乙酸消融胆道的实验研究

杨爱军[1ab]，李晓武[1a]，董家鸿[2]（1.第三军医大学：a.西南医院肝胆外科；b.基础医学部外科应用解剖与手术学教研室，重庆 400038；2.解放军总医院肝胆外科，北京 100853）

［摘 要］ **目的** 探讨乙酸消融家兔胆道后病理及肝功改变，为临床应用消融栓塞胆道治疗肝内胆管结石提供实验依据。**方法** 观察家兔右外叶胆道于25%至5%浓度乙酸消融后肝脏功能状态、肝组织病理改变和术后存活情况。**结果** 25%乙酸胆道消融造成右外叶肝脏大块坏死，仅肝叶边缘有少量存活肝组织。20%乙酸胆道消融后近肝门部肝实质以汇管区为中心的坏死，肝叶中部见汇管区及周围少量肝细胞坏死，肝叶边缘见汇管区点状坏死。15%乙酸胆道消融后近肝门部见汇管区及周围少量组织坏死，肝叶中部及边缘组织见胆管无明显改变，周围组织点状坏死。10%乙酸胆道消融后近肝门部汇管区胆管坏死，周围充血，肝叶中部胆管上皮完整，周围组织充血，肝叶边缘胆管完整，周围少量肝细胞肿胀。5%乙酸胆道消融后近肝门部胆管上皮坏死，肝叶中部胆管上皮完整，仅充血或少量肝细胞肿胀。**结论** 20%为乙酸消融胆道较理想的浓度。

［关键词］肝内胆管结石；乙酸；消融；病理改变

［中图分类号］R575.62 ［文献标识码］A ［文章编号］1672-5042(2010)02-0086-03

Preliminary screening of acetic acid for selective bile duct ablation and embolization

YANG Ai-jun, LI Xiao-wu, DONG Jia-hong (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study pathological changes after ablation with acetic acid in intrahepatic bile ducts in rabbits. **Methods** Thirty rabbits were divided into group A(25% acetic acid, $n=6$), group B(20% acetic acid, $n=6$), group C(15% acetic acid, $n=6$), group D(10% acetic acid, $n=6$), group E(5% acetic acid, $n=6$). The hepatic histopathology and the survival rate of the rabbits were observed. **Results** In group A, right external lobe liver was barely completely necrosis after ablation with 25% acetic acid. There was only a few of normal liver tissues remain at the edge of liver lobe. In group B, portal area tissues and some liver cells nearby were necrosis near porta hepatis. In the middle and at the edge of lobe, portal areas were necrosis. In group C, portal area tissues and a few of liver cells nearby were necrosis near porta hepatis. In the middle and at the edge of lobe, there were no obviously changes in the introhepatic bile ducts. In group D, the introhepatic bile ducts near porta hepatis were necrosis and portal areas were congested. In the middle of lobe were congested. The biliary tracts were normal at the edge of lobe and there were not obviously hepatic tissues necrosis. In group E, the epithelia of bile ducts near porta hepatis were necrosis. In the middle of the lobe or at the edge, there were some liver cells swelling. **Conclusions** 20% is the proper concentration of acetic acid for selective bile duct ablation.

Keywords: hepatolithus; acetic acid; ablation; pathological changes

肝内胆管结石是按肝内胆道系统分布的节段性、区域性疾病。基于肝内区域胆管完全梗阻后可造成分布区域肝脏组织的萎缩纤维化而“自裁”的特点，我们考虑通过区域肝内胆道消融栓塞人为造成栓塞区域肝脏组织的萎缩纤维化，祛除结石复发的条件和环境，以期达到治疗无法手术治疗的肝内胆管结石病的目的，为无法实施外科手术治疗的肝胆管结石的治疗寻找新的治疗途径。应用胆道消融剂杀灭胆道细菌并毁损胆管粘膜，再用氰基丙烯酸酯（粘堵剂）永久地填充病变的胆管腔[1-2]，根除结石产生的条件及环境，以期达到临床治疗目的。本实验拟通过对比不同浓度乙酸消融肝内胆道，筛选较理想乙酸浓度，为临床应用提供实验研究依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验组一健康日本大耳兔18只，雌雄各半，体重(2.33±0.076)kg。实验组二健康雄性日本大耳兔30只，体重(2.31±0.078)kg，随机均分为25%、20%、15%、10%及5%乙酸消融五个组，每组6只。

1.2 手术方法

1.2.1 兔右外叶胆道容积测定 兔右外叶胆道容积测定：实验组一动物于术前12 h禁食水。肌注速眠新Ⅱ麻醉(0.2 mL/kg)，仰卧位固定。取正中切口。显露肝门部胆管，3/0丝

［作者简介］杨爱军(1977-)，男，云南省昆明市人，讲师，硕士，主要从事肝内胆管结石方面的研究。电话：(023)68752251，E-mail：yangaijun1977@gmail.com.cn

［通迅作者］董家鸿，教授，电话：(010)66939817

［收稿日期］2010-02-10 ［修回日期］2010-03-10

线结扎右外叶胆管远端,显微剪右外叶胆管剪一小口,插入细硅胶管(直径 1 mm,总长度 5 cm)并固定,硅胶管插入长度 2 ~ 3 mm。右侧腹壁戳孔引出腹腔。兔仰卧位固定于 X 光机下,设定透视条件,以微量注射泵自胆道引流管(细硅胶管)注入以生理盐水 1∶1 稀释的复方泛影葡胺。透视下动态观察造影情况。右外叶胆道三级分支显影良好(图 1)时测得造影剂用量(0.249 ±0.008)mL。



图 1 兔右外叶胆道造影

1.2.2 胆道消融栓塞 实验组二动物手术方法同前述。据分组自硅胶管注入胆道消融剂 0.25 mL,夹闭硅胶管 20 min。等量生理盐水冲洗 3 次。注入等量栓塞剂 OB 胶。

1.3 观察指标

1.3.1 组织形态学观察 于胆道消融栓塞术后 24 h,分别于右外叶边缘、右外叶肝门及二者连线中点等处各取 0.8 cm × 0.8 cm 肝组织标本,10% 福尔马林固定后,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察组织结构改变情况。

1.3.2 肝脏酶学及胆红素检测 分别于术前及术后 24 h 由耳缘静脉抽取动物血液样品 2 mL,应用自动生化分析仪测定血液中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、γ-谷氨酰转肽酶(GGT)及碱性磷酸酶(AKP)含量变化。

1.4 统计学处理

计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据应用 SPSS 13.0 软件统计分析,多组均数间的比较采用 ONE-WAY ANOVA 检验及两两比较,$P < 0.05$ 判定为有统计学差异。

2 结果

2.1 动物一般情况

各组动物术后无死亡,存活率 100%。

2.2 肝功能指标

谷丙转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)和 γ-谷氨酰转肽酶(GGT)术后各组均较术前明显增高,25%、20% 及 15% 乙酸消融三组间无显著差异,但与 10% 和 5% 乙酸消融组间有显著差异(表 1)。

表 1 术后各组肝功能指标比较

组别	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	GGT(IU/L)	ALP(IU/L)
术前	50.7 ±17.2	16.7 ±13.1	8.0 ±5.6	125.7 ±47.0
25%	385.7 ±129.6*	248.3 ±62.6*	33.3 ±19.4*	199.3 ±82.9*
20%	341.7 ±110.1*	203.7 ±29.8*	29.3 ±10.7*	152.3 ±47.7
15%	337.0 ±60.1*	335.3 ±174.6*	19.7 ±4.7*	138.7 ±76.5
10%	179.7 ±73.5*	242.0 ±155.1*	15.0 ±2.6*	148.3 ±21.5
5%	165.7 ±174.3*	334.3 ±250.3*	34.3 ±18.8*	221.7 ±33.6*

*:与术前比较,$P < 0.05$

2.3 病理改变

2.3.1 25% 乙酸消融组 胆道消融剂注入后,兔右外叶表面即出现密集白色斑点。术后 24 h,腹腔内未见明显粘连,无腹水,右外叶密布白色斑点,数目较术后即时增多,近肝门部分斑点融合。剖面见右肝叶大部分坏死。HE 染色:近肝门部组织完全坏死,残留红色均染物质。肝叶中部组织出现以汇管区为中心的大片坏死,坏死灶间残留少量存活肝细胞,坏死灶周围充血,少量炎性细胞浸润。肝叶边缘组织出现以汇管区为中心的大片坏死,坏死灶间残留少量存活肝细胞,坏死灶周围充血,少量炎性细胞浸润。

2.3.2 20% 乙酸消融组 胆道消融剂注入后,兔右外叶表面即出现少量白色斑点,近肝门部斑点较多。术后 24 h,腹腔内未见明显粘连,无腹水,右外叶弥布白色斑点,数目较术中增多,近肝门部分斑点融合。剖面见沿汇管区坏死灶。HE 染色:近肝门部胆管及周围部分肝细胞坏死,为红色均染物质,保留细胞基本形态,存活肝组织充血。肝叶中部组织呈现以汇管区胆管坏死,均匀红染,汇管区周围少量肝细胞坏死。肝叶边缘组织呈现以汇管区为中心的点状坏死,未见存活胆管上皮(图 2)。

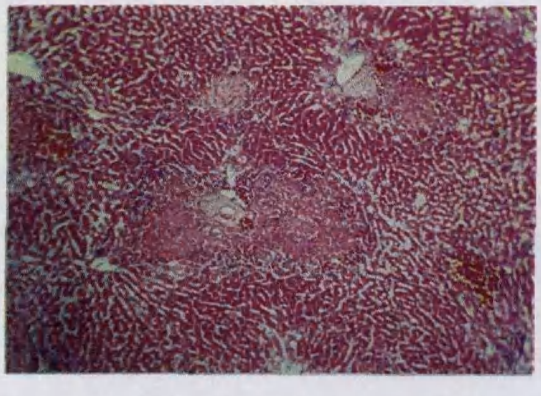


图 2 20% 乙酸胆道消融术后 24 h 肝组织 HE 染色

2.3.3 15% 乙酸消融组 胆道消融剂注入后,兔右外叶表面近肝门出现数个白色斑点。术后 24 h,腹腔内未见明显粘连,无腹水,右外叶少量白色斑点,数目较术中增多。剖面见肝门部汇管区坏死,坏死灶胆汁染色,其余部分未见异常。HE 染

色:近肝门部胆管坏死,周围少量肝细胞坏死,为红色均染物质,保留细胞基本形态,存活肝组织充血。肝叶中部胆管未见明显改变,周围肝组织点状坏死。肝叶边缘胆管无明显改变,胆管上皮完整,周围肝组织点状出血坏死灶。

2.3.4 10% 乙酸消融组 胆道消融剂注入后,兔右外叶近肝门表面即出现少量白色斑点,肝脏颜色略红,淤血可能。术后 24 h,腹腔内未见明显粘连,无腹水,右外叶色暗红,近肝门处见白色坏死斑点。剖面见右肝叶肝门部坏死灶,胆汁染色。HE 染色:近肝门部胆管上皮坏死,周围充血,炎细胞浸润。肝叶中部胆管上皮完整,周围部分肝组织充血。肝叶边缘胆管完整,周围少量肝细胞肿胀。

2.3.5 5% 乙酸消融组 胆道消融剂注入后,兔右外叶表面即出现花斑,似供血改变。术后 24 h,腹腔内未见明显粘连,无腹水,右外叶色暗红,近肝门处见少量白色坏死斑点。剖面见右肝叶肝门部坏死灶,胆汁染色。HE 染色:近肝门部胆管上皮坏死,周围充血,炎细胞浸润。肝叶中部胆管上皮完整,周围部分肝组织充血。肝叶边缘见胆管完整,周围少量肝细胞肿胀。

3 讨论

为了寻找能够完全灭活胆道粘膜且副作用小的胆道化学消融剂行胆道消融栓塞,相继有在大鼠等动物进行胆道化学消融的报道,而消融作用结果各异[3-4]。无水乙醇作为消融剂的应用已有 20 多年的历史,其作用基本原理是引起细胞脱水和蛋白质变性,直接导致细胞凝固性坏死,然后局部纤维化,小血管血栓形成,但无水酒精在组织内弥散边界难以确定,可控性不强[5]。同时乙醇主要通过除去细菌菌膜中的脂类,使细菌菌体蛋白质变性凝固发挥杀菌或抑菌作用。70% ~75 % 乙醇杀菌能力最强,可杀死一般病原菌的繁殖体,但对细菌芽孢无效。而无水乙醇因过快凝固细菌表面蛋白,减弱进一步渗透能力,灭菌效果不佳。故无水乙醇不是理想的胆道消融剂。乙酸是机体内环境主要的酸碱缓冲系统之一,2% ~3% 浓度乙酸可食用,无明显毒副作用。乙酸作为消融剂一般采用 50% 的浓度,作用机理与无水酒精类似,而且由于无水酒精不能渗透过肿瘤隔膜,而乙酸 pH 值低,能引起隔膜中的纤维肿胀,促进分子间的化学键解离,能溶解组织间隙中的Ⅰ型、Ⅲ型胶原和肿瘤组织基底膜Ⅳ型胶原成分,因而乙酸的灭活作用强于无水酒精[6]。乙酸属于有机酸,组织扩散能力强,可对周围正常组织造成损害,对肝脏的破坏是非细胞特异性的,主要通过两个途径发挥损伤效应:一是弥散进入细胞后,利用酸的固有特性,直接引起蛋白质的凝固;二是直接破坏膜性结构,影响膜的通透性,加速凝固性坏死形成。另外发现乙酸形成的坏死范围大,较完全,周围肉芽组织反应出现早且厚,并逐渐纤维化,因而认为乙酸破坏作用更强。

综上所述,我们从乙酸中挑选适合胆道消融的浓度。从较高浓度开始,我们据每次实验结果,逐步降低消融剂浓度,直到肉眼未见大块坏死,再根据靶肝叶组织学标本最后确认浓度。我们的实验结果提示经胆道注入较高浓度的消融剂造成了靶肝叶肝组织的大块坏死,甚至是完全坏死,坏死范围局仅限于胆道引流区域肝脏,由此联想若是局限于肝叶或肝段的肿瘤可以经胆道注入较高浓度消融剂使靶肝叶或段完全坏死,杀灭肿瘤。适当浓度的胆道消融剂则在破坏胆道上皮及胆道周围腺体同时,尽可能的保存了肝组织。若胆道消融剂浓度过低,由于胆管内残留的胆汁等液体稀释,肝叶中部及肝边缘的胆管上皮不能灭活,胆汁分泌传输功能存在,未能达到终止胆管上皮分泌,去除结石产生条件的目的[7]。

20% 乙酸消融术后 24 h 病理提示:近肝门部的胆管破坏完全,肝叶中部组织见以汇管区为中心的坏死,外周肝组织见以胆小管为中心的点状坏死。达到破坏胆管上皮及周围腺体,而尽量多保存肝细胞的胆道消融目的。参考各浓度组肝功能变化也可看出 20% 乙酸消融后肝实质损害程度相对较轻。本实验乙酸从较高浓度起始,梯度减低浓度逐步以组织学结果为主,同时考虑肝功能改变情况,初步筛选出 20% 乙酸较适宜行胆道消融栓塞。临床应用胆道消融剂还需对其长期效应、毒性反应等进行进一步实验。

[参考文献]

[1] Kyokane T, Najino M, Oda K, et al. An experimental study of selective intrahepatic biliary ablation with ethanol[J]. J Surg Research, 2001,96(2):188 - 196.

[2] Leahy AL, McCollum PT, O'Gorman S, et al. Cystic duct obliteration and gallbladder mucosal destruction: a feasible alternative to cholecystectomy[J]. Br J Sury, 1991,78(11):1321 - 1324.

[3] 李富宇,何 生,董家鸿,等. 胆道化学性栓塞治疗肝内胆管结石的可行性初探[J]. 中华实验外科,2005,22(9):1132.

[4] 杨爱军,丁 钧,董家鸿. 胆道消融剂在选择性胆道消融栓塞中的选用[J]. 消化外科,2005,4(6):439 - 443.

[5] Livraghi T, Giorgio A, Marin G, et al. Hepatocellular carcinoma and cirrhosis in 746 patients: long-term results of percutaneous ethanol injection [J]. Radiology, 1995,197(1):101 - 108.

[6] Li Y, Zhang HB, Wan N, et al. The patho-experimental study of general chemical ablation agents[J]. Chin J Lab Diagn, 2006,10(9): 1018 - 1020.

[7] 李富宇,蒋力生,李 宁. 胆道化学性栓塞在肝内胆管结石防治中的临床应用前景[J]. 中华肝胆外科杂志,2007,13(4):286 - 287.

(编辑:余汇洋)