

临床研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000057

肝门阻断过程中扪摸对肝缺血再灌注损伤的影响及其机制研究

李胜伟, 刘超, 庞志刚, 何燕新

(郑州大学第二附属医院普外科, 郑州 450004)

【摘要】目的:研究肝门阻断过程中扪摸对肝缺血再灌注损伤的影响及其机制。**方法:**30 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组:假手术组仅行开腹及肝门分离;缺血再灌注模型(ischemia reperfusion, IR)组采用 Pringle's 法阻断肝门 15 min,再灌注 6 h;干预(manipulation, MN)组操作同 IR 组,且在肝门阻断过程中对大鼠肝脏进行轻柔挤压及摩擦 13 min。分别取门静脉血清测转氨酶[谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT),谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)];取肝组织作病理学检查,同时行免疫组化法测定肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和 P-选择素表达水平。**结果:**MN 组和 IR 组较假手术组:血清 ALT、AST 水平明显升高($P=0.000$);肝组织病理损伤评分升高($P=0.000$);肝组织内 TNF- α 和 P-选择素表达升高($P=0.000$)。其中上述指标在 MN 组中水平较 IR 组均明显增高($P=0.000$)。**结论:**在肝门阻断过程中手术操作本身即扪摸加重肝缺血再灌注损伤,可能是通过增加黏附因子的表达,加重中性粒细胞的聚集,从而导致炎症损伤加重。

【关键词】肝脏;扪摸;肝缺血再灌注损伤;肿瘤坏死因子- α ;P-选择素

【中图分类号】R657.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-01-07

Effects of gentle liver manipulation *in vivo* on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism

Li Shengwei, Liu Chao, Pang Zhigang, He Yanxin

(Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Zhengzhou University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of the gentle liver manipulation, including touching, retracting and moving liver lobes gently, on hepatic ischemia-reperfusion injury during hepatic ischemia and its mechanism. **Methods:** Thirty SD rats were divided into three groups randomly: sham-operated group (sham group), ischemia reperfusion group (IR group: produced by total inflow occlusion for 15 min) and manipulation group (MN group: induced with 13 min gentle manipulation including touching, retracting and moving lobes during 15 min ischemia). Serum aminotransferases alanine transaminase and aspartate aminotransferase (ALT and AST), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and P-selection in the liver were measured after reperfusion. **Results:** In MN and IR groups, serum ALT and AST ($P=0.000$) as well as pathological injury scores ($P=0.000$) were increased; TNF- α and P-selection expressions were higher ($P=0.000$) compared with those in sham group. Those variables mentioned above were significantly increased in MN group compared with those in IR group ($P=0.000$). **Conclusions:** Gentle *in vivo* liver manipulation increases the reperfusion injury during hepatic ischemia, which may be caused by the decrease of pro-inflammatory and activity of neutrophils.

【Key words】 liver; manipulation; ischemia reperfusion injury; tumor necrosis factor- α ; P-selection

在肝脏外科手术如肝部分切除术、部分肝移植过程当中经常需要用 Pringle's 手法进行肝门阻断,且在手术操作过程当中无可避免对肝脏施以摩擦或挤压。既往有研究证实,在肝脏移植手术器官摘取的操作过程当中,对肝组织的摩擦、挤压及肝叶的移动会加重移植器官的缺血再灌注损伤,导致术

后移植器官的存活率下降^[1]。本实验通过对大鼠肝门阻断过程当中,对其进行轻柔摩擦、挤压,观察该操作在在体肝脏肝门阻断过程中对肝再灌注损伤的影响及其可能的机制。

1 对象和方法

1.1 研究对象

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 200~250 g,由河南省动物实验中心提供。

作者介绍:李胜伟,Email:806030827@qq.com,

研究方向:肝、胆、胰疾病的诊断与治疗。

通信作者:刘超,Email:drliuchao@sohu.com。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000057.html

1.2 主要试剂仪器

肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、P-选择素抗体由美国 Santa Cruz 公司提供。SP9000 试剂盒和 DAB 试剂盒由北京中杉生物工程公司提供。日本日立 7600 全自动生化分析仪。德国 Leica 显微照像系统。

1.3 实验方法

雄性 SD 大鼠随机分为 3 组 ($n=10$): 假手术组、缺血再灌注 (ischemia reperfusion, IR) 组及干预 (manipulation, MN) 组。大鼠术前禁食 12 h, 不禁水。10% 水合氯醛 300 mg/kg 腹腔注射麻醉。取正中切口入腹。假手术组仅行开腹、肝门暴露及关腹。IR 组使用无创动脉夹完全阻断肝门 (Pringle's 法), 15 min 后移除动脉夹并关腹, 再灌注 6 h。MN 组操作同 IR 组, 并在肝门阻断过程中对肝叶进行轻柔摩擦及挤压 13 min^[2]。各组大鼠于再灌注 6 h 后取门静脉血液及肝右叶组织, 分别测量血清转氨酶谷丙转氨酶 (alanine transaminase, ALT) 和谷草转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 及肝组织中 TNF- α 和 P-选择素表达。

1.4 结果判定

1.4.1 肝功能测定 使用全自动生化分析仪测定血清 ALT 和 AST。

1.4.2 肝组织病理学检查 肝组织甲醛固定 48 h 后 HE 染色。光镜下每个标本随机取 5 个视野平均值作为每个标本评分值。肝组织损伤分级和评分标准: 0 分: 肝小叶、肝细胞、肝细胞索、肝窦、中央静脉均正常; 1 分: 肝细胞少量变性, 汇管区少量炎细胞浸润; 2 分: 肝窦、肝中央静脉内淤血, 肝小叶内散在肝细胞变性、坏死, 肝组织内较多炎性细胞浸润, 肝小叶结构完整; 3 分: 肝窦、肝中央静脉内淤血, 广泛肝细胞变性、坏死, 肝组织大量炎性细胞浸润, 部分肝小叶破坏^[3]。

1.4.3 免疫组化法 (SP 法) 观察肝组织 TNF- α 和 P-选择素表达 肝组织石蜡切片免疫组化法标记。按 Sp9000 试剂盒说明书, DAB 显色, 苏木精复染。光镜下观察胞质和 (或) 胞膜棕黄色颗粒表达情况, 放大倍数 4×100 。结果以阳性区平均灰度值表示。

1.5 统计学方法

SPSS 13.0 统计软件进行统计处理, 所有资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学分析采用单因素方差分析, 其组间两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 血清 ALT、AST 水平测定结果

IR 组和 MN 组 ALT、AST 水平较假手术组明显升高 ($P=0.000$), 其中 MN 组较 IR 组 AST、ALT 水平明显增高 ($P=0.000$)。结果见表 1。

2.2 光镜下肝组织病理改变及评分

假手术组肝细胞未见有变性 & 坏死, 未见有明显炎症细

胞。IR 组可见大量肝细胞变性。MN 组可见少量细胞坏死。评分结果: IR 组 (0.93 ± 0.13) 和 MN 组 (2.10 ± 0.15) 分别比假手术组 (0.15 ± 0.12) 高 ($P=0.001$), 而 MN 组较 IR 组水平明显增高 ($P=0.000$, 图 1~图 3)。

表 1 各组血清 ALT、AST 比较

Tab.1 Comparison of ALT and AST in each group

组别	例数 (n)	ALT (U/L)	AST (U/L)
假手术组	10	57.25 ± 16.05	76.50 ± 12.38
IR 组	10	251.87 ± 50.80^a	226.75 ± 19.12^a
MN 组	10	366.75 ± 89.45^b	792.25 ± 87.71^b
F 值		54.19	416.21
P 值		0.000	0.000

注: 与假手术组比较, a, $P<0.05$; 与 IR 组比较, b, $P<0.05$

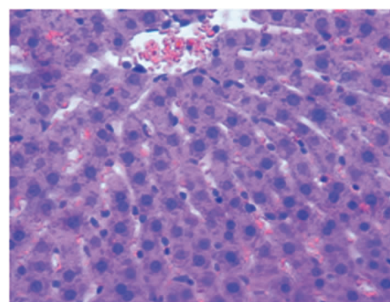


图 1 假手术组大鼠肝脏组织病理学检查结果 (HE, 400 $\times$)

Fig.1 Histological examination of rat's liver tissues in sham group (HE, 400 $\times$)

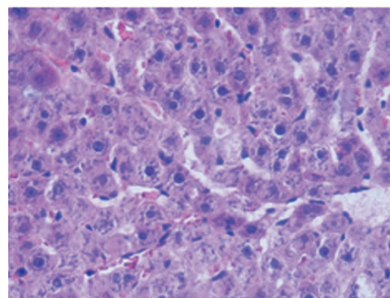


图 2 IR 组大鼠肝脏组织病理学检查结果 (HE, 400 $\times$)

Fig.2 Histological examination of rat's liver tissues in IR group (HE, 400 $\times$)

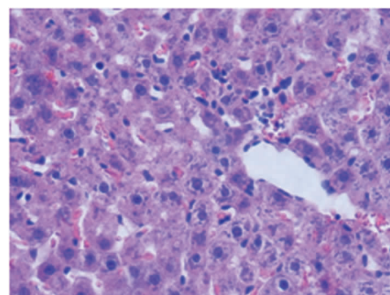


图 3 MN 组大鼠肝脏组织病理学检查结果 (HE, 400 $\times$)

Fig.3 Histological examination of rat's liver tissues in MN group (HE, 400 $\times$)

2.3 免疫组化法肝组织 TNF-α 和 P-选择素表达

各组 TNF-α 和 P-选择素表达情况见表 2 和图 4、图 5。TNF-α 和 P-选择素阳性染色表达均呈棕黄色颗粒,且均定位于细胞的细胞质和(或)胞膜。

表 2 各组 TNF-α、P- 选择素比较

Tab.2 Comparison of TNF-α and P-selection in each group

组别	例数(n)	TNF-α (灰度值)	P-选择素(灰度值)
假手术组	10	85.52 ± 6.31	91.05 ± 2.66
ER组	10	132.08 ± 4.84 ^a	142.14 ± 3.60 ^a
MN组	10	150.50 ± 12.11 ^b	151.91 ± 2.36 ^b
F 值		128.19	1000.39
P 值		0.000	0.000

注:与假手术组比较,a,P<0.05;与 IR 组比较,b,P<0.05

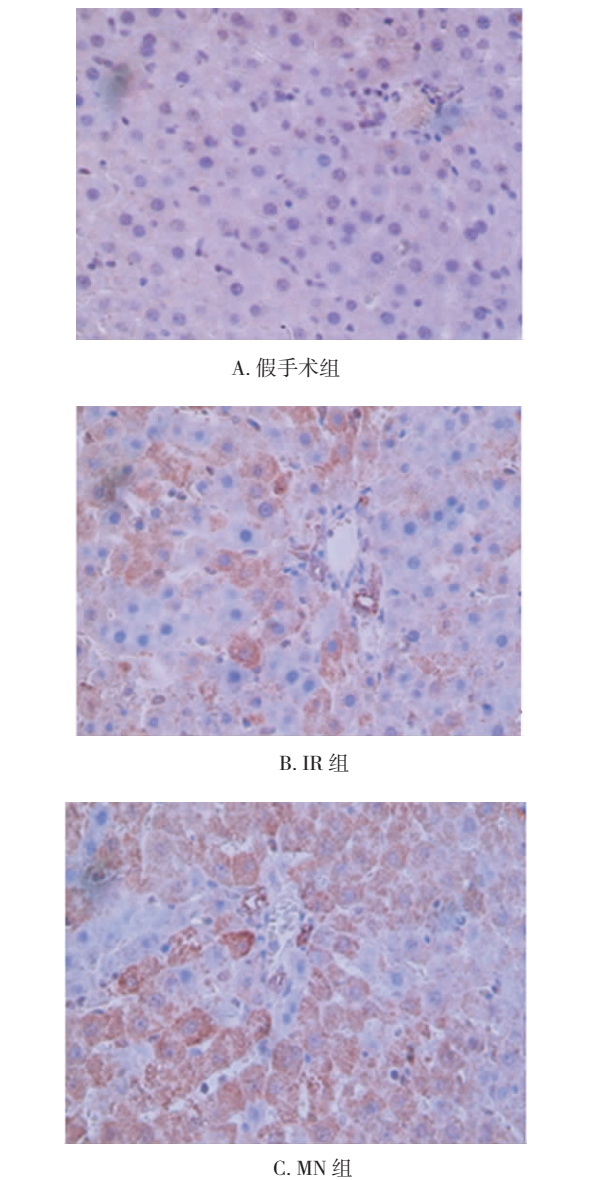


图 4 各组大鼠肝脏组织 TNF-α 表达情况 (免疫组化,400 ×)
Fig.4 Expression of TNF-α in rats' liver tissues in each group (immunohistochemistry,400 ×)

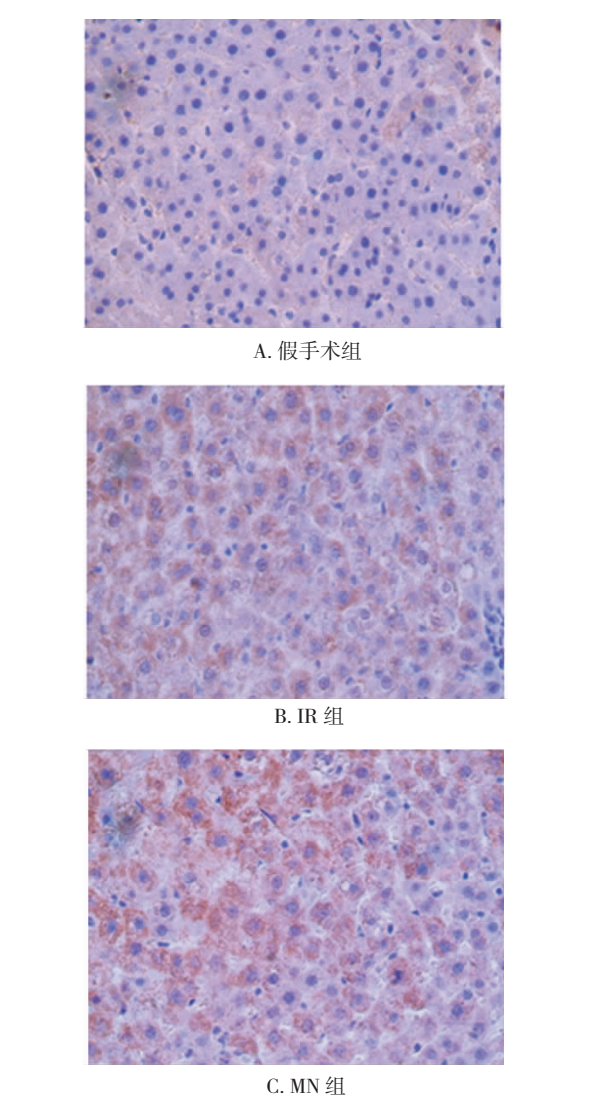


图 5 各组大鼠肝脏组织 P- 选择素表达情况 (免疫组化,400 ×)
Fig.5 Expression of P-selection in rats' liver tissues in each group (immunohistochemistry,400 ×)

3 讨 论

自从 Schemmer 等^[1]在既往研究中发现肝移植手术过程当中,手术操作本身会加重术后移植肝脏的再灌注损伤甚至影响靶器官的存活率后,该损伤因素引起了重视。然而在在体肝脏手术过程当中,比如,由于肝脏肿瘤进行的肝部分切除术,手术操作本身是否对术后肝脏再灌注损伤是否存在影响尚不明确。本研究采用对在体肝脏的操作,去除移植手术过程当中器官的保存可能存在的影响,更直接研究手术过程当中操作本身对肝脏再灌注损伤的影响。而结果显示干预组转氨酶水平较缺血再灌注模型组及假手术组明显升高,证实了该干预因素

加重了肝缺血后再灌注损伤。

由于手术操作本身引起的损伤机制尚不明确。既往离体肝脏动物实验过程证实,可能操作本身影响肝脏的代谢,加重肝脏氧耗,从而加重了再灌注损伤^[4]。也有研究证实该干扰因素使 Kupffer 细胞激活,更加重肝脏的氧耗,并同时加重了细胞凋亡^[5]。Schemmer 等^[6]在随后研究中发现肝门阻断过程当中,扪摸引起肝脏微循环损伤,导致氧自由基升高也是影响该损伤的重要因素之一。本实验从炎症因子方面入手,观察在该过程当中炎症因子水平的变化及其影响机制。

肝脏热灌注损伤有明显的阶段分期。再灌注 2 h 内称为早期,再灌注后 6~48 h 为 IR 损伤晚期,是中性粒细胞聚集介导的炎症紊乱过程^[7]。多项研究均证实,啮齿类动物肝缺血再灌注后不久即可检测到血清 TNF- α 水平升高,TNF- α 可直接介导细胞线粒体毒性作用和诱导肝细胞凋亡及坏死。P-选择素分子为 I 型穿膜糖蛋白,在肝脏缺血再灌注后肝脏微循环中白细胞的早期滚动和黏附上发挥主要作用,也通过血小板的扣留介导再灌注损伤。P-选择素在肝脏缺血后再灌注阶段有 2 个反应中均表达。第 1 个高峰发生在再灌注后 20 min,第 2 个高峰在再灌注 5 h 后^[8-9]。有研究作者认为肝脏再灌注损伤过程中 TNF- α 的升高可导致 P-选择素表达的上调,因而导致肝脏缺血再灌注损伤的加重^[10]。本研究结果发现经过“扪摸”干预的肝脏缺血再灌注后肝功能损伤较模型组为重,且 TNF- α 及 P-选择素表达明显增加,导致中性粒细胞聚集的增多和炎症的加重。

本研究证实,肝脏手术过程中扪摸可能通过影响肝脏 TNF- α 和 P-选择素的表达而加重肝脏热缺血再灌注损伤。因而在肝脏手术过程当中,应尽可能减少对肝脏的抓持、挤压和反复扪摸,减少其影响,如手术方式尽量采用行前入路肝切除。前入路肝切除,又称“原位肝切除”或“逆行肝切除”,由 Lai 等^[11]首次提出,是指在肝切除术中,首先进入肝和出肝血流阻断后、完全横断肝实质,最后分离肝脏周围韧带移除标本。Fan 等^[12]和 De Villa 等^[13]分别报道了前入路肝切除技术在活体供体右半肝切取中的应用,均认为采用前入路法切取供体右半肝时,能够减少对供肝血流的干扰及对供肝实质的反复翻动、挤压和摩擦,从而降低由扪摸造成的肝脏再灌注损

伤,保护残肝功能。总之本研究对减轻在肝脏手术肝门阻断过程中由于“扪摸”引起的再灌注损伤加重的预防的必要性提供了支持和思路。

参 考 文 献

- [1] Schemmer P, Bunzendahl H, Klar E, et al. Reperfusion injury is dramatically increased by gentle liver manipulation during harvest[J]. *Transpl Int*, 2000, 13(1): 525-527.
- [2] Schemmer P, Schoonhoven R, Swenberg JA, et al. Gentle in situ liver manipulation during organ harvest decreases survival after rat liver transplantation: role of Kupffer cells[J]. *Transplantation*, 1998, 65(8): 1015-1020.
- [3] Hakan C, Tamer A, Canten T, et al. The effects of exogenous l-carnitine on lipid peroxidation and tissue damage in an experimental warm hepatic ischemia-reperfusion injury model[J]. *Current Therapeutic Research*, 2007, 68(1): 32-36.
- [4] Schemmer P, Bradford BU, Bunzendahl H, et al. Gentle in situ liver manipulation during organ harvest increases oxygen consumption in liver[J]. *Transplant Proc*, 2000, 32(1): 112.
- [5] Schemmer P, Enomoto N, Bradford BU, et al. Activated Kupffer cells cause a hypermetabolic state after gentle in situ manipulation of liver in rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 280(6): G1076-1082.
- [6] Schemmer P, Connor HD, Arteel GE, et al. Reperfusion injury in livers due to gentle in situ organ manipulation during harvest involves hypoxia and free radicals[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999, 290(1): 235-240.
- [7] 冷建军, 韩本立, 董家鸿. 肝脏缺血再灌注损伤机制和缺血预处理保护作用[J]. *消化外科*, 2005, 4(2): 142-148.
- [8] Sawaya DE Jr, Zibari GB, Minardi A, et al. P-selectin contributes to the initial recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia-reperfusion[J]. *Shock*, 1999, 12(3): 227-232.
- [9] Singh I, Zibari GB, Brown MF, et al. Role of P-selectin in hepatic ischemia and reperfusion injury[J]. *Clin Transplant*, 1999, 13(1Pt2): 76-82.
- [10] Peralta C, Fernández L, Panés J, et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia-reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat[J]. *Hepatology*, 2001, 33(1): 100-113.
- [11] Lai EC, Fan ST, Lo CM, et al. Anterior approach for difficult major right hepatectomy[J]. *World J Surg*, 1996, 20(3): 314-317.
- [12] Fan ST, De villa VH, Kiuchi T, et al. Right anterior sector drainage in right-lobe liver donor liver transplantation[J]. *Transplantation*, 2003, 75(s3): 25-27.
- [13] De Villa VH, Chen CL, Chen YS, et al. Right lobe living donor liver transplantation-addressing the middle hepatic vein controversy[J]. *Ann Surg*, 2003, 238(2): 275-282.

(责任编辑: 关蕴良)