用^[11]。

本研究结果表明,SMO 液对离体大鼠肝脏能量代谢、形态结构及肝细胞凋亡的影响与 UW 液类似,明显优于 HTK 液。研究中还发现 SMO 液保存的大鼠肝脏细胞水肿较 UW 液稍重。这可能与 SMO 液中非渗透性成分较少有关,但减少保存液中非渗透性成分可降低液体黏滞度,对供肝胆管血供的恢复有积极意义。

综上所述,SMO 液对离体大鼠肝脏的保存效果总体上与 UW 液相当,优于 HTK 液,仅在防止细胞水肿方面较 UW 液稍差,可用于保存离体肝脏,且其成分简单易得,成本远低于 UW 液,能大大减轻患者的经济负担,值得进一步研究以应用于临床肝移植,造福更多的肝移植患者。

[参考文献]

- [1] Salahudeen A K, Haider N, May W. Cold ischemia and the reduced long-term survival of cadaveric renal allografts[J]. *Kidney Int*, 2004, 65:713-718.
- [2] 范克军,朱有华,张纯,等. 自制多器官保存液对草犬肾脏低温保存的实验研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20:246-247.
- [3] 牛强,朱有华,缪明永,等. SMO 液对低温下肾皮质线粒体的保护作用[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27:196-199.
- [4] 徐东波,杜智, Potts D J, 等. 大鼠离体肝再灌注模型 (IPRL) 的建立及其在肝移植器官保存液实验中的意义[J]. *生物医学工程与临床*, 2001, 5:1-3.
- [5] 马丽英,张乃忠,邢虹,等. 快速等浓度洗脱高效液相色谱法测定心肌组织中的能量物质[J]. *中国病理生理杂志*, 1992, 8:140-143.
- [6] Belzer F O, Southard J H. Principles of solid-organ preservation by cold storage[J]. *Transplantation*, 1988, 45:673-676.
- [7] Pokorny H, Rasoul-Rockenschaub S, Langer F, et al. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution for organ preservation in human liver transplantation—a prospective multi-centre observation study[J]. *Transpl Int*, 2004, 17:256-260.
- [8] Testa G, Malago M, Nadalin S, et al. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution versus University of Wisconsin solution in living donor liver transplantation: results of prospective study[J]. *Liver Transpl*, 2003, 9:822-826.
- [9] 周智华,朱有华,牛强,等. 川芎嗪改善高渗枸橼酸盐嘌呤溶液保存犬肾的效果[J]. *中华器官移植杂志*, 2006, 27:411-413.
- [10] Thomas S, Anup R, Susama P, et al. Nitric oxide prevents intestinal mitochondrial dysfunction induced by surgical stress[J]. *Br J Surg*, 2001, 88:393-399.
- [11] 周智华,朱有华,牛强,等. 新型肾脏保存液低温保存后犬肾移植效果的评价[J]. *山东医药*, 2006, 46:15-17.

[收稿日期] 2006-12-30

[修回日期] 2007-02-01

[本文编辑] 贾泽军