

门静脉和下腔静脉阻断与开放后门脉高压模型犬肺组织和肺动脉的病变特征

池信锦¹, 黑子清¹, 庞红宇¹, 金亦², 葛 緬¹, 黄品婕¹, 刘德昭¹
(中山大学附属第三医院 1. 麻醉科, 2. 病理科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】观察门静脉和下腔静脉阻断与开放后门脉高压模型犬肺组织与肺动脉的病理学特点,从病理学角度初步探讨终末期肝硬化肝移植围术期急性肺高压和肺损伤的发生机制。【方法】正常家犬 18 只,随机均分为阴性对照组(仅用于取肺组织和肺动脉标本)、对照组和门脉高压模型组(采用部分结扎门静脉的方法建立门脉高压症犬的模型并饲养 12 周),进行门静脉和肝后下腔静脉阻断与开放实验,在术后取右下肺动脉和肺组织,观察其病理形态学特征。【结果】模型组与对照组肺组织在经历门静脉和肝后下腔静脉阻断与开放后均存在不同程度病理形态学改变,但以模型组改变更为显著。门脉高压症犬肺小动脉密度、肺小动脉中膜厚度和血管壁面积/血管总面积(WA/TA)均显著大于阴性对照组和对照组;模型组的肺血管发生了以中膜增厚、动脉管壁肥厚为主要特征的血管重构现象。【结论】模型组犬易发生急性肺高压及肺损伤的特殊的病理学改变与存在门脉高压密切相关。

关键词: 门脉高压; 肺动脉高压; 急性肺损伤/病理学; 门静脉-下腔静脉阻断与开放

中图分类号:R361.2

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)02-0144-04

Characteristic of Lung and Pulmonary Artery after Portal-cavity Clamped and Opened in Portal Hypertension Canine

CHI Xin-jin¹, HEI Zi-qing¹, PANG Hong-yu¹, JIN Yi², GE Mian¹, HUANG Pin-jie¹, LIU De-zhao¹

(1.Department of Anesthesiology, 2.Department of Pathology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】To observe the pathological characteristic of lung and pulmonary artery after portal-cavity clamped and opened in portal hypertension canine, and investigate its mechanism of acute pulmonary hypertension and acute lung injury in order to explore orthotopic liver transplantation (OLT) inducing acute pulmonary hypertension and acute lung injury in the patients with final stage hepatic cirrhosis by pathological pathway. 【Methods】Eighteen canines were randomly divided into groups I (negative control group), II (control group) and III (model group). Canines in negative control group were only for collecting lung and pulmonary artery, and a partial ligation of portal vein were performed in model group. Experiment of portal-cavity clamped and opened was performed after 12 weeks in group II and III. Samples of lung and pulmonary artery were collected postoperatively. The pathological characteristic of lung and pulmonary arteries were analyzed. 【Results】There were pathomorphological changes of pulmonary tissue after portal-cavity clamped and opened in group II and III. But it was more significant in group III than it in the other groups. Density of small pulmonary artery, thickness of tunica media of small pulmonary artery and vessel wall area/vessel total area (WA/TA) in group III were significantly larger than the other groups. Vascular remodeling of pulmonary arteries was occurred in group III, and its key features were thickening of tunica media and vessel wall of pulmonary artery. 【Conclusion】From above data, we could conclude that pathological characteristic of acute pulmonary hypertension and lung injury could be related to existing portal venous hypertension in the model canines. But its mechanism should be further studied.

Key words: portal hypertension; pulmonary hypertension; acute lung injury/pathology; portal-cavity clamped and opened

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(2):144-148]

收稿日期:2007-10-30

基金项目:国家自然科学基金(30271254);广东省科技计划项目(2004B35001005);广东省自然科学基金(7001567)

作者简介:池信锦(1976-),男,福建闽清人,医学硕士,主治医师;黑子清,通讯作者,E-mail:heiziqing@sina.com

终末期肝病常可累及肺血管,表现为肝肺综合征和门脉高压相关性肺动脉高压(portopulmonary hypertension, POPH);其发病机制尚不明。我们的一项临床研究中显示,150例肝硬化行肝移植术的患者大多数存在门脉高压症(portal hypertension, PHT),5.33%患者同时还合并有肺动脉高压(pulmonary hypertension, PH);这些患者在肝移植围术期肺动脉压力变化较其他患者更为显著,持续时间也较长^[1]。同时,部分患者在肝移植围术期会出现不同程度的肺损伤^[2]。目前研究认为门脉高压相关性肺动脉高压的肺动脉的病理学改变与原发肺动脉高压相符,但对于肝硬化并门脉高压症患者在肝移植围术期肺动脉压力变化大,常出现急性增高和发展的趋势;肺氧合能力下降,较非门脉高压患者有着更高的急性肺损伤的发生率的病理学基础尚不明确,缺乏相关的文献报道。因此,我们通过建立门脉高压症犬的模型,观察门静脉和下腔静脉阻断与开放后其肺动脉和肺组织病理形态学特征,从病理学角度初步探讨门脉高压症肝移植围术期急性肺高压和急性肺损伤的发生机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与分组

健康家犬18只,雌雄不限,质量10~17.5 kg,由中山大学医学实验动物中心提供。随机分为3组:阴性对照组6只(麻醉后直接取肺动脉和肺组织标本),对照组6只(只分离门静脉,而不结扎门静脉)和模型组6只(部分结扎门静脉建立肝前门静脉狭窄门脉高压模型)共三组。

1.2 门脉高压动物模型的建立

采用戊巴比妥钠30 mg/kg静脉注射麻醉;参照Van Thiel^[3]和赵莉^[4]的方法采用部分结扎门静脉方法建立肝前型门脉高压犬模型。术后正常饲养12周,术后前3 d肌注0.25 g氯霉素,预防感染。

1.3 门静脉和下腔静脉阻断与开放实验

1.3.1 麻醉方法 采用戊巴比妥钠30 mg/kg静脉注射麻醉后,气管插管,接呼吸机机控呼吸,根据血气分析结果调整呼吸参数,维持呼气末二氧化碳分压(P_{ET,CO_2}) 在35~45 mmHg。间断静注适量30 g/L戊巴比妥钠维持麻醉。

1.3.2 门静脉和下腔静脉阻断与开放手术操作步骤 采用上腹部纵切口,逐层开腹,分离空肠中段肠系膜较平静脉,穿刺测压,造模后犬门静脉压力高于12 mmHg才纳入模型组。分离门静脉和肝后下腔静脉,上紧套索线,阻断肝门静脉、肝后下腔静脉,使实验进入无肝期(正常肝移植手术中,阻断血流后即开始肝脏植入手术,在本实验中吻合肝脏血管步骤不需继续,仅需模拟手术过程),完全阻断下腔静脉和肝门30 min后开放,60 min后手术操作结束。

1.4 肺动脉标本的采集与保存

门静脉和下腔静脉阻断与开放术毕后,取各组右下肺肺组织和肺动脉,40 g/L多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μ m连续切片3张,一张作HE染色,另两张分别进行Weigert弹力纤维染色和Van-Gieson染色。

1.5 研究方法和观察指标

1.5.1 肺组织病理检查方法及评分标准 40 g/L多聚甲醛固定的肺组织常规石蜡包埋切片,HE染色在400倍光镜下任取6个视野,观察肺组织病理改变。参照文献[5,6]肺损伤病理评分标准,对①白细胞在肺组织中的浸润范围;②肺泡腔白细胞量;③肺泡腔渗出物的量;④根据肺实质组织和空肺泡所占面积的百分比四项内容进行评分,判断肺损伤的程度。6个视野计分平均后为该片的损伤得分。

1.5.2 肺动脉病理检查方法及评分标准 弹力纤维染色和Van-Gieson染色切片,着重观察管径不等的肺小动脉壁内、中、外膜3层结构的变化。按Heath与Edwards法^[7]将肺血管病理改变分级。同时挑选大小不等、大致为圆形或卵圆形(纵轴/横轴<2)横断面的小动脉,用Nikon ECLIPSE 80i病理图像系统进行拍照(均为20 \times),然后采用Image Pro Plus 6.0图像分析软件进行分析,测量指标共8个:(1)血管总面积(外弹力板以内,vessel total area,TA);(2)血管腔面积(内膜表面以内,vessel endometry area,EA);(3)管壁面积(外弹力板与内膜表面之间,vessel wall area,WA);(4)血管外径;(5)血管内径;(6)中膜厚度,血管外径减内径的值为中膜厚度;(7)血管壁面积/血管总面积(WA/TV%);(8)肺小动脉密度,即测5个视野内(20 \times)肺小动脉总数,求每个视野内肺小动脉平均数。

1.6 统计分析

所有数据使用 SPSS12.0 软件处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 进行描述, 组间均数的比较使用单因素方差分析, 计量资料组内均数的比较使用重复测量的方差分析; 等级资料采用秩和分析, 取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般资料

模型组与对照组之间犬的质量、表面积、术中出入量(门静脉和下腔静脉阻断与开放手术)等一般情况相似, ($P > 0.05$); 模型组门静脉压力显著高于造模前和对照组 ($P < 0.01$)。

2.2 肺病理学改变特点及评分

阴性对照组: 肺泡腔内未见明显炎性渗出物和炎性细胞浸润, 肺泡腔内仅见少许散在红细胞

渗出, 未见肺泡上皮脱落, 肺毛细血管未见明显充血, 肺泡间隔未见增厚及破坏, 肺泡间隔纤维组织未见增生(图 1A)。对照组: 肺泡腔内见有少许炎性渗出物, 少许散在炎性细胞浸润, 肺泡腔内见一些红细胞渗出, 少许肺泡上皮脱落, 部分肺毛细血管充血较明显, 部分肺泡间隔轻度增厚, 肺泡间隔纤维组织未见明显增生(图 1B)。实验组: 肺泡腔内见炎性渗出物, 并见有炎性细胞浸润, 肺泡腔内见有较多红细胞渗出, 一些肺泡上皮脱落, 肺毛细血管充血明显, 肺泡间隔见有明显增厚及破坏, 肺泡间隔纤维组织增生明显(图 1C)。三组肺组织病理学评分结果表明, 对照组和模型组在经历门静脉和肝后下腔静脉阻断与开放后, 均出现肺损伤 ($P < 0.01, P < 0.05$); 但是模型组的肺组织损伤更为严重(表 1)。

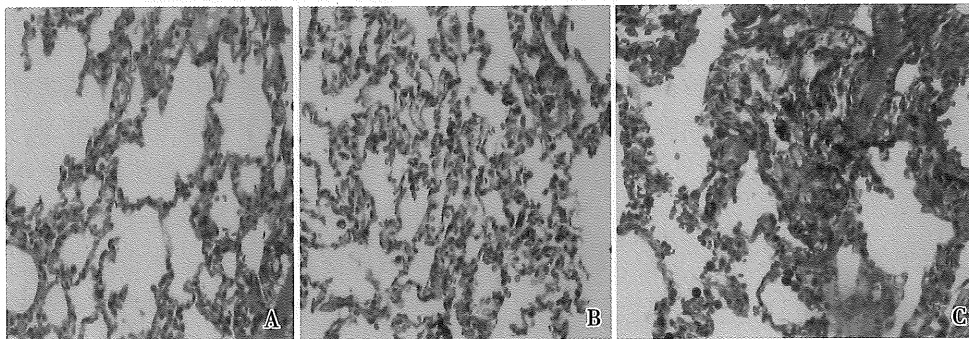


图 1 各组肺组织图片

Fig.1 Lung histopathology of three groups

A: negative control group; B: control group; C: model group; HE, $\times 200$

表 1 三组肺组织病理学变化评分

Table 1 Score of histopathological change for lung in three groups

(n=6)

Group	Range of leukocytic infiltrate	Amount of leucocyte in alveolar space	Effusion in alveolar space	Lung parenchyma/ Keno-alveolus	Total scores
Negative control group	0.17 ± 0.41	0.17 ± 0.41	0.00 ± 0.00	0.17 ± 0.41	0.5 ± 1.2
Control group	1.33 ± 1.21 ¹⁾	1.00 ± 0.89	1.17 ± 1.17 ¹⁾	0.83 ± 0.75	4.3 ± 3.2 ¹⁾
Model group	2.67 ± 0.82 ²⁾³⁾	2.67 ± 0.814 ²⁾⁴⁾	2.83 ± 0.75 ²⁾⁴⁾	2.50 ± 0.22 ²⁾⁴⁾	10.7 ± 3.4 ²⁾⁴⁾
F	12.246	17.857	18.879	11.642	20.078
P	0.001	0.000	0.000	0.001	0.000

Analysis method: One-way ANOVA; 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, vs Negative control group; 3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$ vs Control group

2.3 肺动脉病理学改变特点及评分

阴性对照组: 镜下观察肺各级血管均可见, 血管腔内未见炎性渗出, 血管各层结构清晰可见, 内膜光滑, 未见增生; 中层未见增厚, 血管无充血、扩

张, 未见钙化、纤维化等病理改变; Weigirt 法弹力纤维及 VG 染色, 可见血管纤维排列整齐, 血管中层纤维无增多, Heath 与 Edwards 法分级为 I ~ II 级(图 2A)。对照组: 镜下观察肺各级血管均可见,

部分血管腔内可见少量炎性渗出,各层均可见,内膜光滑,未见增生;少数血管扩张、充血,未见钙化、纤维化等病理改变;Weigirt法弹力纤维及VG染色,可见血管纤维排列整齐,血管中层纤维无明显增多,分级为II~IV级(图2B)。模型组:可见肺各级血管大部分扩张,部分血管腔内可见炎性渗出及出血;血管各层均可见,部分血管内膜增生伴纤维变性,内皮细胞脱落;血管中层增厚,部分血管可见扩张呈血管瘤样改变,少部分血管外周有炎症细胞浸润;Weigirt法弹力纤维及VG染色,可见血管纤维排列欠整齐,大部分血管中层纤维增多,血管呈血管瘤样改变,分级为IV~V级(图2C,表2)。

经过Image Pro Plus 6.0 图像分析软件分析,模型组肺小动脉和末梢动脉壁周围弹性纤维、胶原纤维增多,管壁增厚,管腔狭窄,阴性对照组和对照组的肺小动脉未见异常。

模型组的肺动脉中膜厚度显著大于阴性对照组和对照组 ($P < 0.01$); 模型组 WA/TA 为 79.7 ± 68.3 , 阴性对照组和对照组分别为 60.5 ± 9.8 和 57.0 ± 12.1 , 模型组与其他两组差异显著 ($P < 0.01$), 而两对照组之间无差异;模型组肺小动脉密度模型组为 4.5 支/视野, 显著高于两对照组 ($P < 0.01$, 表 3)。

表2 肺动脉 Heath 与 Edwards 法评分

Table 2 Score of pulmonary artery by Heath-Edwards score

Group	Grade I	Grade II	Grade III	Grade IV	Grade V	Grade VI
Negative control group	3	3	0	0	0	0
Control group ¹⁾	0	3	2	1	0	0
Model group ²⁾³⁾	0	0	0	3	3	0

Analysis method: rank sum test; Chi-square=13.572, $P=0.001$; 1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$, vs Negative control group; 3) $P < 0.01$, vs Control group

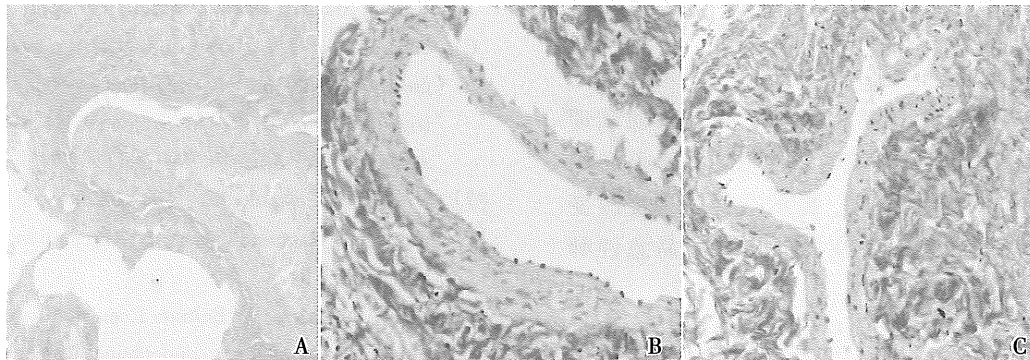


图2 各组肺动脉图片

Fig.2 Histopathology of pulmonary artery in groups

A: negative control group; B: control group; C: model group; VG, $\times 200$

表3 三组肺小动脉病理学图像分析结果

Tab.3 Result of image analysis for small pulmonary artery in three groups (Image element)

Group	TA/ 10^3	EA/ 10^3	WA/ 10^3	External diameter of vessel	Inner diameter of vessel	Thickness of tunica media	WA/TV(%)	Density of pulmonary artery
Negative control group	155 ± 39	71 ± 22	84 ± 18	439 ± 53	295 ± 44	72 ± 27	61 ± 10	2.2 ± 1.0
Control group	140 ± 33	59 ± 15	81 ± 19	439 ± 49	301 ± 36	73 ± 43	57 ± 12	2.0 ± 1.0
Model group	121 ± 22	26 ± 6	95 ± 17	438 ± 43	216 ± 29	111 ± 41 ¹⁾²⁾	80 ± 8 ¹⁾²⁾	4.5 ± 1.6 ¹⁾²⁾
F	2.141	0.277	1.645	0.000	0.174	6.117	25.803	23.292
P	0.128	0.759	0.203	1.000	0.841	0.004	0.000	0.000

TA: vessel total area; EA: vessel endometry area; WA: vessel wall area; 1) $P < 0.01$ vs Negative control group; 2) $P < 0.01$ vs control group

3 讨 论

综合我们的临床实践和文献报道,我们发现原位肝移植围术期肺循环变化大,术后合并肺损伤比率高,这些均明显影响手术的成功率^[1,2]。国外肝移植中心报道终末期肝硬化肝移植患者肺高压的发生率 3.5%~15%^[8,9];长期肝硬化患者在肝移植围术期肺动脉压力变化较其它患者更为显著,而且持续的时间也较长^[1]。原位肝移植术后早期合并肺部并发症的比率高达 41.5%~76%,其中 ALI 占 34.2%~77.8%,终末期肝硬化患者和重型肝炎患者发生率更高^[2,10-11]。目前,关于这方面的报道多局限于临床研究;有肝硬化者,肝移植围术期肺循环变化大和出现肺损伤的病理学特点尚无明确报道。因此,我们通过建立门脉高压症犬的模型,观察门静脉和下腔静脉阻断与开放后其肺动脉和肺组织的病理形态学变化特征。

结果显示:在经历门静脉和肝后下腔静脉阻断与开放后,对照组与模型组肺组织均出现不同程度的病理形态学的改变,模型组病理形态学的改变比对照组和阴性对照组更为明显,综合肺损伤评分显著高于对照组和阴性对照组。表明在门静脉及下腔静脉阻断和开放后引起的一系列病理生理变化^[12],可导致肺组织明显损伤,术前存在门脉高压,则肺损伤更为严重。提示这种病理性改变可能是终末期肝硬化患者在肝移植术后易急性肺损伤的病理学基础。

在本研究中,门脉高压犬在门静脉和肝后下腔静脉阻断与开放后,其肺动脉存在明显病理形态学的改变:血管内膜增生伴纤维变性,内皮细胞脱落;血管中层增厚,部分血管可见扩张呈血管瘤样改变,少部分血管外周有炎症细胞浸润。经过图像分析发现,其肺小动脉密度、肺小动脉中膜厚度和 WA/TA 均显著大于阴性对照组和对照组,这说明模型组的肺血管发生了以中膜增厚、动脉管壁肥厚为主要特征的血管重构现象。肺动脉壁胶原及弹性纤维增生,使动脉管壁更加肥厚、僵硬,顺应性降低,致血管阻力增加。虽然本研究尚不能阐明引起这种血管重构的机制,但初步证实了这种血管重构可能是肝硬化门脉高压患者在肝移植围术期肺动脉压力变化较其它非门脉高压患者更为显著的病理学改变。

综上所述,门脉高压犬在门静脉和肝后下腔静脉阻断与开放后,肺组织与肺动脉病理性损伤明显高于非门脉高压犬,提示有重要的临床意义;但仍需进一步研究其病理学变化的机制。

参考文献:

- [1] 黑子清,黎尚荣,罗刚健,等.肝硬化性门肺高压患者肝移植术中体、肺循环血液动力学的变化[J].中华麻醉学杂志,2006,26(1):7-10.
- [2] 武若君,石炳毅,刘京涛,等.肝脏移植术后急性肺损伤的临床观察与处理[J].解放军医学杂志,2003,28(11):1040-1042.
- [3] Van Thiel DH, Cavalier JS, Slone FL, et al. Is feminization in alcoholic men due in part to portal hypertension: a rat model[J].Gastroenterology,1980,78(1):81-91.
- [4] 赵 莉,李振东,于增文,等.肝前型门静脉高压症动物(犬)模型制作体会[J].中华小儿外科杂志,2001,22(1):42-44.
- [5] Holopainen R, Aho H, Laine J, et al. Nitric oxide inhalation inhibits pulmonary apoptosis but not inflammatory injury in porcine meconium aspiration [J]. Nippon Shonika Gakkai Zasshi,1999,88(10):1147-1155.
- [6] Hei ZQ, Gan XL, Huang HQ, et al. Protective effects of cromolyn sodium on intestinal ischemia-reperfusion triggered lung injury in rats and its mechanisms of action[J]. Br J Anaesth,2007,98(3):407-408.
- [7] Heath D, Edwards JE. The pathology of hypertension pulmonary vascular disease[J]. Circulation, 1958, 18(4 Part 1):533-547.
- [8] Taura P, Garcia V, Beltran J, et al. Moderate primary pulmonary in patients undergoing liver transplantation [J].Anesth Analg,1996,83(4):675-680.
- [9] Benjaminov FS, Prentice M, Sniderman K, et al. Portopulmonary hypertension in decompensated cirrhosis with refractory ascites[J].Gut,2003,52(9):1355-1362.
- [10] Duran FG, Piqueras B, Romero M, et al. Pulmonary complications following orthotopic liver transplant [J]. Transpl Int, 1998,11 Suppl 1:S255-259.
- [11] 郭卫平,陈规划,易慧敏,等.肝移植术后早期呼吸系统并发症的危险因素[J].中国实用外科杂志,2005,25(6):367-368.
- [12] 陈 宇,黄文起,黑子清,等.猪门静脉回流阻断模型内毒素的移位[J].中山大学学报:医学科学版,2005,26(6):635-638.