

热缺血损伤对大鼠心脏死亡供肝线粒体形态和功能的影响

刘树荣¹, 余斌², 焦保平¹, 刘永锋¹(¹中国医科大学附属第一医院普通外科教研室, 器官移植科, 辽宁省沈阳市 110001; ²沈阳市第一人民医院外二科, 辽宁省沈阳市 110041)

文章亮点:

1 心脏死亡后捐献器官作为主要的器官来源, 如何才能很好的把握控制供体器官的功能活性, 使移植达到最佳功能状态是目前重点关注的方向。

2 实验的特点在于采用了透射电镜观察心脏死亡供体肝脏线粒体形态学变化。采用了细胞色素 C 氧化酶表示心脏死亡供体肝脏线粒体功能, 定性表示肝脏功能, 从而从形态学和功能学两方面说明热缺血损伤对心脏死亡供体线粒体的影响。

关键词:

实验动物: 组织构建; 器官捐献; 心脏死亡; 热缺血; 供肝; 线粒体; 细胞色素 C 氧化酶; 透射电子显微镜; SD 大鼠

主题词:

组织供者; 热缺血; 大鼠, Sprague-Dawley; 肝细胞; 线粒体; 电子传递复合物IV; 显微镜检查, 电子; 透射基金资助:

辽宁省教育厅创新团队项目(2009T104); 卫生部行业专项基金资助项目(201002004)

摘要

背景: 如何才能很好的把握控制心脏死亡后捐献器官的功能活性, 使移植达到最佳功能状态是器官移植领域研究的重点方向之一。

目的: 初步探讨热缺血损伤对大鼠心脏死亡供肝功能的影响。

方法: 建立 SD 大鼠心脏死亡动物模型, 将大鼠随机分为 6 组, 分别为对照组(热缺血 0 min 组), 热缺血 10 min 组, 热缺血 20 min 组, 热缺血 30 min 组, 热缺血 40 min 组和热缺血 50 min 组。取各组大鼠肝脏标本制备超薄切片, 透射电镜观察肝细胞结构改变并行 Flameng 评分。提取肝脏线粒体, 用分光光度法测定细胞色素 C 氧化酶的活性。

结果与结论: 透射电镜下见热缺血 30 min 内肝细胞无明显改变, 核膜尚完整, 线粒体轻度肿胀, 线粒体嵴未发生断裂, Flameng 评分在 2 分以下。随着热缺血时间的延长, 细胞核固缩, 部分肝细胞自溶, 可见凋亡小体, 线粒体基质凝固, 线粒体逐渐呈空泡状, Flameng 评分 3 至 4 分。线粒体细胞色素 C 氧化酶活性在热缺血 30 min 内无明显改变, 热缺血 40 min 组和热缺血 50 min 组发生明显降低。从线粒体形态和细胞色素 C 氧化酶活性两方面来看, 热缺血时间在 30 min 内对肝脏功能影响较小, 热缺血时间在 40 min 以上时肝脏呈不可逆性损伤。

刘树荣, 余斌, 焦保平, 刘永锋. 热缺血损伤对大鼠心脏死亡供肝线粒体形态和功能的影响[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(5):681-686.

Impact of warm ischemia injury on mitochondrial morphology and function of rat donor liver after cardiac death

Liu Shu-rong¹, Yu Bin², Jiao Bao-ping¹, Liu Yong-feng¹ (¹Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China; ²Second Department of General Surgery, the First People's Hospital of Shenyang City, Shenyang 110044, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: How to control functional activity of donor liver after cardiac death and maintain the optimal function of grafts are the key issues in organ transplantation study.

OBJECTIVE: To preliminarily explore the effect of warm ischemia injury on the morphology and function of rat donor liver after cardiac death.

METHODS: Cardiac death model was established in Sprague-Dawley rats and the successful models were divided into six groups: control group (warm ischemia for 0 minute), warm ischemia 10 group (warm ischemia for 10 minutes), warm ischemia 20 group (warm ischemia for 20 minutes), warm ischemia 30 group (warm ischemia for 30 minutes), warm ischemia 40 group (warm ischemia for 40 minutes) and warm ischemia 50 group (warm ischemia for 50 minutes). The rat liver specimens in each group were cut into ultrathin sections. The structure of liver cells was observed and photographed by electron microscopy. Flameng score was applied to analyze the degree of mitochondrial damage. Liver mitochondria were extracted and then spectrophotometry was used to assess the viability of cytochrome C oxidase.

刘树荣, 女, 1962 年生, 辽宁省沈阳市人, 汉族, 1986 年中国医科大学毕业, 硕士, 副教授, 主要从事肝胆外科、器官移植方面的研究。

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.05.005
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)05-00681-06
稿件接受: 2013-11-04

Liu Shu-rong, Master, Associate professor, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaoning Province, China

Accepted: 2013-11-04

RESULTS AND CONCLUSION: Under electron microscopy, there were no significant changes in liver cells within 30 minutes of warm ischemia, nuclear membrane was intact, mitochondria mildly swelled, no mitochondrial crista ruptured, and Flameng score was < 2 points. With the extension of warm ischemia time, the cells became swelling, nuclear chromatin condensed, apoptotic body was clearly visible, mitochondrial matrix coagulated, mitochondria exhibited vacuolation, and Flameng score was 3-4 points. The viability of cytochrome C oxidase showed no significant difference within 30 minutes of warm ischemia, but began to significantly decrease at 40 and 50 minutes. The mitochondrial structure and function after liver injury is not obviously affected by 30 minutes of warm ischemia, and significant changes appear after 40 minutes.

Subject headings: tissue donors; warm ischemia; rats, Sprague-Dawley; hepatocytes; mitochondria; electron transport complex IV; microscopy, electron, transmission

Funding: Innovation Team Project Program of Education Department of Liaoning Province, No. 2009T104; Special Fund for Health Sector Scientific Research of the Ministry of Health, No. 201002004

Liu SR, Yu B, Jiao BP, Liu YF. Impact of warm ischemia injury on mitochondrial morphology and function of rat donor liver after cardiac death. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(5):681-686.

0 引言 Introduction

肝移植目前已被公认为是治疗终末期肝病和急性肝功能衰竭唯一有效的方法。结合中国国情, 心脏死亡后器官捐献(donation after cardiac death, DCD)是解决器官来源问题的科学决策^[1-4]。用于移植的心脏死亡供者不断增多^[5], 然而在器官获取过程中缺少可以评估供移植肝脏活力的定量指标^[6-8]。目前, 临床医生主要通过观察器官质地和灌注效果等形态学指标来判断供肝是否适合移植, 这种方法具有很大的不确定性^[9]。据统计, 约有40%的器官由于不能确定其活力是否良好而被舍弃^[10]。线粒体作为细胞器, 是真核细胞活动的主要供能单位, 线粒体很容易因为缺血缺氧而导致功能下降, 引起细胞能量代谢下降, 最终导致细胞及器官失功, 活性下降甚至丧失, 导致移植失败, 因此线粒体的功能直接影响移植器官的活性^[11-13]。实验建立大鼠DCD模型, 通过观察不同热缺血时间下肝脏线粒体形态及细胞色素C氧化酶活性变化, 探讨热缺血损伤对DCD供肝肝功能的影响, 为定性评估DCD供肝活性提供理论支持。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2010年7月至2011年3月在中国医科大学普通外科实验室完成。

材料:

实验所用试剂和仪器:

试剂和仪器	来源
氧化型细胞色素 C 氧化酶试剂盒, 肝脏线粒体提取试剂盒	沈阳海灵兴业贸易有限公司
UV2550 紫外分光光度计	日本岛津公司
透射电镜	JEM-2100F, 日本
图像采集与分析系统	Q550cw, 德国
X-22R 型冷冻离心机	Beckman 公司
微量电子天平	AE100, 上海
微量加样机 0-1 000 μ L	Eppendorf, 德国
光学显微镜	Olympus, 日本

实验动物: 雄性SD大鼠60只, 4周龄, 体质量250-300 g, 购于中国医科大学动物实验中心。

实验方法:

热缺血模型的建立和分组: 动物术前禁食12 h, 自由进水, 大鼠称质量后以10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉, 取仰卧位, 腹部横切口进腹, 经阴茎背静脉注入肝素20 IU, 剪断镰状韧带及左右三角韧带, 游离门静脉及肝固有动脉, 剪开膈肌, 阻断胸主动脉, 制成大鼠DCD模型。随机将大鼠分为6组, 分别为对照组(热缺血0 min组)、热缺血10 min组、热缺血20 min组、热缺血30 min组、热缺血40 min组和热缺血50 min组, 每组10只。达到热缺血时间后, 经门静脉灌注 0-4 °C 乳酸钠林格氏液冲洗肝脏残留血液。对照组夹闭胸主动脉后立即松开, 其余操作与实验组相同。所有实验均在相关动物保护条例下进行。

检测样本的获得: 各组大鼠均在肝右叶同一部位取材进行下一步检测。

透射电镜观察肝脏线粒体并行Flameng评分: 于肝右叶近肝右静脉处剪取一小块肝组织1 mm³, 立即投入预冷的4%戊二醛固定, 经0.1 mol/L PBS漂洗3次, 1%锇酸固定3 h后, 同样方法漂洗3次, 以上实验在4 °C下操作。用不同浓度的乙醇梯度脱水, 再用不同浓度的丙酮逐级脱水, 环氧树脂EPson包埋加温聚合, 定位修块, LKB-v型超薄切片机切片, 经醋酸铀-硝酸铅双重染色, 应用透射电镜观察细胞超微结构的变化。相同放大倍数下随机选择5个视野照相, 每个视野中随机选取约10个线粒体进行分析。按照线粒体的受损程度, 逐个线粒体进行0-4级记分, 最后计算样本的平均得分, 即得到该样本的Flameng评分^[14]。

Flameng 分级方法评分标准:

分级	线粒体形态
0级(0分)	线粒体结构正常, 充满颗粒
I级(1分)	结构基本正常, 基质颗粒丢失(轻度肿胀, 基质密度减少, 嵴分离)
II级(2分)	线粒体肿胀(基质密度严重减小, 嵴分离); 基质透明, 嵴未断裂
III级(3分)	线粒体嵴断裂, 基质凝固(严重肿胀)
IV级(4分)	内外膜完整性消失, 呈空泡状(严重肿胀伴嵴断裂, 内外膜破裂)

肝脏线粒体的提取:

线粒体的提取: ①样本处理: 称取100-200 mg新鲜肝组织, PBS冲洗, 洗净血水, 滤纸吸干, 用剪刀剪成碎块放入小容量玻璃匀浆器内。加入1.5 mL冷的Lysis Buffer1, 0 °C冰浴上下研磨组织20次。②将组织匀浆物转移到离心管, 4 °C, 800×g离心5 min。细胞核、大的膜碎片、未裂解细胞等在管底。③在另一个新的预冷的离心管中预先加入0.5 mL Medium Buffer, 将匀浆后的上清液0.5 mL (Medium Buffer: 上清液体积=1:1)沿管壁小心地加入该离心管中, 覆盖于Medium Buffer的上层。④4 °C, 15 000×g离心10 min。离心后的上清含胞浆成分, 将上清转移到新离心管, 线粒体沉淀在管底。⑤在线粒体沉淀中加入0.2 mL Wash Buffer重悬线粒体沉淀, 4 °C, 15 000×g离心10 min, 弃上清。

蛋白的提取: ①在每1 mL冷Lysis Buffer2加入5 μL磷酸酶抑制剂, 1 μL蛋白酶抑制剂和5 μL 100 mmol/L PMSF, 混匀。冰上保存数分钟待用。②每20 μL线粒体压积中, 加入200 μL上述配制好的冷Lysis Buffer2。③置于4 °C摇床平台上, 温和振荡15 min。④14 000 r/min, 4 °C离心15 min, 取上清为全蛋白提取物, 用缓冲液调整制备的大鼠肝线粒体浓度, 含线粒体蛋白0.5 g/L。用考马氏亮蓝法测定线粒体蛋白浓度。

线粒体细胞色素C氧化酶活性测定: 使用分光光度计法^[15], 具体过程为组织匀浆, 离心, 取上清, 在沉淀中加

入Wash Buffer重悬线粒体沉淀, 离心, 弃上清; 加入磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂混合物, 加入冷Lysis Buffer2; 离心, 取上清, 用考马氏亮蓝法测定线粒体蛋白浓度。离心收集的线粒体蛋白, 反复冻融3次, 使之成为线粒体膜片段以进行细胞色素C氧化酶活性测定。启动反应后, 用分光光度计测定1 min内550 nm处还原型细胞色素C吸光度值, 即细胞色素C氧化酶的活性。

主要观察指标: ①肝组织透射电镜下的结构改变及Flameng评分。②不同热缺血条件下大鼠肝细胞线粒体细胞色素C氧化酶活性。

统计学分析: 用 SPSS 17.0软件包, 所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较单因素方差分析(ANOVA)采用Games-Howell(A)检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 共60只SD大鼠参加实验, 全部进入结果分析, 中途无脱落。

2.2 肝组织透射电镜下的结构改变 透射电镜下可见: 对照组细胞核圆形, 居中, 核膜清晰, 核仁可见。线粒体结构正常, 充满颗粒(图1A)。以后随着热缺血时间的延长, 可见肝细胞胞质稀疏, 核膜多凹陷, 核质边聚, 线粒体肿胀, 基质颗粒丢失(图1B, C); 热缺血30 min组可见核膜不完整, 染色质浓缩, 线粒体肿胀, 基质透明(图1D); 热缺血40 min组可见肝细胞核形状不规则, 部分细胞

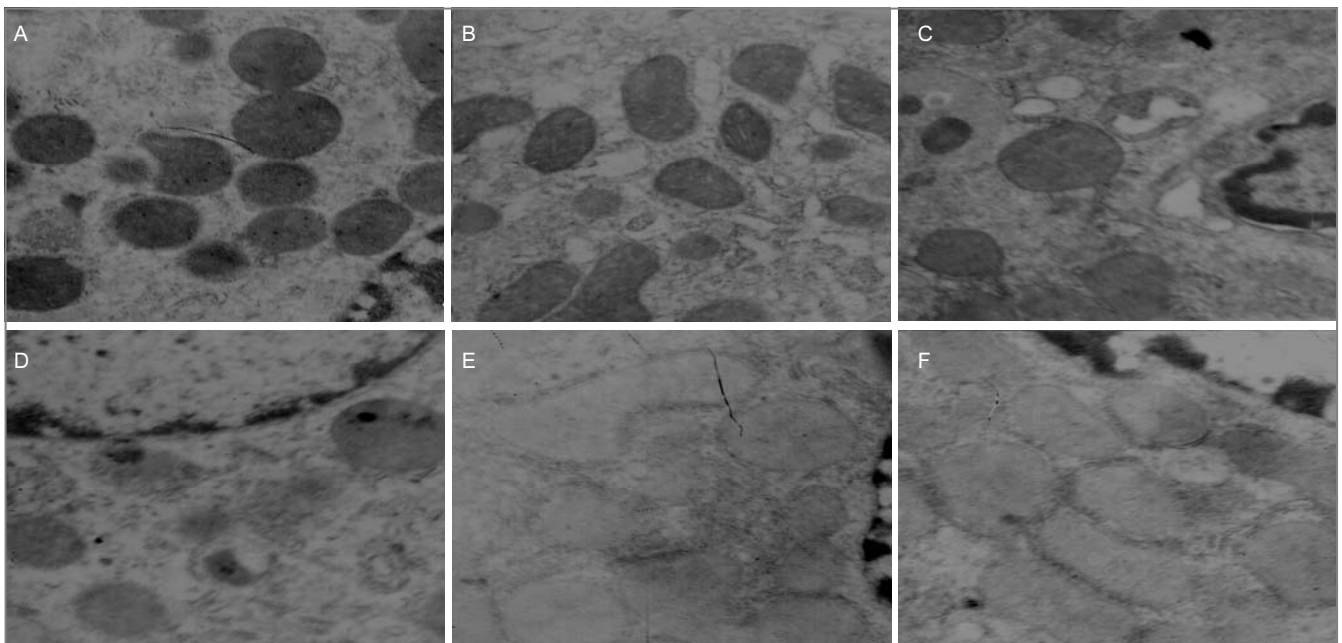


图1 透射电镜下观察肝组织的结构改变(×12 000)

Figure 1 Structural changes of liver tissues under transmission electron microscopy (×12 000)

图注: 图中A为对照组: 细胞核圆形, 居中, 核膜清晰, 核仁可见。线粒体结构正常, 充满颗粒; B为热缺血10 min组: 肝细胞胞质稀疏, 核膜多凹陷, 核质边聚, 线粒体肿胀, 基质颗粒丢失; C为热缺血20 min组: 肝细胞胞质稀疏, 线粒体肿胀, 基质颗粒丢失, 嵴未断裂; D为热缺血30 min组: 核膜不完整, 染色质浓缩, 线粒体肿胀, 基质透明; E为热缺血40 min组: 肝细胞核形状不规则, 部分细胞核固缩、凹陷, 成异形核, 线粒体基质凝固, 线粒体嵴断裂; F为热缺血50 min组: 可见细胞核染色质凝块状, 肝细胞内可见凋亡小体, 线粒体内外膜消失, 呈空泡状。

核固缩、凹陷, 成异形核, 线粒体基质凝固, 线粒体嵴断裂(图1E); 热缺血50 min组可见细胞核染色质凝块状, 肝细胞内可见凋亡小体, 线粒体内外膜消失, 呈空泡状(图1F)。

2.3 Flameng评分 从Flameng评分可知热缺血30 min内, 大部分线粒体评分在2分以内, 线粒体损伤程度较小。热缺血40 min组、50 min组评分分别达到3分和4分, 损伤较大, 呈不可逆损伤, 单因素方差分析可知热缺血40 min组、热缺血50 min组与其他组相比, 差异有显著性意义($P < 0.05$, 表1)。

表1 不同热缺血条件下大鼠肝细胞线粒体形态计量分析及肝细胞线粒体细胞色素C氧化酶活性

Table 1 Morphometric analysis of mitochondria and the viability of cytochrome C oxidase in liver tissues undergoing different warm ischemia time ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Flameng 评分	细胞色素C氧化酶活性(A)
对照组	10	0.158±0.043	5.52±0.075
热缺血 10 min 组	10	0.237±0.042	5.51±0.075
热缺血 20 min 组	10	1.167±0.217	5.40±0.089
热缺血 30 min 组	10	2.150±0.274	5.33±0.216
热缺血 40 min 组	10	3.383±0.366 ^a	4.18±0.232 ^b
热缺血 50 min 组	10	4.033±0.234 ^a	4.62±0.194 ^b

表注: ①热缺血30 min内, 大部分线粒体评分在2分以内, 线粒体损伤程度较小。热缺血40 min组、50 min组评分分别达到3分和4分, 损伤较大, 呈不可逆损伤。②细胞色素C氧化酶活性在对照组、热缺血10-30 min组均无明显改变, 热缺血40 min、热缺血50 min组细胞色素C氧化酶活性下降显著。热缺血40 min组、热缺血50 min组与其他组相比, ^a $P < 0.05$; 热缺血40 min组、热缺血50 min组与对照组相比, ^b $P < 0.05$ 。

2.4 肝组织线粒体细胞色素C氧化酶活性变化情况 随着热缺血时间的增加, 细胞色素C氧化酶的活性下降, 单因素方差分析可见细胞色素C氧化酶活性在对照组、热缺血10-30 min组均无明显改变, 热缺血40 min、50 min组活性下降显著, 差异有显著性意义($P < 0.05$, 表1)。

3 讨论 Discussion

全球首例肝移植成功施行以来, 肝移植手术成为目前终末期肝病的有效治疗手段^[16-17]。在过去的10年中, 等待移植的患者数量稳步增长, 而用于移植的器官数量却没有得到相应增加^[18-20]。由于供者的短缺, 限制了器官移植手术的大量开展, 同时也使相当一部分患者由于无法及时施救而在等待移植期间死亡^[21-22]。成熟的肝移植技术背后日益凸显出供肝的巨大短缺^[23], 活体肝移植、劈离式肝移植及辅助肝移植等随之应运而生^[24-25]。尽管肝移植初期的供肝均来自于DCD, 但鉴于DCD经历了较长的热缺血时间, 可能对供肝本身及肝移植受者近远期存活率造成不可忽视的影响^[26], 自1968年脑死亡概念引入后, DCD的应用逐渐减少, 并被脑死亡器官捐献(donation after brain death, DBD)所取代^[27]。国内目前尚未为脑死亡立法, DBD面临诸多法律难题, 故DCD仍是中国主要的供移植器官来源^[28]。美国2012年OPTN/UNOS的年度报告指出, 2011年DCD供

者占尸体移植的13%(1 053例), 是2000年的9倍(117例, 1.95%)^[29]。实际上, DCD供者已经成为各国重要的供器官来源。2010年3月, 中华人民共和国卫生部与中国红十字会共同启动了人体器官捐献试点工作, 截至2012年11月15日, 全国共完成器官捐献482例, 共捐献大器官1 300个。两年多来, DCD的数量稳定增长, 临床实践证明心脏死亡器官捐献是符合中国国情的, 是切实可行的^[1, 30-31]。

由于心脏死亡的供器官要经历热缺血、冷灌注及缺血再灌注损伤^[32], DCD供肝在肝移植后, 出现移植肝原发性无功能^[33]、肝动脉血栓形成、早期胆汁淤积、缺血性胆管狭窄和排斥反应等的概率远远大于脑死亡供肝^[34-39]。目前, 在器官保存和获取过程中尚无可以有效评估移植植物活力的标记物^[40-41], 用来预测术后移植植物功能, 临床医生判断移植植物是否适合移植主要通过观察器官质地与灌注时的效果来评估, 在移植植物表面出现斑点或灌注不均匀时, 则通常舍弃不用^[42]。对于DCD器官移植来说, 由于移植术后发生功能障碍和原发性无功能的风险较大, 更应准确评估, 在保证移植效果的前提下提高器官利用率^[43]。DCD作为主要的器官来源, 如何才能很好的把握控制供者器官的功能活性, 使移植植物达到最佳功能状态是器官移植目前研究的重点方向之一^[44], 用于评估DCD器官功能的定性指标, 对于判断DCD器官的可利用性非常重要^[45-46]。

电子显微镜是观察线粒体膜电位, ATP生成以及微环境改变的良好技术^[47-48]。本研究显示, 随着热缺血时间延长, 肝细胞核肿胀程度加重, 核膜破裂逐渐加重, 线粒体逐渐肿胀。热缺血30 min内核膜比较完整, 无细胞自溶, 线粒体基质透明, 线粒体嵴未断裂, 大部分线粒体Flameng评分为2分, 细胞是处于可复性阶段。热缺血40 min组部分肝细胞发生不可逆变化, 如染色质边集、核碎裂和核溶解, 部分肝细胞发生凋亡, 线粒体肿胀程度加重, 线粒体基质凝固, 嵴断裂, 大部分线粒体Flameng评分为3分。热缺血50 min时, 肝细胞染色体边集, 出现凋亡小体, 线粒体内外膜消失, 呈空泡状, 大部分线粒体Flameng评分为4分。从肝脏线粒体形态可见, 30 min以上的热缺血损伤对供肝影响较大。细胞色素C氧化酶是线粒体内的关键酶^[49-50], 是细胞活力状态和损伤程度的指示剂^[51-52]。本研究显示, 随着热缺血时间延长, 细胞色素C氧化酶活性下降, 在30 min热缺血时间内, 细胞色素C氧化酶活性差异无显著性意义, 30 min以后细胞色素C氧化酶活性明显下降, 与对照组相比, 差异有显著性意义。因此, 从线粒体功能来看, 30 min以内热缺血损伤对大鼠心脏死亡供肝功能影响较小。

研究表明, 细胞色素C从线粒体释放至细胞质是引发凋亡的重要途径^[53-55]。细胞色素氧化酶除了与肝脏能量代谢有关外, 还通过凋亡途径影响肝脏活性^[56-57]。本研究表明, 热缺血损伤可以改变线粒体外膜通透性, 使线粒体肿胀, 促进凋亡小体形成, 加重肝脏细胞凋亡。研究表明, 热缺血短时间内胞质细胞色素C水平的升高, 早于DNA片段化

的达峰时间^[58-60]。因此, 细胞色素C从线粒体至胞质的移位是与暂时性缺血细胞凋亡的引发相对应的^[61-62]。在局部缺血啮齿类动物中检测细胞色素C氧化酶与细胞凋亡的生化及形态特征如胞质皱缩, 染色质固缩和DNA片段化相关^[63]。

DCD肝移植热缺血再灌注损伤是一个连续发展的病理生理过程^[64-67], 单纯热缺血损伤是这一过程的基础和始动环节, 冷保存期间^[68-69]、手术缺血期及再灌注过程还会进一步损伤供肝活性^[70-73]。能够显示供肝在冷保存期间及再灌注过程中功能损伤程度的活性指标, 以及这些指标综合利用来更好地反映DCD供肝质量等问题仍需要进一步研究^[74-76]。

致谢: 感谢中国医科大学普通外科实验室的大力帮助。

作者贡献: 实验设计为第一作者, 实验实施为第一、二作者, 评估为第三、四作者, 均经过正规科研培训。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 细胞色素C氧化酶-是一种氧化还原酶, 存在于细菌或线粒体上的大型跨膜蛋白复合物。细胞色素氧化酶是呼吸电子传递链的第四个中心酶复合物, 又被称为复合物IV。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 刘永锋. 心脏死亡供者器官评估及体外修复[J]. 中华器官移植杂志, 2010, 31(7): 393-396.
- [2] 邓永林, 沈中阳. 我国心脏死亡器官捐献的现状 & 影响因素[J]. 中华外科杂志, 2012, 50(8): 673-674.
- [3] 董权, 李超, 王胤佳, 等. 中国实行心脏死亡器官捐献供体的可行性分析[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2012, 19(5): 498-501.
- [4] 尹志科, 严谨. 心脏死亡器官捐献的困境及对策[J]. 医学与哲学, 2012, 33(1): 28-29, 32.
- [5] 刘永锋. 心脏死亡供者器官评估及体外修复[J]. 中华器官移植杂志, 2010, 31(7): 393-396.
- [6] 杨春华, 陈雪霞, 谢文锋, 等. 器官捐献与供体维护[J]. 新医学, 2013, 44(6): 363-365.
- [7] 门贺伟, 蔡金贞. 心脏死亡供肝热缺血-损伤的研究进展[J]. 国际移植与血液净化杂志, 2011, 9(4): 8-12.
- [8] 刘学民, 王博, 于良, 等. 心脏死亡供体经典原位肝移植的单中心临床研究[J]. 器官移植, 2013, 4(1): 23-27.
- [9] 王毅, 赵闻雨, 朱有华. 心脏死亡供肾评估和保存的现状 & 进展[J]. 中华器官移植杂志, 2011, 32(8): 510-512.
- [10] Hill DJ, Evans DW, Gresham GA. Availability of cadaver organs for transplantation. BMJ. 1991; 303(6797): 312.
- [11] 骆助林, 权毅, 潘显明, 等. 外科缺血再灌注过程中的线粒体损伤[J]. 西南军医, 2008, 10(4): 113-114.
- [12] 姜斌, 朱有华. 线粒体靶向小分子多肽减轻供者器官缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 中华器官移植杂志, 2011, 32(5): 314-316.
- [13] 林杰, 何飞, 吴林熹, 等. 线粒体途径在缺血后处理减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤作用中的机制研究[J]. 中华器官移植杂志, 2012, 33(10): 624-628.
- [14] Flameng W, Borgers M, Daenen W, et al. Ultrastructural and cytochemical correlates of myocardial protection by cardiac hypothermia in man. J Thorac Cardiovasc Surg. 1980; 79(3): 413-424.
- [15] 王苏华, 张薇, 邢光伟, 等. 细胞色素C氧化酶活力测定方法概况[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(5): 412-414.
- [16] 薛亮, 郑树森. 活体肝移植术后胆道并发症一例[J]. 中华移植杂志(电子版), 2013, 7(1): 36-38.
- [17] Pompili M, Francica G, Ponziani FR, et al. Bridging and downstaging treatments for hepatocellular carcinoma in patients on the waiting list for liver transplantation. World J Gastroenterol. 2013; 19(43): 7515-7530.
- [18] Martínez-Alarcón L, Ríos A, Ramis G, et al. Factor Analysis of Sources of Information on Organ Donation and Transplantation in Journalism Students. Transplant Proc. 2013; 45(10): 3579-3581.
- [19] Lee Cheah Y, K H Chow P. Liver Transplantation for Hepatocellular Carcinoma: An Appraisal of Current Controversies. Liver Cancer. 2012; 1(3-4): 183-189.
- [20] Yoo PS, Umman V, Rodriguez-Davalos MI, et al. Retransplantation of the liver: review of current literature for decision making and technical considerations. Transplant Proc. 2013; 45(3): 854-859.
- [21] Reddy MS, Varghese J, Venkataraman J, et al. Matching donor to recipient in liver transplantation: Relevance in clinical practice. World J Hepatol. 2013; 5(11): 603-611.
- [22] Singal AK, Chaha KS, Rasheed K, et al. Liver transplantation in alcoholic liver disease current status and controversies. World J Gastroenterol. 2013; 19(36): 5953-5963.
- [23] Jones PD, Hayashi PH, Barritt S 4th. Liver transplantation in 2013: challenges and controversies. Minerva Gastroenterol Dietol. 2013; 59(2): 117-131.
- [24] 俞栋栋, 周琳, 郑树森. 肝移植临床可操作性耐受的研究现状及展望[J]. 中华移植杂志(电子版), 2013, 7(2): 103-107.
- [25] 周健, 胡安斌, 何晓顺. 在体劈离式肝移植的外科技术进展[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(40): 3241-3243.
- [26] Neyrinck A, Van Raemdonck D, Monbaliu D. Donation after circulatory death: current status. Curr Opin Anaesthesiol. 2013; 26(3): 382-390.
- [27] Siminoff LA, Agyemang AA, Traino HM. Consent to organ donation: a review. Prog Transplant. 2013; 23(1): 99-104.
- [28] 丁义涛. 心脏死亡供者肝移植的现状 & 展望[J]. 中华器官移植杂志, 2013, 34(1): 1-4.
- [29] Ohe H, Hoshino J, Ozawa M. Factors affecting outcomes of liver transplantation: an analysis of OPTN/UNOS database. Clin Transpl. 2011: 39-53.
- [30] 沈中阳. 供肝短缺背景下我国肝癌患者肝移植的策略[J]. 中华器官移植杂志, 2013, 34(9): 513-515.
- [31] 黄洁夫. 创建符合中国国情的器官捐献与移植体系[J]. 中华外科杂志, 2013, 51(1): 1-3.
- [32] Wertheim JA, Petrowsky H, Saab S, et al. Major challenges limiting liver transplantation in the United States. Am J Transplant. 2011; 11(9): 1773-1784.
- [33] Farmer DG, Amersi F, Kupiec-Weglinski J, et al. Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver. Transplantation Reviews. 2000; 14(2): 106-126.
- [34] Reich DJ, Munoz SJ, Rothstein KD, et al. Controlled non-heart-beating donor liver transplantation: a successful single center experience, with topic update. Transplantation. 2000; 70(8): 1159-1166.

- [35] Abt P, Crawford M, Desai N, et al. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors: an increased incidence of biliary complications. *Transplantation*. 2003;75(10):1659-1663.
- [36] Baldwin WM 3rd, Larsen CP, Fairchild RL. Innate immune responses to transplants: a significant variable with cadaver donors. *Immunity*. 2001;14(4):369-376.
- [37] Halloran PF, Autenried P, Ramassar V, et al. Local T cell responses induce widespread MHC expression. Evidence that IFN-gamma induces its own expression in remote sites. *J Immunol*. 1992;148(12):3837-3846.
- [38] Weiser MR, Williams JP, Moore FD Jr, et al. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *J Exp Med*. 1996;183(5):2343-2348.
- [39] Weisman HF, Bartow T, Leppo MK, et al. Soluble human complement receptor type 1: in vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science*. 1990;249(4965):146-151.
- [40] Sun X, Kimura T, Kobayashi T, et al. Viability of liver grafts from fasted donor rats: relationship to sinusoidal endothelial cell apoptosis. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2001;8(3):268-273.
- [41] Noormohamed MS, Kanwar A, Ray C, et al. Extracorporeal membrane oxygenation for resuscitation of deceased cardiac donor livers for hepatocyte isolation. *J Surg Res*. 2013;183(2):e39-48.
- [42] Taylor MJ, Baicu SC. Current state of hypothermic machine perfusion preservation of organs: The clinical perspective. *Cryobiology*. 2010;60(3 Suppl):S20-35.
- [43] Domínguez-Gil B, Haase-Kromwijk B, Van Leiden H, et al. Current situation of donation after circulatory death in European countries. *Transpl Int*. 2011;24(7):676-686.
- [44] 杨春华, 陈雪霞, 谢文锋, 等. 器官捐献与供体维护[J]. *新医学*, 2013, 44(6):363-365.
- [45] 候萍, 李剑平. 器官移植前保存的理论研究与临床应用[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(5):895-898.
- [46] Shen XD, Ke B, Uchida Y, et al. Native macrophages genetically modified to express heme oxygenase 1 protect rat liver transplants from ischemia/reperfusion injury. *Liver Transpl*. 2011;17(2):201-210.
- [47] 张静, 李胜兰, 吴媛, 等. 定位在线粒体的肝刺激因子对线粒体膜电势的影响[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2013, 22(2):89-94.
- [48] 何晓顺, 马毅, 陈规划, 等. 大鼠肝脏热缺血损伤后组织学与超微结构变化的动态观察[J]. *中华实验外科杂志*, 2002, 19(3):249-251.
- [49] Khalimonchuk O, Bird A, Winge DR. Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*. 2007;282(24):17442-17449.
- [50] Srinivasan S, Avadhani NG. Cytochrome c oxidase dysfunction in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2012;53(6):1252-1263.
- [51] 李保良, 赵晓山, 罗仁, 等. 亚健康疲劳状态时血清对骨骼肌细胞线粒体膜细胞色素C氧化酶活性和线粒体能量负荷的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2008, 12(37):7258-7262.
- [52] Yoshikawa S, Muramoto K, Shinzawa-Itoh K. Reaction mechanism of mammalian mitochondrial cytochrome c oxidase. *Adv Exp Med Biol*. 2012;748:215-236.
- [53] Liu X, Kim CN, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. 1996;86(1):147-157.
- [54] Ferraro E, Corvaro M, Cecconi F. Physiological and pathological roles of Apat1 and the apoptosome. *J Cell Mol Med*. 2003;7(1):21-34.
- [55] 杨栋, 余时沧. 线粒体DNA损伤与细胞凋亡[J]. *标记免疫分析与临床*, 2013, 20(5):325-328.
- [56] 兰春慧, 房殿春, 樊丽琳, 等. 线粒体损伤在幽门螺杆菌诱导胃癌细胞凋亡中的作用[J]. *中华内科杂志*, 2005, 44(10):748-750.
- [57] 李云, 刘菲. 线粒体与细胞凋亡的研究进展[J]. *中国实用眼科杂志*, 2013, 31(8):957-960.
- [58] 闫鹏, 吕刚, 胡萌, 等. 细胞色素C释放与Caspase-3表达在脊髓损伤后神经元细胞凋亡过程中的作用[J]. *山东医药*, 2009, 49(52):46-48.
- [59] 史洪涛, 李陶, 陈东风, 等. 线粒体-细胞色素C途径在非酒精性脂肪肝大鼠肝细胞凋亡中的作用[J]. *重庆医学*, 2007, 36(8):701-703.
- [60] 黄卡特, 吴秀玲, 黄海霞, 等. 细胞色素C在急性肝衰竭大鼠中的蛋白表达变化及其意义[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(17):2826-2828.
- [61] Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, et al. Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998;18(11):1239-1247.
- [62] Monian P, Jiang X. Clearing the final hurdles to mitochondrial apoptosis: regulation post cytochrome C release. *Exp Oncol*. 2012;34(3):185-191.
- [63] Choi DW. Ischemia-induced neuronal apoptosis. *Curr Opin Neurobiol*. 1996;6(5):667-672.
- [64] 王楠, 马庆久, 鲁建国, 等. 缺血后处理对大鼠移植肝缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中华外科杂志*, 2005, 43(23):1533-1536.
- [65] 彭勇, 刘作金, 龚建平, 等. Kupffer细胞CD14及Toll样受体4介导大鼠肝移植缺血再灌注损伤的机制[J]. *中华外科杂志*, 2005, 43(5):274-276.
- [66] 吴勤荣, 时军, 王永刚. 细胞凋亡与肝移植缺血再灌注损伤[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(18):3371-3375.
- [67] 刘现忠, 姚爱华, 仲跻巍, 等. 缺血预处理对大鼠减体积肝移植缺血再灌注损伤的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2007, 17(19):2313-2317.
- [68] 张雷达, 王曙光, 李晓武, 等. 冷保存对肝移植术后肝内胆管微循环的影响[J]. *中华外科杂志*, 2007, 45(5):339-343.
- [69] 崔东旭, 尹剑桥, 柴芳, 等. 不同胆道灌洗液对肝移植供体胆道冷保存损伤的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2007, 11(38):7556-7560.
- [70] 马毅, 何晓顺. 肝脏移植热缺血损伤的研究进展[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2001, 7(8):508-510.
- [71] 徐根云, 吕国才, 陈瑜, 等. 血清对氧磷酯酶1活性监测在肝移植术中的意义[J]. *中华检验医学杂志*, 2004, 27(8):493-495.
- [72] 池萍, 卢实春, 王孟龙, 等. 肝移植手术中心血管活性物质对血流动力学和肾功能的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2009, 25(9):741-744.
- [73] 宋丽洁, 姚桂玲, 刘煜, 等. 亲体肝移植患者围手术期止血与凝血指标的变化[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(31):5737-5740.
- [74] 孙强, 余元龙, 胡泽民, 等. 心脏死亡供体热缺血再灌注损伤对肝内胆道微循环影响的实验研究[J]. *中华普通外科杂志*, 2009, 24(4):333-334.
- [75] 邵强, 何晓顺, 王东平, 等. 心脏死亡器官捐献供者应用血管活性药物对供肝质量及肝移植受者的影响[J]. *中华器官移植杂志*, 2013, 34(7):411-414.
- [76] Campbell P. Clinical relevance of human leukocyte antigen antibodies in liver, heart, lung and intestine transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2013;18(4):463-469.