

文章编号:1005-6947(2008)07-0650-04

· 肝缺血再灌损伤专题研究 ·

大鼠肝脏缺血再灌注损伤程度判定指标的选择

元文勇¹, 余伟平², 叶启发¹, 任祖海¹, 刘海¹, 明英姿¹, 蒋圣军¹

(1. 中南大学湘雅三医院器官移植医学研究院, 湖南长沙 410013; 2. 南昌大学第一附属医院 肝肾移植科, 江西 南昌 330006)

摘要:目的 探讨肝脏缺血再灌注(I/R)损伤程度及其判断指标的选择。方法 建立大鼠肝脏局部I/R模型,测定大鼠肝脏缺血60,90 min再灌注0,1,2,4,6,12,24,48 h时的血清丙氨酸转氨酶(ALT)水平,并行病理检查(相对细胞死亡率)。参照本院I/R损伤分级标准重新将动物分为4个不同的I/R损伤程度的实验组,分析ALT水平与病理改变的关系。结果 缺血60 min组中轻度I/R损伤占75.0%,中度I/R损伤占14.6%,重度I/R损伤占10.4%;缺血90 min组中轻度I/R损伤占41.7%,中度I/R损伤占25.0%,重度I/R损伤占16.7%,严重度I/R损伤占16.7%。损伤程度越重细胞死亡率越高,ALT水平也越高。结论 ALT水平可直接反映肝脏I/R损伤程度;损伤程度越重,转氨酶水平越高,细胞死亡率也越高。

[中国普通外科杂志,2008,17(7):650-653]

关键词: 肝/血液供给;缺血再灌注损伤;大鼠

中图分类号: R 364.2 **文献标识码:** A

Selection of indicator to judge the degree of hepatic ischemia and reperfusion injury in rats

YUAN Wenyong¹, YU Weiping², YE Qifa¹, REN Zuhai¹, LIU Hai¹, MING Yingzi¹, JIANG Shengjun¹

(1. Xiangya Institute of Organ Transplantation, Central South University, Changsha 410013, China;
2. Department of Organ Transplantation, the First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract: **Objective** To explore the selection of indicator to judge the severity of hepatic ischemic and reperfusion injury (IRI). **Methods** Local warm hepatic IRI model was established routinely in rat. The serum alanine aminotransferase (ALT) levels were determined and specimens were sent for pathological test at time of 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 h of reperfusion, after ischemic time of 60 and 90 min respectively. The rats were re-grouped into 4 groups of different severity according to the grading systems for IRI used in our institute, and the relationship between ALT level and pathological changes was analyzed. **Results** After 60 min of ischemia time, there was mild IRI in 75%, intermediate IRI in 14.6% and severe IRI in 10.4% of rats, respectively. After 90 min of ischemia time, there was mild IRI in 41.7%, intermediate IRI in 25%, severe IRI in 16.7%, very severe IRI in 16.7% of rats respectively. The results showed that the more severe the degree of IRI, the higher rate of the cell death, and the higher of the ALT value. **Conclusions** The serum ALT level can directly reflect the severity of IRI. The more severe the degree of IRI, the

收稿日期:2007-11-26; 修订日期:2008-02-28。

作者简介:元文勇,男,中南大学湘雅三医院 器官移植医学研究院主治医师,主要从事肝脏移植方面的研究。

通讯作者:元文勇 E-mail:yuan_521@tom.com

higher was the ALT level, and the higher was the cell death rate.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(7): 650 - 653]

Key words: Liver/ blood supply; Ischemia Reperfusion Injury; Rats

CLC number: R 364.2

Document code: A

缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤在肝脏移植中占有重要地位, 但如何早期判断移植肝的 I/R 损伤的程度, 国内外尚缺乏统一的分级标准。我院在临床工作中, 根据肝脏移植术后移植肝功能改变的程度, 将移植肝脏所受到的 I/R 损伤分为 5 级, 即 0 ~ IV 级灌注性损伤^[1]。本研究参照上述标准, 根据丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 水平的变化, 将动物人为地分为 4 个不同损伤程度的实验组, 分析 ALT 水平与病理改变的关系, 并初步探讨确定肝脏 I/R 损伤分级标准的必要性。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 主要仪器 全自动生化分析仪 (HITA-CHI-7170 型, 日本), 光学显微镜 (OLYMPUS-CH20 型, 日本), 照相系统 (NIKON-ECLIPSE-E400, 日本), HPIAS-10009 增强型病理图文分析系统 (郑州太阳电子科技公司) 和 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统 (武汉同济千屏影像公司)。

1.1.2 实验动物 雄性 Wistar 大鼠, 购于湖南农业大学实验动物中心, 体重 250 ~ 300 g, 单纯随机分组, 术前 12 h 禁食, 术前 6 h 禁食水。

1.2 实 验 方 法

1.2.1 麻醉和手术方法 实验动物麻醉乙醚吸入麻醉后开腹, 腹腔内滴 10% 水合氯醛 1 mL 补充麻醉。剪断肝周各韧带及肝胃韧带, 分离左、中肝叶的胆管及动脉、门静脉, 用无损伤血管夹阻断左、中肝叶的动脉及门静脉血流 (不夹闭胆管), 建立大鼠肝脏局部缺血模型。于缺血 60, 90 min 后取出血管夹恢复血流行再灌注^[2]。

1.2.2 实验分组 实验动物随机分为缺血 0 (假手术, 未阻断血运), 缺血 60, 90 min/再灌注 0, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 48 h; 每组 6 只。参照我院肝脏移植术后肝脏 I/R 损伤程度的分级标准, 按实验大鼠血清 ALT 水平, 分为 4 个不同的 I/R 损伤程度组, 即 < 500 U/L 为轻度组 (I 级灌注性损伤); 500 ~ 1 000 U/L 为中度组 (II 级灌注性损伤); 1 001 ~ 2 000 U/L 为重度组 (III 级灌注性损伤);

> 2 000 U/L 为严重组 (IV 级灌注性损伤) (表 4)。

1.2.3 标本收集 于实验结束时各组动物经肝上下腔静脉抽血, 离心取血清, 并测肝功能。切开肝上下腔静脉放血处死动物, 经门静脉用冰 0.15 mol/L 磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 冲洗肝内血液后, 切取肝中叶, 用 4% 多聚甲醛经门静脉冲洗后放入 4% 多聚甲醛溶液中, 进一步处理。

1.2.4 病理组织学检查 切取肝脏组织放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 2 h, 再放入含有 1/1 000 二乙基焦磷酸胺 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 的蒸馏水中过夜。用梯度乙醇脱水后石蜡包埋, 常规切片, HE 染色, 制作病理标本, 在光学显微镜下观察、照相。

1.2.5 细胞死亡率检测 采用全自动图象分析系统, 在 400 倍视野下, 每张玻片 (上述标本) 随机选取 10 个无血管区视野, 测定检测区的苏木素染色阳性 (细胞核染色为主) 面积的平均面积百分数, 用以估计相对细胞死亡率。阳性区的平均面积百分数越低, 表示细胞相对死亡率越高^[1,3]。

1.3 统 计 学 处 理

所有数据用 SPSS 12.0.1 Windows 中文版软件处理, 行方差分析和 *t* 检验。数据用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 血 清 ALT 水 平

2.1.1 缺血 60 min 组 与假手术组比较, 缺血 60 min 组随着再灌注时间的推移, 大鼠血清 ALT 水平逐渐升高, 再灌注 6 h 达到高峰, 12 h 后逐渐下降, 48 h 下降到正常水平 (表 1)。

2.1.2 缺血 90 min 组 再灌注 2, 4, 6, 12 h 组血清 ALT 水平均明显高于假手术组 ($P < 0.05$), 但再灌注 2, 4, 6, 12 h 组间差异无统计学意义 (表 2)。实验过程中缺血 90 min 组动物死亡率为 52.9% (27/51), 且是在再灌注 2 ~ 12 h 内死亡, 此时 ALT 水平升高非常明显, 并大于 500 U/L 的例数在本组实验中占有的比例为 58.3%, 大于 1 000 U/L 的比例为 33.3%, 故无法观察再灌注 24, 48 h 组 (表 3)。

表1 假手术组和缺血 60 min 后各再灌注组血清 ALT(U/L) 水平的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT(U/L)
假手术组	6	64.17 ± 18.87
缺血 60 min 组		
再灌注 0 h	6	438.83 ± 309.96
再灌注 1 h	6	498.33 ± 497.74 ¹⁾
再灌注 2 h	6	299.67 ± 328.74
再灌注 4 h	6	442.00 ± 130.37
再灌注 6 h	6	939.17 ± 652.21 ^{1),2)}
再灌注 12 h	6	549.67 ± 491.55 ¹⁾
再灌注 24 h	6	284.50 ± 134.09
再灌注 48 h	6	77.00 ± 21.58

注:1)与假手术组比较 $P < 0.05$;2)与再灌注 0 h 比较 $P < 0.05$

表2 缺血 90 min 后再灌注 2,4,6,12 h 组血清 ALT 水平 (U/L) 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT(U/L)
假手术组	6	64.17 ± 18.87
缺血 90min 组		
再灌注 2 h	6	1025.67 ± 1020.44 ¹⁾
再灌注 4h	6	477.17 ± 209.07 ¹⁾
再灌注 6h	6	1238.67 ± 946.35 ¹⁾
再灌注 12h	6	1238.33 ± 863.55 ¹⁾

注:1)各再灌注组与假手术组比较 $P < 0.05$

表3 缺血 90 min/再灌注后各样本 ALT 水平所占的比例 (%) 情况

ALT(U/L)	n	百分率(%)
<500	10	41.67
500 ~	6	25.00
1000 ~	4	16.67
2000 ~	4	16.67
合计	24	100.00

注: >500 U/L 的例数所占比例为 58.3%, >1 000 U/L 的比例为 33.3%

2.2 病理组织学观察结果

光学显微镜下观察:缺血 60 min 组再灌注 1 h 为止,未见明显的组织学破坏。随着再灌注时间的延长能见到肝窦充血、肝细胞肿胀、汇管区炎症细胞浸润、还能见到灶状坏死和点片状坏死灶,以上改变在再灌注 12 h 最为明显。在再灌注 48 h 上述改变很少见。

缺血 90 min 组再灌注 2 h 见到肝窦充血、肝细胞肿胀,小血管内形成血栓。在再灌注 4,6,12 h 中见到大量灶状坏死和大片状坏死灶。

2.3 按 ALT 水平重新分组

结果表明缺血 90 min 组的肝损伤程度明显重于缺血 60 min 组 ($Z = 3.003, P = 0.003$) (表 4),且损伤程度越重,其苏木素染色阳性面积所占的百分数越低,即死亡细胞所占的比例越高(表 5)。

表4 两组重新分组后的分布情况

组别	n	I/R 损伤程度(%)			
		轻度	中度	重度	严重
缺血 60min	48	36(75.0)	7(14.6)	5(10.4)	0(0.0)
缺血 90min	24	10(41.7)	6(25.0)	4(16.7)	4(16.7)

表5 各组 HE 染色(细胞核)阳性面积的平均百分数($\bar{x} \pm s$)

组别	缺血 60 min		缺血 90 min	
	n	阳性面积百分数	n	阳性面积百分数
假手术	6	31.3000 ± 5.01391	6	31.3000 ± 5.01391
轻度	30	30.1470 ± 5.23758	10	28.6190 ± 4.69910
中度	7	28.7600 ± 7.60459	6	27.4500 ± 4.18348
重度	5	23.8920 ± 4.42509 ¹⁾	4	25.1975 ± 3.84010 ¹⁾
严重	0	-	4	23.1100 ± 2.35212 ¹⁾

注:1)与假手术组比较 $P < 0.05$

3 讨论

目前认为 I/R 损伤在肝移植中占有重要地位,而且是影响移植肝功能改变的主要因素之一。如何选择能较准确反映移植肝功能的简便的指标,选择快速评价移植肝 I/R 损伤程度的评分方法是一个亟待统一解决的问题^[1]。

目前认为评判急性肝损伤程度,血清转氨酶水平是最好的指标,因为它是肝细胞破坏后才能在血清中表现高水平,且受到其他因素的干扰较小^[4]。由于移植肝 I/R 损伤也属于急性损伤,故血清转氨酶水平才有可能直接反映移植肝细胞受 I/R 损伤的真正程度^[5]。但转氨酶水平能否准确反映肝损伤程度和及其标准如何?这是当前面临的主要问题。

本研究虽也发现各再灌注时点 ALT 水平的改变与文献报道相似,其均值的高峰在再灌注后 6 h 出现^[6-8],但也有很多样本 ALT 水平高、在高峰期

外出现,而且与病理观察相吻合。也有 ALT 水平低且在高峰期内出现,而病理改变轻微者。说明肝 I/R 损伤虽然在 24 h 后趋于恢复,但其恢复时间的长短与损伤程度有关。研究表明,随着热缺血时间的延长,再灌注性损伤也加重。缺血期间可造成严重的细胞损伤,包括蛋白变性;而在再灌注期间增加的氧自由基又加重这一破坏过程^[9]。本实验中缺血 90 min 组肝损伤较缺血 60 min 组重的结果也说明这一点,而且高峰期内的损伤程度也加重。细胞坏死后形态学改变主要在细胞核,包括核固缩、核碎裂、核溶解等^[10]。因此病理切片中细胞核所占的面积缩小,表示细胞坏死的相对程度。本研究观察 ALT 的改变程度与细胞核所占的面积比率的关系,表明 ALT 水平与病理改变相吻合。即虽然尚未利用病理损伤程度的更多参数作进一步分析,但说明大鼠肝脏热 I/R 损伤模型动物血清 ALT 水平升高的严重程度,基本与病理改变吻合。总之,再灌注损伤的轻重是直接影响损伤恢复速度和预后的主要因素,其结果也不同^[11]。血清 ALT 水平直接反映损伤程度,可作为最简便的判断 I/R 损伤标准的指标之一。如结合病理结果进行分析所反映的 I/R 损伤情况将会更为理想。

本研究提示,肝功能血清转氨酶水平可直接反映肝脏 I/R 损伤程度;损伤程度越重,转氨酶水平越高、细胞死亡率也越高。然而,还需要与更多的病理参数和临床指标相结合作为依据。

参考文献:

- [1] 叶启发,牛英,明英姿,等. 移植肝缺血-再灌注损伤程度的评估及其与肝移植患者预后的关系[J]. 中华器官移植杂志,2006,27(11):668-671.
- [2] Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, *et al.* Mechanism and prevention of ischemia-reperfusion-induced liver injury in rats[J]. *J Surg Res*, 1991, 51(3):240-244.
- [3] 史卫海,李文美. 二氮嗪预处理抑制大鼠肝缺血再灌注所致细胞凋亡的延迟保护作用[J]. 中国普通外科杂志,2007,16(3):248-252.
- [4] Abdo EE, Cunha JE, Deluca P, *et al.* Protective effect of N2-mercaptopyronylglycine on rats and dogs liver during ischemia/reperfusion process[J]. *Arq Gastroenterol*, 2003, 40(3):177-180.
- [5] Kohli M, Selzner M, Madden JF, *et al.* Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver[J]. *Transplantation*, 1999, 67(8):1099-1105.
- [6] 包国强,吴金生,马庆久,等. 肝脏缺血再灌注损伤时大鼠血清谷胱甘肽及其相关酶活性的变化[J]. 第三军医大学学报,2001,23(6):695-697.
- [7] 夏宗江,叶启发,明英姿,等. 银杏叶提取物预处理对大鼠肝移植细胞凋亡及 Caspase-3 mRNA 和 Fas mRNA 表达的影响[J]. 中国现代医学杂志,2006,11(12):2589-2593.
- [8] 李远明,叶启发,张毅,等. 三七总皂甙对大鼠移植肝缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志,2006,15(7):508-511.
- [9] 刘胜,莫国贤,毛平传,等. 肝脏缺血-再灌注后热休克蛋白 70 mRNA 的表达[J]. 海军医学杂志,1999,20(20):127-128.
- [10] 张岚,杨侠,杨宪法,等. 缺血再灌注对肝癌组织及正常肝组织的损伤[J]. 中国普通外科杂志,2007,16(8):783-785.
- [11] 包维民,郭永章,李立,等. 冷/热缺血再灌注损伤对大鼠肝脏细胞能量状态、凋亡和胀亡的影响[J]. 中华实验外科杂志,2005,22(3):302-304.

本刊 2008 年下半年各期重点内容安排

本刊 2008 年下半年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

第 7 期	肝脏外科及肝移植	第 10 期	胃肠道外科及大肠肿瘤
第 8 期	胆道外科及胆道肿瘤	第 11 期	甲状腺、乳腺外科
第 9 期	胰腺外科及胰腺肿瘤	第 12 期	微创外科及其他