DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.021

不同手术方式对肝硬变大鼠线粒体呼吸功能的影响

徐新宝* 蔡景修 董家鸿 韩本立 段恒春 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心) 重庆,630038

提 要 对大鼠肝硬变门静脉高压症及不同术式对其肝脏功能的影响进行观测,以评价各术式的治疗效果。动物分为肠腔侧侧分流术(MCS)、远端脾腔分流术(DSCS)、门奇断流术(PAD)、肝硬变(CL)及正常对照组。观测了血清肝功能参数、肝脏线粒体呼吸功能、肝组织三磷酸腺苷含量、门体分流率及肝脏病理改变。实验结果显示:肝硬变时肝脏线粒体呼吸功能低下,MCS则进一步降低硬变肝脏线粒体功能;而DSCS和PAD对硬变肝脏线粒体呼吸功能影响较小,因此是一种比较理想的术式。

关键词 肝硬变/外科手术;线粒呼吸功能;肝脏;大鼠

中图法分类号 R657.31

目前,外科手术仍然是治疗肝硬变门静脉高压症的主要手段。手术后肝脏功能的改变是评价各手术方式对门静高压症治疗价值的主要因素之一[1]。肝硬变时肝脏线粒体结构和功能异常,但迄今有关不同手术方式对其影响的研究少有报道。本研究目的是观测大鼠肝脏硬变门脉高压症及不同术式对其肝脏线粒体功能的影响,旨在评价各种手术方式的临床治疗价值,为选择合理手术方式提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型、手术方式及实验分组

1.1.1 动物模型 雄性Wistar大鼠,体重230±25 g。按吴孟超等介绍的方式[2]复制大鼠肝硬变模型。皮下注射60% CCl_4 石蜡油溶液,首次为0.5 ml/100 g体重,以后每4日注射0.3 ml/100 g体重;自由饮用10%乙醇水溶液和进食普通颗粒饲料。注射18次以后,再正常饲养3周,待模型稳定后使用。

1.1.2 手术方式 给大鼠腹腔注射戊巴比妥钠130 mg/kg体重麻醉后,取上腹正中切口入腹,先显露门静脉并测定自由门静脉压力(Free portal pressure,FPP),后进行下列手术。

1.1.2.1 肠腔静脉侧侧分流术(Mesocaval shunt,MCS) 在靠近脾静脉下方行肠腔侧侧分流术,吻合口直径略大于肠系膜上静脉直径。

1.1.2.2 远端脾腔静脉分流术(Distal spenocaval shunt,DSCS) 按以往报道的方法进行。尽量向脾门处游离脾静脉,在与门静脉汇合处切断脾静脉,结扎门静脉侧的断端,另一端与下腔静脉行端侧吻合,吻合口直径约等于脾静脉直径,然后结扎并离断胃冠状静脉。

1.1.2.3 门奇断流术(Portoazygos disconnection,PAD) 行食管下段和胃底周围血管离断及脾切除术,结扎胃冠状静脉,然后行幽门成形术。

所有动物手术操作均在10~15倍手术显微镜下进行,并由同一手术组完成,手术完成后均再行门静脉穿刺测压,术后正常喂养。

1.1.3 实验分组 实验组分为MSC、DSCS、PAD,正常对照组(Normol control,NC)、肝硬变组(Cirrhosis,CL)5组,3个手术组各观察术前及术后1周、2周、3周共4个时相点,每组每时相点各10只大鼠。

1.2 观察指标及检测方法

1.2.1 血清肝功能参数 采取动物静脉血,按常规方法测定血清谷丙转氨酸(ALT)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLO)和白/球比值(A/G)。

1.2.2 肝脏线粒体呼吸功能 参照Johnson方法[3]制备肝脏线粒体,采用Estabrook氧电极法[3]测定线粒体呼吸功能。

1.2.3 肝组织ATP含量 活杀动物后迅速取肝组织于液氮内速冻保存。参照Kimmich方法[4]测定组织内ATP含量。

1.2.4 门体分流率(Porto-systemic shunt rate,PSS) 依罗德成[5]等所报道的方法制备^{99m}TC标记的蟾蜍红细胞(^{99m}TC-RBC)。将^{99m}TC-RBC盐水悬液约0.2 ml(约含600000个^{99m}TC-RBC)注入远端回结肠静脉,再以同量的生理盐水注入。5 min后处死动物,取出肝、肺置于γ-闪烁计数器上测量放射性。PSS按下式计算[3]。

$$PSS\% = \frac{\text{肺放射性}(min^{-1})}{\text{肝、肺放射性和}(min^{-1})} \times 100\%$$

1.2.5 肝脏病理改变 取肝脏组织块立即放入福尔马林溶液中固定,常规脱水,石蜡包埋并切片,HE染色,光镜下观察。

* 现在空军总医院 北京,100000

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

2 结果

2.1 动物模型

皮下注射 CCl_4 18 次并恢复 20 d 后，可见肝脏明显缩小，布满大小不等的结节。门静脉和胃冠状静脉增粗，周围侧枝血管增多且扩张、纡曲，后腹膜淋巴管和小血管明显扩张。脾肿大。约 60%的大鼠可见少量腹水。光镜下仅可见假小叶结构，但肝脏内有少量炎性细胞，未见碎片样坏死，说明肝脏硬变模型基本上处于稳定状态。肝硬变大鼠肝 FPP 明显高于正常对照组(1.45±0.08 kPa *vs* 0.77±0.44 kPa，$P<0.05$)。

2.2 门静脉压力

PAD、MCS 和 DSCS 术前 FPP 分别为1.45±0.06、1.46±0.07和1.45±0.05 kPa，三者无显著差异。术后立即测压显示，PAD 术后 FPP 变化不显著；MCS 术后 FPP 为1.10±0.03 kPa，较术前降低非常显著($P<0.05$)；DSCS 术后 FPP 为1.41±0.04 kPa，与术前相比降低不显著($P>0.05$)。

2.3 门体分流率

正常组(NC)和肝硬变组(CL)的 PSS 分别为0.87±0.26%和16.28±3.47%，差别极显著($P<0.005$)。MCS 组术后1、2、3周的 PSS 都显著高于同时相的 DSCS 和 PAD 组($P<0.05$)。三组术后1、2、3周的 PSS 均逐渐升高，各组术后3周时的 PSS 分别与同组术后1周时相比较，都有统计学意义($P<0.05$，表1)。

表1　肝硬变不同手术前后 PSS 的变化(%，$\bar{x}\pm s_x$，$n=8$)

Tab 1　Changes of PSS after cirrhosis and different types of operation (%, $\bar{x}\pm s_x$, $n=8$)

	Preoperation		Postoperation (week)		
	NC	CL	1	2	3
MCS	0.87±0.26	16.28±3.47△	75.00±7.62★	81.83±7.00	86.67±5.09※·
DSCS	0.87±0.26	16.28±3.47△	10.23±2.94★※	11.58±2.68※	15.08±3.26※·
PAD	0.87±0.26	16.28±3.47△	9.28±2.73★※	9.97±2.80※	13.02±3.19※·

△：$P<0.05$，*vs* NC；★：$P<0.05$，*vs* CL；※：$P<0.05$，*vs* same phase NCS；·：$P<0.05$，*vs* a week after same type of operation

2.4 血清肝功能参数(见表2)

表2　肝硬变不同手术前后肝功能的变化($\bar{x}\pm s_x$，$n=10$)

Tab 3　Changes of liver function after cirrhosis and different types of operation ($\bar{x}\pm s_x$, $n=10$)

	ALT (IU/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)	G (g/L)	(A/G)
NC	12.11±4.51	72.56±3.30	75.56±2.52	36.97±2.50	0.97±0.10
CL	29.56±7.30△	66.99±2.12△	26.67±2.66△	40.32±2.68	0.67±0.10△
MCS_1	56.67±9.26★	59.18±4.23★	20.47±3.25·	38.71±3.38	0.53±0.10
$DSCS_1$	31.37±7.91※	63.31±3.39	24.18±2.72	39.17±3.10	0.62±0.10
PAD_1	66.11±14.07★·	58.08±3.62★·	21.96±2.27	36.12±2.79	0.61±0.08
MCS_2	56.78±10.02★	56.06±5.01★	18.49±2.55★	37.57±4.67	0.50±0.10
$DSCS_2$	30.78±7.03※	64.19±3.64※	25.03±3.24※	39.16±3.23	0.64±0.09
PAD_2	47.78±7.43★·	60.40±2.92★	23.30±2.47※	37.11±3.10	0.63±0.10
MCS_3	60.78±11.20★	53.73±1.95★	16.90±1.79★	36.83±4.32	0.47±0.09★
$DSCS_3$	31.22±7.46※	64.79±3.19※	25.49±2.50※	39.30±3.40	0.66±0.10※
PAD_3	30.67±6.64※	61.16±3.53※	25.29±2.68※	38.88±3.10	0.66±0.10※

△：$P<0.05$，*vs* NC；★：$P<0.05$，*vs* CL；※：$P<0.05$，*vs* same phase MCS；·：$P<0.05$，*vs* same phase DSCS

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

2.5 肝脏线粒体呼吸功能及组织内 ATP 含量(见表3)

表3 肝硬变不同手术对肝脏线粒体功能的影响($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Tab 3 Effect of cirrhosis and different types of operation on hepatic Mitochondrial function($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Group	S_3 ($nmol/O_2\cdot mg^{-1}$ protein$\cdot min^{-1}$)	S_4	RCR	ADP/O	ATP
NC	125.03±13.48	30.29±2.36	4.12±0.23	1.74±0.08	2.25±0.15
CL	115.05±3.82	38.66±2.78△	2.99±0.25△	1.57±0.06△	1.45±0.29△
MCS1	106.05±13.77	55.00±4.96★	1.93±0.23★	1.25±0.05△	0.38±0.10★
DSCS1	118.65±8.39	41.34±3.46★	2.88±0.20※	1.53±0.05※	0.95±0.08★※
PAD1	115.15±4.70	46.66±3.93★※	2.48±0.19★*※	1.34±0.11★*	0.93±0.09★※
MCS2	111.86±4.76	49.26±1.72*	2.32±0.18★	1.33±0.10★	0.68±0.09★
DSCS2	113.08±6.27	38.56±1.67※	2.94±0.25※	1.56±0.04※	1.38±0.24※
PAD2	113.94±4.98	42.26±3.37※	2.73±0.23※	1.51±0.03※	1.35±0.23※
MCS3	113.14±6.09	44.58±1.99★	2.54±0.10★	1.36±0.06★	0.92±0.08★
DSCS3	113.23±7.53	34.68±1.47※	2.95±0.24※	1.56±0.05※	1.43±0.29※
PAD3	115.53±7.34	38.50±2.10※	2.91±0.26※	1.57±0.15※	1.42±0.28※

△: $P<0.05$, *vs* NC; ★: $P<0.05$, *vs* CL; ※: $P<0.05$, *vs* same phase MCS; *: $P<0.05$, *vs* same phase DSCS

3 讨论

本实验条件下,MCS 组术后肝功能持续显著降低,PAD 组术后肝功能一过性降低,至术后2周时基本恢复到术前水平。与 MCS 及 PAD 组相比,DSCS 组术后功能改变不显著。这与我们的临床资料相符合;也说明本模型类似于人类肝硬变。

本实验资料显示,肝硬变时肝脏线粒体呼吸活性低下,而 MCS 能进一步降低硬变肝脏的线粒体功能。这与以往的研究结果相似[6,7]。但是,DSCS 及 PAD 对硬变肝脏线粒体功能的影响较小,这与两种手术动物肝脏功能的变化相一致。

各种手术对肝硬变门静脉高压症近远期疗效影响的主要原因之一是门静脉向肝血流量[8]。而门静脉向肝血流量取决于自然及手术后门体分流率。本实验条件下,CL 组 PSS 为16.28%±3.47%,显著高于正常对照组。MCS 术后 PSS 高达75.0%～86.7%,因而门静脉向肝血流大幅度降低,结果导致肝脏线粒体呼吸功能恶化,DSCS 组在远端脾腔静脉吻合的同时施行了门奇断流和脾胰断流,故术后 PSS 较术前有所降低,因而门静脉向肝血流得以维持,术后肝脏线粒体呼吸功能和血液肝功能参数较稳定。PAD 术阻断了食管下端和胃底的反常分流,故术后 PSS 也有所降低,其肝脏线粒体呼吸功能及血肝功参数在一过性降低后较快恢复至术前水平。

综上所述,本实验结果表明,MCS 分流量大,使硬变肝脏血流量锐减,导致术后肝功能恶化,而 DSCS 与 PAD 相似不增加门体分流量,可维持门静脉向肝血流及肝脏功能,是一种比较理想的术式。

参考文献

1 Layton F, Pikkars MD, Gongliang Jin. Surgical management of acute variceal hemorrhage. World J Surg, 1994;18(2):193

2 吴孟超,杨广顺. 大鼠肝硬变模型复制的研究. 中华实验外科杂志,1984;1(4):145

3 董家鸿,段恒春,韩本立等. 免自身对照性胆原性脓毒症模型的建立. 第三军医大学学报,1996;18(1):52

4 Kimmich GA, Randles J, Brand JS. Assay of picomole of amounts of ATP, ADP, AMP using the luciferase enzyme system. Anal Biochem, 1975;69(3):187

5 罗德成,高京生,刘士群等. 急性缺氧大鼠的心输出量和局部血流量. 中国病理生理杂志,1988;4(1):35

6 Lin HE, Soubrane O, Lebrec D. Prevention of hypertension and portosystemic shunts by early chronic administration of clonidine in conscious portal vein-stenosed rats. Hepatology, 1991;14(2):325.

7 Omodawas, Asamuma Y, Koyama K. Evaluntion of hemodynamics and hepatic mitochondrial function on extrahepatic portal obstruction in the rat. Would J Surg, 1990;14(2):247

8 蔡景修. 选择性分流术式的进展与远端脾腔分流术. 见:谭毓全主编. 现代肝胆胰脾外科. 长春:吉林科学技术出版社,1992:69～76

(收稿:1995-05-16;修回:1996-01-07)

(编辑 张大春)

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

Effects of different types of operation on mitochondrial respirtory function of cirrhotic liver in rats

Xu Xingbao, Cai Jingxiu, Dong Jiahong, Han Benli (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract In order to observe the characteristics of cirrhotic portal hypertension and assess the effects of different types of operation on the mitochondrial respiratory function in the cirrhotic liver, several indices of liver functions, hepatic mitochondrial respiratory function, tissue content of adenosine triphosphate, ultrastructural changes of the liver and portosystemic shunt rate were determined respectively in 4 groups of rats with mesocaval shunt (MCS), porto-azygos disconnection (PAD), distal splenocaval shunt (DSCS) and simple cirrhotic liver and in the normal control after the rat model of cirrhotic portal hypertension was established with carbon tetrachloride lethanol injection. It was found that the mitochondrial respiratory function was lowered under cirrhotic state, further decreased after MCS but not significantly affected after DSCS or PAD, which indicates that DSCS and PAD are the surgical procedures of choice to treat cirrhotic portal hypertension.

Key words mitochondria; respiratory function; liver cirrhosis/surgery; rat

（上接 47 页）

附表　海马内微量注射半胱胺对同侧和对侧海马内生长抑素含量和痛阈的影响（$\bar{x}\pm s$）

	海马内 Som 含量（$pg\cdot g^{-1}$）				痛阈（s）
	动物数	同侧	动物数	对侧	
对照组	7	58.4±5.2	5	57.9±6.3	
ASCF 组	7	54.6±3.4	6	54.4±3.7	28±5
1 h	7	43.9±6.8*			
24 h	5	33.7±4.5*			
d 2	8	9.8±1.6*	8	57.0±5.7	
d 4	5	9.3±0.7*	9	55.1±5.8	32±8
d 6	5	17.9±11.3*			
d 8	6	56.5±5.2			

*：与 ACSF 组比较 $P<0.01$

2.3　海马内注射 Cys 对海马 Som 含量和主动回避反应正确率（AARR）的影响

双侧海马内微量注射 Cys（40 $mg\cdot ml^{-1}$，2 μl）后，于第6天 ACSF 组的 AARR 连续三天达80%以　.Cys 组（双侧海马内 Som 含量显著下降，从49.1±5.0 $pg\cdot g^{-1}$降至29.2±2.6 $pg\cdot g^{-1}$的 AARR 与 ACSF 组比较则明显下降（从84.0%±6.5%降至44.4%±6.0%）。

3　讨论

本实验观察到海马内微量注射半胱胺（30 $mg\cdot ml^{-1}$，2 μl）后1 h，同侧海马内 Som 含量便开始下降，第2和第4天降至最低点，第8天基本恢复到正常水平，而对侧海马内 Som 含量并未受影响。有关资料表明，纹状体内微量注射 Cys 50 μg 6 h 后，同侧纹状体内 Som 含量便降至最低点（约下降了50%），第4天已完全恢复到正常水平[1]，而对侧纹状体内 Som 含量亦可被耗竭[1]。由此看来，Cys 对中枢不同部位 Som 耗竭的时程和特点并不完全相同。鉴于 Cys 除可耗竭 Som 外，还可影响中枢内催产素[6]，因此有关 Cys 的作用机理迄今并未完全阐明。

本文还观察到以 Cys 耗竭一侧海马内 Som，使其中的 Som 含量下降了83.9%后，大鼠的痛阈并无明显变化，而耗竭双侧海马内 Som 下降了41.3%时，AARR 则显著降低，由此可见海马内 Som 与痛阈关系不大，但与学习记忆的 AAR 习得功能有关。这一结果与以往报道[2]是一致的。

关键词　生长抑素；半胱胺；海马；痛阈；主动回避反应
中图法分类号　R338

参考文献

1 Beal MF, Martin JB. Depletion of striatal somatostatin by local cysteamine injection. Brain Res, 1984; 308: 319
2 吉卫清，张长城，张光辉. 海马内生长抑素与 γ-氨基丁酸在大鼠穿梭箱主动回避反应中的作用. 中国应用生理学杂志，1995; 11: 40
3 Zheng L, Li XC. Effect of intracerebroventricular injection of somatostatin or GABA on pain threshold and contents of GABA or somatostatin in rat brain. 中国药理学报，1995; 16: 329
4 张长城，周毓生，张光辉. 海马内注射6-OHDA 对大鼠条件行为习得和保持的影响. 生理学报，1992; 245: 434
5 李希成，黎海蒂，赵邦云等. 脑室注射生长抑素对大鼠痛阈和脑内单胺类、黄嘌呤、次黄嘌呤含量的影响. 中国药理学报，1991; 10: 507
6 Millard WJ, Sagar SM, Martin JB. Cysteamine-induced depletion of somatostatin and prolactin. Fed Proc, 1985; 44: 2546

（收稿：1995-04-21；修回：1996-01-09）
（编辑　冯崇英）

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