

制备导管大鼠模型观察置管手术对肝功能的影响

庄思齐¹, Kimura R E², 陈勇², 李易娟¹

(1. 中山医科大学附属第一医院儿科, 广东 广州 510080; 2. 芝加哥 Rush 大学医疗中心儿科, 伊利诺 芝加哥 60612)

摘要:【目的】观察开腹置管手术对大鼠肝功能的影响。【方法】制备导管大鼠模型, 在术后不同时点收集胆汁标本检测胆汁流量(bile flow, BF)、总胆酸(total bile acid, TBA)、谷丙转氨酶(ALT)和谷胱甘肽(glutathione, GSH/GSSG)等重要肝功能指标。【结果】BF 各时点值间无显著性差异(P 均 >0.05); TBA 在术后 24 h 内明显降低, 各时点值间的两两比较, 除 48 与 72 h 之外, 均有显著性差异($P < 0.05$ 或 0.01); ALT 以术后 6 h 最高, 但各组数值仍在正常范围; GSH 和 GSSG 在术后即时测值最高, 6 h 最低, 二者之间有正相关关系。【结论】开腹置管手术明显降低肝脏分泌胆酸的功能, 但对胆汁分泌量、ALT、GSH 以及 GSSG 等其他肝功能的影响较小。

关键词: 肝/分泌; 导管; 留置; 大鼠

中图分类号: R333.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)06-0435-03

Using Catheterized Rat Model for Observation on the Impact of Catheterized Surgery to Hepatic Function

ZHUANG Si-qi¹, KIMURA R E², CHEN Yong², LI Yi-juan¹

(1. Department of Pediatrics, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080 China; 2. Department of Pediatrics, Rush Medical Center, Rush University, Chicago, IL 60612 USA)

Abstract: 【Objective】To observe the impact of catheterized surgery on hepatic function. 【Methods】To make chronic catheterized rat model, which was done by inserting catheters to abdominal aorta, inferior vena cava, common bile duct and duodenum under sterized condition. Drawing bile from biliary catheter to measure bile flow rate, bile acid concentration, GSH/GSSG and ALT for evaluating the hepatic function. 【Results】There was no difference between all groups on bile flow rate ($P > 0.05$); significant difference between TBA groups ($P < 0.05$ or 0.01) except the 48 and 72 h; the highest level of ALT was at 6 h, but all groups were in normal level; the value of GSH/GSSG were also in normal level, but the highest one was 0 hour group, there was positive correlation between GSH and GSSG. 【Conclusion】Surgical stimulation decreased hepatic function on the secretion of bile acid significantly, but no much influence on the bile flow rate, ALT and GSH/GSSG.

Key words: liver/secretion; catheters, indwelling; rats

肝脏是人体最重要的器官之一, 参与消化、代谢、免疫等多种功能。各类疾病和应激都会引起肝功能的改变并导致身体状态的变化。国外利用先进的导管大鼠模型制作方法, 观察开腹置管手术造成的刺激对几项重要的肝功能指标的影响, 并探讨各检测因素之间的相关关系。本文介绍此模型

的重建, 旨在进一步应用此导管大鼠制作多种疾病模型, 开展对有关疾病发病机理和诊治基础等多方面深层次的研究。

1 材料与方法

收稿日期: 2000-03-01

基金项目: 中山医科大学留学回国人员启动基金(018)

作者简介: 庄思齐(1951-), 女, 上海人, 副主任医师, 儿童生长发育、新生儿专业。

1.1 实验动物与手术

同批雄性 sprague-Dawley 大鼠 16 只, 体质量 250~350 g。Ether 和 ketomin 麻醉大鼠后仰卧固定于手术台, 按无菌手术操作切开腹腔, 暴露腹主动脉、下腔静脉、胆总管及十二指肠。以穿刺法将聚乙烯塑胶导管插入各管腔, 另一端与预先已插置于颈部的导管栓连接, 再以缝线和快干胶固定(图 1)。

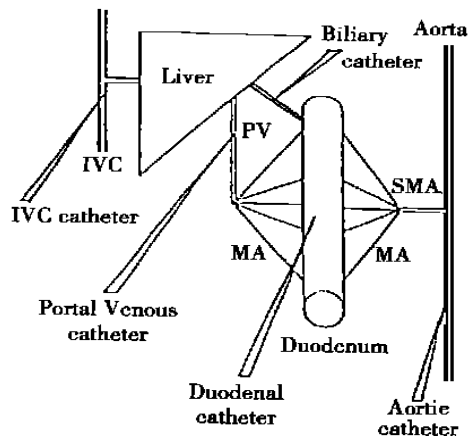


图 1 置管手术示例

Fig. 1 Catheterized surgery

1.2 标本收集

以虹吸法将胆汁经穿插于胆总管导管栓的微细硅胶管引流至容量测定管, 计时留取胆汁, 每次 15 min 后关闭导管。计测胆汁流量(BF)后吸出 5 μ L 胆汁置标本管并迅速转移至 -78 $^{\circ}$ C 冰箱内保存待检。剩余的胆汁经十二指肠导管回输。共收取术后 0、3、6、24、48、72 h 及 7 d 的胆汁标本 7 组(主动脉导管可供取血, 腔静脉导管可供输液给药, 本实验仅作为手术操作, 未经动静脉导管取血或输

液)。

1.3 标本检测

以荧光分光光度计测定各组标本中总胆酸(TBA)含量, 高压液相层析法(HPLC)测定谷胱甘肽(GSH/GSSG), ELISA 酶标仪测定谷丙转氨酶(ALT)。胆汁流量则按公式计算: $BF = \text{标本总重量} \cdot \text{胆汁比重}^{-1} \cdot \text{收集时间}(\text{min})^{-1}$ 。

1.4 统计学处理

各组测定数值采用均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 多组资料均数比较, 采用 F 检验, 若有显著性差异, 则进一步作 q 检验(各组均数间的两两比较); BF、TBA、ALT 之间及 GSH/GSSG 之间关系用直线相关分析。

2 结果

2.1 胆汁中各检测因素在不同时点的动态变化

胆汁中各检测因素在不同时点的动态变化见表 1。从各组数值可见, TBA 在术后 24 h 内明显降低, 48 h 才恢复到正常水平, 各时点值间的两两比较, 除 48 h 与 72 h 之间外, 均有显著性差异($P < 0.05$ 或 0.01); BF 各时点值间无显著性差异(P 均 > 0.05); ALT 以术后 6 h 最高, 但各组数值仍在正常范围, 各时点值间的两两比较, 无显著性差异($P > 0.05$); GSH/GSSG 在术后即时测值最高, 6 h 最低, GSSG 组各时点值间的两两比较, 除 3 h 与 24 h 之间、48 h 与 168 h 之间外, 均有显著性差异($P < 0.05$ 或 0.01); GSH 组各时点值间的两两比较, 除 0 h 与 72 h 之间、3 h 与 24 h 之间外, 均有显著性差异($P < 0.05$ 或 0.01)。

表 1 各检测因素水平的动态变化

Table 1 The impact of different factors level

($\bar{x} \pm s$)

Postoperating time(t/h)	TBA (mmol/L)	BF (μ L/min)	ALT (μ /mL)	GSSG (μ mol/mL)	GSH (μ mol/mL)
0	19.65 \pm 1.39	21.79 \pm 6.15	4.89 \pm 0.49	1.12 \pm 0.23	0.79 \pm 0.28
3	24.77 \pm 2.32	22.12 \pm 6.85	7.12 \pm 0.48	0.49 \pm 0.05	0.45 \pm 0.06
6	23.21 \pm 1.79	22.27 \pm 7.14	9.42 \pm 1.02	0.37 \pm 0.15	0.32 \pm 0.21
24	28.25 \pm 1.94	21.86 \pm 5.13	4.87 \pm 0.74	0.51 \pm 0.09	0.49 \pm 0.07
48	58.03 \pm 3.46	24.41 \pm 5.09	4.74 \pm 0.63	0.62 \pm 0.09	0.64 \pm 0.09
72	60.79 \pm 1.73	25.49 \pm 5.46	4.22 \pm 0.54	0.71 \pm 0.07	0.70 \pm 0.05
168	57.87 \pm 4.69	24.99 \pm 4.49	3.92 \pm 0.64	0.58 \pm 0.08	0.58 \pm 0.07
F	777.43	1.23	138.61	64.12	19.73
P	1.37×10^{-84}	0.30	1.47×10^{-47}	7.08×10^{-33}	2.58×10^{-15}

2.2 胆汁中 TBA、BF 和 ALT 在不同时点的动态变化

胆汁中 TBA、BF 和 ALT 在不同时点的动态变化如图 2 示, 胆汁 TBA 在术后即时明显下降, 24 ~ 48 h 内仍处较低水平, 48 h 后恢复正常并维持较稳定状态。24 h 以内各组与 48 h 之后各组有非常显著性差异 ($P < 0.001$)。

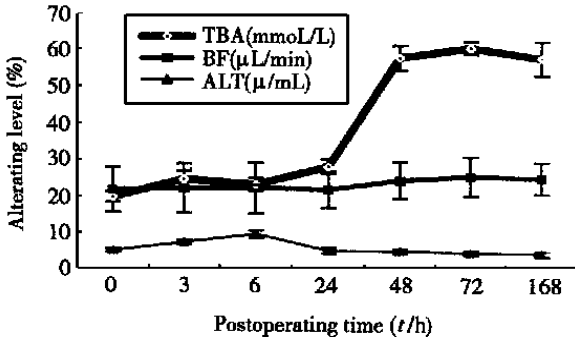


图 2 TBA、BF 和 ALT 的动态变化

Fig 2 The impact of TBA, BF and ALT

BF 在术后各时点组测值之间均无显著性差异 ($P > 0.05$), 呈相当稳定状态。

ALT 在术后逐渐升高, 6 h 达最高值, 与其他各组之间均有显著性差异 ($P < 0.01$), 但各组数值仍在正常范围内。

2.3 胆汁中 GSH/GSSG 在不同时点的动态变化

胆汁中 GSH/GSSG 在不同时点的动态变化见图 3。由图中可见 GSH 和 GSSG 均在术后即时升至最高值, 然后迅速下降, 6 h 达最低点, 以后逐渐回升, 48 h 后趋于相对稳定状态。

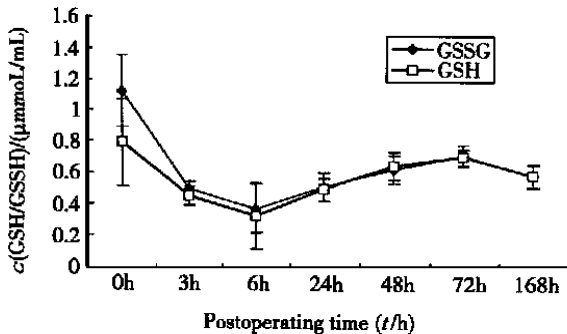


图 3 胆汁 GSSG/GSH 水平的动态变化

Fig 3 The impact of bile GSSG/GSH level

2.4 各检测因素的相关性分析

经直线相关分析检测, BF、TBA 及 ALT 之间无相关性; GSSG 与 GSH 之间除 0 时外, 其余各时

点 GSSG 与 GSH 水平呈正相关关系, 表 2。

表 2 术后各时点胆汁 GSSG、GSH 水平的相关性分析

Table 2 Correlative analysis of GSSH/GSH

Correlation coefficient	Postoperating time (t/h)						
	0	3	6	24	48	72	168
r	0.15	0.87 ¹⁾	0.72 ¹⁾	0.87 ¹⁾	0.74 ¹⁾	0.72 ¹⁾	0.63 ¹⁾

1) $P < 0.05$

3 讨论

导管大鼠模型是近年来在国外开展应用的动物实验模型, 具有术后恢复快、标本取样部位多、快捷稳定、使用时间长等许多优点^[1]。实验时可同时或分别从腔静脉、门静脉、胃肠道等管腔输注各种药物或毒物, 经主动脉和胆总管取标本检测各项生化和分子生物学指标, 以进行药物动力学、血流动力学和疾病发生机制等多方面的研究。本组实验大鼠手术过程中均无明显出血, 可排除缺血缺氧性损伤, 术后胆汁引流顺利, 肠道通畅。实验完毕后剖腹检查, 肝脏大体未见异常, 病理切片镜下观察无肝内胆淤积或胆道阻塞现象。

测定胆汁流量、血清和胆汁中酶系列水平已是国际上公认的评价肝功能损害的主要方法^[2,3]。各种疾病、外源性损伤和应激状态均会引起肝功能的改变并对机体内环境产生重要影响, 其病理生理机制众多, 其中谷胱甘肽 (GSH/GSSG) 在肝脏疾病中的作用日益受到重视^[4]。本组实验检测结果表明, 开腹置管手术对大鼠的刺激明显降低术后头 24 h 的胆酸分泌, 但对胆汁流量的影响甚微, 术后 7 d 内各时段的胆汁流量处于稳定水平。由于该手术创伤未造成缺血缺氧性损伤, 故对肝酶的影响较小, ALT、GSH 和 GSSG 均在正常范围之内, 但仍可见 GSH 及 GSSG 在术后即时释放增加, 可能与应激对答反应有关, 且在术后 6 h 降至最低点, 此时 ALT 则升至最高水平, 至 48 h 后趋于相对稳定状态, 是否与该时点肝细胞谷胱甘肽消耗过多相对不足而导致 ALT 增加有关, 尚待进一步研究。

此模型的制备为下一步开展对败血症、胆汁淤积症等疾病的发生机理和治疗用药方面的研究提供了实验基础, 为排除手术刺激带来的干扰, 应在术后 48 h 才开始进行其他的实验研究。

(下转第 441 页)

性明显降低,即使不应用免疫抑制剂,胸腺内移植后亦可长期存活。

为了证实经低温 24 °C 后的胰岛是否诱导了受体对供体的特异性无反应性,我们对胸腺内移植长期存活的受体进行再次胸腺外移植。结果发现未经培养的胰岛胸腺内移植的受体左肾被膜下的胰岛未见排斥,而培养后胰岛胸腺内移植的受体不仅左肾被膜下的胰岛则可见淋巴细胞浸润胸腺内的胰岛也被排斥,表现为受体小鼠血糖增高,表明再次胸腺外移植诱发了对首次胸腺内胰岛移植物的排斥反应。

小鼠胰岛细胞中含 I 类抗原,又有含 II 类抗原的树突状细胞和内皮细胞,并且具有抗原递呈功能,胰岛的免疫原性主要源于 II 类抗原。研究证实,低温 24 °C 培养、抗 MHC-II 类抗原单抗和抗树突状细胞的单抗均可清除胰岛的 II 类抗原,降低胰岛的免疫原性^{3,4}。辅以免疫抑制剂,经上述处理的胰岛移植到同种异体的肾被膜下,肝内及腹腔,功能存活时间延长。本试验中,培养后胰岛免疫原性明显降低,即便不应用 ATS 胸腺内移植后获长期存活,但免疫原性减低后的胰岛胸腺内移植诱导免疫耐受没有成功,其可解释可能是,低温 24 °C 培养的胰岛清除了 II 类抗原, I 类抗原亦明显减少,未能刺激受体诱发排斥反应。受体应用 ATS 后,外周大部分 T 淋巴细胞被除去,促使骨髓内前胸腺细胞进入胸腺,在表达外源性 MHC 抗原的环境中发育,但由于胸腺内供体特异性 I 类抗原的数量不足以诱导受体对供体移植 I 类抗原的耐受,同时

由于供体移植物经 24 °C 培养后 II 类抗原明显减少或消失,受体亦未形成对供体 II 类抗原抗原的免疫耐受,再次移植供体新鲜分离的胰岛到受体肾被膜下激发了受体对胸腺内及胸腺外移植物的排斥反应,表明供体移植物激活的淋巴细胞可达胸腺实质,这一点同本实验分组中的第①组试验结果是一致的。而胸腺内移植新鲜分离的胰岛,应用 ATS 后,移植物存活时间延长,经过胸腺内免疫耐受诱导,形成了受体对供体胰岛的特异性无反应性。因此,胰岛中含 II 类抗原的抗原递呈细胞在胸腺诱导免疫耐受中起主要作用,而且 I 类、II 类抗原在诱导免疫耐受中起协同作用。这一现象的机理还值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] 王国栋,陈规划. 胸腺内胰岛移植的实验研究 [J]. 中华器官移植杂志, 1999, 20(1): 22.
- [2] Stein E, Mullen Y, Benhamou, P Y, *et al.* Reduction in immunogenicity of human islets by 24 °C culture [J]. *Transplant Proc*, 1994, 26 (2): 755.
- [3] Woehrl M, Markmann J F, Silvers W K, *et al.* Transplantation of cultured pancreatic islets to BB rats [J]. *Surgery*. 1986, 100(2): 334.
- [4] Faustman D L, Steinman R M, Gebel H M, *et al.* Provention of rejection of murine islets allografts by pretreatment with anti-dendritic cell antibody [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1984, 81(12): 3864.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 437 页)

参考文献:

- [1] Beno D W, Kimura R E. Nonstressed rat model of acute endotoxemia that unmasks the endotoxin-induced TNF- α response [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(2 pt 2): H671.
- [2] Frost L, Mahoney J, Field J, *et al.* Impaired bile flow and disordered hepatic calcium homeostasis are early features of halothane-induced liver injury in guinea pigs [J].

Hepatology, 1996, 23(1): 80.

- [3] Imberti R, Vairetti M, Guala M R, *et al.* The effects of thyroid hormone modulation on rat liver injury associated with ischemia-reperfusion and cold storage [J]. *Anesth Analg*, 1998, 86(6): 1187.
- [4] 王 斌. 谷胱甘肽代谢及其在肝脏疾病中的作用 [J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 1997, 18(2): 82.

(编辑 关淡庄)