

• 实验研究 •

术前口服富氢水减轻大鼠移植肾缺血再灌注损伤的作用

任恒昌 喻文立 徐如彬 盛明薇 杜洪印

天津市第一中心医院麻醉科 300192

通信作者:杜洪印,Email:duhongyin@medmail.com.cn

【摘要】 目的 评价口服富氢水减轻肾移植大鼠移植肾缺血再灌注损伤的作用及其机制。方法 健康雄性 SD 大鼠 24 只,采用随机数字表法分为 4 组($n=6$),术前 7 d 开始分别采用富氢水和普通水喂养供鼠和受鼠,建立肾移植模型。(1)对照组:供、受鼠采用普通水喂养;(2)受鼠组:受鼠采用富氢水喂养,供鼠采用普通水喂养;(3)供鼠组:受鼠采用普通水喂养,供鼠采用富氢水喂养;(4)实验组:供、受鼠均采用富氢水喂养。移植后 24 h,采集受鼠下腔静脉血及移植肾,检测肾功能、氧化应激、炎症反应、肾小管上皮细胞损伤和凋亡等相关指标评价肾损伤情况,同时检测凋亡相关蛋白表达和肾组织内 p38 磷酸化探讨相应机制。**结果** 与对照组相比,受鼠组、供鼠组及实验组均可见受鼠肾功能改善,受肾氧化应激损伤减轻,炎性因子生成减少,肾小管上皮细胞损伤及凋亡缓解,凋亡相关蛋白及 p38 磷酸化明显受抑($P<0.05$)。与受鼠组相比,上述表现在供鼠组及实验组中更为明显($P<0.05$)。**结论** 术前口服富氢水可明显减轻大鼠移植肾的缺血再灌注损伤,其机制可能与抑制 p38 MAPK 信号通路的激活有关。

【关键词】 氢;大鼠;肾移植;缺血再灌注损伤;氧化应激;p38 MAPK

基金项目:天津市自然科学基金(17JCYBJC28000)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.11.011

Pretreatment of oral hydrogen-rich water attenuates renal ischemia-reperfusion injury of kidney transplantation in rats

Ren Hengchang, Yu Wenli, Xu Rubin, Sheng Mingwei, Du Hongyin

Department of Anesthesiology, First Central Municipal Hospital, Tianjin 300192, China

Corresponding author: Du Hongyin, Email: duhongyin@medmail.com.cn

【Abstract】 **Objective** To examine the protective effect of preoperatively oral hydrogen-rich water on attenuating renal ischemia-reperfusion (I/R) injury of kidney transplantation in rats and explore the related mechanism. **Methods** Orthotopic kidney transplantation was performed in Sprague-Dawley rats ($n=6$). Pretreatment of hydrogen-rich and conventional water started at 1 week pre-transplantation. Conventional water was provided for both donors and recipients in control (C) group, hydrogen-rich water for recipients and conventional water for donors in hydrogen-water-treated recipient (HWR) group, hydrogen-rich water for donors and common water for recipients in hydrogen-water-treated donor (HWD) group, hydrogen-rich water for both donors and recipients in hydrogen-water-treated donor and recipient (HWDR) group. Renal function, oxidative stress, inflammatory and apoptotic parameters were monitored at 24h post-reperfusion. The phosphorylation of p38 in kidney graft was assayed by Western blot. **Results** As compared with C group, renal function of recipients became ameliorated in HWR/HWD/HWDR group. Meanwhile, oxidative stress and inflammatory response were mitigated and lessened pathological injury and apoptosis of renal tubular epithelial cells coincided with suppressing apoptosis-related protein's generation and phosphorylation of p38 ($P<0.05$). Compared with HWR group, the above differences were more significant in HWD and HWDR groups ($P<0.05$). **Conclusions** Preoperative intake of hydrogen water attenuates renal I/R injury after kidney transplantation. And suppressing the activation of p38 MAPK may be a potential mechanism.

【Key words】 Hydrogen; Rat; Kidney transplantation; Ischemia-reperfusion injury; Oxidative stress; Apoptosis; p38 MAPK

Fund program: Natural Science Foundation of Tianjin Municipality (17JCYBJC28000)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2019.11.011

肾移植是目前治疗终末期肾病的最佳方法,可明显提高受者的生活质量,而移植肾缺血再灌注损伤严重影响器官功能的恢复,并与多种术后并发症有关^[1]。氧化应激和炎症反应是引发缺血再灌注损伤的重要机制。有研究表明,有效的氧化应激和炎症反应抑制剂能够减轻缺血再灌注损伤^[2-3]。氢气是一种小分子量和生理惰性的可燃性气体。2007年,Ohsawa等^[4]首次报道,吸入体积分数2%的氢气能显著改善大鼠的脑缺血再灌注损伤。此后,氢气预处理在多种疾病模型中被证实具有器官保护作用^[5-7]。本研究中,我们拟证实饮用富氢水减轻肾移植大鼠移植肾缺血再灌注损伤的作用,并探讨其机制。

材料与方法

一、富氢水的制备及其氢气浓度

本实验所用富氢水参照 Osawa 等^[8]报道的方法进行制备。维持压力为 0.4 MPa,持续 6 h,使氢气在水中的溶解达到饱和。制备的富氢水取样,采用气相色谱分析法检测氢气浓度,氢气浓度高于 0.6 mmol/L 方可使用。制备的富氢水储存于铝制密闭容器内。

二、实验动物及分组

同种系交配的雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体重 200~250 g,购买于中国人民解放军军事医学科学院。实验动物的饲养均遵循 NIH 动物保护原则,实验过程经天津市第一中心医院动物实验伦理委员会批准。所有大鼠均在无菌环境中饲养,采用标准饮食,饮水分别采用普通饮用水和富氢水喂养,共 7 d,每天 100 ml/kg,少量分次灌服。

取 SD 大鼠 24 只,采用随机数字表法分为 4 组,(1)对照组($n=6$):供鼠和受鼠均采用普通饮用水喂养;(2)富氢水喂养受者组(受者组, $n=6$):受鼠采用富氢水喂养,供鼠采用普通饮用水喂养;(3)富氢水喂养供者组(供者组, $n=6$):受鼠采用普通饮用水喂养,供鼠采用富氢水喂养;(4)实验组($n=6$):供鼠和受鼠均采用富氢水喂养。

三、大鼠肾移植模型的建立

参照 Nakao 等^[9]的方法建立大鼠肾移植模型。供鼠的麻醉采用腹腔注射戊巴比妥钠 60 mg/kg。在切取供鼠左肾前经尾静脉注射肝素钠 200 U/kg。切取左肾,采用 4℃的 UW 液灌注至苍白色,保存于 4℃的 UW 液中待移植。受鼠麻醉方式同供鼠,用 10-0 血管线将共肾动脉和供肾静脉吻合于受鼠

腹主动脉和下腔静脉上,采用端侧吻合法;完成吻合后开放肾动脉和肾静脉;用 10-0 血管线吻合输尿管,采用端端吻合法。肾移植完成后切除受鼠自体双肾。关腹后留置导尿管。

四、样本采集

收集受鼠术后 24 h 尿液用以检测尿蛋白含量。移植后 24 h,抽取受鼠下腔静脉血,离心(1000 r/min,离心半径 15 cm)15 min,取上层血清于 -80℃保存、备用;切取移植肾,用 4℃生理盐水将移植肾冲洗干净,一部分于 -80℃保存、备用,另一部分保存于 100 g/L 甲醛溶液中备用。

五、检测项目

1. 肾功能和氧化应激评估:采用全自动生化分析仪(AU5400, Beckman Coulter)检测血清中肌酐、尿素氮的水平及术后 24 h 尿蛋白含量,以评估移植肾功能。取移植肾组织 0.5 g,制成 10%肾组织匀浆,离心(3000 r/min,离心半径 8 cm)10 min,后取上清液,按照说明书操作,采用 ELISA 试剂盒(R&D, 美国)检测丙二醇和 8-羟基脱氧鸟苷(8-OhdG)的水平。

2. 组织病理学分析:采用 Yamada 等^[10]的方法对肾小管损伤进行半定量分析,所有样本均由同 1 名病理科医生采用盲法观察。显微镜下计数出现上皮细胞坏死、存在坏死碎片或存在管型的肾小管,并计算该类型肾小管的比例,按照下列规则打分:0 分:无;1 分:<10%;2 分:10%~25%;3 分:26%~45%;4 分:46%~75%;5 分:76%~100%。计算平均分数用于统计学分析。

3. 移植肾组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 6(IL-6)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的 mRNA 表达水平:采用实时定量 PCR 法进行检测,具体步骤参照 PCR 扩增试剂盒(Takara, 日本)说明书进行扩增,经预变性、变性、退火及延伸等步骤,共扩增 40 个循环。制得融解曲线,计算达到阈值的最低循环数(C_T 值),每个目的基因重复 3 次,取平均值,以 GAPDH 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算目的基因相对表达水平。引物序列图见表 1。

4. 细胞凋亡检测:采用 TUNEL 试剂盒(Roche, 德国)观察移植肾肾小管上皮细胞的凋亡情况,按照试剂盒说明书操作。于荧光显微镜下观察肾小管上皮细胞凋亡情况并计算凋亡指数:在高倍镜($\times 400$)下每个样本随机选取 5 个视野,计数每 100 个肾小管上皮细胞中阳性细胞的个数,计算平均值即为凋亡指数。

表 1 实时定量聚合酶链反应(PCR)各引物序列

基因	引物序列(5'-3')	产物大小(bp)
TNF- α	上游:CCAGACCCTCACACTCAGATC	79
	下游:CACTTGGTGGTTTGTCTACGAC	
IL-6	上游:AGTTGCCTTCTTGGGACTGA	218
	下游:ACAGTGCATCATCGCTGTTC	
iNOS	上游:CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	95
	下游:CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	
GAPDH	上游:AGGTCGGTGTGAACGGATTTC	95
	下游:GGGGTCGTTGATGGCAACA	

5. 凋亡相关蛋白检测:采用蛋白质印迹(Western blot)法检测肾组织中凋亡相关蛋白 caspase-3、Bcl-2、Bax 的表达情况及 p38 磷酸化情况。肾组织总蛋白经提取后,采用标准步骤进行 SDS-PAGE 电泳和转膜。采用 GAPDH 作为参照,根据光密度值计算相对密度进行统计学分析。

六、统计学处理

数据采用均数 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示,采用 Kolmogorov-Smirnov 法进行正态分布检验,所有数据均符合正态分布 ($P > 0.1$)。采用单因素方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、各组移植肾功能的比较

受鼠组、供鼠组及实验组受鼠术后 24 h 的血清肌酐、尿素氮及 24 h 尿蛋白含量较对照组均明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与受鼠组相比,供鼠组和实验组受鼠肾功能指标均明显改善 ($P < 0.05$);而实验组与供鼠组间肾功能指标的差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 2)。

二、氧化应激水平

受鼠组、供鼠组及实验组受鼠移植肾丙二醇和 8-OhdG 水平较对照组明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);受鼠组移植肾组织丙二醇和 8-OhdG 水平较供鼠组与实验组明显升高 ($P < 0.05$),而供鼠组与实验组之间的差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 2)。

三、组织病理学

与对照组 (2.92 \pm 0.31) 相比,受鼠组 (2.00 \pm

0.25)、供鼠组 (1.28 \pm 0.10) 及实验组 (1.25 \pm 0.14) 肾小管损伤评分均明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);与受鼠组相比,供鼠组及实验组肾小管损伤评分均显著降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),而供鼠组评分与实验组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$,图 1)。

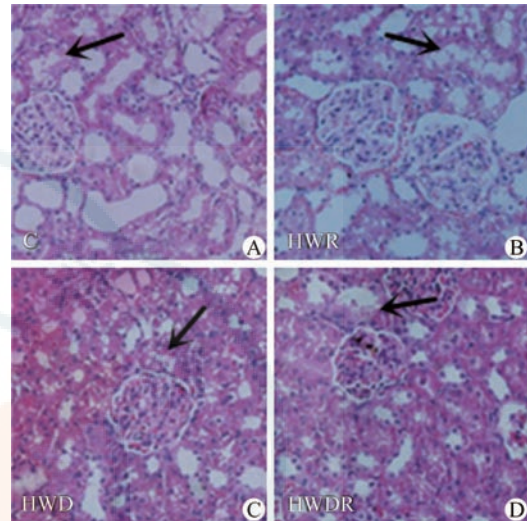


图 1 各组大鼠肾组织病理学改变(HE \times 400),黑色箭头所指处为水泡形成的肾小管上皮细胞和扩张、崩塌的肾小管

四、炎症反应相关 mRNA

与对照组相比,受鼠组、供鼠组及实验组移植肾组织炎症反应相关 mRNA 表达水平均明显降低,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);其中,供鼠组和实验组 mRNA 水平较受鼠组均明显降低 ($P < 0.05$),供鼠组与实验组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$,表 3)。

五、肾小管上皮细胞凋亡

对照组受鼠移植肾经 TUNEL 染色后可见广泛的肾小管上皮细胞凋亡,而受鼠组、供鼠组及实验组中凋亡细胞数明显减少(图 2)。与对照组 (34.70 \pm 2.98) 相比,受鼠组 (25.44 \pm 2.53)、供鼠组 (18.03 \pm 1.95) 及实验组 (9.90 \pm 2.21) 受鼠肾小管凋亡指数均明显降低 ($P < 0.05$),其中供鼠组及实验组凋亡指数较受鼠组均明显降低 ($P < 0.05$);而与供鼠组相比,实验组肾小管上皮细胞凋亡指数明显降低 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肾功能、肾组织氧化应激指标的比较 (Mean \pm SD)

组别	n	24h 尿蛋白(mg)	尿素氮 (mmol/L)	血肌酐 (μ mol/L)	丙二醇 (nmol/mg protein)	OhdG (ng/mg protein)
对照组	6	64.19 \pm 5.37	22.33 \pm 2.54	119.70 \pm 8.32	684.2 \pm 77.3	2.34 \pm 0.20
受鼠组	6	42.97 \pm 4.75 ^a	14.98 \pm 1.80 ^a	88.07 \pm 6.15 ^a	441.2 \pm 68.6 ^a	1.46 \pm 0.14 ^a
供鼠组	6	26.03 \pm 4.41 ^{ab}	8.09 \pm 1.15 ^{ab}	60.33 \pm 6.17 ^{ab}	238.8 \pm 47.3 ^{ab}	0.86 \pm 0.19 ^{ab}
实验组	6	27.23 \pm 7.70 ^{abc}	8.68 \pm 1.11 ^{abc}	56.03 \pm 6.13 ^{abc}	191.7 \pm 44.0 ^{abc}	0.77 \pm 0.17 ^{abc}

注:OhdG 为 8-羟基脱氧鸟苷;与对照组相比,^a $P < 0.05$;与受鼠组相比,^b $P < 0.05$;与供鼠组相比,^c $P > 0.05$

表 3 各组大鼠肾组织炎症细胞因子 mRNA 表达情况的比较

组别	n	TNF- α	IL-6	iNOS
对照组	6	1.00 \pm 0.11	1.00 \pm 0.10	1.00 \pm 0.09
受鼠组	6	0.68 \pm 0.08 ^a	0.63 \pm 0.11 ^a	0.76 \pm 0.11 ^a
供鼠组	6	0.38 \pm 0.09 ^{ab}	0.36 \pm 0.06 ^{ab}	0.35 \pm 0.10 ^{ab}
实验组	6	0.29 \pm 0.08 ^{abc}	0.34 \pm 0.08 ^{abc}	0.31 \pm 0.11 ^{abc}

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与受鼠组相比,^b $P < 0.05$;与供鼠组相比,^c $P > 0.05$

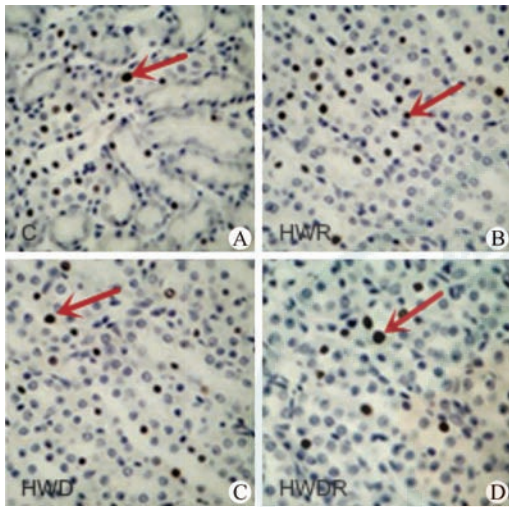


图 2 各组大鼠肾小管上皮细胞凋亡情况 红色箭头所指处为 TUNEL 标记的凋亡肾小管上皮细胞

六、凋亡相关蛋白表达

与对照组相比,受鼠组、供鼠组及实验组移植肾组织中 caspase-3 及 Bax 蛋白表达水平均明显降低 ($P < 0.05$), Bcl-2 表达水平均显著升高 ($P < 0.05$); 与受鼠组相比,供鼠组和实验组中上述目的蛋白表达水平的变化更为明显 ($P < 0.05$, 图 3)。

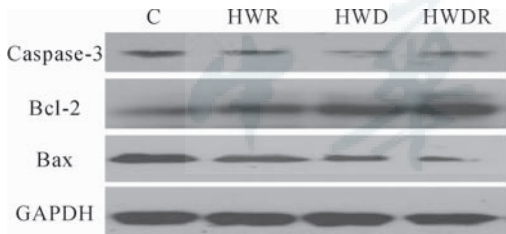


图 3 各组受鼠肾组织凋亡相关蛋白 Caspase-3、Bcl-2、Bax 表达情况的比较 GAPDH 为内参

七、p38 磷酸化程度

与对照组相比,受鼠组、供鼠组及实验组移植肾组织中 p38 磷酸化程度均明显降低 ($P < 0.05$), 以供鼠组和实验组更为明显 ($P < 0.05$, 图 4)。

八、实验相关数据

各组大鼠冷缺血时间、热缺血时间及手术耗时未见明显差异 ($P > 0.05$, 表 4)。各组大鼠均未出现

大量失血及严重术后并发症。

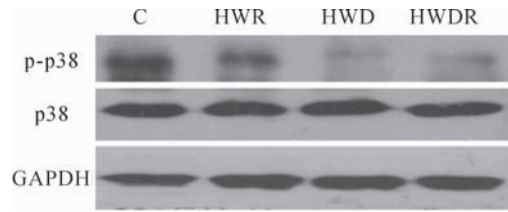


图 4 各组大鼠肾组织 p38 磷酸化(p-p38)情况的比较

表 4 各组大鼠相关实验数据的比较 (Mean \pm SD)

组别	n	受鼠总 摄水量(ml)	热缺血 时间(s)	冷缺血 时间(min)	移植手术 耗时(min)
对照组	6	303.2 \pm 47.3	2.2 \pm 0.2	68.5 \pm 3.5	33.3 \pm 2.8
受鼠组	6	283.7 \pm 43.7	2.4 \pm 0.3	72.0 \pm 2.7	35.0 \pm 3.5
供鼠组	6	308.0 \pm 35.5	2.7 \pm 0.3	64.5 \pm 3.3	32.5 \pm 2.1
实验组	6	343.5 \pm 49.9	2.3 \pm 0.2	69.0 \pm 4.4	39.0 \pm 2.9

讨 论

移植肾缺血再灌注损伤一直是影响肾移植受者预后的重要因素。氢气能够减轻缺血再灌注损伤,改善移植肾功能,提高移植成功率^[11-12]。在氢气常见的给药方式中,口服富氢水更加方便、安全,能够提供有效的氢气浓度,更适合临床应用^[13]。Fujita 等^[14]发现,预先口服富氢水 7 d 能够减轻四氢吡啶毒性导致的大鼠多巴胺能神经元缺失。结合已有的报道,本研究观察了术前 7 d 饮用富氢水减轻肾移植大鼠移植肾缺血再灌注损伤的作用。

过度生成的氧自由基和炎症因子是导致缺血再灌注损伤中的常见诱因。另外,增多的炎症物质能够导致 iNOS 的生成,使组织局部 NO 生成增多,加重细胞损伤。本研究结果显示,术前口服富氢水能够明显降低肾组织丙二醇和 8-OHdG 水平及炎症细胞因子和 iNOS 的 mRNA 表达,抑制氧化应激和炎症介质生成,显著改善术后移植肾功能。

缺血再灌注过程中,P38 MAPK 信号通路能够被过度生成的氧自由基和炎症介质激活。P38 被磷酸化成 p-p38 后,可进一步活化下游转录因子,引起包括 caspase 家族、p53、Fas 受体和 Bax 等在内的多种促凋亡蛋白生成增多,导致细胞凋亡^[15]。本研究结果表明,术前口服富氢水能够抑制 p38 磷酸化,减少促凋亡蛋白 caspase-3 和 Bax 的生成,提高抗凋亡蛋白 Bcl-2 的水平,抑制肾小管上皮细胞凋亡,从而减轻肾小管损伤。

另外,我们通过各组间的比较可以发现,富氢水的保护作用在供鼠组和实验组更为明显,原因可能

与氢气独特的分子特性有关。氢气是小分子惰性气体,化学性质稳定,膜通透较高,循环中的氢气能够轻易通过细胞膜进入细胞质和细胞器,尤其是线粒体中,阻止线粒体膜电位的下降,改善线粒体功能,提高线粒体内复合物的活性,提高氧摄取率,恢复线粒体的能量代谢,尤其是脂肪酸的代谢,从而减少氧自由基的产生^[16]。正是由于氢气的这种性质,供鼠术前饮用富氢水可能会导致供鼠肾组织内分布更多的氢气分子,从而产生更为显著的保护作用。具体机制我们将在后续研究中予以证实。

综上所述,术前口服富氢水能够有效减轻肾移植大鼠移植肾缺血再灌注损伤,其机制可能与抑制 p38 MAPK 信号通路活化,减轻肾小管上皮细胞凋亡有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] Yang B, Dieudé M, Hamelin K, et al. Anti-LG3 antibodies aggravate renal ischemia-reperfusion injury and long-term renal allograft dysfunction[J]. *Am J Transplant*, 2016, 16(12):3416-3429. DOI:10.1111/ajt.13866.
- [2] Choi EK, Jung H, Kwak KH, et al. Inhibition of oxidative stress in renal ischemia-reperfusion injury[J]. *Anesth Analg*, 2017, 124 (1): 204-213. DOI: 10.1213/ANE.0000000000001565.
- [3] Moers C, Pol RA, de Borst MH. Tumor necrosis factor α blockade to ameliorate renal ischemia reperfusion injury: potential implications for kidney transplantation [J]. *Transplantation*, 2016, 100 (8): 1601-1602. DOI: 10.1097/TP.0000000000001221.
- [4] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13(6):688-694. DOI:10.1038/nm1577.
- [5] Meng C, Ma L, Niu L, et al. Protection of donor lung inflation in the setting of cold ischemia against ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide, hydrogen, or both in rats[J]. *Life Sci*, 2016, 151: 199-206. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.03.015.
- [6] 李嘉欣,谢波,谢庆,等.含氢乳酸钠林格液减轻小鼠心脏移植缺血再灌注损伤的作用[J]. *中华器官移植杂志*, 2016, 37(3): 165-169. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2016.03.008.
- [7] 孙伟龙,王思平,陈昊,等.富氢水对乙醇诱导急性胃损伤的保护作用及其机制[J]. *中华消化外科杂志*, 2018, 17(1):89-97. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2018.01.020.
- [8] Ohsawa I, Nishimaki K, Yamagata K, et al. Consumption of hydrogen water prevents atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 377(4):1195-1198. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.10.156.
- [9] Nakao A, Faleo G, Nalesnik MA, et al. Low dose carbon monoxide inhibits progressive chronic allograft nephropathy and restores renal allograft function[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009, 297 (1): F19-26. DOI: 10.1152/ajprenal.90728.2008.
- [10] Yamada K, Miwa T, Liu J, et al. Critical protection from renal ischemia reperfusion injury by CD55 and CD59[J]. *J Immunol*, 2004, 172 (6): 3869-3875. DOI: 10.4049/jimmunol.172.6.3869.
- [11] 王金高,蔺际葵,张民伟,等.吸入氢气能减轻兔心搏骤停后心肌损伤[J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(10):911-915. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.10.010.
- [12] 陈亦润,伍奇杭,任雨,等.氢减轻肾缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *中华器官移植杂志*, 2016, 37(1):59-61. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2016.01.017.
- [13] Sun Q, Kawamura T, Masutani K, et al. Oral intake of hydrogen-rich water inhibits intimal hyperplasia in arterialized vein grafts in rats[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(1):144-153. DOI: 10.1093/cvr/cvs024.
- [14] Fujita K, Seike T, Yutsudo N, et al. Hydrogen in drinking water reduces dopaminergic neuronal loss in the 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6- tetrahydropyridine mouse model of Parkinson's disease[J]. *PLoS One*, 2009, 4(9): e7247. DOI: 10.1371/journal.pone.0007247.
- [15] 于瑶,李世朋,王振,等.干扰素调节因子-1 调控 P38 MAPK 信号通路参与小鼠肝缺血再灌注损伤[J]. *中华器官移植杂志*, 2016, 37(6):362-367. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2016.06.010.
- [16] Shimada S, Wakayama K, Fukai M, et al. Hydrogen gas ameliorates hepatic reperfusion injury after prolonged cold preservation in isolated perfused rat liver[J]. *Artif Organs*, 2016, 40(12):1128-1136. DOI: 10.1111/aor.12710.

(收稿日期:2019-03-27)