

入肝门静脉动脉化加门腔分流术对大鼠肝脏再生的影响

李 坚¹, 关晓东¹, 刘 琦¹, 谢玉妍², 蔡潮农¹, 张百萌^{1*}

(中山大学附属第五医院 1. 普外三科, 2. 病理科, 广东 珠海, 519000)

摘 要:【目的】在大鼠 70%肝部分切除基础上建立入肝门静脉动脉化加门腔分流术的模型,并研究大鼠肝脏再生情况。【方法】155 只 Sprague-Dawley 大鼠分为 3 组。实验组大鼠 65 只,利用右肾动脉行入肝门静脉动脉化,并行门腔分流及肝部分切除,肝切组大鼠 65 只,仅进行肝部分切除,对照组大鼠 25 只,仅右肾切除。分别观察实验组及肝切组术后 2、7、14 及 28 d 残肝再生比率变化,以及 3 组在术中 0 h、术后 24、48、72 h 及 7 d 各时相点残肝肝细胞 S 期细胞比例及增殖细胞核抗原(PCNA)阳性表达的肝细胞比例情况。【结果】术后 2、7、14 d 两组肝脏再生比率相比,实验组较肝切组明显增高,差异有显著统计学意义($P < 0.01$);至术后 28 d,实验组及肝切组肝脏再生比率趋平,差异无统计学意义($P > 0.05$)。术后各时相点实验组及肝切组残肝 S 期肝细胞比例及 PCNA 阳性表达肝细胞比例均较对照组明显升高,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。实验组与肝切组相比,术后 24 h 残肝 S 期细胞比例及 PCNA 阳性细胞比例均已经开始升高,至术后 48、72 h 及术后 7 d,实验组仍明显高于肝切组,差异有显著统计学意义($P < 0.01$)。【结论】入肝门静脉动脉化重建入肝血流对大鼠肝细胞的增生及增殖有促进作用,是预防肝部分切除术后急性肝功能衰竭的有效方法。

关键词: 门静脉动脉化; 肝切除术; 再生; 增殖细胞核抗原

中图分类号: R6

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2010)04-0508-05

Liver Regeneration Following Portal Vein Arterialization Associated with Portocaval Shunt after Partial Hepatectomy in Rats

LI Jian¹, GUAN Xiao-dong¹, LIU Qi¹, XIE Yu-yan², CAI Chao-nong¹, ZHANG Bai-meng^{1*}

(1. The Third Department of General Surgery, 2. Department of Pathology, The Fifth Affiliated Hospital,

Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

Abstract: 【Objective】Extended hepatectomy may result in acute postoperative liver failure, the aim of this study was to assess the effects of portal vein arterialization (PVA) associated with portocaval shunt (PCS) on liver regeneration after 70% partial hepatectomy (PH) in a rat model. 【Methods】One hundred and fifty-five Sprague Dawley rats were assigned to three groups: PVA associated with PCS after 70% PH (experimental group); 70% PH only (PH group); right nephrectomy (control group). Liver regeneration rate (LRR) was assessed on days 2, 7, 14, and 28 after surgery, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling index, and S phase liver cell rate were assessed on 0 h, 24 h, 48 h, 72 h, and 7 days after surgery, respectively. 【Results】Rats with 70% PH following PVA + PCS showed significantly greater liver growth than rats with 70% PH only in the first 14 days postoperatively ($P < 0.01$). However, no significant difference was found 28 days after surgery between these two groups. The rats with PVA + PCS showed the highest values of PCNA labeling index and S phase liver cell rates within 7 days, and higher than the other two non-PVA groups significantly ($P < 0.01$). 【Conclusions】The present findings indicate that PVA technique bring beneficial effects on maintaining liver regeneration after extended partial hepatectomy in rats.

Key words: portal vein arterialization; hepatectomy; liver regeneration; proliferating cell nuclear antigen

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2010, 31(4):508-512]

收稿日期: 2009-10-14

基金项目: 珠海市科技局医药卫生重大项目(PB20081002)

作者简介: 李坚, 博士研究生, 主治医师, E-mail: lijian5@mail.sysu.edu.cn; * 通信作者: 张百萌, 教授, 博士生导师, E-mail: baimeng5@hotmail.com

门静脉动脉化最初应用于肝硬化门静脉高压症门体分流术后预防肝功能衰竭和肝性脑病的发生^[1],以及用于进展期肝胆恶性肿瘤行扩大肝部分或肝门部根治性整块切除后预防急性肝功能衰竭^[2],近年来更多用于肝移植术中处理门静脉栓塞^[3],但多为动物模型研究。已经有部分学者在临床上实验性的应用了门静脉动脉化技术,取得了一定的疗效^[4-5]。但对于门静脉动脉化对肝脏细胞再生的影响如何,至今研究仍较少。为了解门静脉动脉化对肝脏细胞再生影响,结合之前所建立的利用右肾动脉行入肝门静脉完全动脉化加门腔分流术的大鼠模型,我们在此基础上附加肝部分切除,对大鼠肝脏再生情况进行研究,报道如下。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠共 155 只, 体重 250 ~ 300 g, 分 3 组: 实验组 65 只, 行右肾切除, 利用右肾动脉行入肝门静脉动脉化, 门腔完全分流, 再按 Higgins^[6] 方法行 70% 部分肝(肝左叶 + 中叶)切除; 肝切除组 65 只, 行右肾切除 + 70% 部分肝(肝左叶 + 中叶)切除; 对照组 25 只, 仅行右肾切除。

1.2 入肝门静脉动脉化模型建立

所有大鼠术前均禁食 24 h, 不禁水, 口罩吸入乙醚麻醉。取腹部正中切口进腹, 在手术显微镜下, 游离门静脉上至门静脉入肝左右分支处, 下至脾静脉与肠系膜上静脉汇合处。游离右肾动脉、右肾静脉和右输尿管, 右肾动脉由腹主动脉开口处游离至肾动脉分叉以远 3 mm, 并结扎切断由肾动脉发出的肾上腺动脉。右肾静脉由下腔静脉游离至肾门, 游离输尿管并结扎切断。在距腹主动脉 5 mm 处阻断右肾动脉, 于右肾动脉分叉以远 2 mm 处切断右肾动脉, 于右肾静脉汇入下腔静脉处阻断右肾静脉, 距血管夹以远 2 mm 处横断右肾静脉, 切除右肾。肝素生理盐水反复冲洗各游离的血管腔。将右肾动脉从下腔静脉后方拉至其左前方, 并将动脉分叉部用显微组织剪剖开并修剪成鱼口状备用, 长径约 3 ~ 4 mm, 横径约 2 mm。在门静脉主干分支处和脾静脉与肠系膜上静脉汇合处分别用无损伤血管夹阻断, 在两血管夹中下三分之一处横断门静脉。修剪各断端血管外膜, 以备吻合。

在 10 ~ 16 倍双人双目手术显微镜辅助下, 用 10-0 带针无创尼龙缝线将入肝门静脉主干与右肾动脉椭圆形剖面两定点连续端端吻合, 缝合完毕后依次松开入肝门静脉主干与右肾动脉血管夹, 成功将入肝门静脉动脉化(阻断时间 8 ~ 12 min)。之后用 10-0 带针无创尼龙缝线将右肾静脉与远端门静脉主干(脾静脉与肠系膜上静脉汇合处)两定点连续端端吻合, 完毕后松开阻断血管夹, 完成门腔完全分流(阻断时间在 10 ~ 12 min)。以双镊法证实吻合口通畅并检查有无漏血, 若有漏血, 可间断补针。

肝部分切除参照 Higgins^[6] 大鼠肝部分切除方法, 切除大鼠肝脏的左叶和中叶, 切除量占全肝 70%。

术毕经大鼠尾静脉注射 1 mL 生理盐水, 可翻身饮水, 1 d 后正常饮食, 单笼饲养。

1.3 指标测定

1.3.1 肝脏再生比率的测定 预实验时取 10 只正常大鼠称体质量为 (261 ± 31) g, 切除全肝称湿质量, 为 (10.96 ± 2.24) g, 再将肝脏切除左外叶、左内叶及中叶称湿质量, 为 (7.13 ± 1.43) g。得出肝切除部分湿质量占全肝的 $(68.4 \pm 1.7)\%$, 同时求得全肝湿质量占体质量的 $(4.76 \pm 0.34)\%$ 。手术制模前大鼠称质量, 根据全肝/体质量比例算出全肝理论质量, 手术后称取切除之部分肝脏湿质量, 实验组及肝切组分别在术后 2、7、14、28 d 取 10 只大鼠处死后取残肝标本并称取肝湿质量。根据公式计算肝再生比率: 肝再生率 $(\%) = [m_c - (m_A - m_B)] / (m_A - m_B) \times 100\%$, 其中 m_A 为大鼠理论全肝质量, m_B 为切除肝质量, m_C 为处死大鼠取标本时的残余肝质量。

1.3.2 再生肝 S 期肝细胞比例 3 组各取 5 只大鼠分别于术中取 1 cm³ 大小肝组织, 术后 6、24、48、72 h 和 7 d 处死后于残余肝上取部分组织以 0.5 g/L 胶原酶消化, 制作单细胞悬液, 供流式细胞术 FCM 检测。使用 FACS Calibur 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司), 用碘化丙啶(PI)定量 DNA 荧光染色法(美国 BD Cycletest™ Plus DNA Reagent Kit), 鸡红细胞做标准样品, 调整仪器的 CV 值在 5% 以内, 激光功率为 200 W, 激发光波长 488 nm, 滤光片波长 620 nm, 测定细胞荧光信号。每份样品检测 20 000 个细胞, 计数活细胞总数, S 期(DNA 合成期)肝细胞数, 求出每例样本 S 期肝细胞百分比 = S 期肝细胞/活细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.3.3 肝细胞 PCNA 免疫组化检测 3 组同样分别于术中取 1 cm³ 大小肝组织, 术后 6、24、48、72 h 和 7 d 处死时留取肝脏标本, 均中性甲醛溶液固定、石蜡包埋。连续切片, 厚 4 μm。切片常规脱蜡后蒸馏水冲洗 5 min; 用 300 mL/L 过氧化氢孵育 30 min 以抑制内源性过氧化物酶; 用 10 mL/L 正常小牛血清孵育 20 min 封闭内源性过氧化物酶; 加一抗(美国 Dako 公司, PCNA PC10 MAb) 稀释液(1:50) 4℃湿盒内室温孵育过夜, PBS 冲洗 3 次 × 5 min; 加生物素标记的二抗(福州迈新公司, KIT-0100M, Ultra Sensitive S-P Mouse) 室温孵育 30 min; 加 ABC 复合物室温作用 30 min, PBS 彻底冲洗; DAB 显色液(福州迈新, DAB-2031 加强型 DAB Plus Kit) 染色 2~10 min, 苏木素轻度复染; 系列酒精脱水, 二甲苯透明; 树胶封片观察。由两名病理医师双盲法分别观察免疫组织化学染色结果, 在高倍镜下(10 × 40) 随机观察 4 个视野共 1 000 个细胞, 核内有棕黄色颗粒沉积者为阳性细胞, 取其两人计数结果的平均值, 用百分率表示 PCNA 阳性率。计算方法: PCNA 阳性表达细胞比例 = 阳性细胞数/观察的细胞总数 × 100%。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 13.0 版软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间计量资料统计采用 *t* 检验, 3 组间均数比较先行单因素方差分析后再行 LSD-*t* (least significant difference-*t*) 检验, 取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 残肝再生率变化

实验组及肝切组术后肝脏再生率均呈上升趋势, 术后 2 d 至术后 14 d, 实验组肝再生率与对照组相比明显升高, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。至术后 28 d, 实验组及肝切组肝脏再生率趋平, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

表 1 术后实验组及肝切组肝脏再生率的变化

Table 1 The liver regeneration rate after surgery between the experimental group and partial hepatectomy group
(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Group	2 d	7 d	14 d	28 d
PVA + PCS	58.20 ± 3.70 ¹⁾	92.00 ± 2.23 ¹⁾	131.62 ± 5.79 ¹⁾	140.38 ± 9.02
PH	49.00 ± 2.45	83.9 ± 3.65	112.56 ± 7.99	131.28 ± 8.02
	$t = 4.635$	$t = 4.234$	$t = 4.319$	$t = 1.686$
	$P = 0.002$	$P = 0.003$	$P = 0.003$	$P = 0.130$

1) Compared with PH group $P < 0.01$

2.2 残肝 S 期肝细胞比例变化

各组术后 S 期肝细胞比例的变化(表 2)。从表中可以看出实验组及肝切组 S 期肝细胞比例的变化, 其高峰出现在术后 24~72 h, 以后逐渐下降, 但到 7 d 时仍明显高于本组 0 时相点的水平 ($P < 0.01$), 说明肝细胞的再生主要发生在术后一周。特别是在术后 3 d 以内, 是肝细胞再生的关键时期。三组在术后各个时相点总体均数存在统计学差异 ($F = 23.82, P < 0.01$)。其中实验组与肝切除组相比, 在术后各时相点均有明显升高, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。与对照组相比, 实验组与肝切组术后各时相点 S 期肝细胞含量均明显升高, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.3 PCNA 阳性表达细胞比例变化

对照组 PCNA 表达阳性细胞比例在 3% 左右。实验组及肝切组术后 24 h 阳性细胞比例已经明显增高, 至 72 h 达到高峰, 此后逐渐下降, 但仍明显高于本组 0 时相点水平, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 表明术后 1 周细胞仍持续增殖。两组术后各时间点与对照组相比, PCNA 阳性细胞比例均明显升高, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$), 而实验组 PCNA 阳性细胞比例与肝切组比较, 从术后 24 h 至术后 7 d, 各时间点相比较, 实验组均明显高于肝切组, 差异有显著统计学意义 ($P < 0.01$, 表 3; 图 1)。

表 2 各组术后 S 期肝细胞比例的变化

Table 2 S phase liver cell rate in three groups after surgery
(%, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Group	0 h	24 h	48 h	72 h	7 d
PVA + PCS	8.63 ± 0.90	23.51 ± 1.56 ¹⁾²⁾³⁾	27.91 ± 1.29 ¹⁾²⁾³⁾	26.51 ± 1.24 ¹⁾²⁾³⁾	12.27 ± 0.47 ¹⁾²⁾³⁾
PH	7.99 ± 0.65	20.46 ± 1.39 ¹⁾³⁾	24.04 ± 1.50 ¹⁾³⁾	20.57 ± 1.22 ¹⁾³⁾	10.05 ± 1.00 ¹⁾³⁾
Nephrectomy	8.18 ± 0.56	8.77 ± 0.41	8.59 ± 0.78	8.78 ± 0.79	8.28 ± 0.49

Compared to 0 h, 1) $P < 0.01$; Compared to PH, 2) $P < 0.01$; Compared to nephrectomy, 3) $P < 0.01$

表 3 各组大鼠肝脏 PCNA 检测结果

Table 3 Expression of PCNA in hepatic tissue of rats in three groups (% , $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Group	0 h	24 h	48 h	72 h	7 d
PVA + PCS	2.80 ± 0.50	39.42 ± 1.49 ¹⁾²⁾³⁾	47.16 ± 3.25 ¹⁾²⁾³⁾	71.58 ± 4.70 ¹⁾²⁾³⁾	16.50 ± 2.60 ¹⁾²⁾³⁾
PH	3.02 ± 0.27	37.06 ± 2.33 ¹⁾³⁾	42.46 ± 2.01 ¹⁾³⁾	60.12 ± 4.89 ¹⁾³⁾	11.91 ± 1.03 ¹⁾³⁾
Nephrectomy	2.94 ± 0.32	3.12 ± 0.36	3.02 ± 0.26	2.84 ± 0.31	3.05 ± 0.14

Compared to 0 h, 1) $P < 0.01$; Compared to PH, 2) $P < 0.01$; Compared to Nephrectomy, 3) $P < 0.01$

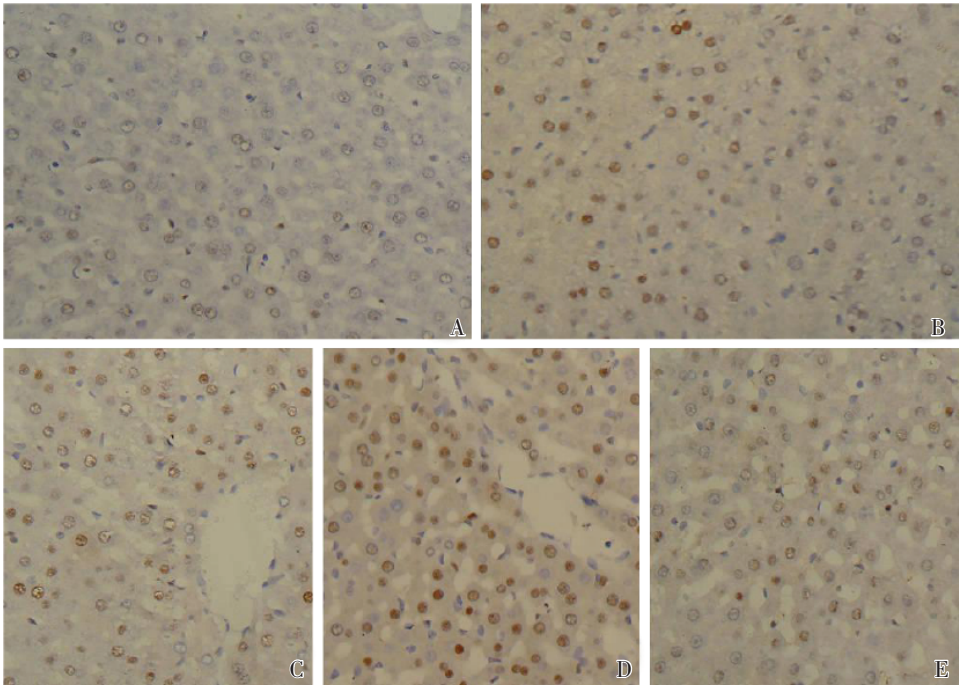


图 1 PVA 组大鼠肝脏 PCNA 表达情况图

Fig.1 Expression of PCNA in hepatic tissue of rats in PVA group

A: Normal hepatic tissue of SD rat; B: 24 h after PVA + PCS, the expression of PCNA enhanced markedly; C: 48 h after PVA + PCS, the expression of PCNA maintained dynamically; D: 72 h after PVA + PCS, the expression of PCNA reached the highest level; E: 1 week after PVA + PCS, the PVA expression of PCNA reduced, but still obvious higher than normal tissue; SABC, ×400

3 讨 论

肝脏作为体内血流最丰富的器官,有肝动脉及门静脉双重血供,约 75%的血液供应来自乏氧的门静脉。以往一直认为,门静脉血中的肝脏营养因子对肝细胞的再生及增殖是必不可少的,但早在 1952 年,Cohn 等就最早提出用动脉血代替门脉血灌注肝脏的设想,随后的动物实验证明,以适当压力和流量的动脉血灌注肝脏,可使分流后的动物维持正常肝血流量,促使肝细胞再生,保证正常肝脏的解毒功能。张红卫等^[7]在肝硬化大鼠行部分门静脉结扎后发现,非结扎的相应肝叶代偿增

生,可提高Ⅱ期肝切除手术的范围。近年来的动物实验结果也显示^[8],在扩大部分肝切除的模型中,采用门静脉动脉化的技术增加肝脏氧供及血流,能有效促进肝细胞的增生。本实验结果亦表明,在完全门腔分流后行入肝门静脉动脉化,肝脏虽然没有静脉血的灌注,但充分的动脉血供能有效促进肝细胞再生,尤其是在术后 1 周内,肝细胞再生相关指标如 S 期肝细胞比例及肝细胞 PCNA 表达的比例均较单纯肝切除者明显升高,与国外部分学者研究结果相符。

陈永亮等^[9-10]研究表明肝脏部分切除后不论是在正常或梗阻性黄疸后再通的大鼠还是在同时行门静脉动脉化的大鼠,术后肝质量的测定、有丝

分裂期肝细胞的计数和流式细胞仪对各期 DNA 含量的检测均表明肝细胞再生非常明显而且比较相似,说明门静脉血的供应对肝脏的再生并不是必须的,门静脉动脉化后不影响肝脏的再生。王鹏等^[11]利用胃十二指肠动脉与门静脉行端侧吻合术加肝左外叶切除犬只模型研究门静脉动脉化对肝硬化犬肝切除后肝再生结果表明,PCNA 表达增强,门静脉动脉化对肝细胞的再生有促进作用。Fan 等^[8]用部分肝切除大鼠模型研究门静脉动脉化后肝脏再生情况的结果表明,充足的肝血流量是肝再生的前提因素,在门静脉血流量相同的情况下,无论是静脉血还是动脉血均能保证肝脏的正常再生能力。而我们的残肝再生率的研究结果亦表明,在术后 28 d 内,相对单纯肝切除,附加入肝门静脉化能显著提高残肝的增生及肝脏重量,这对于扩大的部分肝切除术后预防和减少术后早期发生急性肝功能衰竭有着重要意义。

门静脉动脉化主要机制是通过动脉血强化灌注门静脉,增加门静脉的压力和改善肝脏缺血、缺氧。肝细胞主要由线粒体的呼吸链供能,其作用约消耗肝脏 90% 的供氧,而肝细胞再生的启动有赖于白细胞介素-6 及肿瘤坏死因子- α 等因子表达增加^[12]。因此,稳定的氧供对肝脏能量代谢非常重要。在门静脉动脉化后,富含氧供和高流量血供对肝脏的灌注能有效促进肝细胞再生及增殖,另一方面,结合完全性的门腔分流,有效避免了门静脉属支压力升高而引起的消化道静脉曲张出血。实验结果表明,门静脉动脉化对肝脏再生具有促进作用。

参考文献:

- [1] Maillard JN, Benhamou JP, Rueff B, et al. Arterialization of the liver with porto-caval shunt in the treatment of portal hypertension due to intrahepatic block [J]. *Surgery*, 1970, 67(6): 883-890.
- [2] Iseki J, Touyama K, Noie T, et al. Partial portal arterialization for the prevention of massive liver necrosis following extended pancreatobiliary surgery: experience of two cases [J]. *Surg Today*, 1992, 22(6): 568-571.
- [3] Müller V, Brummer D, Kissler H, et al. Effects of portal vein arterialization on regeneration and morphology in liver transplantation: investigations using the rat model [J]. *Transplantation*, 2004, 78(8): 1159-1165.
- [4] Nardo B, Puviani L, Caraceni P, et al. Technical aspects of portal vein arterialization for acute liver failure: From rat lab to man [J]. *Transpl Proc*, 2006, 38(4): 1195-1197.
- [5] 陈永亮,黄志强,周宁新,等. 门静脉动脉化在肝门部胆管癌根治性切除术中的应用 [J]. *中华普通外科杂志*, 2007, 22(3): 404-406.
- [6] Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal [J]. *Arch Pathol*, 1931, 12: 186-202.
- [7] 张红卫,区庆嘉,陈 双,等. 肝硬化大鼠门静脉分支结扎加Ⅱ期肝叶切除 [J]. *中山医科大学学报*, 1998, 19(s): 30-33.
- [8] Fan YD, Praet M, Van Huysse J, et al. Effects of portal vein arterialization on liver regeneration after partial hepatectomy in the rat [J]. *Liver Transpl*, 2002, 8(2): 146-152.
- [9] 陈永亮,黄志强,王迎宾,等. 门静脉动脉化对实验性梗阻性黄疸大鼠肝脏再生的影响 [J]. *解放军医学杂志*, 2001, 10(26): 740-742.
- [10] 陈永亮,黄志强,李文岗,等. 门静脉动脉化对大鼠肝脏再生的影响 [J]. *消化外科*, 2005, 4(6): 421-424.
- [11] 王 鹏,李 鹏,芮 理,等. 门静脉动脉化对肝硬化犬肝切除后肝再生的作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2009, 17(24): 2499-2502.
- [12] 王国栋,马 毅,陈规划,等. 大鼠部分肝移植后早期肝内细胞因子的变化 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2008, 29(1): 63-66, 71.

(编辑 徐 杰)