DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.021
第26卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 24
2004年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2004

文章编号:1000-5404(2004)24-2227-04

论著

己酮可可碱对小型猪移植肝胆管缺血再灌流损伤保护作用的实验研究

郑树国,董家鸿,李 昆 (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 探讨己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)对小型猪移植肝胆管缺血再灌流(ischemia reperfusion, IR)损伤的保护效应及可能机制。方法 在小型猪同种异体原位肝移植模型上观察保存液中加入PTX,并经肝动脉途径给药对移植肝胆管组织微循环血流量、ATP酶活力、上皮细胞凋亡及病理形态学等的影响。结果 IR+PTX组动物胆管坏死发生率较IR、IR+NS组显著降低,且无动物死亡;与IR、IR+NS两组比较,IR+PTX组术后各时相点GGT、ALP显著降低,术中移植肝胆管组织微循环血流量、Na^+-K^+-ATP酶活力、Ca^{2+}-ATP酶活力显著增加,而凋亡细胞数及病理形态学评分均显著降低。结论 PTX对移植肝胆管IR损伤具有多环节拮抗作用,其可能机制是改善组织微循环、抑制胆管细胞凋亡及维持胆管细胞ATP酶活力。

关键词:己酮可可碱;缺血再灌流损伤;肝移植;胆道并发症;小型猪
中图法分类号:R619.9;R657.3;R972.4 文献标识码:A

Experimental study of the protective effect of PTX on bile duct in grafts against IR injury in the animal model of OLTx in miniature swines

ZHENG Shu-guo, DONG Jia-hong, LI Kun (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of pentoxifylline (PTX) on bile duct in grafts against ischemia-reperfusion (IR) injury and its potential mechanisms in the animal model of OLTx in miniature swines. **Methods** After PTX was added to the preservation solution and administrated through hepatic artery, changes of blood flow, activity of ATPase, apoptosis of epithelial cells, and pathomorphology of the bile duct were investigated in the animal model of OLTx in miniature swines. The animals were divided into IR, IR+NS, and IR + PTX groups. **Results** The results showed that the incidence of biliary necrosis was significantly lower in IR+PTX group than that in IR and IR +NS groups. When compared with those in IR and IR +NS groups, GGT and ALP levels, numbers of apoptosis cells, and scores of pathomorphology were significantly decreased in IR+PTX group, while blood flow, activity of Na^+-K^+ ATPase, Ca^{2+}-ATPase of bile duct in grafts were significantly elevated. **Conclusion** These results suggest that PTX has multiple antagonistic effects against IR injuries of the bile duct. The effects of PTX on bile duct of grafts against IR injuries are possibly correlated with the improvement of the microcirculation, preservation of the ATPase activity of the bile duct, and suppression of the apoptosis of the bile duct cells.

Key words: pentoxifylline; ischemia reperfusion injury; liver transplantation; biliary complication; miniature swine

移植肝胆管缺血再灌流(ischemia reperfusion, IR)损伤是肝移植术后胆道并发症的重要病因学因素,其发生机制复杂,目前尚无有效保护措施。己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)具有广泛的药理作用,从理论上推测,PTX对IR损伤的复杂病理机制可能具有多环节拮抗作用。本研究旨在小型猪同种异体原位肝移植模型上观察证实PTX对移植肝胆管IR损伤的保护作用,并进一步探讨其可能机制,为临床肝移植术后胆道并发

基金项目:全军医学科学技术研究"十五"计划基金重点课题(01Z077),重庆市自然基金重点课题(CSTC 2004 BA5013)
Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01Z077) and the Natural Foundation of Chongqing City (CSTC 2004 BA5013)
作者简介:郑树国(1965-),男,河南省信阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肝脏移植及胰腺外科方面的研究,发表论文30篇。电话:(023)68765310
通信作者:董家鸿,电话:(023)68754168
收稿日期:2004-03-30;修回日期:2004-11-03

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

症的防治提供理论佐证及有效措施。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康巴马小型猪(第三军医大学实验动物中心提供)34 头, 3~6 月龄, 体质量 8~10 kg, 雌雄兼用, 随机(随机数字表法)设定为供、受体, 共行原位肝移植术 17 次。

1.2 手术方法

1.2.1 供肝切取及缺血处理 腹部大"+"切口进腹, 游离肝周韧带和血管, 全身肝素化, 在维持动物呼吸、循环及体温条件下行全肝血流阻断, 开始记录供肝热缺血时间。至设定之热缺血终点(20 min)后立即经门静脉及腹主动脉系统灌注 4 ℃乳酸林格液及 4 ℃ UW 液, 肝表面覆冰屑, 开始记录冷缺血时间。灌注满意后切取供肝, 置 4 ℃ UW 液中修整并保存至规定冷缺血终点(12 h)后置入受体猪。

1.2.2 受体手术 动物术前禁食 24 h, 气管插管全麻, 机控呼吸。上腹反"L"形切口入腹, 切除受体肝, 妥善修整各血管断端。将供肝置入受体动物腹腔, 对端吻合供、受体肝上下腔静脉及门静脉, 恢复肝脏血流, 结束冷缺血。吻合供、受体肝下下腔静脉, 开放下腔静脉血流。植肝过程中经门静脉持续滴注 4 ℃乳酸林格液以避免供肝植入时升温并驱出供肝内富含高钾的 UW 液。采用供、受体肝总动脉吻合重建肝动脉, 供、受体胆总管间断对端吻合。术后每日静脉输液 80~100 ml/kg, 所有存活动物均于术后第 7 天开腹, 取血清、移植肝组织及胆管组织进行指标检测。

1.3 实验设计

本研究供肝热缺血及冷缺血时间分别控制为 20 min 及 12 h, 根据处理方法不同将受体分为 3 组。

缺血对照组组(IR 组, $n=5$): 按以上手术方法行同种异体原位肝移植术。

生理盐水对照组(IR+NS 组, $n=6$): 以等量生理盐水替代 PTX, 余步骤同己酮可可碱治疗组。

己酮可可碱治疗组(IR+PTX 组, $n=6$): 热缺血结束后, 用含 PTX 1.0 g/L 的 4 ℃液灌注并保存供肝至设定之冷缺血时间终点后行同种异体原位肝移植术, 另于植肝过程中经供肝动脉输入 0.25% PTX 注射液 25 mg/kg。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 动物 1 周存活率及胆管坏死发生率

1.4.2 胆系酶谱 分别于术前、术中肝动脉血流开放 1 h 及术后第 1、3、7 天取血标本, Olympus AU2700 型全自动生化分析仪行胆系酶谱检测。

1.4.3 移植肝胆管组织微循环血流量测定 于术中肝动脉血流恢复后 1 h 及术后第 7 天, 以 LDF-Ⅰ/改进型激光多普勒微循环血流仪测定移植肝胆管组织微循环血流量。

1.4.4 移植肝胆管组织 Na^+-K^+-ATP 酶及 Ca^{2+}-ATP 酶活力测定 采用定磷法。

1.4.5 移植肝胆管上皮细胞凋亡检测 采用 TUNEL 法。正常细胞核为蓝色, 凋亡细胞为棕黄色。高倍光学显微镜下(×200)随机选取 10 个视野, 计算凋亡细胞总数, 再计算平均每个视野的凋亡细胞数。

1.4.6 移植肝胆管组织病理形态学 分别于术中肝动脉血流开放后 1 h 及术后第 7 天取移植肝胆管组织, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜观察。并参照 Hertl 等[1]的方法对术中肝动脉血流恢复后 1h 移植肝胆管组织缺血损伤的程度进行量化分级。0 级: 胆管粘膜上皮细胞和粘膜下腺体上皮细胞正常(计 0 分); 1 级: 病变局限于粘膜上皮层, 粘膜上皮细胞有散在性固缩、坏死、脱落, 但其数量不足粘膜上皮上皮细胞总数的 30%, 粘膜下腺体正常(计 1 分); 2 级: 30%~60%的粘膜上皮细胞固缩、坏死、脱落, 30%以下的粘膜下腺体上皮细胞变性、坏死、脱落(计 2 分); 3 级: 超过 60%的粘膜上皮细胞坏死、脱落, 30%~60%的粘膜下腺体上皮细胞变性、坏死、脱落(计 3 分)。

1.5 统计学分析

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 统计程序进行 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 动物 1 周存活率及胆管坏死发生率

IR 组 1 周存活率 80%(4/5), 术后第 6 天因胆管坏死、胆漏死亡 1 例, 存活 1 周 4 例中有 2 例出现肝内外胆管坏死, 胆管坏死率 60%(3/5); IR+NS 组术后 1 周存活率为 83.33%(5/6), 1 例术后第 6 天因胆管坏死、胆漏死亡, 术后第 7 天有 3 例出现胆管坏死, 胆管坏死率为 66.67%(4/6); IR+PTX 组术后 1 周存活率为 100%(6/6), 1 周内未出现动物死亡, 术后第 7 天活检时有 1 例出现胆管坏死, 胆管坏死发生率 16.67%(1/6)。IR+PTX 组胆管坏死率显著低于 IR 组及 IR+NS 组($P<0.05$)。

2.2 胆系酶谱改变

胆系酶谱 GGT、ALP 术中及术后各时相点均较术前升高, IR+PTX 组术中及术后各时相点均显著低于 IR 组及 IR+NS 组, 见表 1。

表 1 各组术中及术后不同时相点 GGT、ALP 变化(IU/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Intraoperative and postoperative changes of GGT and ALP levels in different groups (IU/L, $\bar{x}\pm s$)

Group	Before operation	1 h after hepatic artery reperfusion	Time after operation(d)		
			1	3	7
GGT					
IR	40.80±4.55	118.40±9.02*#	145.40±8.02*#	234.20±13.35*#	135.50±8.06*#
IR+NS	40.33±4.22	120.00±8.97*#	145.83±7.25*#	234.83±12.04*#	137.40±8.17*#
IR+PTX	37.67±5.89	58.67±5.61*	105.00±9.86*	131.33±10.03*	74.17±10.78*
ALP					
IR	239.20±9.15	538.20±15.16*#	643.40±25.30*#	911.00±41.30*#	566.25±13.72*#
IR+NS	243.33±13.02	538.67±13.6*#	644.33±22.75*#	908.67±41.08*#	567.60±12.26*#
IR+PTX	276.67±24.78	434.17±28.85*	517.33±22.4*	647.83±42.31*	369.83±13.61*

*: $P<0.05$, *vs* before operation; #: $P<0.05$ *vs* IR+PTX group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　移植肝胆管组织微循环血流量

IR+PTX 组移植肝胆管组织微循环血流量术中及术后第 7 天分别为(10.80±0.89)mV 和(9.98±0.24)mV, 显著高于 IR 组[术中(6.47±0.42)mV, 术后第 7 天(4.52±0.36)mV] 及 IR+NS 组[术中(6.42±0.35)mV, 术后第 7 天(4.47±0.33)mV], IR 组与 IR+NS 组之间无显著性差异。

2.4　Na^+-K^+-ATP 酶及 Ca^{2+}-ATP 酶活力

IR+PTX 组移植肝胆管组织 Na^+-K^+-ATP 酶及 Ca^{2+}-ATP 酶活力均显著高于 IR 组及 IR+NS 组, IR 组及 IR+NS 组之间无显著性差异(表 2)。

2.5　移植肝胆管上皮细胞凋亡

IR+PTX 组凋亡细胞数显著少于 IR 组及 IR+NS 组(表 2)。

2.6　移植肝胆管组织病理形态学改变

肝动脉血流开放后 1 h 见移植肝胆管粘膜上皮细胞及粘膜下腺体上皮细胞呈不同程度的变性、坏死、脱落, Hertl 积分 IR+PTX 组显著低于 IR 组及 IR+NS 组(表 2, 图 1、2)。

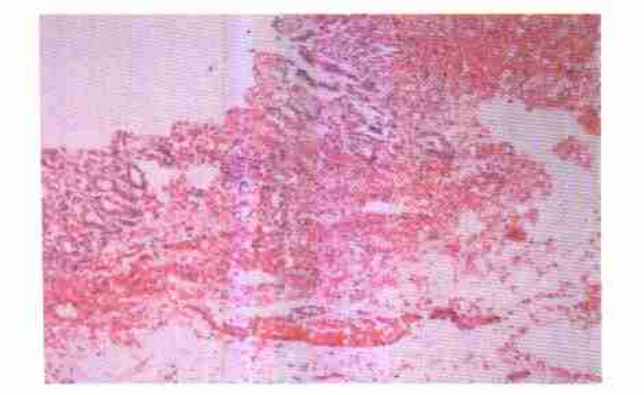


图 1　IR 组胆管粘膜上皮细胞完全脱落, 粘膜下腺体上皮细胞部分脱落　(HE×100)

Fig 1　Epithelial cells of bile duct exfoliated completely while glandular epithelial cells exfoliated partially　(HE×100)

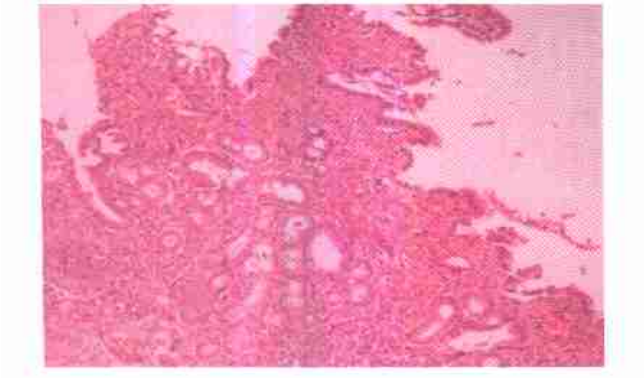


图 2　IR+PTX 组胆管粘膜上皮细胞仅小部分脱落, 粘膜下腺体上皮基本完好　(HE×100)

Fig 2　Epithelial cells of bile duct exfoliated partially while glandular epithelial cells were intact　(HE×100)

表 2　各组移植肝胆管组织 Na^+-K^+-ATP 酶、Ca^{2+}-ATP 酶活力, 细胞凋亡数及病理形态学评分($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Activity of Na^+-K^+-ATPase and Ca^{2+}-ATPase, numbers of apoptosis cell, and pathomorphological scores in each group ($\bar{x}\pm s$)

Parameter	Na^+-K^+-ATPase	Ca^{2+}-ATPase	Number of apoptosis cells	Pathologic score
IR	0.117±0.005	0.126±0.005	151.20±9.91	2.60±0.55
IR+NS	0.117±0.004	0.125±0.005	143.67±7.03	2.50±0.55
IR+PTX	0.194±0.008 *	0.183±0.010 *	72.00±7.16 *	1.50±0.55 *

*: $P<0.05$, *vs* IR group

3　讨论

肝移植术后胆道并发症直接影响患者的生存率和生活质量, 已成为阻碍肝移植疗效进一步提高的重要因素[2]。研究表明, 移植肝胆管缺血再灌注损伤是肝移植术后胆道并发症的重要病因学因素, 严重 IR 损伤可导致移植肝胆管组织不可逆性坏死, 而后者又是移植物丢失和受体死亡的直接原因[3,4]。因此, 移植肝胆管 IR 损伤的防治已成为肝移植领域亟待研究的课题。

移植肝胆管 IR 损伤的发生机制十分复杂, 涉及氧自由基、钙超载、细胞因子、炎性介质及细胞粘附分子等多种病理因素的相互作用和影响[5,6]。既往实验研究所报道的自由基清除剂及血管扩张剂等的作用环节单一, 对移植肝胆管 IR 损伤的保护作用均十分有限, 其在小样本动物实验上所总结的有限资料尚不足以推广到临床。因此, 急需探讨一种具有确切保护作用、能在多环节发挥效应的干预措施。

己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)属甲基黄嘌呤衍生物, 它能清除氧自由基, 改善微循环, 抑制炎症介质及细胞因子的产生和作用[7]。研究表明, PTX 对大脑、肺、肾 IR 损伤具有保护作用[8,9]; PTX 还能增加 IR 后肝脏血流量、改善组织氧合作用和恢复肝细胞功能, 减轻肝组织损害[10]。但 PTX 对移植肝胆管这一特殊类型的 IR 损伤是否具有保护作用, 尚少见报道。

本研究表明 IR+PTX 组移植肝胆管组织病理形态学评分显著低于 IR 组及 IR+NS 组, 特别是 IR+PTX 组术后胆管坏死率显著低于 IR 组及 IR+NS 组, 未出现因胆管坏死、胆漏造成的动物死亡。提示外源性 PTX 对移植肝胆管 IR 损伤具有确切的保护作用。GGT、ALP、Na^+-K^+-ATP 酶、Ca^{2+}-ATP 酶活力在各组不同时相点的差异性变化趋势与病理形态学指标相符合, 从另一侧面印证了 PTX 对移植肝胆管 IR 损伤的保护效应。

为了充分论证 PTX 对胆管 IR 损伤的保护作用, 并进一步探讨 PTX 保护作用的可能机制, 我们还对移

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

植肝胆管组织的微循环血流量以及胆管上皮细胞凋亡情况进行了检测，结果显示：IR＋PTX 组移植肝胆管组织微循环血流量显著高于 IR 组及 IR＋NS 组，而凋亡细胞数则显著低于 IR 组及 IR＋NS 组，进一步证实了 PTX 对移植肝胆管 IR 损伤的保护效应。

以上结果表明，保存液中加入 PTX 并经肝动脉途径给药对移植肝胆管 IR 损伤具有多环节拮抗作用，可减轻移植肝胆管组织 IR 损伤，显著降低肝移植术后早期胆管坏死发生率。其可能机制为改善组织微循环，抑制胆管细胞凋亡及保护胆管细胞 ATP 酶活力。有关 PTX 对移植肝胆管 IR 损伤保护作用的时效、量效关系及其对肝移植术后远期胆道并发症的影响等有待进一步研究。

参考文献：

[1] 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.

[2] Jagannath S, Kalloo A N. Biliary complications after liver transplantation [J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2002, 5(2): 101－112.

[3] Varadarajan R, Golden Mason L, Young L, *et al*. Nitric oxide in early ischaemia reperfusion injury during human orthotopic liver transplantation [J]. Transplantation, 2004, 78(2): 250－256.

[4] Miyagi S, Ohkohchi N, Oikawa K, *et al*. Effects of anti-inflammatory cytokine agent (FR167653) and serine protease inhibitor on warm ischemia-reperfusion injury of the liver graft[J]. Transplantation, 2004, 27(10): 1487－1493.

[5] Koti R S, Seifalian A M, Davidson B R, *et al*. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications [J]. Dig Surg, 2003, 20(5): 383－396.

[6] Net M, Valero R, Almenara R, *et al*. Hepatic preconditioning after prolonged warm ischemia by means of S-adenosyl-L-methionine administration in pig liver transplantation from non-heart-beating donors[J]. Transplantation, 2003, 27(12): 1970－1977.

[7] Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, *et al*. Anti-inflammatory Effect of Pentoxifylline[J]. Chest, 2004, 126(1): 321.

[8] Savas S, Delibas N, Savas C, *et al*. Pentoxifylline reduces biochemical markers of ischemia-reperfusion induced spinal cord injury in rabbits[J]. Spinal Cord, 2002, 40(5): 224－229.

[9] Lauterbach R, Pawlik D, Zembala M, *et al*. Pentoxyfylline in and prevention and treatment of chronic lung disease[J]. Acta Paediatr Suppl, 2004, 93(444): 20－22.

[10] Selzner N, Rudiger H, Graf R, *et al*. Protective strategies against ischemic injury of the liver[J]. Gastroenterology, 2003, 125(3): 917－936.

（编辑 刘洪娥）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2004)24-2230-01

胰岛细胞瘤多发性肝转移介入治疗 1 例

Interventional therapy for islet cell tumor with multiple liver metastasis: a case report

郝 萍[1]，杨仁杰[2]（[1] 第三军医大学新桥医院肿瘤中心，重庆 400037；[2] 北京大学临床肿瘤学院介入治疗科，北京 100036）

患者，女性，39 岁，于 1989 年体检时 CT 检查发现胰尾部占位，考虑良性肿瘤，胰岛细胞瘤可能性大，连续 2 年复查病灶无明显变化。1997 年 5 月患者出现腹泻，为稀水样便，经抗感染、止泻等内科治疗症状无好转，于 1997 年 11 月 11 日行“胰尾及脾切除术”。术后病理诊断：胰尾部胰岛细胞瘤，大小 9 cm×5 cm×4 cm，部分区域可见被膜浸润；脾脏大小 14 cm×7 cm×5 cm，包膜可见浸润。术后患者腹泻缓解。术前检查肝脏两个小的占位病灶，考虑“血管瘤”未作特殊处理。2000 年 11 月复查发现肝内广泛结节病灶，考虑胰岛细胞瘤肝转移，DSA 见肝脏广泛肿瘤染色。2001 年 2 月患者再次出现腹泻，伴软瘫，查血糖、肝功能正常，血钾 2.12～2.89 mmol/L。2001 年 2 月 15 日行介入治疗，介入治疗后腹泻症状有所改善，2001 年 4 月 9 日第 3 次介入治疗，治疗后腹泻停止。分别于 2001 年 6、8、12 月介入治疗 3 次，因无症状，且能正常上班，患者未继续治疗。2002 年 7 月及 2003 年 5 月再次出现顽固性腹泻，伴软瘫，复查 CT 结果与 2000 年 11 月比较肝内病灶稳定，行介入治疗，术中 DSA 所见与 2000 年 2 月相似，治疗后腹泻均停止。患者病程中血糖正常，多次检查血钾、血钙低，经大剂量补钾、补钙及介入治疗后恢复正常。随访至 2003 年 9 月患者病情稳定，正常上班。介入治疗中化疗方案主要为 EADM＋CBP＋MMC，栓塞剂为碘油。

讨论

胰腺内分泌肿瘤是消化系统中常见的内分泌肿瘤，包括由于胰岛细胞的种类不同而产生不同类型的肿瘤，从而引起各种不同颇具特色的临床症状。绝大多数胰岛细胞瘤为单发的良性病变，恶性胰岛细胞瘤大约占 10%。

根据本患者的临床表现、影像学所见、肿瘤病理以及肿瘤切除、介入治疗后患者是否症状缓解，临床诊断考虑为血管活性肠肽瘤（VIP 瘤）。本病多由胰岛细胞腺瘤、胰岛细胞癌或胰

（下转 2234 页）

作者简介：郝 萍（1971－），女，云南省通海县人，硕士，主治医师，主要从事肿瘤介入治疗方面的研究。电话：(023)65205217

收稿日期：2004-03-08；修回日期：2004-10-18

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net