论著

文章编号:1000-5404(2010)19-2062-04

热缺血对大鼠肝移植术后胆管周围血管丛的影响

艾秋宝[1],何 谦[1],张诚华[1],张玉君[2] (362000 福建 泉州,中国人民解放军第180医院普通外科,南京军区肝移植中心[1];400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所[2])

【摘要】 目的 初步探讨供肝热缺血损伤对大鼠肝移植术后胆管周围血管丛的影响。方法 108只受体SD大鼠平均分为假手术组(正常组)、无热缺血组(对照组)及热缺血10 min组(实验组)。分别于术后第1、3、7、14天取9只大鼠处死,检测各组血清碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转肽酶(GGT)、直接胆红素(DBIL)、间接胆红素(IBIL)。另取肝组织行石蜡切片,分别以HE染色和纤维素染色观察移植肝胆管周围血管丛及胆管结构的形态学改变。电镜检测各组各时相点胆管上皮细胞及胆管周围血管丛血管内皮细胞超微结构。结果 实验组术后各时相点血清胆道酶谱和胆红素较相应时相点的对照组和正常组显著升高($P<0.05$),恢复至正常的时间延迟;实验组HE和纤维素染色可见术后胆管周围血管丛损伤及胆管损伤较对照组及正常组严重,且实验组胆管周围血管丛内观察到微血栓形成;电镜下可见实验组术后早期血管内皮细胞损伤严重,且胆管上皮细胞出现缺血缺氧性改变。结论 热缺血再灌注损伤可致胆管周围血管丛损伤及胆管上皮细胞缺血缺氧性改变,可能是肝移植术后缺血型胆管病变和一过性肝内胆汁淤积的重要原因。

【关键词】 肝移植;热缺血损伤;胆管周围血管丛;微循环
【中图法分类号】 R657.3;R332.12;R364.12 【文献标志码】 A

Effect of warm ischemia injury on peribiliary vascular plexus in rats after liver transplantation

Ai Qiubao[1], He Qian[1], Zhang Chenghua[1], Zhang Yujun[2] ([1] Department of General Surgery, Liver Transplantation Center of Nanjing Military Command, No. 180 Hospital of PLA, Quanzhou, Fujian Province, 362000; [2] Laboratory of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of graft warm ischemia injury on peribiliary vascular plexus in rats after liver transplantation. Methods One hundred and eight receptor SD rats were divided into sham operation group (normal group), no warm ischemia injury group (control group), 10-minute warm ischemia injury group (experimental group), 36 rats in each group. Nine rats in each group were killed on days 1, 3, 7 and 14, respectively, after operation. ALP, GGT, DBIL and IBIL in each group were detected. Liver tissue sections were stained with H&E and cellulose to observe changes in morphology of peribiliary vascular plexus and structure of bile duct. Ultra-structures of bile duct epithelium and vascular endothelial cells of peribiliary vascular plexus were observed under electron microscope. Results The serum ALP, GGT, DBIL and IBIL levels were significantly higher in experimental group than in control and normal groups all time points after operation ($P<0.05$) and restored to the normal was later. H&E and cellulose staining showed that the damage of peribiliary vascular plexus and bile duct was severer in experimental group than in control and normal groups after operation. Micro-thrombosis was observed in peribiliary vascular plexus of experimental group after operation. Electron microscopy showed severe damage of vascular endothelial cells and hypoxic-ischemic changes in bile duct epithelial cells in experimental group after operation. Conclusion Warm ischemia-reperfusion injury can lead to damage of peribiliary vascular plexus and hypoxic-ischemic changes in bile duct epithelial cells after liver transplantation, which may be an important reason for ischemic biliary lesion and transient intrahepatic cholestasis after liver transplantation.

【Key words】 liver transplantation; warm ischemia injury; peribiliary vascular plexus; microcirculation

Supported by the General Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Science Development of PLA (06MB153) and the Major Project of Medical Science Research of Nanjing Military Command (09Z022). Corresponding author: Zhang Chenghua, Tel: 86-595-28919211, E-mail: zch180@263.net

【基金项目】 全军医学科研"十一五"计划面上项目(06MB153);南京军区医药卫生科研项目重点课题(09Z022)
【通信作者】 张诚华,电话:(0595)28919211,E-mail:zch180@263.net

肝移植术是目前治疗终末期肝病唯一有效的手段,但肝移植术后缺血型胆管病变(ischemic-type biliary lesion,ITBL)及一过性肝内胆汁淤积(transient intrahepatic cholestasis,TIHC)仍是影响肝移植预后的常见并发症[1,2]。由于国内供肝大部分来源于心脏死亡供体(donation after cardiac death,DCD),再加上国外开始大量利用 DCD 供肝[3]以及活体肝移植的不断开展,使得近年来针对热缺血再灌注损伤(warm ischemia-reperfusion injury)的研究成为热点[4]。胆道系统的血供主要是由肝动脉提供的,肝动脉的大部分终末分支形成胆管周围血管丛(peribiliary vascular plexus,PVP),为胆管上皮细胞提供血供和营养[5]。目前国内外对 PVP 损伤的研究较少。本研究着重探讨热缺血再灌注损伤对大鼠肝移植术后 PVP 的影响,进一步阐明肝移植术后胆道损伤可能的发病机制,为积极预防和治疗胆道热缺血再灌注损伤所致的胆道并发症提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

健康、成年、清洁级、雄性 Sprague-Dawley 大鼠 180 只,体质量 180~220 g,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供,受体体质量略大于供体。所有大鼠平均分为 3 组:假手术组(正常组)36 只;热缺血 0 min 组(对照组)72 只,受体和供体各 36 只;热缺血 10 min 组(实验组)72 只,受体及供体各 36 只。对照组和实验组肝移植术后到处死前死亡的大鼠数量均另外补齐至 9 只。

1.2 手术方法

供受体术前均禁食 12 h,不禁水。采用开放式乙醚持续吸入麻醉,于双人双目显微镜下行清洁手术。正常组:仅行开腹及分离肝周韧带;对照组:供体麻醉满意后,经阴茎背静脉注入肝素钠生理盐水 2 ml(含肝素钠 500 U),开腹后自腹主动脉插管灌注 4 ℃乳酸林格液,灌注的同时游离供肝,待肝脏颜色呈土黄色,切取肝脏保存于 4 ℃乳酸林格液中;实验组:供体麻醉满意后,经阴茎背静脉注入肝素钠生理盐水 2 ml(含肝素钠 500 U),开腹后剪开膈肌,用血管钳夹闭心脏基底部致心脏停搏,热缺血时间自夹闭心脏基底部起至冷灌注时止,共 10 min。余下步骤与对照组类似。

肝移植操作步骤参照 Kamada 等[6]的"二袖套"法及 Lebmann 等[7]的肝动脉吻合法,建立大鼠动脉化原位肝移植模型。各组的冷缺血时间(50±10)min、无肝期(15.3±3.5)min、门静脉开放至肝动脉开放时间(7.5±1.5)min 和手术总时间(2.5±0.25)h 均无显著性差别。

1.3 标本获取及检测指标

各组大鼠分别于术后第 1、3、7、14 天处死,获取肝组织及血清标本,每个时相点各取 9 只大鼠。从下腔静脉取血 4 ml,离心,运用 7150 型全自动生化分析仪进行胆道酶谱碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转肽酶(GGT)、直接胆红素(DBIL)、间接胆红素(IBIL)检测。取大小约 1.0 cm^3 肝组织标本,10% 福尔马林溶液固定 24 h,经脱水透明处理后,石蜡包埋,3 μm 连续切片,行常规 HE 染色和纤维素染色检查观察移植肝 PVP 形态学改变以及胆管结构破坏程度。其中纤维素染色(改良 MSB 法)采用纤维素快速染色试剂盒,按说明书操作,纤维素呈鲜红色,胶原纤维染成蓝色,红细胞呈黄色,细胞核蓝黑色。同时切取大小约 1.0 mm^3 肝组织,4 ℃ 2.5% 戊二醛预固定,包埋,切片,JEM-1400 透射电子显微镜观察并摄片。参照 Hertl 等[8]的方法,根据 HE 染色后胆道上皮细胞不同程度的形态学改变对胆管损伤程度进行分级。0 级:胆管上皮细胞形态正常;1 级:少许(<30%)细胞呈现细胞核固缩或坏死等改变;2 级:30%~60% 的胆管上皮细胞固缩、坏死或脱落;3 级:≥60% 的上皮细胞受到损伤,可见弥漫性上皮细胞脱落,残存的细胞可有固缩、坏死等形态改变。

1.4 统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件行独立样本组间差异 t 检验。

2 结果

2.1 胆道酶谱及胆红素

与正常组比较,对照组及实验组肝移植术后 ALP,GGT 显著升高,且均在术后 3 d 达到最高值,随后逐渐降低,对照组术后 7 d 降至正常,实验组术后 14 d 降至正常。与正常组比较,肝移植术后,对照组及实验组 DBIL,IBIL 显著升高。实验组 DBIL,IBIL 达到最高值和恢复正常的时间都比对照组晚。对照组 DBIL 及 IBIL 均在术后 1 d 达到最高峰,术后 7 d 恢复正常。实验组 DBIL 及 IBIL 在术后 3 d 达到最高峰,术后 14 d 恢复正常(表 1)。

表 1 各组大鼠肝移植术后血清胆道酶谱及胆红素变化

组别	ALP(U/L)	GGT(U/L)	DBIL(μmol/L)	IBIL(μmol/L)
正常组				
术后 1 d	73.6±7.8	17.8±2.7	1.9±0.2	0.9±0.2
术后 3 d	75.0±8.3	19.6±3.8	1.8±0.2	1.0±0.2
术后 7 d	76.3±8.5	16.5±2.4	2.1±0.3	0.9±0.2
术后 14 d	74.9±7.1	19.2±3.5	1.9±0.2	1.0±0.2
对照组				
术后 1 d	172.5±12.1[a]	68.2±4.4[a]	38.9±2.2[a]	14.0±1.1[a]
术后 3 d	189.7±12.3[a]	75.8±4.8[a]	19.7±1.7[a]	11.2±1.0[a]
术后 7 d	83.5±9.6	25.8±4.1	2.3±0.3	1.6±0.4
术后 14 d	80.4±9.2	23.4±3.9	2.1±0.3	1.2±0.2
实验组				
术后 1 d	249.6±16.5[ab]	118.4±6.1[ab]	74.3±4.4[ab]	17.9±1.3[ab]
术后 3 d	297.4±18.7[ab]	147.6±7.5[ab]	107.8±5.5[ab]	37.0±1.9[ab]
术后 7 d	178.7±14.6[ab]	128.3±6.9[ab]	68.5±3.2[ab]	18.7±1.4[ab]
术后 14 d	86.7±9.3	24.2±4.0	2.4±0.3	1.4±0.3

a:$P<0.05$,与正常组比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

2.2 光镜观察

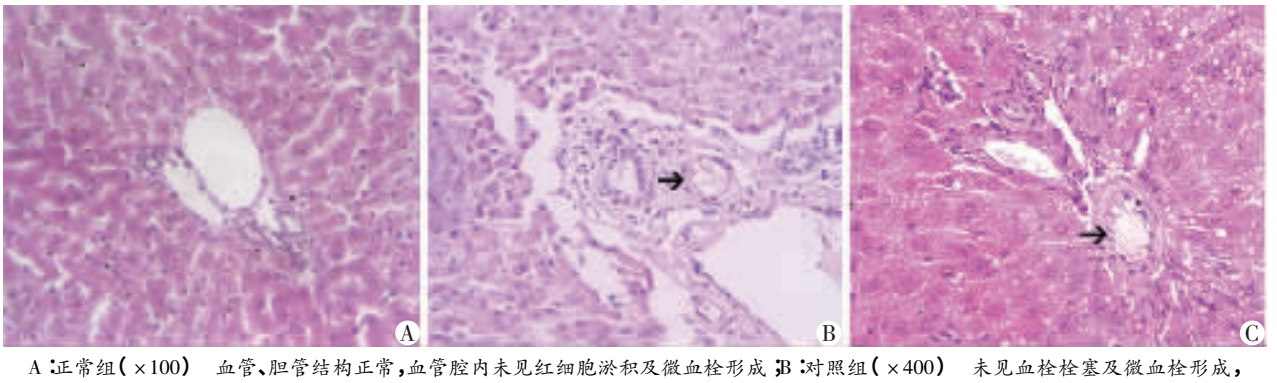
镜下见正常组各时间点胆管周围毛细血管丛结构无明显改变,管腔内未见红细胞淤积及微血栓形成(图 1A)。对照组各时间点可见血管内皮细胞肿胀,少数小叶间血管内可见少许红细胞淤积,未见明显血栓栓塞及微血栓形成(图 1B)。实验组血管内皮细胞明显肿胀,甚至出现坏死、凋亡,管腔内红细胞明显淤积甚至可观察到 PVP 内粉红色均质的微血栓(图 1C),以术后第 1、3 天居多,第 7、14 天逐渐减少。肝动脉主干及大的分支内未见血栓栓塞。纤维素染色证实,实验组 PVP 内血栓是以纤维素为主要成分的透明血栓(图 2A),而正常组和对照

组纤维素染色皆为阴性(图2B、C)。

正常组各时间点胆管损伤程度均为0级;对照组主要为1级,术后第7天基本恢复正常;实验组为2级或3级,术后第7天无血栓处可见胆管上皮细胞增生,第14天基本恢复正常,而胆管周围毛细血管丛内有微血栓处,胆管上皮细胞增生不明显,术后第14天仍可见组织结构损坏的胆管上皮,伴有汇管区纤维化及细胞坏死脱落。

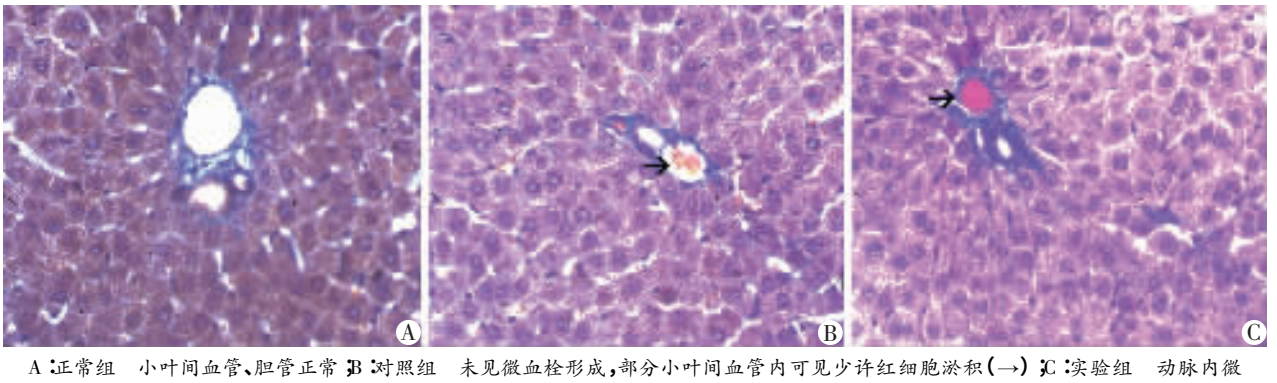
2.3 电镜观察

正常组各时间点胆管上皮细胞和血管内皮细胞结构清晰,完整,细胞核位于中央,核膜、核仁较为清晰。细胞质内细胞器丰富,线粒体形态结构正常,嵴清晰。游离面可见少量形态结构规则的微绒毛(图3A)。对照组肝移植术后第1、3天,胆管上皮细胞和血管内皮细胞水肿,细胞核形态异常,电子密度明显降低,染色质分布异常,核周隙扩张明显。细胞质内线粒体水肿,嵴间隙稀疏,结构不清晰。微绒毛稀少,排列不整齐。未见胆管周围血管丛内红细胞淤积及微血栓形成(图3B)。术后第7天胆管结构基本正常,可见胆管上皮细胞增殖。实验组肝移植术后第1、3天血管丛及胆道损伤较对照组严重,镜下可见胆管上皮细胞缺血缺氧性改变:细胞明显肿胀,细胞质结构破坏、溶解,细胞质内容物团聚,可见大颗粒脂滴。细胞核皱缩,染色质边集,线粒体肿胀较重,出现空泡,线粒体嵴模糊、消失,数目减少,胞浆溶解,微绒毛断裂、脱落(图3C);血管内皮细胞明显肿胀,膜泡形成并向管腔内突起,基底膜结构破坏,细胞器结构不清。血管腔内可见大量异常形态红细胞及白细胞聚集,并见微血栓形成(图3D)。术后第7天管腔内无微血栓形成的血管内皮细胞肿胀逐渐减轻,其周围的胆管上皮细胞开始增生;而管腔内有微血栓形成的血管内皮细胞肿胀未见减轻,其周围的胆管上皮细胞继续坏死、凋亡。术后第14天无血栓形成处胆管结构基本恢复正常;而管腔内有微血栓形成的血管内皮细胞修复不明显,其周围可见坏死的胆管上皮细胞,未见增生的胆管上皮细胞。



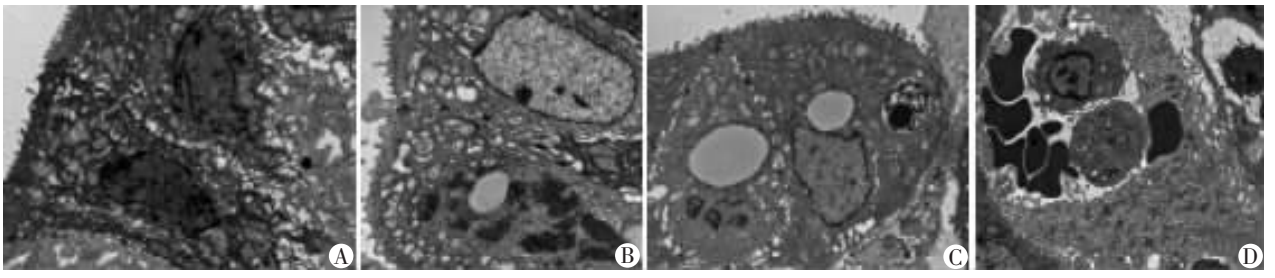
A:正常组(×100) 血管、胆管结构正常,血管腔内未见红细胞淤积及微血栓形成;B:对照组(×400) 未见血栓栓塞及微血栓形成,部分小叶间血管内可见少许红细胞淤积(→);C:实验组(×400) 微小动脉内可见粉红色均质的微血栓(→)

图1 术后第1天各组大鼠肝组织HE染色观察



A:正常组 小叶间血管、胆管正常;B:对照组 未见微血栓形成,部分小叶间血管内可见少许红细胞淤积(→);C:实验组 动脉内微血栓形成,为以纤维素为主要成分的透明血栓(→)

图2 术后第1天各组大鼠肝组织纤维素染色观察(×400)



A:正常组胆道上皮细胞(×5000) 细胞核、细胞质形态结构正常;B:对照组胆道上皮细胞(×5000) 细胞核形态异常,细胞质内线粒体水肿,未见胆管周围血管丛内红细胞淤积及微血栓形成;C:实验组胆道上皮细胞(×5000) 细胞质结构破坏、溶解,可见大颗粒脂滴,细胞核皱缩,线粒体肿胀较重,胞浆溶解;D:PVP内微血栓形成(×3000) 血管腔内可见大量异常形态红细胞及白细胞聚集

图3 术后第3天各组大鼠胆道上皮细胞及血管内皮细胞超微结构观察

3 讨论

近年来很多研究提示肝管疾病、损伤性胆管狭窄和肝移植术后胆道并发症均可能与胆管的微循环有关[9-11]。在肝移植过程中胆管树潜在性遭受很多因素的损害,而大多数因素均是直接或间接地作用于PVP进而导致术后胆道并发症的发生,但至今有关肝移植术后PVP损伤的病理生理过程少见透彻研究,肝移植过程中对这一部分胆道血供的损伤和忽视成为胆道缺血再灌注(Ischemia/Reperfusion,I/R)损伤的重要因素。

本研究发现,热缺血再灌注损伤可导致PVP内炎症细胞聚集;血管内皮细胞肿胀、坏死、凋亡;红细胞淤积、血小板聚集、管腔内微血栓形成;血管内膜损伤、血管收缩等多种病理改变,其中微血栓形成是PVP严重损伤的标志之一(图1C、图3D)。以上诸多病理改变最终引起PVP的损伤和管腔堵塞,进而出现微循环完整性的丧失和血流的减少,对胆道微循环造成严重损害。与此同时,PVP损伤及胆管微循环障碍又可导致胆管上皮细胞缺血、缺氧,出现变性、坏死、凋亡、脱落等病理改变(图1C、图3C),致使上皮细胞丧失功能,胆道酶谱和胆红素显著升高(表1),甚至出现胆管的坏死和狭窄及功能性胆汁淤积等,这有可能是导致肝移植术后非外科吻合技术性胆道并发症尤其是ITBL及TIHC的重要原因。

临床研究发现,通常肝移植患者术后均存在一过性黄疸升高,约在2周内降为正常,而极少部分肝移植术后患者出现持续性胆红素升高,这种黄疸并非胆道狭窄、排斥反应和药物性肝损害等所致,肝穿活检发现毛细胆管内皮细胞异常,且胆管周围终末血管可见不同程度的微血栓形成[12],与本实验结果一致。Olschewski等[13]采用低黏度的HTK液灌注供肝、高黏度的UW液保存供肝,结果提示此法能显著改善肝内微循环。国内外有学者在心脏死亡供体撤除生命支持系统之前静脉注射一定量的肝素、链激酶或尿激酶等抗凝或溶栓物质,以减少PVP内血栓形成,减轻胆管微血管床的损伤,改善胆管微循环障碍,结果提示能显著降低肝移植术后胆道并发症的发生率[14,15],其机制与本实验所观察到的一致,但能否在患者肝移植术后早期对微血栓形成进行积极的预防性治疗,还有待于更多的动物实验和临床研究。

肝移植术中胆道的热缺血损伤可分为首次热缺血和二次热缺血。首次热缺血发生在取供肝时,冷保存之前,尸体肝移植中供肝无疑将遭受严重的首次热缺血损伤。二次热缺血发生在门静脉开放后而肝动脉尚未开放之前。因肝移植术常规在完成肝上下腔静脉和门静脉的吻合后开放血流使供肝再灌注复温,由于胆管血供主要来自于肝动脉,而此时尚未重建肝动脉的血供,可使胆道发生二次热缺血。其中后者对PVP的损伤更大,对胆管结构的破坏作用更为显著,正逐渐引起更多肝移植专家的重视,目前胆道的二次热缺血已成为肝移植学界研究的焦点之一。

总之,热缺血再灌注损伤可导致PVP损伤及胆管微循环障碍,引起胆管上皮细胞缺血缺氧性改变,导致胆管坏死和狭窄,这可能是肝移植术后ITBL和TIHC的重要原因。对PVP的病理生理情况进行深入研究,以积极寻找改善胆道微循环障碍的方法,可为防治肝移植术后胆道并发症开辟新途径。

参考文献:

[1] Cameron A M, Busuttil R W. Ischemic cholangiopathy after liver transplantation[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2005, 4(4): 495-501.
[2] 蒋卫伟,王曙光,陈耿,等. 辛伐他汀对大鼠移植肝胆管损伤的防治作用[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(12): 1325-1328.
[3] Pine J K, Aldouri A, Young A L, *et al*. Liver transplantation following donation after cardiac death: an analysis using matched pairs[J]. Liver Transpl, 2009, 15(9): 1072-1082.
[4] Zhao H F, Zhang G W, Zhou J, *et al*. Biliary tract injury caused by different relative warm ischemia time in liver transplantation in rats[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2009, 8(3): 247-254.
[5] Li W G, Hu S X, Xue B D, *et al*. Observation of hepatohilar peribiliary vascular plexus with complete absence of hepatic artery blood supply in rats[J]. Transplant Proc, 2007, 39(10): 3424-3428.
[6] Kamada N, Calne R Y. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat[J]. Surgery, 1983, 93(1 Pt 1): 64-69.
[7] Lehmann T G, Bunzendahl H, Langrehr J M, *et al*. Arterial reconstruction in rat liver transplantation-development of a new tubing technique of the common hepatic artery[J]. Transpl Int, 2005, 18(1): 56-64.
[8] Hertl M, Harvey P R, Swanson P E, *et al*. Evidence of preservation injury to bile ducts by bile salts in the pig and its prevention by infusions of hydrophilic bile salts[J]. Hepatology, 1995, 21(4): 1130-1137.
[9] 黄志强. 胆道的解剖生理学与肝移植后胆道并发症[J]. 中华外科杂志, 2006, 44(5): 289-291.
[10] Miyagi S, Iwane T, Akamatsu Y, *et al*. The significance of preserving the energy status and microcirculation in liver grafts from non-heart-beating donor[J]. Cell Transplant, 2008, 17(1/2): 173-178.
[11] 张雷达,王曙光,杨占宇,等. 原位全肝移植术后肝内胆管狭窄的病因及诊治[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(1): 84-87.
[12] 张诚华,何谦,陈一杰,等. 持续小剂量尿激酶治疗肝移植术后迁延型胆汁淤积症:附4例报告[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(1): 99-101.
[13] Olschewski P, Hunold G, Eipel C, *et al*. Improved microcirculation by low-viscosity histidine- tryptophan-ketoglutarate graft flush and subsequent cold storage in University of Wisconsin solution: results of an orthotopic rat liver transplantation model [J]. Transpl Int, 2008, 21(12): 1175-1180.
[14] Lang R, He Q, Jin Z K, *et al*. Urokinase perfusion prevents intrahepatic ischemic-type biliary lesion in donor livers [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(28): 3538-3541.
[15] Renz J F. Is DCD for liver transplantation DNR?[J]. Am J Transplant, 2008, 8(3): 485-488.

(收稿:2009-05-13 修回:2009-07-19)
(编辑 邓强庭)