DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.014
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)05-0403-04

论著

应用体外灌流肝脏治疗肝功能损伤的实验研究

丁钧,董家鸿,杨占宇,李 昆,段恒春,董树虹,陈 莉,韩本立 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 观察体外灌流肝脏(ECLP)对急性肝功能损伤家猪的肝功能辅助支持治疗的效果,为体外灌流肝脏系统的开发和应用提供实验研究依据。方法 ①在门-颈静脉转流条件下,阻断家猪入肝血流120 min,造成动物肝脏功能急性损伤;②利用广西巴马小型猪肝脏构建体外灌流肝脏系统;③利用ECLP对急性肝功能损伤家猪进行辅助支持治疗,观察肝脏功能损伤家猪各项生理指标的变化。结果 经ECLP支持治疗后,肝脏功能损伤动物平均存活时间明显延长达101 h、血清ICG潴留率下降、动脉血酮体水平上升、血氨和血胆红素水平下降、凝血酶原时间(PT)未见明显波动而保持基本正常。结论 ECLP具有生物合成和解毒代谢功能,使用ECLP辅助支持治疗急性肝功能衰竭的动物,可在一定时间内改善肝功能损害动物的全身状态,明显延长动物的存活时间。

关键词:体外肝脏灌流;肝脏功能衰竭/治疗;猪
中图法分类号:R575.05;R654.1 文献标识码:A

An experimental study of the extracorporeal liver perfusion in the treatment of hepatic failure

DING Jun, DONG Jia-hong, YANG Zhan-yu, LI Kun, DUAN Heng-chun, DONG Shu-hong, CHEN Li, HAN Ben-li (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of extracorporeal liver perfusion (ECLP) on the assisted treatment of acute hepatic failure in pigs and to provide experimental evidence for the application of ECLP. Methods ①Animal model of acute hepatic failure was established by reperfusion of the livers of Rongchang white pigs following 120 min hepatic and portal vein occlusion with the portal-jugular veno-venous bypass; ②The ECLP was constructed with the liver of the Guangxi Bama little pigs perfused by pump *in vitro* with erythrocyte RPMI1640 liquid; ③ECLP was connected to one of the lateral outlet of the hollow fiber tube, while the other lateral outlet was connected to the oxgenerator. Then 6 animal models of acute hepatic failure were catheterized through the jugular artery, then connected with the hollow fiber tube at one outlet and the other outlet was linked into the jugular vein. The acute hepatic failure pigs were treated at 1 h and 24 h after operation. The hepatic energy states, ICG retention rate, AST/ALT, TB/DB, PT and blood ammonia of these pigs were determined. Results After assisted treatment by ECLP, the mean survival time of the pigs with acute hepatic failure was significantly prolonged to 101 h, ICG retention rate, arterial ketone body level, blood ammonia and blood bilirubin fell, but prothrombin time(PT) remained unchanged. Conclusion ECLP may prolong the survival time of the acute hepatic failure pigs by the improvement of the body condition.

Key words: extracorporeal liver perfusion; hepatic function failure/treatment; pig

应用体外异种肝脏灌流对临床肝脏功能衰竭患者进行辅助支持治疗,国外已进行了大量的动物实验和临床应用研究,但异种抗原免疫排斥反应是限制它广泛临床应用的主要障碍[1~5]。而在国内关于体外肝脏灌流领域的实验及临床研究目前尚属空白,未见文献报道。

本研究利用近交系广西巴马小型猪构建体外肝脏灌流系统,对荣昌大白猪肝脏缺血120 min后再灌流致急性肝功能损伤的动物进行辅助支持治疗,借以对体外肝脏灌流系统辅助治疗肝功能衰竭的效果做出科学的评价,为该系统进一步开发利用提供实验研究依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

近交系广西巴马小型猪12头,体重20~25 kg,雌雄不拘,

作者简介:丁 钧(1964-),男,重庆市垫江县人,博士,主治医师,讲师,主要从事肝胆微创外科及肝脏功能辅助支持治疗方面的研究。电话:(023)68754647

收稿日期:2002-05-08;修回日期:2002-07-08

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

由第三军医大学实验动物中心提供。荣昌大白猪22头(12头用于制作肝损伤模型，10头用于供血)，体重50~90 kg，雌雄不拘，由重庆市种猪场提供。

1.2 实验方法

1.2.1 无菌条件下荣昌大白猪取全血3 000 ml，分离保留红细胞，加无菌RPMI 1640细胞培养液至3 000 ml，4 ℃冰箱保存备用。

1.2.2 12头体重50 kg左右荣昌大白猪，在常温门-颈静脉转流下阻断入肝血流120 min后再灌流，造成动物急性肝脏功能损伤。术后保留颈静脉转流管，左侧颈动脉预置预充肝素(10 U/L)盐水的16F血液转流插管备用。G_{120}组动物急性肝功能损伤术后均不予针对肝脏损伤的特殊治疗处理，G_T组术后应用广西巴马小型猪体外灌流肝脏系统辅助治疗。

1.2.3 无菌条件下切取广西巴马小型猪肝脏，采用红细胞RPMI 1640混悬液分别用离心泵对离体肝动脉、门静脉灌流构建体外灌流肝脏系统，串接入中空纤维管。检测灌流介质酮体比率，氧耗量，观察肝脏胆汁流量确定其功能良好，备用。

1.2.4 G_T组动物在急性肝脏功能损伤术后存活1、24 h两时相点，动物给予平衡液500~1 000 ml适当扩容后，测ACT并将其控制在300~350 s，颈动脉转流管接入体外肝脏灌流系统内中空纤维管外腔，回流血液接入肝脏急性损伤动物颈静脉插管。如图1所示，利用体外灌流肝脏对急性肝脏损伤动物进行辅助支持治疗。

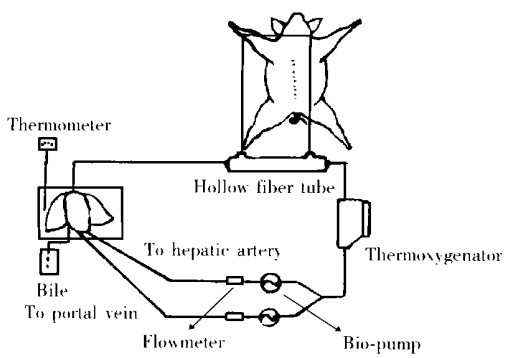


图1 应用体外肝脏灌流系统辅助治疗示意图

Fig 1 The illustrated instructions for animals treated by ECLP

1.3 检测指标及统计学处理方法

肝脏缺血120 min再灌流致急性肝脏功能损伤动物12头，6头动物伤后不予任何处理(G_{120}组)；6头于术后1、24 h接入广西巴马小型猪体外肝脏灌流辅助支持系统(G_T组)，测定两组动物：①血清ICG潴留率，计算R_{15ICG}；②动脉血酮体比(AKBR)；③凝血酶原时间(PT)；④血清肝细胞酶ALT及AST活性；⑤血氨水平；⑥总胆红素、直接胆红素水平。观察对比两组动物各项数据的差异。行自身对照比较的t检验。

2 结果

2.1 一般情况

G_{120}组不给予针对肝脏损伤的特殊治疗处理，术后存活3 d的3头(分别为73、76、74 h)，存活2 d的2头(分别为50、62 h)，存活1 d的1头(40 h)，平均存活61 h，动物3 d内全部死亡。G_T组动物术后第1、24小时分别给予体外肝脏灌流系统辅助支持治疗5 h，动物术后存活98~105 h，平均存活101 h。G_T组动物存活时间明显延长。

动物死亡后肝活检见肝脏广泛片状出血坏死，死亡原因考虑因肝脏损伤过重，辅助支持治疗次数少，未能达到肝脏再生修复时相。

2.2 动物血清ICG潴留率(R_{15ICG}%)变化

G_{120}组肝脏复流30 min时R_{15ICG}=(61.3±5.3)%；术后12 h R_{15ICG}=(62.4±7.4)%；术后24 h R_{15ICG}=(61.7±7.6)%，提示肝脏对ICG清除功能明显下降。G_T组在进行第1次($T_{t\text{-}1}$)和第2次($T_{t\text{-}2}$)ECLP辅助支持期间：R_{15ICG}基本正常；而在第1次($T_{0\text{-}1}$)和第2次($T_{0\text{-}2}$)脱离ECLP辅助支持期间：R_{15ICG}又逐步上升，见表1。ECLP治疗动物R_{15ICG}有显著改善($P<0.05$)。

表1 ECLP支持后动物存活时限及血ICG潴留率(R_{15ICG}%)变化

Tab 1 Changes of the animal survival time and plasma R_{15ICG}(%) with ECLP

animal No.	survival(h)	ICG-$T_{0\text{-}1}$	ICG-$T_{t\text{-}1}$	ICG-$T_{0\text{-}2}$	ICG-$T_{t\text{-}2}$
1	98	0.42~0.45	0.64~0.67	0.43~0.46	0.62~0.64
2	105	0.46	0.62~0.65	0.42~0.45	0.58~0.62
3	101	0.43~0.44	0.63~0.64	0.41~0.45	0.65~0.68
4	103	0.43~0.46	0.63	0.43~0.45	0.62~0.68
5	100	0.41~0.45	0.64~0.66	0.42~0.47	0.63~0.69
6	99	0.42~0.46	0.64~0.67	0.43~0.46	0.62~0.67

2.3 动脉血酮体比(AKBR)

G_{120}组肝脏血流阻断后AKBR逐步下降，复流后AKBR略有回升但维持在低水平直至动物死亡。G_T组动物经1次ECLP治疗期间(AKBR-$T_{t\text{-}1}$)，AKBR逐步上升(≥0.7)，在脱离ECLP后(AKBR-$T_{0\text{-}1}$)逐步下降并维持在低水平(≤0.5)；经第2次ECLP治疗期间(AKBR-$T_{t\text{-}2}$)，动物AKBR再次上升(≥0.7)，而在脱离ECLP后(AKBR-$T_{0\text{-}2}$)下降(≤0.5)，见表2。

表2 ECLP支持后动物动脉血酮体水平变化

Tab 2 Changes of AKBR in animals treated with ECLP

animal No.	AKBR-$T_{t\text{-}1}$	AKBR-$T_{0\text{-}1}$	AKBR-$T_{t\text{-}2}$	AKBR-$T_{0\text{-}2}$
1	0.72	0.43	0.74	0.41
2	0.89	0.49	0.82	0.45
3	0.77	0.45	0.80	0.48
4	0.84	0.47	0.82	0.46
5	0.78	0.43	0.79	0.43
6	0.73	0.42	0.74	0.42

2.4 凝血酶原时间(PT)变化

G_T组经ECLP治疗后PT维持在12.5~14.3 s，与G_{120}组术后PT明显延长达42.1 s，两组动物相比PT值出现明显差异($P<0.05$)。

2.5 血清ALT及AST活性变化

G_{120}组阻断动物入肝血流期间，ALT、AST均无明显变化。

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

当肝脏复流后, 可见 ALT、AST 出现明显升高, 术后 24 h 继续快速上升并维持在高水平直至死亡。

G_T 组动物进行第 1 次 ECLP 时对血清 ALT 及 AST 活性无影响, 进行第 2 次 ECLP 后血清 ALT 及 AST 活性与 G_{120} 组相比有所降低, 但无明显差异, 见图 2。

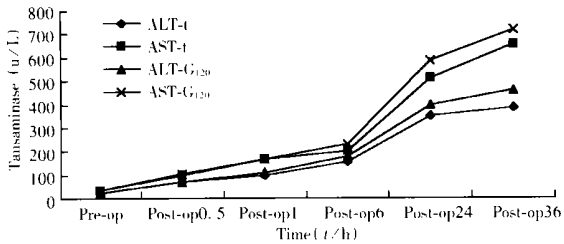


图 2　动物平血清转氨酶活性变化

Fig 2　Change of serum transaminase

2.6　动物血氨水平变化

G_{120}组动物术后血氨水平逐步上升, 术后 24 h 开始快速上升; GT 组动物进行第 1 次 ECLP 治疗时较 G_{120} 组血氨水平低, 脱离治疗后血氨水平缓慢上升, 于 24 h 达最高水平 258 ~ 278 μmol/L。经进行第 2 次 ECLP 治疗后血氨水平再次降到正常对照水平, 到第 72 小时血氨水平又有少许上升, 见图 2。两动物组相比有显著差异($P \leqslant 0.05$)。

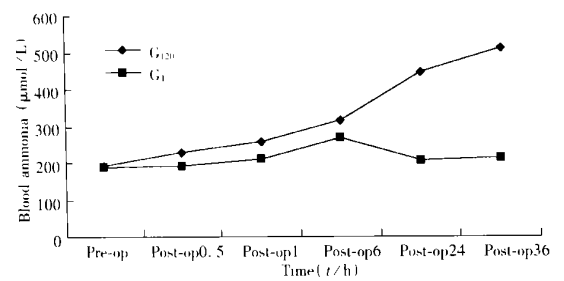


图 3　动物血氨水平变化

Fig 3　Changes of blood ammonia

2.7　血清胆红素水平变化

G_{120}组血胆红素约于术后 12 h 出现以非结合胆红素(UCB)为主的升高, 术后 24 h UCB 达 3.70 μmol/L, 术后 72 h UCB 达 9.64 μmol/L, 而直接胆红素水平变化不大。G_T 组动物经 2 次 ECLP 辅助支持治疗, 血 UCB: 1.64 ~ 1.91 μmol/L, 两组比较差异显著($P < 0.05$)。

3　讨论

3.1　体外灌流肝脏对急性肝脏损伤动物的代偿支持作用

肝脏是机体的物质代谢和转运中心, 生物合成和解毒代谢是其两大主要功能[6]。急性肝脏功能衰竭正是这两大功能的不足造成体内毒素积聚和供人体生命活动的营养成分缺乏, 表现为血氨、胆红素等升高, 白蛋白等降低, 凝血酶原时间延长[7,8]。要对肝脏功能进行辅助支持, 就要保证所采用手段兼具生物合成和代谢毒素的功能。

体外肝脏灌流系统用于对急性肝脏功能衰竭的辅助支持治疗, 评价其效果的最好标准是其生物合成和毒素代谢功能情况。本研究结果显示, 使用 ECLP 辅助支持治疗肝脏功能衰竭的动物后, 与肝脏缺血 120 min 再灌流致急性肝脏功能损伤动物相比血清蛋白质未见下降、PT 未见延长、AKBR 水平可上升达到 0.7, 显示了该系统生物合成功能良好; 而在急性肝脏功能损伤动物中明显升高的血氨得到了有效控制、胆红素水平维持正常, 此外, 经动物体内的 ICG 得到了有效的清除, 显示了该系统的良好解毒代谢功能。

应用体外 ECLP 辅助支持治疗肝脏功能损伤动物未能使其长期存活, 分析原因可能为: 动物肝脏损伤过重, 经两次短时支持治疗后, 虽然各种反映肝脏功能状态的指标有所改善并明显延长动物的生命, 但短期内肝脏无法再生修复, 而目前我们所具有的条件尚难于提供长期多次的辅助支持治疗以观察进一步的疗效。

3.2　应用本研究所构建体外肝脏灌流系统支持治疗的优点

Fox 等[4] 利用体外猪肝 ECLP 对急性肝脏功能衰竭患者进行临床肝脏功能支持治疗, 使患者最终得以施行肝脏移植。但是, 在进行肝脏功能支持治疗过程中较早出现了猪肝脏的损伤。Platt 等[9,10] 研究认为是由猪肝内皮细胞 galalpha 1-3 抗原诱导天然 IgM 激活补体系统产生的急性排斥反应所致。目前解决这一问题的可能途径有以下两条: ①采用生物材料膜将患者血液循环和体外灌流循环系统屏蔽隔离[2,14]; ②利用转基因技术使动物内皮细胞表达人类补体抑制蛋白, 从而抑制免疫排斥反应, 但是使转入基因得以充分表达仍是一难题[11,12]。就上述两种方法而言, 采用生物材料屏蔽 ECLP 与患者的循环系统目前看来简便而可行。

Zymax-22M-030 型中空纤维管[13,14] 为 EBISS 系统使用的生物反应器, 该管由平行排列的多孔质中空纤维组成, 纤维管壁滤过孔径 0.2 μm, 分子截留量约为 10 000, 允许大分子物质: 白蛋白(分子质量: 67×10^3)、凝血酶原(分子质量: 70×10^3)及其它凝血因子[分子质量: $(5.0 \sim 40) \times 10^3$] 通过, 而限制细胞、免疫球蛋白[分子质量: $(150 \sim 900) \times 10^3$] 及补体分子[分子质量: $(80 \sim 400) \times 10^3$] 通过, 既能透过肝细胞合成的生物大分子又起到免疫屏障作用。纤维管壁将中空纤维管分成管内和管外两腔, 两腔间有效交换面积达 1 128 cm^2。继往多使用培养肝细胞附于中空纤维管内或外腔, 血液流经另一腔进行物质交换和代谢解毒以辅助支持肝脏功能。

本研究采用中空纤维管屏蔽体外 ECLP 和急性肝脏损伤动物血液循环系统, 同样有较地维持了动物的

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

AKBR、ICG 潴留率、凝血酶原时间，控制了血氨及血胆红素水平，有效地进行了肝脏功能的支持，病理检查 ECLP 内未见白细胞浸润及肝脏的损害。

以上的结果显示，本系统既有效地屏蔽了免疫细胞及巨分子造成的 ECLP 肝脏损伤，同时有效补偿了急性肝脏损伤动物肝脏生物合成和代谢解毒功能，与 EBLSS 相比结构简单易于使用，成本较低。

3.3 体外肝脏灌流系统的临床应用前景

我国为乙型病毒性肝炎高发区，由此引发的急慢性肝功衰竭患者的有效治疗途径为同种异体肝脏移植，限于供肝来源奇缺的现状，患者往往在等待供体肝脏的过程中由于病情恶化使患者手术耐受力下降或失去手术机会，因而使肝移植的广泛开展和治疗效果受到严重制约。利用肝脏功能辅助支持治疗系统为肝功衰竭患者，特别是急性暴发性肝功衰竭者提供短期的肝脏功能支持，改善患者全身条件，以等待和把握适宜的条件进行肝脏移植治疗，对提高肝移植的治疗效果具有重要的意义。

肝脏功能衰竭时肝脏的解毒功能受损导致体内大量毒素积聚，造成体内重要脏器损伤从而发生致死性并发症，而生物合成功能受损后大部分生物活性物质均可进行人工补充，比较而言肝脏解毒功能受损的危害更大。现有的细胞培养型人工肝在临床应用中取得了一定的疗效，但由于系统内细胞数量有限，难以对体内潴留的大量代谢产物进行有效的解毒，尚需借助血液透析滤过等手段去除体内毒物，从而增加了构建 EBLSS 系统的复杂性。

本研究显示，体外肝脏灌流系统既可在一定时间内保持肝脏的活力，且对改善肝脏功能损害动物的全身状态有一定作用。既往的研究已经证实，不同种属动物间的免疫排斥可导致 ECLP 肝脏损伤以及 ECLP 肝脏异种蛋白诱发机体的过敏反应是限制 ECLP 应用的主要障碍[2,5,10]，本研究中应用中空纤维管隔离后未见 ECLP 肝脏明显免疫损害。而家猪肝脏来源广泛，取用方便，应用中空纤维管隔离免疫细胞及免疫巨分子有效解决免疫排斥反应这一难题后，具有临床应用价值。本研究为进一步临床应用 ECLP 奠定了实验研究基础，但 ECLP 在临床上使用尚有很多问题有待进一步研究解决。

参考文献：

[1] Eiseman B, Liem D S, Raffucci F R. Heterologous liver perfusion in treatment of hepatic failure[J]. Ann Surg, 1965, 162(2): 329—345.

[2] Argibay P F, Vazquez J C, Hyon S H, *et al*. Polyacrylonitrile membrane interposition between a xenograft and an animal in fulminant liver failure [J]. ASAIO J, 1996, 42(5): M411—M416.

[3] Neuhaus P, Blumhardt G. Extrocorporeal liver perfusion: applications of an improved model for experimental studies of the liver[J]. Inter Artif Organ, 1993, 16(5): 729—739.

[4] Fox I J, Langnas A N, Fristoe L W, *et al*. Successful application of extracorporeal liver perfusion: a technology whose time has come[J]. Am J Gastroenter, 1993, 88(12): 1876—1881.

[5] Miller L L. History of isolated liver perfusion and some still unsolved problems[M]. In: Bartosek I, Guaitani A, Miller L L, ed. Isolated liver perfusion and its application. New York: Raven Press, 1972. 1—9.

[6] 朱文玉. 肝脏生理[A]. 见：周衍椒，张镜如 主编. 生理学[M]. 第3版. 北京：人民卫生出版社，1991. 270—272.

[7] Hanid M A, Mackenzie R L, Jenner R E, *et al*. Intracranial pressure in pigs with surgically induced acute liver failure[J]. Gastroenter, 1979, 76(1): 123—131.

[8] Miller D J, Hickman R, Fratter R, *et al*. An animal model of fulminant hepatic failure: a feasibility study[J]. Gastroenter, 1976, 71(1): 109—113.

[9] Platt J, Vercellotti G, Dalmasso A, *et al*. Transplantation of discordant xenograft: a review of progress[J]. Immunol Today, 1990, 11(3): 450—465.

[10] Cooper D, Koren E, Oriol R. Natural antibodies, alpha-galactosyl oligosaccharides and discordant xenografting[J]. Xeno, 1994, 2(1): 22—25.

[11] Pinkert C. Transgenic pig models for xenotransplantation[J]. Xeno, 1994, 2(1): 10—15.

[12] Fodor W, Squinto S. Engineering of transgenic pigs for xenogenic organ transplantation[J]. Xeno, 1995, 3(1): 23—25.

[13] Shatford R A, Nyberg S L, Meiler S J, *et al*. Hepatocyte function in hollow fiber bioreactor: a potential bioartificial liver[J]. J Surg Res, 1992, 53(4): 549—552.

[14] Nyberg S L, Platt J L, Shirabe K, *et al*. Immunoprotection of xenocytes in hollow fiber bioartificial liver (xenocytes bioartificial liver)[J]. ASAIO J, 1992, 38(3): M463—M572.

（编辑 陈聪连）

（上接402页）

弃治疗[2]。该患者伤后已有1周，其手术的成功可以证明无光感不是手术的绝对禁忌征。故对于该类患者应该提倡早行手术治疗，以提高手术的成功率，但对于受伤时间太久，查 VEP 波形消失，同时视神经有萎缩者，则应放弃手术治疗，避免手术的盲目性，我们认为开颅行视神经管减压术应为首选术式，该术式能够将视神经全段更完全、更彻底地减压，手术在显微镜下进行，并行术中 VEP 监测，以明确减压效果。术后应用大量激素冲击治疗，以减少自由基的损害，减轻外伤后的血管痉挛[3]，并使用血管扩张剂、纳络酮、脱水剂、维生素、神经生长因子等综合治疗，但药物的治疗作用只有待手术后才能充分发挥其疗效，且不能忽略。总之，早期准确诊断早期开颅行视神经管减压术，术后给予综合治疗，才能让更多的该类患者能够重见光明。

关键词：视神经损伤；视神经管减压
中图法分类号：R774.605 文献标识码：B

参考文献：

[1] 吴 坚. 视神经管开入减压术治疗视神经损伤44例效果观察[J]. 南通医学院学报，1999, 19(3): 292—292.

[2] Lanning B K line. Injury of the optic nerve[J]. Neurosurgery, 1984, 14(2): 757—763.

[3] 过慧君，陈大周，燕江陵. 管内段视神经间接损伤[J]. 中华眼科杂志，1981, 95(4): 1135.

（编辑 陈聪连）

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