

门静脉动脉化对肝硬化犬肝切除后肝再生的作用

王鹏, 李鹏, 芮理, 李厚祥, 钱海鑫

王鹏, 李鹏, 芮理, 李厚祥, 南通大学附属医院普外科 江苏省南通市 226000

钱海鑫, 苏州大学附一院肝胆外科 江苏省苏州市 215006

南通市社会发展科技计划基金资助项目, No. S30003

作者贡献分布: 王鹏、李鹏及芮理对此文所作贡献均等; 此课题由李厚祥、王鹏及李鹏设计; 研究过程及论文撰写主要由王鹏、李鹏及芮理完成; 钱海鑫对此研究及论文写作进行指导。

通讯作者: 王鹏, 博士生, 主治医师, 226000, 江苏省南通市, 南通大学附属医院普外科. wyc2578@sina.com

电话: 0513-85837517

收稿日期: 2009-06-19 修回日期: 2009-08-01

接受日期: 2009-08-03 在线出版日期: 2009-08-28

Effects of portal vein arterialization on liver regeneration in hepatocirrhosis after partial hepatectomy in dogs

Peng Wang, Peng Li, Li Rui, Hou-Xiang Li, Hai-Xin Qian

Peng Wang, Peng Li, Li Rui, Hou-Xiang Li, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu Province, China

Hai-Xin Qian, Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006 Jiangsu Province, China

Supported by: the Social Development and Science Technique Program Foundation of Nantong, No. S30003

Correspondence to: Peng Wang, Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226000, Jiangsu Province, China. wyc2578@sina.com

Received: 2009-06-19 Revised: 2009-08-01

Accepted: 2009-08-03 Published online: 2009-08-28

Abstract

AIM: To study the effects of portal vein arterialization (PVA) on the liver regeneration in hepatocirrhosis after partial hepatectomy in dogs in order to provide a basis for its clinical use.

METHODS: The liver cirrhosis model of dogs was established. The dogs were divided into three groups randomly: group A (PVA group), partial hepatectomy plus PVA; group B (control group), partial hepatectomy; and group C, sham-operated group. All dogs were killed four weeks after operation. During the experiment, liver regeneration rate, expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in liver tissue and arterial ketone body

ratio(AKBR) were observed.

RESULTS: Liver regeneration rate was significantly higher in group A than in group B ($86.6\% \pm 2.9\%$ vs $73.7\% \pm 6.9\%$, $P < 0.01$); the AKBR of groups A and B was significantly lower than group C (both $P < 0.01$), but 4 wks after operation, the AKBR of group A (1.32 ± 0.14) became close to group C (1.33 ± 0.11), without significant difference ($P > 0.05$); the expression of PCNA in liver tissues of group A was significantly faster than group B.

CONCLUSION: PVA has significantly positive effect on liver regeneration after partial hepatectomy in dogs with hepatocirrhosis.

Key Words: Portal vein arterialization; Hepatocirrhosis; Liver regeneration

Wang P, Li P, Rui L, Li HX, Qian HX. Effects of portal vein arterialization on liver regeneration in hepatocirrhosis after partial hepatectomy in dogs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(24): 2499-2502

摘要

目的: 探讨门静脉动脉化(portal vein arterialization, PVA)对肝硬化犬肝切除后肝再生的作用, 为扩大PVA临床应用提供依据。

方法: 将肝硬化模型犬随机分为3组, A组(手术组): 行肝左外叶切除加门静脉动脉化手术; B组(对照组): 仅行肝左外叶切除手术; C组(假手术组); 均于术后4 wk处死, 实验过程中检测肝脏再生率(SE)与动脉血酮体比(AKBR), 免疫组织化学法检测增殖细胞核抗原(PCNA)。

结果: 肝脏再生率SE值A组显著高于B组, 两者有显著性差异($86.6\% \pm 2.9\%$ vs $73.7\% \pm 6.9\%$, $P < 0.01$); 术后A、B两组AKBR值均较C组降低(均 $P < 0.01$), 术后4 wk A组该值(1.32 ± 0.14)已接近C组(1.33 ± 0.11), 差异无统计学意义 $P > 0.05$; 术后PCNA表达A组显著快于B组。

结论: 门静脉动脉化对肝硬化犬部分肝切除后肝脏再生有明显的促进作用。

■背景资料

门静脉动脉化目前主要应用在肝移植、肝门部肿瘤清扫、肝部分切除术、门脉高压分流术4个方面。在肝部分切除术中90%患者合并肝硬化, 术后易发生肝功能衰竭, PVA可以增强肝细胞的再生能力, 促进肝功能的改善。

■同行评议者

潘兴华, 副主任医师, 中国人民解放军成都军区昆明总医院病理实验科

■研发前沿

PVA对于肝硬化患者本身的门脉高压症状(食管胃底静脉曲张、肠管淤血等)的影响,应该行限制性手术。吻合口径的大小应该控制在什么范围,值得探讨。

关键词: 门静脉动脉化; 肝硬化; 肝再生

王鹏, 李鹏, 芮理, 李厚祥, 钱海鑫. 门静脉动脉化对肝硬化犬肝切除后肝再生的作用. 世界华人消化杂志 2009; 17(24): 2499-2502

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/2499.asp>

0 引言

以往肝再生的研究多针对正常肝脏, 对病理状况下的肝脏再生研究不多. 而临床上, 原发性肝癌及肝内胆管结石等很多疾病都常合并有肝硬化, 比率高达50%-85%^[1], 合并肝硬化的患者在行肝叶切除后, 发生肝功能不全甚至肝衰竭死亡的较多^[2]. 本实验选用胃十二指肠动脉与门静脉吻合的术式, 研究门静脉动脉化(portal vein arterialization, PVA)对肝硬化肝部分切除后肝再生的影响, 以在短时间内促进肝功能的恢复, 减少肝衰竭的发生, 为临床提供一个可行的辅助外科治疗手段.

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年杂种犬24只, 雌雄各12只, 体质量9.5-11.5 kg, 由南通大学动物实验中心提供. 增殖细胞核抗原试剂盒由福建迈新生物技术公司提供.

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: 实验犬按参考文献[3]制作肝硬化模型, 所有犬每周腹腔内2次注射40% CCl₄与60%花生油混合剂, 剂量0.12 mL/kg, 共8 wk; 犬饲料含10%猪油, 饮用水含10%酒精. 2 wk后所有犬均出现精神萎靡, 3-4 wk后均出现体质量减轻, 消瘦; 体毛减少, 毛色晦暗等表现. 8 wk后有部分犬可见明显腹壁静脉曲张, 模型制作前后血生化检查及肝脏病理显示所有犬均形成肝硬化. 制作过程中有2只犬死亡, 雌雄各1只. 将剩余22只犬随机分为3组, A组(手术组)9只: 行肝脏部分切除加PVA手术; B组(对照组)8只: 仅行肝脏部分切除手术; C组(假手术组)5只: 开腹观察1 h后缝合. 手术中A、B组各有死亡1只, 术后1 wk A组、术后B组各有死亡1只, 术后4 wk处死犬18只.

1.2.2 PVA方式: 选用胃十二指肠动脉与门静脉行端侧吻合术. 本实验均行单纯的肝左外侧叶切除.

1.2.3 实验指标: (1)评价肝脏再生能力的肝脏再生率SE值^[4]=(术后犬处死时肝质量/体质量)/(术前肝质量/体质量). (2)免疫组织化学检测增殖

细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA): 所有标本均经100 g/L甲醛固定, 常规石蜡包埋, 4 μm连续切片, 免疫组织化学染色. PCNA免疫组织化学染色采用SP法, 试剂由福建迈新生物技术公司提供. 染色时均设置空白对照. 免疫组织化学染色后均以苏木素复染. (3)动脉血酮体比(arterial ketone body ratio, AKBR): 分别在造模前、术前、术后2 d、术后4 wk采取犬股动脉血, 按吴红斌 *et al*^[5]方法检测乙酰乙酸(ACAC)及β-羟丁酸(β-OHB), 按公式: AKBR = ACAC/β-OHB计算AKBR的比值.

统计学处理 所有数据以mean±SD表示, 肝脏再生率、AKBR结果采用方差分析, 组间两两比较使用*t*检验, PCNA结果采用成组*t*检验, 所有统计学处理均采用Stata 7.0软件完成.

2 结果

2.1 AKBR值 实验结果显示造模后3组AKBR值均明显降低, 提示肝硬化后肝脏能量储备下降, 术后A、B两组AKBR值均较C组降低($P<0.01$), 术后4 wk A组该值已接近C组($P>0.05$), B组虽有恢复但仍低于C组, 提示PVA对肝脏能量代谢有良好的促进作用(表1).

2.2 肝脏再生指标 A组肝再生率高于B组($P<0.01$), 提示肝再生能力加强(表2).

2.3 PCNA 实验结果显示术后第1天A、B组PCNA的表达量均显著增加, 至术后3 d达高峰, 以后逐渐下降, 术后14 d 2组比较已无统计学差异, 术后4 wk已经接近术前水平; 但A组PCNA的表达量在术后1、3、7 d明显大于B组($P<0.01$), 提示PVA对肝再生有促进作用(表3).

3 讨论

PVA可作为肝部分切除术的辅助手段, Shimizu *et al*^[4]在对小鼠进行广泛肝叶切除加PVA的研究中发现, 该术式能使血氧分压和血氧饱和度显著增加, 肝组织中的ATP水平显著增高, 促进肝脏再生, 提高小鼠生存率. 中国人民解放军总医院黄志强教授^[6]领导开展的研究也取得了相类似的结果. 表明PVA对于肝脏术后肝衰具有积极的预防作用, 但既往的实验研究对象多采用正常肝脏, 鲜有对病理肝脏的实验研究. 而临床上肝脏外科的手术大多针对的是病损肝脏, 如部分肝切除术的主要适应证是肝脏肿瘤, 其中以原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占大多数, 在病因与发病学上, HCC与病毒性肝炎、肝硬化有着密切的关系. 其典型过

■相关报道

Lange *et al*认为PVA增加了肝脏的血流, 可提高入肝血液的含氧量, 改善肝功能, 促进肝脏的再生能力. 陈永亮 *et al*认为动脉血流控制在一定范围不会对肝脏结构及肝功能的恢复产生不良的影响.

表 1 3组不同时期AKBR值

	造模前	术前	术后2 d	术后4 wk
A组	2.03 ± 0.11	1.34 ± 0.14	1.04 ± 0.11 ^b	1.32 ± 0.14
B组	2.02 ± 0.12	1.36 ± 0.13	0.60 ± 0.10 ^b	0.77 ± 0.09 ^b
C组	2.04 ± 0.15	1.30 ± 0.13	1.32 ± 0.11	1.33 ± 0.11

^b*P* < 0.01 vs C组.

表 2 3组不同时期肝质量(g)、体质量(kg)和肝再生率(%)

分组	<i>n</i>	术前体质量	切除肝质量	切肝/全肝	28 d体质量	28 d肝质量	肝再生率
A组	7	9.3 ± 0.9	122.5 ± 7.9	44.2 ± 0.9	9.1 ± 0.7	232.6 ± 17.7	86.6 ± 2.9
B组	6	9.7 ± 1.1	126.5 ± 11.3	44.1 ± 1.1	9.6 ± 0.9	204.0 ± 37.1	73.7 ± 6.9 ^d
C组	5	9.3 ± 0.5			9.3 ± 0.4	272.6 ± 23.0 ^b	

^b*P* < 0.01 vs A、B组; ^d*P* < 0.01 vs A组.

表 3 A、B组PCNA的表达

	术前	术后1 d	术后3 d	术后7 d	术后14 d	术后28 d
A组(<i>n</i> = 7)	7.75 ± 2.55	27.38 ± 5.78 ^b	67.88 ± 7.99 ^b	34.11 ± 3.93 ^b	16.14 ± 3.89 ^b	8.26 ± 2.21
B组(<i>n</i> = 6)	7.57 ± 2.82	18.86 ± 2.91 ^{bd}	30.14 ± 3.24 ^{bd}	29.43 ± 2.99 ^{bd}	17.08 ± 4.51 ^b	9.03 ± 2.11

^b*P* < 0.01 vs 术前; ^d*P* < 0.01 vs A组.

程为: 病毒性肝炎-肝硬化-肝癌. 在我国及远东地区, 90%左右HCC患者合并有不同程度的肝硬化^[7]. 这就意味着, 针对HCC所进行的部分肝切除, 大多数是在有肝硬化或慢性肝病基础上进行的, 而肝硬化与肝切除术后肝功能衰竭之间有密切的联系.

术后肝衰是临床肝切除术后一致命并发症, 也是引起术后早期死亡的主要原因之一. 目前对术后肝衰的治疗还颇为困难. 临床上, 肝切除术后肝衰的发生率报道不尽相同, 为2%-17%^[8]. 在原有肝硬化基础疾病者, 对部分肝切除的耐受力大大下降, 术后肝衰的发生率明显增加. 所以, 从一定意义上讲, 肝硬化是降低肝癌手术切除率重要因素之一^[9-10].

因此我们设计制作了犬肝硬化模型, 利用PVA能够增加肝血流量, 增强肝细胞的再生能力, 改善肝功能的特点^[11], 研究其对病变肝脏再生的影响, 为进一步扩大PVA在肝脏外科中的应用提供依据. 实验中我们发现PVA能提高肝硬化犬部分肝切除后的AKBR值, 而AKBR值可以反映肝脏线粒体氧化还原潜在能力, 即缺氧可明显且迅速地损害肝线粒体功能, 导致AKBR低

下, 结果使ATP产生能力下降, 从而发生细胞能量危机, 使肝细胞坏死进而发生急性肝衰^[12]. 这就提示PVA使线粒体功能得到改善, 对肝脏能量代谢有良好的促进作用. PVA亦能改善肝再生率. 通过测量肝脏湿质量而计算出的肝再生率是评价肝脏再生能力的最直观的指标. 实验发现A组再生率明显高于B组. 另外, PVA可增加PCNA的表达. PCNA是真核细胞DNA合成所必需的一种36 kDa核蛋白, 存在并合成于核内, 静止细胞中PCNA含量很少, 增殖细胞和转化细胞中其含量发生明显变化, 大部分G₀-G₁期细胞无明显的PCNA表达, G₁晚期其表达度增加, S期达到高峰, G₂-M期下降, 其含量和表达强弱的变化与DNA合成及DNA复制的活跃程度一致^[13]. 因此, PCNA是评价肝脏再生的一个简单可靠的指标. 本研究结果表明, 由于CCl₄所致的损伤, 术前肝硬化犬肝细胞呈增殖修复现象. 手术后2组均表现出再生增殖, 从实验结果可以看出A组的PCNA表达量在术后1、3、7 d明显高于B组 (*P* < 0.01), 提示PVA对肝硬化肝再生有促进作用.

肝切除术后是否发生肝功能衰竭取决于残余肝脏的再生能力, 而这又依赖于能量的供给,

■创新盘点

本研究制作了犬肝硬化模型, 并选用胃十二指肠动脉与门静脉做端侧吻合, 改变了以往PVA实验中多选用肝动脉的模式, 在肝脏原有的血供基础上更增加了他的营养供应.

■同行评价

本研究观察了门静脉动脉化对肝硬化犬肝切除后肝再生的作用,结果有一定参考价值。

但在肝切除、肝动脉阻断等应激状态下,线粒体的呼吸和ATP的合成就要受到肝细胞内氧浓度的限制。这时氧对能量代谢就十分重要。在单纯肝动脉阻断的报道中,人们认为肝脏功能的维持与充足的氧供是密不可分的^[4]。

以往研究表明,肝硬化肝脏的再生与正常肝再生对比明显减慢,硬化肝脏的有效再生肝细胞数低于正常肝脏,导致余肝组织增殖缓慢,是硬化肝脏储备功能下降的主要原因。本实验在保持肝脏原有血供不变的基础上,接入动脉血,使门静脉血氧分压升高,给应激状态下的肝细胞提供足够的氧供,来满足线粒体呼吸链电子传递所需,促进肝脏的再生速度,使硬化肝脏再生加强,有效肝功能恢复加快。因此,我们认为PVA可作为肝硬化部分肝切除术后防止肝衰的辅助手段。

4 参考文献

- 1 Moser MA, Kneteman NM, Minuk GY. Research towards safer resection of the cirrhotic liver. *HBP Surg* 2001; 11: 285-297
- 2 吴孟超, 吴东. 原发性肝癌综合治疗的现状与展望. 癌症进展 2005; 3: 410-412
- 3 牛廷献, 史智勇. 肝纤维化动物模型的研究进展. 实验动物科学与管理 1997; 14: 27
- 4 Shimizu Y, Miyazaki M, Shimizu H, Ito H, Nakagawa K, Ambiru S, Yoshidome H, Nakajima N. Beneficial effects of arterialization of the portal vein on extended hepatectomy. *Br J Surg* 2000; 87: 784-789
- 5 吴红斌, 严律南. 动脉血酮体比率的测定方法. 中国普外基础与临床杂志 1994; 1: 117-118
- 6 陈永亮, 黄志强, 李文岗, 张焯, 王燕生. 门静脉动脉化对大鼠肝脏再生的影响. 消化外科 2005; 4: 421-424
- 7 沈世强, 陈祖兵. 原发性肝癌的治疗决策. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3477-3479
- 8 江正辉, 黄志强. 肝癌. 第1版. 重庆: 重庆出版社, 1996: 261-288
- 9 Llovet JM, Schwartz M, Mazzaferro V. Resection and liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis* 2005; 25: 181-200
- 10 吴阶平, 裘法祖. 黄家驷外科学. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 1223-1234
- 11 Lange R, Erhard J, Sander A, Kemnitz J, Garkuwa DA, Eigler FW. [Animal experiment studies of arterialization of the portal vein in liver transplantation using the Göttingen minipig] *Langenbecks Arch Chir* 1997; 382: 277-283
- 12 严律南, 陈晓理. 肝癌肝切除术围手术期处理的临床研究. 中国普外基础与临床杂志 2005; 12: 162-166
- 13 Wolf HK, Michalopoulos GK. Hepatocyte regeneration in acute fulminant and nonfulminant hepatitis: a study of proliferating cell nuclear antigen expression. *Hepatology* 1992; 15: 707-713

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

● 消息 ●

《世界华人消化杂志》参考文献要求

本刊讯 本刊采用“顺序编码制”的著录方法,即以文中出现顺序用阿拉伯数字编号排序。提倡对国内同行近年已发表的相关研究论文给予充分的反映,并在文内引用处右上角加方括号注明角码。文中如列作者姓名,则需在“Pang *et al*”的右上角注角码号;若正文中仅引用某文献中的论述,则在该论述的句末右上角注角码号。如马连生^[1]报告……,潘伯荣 *et al*^[2-5]认为……;PCR方法敏感性高^[6-7]。文献序号作正文叙述时,用与正文同号的数字并排,如本实验方法见文献[8]。所引参考文献必须以近2-3年SCIE, PubMed,《中国科技论文统计源期刊》和《中文核心期刊要目总览》收录的学术类期刊为准,通常应只引用与其观点或数据密切相关的国内外期刊中的最新文献,包括世界华人消化杂志(<http://www.wjgnet.com/1009-3079/index.jsp>)和 *World Journal of Gastroenterology*(<http://www.wjgnet.com/1007-9327/index.jsp>)。期刊: 序号, 作者(列出全体作者)。文题, 刊名, 年, 卷, 起页-止页, PMID编号; 书籍: 序号, 作者(列出全部), 书名, 卷次, 版次, 出版地, 出版社, 年, 起页-止页。(科学编辑: 李军亮 2009-08-28)