文章编号:1000-5404(2005)06-0535-03

论著

小型猪小体积肝移植后血清ET-1和NO水平变化研究

冷建军,韩本立,董家鸿,李 昆,陈利均 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨小体积肝移植损伤分子学机制。**方法** 用广西巴马小型猪建立全肝供肝原位肝移植对照组(A组)、右半肝供肝部分肝移植组(B组)和右中叶联合尾状叶供肝部分肝移植组(C组)不同移植量活体部分肝移植模型,动态检测血清ET-1和NO水平。**结果** A、B组动物7 d生存率为100%,C组仅20%。移植肝复流后各组血清ET-1水平显著上升,1 h即达高峰值,随后逐渐下降,术后第7天基本恢复至基础水平。C组除存活1例在第7天外,各时相点均显著高于A、B组;C组动物在复流后1 h血清NO水平显著升高,达到最高峰值,C组水平显著高于A组,随后迅速下降。比较血清中ET-1和NO比值变化趋势,可见C组除1例存活动物在第7天水平外,术后各时相点与A组存在显著差异,而B组各时相点与A组比较无统计学差异。**结论** 小体积移植肝损伤机制尚未完全阐明,血清ET-1、NO水平失衡是导致小体积移植肝微循环损害的重要因素。

关键词: 肝移植;小型猪;内皮素;一氧化氮
中图法分类号: R446.11; R657.3; R617 **文献标识码:** A

Changes of serum endothelin-1 and nitric oxide after small-for-size liver transplantation in Bama miniature pigs

LENG Jian-jun, HAN Ben-li, DONG Jia-hong, LI Kun, CHEN Li-jun (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanisms of graft injury in small-for-size liver transplantation. **Methods** Liver transplantation animal models with different graft volumes were established in 15 Bama miniature pigs, which were divided into Group A with whole liver graft, Group B with right half liver graft, and Group C with right lateral combined with caudate lobe graft. The serum endothelin-1 (ET-1) and nitric oxide (NO) levels before operation, at 1 h after reperfusion, and at day 1, 3, 5 and 7 after operation were measured. **Results** All animals in groups A and B survived for 7 d after operation (100%). Only one in Group C survived for 7 d (20%). Serum ET-1 and NO levels increased obviously after reperfusion, reached the peak value at 1 h after reperfusion, and then ET-1 decreased fleetly in Group A, slowly in Group C, and mildly in Group B. The serum NO peak level was the highest in Group C at 1 h after reperfusion and thereafter the level dropped rapid. The ratio of ET-1/NO in Group C was significantly higher than that in groups A and B, but the ratios were closed to each other in groups A and B or the basic levels. **Conclusion** As to small-for-size liver transplantation, the reduction of graft vascular volume is the primary pathogenesis of the graft injury. Although the detailed mechanisms in small-for-size graft injury are unclear, the imbalance of ET-1 and NO may be the important molecular mechanism leading to the graft microcirculation dysfunction.

Key words: liver transplantation; miniature pig; endothelin; nitric oxide

得益于肝脏解剖和肝脏外科技术的进步,临床肝移植逐渐从减体积肝移植、劈裂式肝移植发展到活体部分肝移植。活体肝移植首先在儿童受体取得成功后,近年越来越多在成人受体应用[1]。目前研究认为成人间LDLT移植物必须超过标准肝体积40%~50%或移植物与移植物受体体质量比(GRWR)大于0.8%,

基金项目: 国家杰出青年科学基金海外青年合作研究基金资助项目(30228030)
Supported by the Cooperative Research Foundation for Oversea Scholars of the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (30228030)
作者简介: 冷建军(1966-),男,江西省九江市人,博士,主治医师,主要从事肝胆外科临床和实验方面的研究,发表论文15篇,现在解放军第174医院普外科工作。电话:(0592)2535709
通讯作者: 董家鸿,电话:(023)68754168;E-mail: jhdong@hbsky.org
收稿日期: 2004-06-25;**修回日期:** 2004-12-11

否则易发生移植肝早期功能衰竭，表现为胆汁淤积、凝血功能障碍，称为小体积综合征。一般认为小体积综合征的发生除了与移植肝体积的大小有关外，也受受体移植前疾病状态的影响[2]，但其确切发病机制尚未阐明。本研究采用巴马小型猪模拟部分肝移植大动物模型，对小体积肝移植后血清内皮素-1（endothelin-1，ET-1）和一氧化氮（nitric oxide，NO）水平进行动态观察，初步探讨移植肝损伤的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

广西巴马小型猪15头，雌雄不拘，体质量15～20 kg，由第三军医大学实验动物中心提供。采用肝周去神经骨骼化解剖、原位灌注和肝切除建立模拟不同植肝量自体原位部分肝移植模型。动物分为3组，每组5只动物：A组，全肝供肝原位肝移植对照组，GRWR = 2.11%；B组，右半肝供肝部分肝移植组，GRWR = 1.05%；C组，右中叶联合尾状叶供肝部分肝移植组，GRWR = 0.61%。

1.2 标本采集

经颈外静脉插管，于手术开始前（Base）、移植肝复流后（after Reperfusion）1 h、1、3、5 d和7 d分别采集全血标本5 ml，加入干燥试管，自然凝固后，3 000 r/min离心15 min，留取血清置－80 ℃冰箱保存待测。

1.3 检测指标

采用Cayman公司Endothelin-1 EIA Kit（583151）方法检测血清ET-1水平。

采用Cayman公司Nitrate/Nitrite Colorimetric Assay Kit（780001）方法检测血清NO水平。

1.4 统计学处理

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用SPSS 10.0软件行单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 动物生存率

各组动物无手术死亡。A组和B组动物术后恢复良好，所有动物存活超过7 d，生存率为100%；C组动物仅1例存活7 d，生存率为20%，3例因肝功能衰竭在术后3 d内死亡，1例因细菌性腹膜炎于术后第4天死亡。

2.2 血清ET-1水平

小型猪基础ET-1水平约40 pg/ml，各组间无差异；复流后各组血清ET-1水平显著上升，1 h即达高峰值，随后A组水平下降较快，C组下降趋势缓慢，B组介于两组之间；C组除存活1例在第7天水平外，复流后各时相点与A、B组间均存在显著差异（$P<0.05\sim0.01$）；B组与A组各时相点比较无统计学差异（$P>0.05$）。结果见表1。

2.3 血清NO水平

小型猪基础状态下血清NO浓度约16 μmol/ml，各组间无差异；各组动物在复流后1 h血清NO水平显著升高，达到最高峰值，C组水平显著高于A组（$P<0.05$）；随后出现逐渐下降趋势，C组下降最明显，B组下降趋势较缓慢，在第1、3天时相点B组与A、C之间存在显著差异（$P<0.01$）；至第5天后A、B组间无差异，C组水平偏低，但各组存活7 d动物间无显著差异。结果见表2。

表1 各组动物血清ET-1水平结果（$n=5$，pg/ml，$\bar{x} \pm s$）

Tab 1 Serum ET-1 level in each group（$n=5$，pg/ml，$\bar{x} \pm s$）

Group	Base	After Reperfusion				
		1 h	1 d	3 d	5 d	7 d
A	40.36±1.11	65.68±1.99	54±1.85	41.35±1.66	42.39±2.01	41.12±1.72
B	40.48±1.54	71.07±1.39☆	64.97±1.6☆	57.58±1.71☆	44.25±1.58△	39.77±1.55
C	40.34±1.66	82.33±2.5★	72.68±2.75★	64.15±1.54★	51.13±0.00★#	41.16±0.00#

★：$P<0.01$，*vs* A；△：$P<0.05$，*vs* C；☆：$P<0.01$，*vs* C.

#：Data of the only survived pigs

表2 各组动物血清NO水平（$n=5$，μmol/ml，$\bar{x} \pm s$）

Tab 2 Serum NO level in each group（$n=5$，μmol/ml，$\bar{x} \pm s$）

Group	Base	After Reperfusion				
		1 h	24 h	3 d	5 d	7 d
A	16.09±0.52	30.18±1.09	23.4±0.86	20.35±1.07	17.28±0.26	16.74±0.48
B	16.04±0.57	32.11±1.62	27.38±0.7★☆	24.61±1.52★	17.75±1.42	16.45±1.51
C	16.06±0.54	32.67±1.46*	22.12±1.66	22.87±3.97	16.59±0.00	16.7±0.00

*：$P<0.05$，*vs* A；★：$P<0.01$，*vs* A；☆：$P<0.01$，*vs* C.

2.4 血清ET-1/NO变化

为了更好的比较血清中ET-1和NO的变化关系，对比分析了两者比值变化趋势。可见C组除1例存活动物在第7天水平外，术后各时相点与A组存在显著差异，而B组各时相点与A组比较无统计学差异。见表3。

表3 各组动物血清ET-1/NO结果（$n=5$，$\bar{x} \pm s$）

Tab 3 Ratio of ET-1/NO in each group（$n=5$，$\bar{x} \pm s$）

Group	Base	After Reperfusion				
		1 h	24 h	3 d	5 d	7 d
A	2.51±0.11	2.18±0.08	2.31±0.07	2.04±0.12	2.45±0.12	2.46±0.14
B	2.53±0.15	2.22±0.15△	2.37±0.1△	2.35±0.22	2.50±0.21	2.43±0.21
C	2.51±0.08	2.53±0.16★	3.31±0.35*	2.86±0.48★	3.12±0.00*	2.46±0.00

*：$P<0.05$，*vs* A；★：$P<0.01$，*vs* A；△：$P<0.05$，*vs* C

3 讨论

移植物体积大小对活体肝移植预后具有重要意义。临床肝移植中通常采用移植物受体体质量比或移植物占受体标准肝体积（SLV）百分比表示移植肝大小。研究表明：GRWR小于0.8%，1年生存率仅42%；GRWR达到0.8%和1.0%时，1年生存率上升到74%和92%。目前认为安全的移植物GRWR应该达到0.8%以上或受体SLV在40%以上。GRWR低于

0.8%或 SLV 小于 40% 的移植肝称为小体积移植物，移植后可发生进行性的肝内胆汁淤积、门静脉高压和大量的腹水，称之为小体积综合征（small-for-size syndrome，SFSS）[3]。因此，美国和欧洲大多数肝移植中心常规采用右叶供肝，可以满足成人的肝脏功能需要和避免 SFSS 的发生[4]。文献[5，6]报道右肝供肝活体肝移植供受体并发症显著增加，至少已有 7 例因为供肝导致供体死亡和 2 例供体本身需要接受肝移植的报道。作者认为单纯采用扩大供体供肝的做法有违 LDLT 供体安全第一的首要原则，从一定意义上说是将 LDLT 的受体危机转嫁给了供体。

尽管肝切除后剩余肝组织安全量尚没有确切的数据，一般认为 25% ~ 30% 的无肝硬化正常肝实质足以快速再生，患者不伴有明显的肝功能损害[7]。小体积移植肝就像扩大肝切除后的残肝一样，处于门静脉血流过度灌流环境中。临床研究表明小体积肝移植后门静脉过度灌流及急性门静脉高压是移植肝损害的主要病因学机制[8]。扩大肝切除后小体积剩余肝组织可以快速再生，保证患者恢复顺利，而小体积肝移植后却容易发生小体积综合征，这可能与移植肝经受缺血再灌注损伤后微循环调节机制改变有关。

肝脏微血管系统由门静脉、肝动脉、肝窦、中央静脉和淋巴管组成。肝窦是肝脏微循环血流调节的关键部位。定位在内皮细胞下 Disse 间隙肝脏星状细胞（HSC）三维结构特征类似于其它器官中调节血流的周细胞，在肝窦表现类似周细胞的功能，是调节肝窦大小的重要因素。ET-1 和 NO 是通过 HSC 调节肝脏微循环的主要细胞因子，分别调节 HSC 收缩和舒张效应[9]。正常肝脏存在免疫学检测水平的 ET，ET-1 水平升高对肝脏有多种不良影响，包括肝窦血管收缩，灌注率下降，门静脉压升高和肝内血管阻力升高，也促进了白细胞与内皮细胞的相互作用。Palmes 等通过在小体积肝移植受体再灌注前应用 ET-A 受体拮抗剂 darusentan，微循环紊乱和随后的内皮细胞损害明显减小，内皮细胞损伤和 Kupffer 细胞激活减少，保存了内皮细胞连续性和 Disse 间隙的完整，以致移植肝功能全面提高。显示 ET-1 在部分肝移植微循环紊乱中发挥中心作用，而选择性阻断 ET-B 受体对肝脏没有任何保护作用[10]。NO 是一种独特的多效性信使分子，内皮细胞源性 NO 具有强烈的血管舒张作用，调节血管舒张、血压和区域性血流。肝内低水平的 NO 含量对维持肝脏微循环非常重要，以对抗肝窦收缩调节因子 ET-1 和 PAF。NO 可通过对抗内皮素、血栓素 A_2 的缩血管作用、减轻炎性细胞的活性以及细胞因子和粘附分子的表达、抑制肝细胞凋亡等机制保护肝脏对抗缺血再灌注损伤[11]。

本研究通过动态检测各组动物血清 ET-1 和 NO 水平，结果表明移植肝复流后各组血清 ET-1 水平显著上升，1 h 即达高峰值，C 组各时相点与 A、B 组间均存在显著差异；而 C 组 NO 水平仅复流后出现一短暂高峰后迅速下降，反而低于 A、B 组水平。进一步对比各组动物血清中 ET-1/NO 值，更直观的观察到，C 组动物 ET-1/NO 值在复流后除第 1 小时和第 7 天外，各时相点水平均明显高于 A、B 组，A、B 组血清 ET-1/NO 值维持相对稳定。说明小体积肝移植后尽管机体在复流后短暂的 NO 水平升高，扩张肝窦血管床容量，随后由于内皮细胞、HSC 活化，ET-1 分泌量更高，ET-1 与 NO 比例失衡导致肝窦收缩性增强，肝脏微循环血管床容量进一步减少，以致肝脏微循环处于失代偿的衰竭状态。因此，我们认为小体积肝移植后血清 ET-1、NO 水平失衡，是导致小体积移植肝微循环损害的一个重要因素。

参考文献：

[1] Williams R, Alisa A, Karani J, *et al*. Living related adult-to-adult liver transplantation: meeting the donor shortage[J]. Antiviral Res, 2001, 52(2): 217 - 223.

[2] Tojimbara T, Fuchinoue S, Nakajima I, *et al*. Factors affecting survival after living-related liver transplantation[J]. Transpl Int, 2000, 13(Suppl 1): S136 - S139.

[3] Lo C M, Fan S T, Liu C L, *et al*. Minimum graft size for successful living donor liver transplantation[J]. Transplantation, 1999, 68(8): 1112 - 1116.

[4] Marcos A, Fisher R A, Ham J M, *et al*. Right lobe living donor liver transplantation[J]. Transplantation, 1999, 68(6): 798 - 803.

[5] Scatton O, Belghiti J, Dondero F, *et al*. Harvesting the middle hepatic vein with a right hepatectomy does not increase the risk for the donor[J]. Liver Transpl, 2004, 10(1): 71 - 76.

[6] Salame E, Goldsteinb M J, Kinkhabwala M, *et al*. Analysis of donor risk in living-donor hepatectomy: the impact of resection type on clinical outcome[J]. Am J Transplant, 2002, 2(8): 780 - 788.

[7] Yigitler C, Farges O, Kianmanesh R, *et al*. The small remnant liver after major liver resection: how common and how relevant[J]? Liver Transpl, 2003, 9(9): S18 - S25.

[8] Troisi R, Cammu G, Militerno G, *et al*. Modulation of portal graft inflow: a necessity in adult living-donor liver transplantation[J]? Ann Surg, 2003, 237(3): 429 - 436.

[9] Rokcey D C. Hepatic blood flow regulation by stellate cells in normal and injured liver[J]. Semi Liver Dis, 2001, 21(3): 337 - 349.

[10] Palmes D, Budny T B, Stratmann U, *et al*. Endothelin-A receptor antagonist reduces microcirculatory disturbances and transplant dysfunction after partial liver transplantation[J]. Liver Transpl, 2003, 9(9): 929 - 939.

[11] 王松柏，崔　疝，孙家潭，等. 肝癌患者肝移植术中酸碱平衡及电解质的变化[J]. 局解手术学杂志，2004，13(2)：89 - 91.

（编辑　王　红）