

# 大鼠肝移植重建肝动脉对胆管超微结构和并发症的影响

邱明键 曾永毅 林科灿 张国寿 刘景丰

**【摘要】 目的** 观察大鼠原位肝移植重建肝动脉对肝内胆管上皮细胞缺血再灌注损伤后超微结构及术后胆道并发症的影响。**方法** 228 只 SD 大鼠分为假手术组(8 只)、肝移植重建肝动脉组(55 对)和未重建肝动脉组(55 对)。重建肝动脉组和未重建肝动脉组分别于肝脏复流后 0.5、3、6、12、24、36、48 h 取材,用透射电镜观察肝内胆管上皮细胞的超微结构,通过计算机图像分析系统对线粒体形态计量分析;观察术后胆道并发症。**结果** 两组肝内胆管上皮细胞损伤均有加重,表现为线粒体肿胀、嵴模糊或消失、微绒毛减少等超微结构改变,至 24 h 达高峰,以后逐渐恢复。术后两组线粒体平均面积和周径随时间的延长逐渐增大,线粒体数密度随时间延长而减少。在 24 h,两组缺血再灌注损伤最显著,之后均开始缓解。在 24、36、48 h,两组线粒体平均面积、平均周径比较,差异均有统计学意义( $t = -3.566, -7.780, -4.730, -4.610, -2.599, -5.370, P < 0.05$ );在 36、48 h,两组线粒体平均数密度比较,差异有统计学意义( $t = -4.619, 4.000, P < 0.05$ )。重建肝动脉组的胆道并发症发生率低于未重建肝动脉组( $\chi^2 = 4.286, P < 0.05$ )。**结论** 大鼠肝移植重建肝动脉对肝内胆管上皮细胞缺血再灌注损伤后的超微结构具有保护作用,有利于术后恢复和减少胆道并发症的发生。

**【关键词】** 肝移植; 肝动脉重建; 胆道并发症; 大鼠; 超微结构

**【中图分类号】** R657.3

**【文献标识码】** A

**Effects of hepatic artery reconstruction in rat with orthotopic liver transplantation on ultrastructure of intrahepatic biliary epithelial cells and biliary complications** QIU Ming-lian, ZENG Yong-yi, LIN Ke-can, ZHANG Guo-shou, LIU Jing-feng. Liver Disease Center, First Affiliated Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350005, China

Corresponding author: LIU Jing-feng, E-mail: drjingfeng@yahoo.com.cn

**【Abstract】 Objective** To observe the effects of hepatic artery reconstruction in rat with orthotopic liver transplantation (OLT) on ultrastructure changes of intrahepatic biliary epithelial cells after ischemia reperfusion injury and postoperative biliary complications. **Methods** Male SD rats were divided into sham operation group (SO), OLT with hepatic artery reconstruction group (HA) and OLT without hepatic artery reconstruction group (NA). The liver tissue samples were collected at 0.5, 3, 6, 12, 24, 36, 48 hours after ischemia reperfusion in both HA group and NA group. The ultrastructure of intrahepatic biliary epithelial cells was observed by transmission electron microscope, and the morphometric analysis by the computer image analysis system. The postoperative biliary complications were also observed. **Results** In HA group and NA group, the injury of intrahepatic biliary epithelial cells aggravated gradually along with the reperfusion. The ultrastructure changes, such as enlarged mitochondria, blurred or disappeared cristae and decreased number of microvilli, were most significant at 24 hours and then recovered gradually. The mitochondrial average area and average perimeter were increased and the mitochondrial numerical density was decreased gradually along with the reperfusion. At 24, 36, 48 hours, the mitochondrial average area and average perimeter in NA group were significantly greater than those in HA group ( $t = -3.566, -7.780, -4.730, -4.610, -2.599, -5.730, P < 0.05$ ). The average numerical density of mitochondria in NA group was significantly less than that in HA group at 36, 48 hours ( $t = -4.619, 4.000, P < 0.05$ ). The incidence rate of biliary complications in HA group is significantly lower than that in NA group ( $\chi^2 = 4.286, P < 0.05$ ). **Conclusions** Hepatic artery reconstruction in rat with OLT has an protective effect on the ultrastructure of intrahepatic biliary epithelial cells after ischemia reperfusion. It is beneficial to the recovery of intrahepatic bile duct epithelial cells and can reduce the incidence rate of biliary complications.

**【Key words】** Liver transplantation; Hepatic artery reconstruction; Biliary complication; Rat; Ultrastructure

作者单位: 350005 福州, 福建医科大学附属第一医院肝病中心

通讯作者: 刘景丰, E-mail: drjingfeng@yahoo.com.cn

大鼠肝移植是肝移植基础研究的常用模型。由于大鼠肝动脉血流量较少,未重建肝动脉并不影响大鼠肝移植术后生存率。因此,在该模型中是否重建肝动脉一直存在争论。本实验通过对大鼠肝内胆管上皮细胞缺血再灌注损伤的变化进行电镜超微结构定量分析,探讨大鼠肝移植重建肝动脉对术后肝内胆管上皮细胞缺血再灌注损伤及胆道并发症的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验分组及肝移植模型的建立

雄性 SD 大鼠 228 只,体重 240 ~ 260 g,由福建医科大学实验动物中心提供。分为假手术组(8 只)、肝移植重建肝动脉组(55 对)和未重建肝动脉组(55 对)。其中重建肝动脉组和未重建肝动脉组又根据肝脏再灌注后 0.5、3、6、12、24、36、48 h 分为 7 小组,每小组 5 只。两组各留 20 只观察术后胆道并发症。

未重建肝动脉组按改良“二袖套”法建立大鼠肝移植模型<sup>[1-2]</sup>。重建肝动脉组则在未重建肝动脉的基础上,保留供肝的肝固有动脉、肝总动脉及腹腔干,分别结扎、远端离断脾动脉和胃左动脉;修肝时于腹腔干置一自制内支架并结扎固定;植肝时结扎受体左肾动脉远端,近端动脉夹暂时钳夹阻断血流,将受体腹腔干近腹主动脉处剪一楔形小口,置入位于供肝腹腔干上的内支架,结扎固定,移去动脉夹,开放血流,即完成重建肝动脉的肝移植模型。未重建肝动脉组供体手术时间为 $(19.6 \pm 2.4)$  min,无肝期时间为 $(17.5 \pm 2.5)$  min;重建肝动脉组供体手术时间为 $(21.3 \pm 2.9)$  min,无肝期时间为 $(17.9 \pm 2.3)$  min,肝动脉重建时间为 $(4.2 \pm 1.7)$  min。两组热缺血和冷缺血时间分别控制在 5 min 和 60 min。假手术组只开腹游离肝周韧带后取标本。

### 1.2 术后标本的处理和胆道并发症的观察

两组分别于术后 0.5、3、6、12、24、36、48 h 取材。重建肝动脉组先观察肝动脉重建处及供肝肝固有动脉的搏动及充血情况,搏动、充血均良好者,予以取材,否则剔除。标本用 3% 戊二醛-1.5% 多聚甲醛前固定,1% 锇酸-1.5% 亚铁氰化钾后固定,酒精-丙酮脱水,环氧树脂 618 包埋剂包埋;超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色,在飞利浦 208 型透射电镜下观察肝内胆管上皮细胞并采集图像,每张切片选出 5 个肝内胆管上皮细胞,描出其内所有线粒体,计算

肝内胆管上皮细胞线粒体平均面积、平均周径和数密度。术后 30 d 解剖未死亡的大鼠,观察是否存在胆漏、肝外胆管梗阻、肝内小胆管阻塞(肝叶片状黄染)等并发症及重建肝动脉组动脉的通畅情况。

### 1.3 统计学分析

胆管上皮细胞线粒体平均面积、平均周径和数密度的数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,不同组间均数的比较采用方差分析。胆道并发症发生率采用  $\chi^2$  检验。应用 SPSS 13.0 进行统计分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝内胆管上皮细胞超微结构变化

假手术组胆管上皮细胞呈柱状,细胞核位于基底部,膜层结构完整,线粒体不肿胀,嵴清晰,内质网无扩张,核糖体排列整齐,微绒毛丰富。重建肝动脉组和未重建肝动脉组在术后均见线粒体肿胀,嵴模糊,微绒毛减少,并随时间延长而加重。在 24 h 损伤最重,线粒体显著肿胀,嵴消失,基质空泡化,内质网扩张,微绒毛消失。48 h 两组均有恢复,但未重建肝动脉组恢复缓慢(图 1),重建肝动脉组恢复较明显(图 2)。

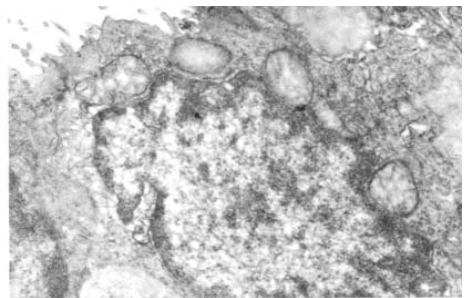


图 1 未重建肝动脉组 48 h 肝内胆管上皮细胞超微结构 ( $\times 14\ 000$ )

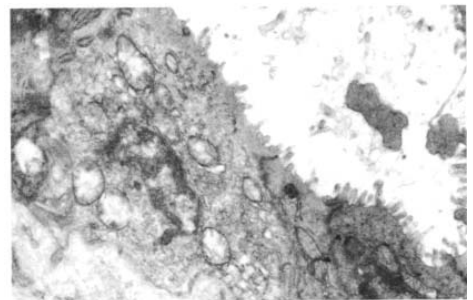


图 2 重建肝动脉组 48 h 肝内胆管上皮细胞超微结构 ( $\times 14\ 000$ )

## 2.2 肝内胆管上皮细胞线粒体形态计量分析

在重建肝动脉组和未重建肝动脉组中,线粒体平均面积及平均周径均随着术后时间的延长逐渐增大,而线粒体数密度则随着术后时间的延长逐渐减少。缺血再灌注损伤 0.5~3 h 数值变化急剧,以后趋于缓慢;在 24 h 损伤最显著,之后开始缓解。两组的线粒体平均面积在 24、36、48 h 比较,差异均有统计学意义( $t = -3.566, -7.780, -4.730, P < 0.05$ );两组的线粒体平均周径在 24、36、48 h 比较,差异均有统计学意义( $t = -4.610, -2.599, -5.370, P < 0.05$ );两组的线粒体平均数密度在 36、48 h 比较,差异均有统计学意义( $t = -4.619, 4.000, P < 0.05$ )。

## 2.3 术后胆道并发症的发生率

重建肝动脉组术后死亡 2 只,1 个月生存率为 90% (18/20);有 2 只血栓形成,通畅率为 89% (16/18);3 只出现肝叶小片状黄染(肝内小胆管阻塞所致),胆道并发症发生率为 15% (3/20)。未重建肝动脉组术后死亡 3 只,其中有 2 只分别死于胆漏和胆总管梗阻,1 个月生存率为 85% (17/20);7 只出现肝叶片状黄染甚至累及整个肝叶,胆道并发症发生率为 45% (9/20)。两组胆道并发症发生率比较,差异有统计学意义( $\chi^2 = 4.286, P < 0.05$ )。

## 3 讨论

### 3.1 胆道的动脉血供及其缺血再灌注损伤程度指标

胆道系统由肝动脉分支在胆管周围形成血管网供血。因此,建立肝动脉血液供应对于防止大鼠肝移植术后胆管缺血、减少胆道并发症的发生有着十分重要的意义。肝脏缺血再灌注损伤的病理过程是一个连续的过程,分两个阶段:早期阶段约在再灌注后的 0~2 h,晚期阶段约在再灌注后的 6~48 h,损伤程度与缺血时间有关<sup>[3]</sup>。本研究中数密度代表线粒体的分布密度;分析线粒体平均面积和平均周径可反映线粒体肿胀程度,可以说明线粒体受损的状况,能较客观地反映胆管上皮细胞缺血再灌注损伤的程度。

### 3.2 重建肝动脉对大鼠肝移植术后胆道的影响

本实验结果显示,大鼠肝移植供肝经历热缺血和冷缺血后,随着再灌注时间的延长,两组肝内胆管

上皮细胞的损伤均有加重,表现为线粒体肿胀进行性加重,嵴不明显,微绒毛逐渐减少甚至消失等超微结构改变。对线粒体形态学的定量分析发现,随着再灌注时间延长,两组线粒体平均面积、平均周径均逐渐增大,线粒体数密度均逐渐减少。这提示线粒体损伤逐渐加重,特别是在损伤早期胆管上皮细胞损伤在短时间内明显加剧,之后损伤相对缓慢。缺血再灌注损伤到 24 h 达到峰值,且未重建肝动脉组的损伤程度明显重于重建肝动脉组;之后,两组线粒体的损伤程度均有所改善,但未重建肝动脉组恢复明显慢于重建肝动脉组,到 48 h 时两组线粒体平均面积、平均周径及数密度差异均有统计学意义。这可能由于再灌注后未重建肝动脉组肝脏仅有门静脉单独血供,移植肝特别是肝内胆管持续处于热缺血状态,导致无肝动脉供血的胆管上皮细胞缺血再灌注损伤更为严重。未重建肝动脉组大鼠肝脏虽无肝动脉血供,但肝内胆管缺血再灌注损伤仍有所恢复。早期可能是由于门静脉血循环再通之后,小部分血液可通过门静脉与肝动脉之间的交通支逆行流入肝动脉的胆管周围血管网以提供血供,后期由于肝脏周围粘连形成异常动脉血供<sup>[4]</sup>。这虽然不影响大鼠肝移植术后生存率,但增加了术后胆道并发症的发生率<sup>[5]</sup>。

总之,大鼠肝移植重建肝动脉对于肝内胆管上皮细胞缺血再灌注后的超微结构具有保护作用,有利于术后胆管上皮细胞恢复,可以减少术后胆道并发症的发生。

## 参考文献

- [1] 张莹,别平,石承先,等.“二袖套法”制备大鼠原位肝移植模型的方法改进. 消化外科,2005,4(6):444-446.
- [2] 刘骅,曹晖,吴志勇.改良二袖套法大鼠原位肝移植 180 例. 消化外科,2006,5(1):52-56.
- [3] Teoh NC, Farrell GC. Hepatic ischemia reperfusion injury: pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection. J Gastroenterol Hepatol,2003,18(8):891-902.
- [4] Beaussier M, Wendum D, Fouassier L, et al. Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia. J Hepatol,2005,42(2):257-265.
- [5] 陈耿,张玉君,杨程,等.大鼠原位肝移植胆管外引流及胆汁采集方法的改进与评估. 消化外科,2006,5(2):129-132.

(收稿日期:2007-08-16)

(本文编辑:陈敏)