

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00796

阻塞性黄疸大鼠肝功能和病理形态学研究

刘志强¹, 吕浩², 杨立群^{2*}, 孙玉明², 李泉², 俞卫锋²

1. 同济大学附属第一妇婴保健院麻醉科, 上海 200040

2. 第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438

[摘要] 目的:探讨胆管阻塞对大鼠肝功能和病理形态学的影响。方法:60只健康雄性SD大鼠随机分为6组:胆总管结扎组(BDL, $n=50$)和假手术组($n=10$,仅游离胆总管不予结扎)。BDL组据结扎持续时间又分为BDL₃、BDL₇、BDL₁₄、BDL₂₈和BDL₄₂组(每组10只),分别于术后第3、7、14、28、42日测定血清总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、总胆汁酸(TBA)、谷丙转氨酶(ALT)等肝功能指标,并观察肝脏组织病理形态。假手术组于术后7d行上述检测。结果:与假手术组相比,BDL组大鼠肝功能指标明显改变,血清TBIL、DBIL、TBA值在阻塞早期(BDL₃或BDL₇组)为最高,后呈下降趋势,至实验末期(BDL₄₂组)时仍高于对照组;ALT等酶学指标也有类似变化。BDL组大鼠的主要病理形态学改变为肝内小胆管增生和肝纤维化。结论:大鼠肝功能阻塞早期即发生明显的损害,机体可产生一定的代偿以改善肝功能,但持续存在的胆管阻塞最终导致肝纤维化。大鼠阻塞性黄疸期内病理形态学的改变显示其肝功能测定值并不能反映其肝脏组织的实际损害程度。

[关键词] 阻塞性黄疸;肝功能试验;病理学

[中图分类号] R 657.43 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0796-04

Study on liver function and pathomorphology in rats with obstructive jaundice

LIU Zhi-qiang¹, LÜ Hao², YANG Li-qun^{2*}, SUN Yu-ming², LI Quan², YU Wei-feng²

1. Department of Anesthesiology, The First Maternal & Infant Hospital, Tongji University, Shanghai 200040

2. Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effect of obstructive jaundice on liver function and pathomorphology in rats. **Methods:** Sixty healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into bile duct ligation (BDL) group (the common bile ducts were ligated, $n=50$) and sham group (the common bile ducts were isolated but not ligated, $n=10$). According to the ligation periods, BDL group was further divided into BDL₃, BDL₇, BDL₁₄, BDL₂₈ and BDL₄₂ groups. Liver function indices, including the serum total bilirubin (TBIL), direct bilirubin (DBIL), total bile acid (TBA), and alanine aminotransferase (ALT), were measured; and the liver pathomorphology was observed 3, 7, 14, 28, and 42 days after BDL. The above examinations were performed in the sham rats 7 days after operation. **Results:** The liver function of rats had obvious changes compared with that of sham group. The serum levels of TBIL, DBIL, and TBA reached the peak in the early phases (BDL₃ or BDL₇) and decreased gradually thereafter, but were still higher than that of the sham control in the end phase (BDL₄₂). There was a similar change in the biochemical indices such as ALT. The main pathomorphology changes in BDL group were intrahepatic bile duct proliferation and hepatic fibrosis. **Conclusion:** There is obvious impairment in the early phase of obstructive jaundice; the liver function may be improved to a certain degree by a compensation mechanism; however, the persistence of obstructive jaundice finally leads to hepatic fibrosis. The liver function indicated by the pathomorphology changes can not reflect the actual impairment of liver tissue in obstructive jaundice rats.

[KEY WORDS] obstructive jaundice; liver function tests; pathology

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7): 796-799]

阻塞性黄疸是临床常见的肝胆外科病症,主要是指因胆管阻塞后胆汁淤滞所致的黄疸,是以肝胆

组织损害和全身各系统发生一系列病理和生理改变为主的症候群。近年来大量动物实验及临床研究对

[收稿日期] 2007-12-03 **[接受日期]** 2008-01-14

[基金项目] 国家自然科学基金(30600584), Supported by National Natural Science Foundation of China(30600584).

[作者简介] 刘志强, 硕士, 副主任医师。

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070841, E-mail: lqyang72721@hotmail.com

胆管阻塞时肝脏受损的机制、病理生理改变作了系统研究^[1-2], 但关于胆管阻塞后不同时期肝脏功能及病理形态学改变的详细报道较少。本实验采取结扎胆总管方法建立阻塞性黄疸大鼠模型, 观察其肝功能和病理形态学的改变进程, 了解胆管阻塞对肝脏的影响, 以期为临床阻塞性黄疸患者的诊断和治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物的选取和饲养 成年雄性 SD 大鼠 60 只, 清洁级, 体质量 250~300 g, 由第二军医大学实验动物中心提供, 交予第二军医大学东方肝胆外科医院动物房饲养。饲养条件为室温 22~25℃, 湿度 40%~60%, 自由进水和食物。术前均禁食 6 h。

1.2 阻塞性黄疸大鼠模型的分组和建立 实验组(胆管结扎组, BDL 组): 大鼠入室后予乙醚吸入麻醉, 取仰卧位, 固定于手术台上, 备皮, 碘酒、乙醇消毒手术野, 铺巾。取上腹部正中直切口, 长约 2 cm, 按层进腹, 提出十二指肠, 寻及胆总管并于近十二指肠处两端丝线结扎, 依层关腹。随机分为 BDL₃、BDL₇、BDL₁₄、BDL₂₈ 和 BDL₄₂ 组(每组 10 只), 分别留待第 3、7、14、28、42 日后再次手术行标本采集。对照组(假手术组, $n=10$): 进腹后仅游离胆总管不予结扎, 术后 7 d 后再次手术。

1.3 标本的收集和处理 再次进腹后腔静脉取血 3~4 ml, 离心取上层血清, 应用日本日立牌肝功全自动分析仪测定血清总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、总胆汁酸(TBA)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草

转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、谷氨酰转肽酶(GGT)。取出部分肝脏组织后 10% 甲醛液固定, 石蜡包埋, 切片后常规脱蜡、脱水, H-E 染色, 光镜下行病理形态学观察。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 11.0 软件包进行统计学分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术结果 研究期内对照组大鼠一般状况良好, 未发生意外死亡。实验组内共有 7 只大鼠意外死亡, 其中 7 d 组 1 只, 14 d 组 2 只, 28 d 组 1 只, 42 d 组 3 只。死亡后即开腹肉眼观察各重要器官改变, 必要时行病理学检查, 分析其死因有急性肝功能衰竭、胆瘘致胆汁性腹膜炎、急性胰腺炎、胆汁性肝硬化合并腹水等。实验组大鼠再次进腹后首先确认胆总管完全阻塞, 排除胆总管结扎处松解、再通等异常情况。14 d、28 d 组各 1 只大鼠出现结扎胆总管再通, 胆总管未见扩张, 认为未形成胆道有效阻塞。意外死亡和未形成胆道有效阻塞大鼠于统计结果中剔除。

2.2 实验组和对对照组的肝功能 测得的大鼠血清 TBIL、DBIL、TBA、ALT、AST、ALP、TP、GGT 值见表 1。从表中可以看出, 胆管阻塞后大鼠黄疸指数明显升高, 肝功能损害显著, 阻塞期内血清指标有不同程度的改变。血清 TBIL、DBIL 在 BDL₃ 组, TBA 值在 BDL₇ 组中为最高, 后呈下降趋势, BDL₄₂ 组为最低, 但仍高于假手术组。以 ALT 为代表的酶学指标也有相似改变。

表 1 各组大鼠肝功能测定结果

Tab 1 Results of hepatic function test in rats of different groups

Group	n	$(\bar{x} \pm s)$							
		TBIL $c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	DBIL $c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	TBA $c_B/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	ALT $z_B/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	AST $z_B/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	ALP $z_B/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$	TP $(\rho_B/g \cdot \text{L}^{-1})$	GGT $z_B/(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$
Sham	10	5.17±2.27	3.78±1.10	17.47±10.17	59.75±24.53	76.43±32.21	58.27±31.65	71.32±9.87	5.77±4.32
BDL ₃	10	114.12±32.46**	87.23±27.76**	243.29±122.38**	446.21±156.79**	831.28±372.28**	268.39±98.18**	72.21±7.22	54.56±23.48**
BDL ₇	9	78.74±26.64**	64.52±19.07**	278.38±136.45**	428.57±131.36**	628.67±129.30**	421.28±189.29**	69.57±9.78	43.42±28.39**
BDL ₁₄	7	44.31±12.53**	37.75±10.86**	204.55±87.28**	253.50±86.18**	425.18±139.43**	351.13±113.24**	68.26±6.28	47.41±27.29**
BDL ₂₈	8	17.53±11.17**	14.22±8.35**	107.39±53.81**	115.17±18.29**	259.28±169.11**	251.23±78.29**	70.31±5.27	16.43±20.15**
BDL ₄₂	7	13.21±5.37**	10.89±4.97**	69.56±17.93**	96.25±13.51**	182.29±78.19**	156.28±38.83**	66.18±8.24*	17.18±12.23**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs sham group; TBIL: Total bilirubin; DBIL: Direct bilirubin; TBA: Total bile acid; ALT: Alanine aminotransferase; AST: Aspartate aminotransferase; ALP: Alkaline phosphatase; TP: Total protein; GGT: γ -glutamyl transpeptidase. BDL₃, BDL₇, BDL₁₄, BDL₂₈ and BDL₄₂ indicate that the blood samples were harvested on 3, 7, 14, 28 and 42 days after ligation, respectively

2.3 肝脏病理形态学的改变 各组大鼠肝脏病理形态学改变见图 1A~1F。从图中可看出 BDL 组在胆管阻塞后肝脏组织形态逐渐发生变化。在早期,肝细胞首先出现散在变性和坏死,并伴有炎细胞浸润,汇管区小叶周边部出现小胆管样上皮细胞并增生(图 1B、1C);随着阻塞时间的延长,小胆管样上皮细胞增生显著,小叶中央区出现淤胆,增生逐渐扩

展、延伸,向小叶内深入,同时与伴随出现的胶原纤维、成纤维细胞和小毛细血管等形成膜样间隔,并与临近增生的间隔相互连接、包绕与分割,出现肝纤维化,原正常肝小叶被改建形成假小叶(图 1D、1E);至阻塞后期,所见标本已是典型早期肝硬化组织(图 1F)。

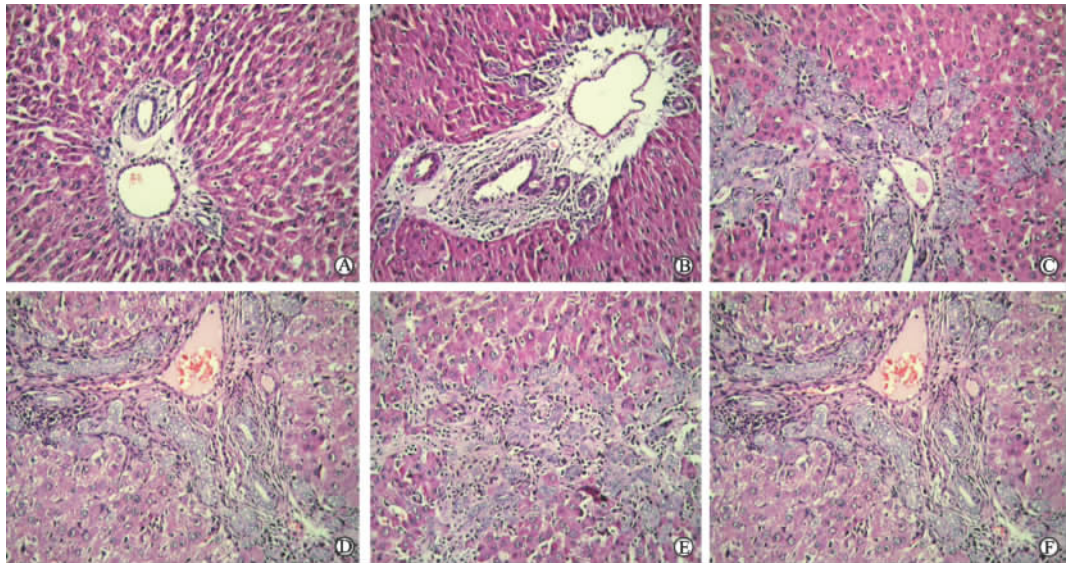


图 1 各组大鼠肝脏病理形态学改变

Fig 1 Pathomorphological changes of each group(H-E)

A:Sham group; B:BDL₃ group; C:BDL₇ group; D:BDL₁₄ group; E:BDL₂₈ group; F:DL₄₂ group. Original magnification: ×200

3 讨论

血清 TBIL、DBIL、TBA、ALT、AST、ALP、TP、GGT 是临床上常用的肝功能检测指标,在本实验中随着胆管阻塞时间的延长,均发生了不同程度的改变。急性阻塞早期导致的胆汁淤积使肝肠循环阻断,胆管内压力升高,胆管显著扩张,使体内内源性代谢产物如胆红素、胆汁酸等的排泄不畅,并通过受损的肝细胞间连接经狄氏腔逆流入血,导致高胆红素和高胆汁血症等^[3]。有报道^[4]指出大鼠胆管阻塞后几小时内即可发生血清 TBIL、DBIL 等的升高,在第 5~10 日或第 2 周达到高峰,并在数周内下降。另有报道^[5]大鼠的血清 TBIL、DBIL 在阻塞后第 1~3 日呈急剧上升趋势,至术后第 3 日达到高峰,随后第 5~7 日呈急剧下降趋势,至术后第 21 日可低于正常水平。本实验观察到的 TBIL、DBIL 和 TBA 的峰值至少是出现在第 7 日前,后呈下降趋势,但至术后 6 周仍高于正常对照组。

胆管的完全阻塞可使胆管压力急剧上升,门静脉和肝窦压升高,肝脏有效血流灌注降低,使肝实质细胞处于缺血缺氧状态,高能磷酸化合物如 ATP 的生成减少,Na⁺-K⁺-ATP 泵活性下降,Ca²⁺跨膜内流,增加 ATP 的分解,为自由基的产生提供底物,Ca²⁺的内流还可激活蛋白酶,催化氧和次氧嘌呤反应,引起生物膜脂质过氧化损伤^[6];阻塞导致的胆汁酸排泄障碍可使肠内胆盐缺乏,肠道内细菌过度繁殖,内毒素生成增加,灭活减少,可发生肠源性内毒素血症并激活单核吞噬系统,释放大细胞因子,介导一系列引起肝细胞损伤的反应;积聚在血清和肝脏内过高的胆红素和胆汁酸,尤其是未经过葡萄糖醛酸化的游离胆汁酸为极性分子,具有细胞毒性,可攻击肝细胞生物膜,加重细胞损伤;有研究^[7]表明胆盐还可诱发肝细胞的凋亡。上述多种因素使肝脏实质细胞功能在早期即明显受损,生物转化包括蛋白质合成能力下降,血清酶学指标升高。

胆管阻塞的持续所导致的典型病理形态学改变

是肝内小胆管增生和肝纤维化^[8]。据文献^[9]报道大鼠胆总管结扎后, 肝纤维化随着阻塞时间的延长而加重, 即使结扎后四周行胆肠引流术减轻淤胆, 肝脏病变也难以恢复。肝纤维化可导致门静脉到肝窦的分支明显减少, 肝小动脉血管壁增厚、管腔变狭窄, 肝脏的血流量明显减少, 代谢功能发生障碍, 肝细胞分泌胆汁功能受损, 加之肝窦内压力的增加共同使胆汁返流入血减少, 使血清胆红素和胆汁酸水平降低; 另外肾脏的代偿作用增强, 其加快结合胆红素的排出也可使黄疸程度得以减轻^[10]; Li 等^[11]报道在离体大鼠肝细胞中, 过高水平的胆红素和胆汁酸可上调相关尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶的表达, 这使自身的葡萄糖醛酸化加速, 结合产物的水溶性增加, 毒性降低, 并易于从尿中排泄。从本实验中可以看出在阻塞后期, 虽然大鼠肝脏组织进一步损害, 但血清中胆红素和胆汁酸水平回落, 相应酶学指标也有一定程度上的恢复。

通过本实验对阻塞性黄疸大鼠不同时期肝功能和病理形态学的观察, 可看出在胆管阻塞形成后, 胆汁淤积可导致肝内小胆管增生及肝细胞的变性、坏死, 肝脏功能发生明显损害; 虽然机体的代偿在一定程度上可降低血清中胆红素和胆汁酸水平, 但阻塞的持续存在使之最终发展为不可逆的肝硬化阶段。这一方面提示在阻黄病程中, 肝功能指标值的高低并不能反映肝脏组织的实际损害程度; 另一方面提示我们在阻黄患者的治疗中, 早期行胆管减压或引流降低胆红素和胆汁酸水平, 以逆转和改善肝脏损伤, 是提高治疗效果的关键。

[参考文献]

- [1] Nehéz L, Andersson R. Compromise of immune function in obstructive jaundice. [J]. *Eur J Surg*, 2002, 168: 315-328.
- [2] Sinenchenko G I, Kabanov M Iu, Tikhonchuk S V. [Perspectives of using ozonized solutions in complex treatment of patients with mechanical jaundice][J]. *Vestn Khir Im I I Grek*, 2004, 163: 91-94.
- [3] Scott-Conner C E, Grogan J B. The pathophysiology of biliary obstruction and its effect on phagocytic and immune function [J]. *J Surg Res*, 1994, 57: 316-336.
- [4] Boyer J L. New perspectives for the treatment of cholestasis: lessons from basic science applied clinically [J]. *J Hepatol*, 2007, 46: 365-371.
- [5] 孙杨忠, 耿小平. 阻性黄疸大鼠胆总管直径、压力及血清胆红素代谢变化的观察[J]. *肝胆外科杂志*, 2003, 11: 141-143.
- [6] Koyama K, Takagi Y, Ito K, Sato T. Experimental and clinical studies on the effect of biliary drainage in obstructive jaundice [J]. *Am J Surg*, 1981, 142: 293-299.
- [7] 王剑明, 邹声泉. 胆盐诱发肝细胞凋亡及蛋白激酶 C 信号通道的作用[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2000, 6: 291-293.
- [8] 郭善敏. 梗阻性黄疸与肝脏病理生理变化的研究进展[J]. *临床外科学杂志*, 1996, 4: 34-36.
- [9] Koea J, Holden A, Chau K, McCall J. Differential diagnosis of stenosing lesions at the hepatic hilus[J]. *World J Surg*, 2004, 28: 466-470.
- [10] Schiff L. *Disease of the liver*[M]. 4th ed. Toronto: J B Lippincott Company, 1975: 314-327.
- [11] Li Y Q, Prentice D A, Howard M L, Mashford M L, Desmond P V. Bilirubin and bile acids may modulate their own metabolism via regulating uridine diphosphate glucuronosyltransferase expression in the rat[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 15: 865-870.

[本文编辑] 尹 茶

• 消 息 •

《中国医学文摘·外科学》杂志更名启事

由国家卫生部主管、江苏省医学情报研究所主办的原《中国医学文摘·外科学》杂志, 经新闻出版总署审批同意, 正式更名为《中国肿瘤外科杂志》(批准文号: 新出报刊[2008]612号), 新编国内统一连续出版物号为: CN32-1795/R。新刊仍由卫生部主管, 主办单位变更为中国医师协会、江苏省医学情报研究所、江苏省肿瘤医院。

《中国肿瘤外科杂志》的办刊宗旨是: 为从事肿瘤临床工作的专业人员提供学术交流园地, 向广大肿瘤外科及其相关学科工作者传递肿瘤外科学领域的新理论、新技术、新成就等信息, 促进肿瘤外科学的发展。热忱欢迎广大临床与科研工作者踊跃投稿和订阅。

本刊地址: 南京市汉中中路 129 号, 邮编: 210029

联系人: 李筱蕾; 电话: 025-84706094, 025-84709114-5814

E-mail: zgglwk.2008@yahoo.com.cn