

# 不同热、冷缺血时间对供肝胆道保存的影响

陆敏强 陈规划 黄洁夫

(中山医科大学附属第一医院器官移植科, 广州, 510080)

**摘要** 目的: 探讨不同热、冷缺血时间对供肝胆道的影响。方法: 将经历不同热缺血时间的SD大鼠肝脏用4℃ UW液(solution of University of Wisconsin)经门静脉灌注, 胆管用4℃ UW液或Ringer液逆行灌注后置4℃ UW液中保存一定时限。光镜观察胆道粘膜。结果: UW液灌注组: 热缺血时间在3 min以内胆道经历12 h冷缺血后无明显改变; 热缺血时间达5 min的胆道在经历12 h冷缺血后出现严重的损伤。用Ringer液进行胆道灌注效果欠佳。结论: ①UW液对供肝胆道有保护作用。②关于供肝胆道的保存时限: 热缺血时间不应超过5 min; 若热缺血时间在3 min以内, 冷缺血时间可延长至12 h; 热缺血时间达5 min, 则冷缺血时间不应超过8 h。

**主题词** 肝移植; 胆道; 器官保存/方法; 时间因素

**中图分类号** R 617

## STUDY OF THE PRESERVATION EFFECTS OF DIFFERENT WARM AND COLD ISCHAEMIC TIME ON THE BILE DUCTS

Lu Minqiang Chen Guihua Huang Jiefu

(Department of Transplantation, First Affiliated Hospital,  
Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080)

**Abstract Objective** To study the best preservation time of bile ducts. **Methods:** Rat livers underlying various warm ischaemic time were perfused with UW solution at 4℃, bile ducts were flushed retrograde with UW solution at 4℃ or Ringer's solution and livers were stored in UW solution at 4℃. Bile ducts were examined by light microscopy. **Results** The quality of bile ducts in UW's group was depend on the warm and cold ischaemic time. The injury of different degrees in epithelial cells of bile ducts could be observed in Ringer's group. **Conclusions** ①UW solution is suitable to bile ducts preservation; ②Within 3 minutes warm ischaemic time, bile ducts stored in UW solution within 12 hours cold ischaemic time are safety; the cold ischaemic time can not exceed 8 hours as the warm ischaemic time is 5 minutes.

**Subject headings** liver transplantation; biliary tract; organ preservation/methods; time factor

肝移植术后的胆道并发症直接影响了患者术后的长期生存以及生活质量, 其发病率约50%, 死亡率约30%<sup>[1]</sup>。引起胆道并发症的高危因素是多种多样的。针对我国供体情况, 作者对不同热、冷缺血时间下供肝胆道的形态学变化进行了研究, 结合文献探讨适合我国国情的供肝胆道保存方法和保存时限。

### 1 材料和方法

#### 1.1 实验动物和分组

雄性SD大鼠, 300~350 g, 共108只。按供肝热缺血时间随机分为3大组, 分别为I组(0 min), II组(3 min), III组(5 min)。每组36只, 每大组内按胆道灌注液随机等分为A(UW液; Solution of University of Wisconsin)、B(林格氏液; Ringer's Solution)两组。A、B组按冷缺血时间又随机分为3小组, 每小组6只, 分别为A1、A2、A3、B1、B2、B3。1~3小组供肝冷缺血时间分别为4、8、12 h。

#### 1.2 方法

给大鼠予3%戊巴比妥钠按35 mg/kg行腹腔内麻醉。正中切口进腹。结扎远端胆管后用一长2 cm硬外管插入近端胆管并予丝线牢固固定, 留待作胆道灌注。游离并结扎幽门静脉、脾静脉。门静脉游离后过线。结扎门静脉远端, 近端行门静脉插管。同时剪断肝下腔静脉、腹主动脉及肝上下腔静脉。其中, 第I组马上经门静脉插管开始予4℃ UW液10 mL进行肝脏灌注, 直至肝脏变为均匀土黄色。第II、III组则按不同的热缺血时间行门静脉灌注。每组在进行门静脉灌注的同时, 分别用4℃ UW液或Ringer液1 mL在30 s内匀速进行胆道低压灌注。各组胆道灌注压力大致相等。胆道灌注完毕立即拔除胆道插管, 让胆汁及灌注液自然流出。灌注完毕, 切取肝门部约1 cm×1 cm×1 cm肝脏置4℃ UW液中保存。按实验设计将经历冷缺血后的肝脏用10%福尔马林磷酸缓冲液(pH=7.4)固定。

### 1.3 病理观察

标本进行 HE 染色后在 400 倍光镜下观察。为避免阅片中的主观因素, 采用随机盲法看片。

## 2 结果

### 2.1 UW 液灌注组

热缺血时间为 0.3 min 的第 I 组及第 II 组, 供肝胆道分别经历 4 h(A1 组)、8 h(A2 组)和 12 h(A3 组)冷缺血时间后, 光镜下胆道均无明显保存性损伤的表现; 胆道立方上皮细胞基本上排列整齐, 胞浆清楚, 核固缩不明显, 核染色质无溶解, 胆管结构无破坏。

热缺血时间为 5 min 的第 II 组供肝胆道则随着冷缺血时间延长而表现出不同程度的保存性损伤改变。其中热缺血时间都为 5 min, 冷缺血时间分别为 4 和 8 h 的 IIIA1 组和 IIIA2 组光镜下胆道改变大致相同; 胆道立方上皮细胞大部分出现中等程度的肿胀、核固缩、部分核染色质溶解(图 1)。

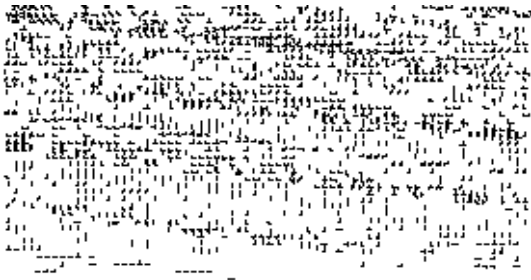


图 1 UW 组; 热缺血时间达 5 min, 冷缺血时间为 8 h, 胆道上皮有一定程度损伤改变

Fig. 1 UW group, within 5 minutes warm ischaemic time and 8 hours cold ischaemic time a mild injury in epithelial cells of bile ducts can be observed

热缺血时间为 5 min, 冷缺血时间为 12 h 的 IIIA3 组供肝胆道则出现严重的保存性损伤改变: 光镜下胆道立方上皮细胞不规则肿胀明显, 胞浆染色差, 核固缩较明显, 核染色质溶解明显, 大小胆管均累及(图 2)。

### 2.2 Ringer 液灌注组

热缺血时间分别为 0、3、5 min 的第 I、第 II、第 III 组, 无论冷缺血时间为 4、8 还是 12 h, 供肝胆道均呈现严重的保存性损伤改变: 绝大部分胆管立方上皮细胞肿胀严重, 胞浆不清楚, 核固缩变形明显, 核染色质溶解, 甚至发生胆管结构破坏(图 3)。

## 3 讨论

### 3.1 供肝胆道发生保存性损伤的原因

常温下器官发生缺血超过一定时限, 细胞结构的破坏

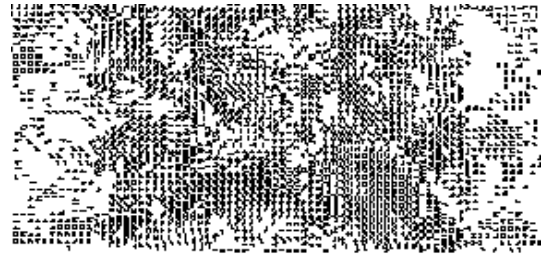


图 2 UW 组; 热缺血时间达 5 min, 冷缺血时间为 12 h, 胆道上皮出现严重损伤

Fig. 2 UW group, within 5 minutes warm ischaemic time and 12 hours cold ischaemic time severe injury in epithelial cells of bile ducts can be seen



图 3 Ringer's 组; 胆道灌注效果欠佳, 胆道上皮出现不同程度的损伤改变

Fig. 3 Ringer's group. Its flushed effect is bad, the injury of different degrees in epithelial cells of bile ducts can be seen

所导致的器官功能障碍将产生不可逆性损害。我们曾进行的一系列动物实验证实了不同的热缺血时间直接影响到器官在冷保存中的质量。本实验热缺血时间在 3 min 以内且采用 UW 液作胆道灌注的 I A1~3 及 II A1~3 组, 在经历 12 h 冷缺血时间后胆道结构仍无明显病理变化。而在热缺血时间达 5 min 组(IIIA1~3 组), 尽管同样使用 UW 液行胆道灌注, 但冷保存至 4 h 后已开始出现胆道上皮损伤, 至 12 h 时胆道损伤的形态学变化更加明显。胆道上皮细胞的病理变化与第 I A、II A 组有显著性差异。

一般认为, 在低温条件下, ATP 酶失活, 能量释放停止,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP 酶泵受到抑制, 使细胞内外离子失衡, 一些离子如  $\text{Na}^+$ 、 $\text{Cl}^-$  等渗入细胞内导致细胞肿胀。这种水肿作用能够通过使用无毒的非渗透性大分子物质所抑制<sup>[2]</sup>。Clavien<sup>[3]</sup> 等指出, ATP 酶泵的抑制不是低温下导致细胞肿胀的唯一原因。低温本身也可产生一种能增加细胞膜通透性的物质从而导致细胞外的离子渗入细胞内致细胞肿胀。在冷保存期间, 内皮细胞表面的改变使血小板和白细胞粘附导致直接的损伤, 且这种损伤会随着冷缺血时间的延长而加重<sup>[3]</sup>。

即使在低温条件下, 器官由于缺血仍可产生巴士德效应, 导致细胞内酸中毒, 从而诱使溶酶体活化并改变线粒体的特性。

### 3.2 胆道灌注液的选择

选择一种合适的胆道灌注液就如选择合适的肝动脉、门静脉灌注液一样重要。充分有效的胆道灌注冲洗能使胆道在冷保存期间获得最佳的保护。供肝胆道损伤的另一原因是胆盐对缺血状态下的胆管上皮具有毒性作用<sup>[4]</sup>, 其程度是基于胆盐的浓度和成分。Knoop等<sup>[5]</sup>发现, 当使用 UW 液和胆汁混合液(各为 50%)对胆总管进行冷保存 12 h, 胆管壁粘膜已开始坏死, 而单纯使用 UW 液则仅表现为胆管上皮水肿。Belzer<sup>[6]</sup>指出, 使用 UW 液灌洗胆道能降低移植术后胆道并发症的发生率。本实验结果显示: 在相同的条件下, 采用 UW 液作胆道灌洗组与采用 Ringer 液组相比, 其灌洗效果有显著性差异。热缺血时间在 3 min 以内且以 UW 液作胆道灌注的 I A1~3 和 II A1~3 组在分别经历 4、8、12 h 冷缺血时间后光镜下胆管结构无破坏。而热缺血时间同样在 3 min 以内但以 Ringer 液行胆道灌注的 B 组, 即使经历 4 h 冷缺血后, 光镜下胆道已发生明显的病理变化。故切取肝脏进行冷保存前采用 UW 液进行充分的胆道冲洗可减轻胆道的保存性损伤。

### 3.3 供肝胆道冷保存的时限

尽管目前公认采用 UW 液对肝脏进行冷保存可长达 30 h, 但 Sanchez-Urdazpal<sup>[7]</sup>指出, 供肝采用 UW 液保存 < 11.5 h 组, 肝移植术后的胆道狭窄发生率仅 2%, 而 > 11.5 h 组其发生率则高达 35%。两者之间差异有统计学意义。将使用 UW 液进行冷保存的时间限制在 < 13 h 以内可以显著地降低移植术后胆道并发症的发生率。本实验结果也提示: 在供肝存在热缺血损伤的基础上, 冷缺血时间与胆道上皮的损伤程度有一定的关系。虽然第 I、II 组(热缺血时间分别为 0 和 3 min)采用 UW 液灌注胆道及保存 12 h 后光镜下胆道仍无明显病理变化。但同样条件下的 IIIA1~2 组(热缺血时间为 5 min, 冷缺血时间分别为 4、8 h)与第 I、

II 组相比, 其胆道上皮已出现一定程度的损伤, 而经历 12 h 冷缺血后的 IIIA3 组胆道病理变化则极为严重。上述结果揭示: 在一定热缺血损伤基础上经历不同的冷缺血时间后, 供肝胆道会出现有明显差异的病理变化, 供肝的热、冷缺血因素与供肝胆道的保存质量有直接关系。应尽可能缩短热缺血时间。最长不应超过 5 min。若热缺血时间在 3 min 以内, 冷保存时间延长至 12 h 仍安全, 可争取更多的修肝时间。而热缺血时间达到 5 min, 则冷保存时间不应超过 8 h。

### 参 考 文 献

- 1 Starzl T E, Putnam C W, Hansbrough J, *et al.* Biliary complications after liver transplantation; with special reference to the biliary cast syndrome and techniques of secondary duct repair. *Surgery*, 1997, 163: 519
- 2 Belzer F O, Southard J H. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*, 1988, 45(4): 673
- 3 Clavien P A, Sanabria J R, Upadhyaya A, *et al.* Evidence of the existence of a soluble mediator of cold preservation injury. *Transplantation*, 1993, 56(1): 44
- 4 Hertl M, Harvey P R, Swanson P E, *et al.* Evidence of preservation injury to bile ducts by bile salts in the pig and its prevention by infusions of hydrophilic bile salts. *Hepatology*, 1995, 21(4): 1130
- 5 Knoop M, Schnoy N, Keck H, *et al.* Morphological changes of human common bile ducts after extended cold preservation. *Transplantation*, 1993, 56: 735
- 6 Belzer F O. Evaluation of preservation of the intra-abdominal organs. *Transplant Proc*, 1993, 25(4): 2527
- 7 Sanchez-Urdazpal L, Gores G L, Ward E M, *et al.* Ischaemic type biliary complications after orthotopic liver transplantation. *Hepatology*, 1992, 16: 49

(1997-12-10 收稿 1998-04-20 修回)