论著

文章编号:1000-5404(2007)04-0342-04

肠腔分流下巴马小型猪肝脏耐受入肝血流阻断的安全时限研究

陈继业,马正伟,董家鸿 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,全军肝移植重点实验室,重庆 400038)

提 要: 目的 了解在肠腔分流条件下正常巴马小型猪肝脏耐受缺血的安全时限,为临床上阻断肝脏血流的时间及设计合理手术方案提供实验依据。**方法** 将18只正常小型猪随机分为A组(肝血流阻断90 min)、B组(肝血流阻断100 min),在肠腔分流的条件下,观察2组动物的术后存活情况、入肝血流阻断前后,再灌注0、1 h、1~5 d时肝功能及组织病理改变。**结果** ①A组动物长期存活率显著高于B组(100%与44.4%, $P<0.05$)。②2组动物ALT在术后2、3 d显著升高,术后4 d时与术前无显著差异,术后2、3 d时B组显著高于A组;复流1 h时2组AST水平达峰值,此后逐渐下降,术后3 d与术前无显著性差异,复流1 h、术后1、2 d时B组AST显著高于A组;A组动物缺血时D-BIL、T-BIL显著升高,复流1 h后降至正常水平,B组动物至术后5 d才恢复正常水平,于复流前、复流1 h、术后1、2、3、4 d时B组动物D-BIL、T-BIL均显著高于A组。③2组动物缺血时肝组织损伤明显,复流1 h时损伤进一步加重,A组及B组长期存活动物肝组织结构于术后4 d恢复正常;与A组比较,B组肝组织损伤显著,坏死灶明显增多。**结论** 避免门静脉淤滞条件下正常巴马小型猪常温耐受入肝血流阻断的安全时限可达90 min。

关键词: 肝脏; 缺血再灌注; 肝功; 病理; 耐受

中图法分类号: R-332;R364.12;R657.3 **文献标识码**: A

On tolerance limit for normothermic hepatic inflow occlusion by meso-caval shunt in Bama swines

CHEN Ji-ye, MA Zheng-wei, DONG Jia-hong (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To establish an animal model of hepatic inflow occlusion with meso-caval shunt in Bama swines so as to evaluate the tolerance limit of normothermic hepatic inflow occlusion. **Methods** Eighteen Bama swines were divided into group A in which the hepatic blood inflow was occluded for 90 min and group B in which the hepatic blood inflow was blocked for 100 min. The animal survival rate, the changes of liver function and histopathology were observed. **Results** The animal survival rate was significantly higher in group A than group B (100% *vs* 44.4%, $P<0.05$). Compared with the pre-ischemia value, ALT levels in the two groups on the 2nd and 3rd day postoperatively were significantly increased. On the 4th day postoperatively ALT recovered to normal level. ALT level was significantly higher in group B than group A on the 2nd and 3rd days postoperatively. AST in the two groups peaked at 1 h after reperfusion, and recovered to normal on the 3rd day postoperatively. AST was significantly higher in group B than group A at 1 h after reperfusion and on the 1st and 2nd days postoperatively. T-BIL and D-BIL levels in group A at ischemia 90 min were significantly higher than the pre-ischemia levels, and then decreased to the normal level. T-BIL, D-BIL levels in group B peaked after 100 min of ischemia, and returned to normal on the 5th day postoperatively. T-BIL and D-BIL levels in group B were significantly higher than group A at the end of ischemia, 1 h after reperfusion and postoperative days 1-4. Hepatic injury was severer at 1 h after reperfusion in both groups. The hepatic tissue recovered to normal in group A on the 4th day postoperatively; however, hepatic necrosis was found in group B. **Conclusion** Ninety minutes is the tolerance limit for normothermic hepatic inflow occlusion in swine under conditions of meso-caval shunt.

Key words: liver; ischemia-reperfusion; liver function; histopathology; tolerance

基金项目:国家杰出青年科学基金海外青年合作研究基金(30228030);国家自然科学基金青年基金(30400436)

Supported by the National Science Fund for Young Distinguished Scholars(30228030) and the National Natural Science Foundation for Distinguished Young Scholars (30400436)

作者简介:陈继业(1981-),男,湖北省仙桃市人,硕士,医师,主要从事缺血再灌注损伤机制方面的研究。电话:(023)68765314

通讯作者:董家鸿,电话:(023)68754168,E-mail: jhdong@hbsky.com.cn

收稿日期:2006-03-21;**修回日期**:2006-08-24

入肝血流阻断的安全时限目前仍不明确，临床上一般均以 15 ~ 20 min 作为常温下肝脏血流阻断的安全时限，但近年不断有超越此时限的临床报道[1-4]。研究显示门静脉淤血是影响肝耐受缺血时限的重要因素。以往的研究为避免门静脉淤血多采用生物泵行门静脉转流，然而此方法需对实验动物行全身肝素化，术中、术后难以监护并对实验结果有一定的影响[5,6]。同时，对于肝脏在缺血再灌注（ischemia-reperfusion，I/R）过程中其肝功能及病理变化规律，少见文献报道。本研究建立了肠腔分流避免门静脉淤血的实验动物模型，通过持续观察 I/R 过程中动物的存活率、肝功能及病理变化，全面了解实验动物在 I/R 过程中肝功能及病理变化规律，同时评估巴马小型猪耐受肝脏缺血的安全时限，以期为临床上阻断肝脏血流的时间及设计合理手术方案提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

健康广西巴马小型猪 18 只，雌雄不限，体质量 20 ~ 30 kg，由第三军医大学实验动物中心提供。随机分为 2 组，每组 9 只。其肝门阻断时间依据 Nordlinger[7] 及丁均等[8] 相关实验研究结果而设立。A 组：肠腔分流条件下肝门阻断 90 min；B 组：肠腔分流条件下肝门阻断 100 min。

1.2　动物模型建立

实验动物于术前 12 h 禁食水。予以 10 mg/kg 盐酸氯胺酮，1 mg 硫酸阿托品肌注进行麻醉前诱导，然后用 1% 戊巴比妥钠（0.5 ml/kg）麻醉。气管插管后连接呼吸机，颈动脉插管监测心率、血压变化，颈静脉插管建立输液通道。腹正中切口入腹，分离切断肝周所有韧带，阻断所有侧支入肝血流，游离肠系膜上静脉及下腔静脉。行肠系膜上静脉-下腔静脉侧侧吻合后，吻合直径为 1.5 ~ 2 cm，8 号尿管悬吊结扎肝十二指肠韧带。阻断一定时间后解除肝门阻断，拆除并修补肠系膜上静脉-下腔静脉侧侧吻合口并恢复肝脏正常解剖结构。至动物术后清醒、自主呼吸后拔除气管插管。

1.3　观察指标

1.3.1　动物手术后存活情况　　所有动物手术后均精心饲养 14 d，存活 > 14 d 视为长期存活。

1.3.2　动物肝功能变化　　于肝脏血流阻断前、复流前、复流 1 h、术后 1 ~ 5 d 不同时相点采取静脉血标本测定丙氨酸氨基转移酶（ALT）、天冬氨酸氨基转移酶（AST）、γ-谷氨酰基转移酶（GGT）、碱性磷酸酶（ALP）、白蛋白（ALB）、总胆红素（TBIL）、直接胆红素（DBIL）。

1.3.3　动物肝脏病理形态学变化　　于肝脏血流阻断前、复流前、复流 1 h、术后 1 ~ 7、10、14 d 不同时相点对动物实施麻醉后活检，取肝组织常规包埋、切片、HE 染色后行光学显微镜观察。参照黄芬等[9] 的病理分级方法，根据窦状隙充血，气球样变，肝细胞坏死程度进行病理评分。

1.4　统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 统计软件包进行方差分析及 t 检验，计数资料用 χ^2 检验。

2　结果

2.1　实验动物存活情况

A 组所有实验动物术后存活均超过 14 d，存活状况良好，长期存活率为 100%；B 组实验动物术后 1 d 死亡 3 只，术后 2 d 死亡 1 只，术后 3 d 死亡 1 只，其余动物存活均超过 14 d，存活状况良好，长期存活率为 44.4%，2 组动物存活率有显著差异。所有死亡动物均行尸检，证实死因为肝组织大片坏死肝功能衰竭。

2.2　血清肝功能变化（表 1）

表 1　2 组实验动物肝功能变化

组别	阻断前	复流前	复流 1 h	术后 1 d	术后 2 d	术后 3 d	术后 4 d	术后 5 d
ALT（IU/L）								
A 组	46.1 ± 10.9	50.3 ± 23.0	79.4 ± 45.5	78.2 ± 22.7	86.9 ± 19.8[a]	98.1 ± 25.3[a]	80.5 ± 18.5	58.8 ± 17.6
B 组	46.1 ± 10.9	78.7 ± 49.7	198.6 ± 169.7	118.3 ± 63.1	164.2 ± 27.9[ab]	163.4 ± 36.6[ab]	108.7 ± 38.6	90.2 ± 30.5
AST（IU/L）								
A 组	53.5 ± 17.4	192.1 ± 88.5	1 021.1 ± 188.8[a]	489.4 ± 217.4[a]	318.1 ± 132.8[a]	141.4 ± 58.8	88.5 ± 44.6	61.6 ± 16.6
B 组	53.5 ± 17.4	194.9 ± 107.0	2 926.2 ± 572.3[ab]	537.7 ± 201.8[ab]	433.8 ± 60.2[ab]	378.5 ± 331.9	126.8 ± 67.9	67.3 ± 24.9
GGT（IU/L）								
A 组	90.5 ± 38.0	108.2 ± 30.1	91.1 ± 16.4	61.8 ± 33.3	56.0 ± 23.9	46.2 ± 15.1	61.5 ± 35.1	64.4 ± 21.9
B 组	90.5 ± 38.0	111.0 ± 75.9	105.9 ± 51.3	46.8 ± 22.5	40.4 ± 5.2	38.8 ± 14.6	53.8 ± 27.9	52.0 ± 32.4
ALP（IU/L）								
A 组	100.0 ± 42.1	173.7 ± 68.8	181.9 ± 63.6	185.8 ± 61.6	152.0 ± 51.3	102.2 ± 20.5	74.4 ± 21.1	59.4 ± 16.1
B 组	100.0 ± 42.1	161.4 ± 70.7	193.4 ± 67.6	156.3 ± 49.4	194.0 ± 33.2	155.8 ± 32.1	132.0 ± 47.0	107.8 ± 58.3
ALB（g/L）								
A 组	27.7 ± 4.4	27.9 ± 3.9	24.8 ± 4.8	25.0 ± 4.3	27.7 ± 6.4	27.1 ± 4.5	27.6 ± 3.6	27.0 ± 2.2
B 组	27.7 ± 4.4	26.2 ± 4.8	24.6 ± 4.0	25.2 ± 6.0	33.1 ± 2.3	32.6 ± 3.3	32.4 ± 2.9	32.0 ± 1.7
DBIL（μmol/L）								
A 组	6.6 ± 1.2	9.4 ± 0.4[a]	8.3 ± 1.4	6.3 ± 1.3	5.7 ± 1.1	7.5 ± 1.2	5.7 ± 1.3	5.8 ± 1.3
B 组	6.6 ± 1.2	18.6 ± 2.1[ab]	16.7 ± 2.6[ab]	15.7 ± 2.4[ab]	13.8 ± 2.3[ab]	14.2 ± 1.3[ab]	11.4 ± 1.6[ab]	8.7 ± 1.8
TBIL（μmol/L）								
A 组	17.4 ± 1.5	20.7 ± 1.2[a]	17.8 ± 1.8	17.3 ± 2.6	17.1 ± 0.8	17.9 ± 1.4	15.7 ± 1.2	16.0 ± 1.3
B 组	17.4 ± 1.5	35.4 ± 9.4[ab]	31.7 ± 8.4[ab]	28.9 ± 6.3[ab]	25.2 ± 1.3[ab]	24.6 ± 1.6[ab]	21.3 ± 4.0[ab]	18.3 ± 3.3

a：$P < 0.05$，与阻断前比较；b：$P < 0.05$，与同时相点 A 组比较

2.2.1 ALT 变化 2 组动物于缺血及复流 1 h ALT 水平变化较术前无明显变化($P>0.05$),此后逐渐升高,到术后 2、3 d ALT 水平显著高于术前($P<0.05$),术后 4 d 与术前无显著差异($P>0.05$)。术后 2、3 d 时 B 组 ALT 水平均显著高于 A 组($P<0.05$)。

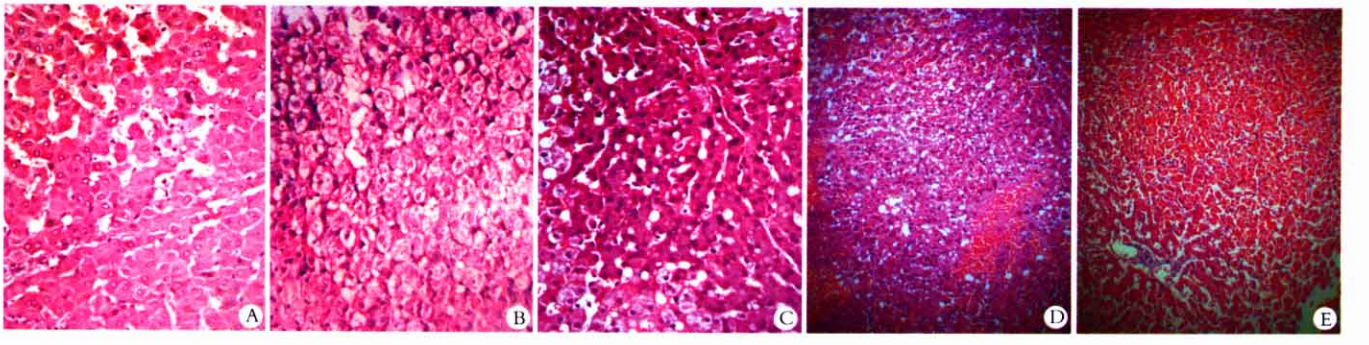
2.2.2 AST 变化 各组动物于复流 1 h 时 AST 水平达到峰值($P<0.05$),随后逐渐下降,到术后 3 d 与术前无显著性差异($P>0.05$)。实验动物于复流 1 h,术后 1、2 d 时 B 组水平显著高于 A 组($P<0.05$)。

2.2.3 TBIL 和 DBIL 变化 A 组动物缺血时 TBIL、DBIL 水平显著升高($P<0.05$),复流 1 h 后降至正常水平($P>0.05$),B 组动物于缺血时 TBIL、DBIL 升高至术后 4 d 均显著高于术前水平($P<0.05$),5 d 后方恢复正常($P>0.05$)。于复流前、复流 1 h,术后 1、2、3、4 d 时 B 组动物 TBIL、DBIL 水平均显著高于 A 组($P<0.05$)。

GGT、ALP 和白蛋白在术前、术中、术后、及 2 组间各时相点均无显著性差异($P>0.05$)。

2.3 肝组织病理学变化

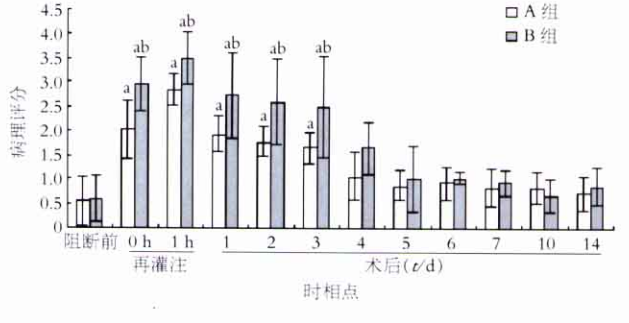
肝脏 I/R 过程中病理学改变有以下特点:①缺血 90 min(图 1a)肝细胞肿胀明显,汇管区炎细胞浸润;复流 1 h 后(图 1b)病变进一步加重,肝细胞广泛变性,灶性坏死,肝窦充血,汇管区及肝窦内明显炎细胞浸润;随后病变逐渐减轻,术后 4 d 恢复正常($P>0.05$)。② 缺血 100 min(图 1c)肝细胞广泛空泡样变,肝组织灶性坏死;复流 1 h 后(图 1d)进一步加重,肝组织内较多灶性坏死,甚至为大片样坏死,未坏死区域肝细胞广泛气球样变、脂肪变性,肝窦广泛充血,汇管区及肝窦大量炎性细胞浸润;死亡动物尸检(图 1e)见汇管区大量出血,白细胞聚集,血管及胆管正常结构消失,组织大片溶解坏死;长期存活动物于术后 4 d 恢复正常($P>0.05$)。③B 组较 A 组损伤更为显著,坏死灶增多($P<0.05$)。



A: A 组阻断 90 min(HE×400); B: A 组复流 1 h(HE×400); C: B 组阻断 100 min (HE×400); D: B 组复流 1 h (HE×200); E:B 组死亡动物尸检肝组织(HE×200)

图 1 2 组实验动物肝脏病理学改变

根据病理评分进一步统计分析(图 2),见 2 组动物入肝血流阻断后肝组织结构均显著改变($P<0.05$),复流 1 h 时肝组织病变最为严重($P<0.05$),此后动物肝组织结构逐渐恢复正常,到术后 4 d 与术前无显著性差异($P>0.05$)。实验动物于复流前、复流 1 h、术后 1~4 d 时 B 组肝组织病变显著高于 A 组($P<0.05$)。



a: $P<0.05$, 与阻断前比较;b: $P<0.05$,与同时相点 A 组比较

图 2 2 组实验动物肝组织病理评分

3 讨论

本实验所采用的肠腔分流情况下肝门血流阻断模型具有门静脉血液转流及肝脏缺血完全、操作较为简便、生理干扰及创伤小等优点,同时避免了因门静脉系统淤血、全身血流动力学紊乱及过重的创伤对实验结果的影响,因此能客观准确的反映肝缺血及再灌注损伤的程度及变化趋势。

Rothenberger 等[10,11]研究指出肝 I/R 损伤是一种炎症反应过程,其病理损害复杂多样。目前认为肝 I/R 损伤可分为 2 个阶段:第 1 阶段发生于再灌注 0.5~4 h,是由于激活的 Kupffer 细胞及中性粒细胞释放的氧自由基以及炎症细胞因子造成肝细胞的损伤;第 2 阶段发生于再灌注 6~24 h,此阶段则由于肝外细胞源性氧自由基以及炎症细胞因子对肝组织的损伤。本研

究通过持续观测 I/R 过程中肝组织病理改变的变化规律，其结果与上述报道基本一致。同时在检测肝 I/R 过程中发现肝功能各项指标其变化具有下列特点：①肝脏缺血后 TBIL、DBIL 显著增加，且随缺血时间延长，增加更加显著；②复流 1 h 时 AST 显著升高，且随缺血时间延长，增加更加显著；③术后 4 d 肝功能各指标均恢复正常；④血清 GGT、ALP、ALB 水平在整个肝缺血再灌注过程中未见明显变化。对比肝功及病理变化规律，我们发现检测血清中 AST 水平较之其他肝功能指标能更好的反映肝 I/R 过程中肝组织的损伤程度，而 TBIL、DBIL 如果持续升高则可能表明肝脏再灌注损伤难以恢复。为了寻找到能定量、灵敏地反映肝 I/R 损伤的指标，使肝门阻断时限个体化，学者们采用了肝组织能量代谢变化、动脉酮体比、ICG 排泄实验、游离脂肪酸及嘌呤化合物水平等指标，它们似乎有一定的意义，但是有些指标测定需要肝脏标本、操作过程复杂，难以应用临床[12,13]。肝功能的测定作为反映肝脏功能的生化指标在临床上已得到广泛的应用，本研究通过对比观察肝脏 I/R 过程中动物肝功能各项指标及病理变化规律，认为肝功能的检测在一定程度上可以反映肝 I/R 过程中组织病变情况，但其是否能灵敏准确的反映肝组织的病理变化并能对肝 I/R 损伤的预后进行正确的预判，尚需进一步的研究证实。

已有研究资料表明，不同种属的实验动物耐受肝缺血时间有一定的差异[7,12,13]。但在肝门阻断的同时行门静脉血液转流，可使动物耐受缺血的时限延长[13]。Nordlinger 等[7]发现利用生物泵行门-颈静脉转流的条件下猪经 120 min 入肝血流阻断仍有部分存活。丁钧等[8]发现利用生物泵行门-体静脉转流可使家猪常温下耐受肝脏缺血的安全时限从 30 min 延长为 90 min。本实验采用广西巴马小型猪，在肠腔分流情况下行肝门血流阻断，研究表明，经过 90 min 缺血后，动物均长期存活，并且肝功、病理均恢复正常；而经过 100 min 缺血后，动物死亡率为 55.6%，死亡动物尸检见汇管区大量出血，白细胞聚集，血管及胆管正常结构消失，组织大片溶解坏死。由此可见在肠腔分流避免门静脉淤血情况下，正常广西巴马小型猪肝脏常温缺血 90 min，其肝脏结构和功能损伤可于复流后逐步恢复正常，进一步证实常温下避免门静脉淤滞的情况下正常猪耐受入肝血流阻断的安全时限可达 90 min。这一结果对重新认识肝脏耐受入肝血流阻断的安全时限，从而设计更加合理的入肝血流阻断方式具有指导意义。但应当指出，本研究所提出的安全时限是基于本动物实验条件下取得的，对于临床上应用此方法及各种病理状态下的肝脏在此条件下耐受入肝血流阻断的安全时限变化还有待进一步观察研究。

参考文献：

[1] Chau G Y, Lui W Y, King K L, *et al*. Evaluation of effect of hemihepatic vascular occlusion and the Pringle maneuver during hepatic resection for patients with hepatocellular carcinoma and impaired liver function[J]. World J Surg, 2005, 29(11): 1374 - 1383.

[2] Kim Y I, Hwang Y J, Lee J W, *et al*. 101 hepatectomies under continuous inflow occlusion following simple in-situ liver cooling in patients with chronic liver diseases[J]. Hepatogastroenterology, 2004, 51(58): 1093 - 1098.

[3] Giovanardi R O, Giovanardi H J, Bozetti M, *et al*. Intermittent total pedicular clamping in hepatic resections in non-cirrhotic patients[J]. Hepatogastroenterology, 2002, 49(45): 764 - 769.

[4] Dixon E, Vollmer C M, Jr., Bathe O F, *et al*. Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection[J]. Am J Surg, 2005, 190(1): 75 - 86.

[5] Kanoria S, Glantzounis G, Jalan R, *et al*. A model to study total hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. Transplant Proc, 2004, 36(9): 2586 - 2589.

[6] 冷建军，韩本立，董家鸿. 肝脏缺血再灌注损伤机制和缺血预处理保护作用[J]. 消化外科，2005，4(2)：142 - 148.

[7] Nordlinger B, Douvin D, Javaudin L, *et al*. An experimental study of survival after two hours of normothermic hepatic ischemia[J]. Surg Gynecol Obstet, 1980, 150(6): 859 - 864.

[8] 丁　钧，董家鸿，杨占宇，等. 家猪常温下耐受入肝血流阻断安全时限的研究[J]. 中华实验外科杂志，2004，21(3)：311 - 313.

[9] 黄　芬，王静艳，高　红，等. 鼠血清中 TNF 活性及 HGF、PGE_1 保护肝脏作用的研究[J]. 中国医科大学学报，1993，22(4)：275 - 278.

[10] Rothenberger S, Food M R, Gabathuler R, *et al*. Coincident expression and distribution of melanotransferrin and transferrin receptor in human brain capillary endothelium[J]. Brain Res, 1996, 712(1): 117 - 121.

[11] 陈继业，马正伟，李　昆，等. 肠腔分流条件下巴马小型猪缺血再灌注肝功及病理变化[J]. 消化外科，2005，4(4)：279 - 282.

[12] Liu W, Schob O, Pugmire J E, *et al*. Glycohydrolases as markers of hepatic ischemia-reperfusion injury and recovery[J]. Hepatology, 1996, 24(1): 157 - 162.

[13] Seifalian A M, El-Desoky H, Delpy D T, *et al*. Effects of hepatic ischaemia/reperfusion injury in a rabbit model of Indocyanine Green clearance[J]. Clin Sci (Lond), 2002, 102(5): 579 - 586.

（编辑　龙　亮）