

文章编号:1005-6947(2006)07-0533-03

· 基础研究 ·

肝动脉缺血对犬肝细胞损害的实验研究

蒋基令¹, 杨文军², 熊国祚², 许志杰², 何葵², 姜德诵², 方勇³

(1. 广东省东莞市人民医院 外科, 广东 东莞 523018; 南华大学第二附属医院 2. 普通外科 3. 病理科, 湖南衡阳 421001)

摘要:目的 探讨肝动脉缺血对犬肝细胞的损害。方法 对20只犬进行肝动脉阻断, 不阻断门静脉, 分别于阻断前、阻断后20, 40, 60min取肝组织进行活检, 用常规HE染色和BCL-2免疫组化染色并进行灰度测定。结果 肝动脉阻断20min, 肝细胞已有明显损害, 阻断60min有不可逆性严重损害, BCL-2免疫组化灰度测定, 阻断前与阻断后各时点差异均有高度显著性($P < 0.0001$), 其中20min和40min与60min之间差异有高度显著性($P < 0.001$)。结论 肝动脉阻断20min, 肝细胞有明显损害, 肝动脉阻断60min, 肝细胞有不可逆性损害。

关键词:肝/血液供给; 缺血; 肝动脉; 肝细胞培养

中图分类号: R322.47; R322.121

文献标识码: A

Study of hepatic cellular injury due to hepatic ischemia in dogs

JIANG Ji-ling¹, YANG Wen-jun², XIONG Guo-zuo², XU Zhi-jie², HE Kui²,
JIANG De-song², FANG Yong³

(1. Department of Surgery, Dongguan People's Hospital, Dongguan, Guangdong 523018, China;
2. Department of Surgery, 3. Department of Pathology, the 2nd Hospital of Nanhua University, Hengyang,
Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the ischemic injury of hepatic cell caused by hepatic artery occlusion. **Methods** The hepatic artery was occluded in 20 dogs via operation, while the portal vein remained patent. Specimens were gained from the right liver at four time points: before occlusion of the hepatic artery, 20 minutes, 40 minutes and 60 minutes after artery occlusion. Each specimen was examined by HE and BCL-2 by immunohistochemistry. The gray scale of BCL-2 in HE sections was detected. **Results** Hepatic cellular injury was obvious 20 minutes after occlusion of the hepatic artery. Irreversible hepatic cellular injury was observed 60 minutes after hepatic artery occlusion. The results showed that the gray scale of BCL-2 at every time point after hepatic artery occlusion were significantly different from that before hepatic artery occlusion ($P < 0.0001$). Besides, the hepatic cell injury and BCL-2 expression at 20 minutes and 40 minutes after occlusion was significantly different from that of 60 minutes ($P < 0.0001$), respectively. **Conclusions** There was obvious hepatic cellular injury 20 minutes after hepatic artery occlusion, and irreversible hepatic cellular injury occurred 60 minutes after hepatic artery occlusion.

Key words: Liver/blood supply; Ischemia; Liver Artery; Hepatic Cell Injury

CLC number: R322.47; R322.121

Document code: A

肝脏的血液供应70%来自门静脉, 30%来自肝动脉。因此, 一直认为肝动脉可以结扎^[1]。但肝

动脉占肝的供氧来源的50%。肝动脉结扎后对肝脏会产生哪些影响是值得探讨的问题。笔者通过对肝动脉进行阻断, 定时肝活检, 对肝组织进行HE染色和BCL-2免疫组化染色, 并进行灰度测定, 观察肝细胞的损害情况, 现报道如下。

收稿日期:2006-03-07; 修订日期:2006-04-30。

作者简介:蒋基令,男,湖南道县人,广东省东莞市人民医院副主任医师,主要从事普通外科方面的研究。

通讯作者:蒋基令 E-mail:jiangjiling@hotmail.com。

1 材料和方法

1.1 实验动物

成年家犬 20 只,其中雄性 9 只,雌性 11 只,体重 15 ~ 28 kg,平均 18.3 kg,由南华大学实验动物部提供。实验设计以阻断前作为自身对照。

1.2 手术操作

开腹,找到并分离出肝动脉,于肝右叶取肝组织约 1 cm × 1 cm × 1 cm 后进行肝动脉结扎并计时,分别于结扎后 20,40,60 min 于肝右叶取相同量肝组织,置于 10% 甲醛溶液中固定。

1.3 HE 染色

对上述组织进行石蜡包埋切片,常规 HE 染色,进行组织病理学检查。

1.4 BCL-2 免疫组化染色及灰度测定

采用迈新公司的 BCL-2 试剂盒进行免疫组化染色,采用 OLYMPUS BX51 显微镜放大 400 倍、POLAROID 数码相机照相,用“PIPS-2020 超清晰度病理图文分析系统”进行灰度测定。

1.5 统计学处理

采用 SAS 统计软件进行方差分析和 *t* 检验。

2 结果

2.1 HE 染色

2.1.1 肝动脉阻断前 肝脏结构正常,肝细胞未见异常;小叶间胆管、小叶间静脉、动脉结构清楚;汇管区,肝窦内及中央静脉旁可见少许淋巴细胞浸润;中央静脉及肝窦可见充血(附图 a)。

2.1.2 肝动脉阻断 20 min 肝脏结构正常;小叶间胆管结构清晰,汇管区,肝窦内及中央静脉旁可见少许淋巴细胞浸润;中央静脉、肝窦及小叶间静脉可见充血;小叶周边肝细胞疏松、肿胀,气球样变(附图 b)。

2.1.3 肝动脉阻断 40 min 肝脏结构正常;小叶间胆管结构清晰,部分小叶间胆管胆汁淤积,汇管区,肝窦内及中央静脉旁可见少量淋巴细胞浸润;中央静脉及肝窦可见充血;肝细胞广泛嗜酸性变(附图 c)。

2.1.4 肝动脉阻断 60 min 肝脏结构正常;汇管区,肝窦内及中央静脉旁可见少许淋巴细胞浸润;中央静脉及肝窦可见充血;肝细胞胞浆广泛疏松,肿胀,气球样变;小叶间胆管结构欠清,上皮细胞扁平状(附图 d)。

a: 阻断前

b: 阻断后 20 min

c: 阻断后 40 min

d: 阻断后 60 min

附图 肝动脉阻断前后肝组织 HE 染色(×40)

2.2 BCL-2 免疫组化染色

2.2.1 光镜下 肝动脉阻断前,肝细胞轻微着色,20 min 开始有明显呈阳性着色,随着时间推移,着色加深。

2.2.2 灰度测定 阻断前与阻断后各组差异均有高度显著性(均 $P < 0.0001$)。阻断后 20,40,60 min 组之间差异均有高度显著性(均 $P < 0.001$) (附表)。

附表 各时点免疫组化染色灰度表($n = 20$)

时点	灰度值
阻断前	91.75 ± 11.84
阻断后 20min	49.15 ± 10.27 ^{1),3)}
阻断后 40min	51.35 ± 9.87 ^{1),2),3)}
阻断后 60min	60.50 ± 7.34 ¹⁾

注:1)与阻断前比较, $P < 0.0001$;2)与阻断后 20min 比较, $P > 0.05$;3)与阻断后 60min 比较, $P < 0.001$

3 讨论

肝脏的供氧 50% 来自肝动脉,肝动脉结扎后,门静脉不能给肝脏完全供氧^[1]。

常温下,肝脏能耐受缺血的时间,一般认为 15 min 是安全的,有认为可以耐受 30 min,最长达 65 min^[2]。但以往的研究通常是肝动脉和门静脉一起阻断。

在肝移植的动物实验研究和临床研究中,有大量文献报道认为,肝动脉血供对肝脏十分重要^[3-7]。肝移植术后胆道并发症可能与肝动脉血供障碍有关。

作者采用常规病理切片光镜检查 and BCL-2 免疫组化染色,观察肝动脉结扎后肝细胞的损害情况^[7]。实验结果显示,在肝动脉被阻断 20 min 时,光镜下提示小叶周边肝细胞疏松、肿胀,气球样变,肝细胞已经有明显的损害;此时的 BCL-2 免疫组化染色呈阳性反应。灰度测定与阻断前比较差异有高度显著性。肝动脉阻断 40 min 时,部分小叶间胆管胆汁淤积,汇管区,肝窦内及中央静脉旁可见少量淋巴细胞浸润;中央静脉及肝窦可见充血;肝细胞广泛嗜酸性变,肝细胞损害进一步加重。此时的 BCL-2 免疫组化染色呈强阳性反应。灰度测定与阻断前比较差异有高度显著性。肝动脉阻断 60 min 时,虽然肝脏结构正常;但汇管区,肝窦内及中央静脉旁可见少许淋巴细胞浸润;中央静脉及肝窦可见充血;肝细胞胞浆广泛疏松,肿胀,气球样变;小叶间胆管结构欠清,上皮细胞扁平状,表现为不可逆损害。此时的 BCL-2 免疫组化染色呈阳性反应。灰度测定与阻断前及阻断后 20 min 和 40 min 比较差异均有高度显著性。

但是,与阻断前的灰度值比较,40 min 时差异最大,60 min 时反而变小,但两者与术前比较,差异均有显著性 ($P < 0.001$)。原因不明,可能与 BCL-2 蛋白表达的特性有关,值得进一步探讨。因此,上述结果提示,在家犬的实验中,肝动脉阻

断的时间在超过 20 min 后即可引起肝脏损害,如果达到 60 min,肝脏可发生某些不可逆损害。作者建议,(1)除非某些特殊情况,如胆道出血,一般不宜结扎肝动脉。(2)临床肝移植手术中,通常情况下是吻合好下腔静脉和门静脉后开放血流,肝脏复温后再吻合肝动脉。而在吻合肝动脉以前及吻合期间,肝脏处于无动脉血供状态,可能是某些肝移植术后胆道并发症发生的重要原因。因此,在肝移植手术中,尽量缩短肝动脉吻合时间,或快速建立一个临时通道,使肝动脉和门静脉同时开放,以减少可能肝动脉无血供而导致的肝脏损害和胆道并发症。

参考文献:

- [1] 郑树森. 肝脏移植 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2001. 28 - 29.
- [2] 黄志强,黎鳌. 外科手术学 [M]. 北京:人民卫生出版社,1996. 923 - 924.
- [3] Li S, Stratta RJ, Langnas AN, *et al.* Diffuse biliary tract injury after orthotopic liver transplantation [J]. *AM J Surg*, 1992, 164 (5): 530 - 540.
- [4] Cameron AM, Buusuttil RW. Ischemic cholangiopathy after liver transplantation [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2005, 4 (4): 495 - 501.
- [5] Vivarelli M, Cucchetti A, La Barba G, *et al.* Ischemic arterial complications after liver transplantation in the adult: multivariate analysis of risk factors [J]. *Arch Surg*, 2004, 139 (10): 1069 - 1074.
- [6] Karavios DD, Tsamandas AC, Tepetes K, *et al.* BCL-2 and BAX expression and cell proliferation, after partial hepatectomy with and without ischemia, on cholestatic liver in rats: an experimental study [J]. *J Surg Res*, 2003, 110 (2): 399 - 408.
- [7] Colonna JO, Shaked A, Colquhoun SD, *et al.* Biliary strictures complicating liver transplantation. Incidence, pathogenesis, management, and outcome [J]. *Ann Surg*, 1992, 216 (2): 344 - 350.