DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.005
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

文章编号:1000-5404(2000)11-1029-04

论著

门静脉转流下阻塞性黄疸肝脏对缺血耐受性的研究

张雷达,董家鸿,何效东,李 昆 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 探索在门静脉转流下阻塞性黄疸大鼠耐受入肝血流阻断的安全时限。方法 以胆管结扎后1周大鼠门静脉转流下阻断入肝血流不同时程后,10 d动物存活率、肝脏病理组织学改变及肝脏能量代谢功能损害的严重程度及可逆性。结果 胆道梗阻1周大鼠阻断入肝血流60 min以内,术后10 d动物全部存活,其肝脏缺血再灌流损害可逆;阻断入肝血流时间超过60 min,术后10 d动物存活率明显下降;入肝血流阻断90 min,肝脏缺血再灌流损害严重而陷入失代偿状态。结论 胆道梗阻后1周大鼠门静脉转流及常温下耐受入肝血流阻断的安全时限为60 min。

关键词:肝脏/病理学;阻塞性黄疸;入肝血流阻断;缺血再灌流损害;大鼠
中图法分类号:R575;R619.9 文献标识码:A

Ischemic tolerance of obstructive jaundice liver in rat with portal blood bypass

ZHANG Lei-da, DONG Jia-hong, HE Xiao-dong, LI Kun (Center of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the maximum tolerant limit of obstructive jaundice rats to hepatic inflow occlusion with portal blood bypass. Methods One week after biliary obstruction, the hepatic portal inflow vessels of rat were occluded with blood bypass in different durations, and then the livers were reperfused later. The survival rate of rats, the histopathological changes and energy metabolism of the liver were studied to obtain the safe tolerant limit of the animals to hepatic inflow occlusion in ordinary temperature under the circumstances of portal blood bypass. Results All rats with hepatic inflow occlusion within 60 min survived on day 10 after the occlusion, and the ischemia-reperfusion injury of their livers was reversible and compensatory. However, the survival rates of rats with more than 60 min hepatic inflow occlusion decreased significantly. The liver injury of the rats with 90 min of hepatic inflow occlusion was severe and irreversible. Conslusion The safe tolerant limit of obstructive jaundice rats to normothermic hepatic vascular occlusion with portal blood bypass is 60 min.

Key words: liver; pathology; obstructive jaundice; hepatic inflow occlusion; ischemia-reperfusion injury; rats

新近,我们采用门静脉转流下入肝血流阻断模型研究证明正常大鼠常温下耐受入肝血流阻断的安全时限长达90 min[1],但是目前对肝脏已有病变的大鼠耐受入肝血流阻断的安全时限尚不清楚,因此有必要研究阻塞性黄疸条件下肝脏耐受缺血的安全时限。

本研究目的是采用我们已建立的研究大鼠入肝血流阻断的理想的动物模型,研究阐明胆道梗阻后1周大鼠门静脉转流及常温下耐受持续入肝血流阻断的安全时限,以期为外科临床上设计针对阻塞性黄疸病人阻断肝脏血流的合理手术方案提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验采用成年Wistar大鼠,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腹腔内注射戊巴比妥钠(25 mg/kg体重)麻醉,经上腹正中切口。

基金项目:全军"九五"医药卫生科研基金资助项目(96M095)
作者简介:张雷达(1969—),男,浙江省奉化市人,硕士,医师,主要从事肝脏生理及病理变化方面的研究。电话:(023)68754000—73077
收稿日期:2000-01-30;修回日期:2000-07-18

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

1.2 动物实验模型的复制

1.2.1 大鼠胆道梗阻及再通模型复制 结扎、切断总胆管，造成大鼠胆道梗阻。1周后再次剖腹，阻断入肝血流同时行胆肠架桥吻合，于胆道近侧扩张部穿刺置入长约4 cm、内径2 mm的硅胶管，导管远端置入十二指肠内，两端予以缝合固定，完成胆道再通。

1.2.2 入肝血流阻断模型复制 采用我们已建立的大鼠门静脉转流下入肝血流阻断模型[1]。大鼠胆道梗阻后1周经原切口再次剖腹，用小号动脉夹分别阻断肝左、中、右叶肝蒂（约占全肝95%），造成受累肝叶缺血，保留尾叶血供作为门静脉血液回流通道，到预定观察终点，去除肝蒂阻断夹即恢复肝脏灌流，随后切除未缺血的尾状叶。

1.3 实验动物分组

1.3.1 阻断入肝血流后的存活率 本实验以单纯胆肠内引流（BDO）组为对照组，设肝血流阻断（HVO）30、60、75、90及105 min组，共6组，每组10只大鼠，总计60只；其中BDO组动物在胆道梗阻1周后仅行胆肠内引流而不阻断入肝血流，其余处理同HVO组。

1.3.2 肝脏缺血再灌流损伤及恢复过程的评估 动物设4组，即BDO、HVO-30 min、HVO-60 min、HVO-90 min，每组均观察缺血后、再灌流1、6、24 h 4个时相点，每时相点观察8只大鼠，每组32只共计128只大鼠。

1.4 观察指标及检测方法

1.4.1 存活率 各组大鼠阻断入肝血流不同时间后分笼喂养，观察并统计动物术后10 d存活率。

1.4.2 肝脏病理变化 动物在预定时相点活杀后取肝中叶组织块，常规固定、脱水、透明，石蜡包块后切片及HE染色，光镜下观察。

1.4.3 肝细胞线粒体呼吸活性 肝脏线粒体提取及活性测定分别采用Johnson差速离心法[2]和Estabrood氧电极法[3]，呼吸状态区别为S_3、S_4，两者之比即为呼吸控制率（RCR），计算磷氧比值（P/O）。

1.4.4 肝组织ATP含量 采用生物发光法[4]测量肝组织ATP含量。

1.4.5 动脉血酮体比值 动物在预定时相点剖腹后从腹主动脉穿刺抽血1.5 ml。按Williamson[5]和Mellanby[6]所介绍的方法测定乙酰乙酸（AcAc）和β-羟丁酸（β-HB）浓度，两者比值即为动脉血酮体比值（AKBR）。

1.5 统计学处理

所有数据以$\bar{x}\pm s$表示，分别采用方差分析。

2 结果

2.1 胆道梗阻大鼠阻断入肝血流后的存活率

BDO组、HVO-30 min组和HVO-60 min组大鼠术后10 d全部存活，阻断入肝血流75、90、105 min大鼠术后10 d存活率分别为65%、40%、10%。

2.2 肝脏病理组织学改变

胆道梗阻后1周大鼠肝脏汇管区小胆管明显增生，有炎性细胞浸润，肝细胞可见轻度肿胀及点状坏死；胆肠内引流24 h内上述病变无明显变化。缺血后各组动物肝组织病变程度与缺血的时间呈正比，但仍以肝窦扩张、淤血及肝细胞肿胀变性为主。各组动物肝脏复流后，肝组织病变显著加重，其损害程度与肝脏缺血的时间呈正比；肝细胞肿胀、肝窦淤血在复流后早期明显，随后略有减轻，而肝组织坏死程度随再灌流时间延长而加重；HVO-30 min组主要以肝细胞肿胀变性为主，HVO-90 min组可见大片状肝组织坏死，于RP-24 h时失活肝组织约占全肝的50%，而HVO-60 min组肝组织病变介于两者之间，明显轻于HVO-90 min组，见图1、图2。

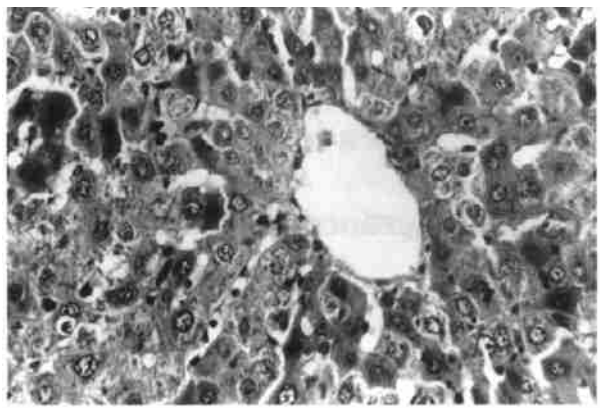


图1 阻塞性黄疸大鼠入肝血流阻断60 min再灌注24 h肝组织 （HE× 400）

Fig 1 Hepatic tissue of obstructive jaundice rats with hepatic inflow occlusion for 60 min and reperfusion for 24 h （HE× 400）

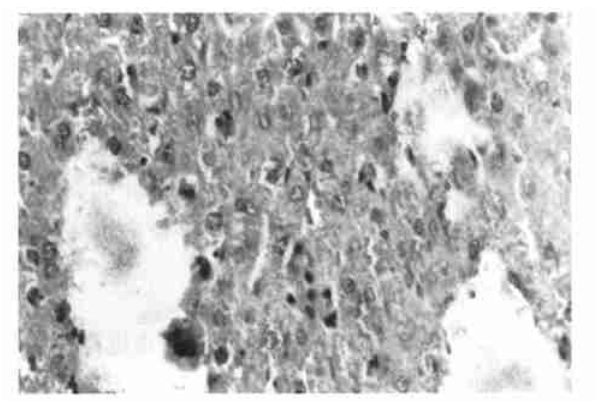


图2 阻塞性黄疸大鼠入肝血流阻断90 min再灌流24 h肝组织 （HE× 400）

Fig 2 Hepatic tissue of obstructive jaundice rats with hepatic inflow occlusion for 90 min and reperfusion for 24 h （HE× 400）

2.3 肝脏能量代谢状态

2.3.1 肝细胞线粒体呼吸活性 见表1。

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

表 1　肝线粒体呼吸功能参数

Tab 1　The paramers of respiratory function of hepatic mitochondrion

		Reperfusion time (h)			
		0	1	6	24
S_3 (nmol·min^{-1}·mg^{-1})					
	BDO	21.53±8.35△	22.30±11.24△	23.47±7.55△	23.84±8.46△
	HVO−30 min	14.18±7.10#	13.86±15.13#	15.67±4.26#	16.64±8.94#*
	HVO−60 min	13.25±5.61#	12.83±6.64#	14.16±5.11#	15.57±5.16#*
	HVO−90 min	12.16±4.03#	11.34±6.30#△	12.02±3.44#△	13.03±4.22#△
RCR	BDO	2.71±0.31△	2.82±0.15△	2.83±0.28△	2.88±0.47△
	HVO−30 min	1.83±0.22#	1.81±0.07#	2.02±0.10#*	2.19±0.26#*
	HVO−60 min	1.70±0.02#	1.66±0.51#	1.89±0.11#*	2.11±0.12#*
	HVO−90 min	1.63±0.05#	1.43±0.20#△*	1.55±0.10#△	1.70±0.15#△
P/O	BDO	1.58±0.43△	1.62±0.13△	1.64±0.34△	1.65±0.21△
	HVO−30 min	1.10±0.32#△	1.01±0.07#	1.14±0.16#	1.34±0.23#*
	HVO−60 min	0.94±0.08#	0.91±0.10#	1.08±0.08#*	1.26±0.09#*
	HVO−90 min	0.90±0.12#	0.86±0.05#	0.87±0.21#△	0.98±0.13#△

#: $P<0.05$ *vs* BDO; △: $P<0.05$ *vs* HVO−60 min; *: $P<0.05$ *vs* 0 h

2.3.2　肝组织 ATP 含量　　见表 2。

表 2　肝组织 ATP 含量(m_B/μmol·g^{-1})

Tab 2　The contents of hepatic tissue ATP(m_B/μmol·g^{-1})

Group	Reperfusion time (h)			
	0	1	6	24
BDO	1.368±0.036△	1.340±0.064△	1.428±0.007△	1.483±0.045
HVO−30 min	0.520±0.026#△	1.086±0.089#△*	1.426±0.106*	1.506±0.069*
HVO−60 min	0.415±0.009#	0.868±0.048#*	1.258±0.009*	1.373±0.038*
HVO−90 min	0.276±0.009#△	0.428±0.021#△*	0.479±0.014#△*	0.680±0.008#△*

#: $P<0.05$ *vs* BDO; △: $P<0.05$ *vs* HVO−60 min;
*: $P<0.05$ *vs* 0 h

2.3.3　动脉血酮体比值　　见表 3。

表 3　动脉血酮体比值

Tab 3　Ratio of arterial blood ketone body

Group	Reperfusion time (h)			
	0	1	6	24
BDO	0.591±0.006△	0.605±0.020	0.620±0.010	0.638±0.012
HVO−30 min	0.393±0.009#	0.624±0.006*	0.724±0.009*	0.700±0.011*
HVO−60 min	0.389±0.020#	0.554±0.011*	0.616±0.007*	0.695±0.010*
HVO−90 min	0.333±0.016#△	0.360±0.016#△	0.383±0.008#△	0.400±0.001#△*

#: $P<0.05$ *vs* BDO; △: $P<0.05$ *vs* HVO−60 min;
*: $P<0.05$ *vs* 0 h

3　讨论

阻塞性黄疸大鼠肝脏对缺血损害的敏感性增加, 缺血超过一定时限后肝脏结构和功能损害不可逆, 不可避免地发生急性肝脏功能衰竭, 导致机体死亡。Okada 等[7] 通过观察存活率、血清转氨酶及胆红素的变化认为胆道梗阻后 2 周大鼠肝脏常温下最长能耐受 10 min 的肝门阻断。但因该研究未采用门静脉转流, 门静脉淤血及由此造成的血流动力学紊乱对实验结果必然会造成很大的影响[1]。Ersöz 等[8] 观察到胆道梗阻后 10 d 兔在全肝血流阻断 45min 后 7 d 全部存活, 且血清转氨酶和胆红素已基本恢复至正常水平, 据此认为胆道梗阻 10 d 兔能耐受全肝血流阻断 45 min。Itoh 等[9] 研究结果显示相同时间的肝脏缺血后阻塞性黄疸大鼠比正常大鼠存活率低, 其肝细胞损害也更明显。但这些结果都不能明确阻塞性黄疸肝脏究竟能耐受多长时间的缺血。

本研究采用的大鼠门静脉转流下入肝血流阻断模型具有门静脉血液转流及肝脏缺血完全、操作简便、生理干扰及创伤小等优点, 避免了因门静脉系统淤血、全身血流动力学紊乱、过重的创伤对实验结果的影响[1]。采用该模型研究发现胆道梗阻后 1 周大鼠入肝血流阻断 60 min 及 60 min 以下, 术后 10 d 所有动物全部存活; 入肝血流阻断时间超过 60 min, 动物存活率明显降低, 据此, 可以初步确认胆道梗阻后 1 周大鼠常温下耐受入肝血流阻断的最长安全时限是 60 min。本实验所显示的阻断入肝血流时程与肝脏缺血再灌流损害的严重度及可逆性的时间-效应关系也支持本实验条件下胆道梗阻后 1 周大鼠耐受入肝血流阻断的安全时限是 60 min 这一结论。从肝脏的病理形态看, 肝脏缺血 30 min 和 60 min 两组大鼠肝脏的缺血再灌流损害以肝窦淤血、肝细胞肿胀等可逆性损害为主, 但是肝脏缺血 90 min 组以大量肝组织坏死等不可逆病变为突出。从肝脏能量代谢功能损害及恢复的过程看, 肝脏缺血 30 min 和 60 min 两组大鼠在再灌流后 24 h 内线粒体呼吸控制率、ATP 含量及 AKBR 已有明显恢复, 而缺血 90 min 组大鼠肝脏能量代谢功能严重损害, 线粒体呼吸活性处于持续抑制状态, ATP 含量和 AKBR 一直维持在显著降低的水平。

综上所述, 本实验研究表明胆道梗阻后 1 周大鼠在门静脉转流下耐受持续肝脏缺血的安全时限是 60 min, 这一研究结果对进一步认识阻塞性黄疸病患者的肝脏耐受缺血的安全时限, 从而在临床上设计阻断入肝血流的合理手术方案有参考价值。

参考文献:

[1] 何效东, 董家鸿, 蔡景修, 等. 大鼠门静脉转流下入肝血流阻断的动物模型[J]. 西北国防医学杂志, 1999, 20(3): 175−177.

[2] Johnson D. Isolation of liver or kidney mitochondria[A]. In:

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

Bergmeyer H V. Methods In Enzymology[M]. New York: Academic Press, 1967. 94.

[3] Estabrook R W. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP/O ratio[A]. In: Bergmeyer H V. Methods In Enzymol[M]. New York: Academic Press, 1967. 41—47.

[4] 严 涛, 张 平, 段恒春, 等. 组织 ATP、ADP、AMP 水平的荧光素酶系测定[J]. 第三军医大学学报, 1987, 9(3): 294—296.

[5] Williamson D H, Mellanby J. β-Hydroxybutyrate[A]. In: Bergmeyer H V. Methods of Enzymatic Analysis[M]. New York: Aca-demic Press, 1974. 1 836—1 839.

[6] Mellanby J, Williamson D H. Acetoacetate[A]. In: Bergmeyer H V. Methods of Enzymatic Analysis[M]. New York: Academic Press, 1974. 1 446—1 451.

[7] Okada Y. Experimental study on the interruption of hepatic blood flow in obstructive jaundice, with special reference to the cause of death and prolonged decompression[J]. Nippon Geka Hokan, 1989, 58(3): 275—288.

[8] Ersöz S, Cakmakh S, Gecim E, *et al*. The safety of total hepatic vascular occlusion in rabbits with acute extrahepatic cholestasis [J]. Eur Surg Res, 1996, 28(2): 104—110.

[9] Itoh H, Miyazaki M, Udagawa I, *et al*. Experimental study on cell damage of ischemic liver in obstructive jaundiced rats[J]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 1991, 88(5): 1 200—1 203.

(编辑 王 红)

经验与短篇

文章编号: 1000-5404(2000)11-1032-01

重庆市儿童哮喘 α_1-抗糜蛋白酶遗传缺陷基因频率及基因分析研究

Study on gene frequency of α_1-antichymotrypsin deficiency and gene analysis in childhood asthma

尹晓娟[1], 李为明[2], 魏红光[2], 光丽霞[2] (第三军医大学: [1]附属西南医院儿科, 重庆 400038; [2]附属新桥医院儿科, 重庆 400037)

哮喘发病具有明显的遗传倾向, 国外研究显示 α_1-抗糜蛋白酶(α_1-ACT)遗传缺陷是哮喘发病的重要因素[1]。为探讨 α_1-抗糜蛋白酶遗传缺陷在中国儿童哮喘发病中的作用, 本研究对 90 例重庆市汉族儿童哮喘血浆 α_1-ACT 含量、Bonn-1 和 Bochum-1 变异体进行了初步探讨, 取得如下结果。

1 资料与方法

1.1 资料

1.1.1 研究对象选择及血样本来源 按文献[3]选择汉族哮喘儿童 90 例作为哮喘组, 年龄 0.25～12.75 岁; 并选择汉族健康儿童 180 例作为儿童对照组, 年龄 0.03～13.4 岁; 健康献血员 200 例作为成人对照组。518 份血样用于测定血浆 α_1-ACT 含量和表型分析, 其中 470 份采自研究对象(哮喘组在缓解期采血); 48 份血样采自 3 组 25 个汉族家庭的父母。用于基因分析的 5 份血样采自 5 例 α_1-ACT 杂合缺失者。所有血样均用 ACD 液抗凝。

1.1.2 主要试剂 人血浆蛋白标准品、兔抗人 α_1-ACT 抗血清; PCR 试剂盒, PCR Marker, AluⅠ、DdeⅠ内切酶。检测 α_1-ACT exon Ⅲ Pro^{229}→Ala(CCT→GCT)点突变引物序列: 引物 1 为 5'-TAT-GAGGACTCTGGGCACTTC-3', 引物 2 为 5'-ACTCCAGAGAGTCTCT-CCAC-3'; 检测 α_1-ACT exonⅡ Leu^{55}→Pro(CTG→CCG)点突变引物序列: 引物 3 为 5'-CTCTACAGTGGTTTGCCTAATAAC-3', 引物 4 为 5'-TCCATCTGGCCCTCTGAG ACT-3'。

1.2 方法

1.2.1 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦免疫固定技术检测 α_1-ACT 表型。

1.2.2 常规火箭电泳检测血浆 α_1-ACT 含量, 确定 α_1-ACT 杂合缺失。

1.2.3 聚合酶链反应及酶切检测技术检测 Bonn-1 和 Bochum-1 变异体。

1.2.4 临床资料 判定哮喘组 α_1-ACT 杂合缺失与非缺失患者在如下指标是否存在差异: 哮喘的初发年龄、发作住院次数、放射性过敏原吸附试验(RAST)结果。

1.3 统计学处理

用 Mantel-Haenszel χ^2_{MH} 检验、t 检验及 Fisher 确切概率法进行数据处理。

2 结果

α_1-ACT 杂合缺失及其频率: 哮喘组 4 例、成人对照组 1 例

(下转 1035 页)

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39570749)

作者简介: 尹晓娟(1966—), 女, 湖南省邵阳市人, 硕士, 主治医师, 主要从事 α_1-抗糜蛋白酶遗传缺陷在中国人发病中的作用方面的研究, 发表论文 10 余篇。电话: (023)68754413

收稿日期: 1999-11-01; 修回日期: 2000-08-25

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