

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2010.05.003

保留大鼠半肝动脉血供肝血流安全阻断时限的实验研究

穆振国 王新伟 王洪远 梁静雅 李建新 张林

(日照市中医医院, 山东日照 276800)

摘要 **目的** 探讨门静脉自然转流及非转流情况下保留半肝动脉血供肝血流阻断的安全时限。**方法** 将实验用雄性 Wistar 大鼠随机分为 A、B、C 组。A 组保留肝左、肝中动脉血供及尾状叶动脉、门静脉血供(约占全肝 5%), 夹闭肝左、肝中叶门静脉, 结扎肝右叶肝蒂, 到预定阻断时相点, 恢复肝脏灌注, 切除肝右叶及尾状叶, 24h 后检测 ALT、肝脏 HE 染色(细胞核)阳性面积的平均百分数及术后 7d 存活率。B 组不保留尾状叶动脉、门静脉血供, 其他与 A 组相同。C 组完全阻断肝脏入肝血流, 肝切除方式及检测指标与 A 组相同。**结果** 在 A、B、C 3 组中, A 组的阻断形式对肝脏的损害最轻, B 组次之, C 组最重。A/100、B/40 与 C/20 损害程度相当。**结论** 大鼠门静脉转流下保留半肝动脉血供入肝血流阻断的安全时限是 100min, 单纯保留半肝动脉血供入肝血流阻断组的安全时限是 40min。

关键词 肝切除术; 保留半肝动脉血供; 肝血流阻断; 安全时限; Wistar 大鼠

中图分类号: R33 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)10-312-04

Research on tolerance limit of rats to hepatic inflow occlusion with half-hepatic artery supply retained

MU Zhen-guo, WANG Xin-wei, WANG Hong-yuan, et al

(General Surgery Department, Rizhao Hospital of Traditional Chinese Medicine, Rizhao 276800, China)

Abstract: Objective To study the tolerance limit of rats to hepatic inflow occlusion with half-hepatic artery supply retained and together with portal vein blood bypass or not. **Methods** Rats were randomly divided into three groups (group A, B and C). The left and middle hepatic artery supply were remained in both A and B group, and caudate lobe supply (including part of artery and portal vein supply of caudate lobe, about 5% in total hepatic blood supply) was together remained in the A group while not remained in the B group. The hepatic inflow were completely blocked in the C group. In both A and B groups, liver perfusion were blocked by clamping the left and the middle branches of portal vein and ligating the hepatic pedicle of the right liver lobe, and then recovered and right liver lobe and caudate liver lobe were cut at the scheduled time. Blood ALT values, HE staining positive rate of liver cells and rats survival rate within 7 days were recorded. **Results** Liver damage in the group A is the smallest, the group B bigger than A, and the biggest damage is in the group C. Damage to A/100, B/40 and C/20 is in the same level. **Conclusion** 100 min is the tolerance limit of hepatic inflow occlusion rats with portal vein blood bypass and half-hepatic artery supply retained, while 40 min is the tolerance limit of half-hepatic artery supply retained rats without portal vein blood bypass.

Key words: Rats; Hepatic inflow occlusion with half-hepatic artery supply; Tolerance limit

选择适当肝血流阻断方式是肝切除手术成功的基础, 保留半肝动脉血供入肝血流阻断技术适用于半肝阻断困难的复杂肝切除患者。许多学者临床实践证实该技术在减少肝脏缺血再灌注损伤方面优于全肝血流阻断(Pringle 法)^[1], 但是该方法终究对肝脏有一定的损伤。Pringle 法的安全时限

为 20min^[2], 那么保留半肝动脉血供入肝血流阻断技术的安全时限究竟是多少, 目前尚不确切。本研究通过动物实验, 以 Pringle 法 20min 的动物肝脏损害程度及存活率为评判标准, 探讨门静脉自然转流及非转流情况下保留半肝动脉血供肝血流阻断的安全时限。以期指导临床, 尤其对肝硬化合并门

静脉高压患者实施肝切除时肝门阻断的再认识有重要意义。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

实验动物为雄性 Wistar 大鼠, 体重 230~260 g, 由济宁医学院动物实验中心提供。随机分为 3 组: A 组为门静脉转流下保留半肝动脉血供入肝血流阻断组, B 组为单纯保留半肝动脉血供入肝血流阻断组, C 组为全肝入肝血流阻断组(Pringle 法)。每组 90 只大鼠, 其中 40 只观察存活率(每个时相点 10 只), 40 只供病理学检查(每个时相点 10 只)。另取 10 只做染料示踪观察。各组阻断时相点分别用组别/时间(min)记录, 如: A/60 代表 A 组, 阻断 60min, 以此类推。

1.2 动物模型的制备

1.2.1 术前准备 实验动物术前禁食 12h, 自由饮水; 麻醉方法: 腹腔注射苯巴比妥钠 15 mg, 切口局部注射 0.3%利多卡因 0.1mL。

1.2.2 实验方法 A 组: 入腹后切断所有肝周韧带, 分离出肝左、肝中动脉予以保护, 随后结扎肝右叶肝蒂, 用小号动脉夹分别阻断肝左、肝中叶门静脉 60、90、100、120min, 缺血受累肝脏约占全肝 95%, 保留尾状叶(约占全肝 5%)血供, 作为门静脉血液经肝脏回流入下腔静脉的通道。到预定观察终点, 去除肝蒂阻断夹恢复肝脏灌流, 切除肝右叶及尾状叶(肝切除量约 32%)^[3], 缝合腹壁切口。

B 组: 术前准备、麻醉及保留半肝动脉血供方法同 A 组。肝左、肝中叶门静脉阻断时间分别为 30、40、60、90min, 不保留尾状叶血供, 完全阻断门静脉血流。到预定观察点, 去除肝蒂阻断夹恢复肝脏灌流, 切除肝右叶及尾状叶, 缝合腹壁切口。

C 组: 即 Pringle 法, 术前准备及麻醉同 A、B 组。用小号动脉夹阻断肝十二指肠韧带, 使包括尾状叶在内的全部肝叶完全缺血, 阻断时间分别为 20、30、40、50min。到预定观察点, 去除肝蒂阻断夹恢复肝脏灌流, 切除肝右叶及尾状叶, 缝合腹壁切口。

1.3 观察指标及检测方法

1) 观察阻断前后肝脏及胃肠的色泽。

2) 用亚甲蓝染色示踪法观察阻断血流后门静脉流出道的完整性及肝脏缺血的完全性。

3) 肝功能检测 恢复灌注后 24h 分别抽血检测

ALT 数值。

4) 肝脏病理组织学检查 入肝血流阻断各时相点及恢复灌注后 24h 分别取肝组织标本, 给以固定、切片、HE 染色, 光学显微镜下组织学观察。

5) 肝细胞死亡率测定 采用全自动图象分析系统, 在 400 倍视野下, 每张玻片(上述标本)随机选取 10 个无血管区视野, 测定检测区的苏木素染色阳性(细胞核染色为主)面积的平均面积百分数, 用以估计相对细胞死亡率。阳性区的平均面积百分数越低, 表示细胞相对死亡率越高^[4]。

6) 恢复灌注后 24h 取 10cm 空肠检查肠黏膜损害情况。

7) 动物存活率观察 观察再灌注后 7d 的动物存活率。

1.4 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 分别采用方差分析、*t* 检验进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 入肝血流阻断后肝脏及胃肠的色泽

A 组: 肝左、肝中叶由鲜红色变为红褐色, 肝右叶呈紫黑色, 尾状叶颜色不变。恢复灌注后肝左、肝中叶呈紫褐相间的花斑状, 4~5min 后变为紫色, 充血, 肝缘变钝、饱满, 阻断期及恢复血流后肠壁颜色红润, 无水肿。

B 组: 肝左、肝中叶由鲜红色变为红褐色, 肝右叶及尾状叶均变为紫黑色。恢复灌注后肝左、肝中叶呈紫褐相间的花斑状, 4~5min 后变为紫褐色, B/60、B/90 肝脏色泽恢复缓慢。阻断期大鼠的肠壁颜色紫黑, 水肿明显, 恢复血流 4~5min 后肠壁颜色渐渐转红润。

C 组: 入肝血流阻断后 3~4min 全肝变为紫褐色, 随着阻断时间的延长渐渐呈暗灰色, 肠壁紫黑, 全腹腔脏器水肿明显。恢复灌注后肝缘变钝、肝叶水肿, C/40、C/50 肝脏色泽恢复缓慢。

2.2 亚甲蓝染色示踪观察

经门静脉穿刺注射亚甲蓝后, A 组可见肝尾叶首先染色, 随后心、肺及胃肠道均有染色, 而所阻断肝叶在复流前不染色。B、C 组在经门静脉穿刺注射亚甲蓝后穿刺点渗血, 亚甲蓝外溢, 心、肺、肝均无染色。

2.3 肝脏病理组织学观察及 HE 染色(细胞核)阳

性面积的平均百分数

2.3.1 光学显微镜下观察 复流前各组肝脏标本均可见局部肝窦淤血及轻度扩张,肝小叶结构完整,汇管区正常。复流后 A/60、A/90(图 1)、A/100、B/30、B/40 及 C/20 大鼠肝脏标本可见肝窦明显充血,肝细胞肿胀,汇管区炎症细胞浸润和点片状坏死灶。A/120(图 2)、B/60 及 C/30 大鼠肝窦内有淤积的红细胞和血栓形成,并可见部分细胞空泡变性、胞核消失、胞体崩解。汇管区有炎症细胞浸润,肝小叶变形。还可见局灶性肝细胞坏死。B/90、C/40、C/50 大鼠 24h 内全部死亡,未能获得标本。

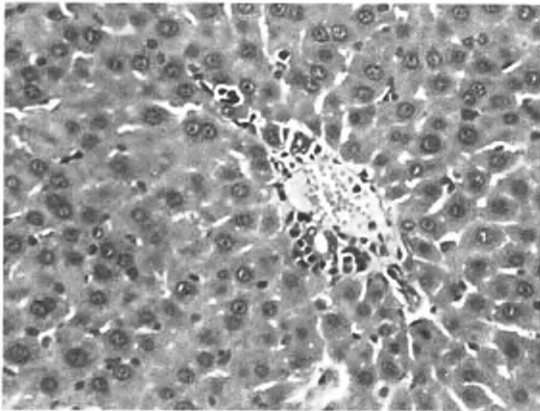


图 1 肝细胞肿胀,汇管区炎症细胞浸润和点片状坏死灶(HE 染色,×200)

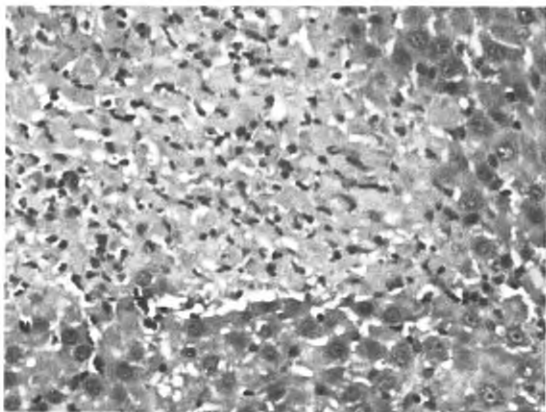


图 2 肝细胞胞核消失、胞体崩解,局灶性坏死(HE 染色,×200)

2.3.2 肝脏 HE 染色(细胞核)阳性面积的平均百分数 A/120、B/60、C/30 与 C/20 对照 $P < 0.05$; A/100、B/40 与 C/20 对照 $P > 0.05$ (见表 1);(图 1 示 A/100 肝坏死情况,图 2 示 C/20 肝坏死情况)。

2.4 复流后 24h 各组 ALT 数值

复流后 24h 各组 ALT 数值与肝门阻断时间呈正相关,阻断时间越长 ALT 数值越高,A/120、B/60、C/30 与 C/20 相比,差异有统计学意义, $P < 0.05$;各组之间因阻断形式不同差别较大,但差异无统计学意义(A/100、B/40 与 C/20 相比 $P > 0.05$),详见表 1。

表 1 各组术后肝功能损害、肝细胞坏死数及术后存活率分析

阻断方式/阻断时间 (min)	n	术后 24h ALT 数值 (IU/L)	HE 染色(细胞核)阳性面积的平均百分数	术后 7d 大鼠存活率
C/20	10	730.6±56.02	32.8436±1.5651	10/10(100%)
A/60	10	444.3±48.01	34.1621±2.3872	10/10(100%)
A/90	10	665.4±61.63	31.5219±2.1333	10/10(100%)
A/100	10	766.7±54.41*	31.3708±1.5766*	10/10(100%)*
A/120	10	1076.7±95.69#	27.4616±2.1179#	4/10(40%)#
B/30	10	561.6±38.34	33.5605±1.2890	10/10(100%)
B/40	10	737.1±55.36*	31.3975±1.7163*	10/10(100%)*
B/60	10	1000.3±90.59#	29.0214±6.4179#	3/10(30%)#
B/90	10	术后 24h 内全部死亡		0(0)
C/30	10	912.38±53.21#	28.4024±1.3854#	7/10(70%)#
C/40	10	术后 24h 内全部死亡		0(0)
C/50	10	术后 24h 内全部死亡		0(0)

注: # 与 C/20 对照, $P > 0.05$; * 与 C/20 对照, $P < 0.05$

2.5 小肠组织病理形态学观察

A/60、A/90、A/100、B/30、B/40、C/20 未见明显的组织学改变;A/120、B/60、C/30 可见小肠黏膜绒毛变矮、水肿,上皮下 Gruenhagen's 间隙增大,伴随上皮层与固有层分离,伴随毛细血管淤血、间质水肿及少量炎症细胞浸润(以中性粒细胞和淋巴细胞为主);B/60 部分标本出现绒毛破损伴随固有层毛细血管暴露甚至出血,炎症细胞在固有层或内皮下大量聚集,肠上皮细胞坏死、脱落。

2.6 手术后 7d 大鼠存活率

A/60、A/90、A/100 大鼠无死亡,A/120 存活率则下降为 40%;B/30、B/40 大鼠无死亡,B/60 下降至 30%,B/90 下降为 0;C/20 大鼠无死亡,C/30 下降至 70%,C/40、C/50 下降为 0。各组大鼠死亡时间多发生在术后 1~2d。

3 讨论

肝脏是对缺血缺氧甚为敏感的器官,其耐受缺

血缺氧的时限可以随着肝脏所处环境的变化而变化。复杂肝切除需要较长时间的肝血流阻断,当传统半肝血流阻断困难的情况下,保留半肝动脉血供肝血流阻断技术很好地扮演了替代者角色,在减少肝脏缺血再灌注损伤方面优于全肝血流阻断(Pringle 法)^[5]。然而在临床实践中此项技术肝门阻断多长时间是安全的目前尚不明了,尤其是对肝硬化合并门静脉高压患者,当并有大量门静脉侧支循环时,其安全时限是延长还是缩短亦存在许多争议。

Nakao 等^[2]通过临床观察认为入肝血流阻断不宜超过 20min;Tashiro 等^[6]认为门静脉阻断 45min 后,即使再通也会发生广泛肠黏膜坏死;赵建勇等^[7]进行猪单纯门静脉血流阻断实验,发现阻断 45min 以内的动物存活率为 100%,阻断 60min 组则减少到 66.7%;丁钧等^[8]发现利用生物泵行门体静脉转流可使家猪常温下耐受全肝血流阻断的安全时限从 30 min 延长为 90 min。黄波等^[9]研究肠腔分流条件下,正常巴马小型猪耐受单纯门静脉阻断安全时限为 120min。所以,不难看出,既往所用各种大小动物入肝血流阻断模型,与保留半肝动脉血供入肝血流阻断技术均有其不同之处。本实验设计了门静脉转流及非转流两种条件下保留半肝动脉血供入肝血流阻断形式。前者以复流后切除的非缺血肝尾叶作为其他肝叶阻断期间门静脉血的流出道,既提升了门静脉血的压力,又达到了门静脉血转流目的,符合肝硬化合并门静脉高压患者的临床病理机制;两组实验动物的肝右叶加肝尾叶切除占全肝总量的 32%,其肝切除模型符合临床手术实际;恢复灌注后 24h 取 10cm 空肠检查肠黏膜损伤情况可以协助分析肝脏缺血再灌注损伤以及实验动物死亡的肠源性因素;以 Pringle 法阻断肝门 20min 的动物肝脏损害程度为评判标准得出的保留半肝动脉血供肝血流阻断安全时限(门静脉转流或无转流的情况下)有较高的临床指导意义。

从本研究结果可以看出,肝脏的缺血再灌注

损伤与肝血流阻断形式及阻断时间密切相关,C/20 实验动物手术后 7d 全部存活,而 C/30 则存活 70%,在术后 24h ALT 数值、HE 染色(细胞核)阳性面积的平均百分数方面,C/20 与 C/30 相比也有显著差异($P < 0.05$)。所以,用 C/20 实验动物的肝脏损害程度及术后 7d 存活率作为安全与否的评判标准是可行的。在 A、B、C 3 组中,A 组阻断形式对肝脏的损害最轻,B 组次之,C 组最重。A/100、B/40 与 C/20 损害程度相当,也就是说大鼠门静脉转流下保留半肝动脉血供入肝血流阻断的安全时限是 100min,单纯保留半肝动脉血供入肝血流阻断组的安全时限是 40min。

参考文献:

- [1] 金山,戴朝六,贾昌俊,等.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):3168-3172.
- [2] Nakao A,Harada A,Nonami T,et al. Regional vascular resection using catheter bypass procedure for pancreatic cancer [J]. Hepatogastroenterology,1995,42(5):734-739.
- [3] 何效东,董家鸿,蔡景修,等.门静脉转流下入肝血流阻断动物模型的建立及评价[J].西北国防医学杂志,1999,20(3):175-177.
- [4] 元文勇,余伟平,叶启发,等.大鼠肝脏缺血再灌注损伤程度判定指标的选择[J].中国普通外科杂志,2008,17(7):650-653.
- [5] 穆振国,王海水,穆重,等.保留半肝动脉血供联合肝缺血预处理在肝硬化复杂肝切除术中的应用[J].中国现代普通外科进展,2010,13(7):550-553.
- [6] Tashiro S,Uchino R,Hiraoka T,et al. Surgical indication and significance of portal vein resection in biliary and pancreatic cancer[J]. Surgery,1991,109(4):481-487.
- [7] 赵建勇,董家鸿,詹国清,等.猪单纯门静脉血流阻断安全时限的研究[J].第三军医大学学报,2001,23(8):965-967.
- [8] 丁钧,董家鸿,杨占宇,等.家猪常温下耐受入肝血流阻断安全时限的研究[J].中华实验外科杂志,2004,21(3):311-313.
- [9] 黄波,别平,冯春林,等.肠腔分流条件下猪单纯门静脉阻断的安全时限[J].第三军医大学学报,2008,30(24):2299-2301.

(收稿日期 2011-09-15)