

胆管上皮细胞与缺血再灌注损伤的研究进展

谢芳, 罗渝昆, 唐杰

解放军总医院 超声科, 北京 100853

摘要: 随着肝移植术后胆道并发症研究的进展, 缺血再灌注损伤越来越受到关注。然而, 关于胆管上皮细胞与缺血再灌注损伤的相关研究尚少。目前, 缺血再灌注损伤引起的胆道病变临床诊治相当棘手, 其发病机制是多方面的, 主要包括能量代谢紊乱、器官缺血产生的微血管功能障碍以及再灌注损伤引起的炎症免疫反应。本文对肝移植后胆管缺血再灌注损伤的病理生理学机制、影像学诊断及药理学防治的研究状况作一系统分析, 以揭示缺血再灌注损伤与胆管疾病之间的关系, 为肝移植术后胆道并发症的临床诊治提供有价值的信息。

关键词: 胆管上皮细胞; 缺血再灌注损伤; 胆管周围血管丛; 炎症免疫损伤; 超声造影

中图分类号: R 657.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2015)08-0857-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2015.08.026

网络出版时间: 2015-05-06 10:52 **网络出版地址:** http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20150506.1052.001.html

Advances in biliary epithelial cell and ischemia-reperfusion injury

XIE Fang, LUO Yukun, TANG Jie

Department of Ultrasonography, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LUO Yukun. Email: lyk301@163.com

Abstract: With the progress of research in biliary tract complications after liver transplantation, ischemia-reperfusion injury is attracting more and more attention. However, studies on biliary epithelial cell associated with ischemia-reperfusion injury are rarely few. Currently, the clinical diagnosis and treatment of biliary tract diseases caused by bile duct ischemia-reperfusion injury is a tricky one. The pathogenesis of bile duct ischemia-reperfusion injury is various, mainly including: energy metabolism disorders, microvascular dysfunction caused by organ ischemia, and inflammatory immune response triggered by reperfusion injury. Therefore, this review highlights the pathophysiology mechanism of bile duct ischemia-reperfusion injury, and discusses examples of imaging diagnosis and innovative therapeutic approaches based on these mechanistic findings, as well as gains new insight into the relationship between ischemia-reperfusion injury and bile duct diseases, in order to provide valuable information for the clinical diagnosis and treatment of biliary complications after liver transplantation.

Keywords: biliary epithelial cell; ischemia reperfusion injury; peribiliary vascular plexus; inflammatory and immunological injury; contrast-enhanced ultrasound

肝移植是目前治疗终末期肝病的一种有效方法, 在此过程中供肝需经过切取、保存和植入3个步骤, 不可避免要经历缺血再灌注的病理生理过程。缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是一个多细胞参与、多种介质共同作用的复杂病理过程, 包括缺血引起的器官损伤以及炎症介导的再灌注组织损伤, 是肝移植术后胆道并发症的重要因素, 严重影响着术后肝功能和移植物的存活。现已证实, 肝内胆管细胞对缺血再灌注损伤的反应比肝细胞更为敏感, 与再灌注密切相关^[1]。胆管缺血再灌注损伤主要表现在胆管壁和胆管上皮细胞(biliary epithelial cell, BEC)的损伤以及胆管周围血管丛微循环障碍, 临床上可引起胆管炎、胆道狭窄, 甚至出现胆道缺血性坏死、胆瘘。

因此, 进一步了解胆管缺血再灌注损伤的机制将有助于其防治策略的研究, 减少肝移植术后胆道并发症的发生。

1 胆管上皮细胞超微结构损伤

胆管上皮细胞是一族高耗氧、高代谢、缺氧耐受能力差的细胞群体, 仅占肝细胞总数的3%~5%, 形态和功能上都具有多样性。线粒体是细胞的活性代谢中心, 对各种损伤因子极为敏感, 是最常见的用于观察超微结构的细胞器之一。在许多病理性损伤因子(缺血、缺氧)的作用下, 线粒体首先受损, 三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)迅速耗竭, 进而损伤整个细胞的功能。因此, 超微结构的观察是研究肝内胆管上皮细胞IRI的一个重要手段。实验表明, 胆管上皮细胞线粒体超微结构的观察可反映胆道组织IRI的程度^[2]。缺血缺氧时, 胆管上皮细胞基底膜脱落, 同时中性粒细胞浸润, 线粒体肿胀、数量减少, 细胞核皱缩, 炎细胞浸润。再灌注后, 钙超载与氧自由基大量生成, 二者相互影响、协同作用, 导致线粒体结构和功能损伤进一步加重, 微绒毛逐渐减少, 甚至消失, 线粒体膜结构和骨架破坏, 通透性增加, 能量代谢障碍, 直接造成了胆管上

收稿日期: 2015-01-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81271588)

Supported by the National Natural Science Foundation of China(81271588)

作者简介: 谢芳, 女, 在读博士, 副主任医师。研究方向: 超声医学。Email: lmsh1225@163.com

通信作者: 罗渝昆, 女, 博士, 主任医师, 博士生导师。Email: lyk301@163.com

皮细胞的损伤。

2 胆管周围血管丛微循环障碍

胆管的动脉血供相当复杂,随着肝胆外科的发展,肝动脉的终末分支—胆管周围毛细血管丛(peribiliary blood plexus, PBP)作为胆管直接的血供来源,在维持其正常生理功能中的作用越来越受到重视^[3]。肝细胞接受门静脉和肝动脉的双重血供,血管腔较大;而胆管只接受肝动脉分支PBP的血供,管腔较细,因而在IRI时,胆管细胞受到的伤害比肝细胞更加严重。黄志强和黄晓强^[4]通过观察兔肝微血管铸型扫描电镜也证实了PBP的这种血流灌注特点,这正是肝移植术后肝动脉血流通畅但却会发生缺血性胆管狭窄的解剖学原因。肝移植过程中,供肝冷冻保存时间过长,可直接损害肝窦内皮细胞及胆管上皮细胞,并破坏PBP的微循环。在原位肝移植手术过程中,胆管还要经历两个阶段的热缺血损伤^[5],一是供肝切取过程中的短暂热缺血损伤,二是门静脉血流开放至肝动脉血流开放过程中的肝动脉缺血损伤。在此期间,肝尚有门静脉单纯血供,而胆管仍处于热缺血状态,因此,胆管缺血再灌注损伤更加明显。病理实验证实,门脉区胆管上皮细胞损伤程度与二次热缺血时间密切相关^[6]。

3 胆管上皮细胞的炎症损伤

现已证实,结构特殊的胆管也是冷、热缺血及再灌注损伤的重要靶组织。目前认为,缺血再灌注损伤的机制与钙超载、氧自由基增多及炎性细胞聚集等有关。缺血期,由于组织缺氧导致细胞代谢紊乱,ATP耗竭及微循环障碍,胆管上皮细胞脱落,微绒毛数量减少,甚至出现黏膜全层水肿、坏死、纤维化形成而致狭窄。随着再灌注时间的延长,中性粒细胞不断聚集,组织损伤反而加剧,进而引起一系列炎症反应,并且生成的氧自由基和蛋白酶产生强烈的细胞损伤放大效应^[7]。许多炎症介质参与了胆管IRI这一复杂的病理生理过程,如激活的枯氏细胞、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白介素(IL)、5-羟色胺、血小板活化因子、内皮素、一氧化氮、花生四烯酸代谢产物、前列腺素、趋化因子和黏附分子等。这些介质通过自分泌、旁分泌或类似激素的方式诱导其自身及其他因子产生,形成一个细胞炎症反应的分子链,使胆管上皮细胞的损伤呈进行性加重。胆管上皮细胞来源的5-羟色胺(5-HT)以及门管区成纤维细胞来源的TGF- β 介导了BEC与成纤维细胞之间的自分泌与旁分泌效应,以维持BEC的增殖,在胆管病发病机制中具有重要的意义^[8]。此外,由于胆管上皮细胞内缺乏抗氧化酶系,如过氧化氢酶、过氧化物歧化酶、还原型谷胱甘肽,因而较肝细胞更容易受到再灌注时氧自由基的损伤。

肝移植缺血再灌注损伤后,PBP和其内皮细胞也广泛参与了胆管免疫炎症反应的病理过程,包括血管通透性增加、内皮细胞炎症反应、血管收缩、血细胞淤塞以及补体系统的激活,其中细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及血小板—白细胞聚合物进一步加剧了PBP的微循环障碍。

4 胆管上皮细胞的免疫学损伤

肝是最重要的具有天然免疫功能的器官,它通过门静

脉接收并过滤其他系统80%的血液。再灌注损伤后,胆管上皮细胞积极参与肝内免疫介导的无菌性炎症,激活炎症细胞;并通过自身免疫应答,诱导主要组织相容性抗原分子的上调或表达,完成抗原提呈过程;分泌和表达促炎性细胞因子、化学趋化因子及黏附分子,激活天然和获得性免疫反应,引发移植损伤,使胆管成为肝移植后胆道并发症的靶器官^[9]。

目前,在缺血再灌注免疫损伤中研究较多的是Toll样受体(toll-like receptor, TLR),它是参与天然免疫的一类重要蛋白质,也是连接天然免疫和获得性免疫的桥梁。TLR广泛表达于肝的实质细胞和非实质细胞,包括肝细胞、肝窦内皮细胞、枯氏细胞、淋巴细胞、胆管上皮细胞及星状细胞,对肝及胆道的功能起着至关重要的作用。新近研究发现,TLR不仅可识别外源性病原体,如疾病相关分子模式,还能够识别机体自身产生的内源性配体,即损伤相关分子模式(damage associated molecular patterns, DAMPs),并激活机体产生免疫细胞应答^[10]。DAMPs通常隐藏于细胞内,缺血再灌注损伤后,被一些受损或死亡的细胞激活,释放到细胞外而引起免疫反应。也有证据表明,细胞外的DAMPs是在代谢过程中生成或释放的,缺血再灌注损伤时,这种在分解代谢中产生的DAMPs既可以激活免疫反应,也可以作为一个安全信号,抑制有害的免疫反应,而保护组织的完整性^[11-12]。最近的研究表明,TLR信号转导对天然免疫及获得性免疫均有重要的调控作用^[13]。TLR介导的信号转导几乎参与了所有的肝疾病,如急性和慢性肝炎、肝纤维化、肝硬化、肝缺血再灌注损伤、肝再生和肝细胞癌。TLR被配体识别后,激活下游的核转录因子Kappa B、促分裂原活化蛋白激酶以及I型干扰素信号通路,分泌促炎性细胞因子(TNF、IL-6、IL-1 β)和化学趋化因子,从而调节机体辅助性T细胞的平衡^[9]。

枯氏细胞、树突状细胞、中性粒细胞、T细胞及NK/NKT细胞也都参与了缺血再灌注损伤引起的免疫反应。目前,T细胞在无菌性炎症环境下被激活的机制仍然没有深入了解,但证据表明,T细胞激活具有抗原特异性及抗原独立性^[14]。实验表明,CD4⁺和CD8⁺T淋巴细胞参与了肠道组织缺血再灌注损伤的过程^[15],CD2和CD28 T淋巴细胞在鼠肺缺血再灌注损伤中均具有损伤的作用^[16];补体调节蛋白CD59在小鼠脑缺血再灌注24 h后显著降低,其可能也参与了脑缺血再灌注的免疫损伤过程^[17]。

5 胆管缺血再灌注损伤的影像学诊断及防治

目前,临床上诊断胆管疾病主要依靠各种影像学手段,包括ERCP、PTC、MRCP和超声,都是通过显示胆管狭窄、扩张等形态学改变来诊断。而超声检查具有无辐射、经济便捷、实时动态、可用于术中及床旁等显著优势,已成为胆道疾病首选的影像学检查之一^[18]。由于胆道系统的特殊性,超声造影剂不仅可以通过静脉,还能经胆管腔内注入,从而观察胆管腔外和腔内的结构。郑荣琴等应用经静脉注入超声造影剂对胆管壁微循环灌注进行实时、无创观测,通过检测胆管周围毛细血管丛的血流灌注状态对胆道缺血

进行评价,其改变可能早于形态学变化^[19]。Nunoi等^[20]结合超声造影与彩色多普勒,为门脉性胆道病的诊断及鉴别诊断提供了直观而特异的形态学检查方法,避免了病人遭受胆道活检和外科手术的痛苦。尽管如此,超声造影对于胆道炎症、缺血性病变的诊断价值还缺乏更多的相关证据。因此,笔者认为超声造影对于胆道病变的诊断价值还有待进一步深入研究。

过去10年,对于再灌注损伤的机制研究已经取得了很大进展,而且也提出了很多确实有效的策略来预防缺血或再灌注损伤^[21-22]。缺血预适应就是一种重要的临床治疗方法^[23]。新近一项研究报道,肝切除术前采取多次间断缺血、再灌注,较单纯缺血预适应可更加有效地减轻肝组织损伤,而且,缺血与再灌注间隔时间越短,肝损伤越小^[24]。实验研究表明,低温机器灌注与经典的静态冷藏器官保存方法相比,可更好地保护肝实质,防止胆管周围血管丛小动脉坏死,有助于更快地恢复缺血性胆管的血流再灌注^[22]。除此之外,大量的药物实验研究模拟缺血预处理的机制,为缺血再灌注损伤治疗提供了新的强有力的依据。例如,应用脯氨酸羟化酶抑制剂或腺苷受体激动剂调控能量代谢过程可以增加组织缺血耐受力^[25-26];在冠状动脉旁路移植术前应用激活的线粒体醛脱氢酶可增强患者心肌缺血的耐受性^[27]。实验证明,一些治疗性的气体包括氢气、一氧化氮、硫化氢和一氧化碳也可以减轻再灌注损伤^[28]。另外,Sheng等^[29]研究报道,植入自体骨髓单核细胞能够显著减少肝内胆管上皮细胞的凋亡,从而预防及减少肝内胆道缺血的发生。缺血再灌注损伤的干预及治疗措施目前已进入了临床试验阶段,其安全性和有效性正在论证。一些药剂已经在小型临床试验中取得了非常好的结果,但仍需要大样本的临床研究证实。

6 展望

胆道缺血再灌注损伤在肝移植后的发生率仍然很高。只有深入理解缺血再灌注损伤的炎症免疫学机制,深入阐释缺血再灌注损伤与胆管疾病之间的关系,利用更完善的外科技术及更有效的预防治疗策略,才会减少肝移植术后胆道并发症的发生。低温机器灌注已经受到了越来越多的研究和关注,具有潜在的优势,可以更好地保护脆弱的胆管。目前,大多数研究表明,这种技术(如温度、时间等)还需要探索与改善。尽管如此,低温机器灌注仍然具有良好的前景,有可能成为一种新技术,有效地减少胆道缺血再灌注的损伤。尽管未来还有很大的挑战,我们还是希望有更好的探索及新的疗法应用于缺血再灌注损伤的临床实践中,推动肝移植的发展。

参考文献

- Emadali A, Muscatelli-Groux B, Delom F, et al. Proteomic analysis of ischemia-reperfusion injury upon human liver transplantation reveals the protective role of IQGAP1 [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2006, 5 (7): 1300-1313.
- 王洪波, 储芳, 孙艳玲, 等. 肝移植术中不同时相供肝胆道上皮细胞的病理组织结构改变 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2012,

- 11 (7): 489-491.
- 黄志强. 当今胆道外科的发展与方向 [J]. *继续医学教育*, 2007, 21 (10): 10-12.
- 黄志强, 黄晓强. 重视胆管、胆管细胞与移植肝胆道病的研究 [J]. *消化外科*, 2006, 5 (1): 1-6.
- Zhu XH, Pan JP, Wu YF, et al. Establishment of a rat liver transplantation model with prolonged biliary warm ischemia time [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18 (48): 7194-7200.
- Zhu XH, Pan JP, Wu YF, et al. Effects of warm ischemia time on biliary injury in rat liver transplantation [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18 (43): 6308-6314.
- Zhai Y, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation [J]. *Am J Transplant*, 2011, 11 (8): 1563-1569.
- 陈莉萍, 王雅文, 樊文梅, 等. 5-羟色胺在胆管上皮细胞与门管成纤维细胞自分泌/旁分泌中的作用 [J]. *解放军医学院学报*, 2014, 35 (10): 1044-1048.
- Eltzschig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion—from mechanism to translation [J]. *Nat Med*, 2011, 17 (11): 1391-1401.
- Chen GY, Nuñez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage [J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10 (12): 826-837.
- McDonald B, Pittman K, Menezes GB, et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation [J]. *Science*, 2010, 330 (62): 362-366.
- Grenz A, Homann D, Eltzschig HK. Extracellular adenosine: a safety signal that dampens Hypoxia-Induced inflammation during ischemia [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15 (8): 2221-2234.
- Chen YY, Sun R. Toll-like receptors in acute liver injury and regeneration [J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11 (10): 1433-1441.
- Shen XD, Wang YE, Gao F, et al. CD4 T cells promote tissue inflammation via CD40 signaling without De Novo activation in a murine model of liver ischemia/reperfusion injury [J]. *Hepatology*, 2009, 50 (5): 1537-1546.
- Yang DJ, Zhu ZX, Fu HB, et al. Hypertonic saline activates CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in the small intestine to alleviate intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2014, 18 (20): 3069-3075.
- Gao W, Liu DD, Li D, et al. Effects of hypercapnia on T cells in lung ischemia/reperfusion injury after lung transplantation [J]. *Exp Biol Med*, 2014, 239 (12): 1597-1605.
- 赵军, 晏沐阳, 张传福, 等. CD59 在小鼠脑缺血再灌注损伤中的表达及意义 [J]. *解放军医学院学报*, 2013, 34 (4): 373-375.
- Sparchez Z, Radu P. Role of contrast enhanced ultrasound in the assessment of biliary duct disease [J]. *Med Ultrason*, 2014, 16 (1): 41-47.
- Zhang YC, Qu EZ, Ren J, et al. New diagnosis and therapy model for Ischemic-Type biliary lesions following liver Transplantation—A retrospective cohort study [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (9): e105795.
- Nunoi H, Hirooka M, Ochi H, et al. Portal biliopathy diagnosed using color doppler and contrast-enhanced ultrasound [J]. *Intern Med*, 2013, 52 (10): 1055-1059.
- Papadopoulos D, Siempis T, Theodorakou E, et al. Hepatic ischemia and reperfusion injury and trauma: current concepts [J]. *Arch Trauma Res*, 2013, 2 (2): 63-70.
- Den Dries SO, Sutton ME, Karimian N, et al. Hypothermic oxygenated machine perfusion prevents arteriolonecrosis of the peribiliary plexus in pig livers donated after circulatory death [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (2): e88521.
- Adam AN. Some mechanisms of the protective effect of ischemic preconditioning on rat liver ischemia-reperfusion injury [J]. *Int J Gen Med*, 2014, 7: 483-489.

(上接859页)

- 24 Seyama Y, Imamura H, Inagaki YA, et al. Intermittent clamping is superior to ischemic preconditioning and its effect is more marked with shorter clamping cycles in the rat liver [J] . J Gastroenterol, 2013, 48 (1) : 115–124.
- 25 Hill P, Shukla D, Tran MG, et al. Inhibition of hypoxia inducible factor hydroxylases protects against renal ischemia–reperfusion injury [J] . J Am Soc Nephrol, 2008, 19 (1) : 39–46.
- 26 Bernhardt WM, Wiesener MS, Scigalla P, et al. Inhibition of prolyl hydroxylases increases erythropoietin production in ESRD [J] . J Am Soc Nephrol, 2010, 21 (12) : 2151–2156.
- 27 Chen CH, Budas GR, Churchill EN, et al. Activation of aldehyde dehydrogenase–2 reduces ischemic damage to the heart [J] . Science, 2008, 321 (5895) : 1493–1495.
- 28 Lanford RE, Hildebrandt–Eriksen ES, Petri A, et al. Therapeutic silencing of microRNA–122 in primates with chronic hepatitis C virus infection [J] . Science, 2010, 327 (5962) : 198–201.
- 29 Sheng QS, Chen WB, Lin JJ, et al. Effects of autologous bone marrow mononuclear cells implantation on cholangiocytes apoptosis in model of intrahepatic ischemic type biliary lesion in rabbits [J] . Transplant Proc, 2012, 44 (5) : 1435–1438.