论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1374-04

门静脉血流阻断加重梗阻性黄疸大鼠肝细胞损伤

冯春林[1,2],林 恒[1],冷 凯[2],陈 炜[2],郑晓华[2],主鹤亭[2],别 平[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所[1];563000 贵州 遵义,遵义医院肝胆外科[2])

【摘要】 **目的** 探讨门静脉血流阻断对梗阻性黄疸大鼠肝细胞凋亡的影响。**方法** Wistar大鼠60只,分为A组:胆道再通、门静脉周围游离、切除肝尾状叶,90 min后关腹腔;B组:胆道再通、肝尾状叶分流门静脉、余肝门静脉血流阻断90 min、恢复正常门静脉血流、切除肝尾状叶,关腹。术后0、1、6、24、72 h采集标本,进行组织学观察,测定肝功能及内毒素水平变化并利用TUNEL法检测肝细胞凋亡。**结果** 术后B组肝功能损害更明显($P<0.05$),内毒素水平更高,且肝细胞凋亡也更明显。**结论** 胆道梗阻条件下门静脉血流阻断可能通过损伤肝细胞线粒体导致肝细胞凋亡。

【关键词】 梗阻性黄疸;门静脉阻断;凋亡
【中图法分类号】 R322.47;R657.3;R657.43 【文献标志码】 A

Portal vein occlusion deteriorates hepatocellular apoptosis in rats with obstructive jaundice

Feng Chunlin[1,2], Lin Heng[1], Leng Kai[2], Chen Wei[2], Zheng Xiaohua[2], Zhu Heting[2], Bie Ping[1] ([1]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Hepatobiliary Surgery, Zunyi Hospital, Zunyi, Guizhou Province, 563000, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the effect of portal vein occlusion (PVO) on hepatocellular apoptosis in rats with obstructive jaundice (OJ). **Methods** Sixty rats were randomly divided into two groups, group A and group B. The rats of group A received ligation of common bile duct, and in 1 week after which followed by biliary tract recanalization, liberation of portal vein, resection of caudate lobe of liver and then closure of abdomen in 90 min later. For the animals of group B, they were given portal vein bypass in caudate lobe of liver, PVO of left hepatic tissue in 90 min, then recovery of portal vein flow and resection of caudate lobe of liver. Liver tissue and blood samples were collected at 0, 1, 6, 24 and 72 h post operation, one time point for 6 rats. The histological changes were observed by light and transmission microscopy, hepatic function and serum endotoxin level were measured by biochemical methods, and hepatocellular apoptosis were detected by TUNEL. **Results** Compared to group A, group B presented more severe damaged hepatic function, higher level of endotoxin and more obvious hepatocellular apoptosis. **Conclusion** In the condition of OJ, PVO may damage hepatocelluar mitochondria which leads to cell apoptosis.

【**Key words**】 obstructive jaundice; portal vein occlusion; apoptosis

Corresponding author: Bie Ping, E-mail: bieping@medmail.com.cn

在临床上,一些恶性肿瘤如:胰头癌、Ⅰ型胆管癌等,常以黄疸为首发症状,而由于肿瘤的特殊位置和其侵袭性常早期侵犯门静脉,导致较低的根治性切除率。近年来,联合门静脉切除重建的胰十二指肠切除术得到了较为广泛的认同,提高了这些肿瘤的切除率,但是术中门静脉血流的急性阻断(portal vein occlusion, PVO)对合并有梗阻性黄疸(obstructive jaundice, OJ)的肝脏必然造成进一步的损害,限制了这类肿瘤切除率的进一步提高。既往我们的研究表明OJ大鼠耐受PVO的安全时限为60 min[1],但PVO对肝脏造成损伤的机制尚不清楚,探明其可能损伤机制对于临床如何把握PVO时间以及如何保护肝脏将有重要意义。

【通信作者】 别 平,E-mail:bieping@medmail.com.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar大鼠60只,雌雄不限,体质量220~250 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),雌雄不拘,术前禁食 12 h,自由饮水,术后自由进食和饮水,所有动物手术均采用乙醚吸入麻醉,经腹部正中切口。

1.2 动物实验模型的制作及分组

1.2.1 结扎胆总管　开腹后,显露肝门,略为分离胆总管,于十二指肠上缘以 3-0 丝线双重结扎胆总管,不切断以免胆总管回缩,1-0 丝线连续缝合关闭腹腔。精心饲养 1 周。

1.2.2 胆道再通、门静脉血流阻断、肝尾状叶分流　1 周后,经原切口开腹,仔细分离粘连,显露胆总管和门静脉;以硅胶管行胆总管-十二指肠架桥。A 组:90 min 后切除肝尾状叶,关腹。B 组:阻断门静脉,但保留尾叶门静脉血液回流通道,90 min 后,恢复肝脏门静脉血供,切除肝尾状叶后关腹。

1.3 标本采集时间及采集内容

1.3.1 标本采集时间　各组动物均在术后 0、1、6、24、72 h 5 个时间点采集标本,每组每个时相点 6 只大鼠,共 60 只大鼠。

1.3.2 标本采集内容　血清标本:动物乙醚麻醉、开腹后,于下腔静脉穿刺抽血 4 ~ 5 ml,冰浴,4 ℃下 3 000 r/min 离心 15 min,取上清置于 -70 ℃保存待测。肝组织标本:切取 1.0 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小肝组织浸入 10% 甲醛中固定保存;切取部分肝脏修剪成 1 mm×1 mm×1 mm 组织块于 3% 戊二醛中固定保存。观察指标及检测方法:全自动生化分析仪检测血清 ALT、AST 及 TBIL 变化水平;光镜下和透射电镜下观察肝脏病理形态学及超微结构改变;uUTP 缺口末端标记法(TdT-mediated Dutp-Biotin nick and labeling,TUNEL)检测肝细胞凋亡。

1.4 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有数据应用 SPSS 13.0 软件进行分析,均数的比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组血清 ALT、AST 及 TBIL 变化水平

从表 1 及表 2 可以看出,未缺血的 A 组大鼠因胆道再通后,术后 ALT 和 AST 水平逐渐下降趋势,说明胆道梗阻解除一定程度上使肝脏损害得到恢复;而遭受缺血损伤的 B 组均呈逐渐升高趋势,均在术后 6 h 达高峰,到术后 24 h 仍呈继续增高趋势,与 A 组相比有显著性差异($P<0.05$)。说明虽然消除了 OJ 的继续损害,但 PVO 将进一步加重肝脏损害。

表 1　2 组大鼠不同时间点 ALT 变化水平[$n=6$,($\bar{x} \pm s$) U/L]

组别	0 h	1 h	6 h	24 h	72 h
A 组	196.31 ±20.88	239.26 ±24.89	344.40 ±27.65	3 28.07 ±22.90	259.85 ±21.45
B 组	546.81 ±45.14[a]	631.44 ±50.84[a]	824.07 ±73.85[a]	852.12 ±78.66[a]	958.53 ±72.91[a]

a:$P<0.05$,与 A 组比较

表 2　2 组大鼠不同时间点血清 AST 水平的变化[$n=6$,($\bar{x} \pm s$) U/L]

组别	0 h	1 h	6 h	24 h	72 h
A 组	135.33 ±14.02	148.53 ±18.18	128.11 ±14.67	98.88 ±12.09	91.79 ±8.18
B 组	483.81 ±39.31[a]	586.26 ±46.16[a]	722.61 ±50.38[a]	745.04 ±57.25[a]	793.40 ±59.33[a]

a:$P<0.05$,与 A 组比较

从表 3 中可以看出,未缺血 A 组因胆道再通后 TBIL 水平在术后各时相点呈逐渐下降趋势、而遭受缺血损伤 B 组术后 TBIL 水平均呈逐渐升高趋势,在术后 6 h 达高峰,在术后 24 h 仍呈继续增高趋势,与 A 组相比有显著性差异($P<0.05$)。

表 3　2 组大鼠不同时间点血清 TBIL 水平的变化
(μmol/L, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	0 h	1 h	6 h	24 h	72 h
A 组	185.82 ±13.33	145.58 ±13.57	135.98 ±12.82	96.52 ±8.70	45.51 ±5.90
B 组	567.22 ±43.97[a]	620.77 ±47.88[a]	766.16 ±51.70[a]	823.18 ±54.92[a]	875.93 ±67.07[a]

a:$P<0.05$,与 A 组比较

2.2 门静脉内毒素水平变化

从表 4 中可以看出,未缺血的 A 组大鼠术后因胆道再通其 ETX 水平,在术后各时相点呈逐渐下降趋势,说明胆道梗阻在本实验中是 ETX 增高的主要因素,而 胆道再通是有利于消除 ETX 的重要措施;在受到 PVO 损伤的 B 组其 ETX 在术后各时相点呈大幅度的逐渐升高,到术后 72 h 亦无明显下降趋势;有显著性差异($P<0.05$)。

表 4　2 组大鼠不同时间点 ETX 变化水平(Eu/ml, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	0 h	1 h	6 h	24 h	72 h
A 组	57.46 ±4.43	43.23 ±3.95	36.59 ±2.88	26.59 ±2.34	17.23 ±2.26
B 组	186.23 ±14.16[a]	215.68 ±20.11[a]	266.16 ±21.53[a]	285.13 ±25.28[a]	320.04 ±33.23[a]

a:$P<0.05$,与 A 组比较

2.3 血清 TNF-α 变化水平

从表 5 中可以看出,A 组大鼠虽未受到 PVO 损伤,但因有胆道梗阻的基础损伤,在术后各时相点即可观察到血清 TNF-α 水平的升高,并呈现出先升高后下降的趋势,说明 OJ 是引起血清 TNF-α 水平升高的原因之一;在受到 PVO 损伤的 B 组其 TNF-α 水平在术后各时相点呈大幅度的逐渐升高,到术后 72h 亦维持在较高水平,有显著性差异($P<0.05$)。

表 5　2 组大鼠不同时间点血清 TNF-α 变化水平
(ng/ml, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	0 h	1 h	6 h	24 h	72 h
A 组	2.57 ±0.22	2.84 ±0.29	3.87 ±0.43	3.18 ±0.35	2.65 ±0.25
B 组	6.36 ±0.59[a]	6.84 ±0.53[a]	7.85 ±0.68[a]	7.51 ±0.65[a]	7.14 ±0.54[a]

a:$P<0.05$,与 A 组比较

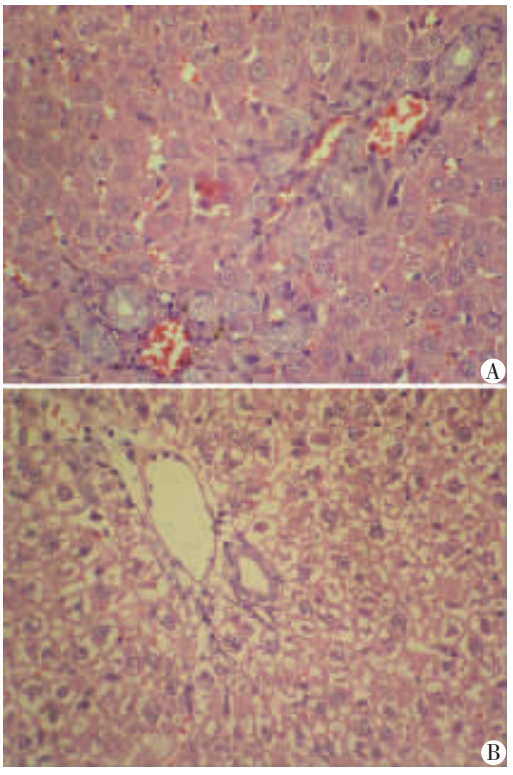
2.4 HE 染色观察病理形态学改变

A 组:肝细胞轻度浊肿,肝门、肝索结构尚清晰,汇管区小胆管见轻度淤胆,汇管区极少量淋巴细胞浸润(图 1A);B 组:肝组织结构紊乱,肝细胞广泛空泡化及坏死,炎细胞浸润淤胆较重(图 1B)。

2.5 透射电镜观察

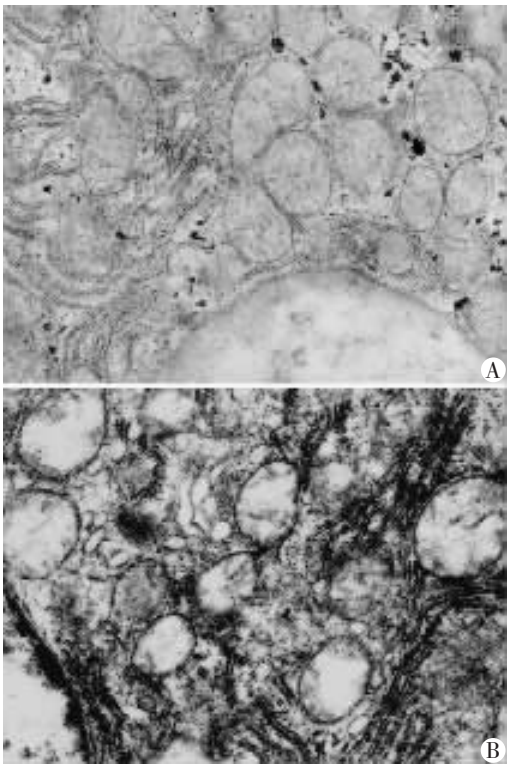
A 组:肝细胞线粒体结构完整,基质均匀,未见明显异常(图 2A);B 组:肝细胞线粒体高度肿胀呈大泡状改变(图 2B)。

根据结果我们发现 OJ 大鼠 PVO 后,肝脏出现明显病理学改变,主要表现为肝脏肿胀,质地粗糙,颜色呈黄褐色;肝组织结构紊乱,肝细胞出现变性、坏死、小胆管增生,炎细胞浸润;肝细胞线粒体出现明显肿胀,基质密度减低甚至消失,嵴断裂、减少、消失,严重者整个线粒体高度肿胀呈大泡状改变。



A:A组;B:B组

图1 2组大鼠肝组织病理观察 (HE ×400)



A:A组;B:B组

图2 2组大鼠肝细胞超微结构观察 (TEM ×14 000)

2.6 TUNEL法检测肝细胞凋亡

从表6可以看出,各组术后0 h即有肝细胞凋亡,未缺血的A组大鼠因胆道再通后,术后肝细胞凋亡率逐渐下降趋势,说明胆道梗阻解除一定程度上使肝细胞凋亡减轻;而遭受缺血损伤的B组术后肝细胞凋亡率均呈逐渐升高趋势,在术后6 h达高峰,在术后24 h呈现缓慢下降趋势,与A组相比有显著性差异($P<0.05$)。说明虽然消除了OJ的继续损害,但PVO将进一步加重肝脏损害。

表6 2组大鼠肝细胞凋亡率[$n=6$,($\bar{x}\pm s$)%]

组别	0 h	1 h	6 h	24 h	72 h
A	9.13±1.50	9.53±1.43	12.67±2.67	11.06±2.67	8.52±1.37
B	11.65±2.20[a]	39.84±4.22[a]	52.3±4.51[a]	49.51±3.84[a]	48.00±3.78[a]

a:$P<0.05$,与A组比较

3 讨论

3.1 梗阻性黄疸与内毒素血症

门静脉是肝脏的功能血管,不仅供应70%~75%的血量和40%~60%的氧量[2-3]还将胃肠道吸收的营养和某些有毒物质输入肝内进行代谢和加工处理。此外,促进肝再生的营养因子和激素成分亦来自门静脉。因此PVO对肝脏带来的损害是一个十分重要的问题,尤其是对于合并OJ等基础疾病的肝脏,虽可以通过门静脉预分流或转流的方式予以消除PVO对肝外器官的影响和门静脉淤血引起的内毒素血症,但OJ本身可以引起ETX升高,从而诱导TNF-α的升高,后者介导了肝细胞的损伤。TNF-α可激活细胞因子的级联反应,诱发白细胞介素-1(interleukin,IL),IL-6,IL-8,血小板活化因子(platelet activating factor,PAF)、前列腺素和白三烯的分泌,激发炎症连锁反应,导致所谓“瀑布效应”,最终使肝细胞功能受损。正常情况下,胆汁酸盐进入肠道,作为表面激活剂,能够灭活、分解内毒素或抑制细菌生长。OJ时胆盐返流入血而不能进入肠道,肠道内细菌繁殖。内毒素释放增多,灭活减少。同时,肠黏膜发生明显的病理改变[4];黏膜下层水肿,肠上皮细胞变性、坏死或脱落,线粒体肿胀,内质网扩张。这些病变造成肠黏膜屏障功能受损,细菌和内毒素易进入血液循环,加之肝脏网状内皮系统清除功能下降,势必造成ETX血症。而ETX又可通过激活TNF-α进一步诱导机体免疫抑制和胃肠黏膜损伤,从而造成恶性循环[5-6]。

从本部分实验中观察到,未缺血的A组大鼠术后因胆道再通,其门静脉ETX水平和血清TNF-α水平在术后各时相点呈逐渐下降趋势,肝功指标ALT、AST及TBIL水平也逐渐下降,两者变化呈正相关。提示胆道梗阻在本实验中是ETX增高的主要因素,而胆道再通有利于降低门静脉血ETX水平和血清TNF-α水平,从而起到防止肝脏功能进一步损害的作用;在受到PVO

损伤的B组其门静脉血ETX和血清TNF-α在术后各时相点呈大幅度的逐渐升高,到术后72 h亦无明显下降趋势,其ALT、AST及TBIL水平也呈现一致性变化,与A组比较有显著性差异($P<0.05$)。说明OJ可以通过ETX和TNF-α触发肝损害,门-腔分流虽可消除因门静脉系统淤血引起的ETX,但无法消除OJ所引起的ETX及其诱发的TNF-α水平的升高,只有通过解除胆道梗阻才能有效的降低ETX水平和缓解肝脏功能受损。

3.2 PVO与肝细胞凋亡

肝脏是一个高度需氧的器官,肝脏缺血后,氧浓度急剧下降,无氧酵解替代了有氧代谢提供能量。肝脏缺血再灌注损伤(Ischemical reperfusion injury,IRI)是复杂的,涉及细胞凋亡和坏死途径。有研究研究认为,门静脉缺血对肝血窦内皮细胞和枯否氏细胞更为敏感,其损伤更为严重,相继释放大量细胞因子如TNF、MDA、IL等,进一步造成肝细胞受损[7-10];但Rokicki等[11]的研究表明,保持部分门静脉供血与完全阻断门静脉供血对肝脏增生有很大差别。大鼠门静脉供血完全中断后,只有肝细胞受损,而单核-吞噬细胞作用功能仍保持正常[12]。Ding[13]和Neuman[14]认为在缺血再灌注(Ischemia reperfusion,IR)引起肝损伤、病毒性肝炎、酒精性肝炎等肝脏疾病中,凋亡占有重要位置,由IR引发TNF-R1的激活可以诱发多条凋亡通路,如B细胞淋巴瘤/白血病-2(B-cell lymphoma /leukemia-2, Bcl-2)家族、氧自由基、C-Jun氨基末端激酶(JNK)等通路。

近年来,越来越多的证据说明凋亡在IRI中发挥重要作用,Jiang等[15]认为热缺血再灌注(warm ischemia reperfusion,WIR)导致攻击性炎症因子和氧自由基的释放,引起肝脏损伤,而凋亡是WIR造成损伤的中心机制,实验制备Wistar大鼠WIR模型,应用苦参碱(缺血前30min静脉给予)抑制凋亡,结果与对照组相比凋亡受到明显的抑制,流式细胞学方法检测凋亡指数下降了65%,血浆ALT和AST水平明显下降($P<0.05$),肝脏受到保护。

从本实验中也观察到B组出现ALT、AST及TBIL水平的急剧升高和明显的肝细胞凋亡,其血清ALT、AST及TBIL水平和凋亡率显著高于未缺血的A组($P<0.05$)。通过电镜观察,肝组织病理改变明显的B组其线粒体高度肿胀呈大泡状改变(图2B),其损伤改变具有一致性。说明OJ条件下PVO肝损害可能是通过损伤肝细胞线粒体而导致肝细胞凋亡,但其如何介导线粒体的损伤、触发肝细胞凋亡的机制是一个非常复杂的病理生理过程,我们将在下一部分实验中作更为深入的研究。

参考文献:

[1] 冯春林,别平,林恒,等. 门静脉转流下门静脉缺血对梗阻性黄疸大鼠肝脏能量代谢的影响[J]. 实用临床医药杂志,2007,11(4):35-38.

[2] Ferri M, Gabriel S, Gavelli A, *et al*. Bacterial translocation during portal clamping for liver resection. A clinical study[J]. Arch Surg, 1997, 132(2):162-165.

[3] Lebrec D, Bataille C, Bercoff E, *et al*. Hemodynamic changes in patients with portal venous obstruction[J]. Hepatology, 1983, 3(4):550-553.

[4] 王万铁,徐正,林丽娜.. 家兔门脉阻断和再开放对心脏血流动力学的影响[J]. 温州医学院学报,1995,25(1):4-6.

[5] Deitch E A, Sittig K, Li M, *et al*. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut[J]. Am J Surg, 1990, 159(1):79-84.

[6] Greve J W, Gouma D J, Soeters P B, *et al*. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins:a study with germ-free rats[J]. Gastroenterology, 1990, 98(2):478-485.

[7] Scott-Conner C E, Grogan J B, Scher K S, *et al*. Impaired clearance of Escherichia coli bacteremia in early biliary obstruction[J]. Am J Surg, 1989, 157(2):210-214.

[8] Mckeown C M, Edwards V, Phillips M J, *et al*. Sinusoidal lining cell damage:the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat[J]. Transplantation, 1988, 46(2):178-191.

[9] Galdwell-kenkel J C, Thurman R G, Lemasters J J. Selective loss of nonparenchymal cell viability after cold ischemic storage of rat livers[J]. Transplantation, 1988, 45(4):834-837.

[10] 王立明,刘浩,刘永峰,等. 肝脏低温保存时肝窦内皮细胞损伤的研究[J]. 中华器官移植杂志,1997,18(4):221-222.

[11] Rokicki M, Rokicki W. Liver regeneration in rats after complete and partial occlusion of the portal blood influx [J]. Res Exp Med (Berl), 1993, 193(5):305-313.

[12] Edgcomb L P, Eckhauser F E, Porter-Fink V L, *et al*. Effects of portacaval shunt and portacaval transposition on hepatocellular and hepatic reticuloendothelial cell activity in the dog[J]. J Surg Res, 1984, 36(5):446-452.

[13] Ding W X, Yin X M. Dissection of the multiple mechanisms of TNF-alpha-induced apoptosis in liver injury[J]. J Cell Mol Med, 2004, 8(4):445-454.

[14] Neuman M G. Apoptosis in diseases of the liver [J]. Crit Rev Clin Lab Sci, 2001, 38(2):109-166.

[15] Jiang H, Meng F, Li J, *et al*. Anti-apoptosis effects of oxymatrine protect the liver from warm ischemia reperfusion injury in rats[J]. World J Surg, 2005, 29(11):1397-1401.

(收稿:2011-05-04 修回:2011-05-29)

(编辑 邓强庭)