

## · 论著 ·

## 乌司他丁对肝脏冷保存损伤的保护作用研究

洪勇 古维立 曹杰 夏杰

**【摘要】** 目的 探讨乌司他丁对肝脏冷保存是否具有保护作用及其可能的机制。方法 采用大鼠肝脏单纯冷保存离体灌注模型,用 UW 液中加入乌司他丁冷保存鼠肝(实验组),同时设单纯 UW 液保存对照组。收集不同保存时间点(0、12 和 24 h)肝脏灌洗液,检测反映肝细胞功能的丙氨酸转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)水平;取肝组织标本,检测反映中性粒细胞聚集性的髓过氧化物酶(MPO)以及反映细胞氧化性损伤的氧自由基代谢产物丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD);在光镜和电镜下观察肝组织病理学变化。结果 在 12 h 和 24 h 保存时间点,实验组灌洗液中 ALT 和 LDH 以及肝组织中 MDA 和 MPO 均明显低于对照组,且 ALT、LDH、MDA 和 MPO 水平均随保存时间延长而增高( $P < 0.01$ );实验组 SOD 则明显高于对照组,且随时间延长而降低( $P < 0.01$ )。实验组肝组织病理学改变明显轻于对照组。结论 ①UW 冷保存液对肝脏的冷保存有随时间延长其保护作用逐渐减弱的趋势。②UW 液中加入乌司他丁对肝脏冷保存损伤具有保护作用,其机制与乌司他丁抑制中性粒细胞聚集、抗氧化损伤及膜稳定剂作用等有关。

**【关键词】** 乌司他丁; 肝移植; 冷保存损伤; 保护作用

**Protection against liver injuries induced by low-temperature preservation with ulinastatin** HONG Yong\*, GU Wei-li, CAO Jie, XIA Jie. \*Department of Hepatobiliary Surgery, Nanxishan Hospital, Guilin Medical College, Guilin 541002, Guangxi, China

**【Abstract】** **Objective** To study whether ulinastatin has a protective role in cold preservation of liver and its mechanism. **Methods** To study the role of ulinastatin in protection of liver after cold preservation, the isolated rat liver with perfused either with cold perfusion fluid or perfused with cold perfusion fluid with ulinastatin. Liver tissue was harvested at 0, 12 and 24 hours after cold perfusion, and morphological changes were examined, alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), thoperoxidase (MPO), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase(SOD) contents were also determined. **Results** ALT, LDH, MPO and MDA contents were significantly lower in ulinastatin group than those in the control group at 12 and 24 hours, and levels of ALT, LDH, MDA and MPO were increased along with prolongation of preservation time(all  $P < 0.01$ ), but SOD was higher in ulinastatin group than the control group and it was increased along with the prolongation of time (all  $P < 0.01$ ). Compared with ulinastatin group, the control group showed obvious pathological changes. **Conclusion** Protective effect of UW solution used in clinic weakens gradually as cold preservation time is prolonged. Ulinastatin has protective effect on liver against cold preservation injury, and its effect is better than the simple UW solution. Its mechanism is related to inhibition of anti-oxidation and aggregation neutrophil's accumulation effect of ulinastatin.

**【Key words】** ulinastatin; liver transplantation; cold preservation injury; protection

成功的肝移植很大程度上依赖于安全有效的供肝保存。1986 年, Belzer 等研制出供肝保存液 UW 液,使肝移植取得了突破性进展,但是肝脏保存液并未停留在 UW 液水平,如何进一步提高保存质量仍为国内外学者研究的热点。能否有效保存供体肝脏,目前仍是影响肝移植成功的主要因素之一。据报道,由于肝脏保存时的损伤,大约有 15%~30%的供肝

存在肝功能不全或原发肝脏无功能<sup>[1]</sup>,其发生的原因错综复杂,但与供肝冷保存再灌注损伤极为密切<sup>[2]</sup>。乌司他丁是一种具有多种生物效应的蛋白酶抑制剂,研究大鼠全肝缺血/再灌注(I/R)模型发现,用乌司他丁预处理对肝脏结构和功能损伤有明显的保护作用<sup>[3]</sup>。但 UW 液中加入乌司他丁,对器官低温保存再灌注损伤有无保护作用及其机制尚未见报道。本研究在低温保存模型上研究乌司他丁对肝脏低温保存损伤的保护作用及其可能机制,为乌司他丁应用于临床提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与分组:** 选用雄性 SD 大鼠 60 只,体重 200~240 g,由广州医学院实验动物中心提供,按随机数字表法均分为对照组(UW 液中不加入乌司

基金项目:广东省医学科研立项课题(A2006506);广州市医药卫生科技立项课题(2005-YB-006)

作者单位:541002 广西桂林,桂林医学院附属南溪山医院肝胆外科(洪勇);510182 广东广州,广州医学院附属广州市第一人民医院(古维立,曹杰,夏杰)

作者简介:洪勇(1971-),男(汉族),江西省人,医学硕士,主治医师(E-mail:hongyong0001@126.com)。

他丁)和实验组[UW 液中加入乌司他丁 1 MU/L (广东天普生物制药公司提供)],两组再分为 0、12 和 24 h 保存时限。

**1.2 动物模型建立:**用大鼠肝脏单纯冷保存离体灌注模型,大鼠术前 12 h 禁食、不禁水,称重,乙醚麻醉后,腹部弧形切口进腹,分离左右三角韧带及镰状韧带,结扎左膈静脉,结扎并离断肝动脉,游离出门静脉,经阴茎背静脉注入肝素(100 U/kg),然后经门静脉插管并持续灌注 4 ℃ 的保存液,行供肝原位低压重力灌注[灌注量 15 ml,灌注压 10 cm H<sub>2</sub>O (1 cm H<sub>2</sub>O=0.098 kPa),速度为 10 ml/min],同时剪开肝下腔静脉,边灌注边放血,至肝颜色变淡呈均匀土黄色,再切取供肝置于 4 ℃ 的保存液中。保存结束后,采用非循环灌注,经门静脉置管恒温 37 ℃ 再灌注 Krebs-Henseleit 液 30 min,调定灌注压为 10 cm H<sub>2</sub>O,灌注量为 15 ml/min,再灌注过程中,以 2 L/min 向灌注液中持续通入体积分数为 95% 的 O<sub>2</sub> 与 5% 的 CO<sub>2</sub> 混合气体,并向灌注液中加入新鲜人洗涤红细胞(血细胞比容为 0.15)。

**1.3 灌注液和肝组织标本采集:**离体灌注最后 2 min,收集灌注液 3 ml,即刻以 3 000 r/min (离心半径 8 cm)离心 5 min 后取上清液,备检肝脏灌注液中丙氨酸转氨酶(ALT)和乳酸脱氢酶(LDH)。同时取肝组织 2 g 左右,放入 -80 ℃ 低温冰箱保存备检丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和髓过氧化物酶(MPO)。光镜下观察:取保存 24 h 再灌注肝左叶组织标本,用体积分数为 10% 的中性甲醛固定,制成蜡块后作病理切片,进行苏木素-伊红(HE)染色。电镜检查:取保存 24 h 再灌注肝组织 1 mm<sup>3</sup> 固定于体积分数为 2.5% 的戊二醛固定后立即送检(广州医学院电镜室协助完成)。

**1.4 检测指标及方法:**肝功能采用全自动生化分析仪测定;MDA 采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定;SOD 采用黄嘌呤氧化酶法测定;MPO 采用依赖

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应产物比色法测定,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

**1.5 统计学方法:**数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 灌注液中酶学指标测定结果(表 1):**在保存初始,两组灌注液中 ALT 及 LDH 比较差异均无显著性( $P$  均  $> 0.05$ );在 12 h 和 24 h 保存时限实验组灌注液中 ALT 及 LDH 明显低于对照组,差异有显著性( $P$  均  $< 0.01$ )。两组灌注液中 ALT 及 LDH 含量随保存时间延长而增高,与前一时间点比较差异均有显著性( $P$  均  $< 0.01$ )。

**2.2 肝组织中 MDA、SOD 和 MPO 含量测定结果(表 1):**在保存初始,两组肝组织中 MDA、SOD 和 MPO 含量比较差异均无显著性( $P$  均  $> 0.05$ );两组 MDA 和 MPO 含量随保存时间延长而增高,而 SOD 则减少( $P$  均  $< 0.01$ )。实验组 12 h 和 24 h 肝组织中 MDA 和 MPO 明显低于对照组,SOD 则明显高于对照组,差异均有显著性( $P$  均  $< 0.01$ )。

**2.3 组织病理学观察结果:**光镜下可见实验组肝窦、肝细胞索结构清晰,肝轻度肿胀,无细胞坏死;对照组肝细胞肿胀、水样变性明显,少量点状、灶状肝细胞坏死,网状纤维支架有塌陷,并伴有瘀血和炎性细胞浸润(彩色插页图 1,图 2)。电镜下可见实验组肝细胞水肿,且伴有线粒体的异常,呈现线粒体轻度肿大,嵴变短,数目减少,滑面内质网轻度扩张;对照组细胞水肿明显加重,可见线粒体肿胀,滑面内质网扩张明显,细胞核体积缩小,染色质凝集成块并聚集于细胞核边缘形成环状(彩色插页图 3,图 4)。

## 3 讨论

大量肝移植模型虽然可用来评价保存液对供肝保存的效果,但较为复杂,本实验所采用的大鼠离体肝低温保存模型方法较为简单易行,是进行器官保存液研究的理想模型<sup>[4]</sup>。目前认为,在冷保存期间影

表 1 两组不同时间点灌注液中 ALT、LDH 及肝组织中 MDA、SOD 和 MPO 含量的比较( $\bar{x} \pm s, n=30$ )

Table 1 Comparison of the content of ALT, LDH in irrigating solution, and MDA, SOD and MPO in liver tissue at different time points between two groups( $\bar{x} \pm s, n=30$ )

时间	组别	ALT(U/L)	LDH(U/L)	MDA(nmol/mg)	SOD(kU/mg)	MPO(nmol/mg)
0 h	对照组	29.00 ± 6.83	176.10 ± 35.77	0.36 ± 0.01	2.80 ± 0.12	0.23 ± 0.01
	实验组	29.10 ± 7.25	182.70 ± 38.12	0.36 ± 0.01	2.80 ± 0.14	0.22 ± 0.01
12 h	对照组	103.90 ± 28.72 <sup>△</sup>	791.20 ± 223.20 <sup>△</sup>	1.29 ± 0.08 <sup>△</sup>	1.04 ± 0.15 <sup>△</sup>	0.76 ± 0.03 <sup>△</sup>
	实验组	56.70 ± 22.64* <sup>△</sup>	326.10 ± 60.13* <sup>△</sup>	0.81 ± 0.06* <sup>△</sup>	1.79 ± 0.08* <sup>△</sup>	0.32 ± 0.02* <sup>△</sup>
24 h	对照组	154.50 ± 37.61 <sup>△</sup>	1128.00 ± 288.50 <sup>△</sup>	1.92 ± 0.29 <sup>△</sup>	0.70 ± 0.03 <sup>△</sup>	1.19 ± 0.05 <sup>△</sup>
	实验组	91.70 ± 31.29* <sup>△</sup>	521.80 ± 176.17* <sup>△</sup>	1.20 ± 0.54* <sup>△</sup>	0.92 ± 0.04* <sup>△</sup>	0.80 ± 0.04* <sup>△</sup>

注:与对照组比较:\* $P < 0.01$ ;与本组前一时间点比较:<sup>△</sup> $P < 0.01$

响供肝功能的主要因素为再灌注损伤、细胞水肿、溶酶体酶释放等<sup>[5]</sup>。其中保存过程中再灌注损伤尤为重要,如何防治保存过程中再灌注损伤日益得到重视。移植肝脏自供者切取冷保存后,就开始受冷缺血损伤,移植肝恢复血流后,又遭受再灌注损伤,二者关系密切,不可分割。再灌注损伤与再灌注本身无关,而与器官保存时间长短以及保存损伤程度有关,也就是说肝脏的冷保存损伤在再灌注时就表现出来了。目前认为,肝脏保存过程中再灌注损伤的机制为:由活化的库普弗细胞释放大量的氧自由基和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1(IL-1)等细胞因子,对肝细胞造成直接的损害;另一方面是由中性粒细胞介导的损伤,即中性粒细胞激活释放的弹性蛋白酶、组织蛋白酶 G、肝素酶、胶原酶和水化酶等都对肝细胞有直接损害作用<sup>[6]</sup>。

MPO 是存在于中性粒细胞内的一种耐高温酶,它是中性粒细胞在组织中浸润程度的指标,在 I/R 时组织中 MPO 活性增强,其活性与中性粒细胞在组织中浸润程度成正比<sup>[7]</sup>。脂质过氧化物最后裂解终产物 MDA 是目前公认的能反映氧自由基产生及引发脂质过氧化反应的间接指标,其含量变化不仅可反映体内氧自由基生成与否及脂质过氧化反应强烈程度,尚可反映其造成组织损伤的严重程度<sup>[8]</sup>。内源性清除氧自由基物质 SOD 活性可准确反映体内氧自由基量,为了解中性粒细胞在肝组织中的浸润程度,在本实验中测定了 MPO 活性,并测定 MDA 和内源性清除氧自由基物质 SOD 活性来研究乌司他丁对抗氧自由基损伤的作用。

目前仍缺乏保护肝脏冷保存的药物。虽然 UW 液是已研制出的一种最为成功的长效多器官保存液,但肝脏保存液并未停留在 UW 液水平,如何进一步提高 UW 液的保存效果仍为国内外学者研究的热点。本实验结果证明,在用 UW 液冷保存肝脏过程中加入乌司他丁后,其肝脏生化指标、组织形态学指标均优于单用 UW 液,同时发现 MDA 升高和 SOD 降低,表明脂质过氧化可能参与了冷保存损害过程;MPO 的升高表明,肝脏保存再灌注后聚集在肝组织中的中性粒细胞与肝细胞受损有关,可能参与了冷保存损害过程。

乌司他丁是从人尿中提取精制的一种蛋白水解

酶抑制剂,能有效、广谱地抑制多种蛋白酶,同时还能抑制炎症因子释放,保护机体重要脏器的功能,在临床上得到普遍应用<sup>[9,10]</sup>。本实验证实,乌司他丁对大鼠供肝冷保存损伤的保护作用机制可能与其抑制中性粒细胞浸润,进而减轻中性粒细胞造成的蛋白水解酶释放、抑制炎症介质释放、预防细胞因子级联反应的作用有关;另一方面,作为一种膜稳定剂,它能抑制氧自由基生成,清除氧自由基,从而增加肝细胞膜及溶酶体、线粒体、内质网等细胞器的稳定性,减轻氧自由基引起的损伤。通过增加线粒体的稳定性,改善因冷保存时缺氧导致的能量代谢障碍。

综上所述,临床上常规使用的 UW 冷保存液对肝脏冷保存的保护作用随时间延长逐渐减弱;而加用乌司他丁的 UW 液对大鼠肝脏冷保存损伤有保护作用,能延缓 UW 液保护作用随时间延长逐渐减弱的趋势,其机制与乌司他丁的膜稳定及抗氧化性损伤作用有关。能否将乌司他丁作为一种常用药物用于临床肝脏的冷保存值得进一步研究。

#### 参考文献:

- 1 Decker K. Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells)[J]. Eur J Biochem, 1990, 192(2): 245-261.
- 2 Sun B, Jiang H C, Piao D X, et al. Effects of cold preservation and warm reperfusion on rat fatty liver[J]. World J Gastroenterol, 2000, 6(2): 271-274.
- 3 杨广运, 徐克森. UTI 和丹参在鼠肝脏缺血再灌注中对肝窦内皮细胞损伤保护效应的实验研究[J]. 中国现代普通外科进展, 2005, 8(1): 31-33.
- 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): 1-3.
- 5 赵浩亮, 裘法祖. 肝脏低温保存再灌注损伤的细胞分子机理[J]. 中华肝胆外科杂志, 2000, 6(4): 313-315.
- 6 Peralta C, Prats N, Xaus C, et al. Protective effect of liver ischemic preconditioning on liver and lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion in the rat[J]. Hepatology, 1999, 30(6): 1481-1489.
- 7 王刚, 陈婷婷, 高长青. 乌司他丁对创伤失血性休克兔肺损伤的保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(1): 36-38.
- 8 王万铁, 徐正衿, 林丽娜, 等. 心肌缺血再灌注损伤时 MAP 与 MDA 的相关分析[J]. 温州医学院学报, 1997, 27(1): 76-78.
- 9 王晓琳, 张宏, 刘荣, 等. 乌司他丁对肝缺血/再灌注后急性肺损伤的保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15(7): 432-434.
- 10 邵义明, 张良清, 邓烈华, 等. 乌司他丁对全身炎症反应综合征的治疗作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(4): 228-230.

(收稿日期: 2006-11-09 修回日期: 2007-06-14)

(本文编辑: 李银平)

更正: 由于校对失误, 本刊 2007 年第 6 期第 369 页李慧医生的文章《地塞米松对大鼠脑水通道蛋白 4 表达的影响》中第二作者应为孙圣刚。特此更正, 并向作者致歉。

(本刊编辑部)

## 乌司他丁对肝脏冷保存损伤的保护作用研究

(正文见398页)

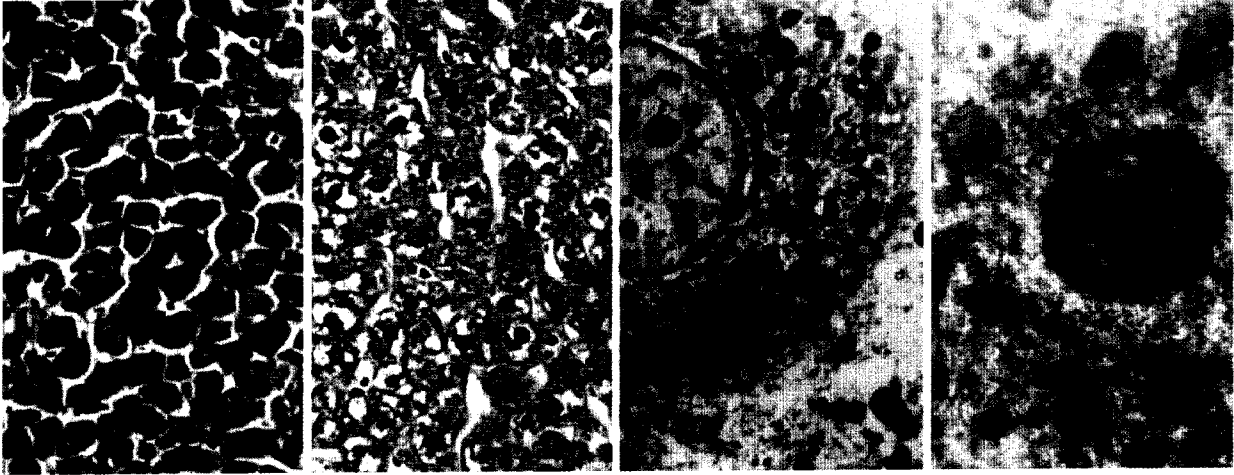


图1 实验组肝组织病理学变化 (HE, × 400)

Figure 1 Pathological change of liver tissues in test group(HE, × 400)

图2 对照组肝组织病理学变化 (HE, × 400)

Figure 2 Pathological change of liver tissues in control group (HE, × 400)

图3 实验组电镜下肝超微结构 (TEM, × 10 000)

Figure 3 Ultrastructure of liver tissues in test group(TEM, × 10 000)

图4 对照组电镜下肝超微结构 (TEM, × 10 000)

Figure 4 Ultrastructure of liver tissues in control group (TEM, × 10 000)

## 骨髓间充质干细胞移植对心肌梗死后心功能的影响

(正文见428页)

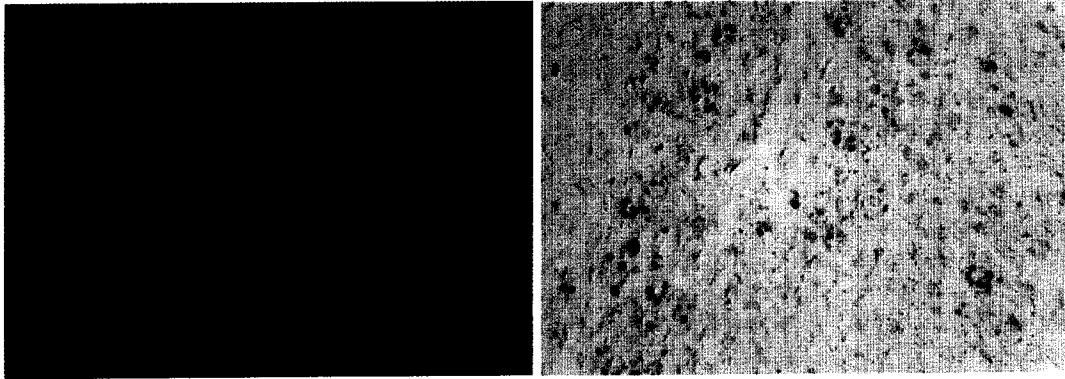


图1 体外原代培养的MSCs(× 100)

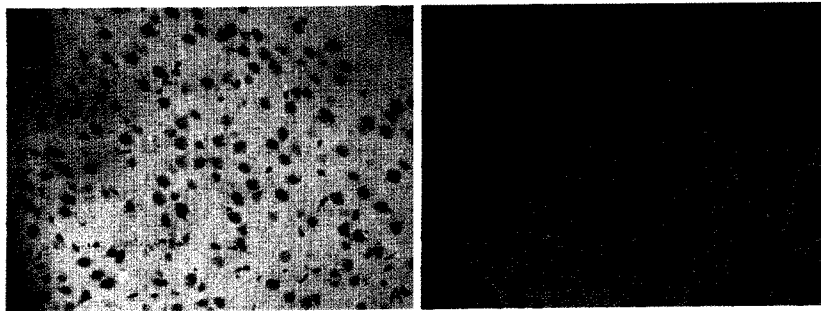
Figure 1 Primary culture of MSCs in vitro (× 100)

图2 MSCs组心肌细胞阳性表达(免疫组化, × 400)

Figure 2 Positive expression of cardiac muscle cell in MSCs labeled with BrdU (immunohistochemistry, × 400)

## 大鼠局灶性脑缺血/再灌注损伤后早期生长反应基因-1 mRNA的表达

(正文见436页)



A:假手术组; B:I/R组2 h

图1 各组脑组织Egr-1mRNA阳性表达(原位杂交, × 400)

Figure 1 Positive expression of Egr-1 mRNA in brain tissue in each group (In situ hybridization, × 400)

ym=21