

[文章编号] 1000-4718(2008)04-0817-03

大鼠肝移植术后胆汁淤积和肝组织能量代谢的变化

胡明华^{1,2}, 杨甲梅¹, 盛勇², 王野¹, 李殿启¹, 吴孟超¹(¹ 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438; ² 皖南医学院附属弋矶山医院, 安徽 芜湖 241001)

[摘要] 目的: 了解肝移植术后肝功能恢复和胆汁淤积及消退的规律, 从肝细胞能量变化和肝脏超微结构角度探讨肝移植术后胆汁淤积的机制。方法: Wistar 鼠 49 只, 体重 300-350 g, 随机取出 7 只为对照组(A 组); 另外 42 只随机分为供体组和受体组(每组 14 只大鼠, 其中 7 只为供体, 另 7 只为受体), 两两配对再随机分成 3 组进行原位肝移植(供肝均为热缺血 5 min 加冷保存 10 h), 按术后处死采集标本时间(1 d、3 d、7 d)分别设为 B、C、D 组。麻醉后取血检测肝功能、动脉血酮体比值(AKBR), 处死后取肝组织检测肝脏 ATP 含量, 并进行肝组织化学染色, 结合免疫电镜方法, 在肝细胞质膜上染色定位 Na⁺/K⁺ ATP 酶, 计算机图像分析测定, 半定量比较肝细胞质膜上 Na⁺/K⁺ ATP 酶活性。结果: 在肝移植术后 1 d 组和 3 d 组, ALT、ALP、TBIL、DBIL、GGT 指标有明显上升, ATP 含量和 AKBR 均有明显下降, 至术后 7 d 组各指标已基本接近正常。Na⁺/K⁺ ATP 酶广泛存在于肝细胞质膜上, 在术后也存在明显下降并改善的过程, 并出现肝细胞分泌胆汁极性的改变。结论: 肝移植过程对肝脏功能和肝细胞能量代谢有明显影响。肝移植术后胆汁淤积可能与肝细胞质膜上 Na⁺/K⁺ ATP 酶活性的改变有关。

[关键词] 大鼠; 肝移植; Na⁺/K⁺ ATP 酶; 胆汁淤积

[KEY WORDS] Rats; Liver transplantation; Na⁺/K⁺ ATPase; Cholestasis

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

临床上, 肝移植患者术后早期常常出现胆汁分泌减少, 胆红素增高, 胆汁淤积的表现。本实验通过建立大鼠肝移植模型, 术后不同时段组分别采血检测肝功能以及动脉血酮体比值(AKBR), 取肝组织检测肝脏 ATP 含量和肝细胞 Na⁺/K⁺ ATP 酶活性, 采用组织化学染色技术, 结合免疫电镜方法及计算机图像分析技术, 在肝细胞膜上定位 Na⁺/K⁺ ATP 酶, 并测定其活性, 了解肝移植术后肝功能恢复和胆汁淤积及消退的规律, 以期从能量代谢和超微结构角度探讨肝移植术后胆汁淤积的机制。

材 料 和 方 法

1 动物分组

同种同系雄性 Wistar 鼠 49 只, 体重 300-350 g, 随机取出 7 只为对照组(A 组); 另外 42 只随机分成供体组和受体组, 两两配对再随机分成 3 组进行原位肝移植(每组 14 只大鼠, 其中 7 只为供体, 另 7 只为受体); 肝移植组(供肝均热缺血 5 min 加冷保存 10 h)按术后处死采集标本时间(1 d、3 d、7 d)分别设为 B、C、D 组。模型建立均在 SPF 级实验室完成, 所有动物的选择和饲养均符合 2 级动物实验条件。

2 建立对照组

取 Wistar 鼠, 仅做开腹和关腹, 游离肝脏并不行肝移植, 于术后第 7 d 取材。

3 建立肝移植大鼠模型

大鼠原位肝移植模型参照 Kamada 等^[1]“双套袖法”和王轩等^[2]报道的方法并稍加改进。供体采用腹主动脉灌注法, 热缺血时间 5 min, 热缺血时间界定为: 开胸后用血管钳夹闭供体大鼠心脏基底部致心脏停搏, 自夹闭心脏基底部至冷灌注前即为热缺血时间。供肝切除后立即保存于 0-4°C 的林

格氏液中。受体手术无肝期为(20.0 ± 4.9) min。取肝移植术后鼠, 原切口进腹, 分别于术后 1 d、3 d、7 d 取材。

4 血清胆红素等肝功能指标的测定

取实验鼠, 麻醉后于预定时间开腹从下腔静脉取血, 在 Hitachi 7170A 自动生化检测仪测定血清总/直接胆红素等胆汁淤积相关指标等。

5 AKBR

各组动物于预定时间麻醉后, 从腹主动脉穿刺抽血 1 mL, 按文献^[3]方法测定。

6 肝脏 ATP 含量检测

将液氮保存的肝组织制成组织匀浆, 通过高效液相色谱法(HPLC), 检测肝组织 ATP 含量。

7 肝细胞膜 Na⁺/K⁺ ATP 酶测定

取实验鼠新鲜肝脏, 固定于 2% 戊二醛-0.1 mol/L 二甲胍缓冲液内, 切片后, 用 3% 戊二醛液重固定, 1% 锇酸-二甲胍缓冲液内后固定, 丙酮脱水, 环氧树脂倒扣包埋, 聚合, 超薄切片切片机切片, 醋酸铀和硝酸铅重染色, 透射电镜下观察。CMIAS 图像分析仪测定 Na⁺/K⁺ ATP 酶活性, 以相对灰度比值表示。采用无底物孵育作为方法对照。

8 统计学处理

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析及均数间多重比较。

结 果

1 肝脏功能的变化

大鼠肝移植术后, 肝功能指标 ALT、ALP、TBIL、DBIL、GGT 在肝移植术后 1 d、3 d、7 d 组(B、C、D 组)和正常对照组(A 组)比较均有上升, 其中以术后 1 d、3 d 组(B、C 组)明显

[收稿日期] 2007-07-09

[修回日期] 2007-10-30

E-mail: hwmwh2004@sohu.com

($P < 0.05$),而术后7 d 则呈下降趋势,部分指标接近正常对照组(A组),见表1。

表1 各实验组的肝脏功能变化

Tab 1 Liver function changes of different experimental groups ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Group	ALP(U/L)	GGT(U/L)	TBIL($\mu\text{mol/L}$)	DBIL($\mu\text{mol/L}$)	ALT(U/L)
A	66.8±20.4	6.3±1.6	5.2±1.4	3.1±1.1	58.8±21.5
B	168.2±36.7*	11.5±2.9*	17.3±6.4*	8.7±2.1*	1089.2±235.3*
C	200.2±38.5*	11.5±3.4*	15.3±5.2*	7.8±2.6*	520.7±132.2*
D	78.2±24.6	7.0±1.4	9.4±4.0*	3.2±1.5	135.7±39.2*

* $P < 0.05$ vs A group.

2 AKBR 和肝脏 ATP 含量的变化

大鼠肝移植术后1 d,3 d组(B、C组)的肝组织ATP含量和正常对照组(A组)比较,均有明显下降($P < 0.05$),而术后7 d组(D组)和正常对照组(A组)比较,差异无统计学意义。AKBR在术后1 d组(B组)明显下降($P < 0.05$),术后3 d,7 d组(C、D组)和正常对照组(A组)比较,差异无显著,见表2。

表2 各实验组 AKBR 和 ATP 的变化

Tab 2 ATP content and AKBR changes of different experimental groups ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Group	ATP($\mu\text{mol/g}$)	AKBR
A	3.36 ± 0.36	0.743 ± 0.039
B	0.98 ± 0.12*	0.313 ± 0.015*
C	2.83 ± 0.19*	0.730 ± 0.035
D	3.34 ± 0.41	0.750 ± 0.036

* $P < 0.05$ vs A group.

3 肝细胞质膜表面 Na⁺/K⁺ ATP 酶的变化

在正常对照组(A组),肝细胞质膜Na⁺/K⁺ATP酶分布不均匀,肝窦胞质膜面高于肝毛细胆管膜面($P < 0.05$),肝毛细胆管膜面高于肝细胞间胞质膜面($P < 0.05$)。肝移植术后早期,Na⁺/K⁺ATP酶活性明显下降。其中:①肝窦胞质膜面、肝细胞间胞质膜面、肝毛细胆管膜面:术后1 d,3 d组(B、C组)Na⁺/K⁺ATP酶活性低于正常对照组($P < 0.05$)。术后7 d组(D组)与1 d,3 d组(B、C组)组比较有明显上升,和正常对照组比较差别无显著;②术后1 d,3 d组(B、C组)肝毛细胆管膜面的酶活性甚至高于肝窦胞质膜面,见表3。

表3 各实验组肝细胞质膜表面 Na⁺/K⁺ ATP 酶的变化

Tab 3 Na⁺/K⁺ATPase activity changes of different experimental groups ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Group	Na ⁺ /K ⁺ ATPase activity		
	Sinusoid	Interhepatic	Bile canalicular
A	108 ± 17	78 ± 9 [△]	95 ± 10 ^{△△}
B	66 ± 8*	55 ± 10*	80 ± 12**
C	65 ± 12*	52 ± 11*	70 ± 14**
D	98 ± 11	76 ± 10	92 ± 10

[△] $P < 0.05$ vs sinusoid in A group; ^{△△} $P < 0.05$ vs interhepatic in A group; * $P < 0.05$ vs A group in different position; ** $P < 0.05$ vs sinusoid in B and C group.

讨 论

在肝移植术后的早期,常常发生胆汁淤积。在术后2-3周内25%的患者存在此种现象。为了从肝细胞能量变化和肝脏超微结构角度探讨肝移植术后胆汁淤积的机制,通过建立稳定的大鼠肝移植模型来了解原位肝移植术后肝脏功能和胆汁淤积程度的变化。通过实验摸索,在保证实验鼠存活的前提下,特意将热缺血和冷保存时间设定得较长,以便较好地模拟术后胆汁淤积。手术方式采用同系Wistar大鼠行原位肝移植,术后无排斥反应,故其肝功能和胆汁淤积程度的变化主要与热缺血、冷保存和缺血再灌注损伤等因素有关^[4],其中器官的冷保存可造成氧自由基及其引发的脂质过氧化反应^[5]。而热缺血过程能快速地引起肝脏内ATP含量降低。以上多种因素均可能参与了供肝损伤的病理生理过程。

ALP、GGT和TBIL是胆汁淤积的常规标志。本实验发现血清ALT、ALP、TBIL、DBIL及GGT在肝移植术后1 d,3 d组均较对照组明显升高,术后7 d组则呈下降趋势,部分指标接近正常对照组。说明本组模型证实了大鼠肝移植术后很快出现了胆汁淤积,并能够逐渐减轻,其发生与肝热缺血和冷保存及再灌注损伤有密切关系。肝移植供肝热缺血、冷保存和缺血再灌注损伤多因素共同作用造成术后早期胆汁淤积。

本组实验中,肝移植术后早期肝组织ATP含量及动脉血酮体比值均有不同程度的下降,然后又自行回升。肝脏缺血后,由于能量代谢系统受损,组织生成ATP的能力下降,ATP含量较正常时明显减少,细胞各种膜系统损伤,导致细胞水肿、溶酶体激活等各种病理生理变化;再灌注后,在相当长时间内能量代谢不能完全恢复正常^[6]。而肝移植术后早期肝细胞内ATP合成量下降,又会导致糖耐量降低,动脉血酮体比值下降。

肝移植术后早期的胆汁淤积往往发生在胆小管或毛细胆管内。研究证实,胆小管是缺血再灌注早期破坏明显的胆道结构之一。肌动蛋白聚合酶的作用依赖ATP,缺血缺氧和ATP消耗会导致肌动蛋白聚合酶功能失常。再灌注后,由于细胞膜钙通道异常和氧化产物增加损伤了细胞骨架而出现微丝功能障碍致使胆小管收缩受阻,进而扩张产生胆汁淤积^[7,8]。缺血和冷保存导致ATP消耗,使胆汁生成和胆小管收缩功能障碍;再灌注时淤血肠道内酸性代谢产物和有毒物质涌入肝脏,造成二次打击,使肝细胞发生形态学改变,细胞骨架塌陷或崩溃,造成毛细胆管、胆小管结构异常和功能障碍,最终引起肝内胆汁淤积。

本组实验结果还显示:在正常情况下,肝细胞质膜Na⁺/K⁺ATP酶的分布是不均匀的,表现为肝窦胞质膜面高于肝毛细胆管膜面($P < 0.05$),肝毛细胆管膜面高于肝细胞间胞质膜面,其间差异显著($P < 0.05$),这反映了肝细胞排泄胆汁和胆红素的正常极性。肝移植术后,肝脏超微结构受损可能与肝细胞膜Na⁺/K⁺ATP酶活性有密切关系,肝细胞能量代谢障碍和术后胆汁淤积互为因果。因此,保证细胞基本的能量供给,提高Na⁺/K⁺ATP酶活性对维持细胞结构和功能稳定起重要作用,对移植后供肝功能的恢复具有积极作用。

肝移植术后肝内胆汁淤积发生的原因有多方面。本实验证明:大鼠肝移植后肝功能和肝组织的能量代谢都有显著

改变。在术后 1 d、3 d, 肝组织 ATP 含量和肝细胞胞质膜 Na^+/K^+ ATP 酶活性均显著降低, 且 Na^+/K^+ ATP 酶在肝细胞质膜上的分布亦发生了明显改变。这表明此时胆汁淤积的发生有泵功能显著不足的因素参与作用。肝组织的泵功能不足是导致大鼠肝移植术后并发胆汁淤积的因素之一。

[参 考 文 献]

- [1] Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat[J]. *Transplantation*, 1979, 28(1): 47 - 50.
- [2] 王 轩, 杨甲梅, 严以群. 大鼠原位肝移植不同术式探讨[J]. *中华器官移植杂志*, 1998, 19(2): 76 - 78.
- [3] Li PK, Lee JT, MacGillivray MH, et al. Direct, fixed - time kinetic assays for β - hydroxybutyrate and acetouacetate with a centrifugal analyzer or a computer - backed spectrophotometer[J]. *Clin Chem*, 1980, 26(12): 1713 - 1717.
- [4] Settaf A, Zahidy M, Elimadi A, et al. S - 15176 reduces the hepatic injury in rats subjected to experimental ische-

mia and reperfusion[J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 406(2): 281 - 292.

- [5] Serrari H, Haddad P. Effects of cold preservation and re-warming on rat liver cell volume regulation and concentrative amino acid uptake[J]. *Gastroenterology*, 1997, 112(4): 1344 - 1353.
- [6] 黄大熔, 胡建中, 汤礼军, 等. 兔肝冷保存后复温缺血 - 再灌注损伤及其相关机制的研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2001, 17(2): 161 - 163.
- [7] Cutrin JC, Cantino D, Biasi F, et al. Reperfusion damage to the bile canaliculi in transplanted human liver[J]. *Hepatology*, 1996, 24(5): 1053 - 1057.
- [8] Yasui H, Yoshimura N, Kobayashi Y, et al. Microstructural changes of bile canaliculi in canine liver; the effect of cold ischemia - reperfusion in orthotopic liver transplantation [J]. *Transplant Proc*, 1998, 30(7): 3754 - 3757.

(上接第 816 页)

表 2 乙肝组、加硒组、对照组细胞内 GSH - Px、MDA 的活性比较

Tab 2 GSH - Px, MDA activity of DCs in hepatitis group, treatment group, control group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	MDA	GSH - Px
Hepatitis	20	1.45 ± 0.12	64.35 ± 5.05
Treat	20	1.27 ± 0.18*	97.91 ± 3.57*#
Control	12	0.93 ± 0.13*	89.74 ± 6.42*

* $P < 0.05$ vs hepatitis group; # $P < 0.05$ vs control group.

讨 论

慢性乙型肝炎患者外周血 DCs 功能的缺陷是造成机体免疫反应低下、HBV 持续感染的重要原因之一。Arima 等^[4]用原位杂交 PCR 和原位 RT - PCR 检测发现慢性乙型肝炎患者约占 20% - 40% DCs 中含有 HBV DNA 和 HBV RNA。表明在慢性乙型肝炎患者体内 DCs 是 HBV 的肝外储存场所之一, 可能也是 HBV 相关蛋白质合成场所。

病毒性肝炎的发病机制非常复杂, 自由基及其引发的脂质过氧化反应也是其分子病理学基础之一。有研究发现慢性乙型肝炎患者血中脂质过氧化物(LPO)含量明显升高, 外周血单个核细胞(PBMC)产生 IL - 2 活性水平及其膜上 IL - 2 受体表达能力下降, 而自由基攻击、脂质过氧化损伤可能是产生上述现象的原因之一^[5]。本实验发现, 从乙肝组 PBMC 诱生出的 DCs 内脂质过氧化产物 MDA 与对照组比较明显升高, 提示过量自由基与 DCs 功能下降有一定的联系。临床流行病学研究表明, 各型肝炎患者均不同程度缺硒或血硒水平低下, 并与病情相关。有学者提出 HBV、HCV 存在及表达硒蛋白 GSH - Px 基因的理论, 进一步从基因及蛋白质水平证明 HCV、HBV 感染 DCs 后, 改变硒蛋白 GSH - Px 表达, 与硒结合蛋白相互作用从而干扰脂质过氧化作用, 影响 DCs 的功能^[6]。

硒是 GSH - Px 的活性中心元素, 通过 GSH - Px 分解过

氧化物及利用谷胱甘肽的还原作用发挥抗氧化作用, 阻止过氧化物对细胞膜、线粒体及溶酶体膜上的脂质产生破坏性的过氧化反应, 保护细胞膜的完整性、稳定性及细胞的正常生理功能。本实验结果显示体外培养慢性乙肝患者 DCs 细胞内 GSH - Px 活性降低, 提示 HBV 感染后 DCs 存在过氧化损伤及抗氧化损伤的能力减弱; 体外加入适当剂量的硒后, GSH - Px 活性升高, 提示补硒可以提高 DCs 的抗氧化损伤作用并在一定程度上能够恢复 DCs 的功能。

[参 考 文 献]

- [1] 高月求, 孙学华, 章晓鹰, 等. 乙肝病毒蛋白对慢性乙型肝炎患者 PBMCs 功能的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(6): 1161 - 1163.
- [2] 汪晓莺, 朱 俊, 汤 伟, 等. 慢性乙型肝炎患者外周血来源树突状细胞的功能状态[J]. *上海免疫学杂志*, 2002, 22(5): 329 - 331.
- [3] van der Molen RG, Sprengers D, Binda R, et al. Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B[J]. *Hepatology*, 2004, 40(3): 738 - 746.
- [4] Arima S, Akbar SM, Michitaka K, et al. Impaired function of antigenpresenting dendritic cells in patients with chronic hepatitis B; Localization of HBV DNA and HBV RNA in blood DCs by *in situ* hybridization[J]. *Int J Mol Med*, 2003, 11(2): 169 - 174.
- [5] 和水祥, 李长顺, 李红霞, 等. 硒对人外周血单个核细胞 IL - 2 系统的影响[J]. *微量元素与健康研究*, 2003, 20(2): 7 - 9.
- [6] Chrobot AM, Szaflarska - Szczepanik A, Drewa G. Antioxidant defense in children with chronic viral hepatitis B and C[J]. *Med Sci Monit*, 2000, 6(4): 713 - 718.