

# 灌注速度对移植肝脏缺血再灌注的损伤\*\*

肖宏, 尹思能, 陈安平, 田刚, 陈先林, 龙飞伍

## Effects of perfusion speed on graft ischemia/reperfusion injury following liver transplantation

Xiao Hong, Yin Si-neng, Chen An-ping, Tian Gang, Chen Xian-lin, Long Fei-wu

Department of  
Hepatobiliary  
Surgery, the Second  
People's Hospital of  
Chengdu, Chengdu  
610017, Sichuan  
Province, China

Xiao Hong, Associate  
chief physician,  
Department of  
Hepatobiliary  
Surgery, the Second  
People's Hospital of  
Chengdu, Chengdu  
610017, Sichuan  
Province, China

Correspondence to:  
Long Fei-wu, Master,  
Attending physician,  
Department of  
Hepatobiliary  
Surgery, the Second  
People's Hospital of  
Chengdu, Chengdu  
610017, Sichuan  
Province, China  
longfw1978@sina.  
com

Supported by: the  
Science and  
Technology  
Foundation of Health  
Department of  
Sichuan Province,  
No. 080015\*,  
090025\*

Received:2010-08-13  
Accepted:2010-10-15

### Abstract

**BACKGROUND:** Previous studies demonstrated that perfusion pressure influences the energy metabolism of graft and affects its energy, suitable perfusion pressure can significantly improve the quality of donor.

**OBJECTIVE:** To investigate the effects of various perfusion-speeds on reperfusion injury of graft after rat orthotopic liver transplantation.

**METHODS:** SD to SD rat orthotopic liver transplantation models were established by improved Kamada two-cuff technique. Perfusion-speed during harvesting grafts was 50, 100, 150 and 200 mL/h, respectively. The morphological change of grafts were observed by light microscope, alanine transaminase (ALT) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in peripheral serum and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) protein and mRNA intragraft were detected.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The pathohistological damage of grafts in 200 mL/h group was obviously compared with other groups. Compared with 50 and 100 mL/h groups, ALT in 150 and 200 mL/h groups was significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), but the expression of eNOS protein and mRNA was obviously lower ( $P < 0.01$ ). The hepatic function damaged seriously with increasing of perfusion speed after 100 mL/h. The findings demonstrated that suitable perfusion speed can reduce hepatic function injury and improve prognosis. 100 mL/h was compatible speed for harvesting graft of rat liver transplantation.

Xiao H, Yin SN, Chen AP, Tian G, Chen XL, Long FW. Effects of perfusion speed on graft ischemia/reperfusion injury following liver transplantation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(5): 788-791. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 近年来有学者研究发现供体灌注的压力可直接影响移植物的能量代谢从而影响其活力, 适当的灌注压力能明显提高供体的质量。

**目的:** 观察不同灌注速度对大鼠移植肝脏再灌注损伤的影响。

**方法:** 采用改良的 Kamada 双袖套法建立 SD→SD 原位肝移植模型。供体肝脏获取时分别以 50, 100, 150, 200 mL/h 进行灌注。检测移植后外周血清肿瘤坏死因子  $\alpha$  和谷丙转氨酶水平, 观察肝脏组织病理学改变和肝脏组织内皮源性一氧化氮合酶的表达变化。

**结果与结论:** 与低灌注速度相比, 供体肝脏制备过程中 200 mL/h 的灌注速度导致了更加明显的肝脏病理形态学改变, 肝细胞变性、肝血窦扩张和炎细胞浸润也更加明显。术后 24 h 肝功能的检测也发现, 150, 200 mL/h 灌注速度组外周血清谷丙转氨酶活性、肿瘤坏死因子水平明显高于 50, 100 mL/h 灌注速度组 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 内皮源性一氧化氮合酶表达明显低于 50, 100 mL/h 灌注速度组 ( $P < 0.01$ ), 100 mL/h 灌注速度后, 随着灌注速度的增加肝功能损伤也明显加重。证实适当的灌注压力和速度是获得高质量供体的保障, 能够减轻移植后肝功能损伤, 改善受体预后, 在大鼠肝移植供体制备过程中 100 mL/h 是适宜的灌注速度。

**关键词:** 灌注速度; 肝移植; 缺血再灌注损伤; 大鼠; 器官移植  
doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.05.007

肖宏, 尹思能, 陈安平, 田刚, 陈先林, 龙飞伍. 灌注速度对移植肝脏缺血再灌注的损伤[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(5):788-791. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

## 0 引言

自 1979 年 Kamada<sup>[1]</sup> 成功建立大鼠肝移动物植模型以来, 经过不断的改进大鼠肝脏移植已经发展成为进行肝脏缺血再灌注损伤、移植免疫、器官保存等基础理论研究的理想动物模型。近年来有学者研究发现供体灌注的压力可直接影响移植物的能量代谢从而影响其活力, 适当的灌注压力能明显提高供体的质量<sup>[2-4]</sup>。

既往对大鼠肝移植的研究多集中在手术技术的提高和改良以及术中麻醉的选择, 而灌注速度和压力对移植损伤的研究却较少, 有学

者研究发现不适当的压力会导致肝脏移植能量代谢变化和肝细胞钙超载, 从而影响移植物的活力, 为了获得高质量的供肝应该采用低温低压灌注<sup>[5-8]</sup>。本实验应用微量灌注泵在大鼠供体肝脏制备过程中以不同的速度经过腹主动脉灌注供体肝脏, 观察灌注速度对大鼠肝移植缺血再灌注损伤的影响及可能机制。

## 1 材料和方法

**设计:** 随机对照动物观察实验。

**时间及地点:** 于 2006/2008 在四川大学华西医院移植免疫研究室完成。

**材料:** 成年雄性 SD 大鼠 48 只, 体质量 (220±20) g, 购于解放军第三军医大学大坪医院实验动物中心。

#### 实验方法:

**动物模型的建立:** 将 48 只 SD 大鼠以数字表法随机分为 4 组, 采用 SD→SD 原位肝移植, 以 4 °C 肝素乳酸林格氏液经由肝固有动脉和门静脉灌注肝脏 15 min; 在供肝制备过程中以微量注射泵分别以 50, 10, 150, 200 mL/h 不同的速度灌注肝脏。灌注结束后置 4 °C 乳酸林格液中保存 30 min。余手术步骤采用改良的 Kamada 双袖套法完成<sup>[3]</sup>。

**标本收集及检测方法:** 每组 6 只大鼠于术后 6, 12 h 由尾静脉抽血 1 mL, 给予相同体积生理盐水补液, 术后 24 h 取大鼠血清与肝组织于 -70 °C 保存, 肝组织块以体积分数 10% 中性甲醛固定。

**肝组织病理学改变:** 常规石蜡包埋切片 (3 μm), 苏木精-伊红染色后光镜下观察。

**肝功能检测:** 冻存外周血清复温后全自动生化分析检测谷丙转氨酶水平。

**肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 检测:** 按 ELISA 检测试剂盒说明操作, 检测受体大鼠术后 6, 12, 24 h 外周血清 TNF-α 水平。由酶标仪自带 KC junior 软件自动检测计算绘制标准曲线, 自动读取待测样本数据。

**肝组织内内皮源性一氧化氮合酶 (Endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 蛋白和 mRNA 表达检测:** 免疫组织化学检测肝组织内 eNOS 表达采用二步法完成。

**肝组织内 eNOS mRNA 表达检测.** 按小量组织/细胞总 RNA 快速抽提纯化试剂盒说明要求提取肝组织总 RNA。按 Realtime-PCR 反应试剂盒 (TAKARA, 大连) 操作说明配制 25 μL 反应体系完成 eNOS 基因扩增 (icycler IQtm Multicolor Real-Time Detection System, Bio-RAD, USA)。Realtime-PCR 反应按标准的定量 PCR 操作程序完成。反应溶解曲线呈单峰表现。

**主要观察指标:** 移植后外周血清 TNF-α 和谷丙转氨酶水平, 肝组织病理学改变和肝组织内 eNOS 的表达变化。

**统计学分析:** 所有实验数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用方差分析, 所有数据均采用 SPSS 13.0 软件进行处理, 以  $P < 0.05$  表示差异有显著性意义。统计学分析由通讯作者完成。

## 2 结果

**2.1 实验动物数量分析** 24 只受体大鼠均进入结果分析。

**2.2 各组受体大鼠肝脏组织病理学改变** 石蜡切片苏木精-伊红染色后光镜下观察肝脏组织病理学改变。50, 100 mL/h 灌注速度组大鼠移植后肝脏小叶结构基本正常, 肝血窦轻度扩张或者正常, 汇管区或门静脉内皮细胞下炎细胞浸润较少或不可见; 150, 200 mL/h 灌注速度组大鼠移植后肝脏小叶结构损伤明显, 肝细胞变性水肿, 肝血窦明显扩张充血, 汇管区和内皮细胞下炎细胞浸润明显, 200 mL/h 灌注速度组损伤较 150 mL/h 灌注速度组更加明显。见图 1。

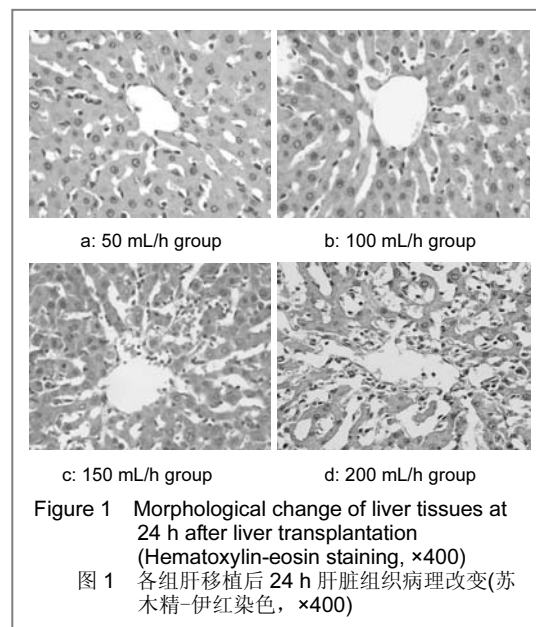


Figure 1 Morphological change of liver tissues at 24 h after liver transplantation (Hematoxylin-eosin staining, ×400)  
图 1 各组肝移植后 24 h 肝脏组织病理改变 (苏木精-伊红染色, ×400)

**2.3 各组大鼠肝移植后肝功能变化** 移植后 24 h 各组谷丙转氨酶明显升高, 50 mL/h 灌注速度组 (12.5±2.2) μkat/L 与 100 mL/h 灌注速度组 (11.6±2.7) μkat/L 比较差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。150 mL/h 灌注速度组 (18.3±3.3) μkat/L 与 200 mL/h 灌注速度 (23.4±4.2) μkat/L 明显高于 50, 100 mL/h 灌注速度组 ( $P < 0.01$ )。200 mL/h 灌注速度组明显高于 150 mL/h 灌注速度组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

**2.4 肝移植后各组大鼠外周血 TNF-α 水平变化**  
移植后 6 h: 100 mL/h 灌注速度组 (365±79) ng/L、150 mL/h 灌注速度组 (428±46) ng/L 和 200 mL/h 灌注速度组 (475±66) ng/L 均高于 50 mL/h 灌注速度组 (342±98) ng/L, 100, 150 mL/h 灌注速度组与 50 mL/h 灌注速度组差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ ); 200 mL/h 灌注

成都市第二人民医院肝胆胰外科, 四川省成都市 610017

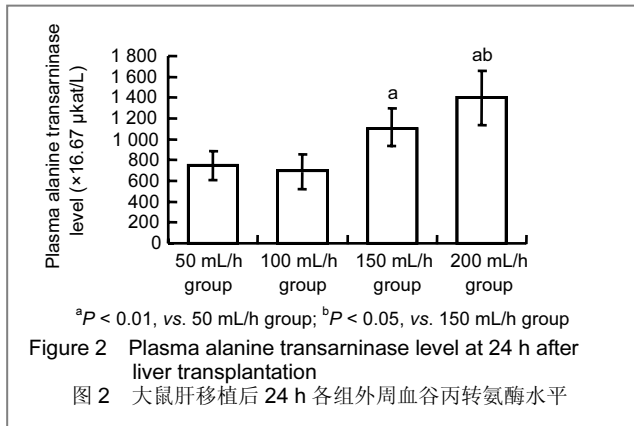
肖宏, 男, 1965 年生, 重庆市人, 汉族, 1989 年泸州医学院毕业, 副主任医师, 主要从事于肝胆疾病临床及基础研究。

通讯作者: 龙飞伍, 主治医师, 硕士, 成都市第二人民医院肝胆胰外科, 四川省成都市 610017  
longfw1978@sina.com

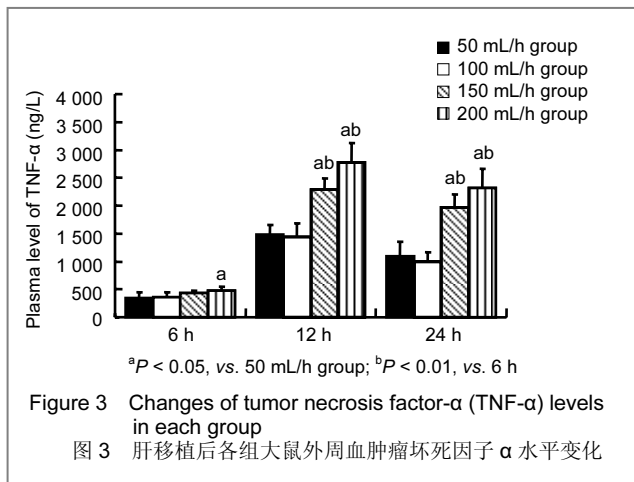
中图分类号: R617  
文献标识码: A  
文章编号: 1673-8225 (2011)05-00788-04

收稿日期: 2010-08-13  
修回日期: 2010-10-15  
(20100707007/GW Z)

速度组较 50 mL/h 灌注速度组升高明显( $P < 0.05$ )。



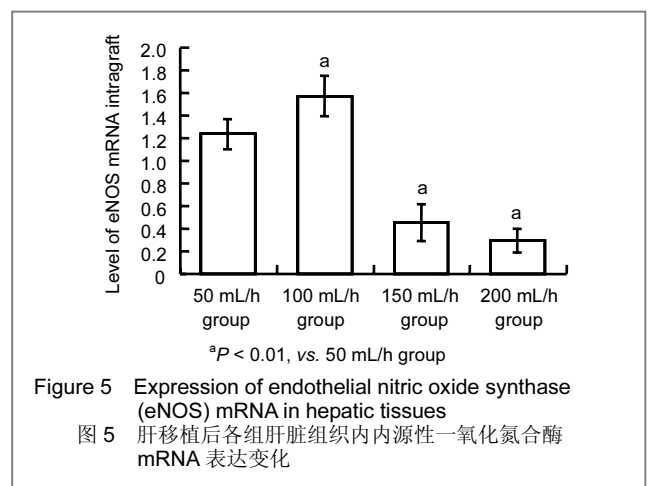
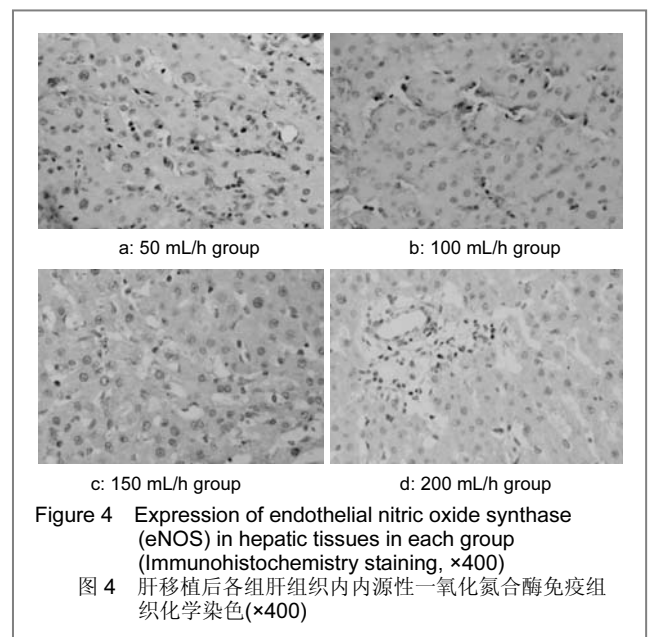
移植后 12, 24 h: 50 mL/h 灌注速度组( $1\ 480 \pm 178$ ), ( $1\ 088 \pm 270$ ) ng/L 稍高于 100 mL/h 灌注速度组( $1\ 440 \pm 236$ ), ( $992 \pm 176$ ) ng/L, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。150 mL/h 灌注速度组( $2\ 293 \pm 194$ ), ( $1\ 967 \pm 229$ ) ng/L 和 200 mL/h 灌注速度组( $2\ 320 \pm 346$ ), ( $3\ 487 \pm 326$ ) ng/L 均明显高于 50, 100 mL/h 灌注速度组( $P < 0.01$ )。外周血 TNF- $\alpha$  于移植后 12 h 达峰, 至 24 h 开始下降( $P < 0.05$ ); 各组内比较, 移植后 12, 24 h 较 6 h 明显升高( $P < 0.01$ )。见图 3。



2.5 各组肝脏组织内 eNOS 表达变化 50, 100 mL/h 灌注速度组肝脏内皮细胞 eNOS 表达明显, 100 mL/h 灌注速度组稍强于 50 mL/h 灌注速度组。而 150 mL/h 灌注速度组仅见微弱表达, 200 mL/h 灌注速度组肝脏组织内未见 eNOS 表达。见图 4。

荧光定量 PCR 检测移植后肝脏组织内 eNOS mRNA 表达。50 mL/h 灌注速度组  $1.24 \pm 0.13$  和 100 mL/h 灌注速度组  $1.57 \pm 0.18$  明显高于 150 mL/h 灌注速度组  $0.46 \pm 0.16$  和 500 mL/h 灌注速度组  $0.30 \pm 0.10$  ( $P < 0.01$ ); 且 100 mL/h 灌注速度组表达强于 50 mL/h 灌注速度组( $P < 0.05$ )。灌注速度大于 100 ml/h 时, 随压力增加 eNOS mRNA 表达明显下降, 200 mL/h 灌注速度组稍弱于 150 mL/h 灌注速度组, 但两组比较差异无显

著性意义( $P > 0.05$ )。见图 5。



### 3 讨论

本实验发现大鼠肝移植后移植物具有不同程度的缺血再灌注损伤的表现, 而供体肝脏制备过程中较高的灌注速度将导致更加明显的肝脏病理形态学改变, 肝细胞变性、肝血窦扩张和炎细胞浸润也更加明显。术后 24 h 肝功能的检测也发现, 150, 200 mL/h 高灌注速度组外周血谷丙转氨酶明显高于 50, 100 mL/h 低速灌注组, 且随着灌注速度的增加肝功能的损伤也明显加重。

eNOS 是目前发现的 3 种一氧化氮合成酶中的一种, 在肝脏血窦内皮细胞构成性的表达, 参与调节 NO 的合成<sup>[9-10]</sup>。而 eNOS 来源的 NO 能够维持正常的血管结构和功能, 调节血管壁张力, 是调节肝内血流的关键性调节因子<sup>[11]</sup>。Serracino-Inglott 等<sup>[12]</sup>研究表明, 在大鼠肝脏缺血再灌注模型中 eNOS 表达明显下调, 减少 NO 的合成, 直接导致了肝脏的损伤。近来的研究发现

eNOS 基因缺陷小鼠肝移植后缺血再灌注损伤表现明显加重, 移植物组织内单核巨噬细胞浸润更加明显, 表明 eNOS 对肝移植后缺血再灌注损伤具有保护作用<sup>[13-14]</sup>。进一步的研究发现, eNOS 基因缺陷小鼠肝移植后 kupffer 细胞活性明显增强; 而给与 GdCl<sub>3</sub> 抑制 kupffer 细胞功能时可以明显缓解 eNOS 基因缺陷小鼠肝脏缺血再灌注损伤, 因此认为 eNOS 可能通过抑制 kupffer 细胞激活, 减少多种细胞因子和炎症递质合成和释放, 减轻肝移植后缺血再灌注损伤<sup>[15]</sup>。同时 Grisham 等<sup>[16]</sup>研究表明 eNOS 基因缺陷或功能抑制将导致血管平滑肌收缩、减少组织血供, 同时增加内皮细胞表面黏附分子的表达而增强单核巨噬细胞浸润, 最终导致微循环障碍加重组织器官损伤。本实验中发现高速灌注组肝脏组织内 eNOS 表达微弱或不表达, 明显低于低速灌注组, 表明较高的灌注速度和压力可能导致肝脏血窦内皮细胞的损伤和缺失, 减少 eNOS 表达, 从而通过多种途径加重肝移植后缺血再灌注损伤。

以前的研究表明, 肝脏的缺血再灌注损伤分为早期阶段(再灌注后 1~3 h)和晚期阶段(再灌注后 6~24 h), 早期阶段的肝脏损伤与激活的 Kupffer 细胞释放的炎症递质有关, 而晚期阶段出现的损伤则由肝脏组织内浸润的炎症细胞释放的炎症递质和细胞因子介导<sup>[17]</sup>。TNF- $\alpha$  主要由活化的单核-巨噬细胞分泌, CoLletti 等<sup>[18]</sup>研究发现 TNF- $\alpha$  是肝脏缺血再灌注损伤后炎症递质和细胞因子释放最主要的始动细胞因子, 通过多种途径参与了肝脏的损伤。实验中检测了术后 6, 12, 24 h 外周血 TNF- $\alpha$  水平, 发现术后 6 h 各组 TNF- $\alpha$  水平明显高于正常, 12 h 达峰, 24 h 时有所下降。同时相同时间点高速灌注组 TNF- $\alpha$  水平明显高于低速灌注组。其变化的趋势和组织学改变一致。结果表明较高的灌注速度可能导致了更加严重的肝脏血窦内皮细胞损伤和单核巨噬细胞浸润, 在肝脏局部合成和释放 TNF- $\alpha$ , 继而激活细胞因子级联网络而促进肝损伤。作者在实验中发现术后 24 h 50 mL/h 灌注组 TNF- $\alpha$  表达强于 100 mL/h 灌注组, 可能与肝脏局部血液残留再灌注后激活淋巴细胞免疫反应以及形局部微小血栓有关; 同时本实验发现 50 mL/h 灌注组移植后肝组织内 eNOS 的表达低于 100 mL/h 灌注组, 可能由 TNF- $\alpha$  下调 eNOS 表达所致<sup>[19]</sup>。

综上所述, 本实验发现在大鼠肝移植供体肝脏制备过程中高速灌注可能通过加重肝脏血窦内皮细胞的损伤, 下调 eNOS 的表达, 从而经过多个途径促进肝移植后缺血再灌注损伤; 同时单核巨噬细胞浸润促进了细胞因子和炎症递质级联的活化, 进一步抑制 eNOS 表达, 加重肝脏功能的损伤。过低的灌注速度可能导致供体血液成分残留形成微血栓, 在肝脏再灌注后激活免疫反应加重肝功能的损伤。因此, 适当的灌注压力和速度是获得高质量供体的保障。

#### 4 参考文献

- [1] Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat: techniques using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation*. 1979;28(1): 47-49.
- [2] Tisone G, Vennarecci G, Bauiechi L, et al. Randomized study on in situ liver perfusion techniques: gravity perfusion vs high pressure perfusion. *Transplant Proc*. 1997;29(8):3460.
- [3] Tokunaga Y, Ozkai N, Wkashiro S, et al. Effects of perfusion pressure during flushing on the viability of the procured liver using invasive fluorometry. *Transplantation*. 1988;45:1031.
- [4] Zhang G, Wang XH, Zhang F. Zhongguo Puwai Jichu yu Linchuang Zazhi. 1999;6(3):140-142.  
张浩, 王学浩, 张峰. 灌注压力对肝移植活性的影响[J]. 中国普外基础与临床杂志, 1999, 6(3):140-142.
- [5] Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery*. 1983;93 (1 Pt 1): 64-69.
- [6] Miyata M, Fisher JH, Fuhs W, et al. A simple method for orthotopic liver Transplantation in the rat. *Transplantation*. 1980;30(5):335.
- [7] Delrivie RE, Gibbs P, Kobyaashi E, et al. Technical details for safer venous and Biliary anastomoses for liver transplantation in the rat. *Microsurgery*. 1998;18(1):12-18.
- [8] Peng Y, Gong JP, Liu CA, et al. Zhongguo Putong Waike Zazhi. 2003;12(9):673-676.  
彭勇, 龚建平, 刘长安, 等. 大鼠原位肝移植模型制作过程中麻醉方法的选择[J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(9):673-676.
- [9] Shah V, Haddad FG, Garcia-Cardena G, et al. Liver sinusoidal endothelial cells are responsible for nitric oxide modulation of resistance in the hepatic sinusoids. *J Clin Invest*. 1997;100(11): 2923-2930.
- [10] Leifeld L, Fielenbach M, Dumoulin FL, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in fulminant hepatic failure. *J Hepatol*. 2002;37(5): 613-619.
- [11] Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, et al. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ Res*. 1987; 61(6):866-879.
- [12] Serracino-Inglott F, Virlos IT, Habib NA, et al. Differential nitric oxide synthase expression during hepatic ischemia-reperfusion. *Am J Surg*. 2003;185(6):589-595.
- [13] Theruvath TP, Zhong Z, Currin RT, et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Protects Transplanted Mouse Livers Against Storage/Reperfusion Injury: Role of Vasodilatory and Innate Immunity Pathways. *Transplant Proc*. 2006; 38(10): 3351-3357.
- [14] Kawachi S, Hines IN, Laroux FS, et al. Nitric oxide synthase and postschemic liver injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 276(3):851-854.
- [15] Hines IN, Harada H, Flores S, et al. Endothelial nitric oxide synthase protects the post- ischemic liver: potential interactions with superoxide. *Biomed Pharmacother*. 2005;59(4):183-189.
- [16] Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ. Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med*. 1998;25(4-5):404-433.
- [17] Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in the rat liver in vivo. *FASEB J*. 1990; 4(15):3355-3359.
- [18] CoLletti LM, Kumkel SL, Walz A, et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1996;23(3): 506-514.
- [19] Mohamed F, Monge JC, Gordon A, et al. Lack of role for nitric oxide (NO) in the selective destabilization of endothelial NO synthase mRNA by tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:52-57.

来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 四川省卫生厅科基金项目(080015, 090025)。

**作者贡献:** 实验设计、实施及评估均由通讯作者在实验室技术员老师的指导下完成, 第一作者成文, 第一作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验过程中对动物处置符合动物伦理学要求。