

· 基础研究 ·

不同入肝血流阻断方式对荷瘤小鼠肝功能影响的实验研究*

史斌 李崇辉 陈永卫 葛新兰 张爱群 董家鸿[△]

(解放军总医院 全军肝胆外科研究所 北京 100853)

摘要 目的 探讨不同血流阻断方式对荷瘤小鼠肝细胞功能的影响。方法 选择昆明小鼠 24 只随机分为三组,正常对照组(Suspended operation,SO)、肝门阻断组(Occlusion of the portal triad,OPT)、保留肝动脉持续阻断门静脉(Occlusion of portal vein,OPV)各 8 只。采用门静脉注射肿瘤的方法建立肝癌模型,建模后 3 天采用阻断范围为左外叶和中叶、阻断时间为 60 分钟的入肝血流阻断方式,复流后 5 天后,通过测量 3 组对肝脏的缺血再灌注损伤程度以及病理学变化来评价不同血流阻断方式对肝细胞功能影响的程度。结果 门静脉注射小鼠肝癌细胞 8 天后,对照组测量小鼠正常丙氨酸氨基转移酶(ALT)值为 66.5 ± 22.3 IU/L,OPT 组值为 276.3 ± 80.5 IU/L,OPV 组值为 89.6 ± 28.4 IU/L,两组比较有统计学差异($P < 0.01$);对照组测量小鼠正常天冬氨酸氨基转移酶(AST)值为 301.3 ± 126.7 IU/L,OPT 组值为 1126.4 ± 285.5 IU/L,OPV 组值为 438.6 ± 150.7 IU/L,两组比较有统计学差异($P < 0.01$),病理组织学 OPV 组肝细胞损伤程度明显较 OPT 组轻。结论 保留肝动脉持续阻断门静脉可以减轻荷瘤小鼠肝脏的缺血再灌注损伤。

关键词 肝脏;血流阻断;缺血再灌注损伤;荷瘤小鼠

中图分类号 R-332 R322.61 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)14-2601-04

Effect of Different Hepatic Occlusion on Liver Function in Tumor-bearing Mice*

SHI Bin, LI Chong-hui, CHEN Yong-wei, GE Xin-lan, ZHANG Ai-qun, DONG Jia-hong[△]

(Institute of Hepatobiliary Surgery, Department of Hepatobiliary Surgery of General Hospital of PLA, Beijing, 100853, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of different hepatic vascular occlusion maneuvers on liver function in tumor-bearing mice. **Methods:** Twenty-four Kunming healthy mice were randomly divided into three groups, including SO (sham operation) ($n=8$), group OPT (occlusion of portal triad) ($n=8$) and group OPV (occlusion of portal vein) ($n=8$). Three days after an hepatocellular carcinoma model was established using portal vein injection, mice underwent either simultaneous clamping of both the portal portal vein and the hepatic artery or selective clamping of the portal vein to the median and left liver lobes for 60 minutes. Sham-operated mice served as controls. The ischemia-reperfusion (I/R), pathological changes of liver tissue were evaluated. **Results:** The OPV group showed significantly lower ALT, AST value in the restoration of blood flow after five days than the OPT group. Hepatocytes in the OPV group were much less injured than in the OPT group in histopathology. **Conclusion:** Presevering hepatic artery flow during portal triad blood inflow occlusion reduces liver ischemia-reperfusion injury in tumor-bearing mice.

Key words: Liver; Blood flow occlusion; Ischemia-reperfusion; Mice

Chinese Library Classification (CLC): R-332, R322.61 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)14-2601-04

前言

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC, 简称肝癌) 是全球第五大恶性肿瘤, 每年约 54% 新发病的肝癌病例在我国大陆, 占我国恶性肿瘤死亡率的第二位^[1]。肝癌的治疗已经进入了多元化治疗的时代, 手术切除是相对有效的治疗方法^[2]。由于肝脏复杂的血管分布和丰富的血液供应, 肝切除过程中创面出血是影响手术及术后患者恢复的重要因素。因此, 肝脏出血和如何控制出血成为肝脏外科中的核心问题。自 1908 年 Pringle 提

出通过阻断肝蒂的入肝血流来减少肝脏手术时出血的方法后, 人们又提出了多种改良方法, 如半肝血流阻断法、肝褥式缝合法等, 很大程度上提高了肝脏手术的安全性, 促进了复杂肝脏手术的开展^[3]。复杂的肝脏手术如肝切除、肝移植等往往需暂时性阻断肝脏的血流, 但肝脏是机体能量代谢的主要器官之一, 对缺血和缺氧甚为敏感, 缺血情况下, 肝细胞内的能量很快耗尽, 带来肝细胞在功能和结构上的伤害, 细胞损伤的程度是与缺血时间成正比的, 然而在恢复血流后, 又会产生以氧自由基生成为主的多种损害因子共同作用造成肝细胞更严重的损伤。

* 基金项目 国家传染病防治科技重大专项资助(2008zx10002-26) 北京市科技计划课题(Z101107050210013)

作者简介 史斌(1981-) 男, 硕士, 主要从事肝胆胰脾疾病的诊治研究。E-mail: shib2011@sina.com

[△]通讯作者 董家鸿, 男, 博士生导师, 主任医师, 电话: 010-66938030, E-mail: Dongjh@163.com

(收稿日期: 2011-11-05 接受日期: 2011-11-30)

笔者在临床工作实践中发现,肝脏恶性肿瘤的治疗方法以手术切除居多,肝脏良性肿瘤需要手术治疗的相对较少,而肝脏恶性肿瘤中肝细胞肝癌所占的比重较大。在以往文献报道中,不同入肝血流阻断方式对正常肝脏的影响研究较多^[4-6],而对荷瘤肝脏功能的影响研究较少。香港大学 K Man 学者的观点是肝 I/R 损伤导致的手术应激,通过急性期的炎症反应和微循环功能的紊乱使肝脏微环境更加适合肿瘤生长、迁徙和入侵^[7]。因此,究竟采用何种阻断方法,既可以减少出血,又可以减轻缺血再灌注损伤,成为我们研究的重点内容。本实验通过建立小鼠肝癌模型采用不同入肝血流阻断方式对荷瘤肝脏功能的影响进行深入广泛研究。

1 材料与方法

1.1 动物分组

1.1.1 实验动物及分组 雄性健康昆明小鼠 24 只,体重 35~45g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供。随机分为 3 组,每组 8 只,分别是肝门阻断组(Occlusion of the portal triad, OPT)、单纯门静脉阻断组(Occlusion of portal vein, OPV)、对照组(Suspended operation, SO)。

1.1.2 肝 I/R 的动物模型 动物术前禁食,自由饮水,严格的光线控制,给予 12h 的昼夜间隔。术后饮用 10%葡萄糖注射液,麻醉采用 0.2%戊巴比妥钠,按 1.75ml/100g 腹腔内注射,术中间断应用乙醚吸入维持麻醉状态。麻醉成功后用碘伏消毒腹部,取腹正中切口入腹,切口长约 1.0~1.5cm,充分暴露肝区结构,离断肝周韧带,以显微外科方法分出支配肝左、中叶的门静脉,肝动脉和胆管,用无损伤小动脉夹夹闭整个肝左、中肝肝蒂,约占整个肝叶的 70%,阻断时限为 60 分钟,造成受累肝脏完全缺血,到预定观察时点,去除肝蒂阻断夹,恢复肝脏血流,此即肝门阻断组;其次,充分暴露肝门部,仔细分出支配分支往左、中肝的肝蒂,小心剥离其表面的 Glisson 鞘及胆管,用无损伤小动脉夹夹闭左、中门静脉分支,同时保留左、中肝的肝动脉血供及右肝血供。夹闭 60 分钟后松开动脉夹,恢复肝脏血流,此即单纯门静脉阻断组;开腹后,分离出门静脉和动脉,不阻断入肝血流,此即对照组。整个手术过程是在无菌条件下操作,使用保鲜膜覆盖周围皮肤以避免失水。使用 5-0 慕丝分别缝合腹膜和皮肤。5 天后,收获标本。

1.1.3 肝癌细胞培养和肝癌模型的建立 H22 肝癌瘤株形态特性为实体瘤、腹水瘤,生长特性是体内生长,制备成细胞悬液接种至 BALB/C 小鼠体内。取 H22 肝癌细胞在显微镜下细胞计数后,分离 H22 肝癌细胞,制成浓度为 5×10^6 cells/100 μ l 的细胞悬液,台盼蓝染色检查细胞活性,成活率 95%以上即可接种。开腹后,从门静脉起始端使用 32G 胰岛素注射针头以 10 μ l/秒的速度注射 5×10^6 /100 μ l,拔出针尖,用棉签按压注射点 1 分钟,确认无出血后,滴入粘停宁液以预防再次开腹时粘连,腹腔内注入少量盐水,使用 5-0 慕丝分别缝合腹膜和皮肤。3 天后,开腹阻断。

1.2 评估方法

1.2.1 缺血再灌注损伤的评估 血清转氨酶的变化被普遍用以评估肝细胞损伤程度,本实验分别测量阻断复流后 5 天自肝下腔静脉采集静脉血 1ml,放入促凝管促凝后,即刻将标本行 3500 转/分离心 5 分钟后,取上清液,备检血清 ALT、AST,用以评估两种阻断方法对肝细胞的损伤程度。血液标本检测由我院生化科提供的全自动生化分析仪(Cobas-MiraPlus Roche, Mannheim, Germany)测量完成。

1.2.2 肝细胞损伤程度的组织病理学观察 肝门阻断复流后 5 天处死小鼠,取肝脏标本,肝脏组织用 10%中性甲醛溶液固定,脱水,修剪成 1cm $\times$ 1cm $\times$ 0.5cm 大小组织块,制成蜡块,常规行 4 μ m 切片后苏木精-伊红 HE 染色,用光镜观察肝组织病理形态变化。由解放军总医院病理科协助完成。

1.2.3 统计学处理 所有数据使用 SPSS10.0 统计学软件进行处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 不同入肝血流阻断法阻断 60 分钟复流后 5 天 ALT、AST 的数值

对照组测量荷瘤小鼠正常 ALT 值为 66.5 ± 22.3 U/L, OPT 组值为 276.3 ± 80.5 U/L, OPV 组值为 89.6 ± 28.4 U/L, 两组对比有明显统计学差异($P < 0.01$),见图 1。对照组测量小鼠正常 AST 值为 301.3 ± 126.7 U/L, OPT 组值为 1126.4 ± 285.5 U/L, OPV 组值为 438.6 ± 150.7 U/L, 两组对比有明显统计学差异($P < 0.01$),见图 2。

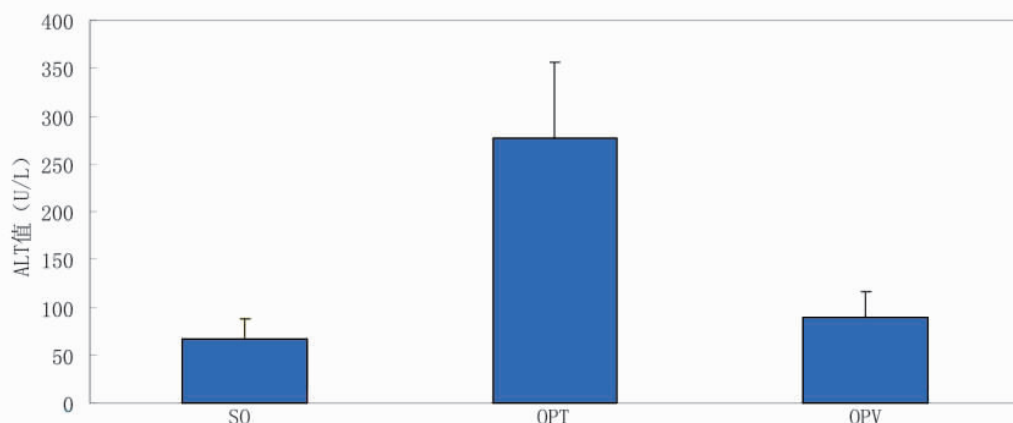


图 1 阻断 60 分钟复流后 5 天 ALT 变化

Fig.1 ALT value in the restoration of blood flow after five days

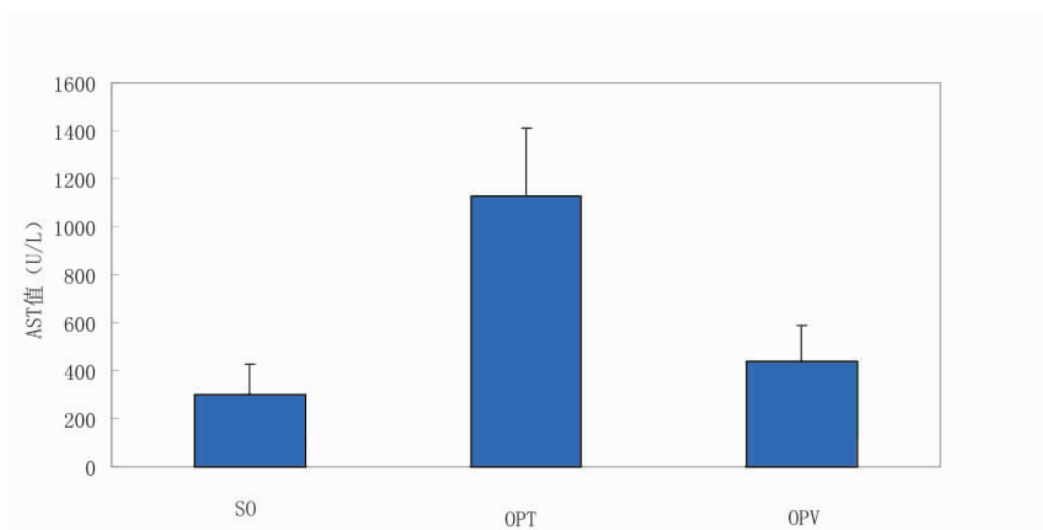


图2 阻断60分钟复流后5天AST变化

Fig.2 AST value in the restoration of blood flow after five days

2.2 阻断60min复流后5天的肝脏组织学变化

两种阻断方法阻断60min,复流后5天,处死大鼠,观察组织病理学变化。

复流后5天病理改变:OPT组可见肝小叶结构基本清晰,

肝窦条索状结构相对完整,肝窦内炎性细胞明显浸润(图3A),肿瘤细胞周围见有大量的坏死区域(图3B),OPV组可见肝小叶结构清晰,肝窦内少量炎细胞浸润(图3C),肿瘤细胞周围坏死区域较少(图3D)。

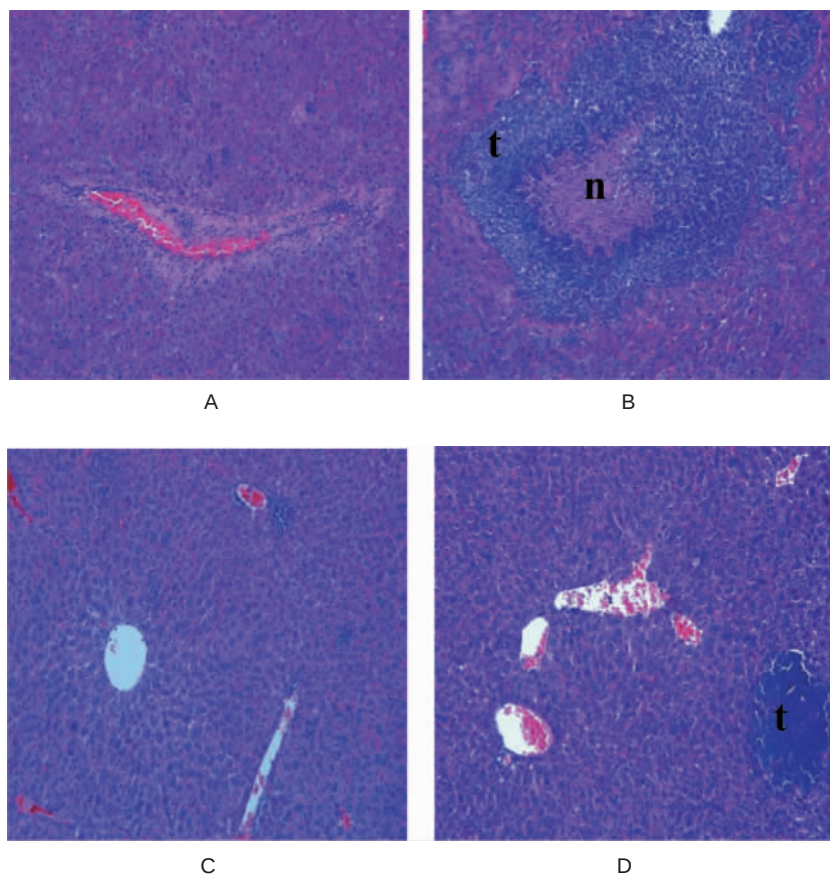


图3 阻断60分钟复流后5天的肝脏组织学变化

Fig.3 Pathological changes of liver tissue in the restoration of blood flow after five days at tumor n necrosis

3 讨论

由于肝脏复杂的解剖结构,以往的肝切除总是伴随着大量出血和较高的病死率。肝切除术易发生大量出血,如何减少出

血成为手术成败的关键。越来越多临床实践证实,术中大量输血可能导致术后病死率、并发症发生率增高及肝癌患者长期生存率降低^[9]。因此,如何减少出血成为手术成败的关键。肝切除时减少出血的常见方法有:术中降低中心静脉压^[9-12],切肝时应用超声吸引刀、热凝(微波固化)^[13-15],阻断入肝血流伴有或不伴有出肝血流的控制^[16-20]。在这些方法当中,入肝血流阻断是相对有效的方法。各种入肝血流阻断方法均存在不同程度的缺血再灌注损伤,影响肝脏功能。在本研究中我们优化不同入肝血流阻断的方法,来评估其对肝细胞损伤的程度。

ALT 及 AST 是反应肝功能的最灵敏指标,肝脏缺血时在血清中较早升高。在肝缺血再灌注后,ALT 及 AST 均有不同程度的升高。从实验结果分析,肝细胞受损后,细胞通透性增强,使得细胞内丙氨酸氨基转移酶(ALT)及门冬氨酸氨基转移酶(AST)渗出细胞外进入到血液,因此血液中上述酶的升高是肝细胞受损的敏感指标。从实验结果分析在复流后 5 天 OPT 组转氨酶值明显高于 OPV 组,两者比较有明显统计学差异($P<0.01$),因此笔者认为,保留肝动脉能够一定程度上减轻缺血再灌注对肝细胞的损伤程度。

从肝脏组织病理学切片观察,OPT 组可见肝小叶结构基本清晰,肝窦条索状结构相对完整,肝窦内炎性细胞明显浸润,肿瘤细胞周围见有大量的坏死区域,OPV 组可见肝小叶结构清晰,肝窦内少量炎细胞浸润,肿瘤细胞周围坏死区域较少。可见保留动脉血供可以明显减轻复流后炎性细胞浸润及肝细胞的损伤程度。

本研究表明,持续肝门阻断时,保留肝动脉入肝血流,和完全阻断组相比可以明显减轻对肝细胞的缺血再灌注损伤,因此,我们认为在荷瘤小鼠实验中,保留肝动脉持续阻断门静脉同样可以减轻缺血再灌注对肝细胞的损伤程度。

肝切除术在肝脏疾病的治疗中举足轻重的地位,术中出血的控制又是肝切除术中最关键的环节。肝血流阻断术在控制肝切除术中出血发挥重要作用,选择适当的血流阻断方法、有效的阻断时间才能达到控制最佳止血效果和最少并发症的发生。随着手术设备、手术方式的不断改进,减少肝切除术出血将会有更多的选择,手术亦会更安全。在以后的工作中,我们将建立肝硬化基础上的肝癌模型,深入地研究和探讨不同入肝血流阻断方式对肝细胞功能的影响及其发生发展机制。

参考文献(References)

- [1] Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000[J]. *Lancet Oncol*, 2001, 2(9): 533-543
- [2] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2003, 362(9399): 1907-1917
- [3] Wu CC, Yeh DC, Ho WM, et al. Occlusion of hepatic blood inflow for complex central liver resections in cirrhotic patients: a randomized comparison of hemihepatic and total hepatic occlusion techniques[J]. *Arch Surg*, 2002, 137(12): 1369-1376
- [4] Wei CY, Hui LC, Zhang AQ, Yang SZ, Zhang WZ, Dong JH. Preserving Hepatic Artery Flow During Portal Triad Blood Inflow Occlusion Reduces Liver Ischemia-Reperfusion Injury in Rats [J]. *J Surg Res*, 2011, 1-7
- [5] 保留半肝动脉血供的入肝血流阻断法对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(30): 3168-3131

- Effect of hepatic blood inflow occlusion without hemihepatic artery control during hepatic ischemia-reperfusion injury in rats [J], 2007, 15 (30): 3168-3131
- [6] der Bilt JD v, Kranenburg O, Verheem A, van HR, Borel RIH. Selective portal clamping to minimize hepatic ischaemia-reperfusion damage and avoid accelerated outgrowth of experimental colorectal liver metastases[J]. *Br J Surg England*, 2006, 93(8):1015-1022
- [7] Man K, Ng KT, Lo CM, et al. Ischemia-reperfusion of small liver remnant promotes liver tumor growth and metastases-activation of cell invasion and migration pathways. *Liver Transpl*. 13(12)[J]. United States, 2007: 1669-1677
- [8] Makuuchi M, Mori T, Gunven P, Yamazaki S, Hasegawa H. Safety of hemihepatic vascular occlusion during resection of the liver [J]. *Surg Gynecol Obstet*, 1987, 164(2): 155-158
- [9] Wu CC, Yeh DC, Ho WM, et al. Occlusion of hepatic blood inflow for complex central liver resections in cirrhotic patients: a randomized comparison of hemihepatic and total hepatic occlusion techniques [J]. *Arch Surg*, 2002, 137(12): 1369-1376
- [10] Smyrniotis VE, Kostopanagiotou GG, Gamaletsos EL, et al. Total versus selective hepatic vascular exclusion in major liver resections[J]. *Am J Surg*, 2002, 183(2): 173-178
- [11] Chen XP, Zhang ZW, Zhang BX, et al. Modified technique of hepatic vascular exclusion: effect on blood loss during complex mesohepatectomy in hepatocellular carcinoma patients with cirrhosis[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2006, 391(3): 209-215
- [12] Smyrniotis V, Kostopanagiotou G, Theodoraki K, Tsantoulas D, Contis JC. The role of central venous pressure and type of vascular control in blood loss during major liver resections[J]. *Am J Surg*, 2004, 187 (3): 398-402
- [13] Strasberg SM, Drebin JA, Linehan D. Use of a bipolar vessel-sealing device for parenchymal transection during liver surgery [J]. *J Gastrointest Surg*, 2002, 6(4): 569-574
- [14] Weber JC, Navarra G, Jiao LR, Nicholls JP, Jensen SL, Habib NA. New technique for liver resection using heat coagulative necrosis[J]. *Ann Surg*, 2002, 236(5): 560-563
- [15] Fan ST, Ng IO, Poon RT, Lo CM, Liu CL, Wong J. Hepatectomy for hepatocellular carcinoma: the surgeon's role in long-term survival[J]. *Arch Surg*, 1999, 134(10): 1124-1130
- [16] Figueras J, Llado L, Ruiz D, et al. Complete versus selective portal triad clamping for minor liver resections: a prospective randomized trial[J]. *Ann Surg*, 2005, 241(4): 582-590
- [17] Man K, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL, Wong J. Prospective evaluation of Pringle maneuver in hepatectomy for liver tumors by a randomized study[J]. *Ann Surg*, 1997, 226(6): 704-711
- [18] Belghiti J, Noun R, Zante E, Ballet T, Sauvanet A. Portal triad clamping or hepatic vascular exclusion for major liver resection. A controlled study[J]. *Ann Surg*, 1996, 224(2): 155-161
- [19] Van GTM, De Graaf W, Dinant S, Busch OR, Gourma DJ. Vascular occlusion techniques during liver resection [J]. *Dig Surg*, 2007, 24 (4): 274-281
- [20] Dixon E, Vollmer CM Jr, Bathe OF, Sutherland F. Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection[J]. *Am J Surg*, 2005, 190(1): 75-86