

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.21.022

血流阻断的缺血预处理技术在肝癌切除术中的临床应用价值

陈培升 罗汉传 覃俊仕 吴瑞正 贺新新

(广西医科大学第八附属医院肝胆外科 广西 贵港 537100)

摘要 目的:探讨血流阻断的缺血预处理技术在肝癌切除术中的临床应用价值。**方法:**选取2010年4月至2013年7月我院收治的96名原发性肝癌并采用肝脏部分切除术进行治疗的患者,将患者随机分为观察组和对照组,每组各48例,观察组在肝脏部分切除术阻断肝门血流前先分别给予1个5 min缺血和再灌注的处理。对照组不采取任何干预措施。术前、术后1天、3天、7天时分别进行生化检查,并于术前及术后1h对Fas-mRNA表达、Caspase-3活性及AI进行测定,观察记录患者术后的并发症情况、手术时间、术中出血量以及住院时间。**结果:**术后1天、3天、7天时两组间的AST、ALT、TBIL等生化指标的含 量情况相比,观察组均显著优于对照组($P < 0.05$);术后1d,两组患者ALB均有不同程度的降低,对照组低于观察组($P < 0.05$);术后住院时间观察组为 13.28 ± 3.85 天,对照组为 19.48 ± 4.92 天,观察组明显低于对照组($P < 0.05$);术后1h,两组患者的Fas-mRNA表达、Caspase-3活性相比于阻断前均显著提高,但观察组提高幅度明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$);两组阻断前均未见肝细胞凋亡,术后1h时,两组组均可见肝细胞凋亡,且对照组明显高于观察组($P < 0.05$)。**结论:**血流阻断的缺血预处理技术具有操作简便、副作用小的重要特点,应用于肝癌切除术中在保护肝功能方面具有显著的优势。

关键词:血流阻断的缺血预处理技术;原发性肝癌;肝脏部分切除术

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)21-4088-04

Vascular Occlusion of the Clinical Value of Ischemic Preconditioning in Liver Cancer Resection

CHEN Pei-sheng, LUO Han-chuan, QIN Jun-shi, WU Rui-zheng, HE Xin-xin

(Department of Hepatobiliary Surgery, Eighth Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guigang, Guangxi, 537100, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the blood flow blocked the clinical value of ischemic preconditioning in liver cancer resection. **Methods:** 96 patients with primary liver cancer and the use of partial liver resection for treatment of patients, the patients were randomly divided into observation group and control group, with 48 cases in each group, in the observation group, partial resection of hepatic hilar previously blocked blood flow were given a 5min ischemia and reperfusion treatment. Control group received no intervention. Pre-operative and postoperative 1 day, 3 days, 7 days, respectively biochemical tests and 1h before surgery and on postoperative Fas-mRNA expression, Caspase-3 activity and AI were measured, observed and recorded postoperative complications in patients, operative time, blood loss and hospital stay. **Results:** After 1 day, 3 days, 7 days, the content of AST, ALT, TBIL in the observation group were significantly better than the control group ($P < 0.05$); After 1 day, two groups of patients had significantly lower ALB, the control group was lower than in the observation group ($P < 0.05$). Postoperative hospital stay in the observation group was 13.28 ± 3.85 days, the control group was 19.48 ± 4.92 days, the observation group was significantly lower than the control group ($P < 0.05$); after 1h, Fas-mRNA expression, Caspase-3 activity in two groups of patients were significantly improved compared to before the blockade, but increase rate in the observation group was significantly lower than the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$); Before blocking, the two groups showed no liver cell apoptosis, 1h after surgery, the two groups were seen liver cell apoptosis, and significantly higher in the control group was significantly higher than in the observation group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ischemic preconditioning techniques blocking blood flow is simple, side effects of important features used in liver cancer resection has significant advantages in terms of protection of liver function.

Key words: Vascular occlusion of ischemic preconditioning techniques; Primary liver cancer; Liver resection surgery

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)21-4088-04

前言

近年来,肝癌的研究取得了很大的进展,越来越多的病人

作者简介:陈培升(1976-),男,本科,主治医师,从事肝胆血管外科方面的研究,E-mail:chenpsheng@163.com

(收稿日期:2013-12-14 接受日期:2014-01-13)

获得长期生存。然而,从总体来看,肝癌的长期生存率仍然很低^[1]。目前,肝脏部分切除术仍然是治疗原发性肝癌的首选治疗方法^[2],肝切除术中出血是肝脏手术的一大难题,因此在手术前,往往需要对入肝的血流进行阻断,以预防肝断面的大量出血^[3-5]。入肝血流阻断是指在切肝时暂时阻断第一肝门肝十二指肠韧带内的肝动脉和门静脉血流。但是,对入肝血流进行长时

间的阻断,容易造成肝脏的缺血再灌注损伤,给患者增加巨大的痛苦,因此对其采取有效措施进行预防干预十分重要。我院将血流阻断的缺血预处理技术应用于原发性肝癌患者的肝脏部分切除术中,取得了满意的效果。现报道如下:

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2010 年 4 月至 2013 年 7 月我院收治的 96 名原发性肝癌患者,所有患者均采用肝脏部分切除术进行治疗。男性 78 例,女性 18 例,年龄最小为 38 岁,最大为 64 岁,平均年龄为 58.73 ± 6.82 岁。其中,有 77 例患者合并有肝硬化。肿瘤大小为 7.13 ± 2.19 cm,除外肝功能 Child-pugh 分级为 C 级的患者。将患者随机分为观察组和对照组,每组各 48 例,两组患者在年龄、性别、肝硬化、肿瘤大小、肝功能分级等方面相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.2 方法

入腹后经探查确定可以对肿瘤进行切除,用 1 根 8 号导尿管将肝十二指肠韧带缠绕 2 周,在行肝脏部分切除术时紧缩尿管对入肝血流进行阻断。观察组在肝脏部分切除术前先分别给予 1 个 5 min 缺血以及再灌注的处理。两组均在肝门阻断后 17~21 min 内完成肝脏部分切除,缝合并止血后将导尿管松开。对阻断的时间进行记录。两组患者均在入腹后、对肝脏进行游离前和血流灌注恢复后 1 h 取 1 块肝组织用于 Fas-mRNA 表达、Caspase-3 活性及肝细胞凋亡等指标的测定。

1.3 检测观察指标

1.3.1 一般项目 对患者术后并发症及死亡情况、手术时间、术中出血量以及术后住院时间等情况进行观察记录。

1.3.2 生化指标检查 分别于术前及术后第 1、3 和 7 天,采集患者的外周血,采用 HITACHI 全自动生化分析仪对血清天门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate aminotransferase, AST)和丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)和总胆红素(Total

bilirubin, TBIL)等指标进行检测。术前及术后第 1 天测定白蛋白(Albumin, ALB)。

1.3.3 Fas-mRNA 含量的测定 采用武汉博士德生物工程公司提供的 Fas 原位杂交试剂盒按照说明书的操作规范对肝组织的 Fas-mRNA 表达进行测定。若细胞浆出现棕黄色者则评为阳性。采用德国 Koutron 公司提供的 RONTRONIBAS2.5 全自动图像分析系统对 Fas-mRNA 进行定量分析,在 200 倍电镜下选取每张玻片中的 3 个视野,对其阳性反应物的灰度、面积进行测定,取平均值即为量化结果,数值越大,代表 Fas-mRNA 的含量越高。

1.3.4 Caspase-3 活性 用 Sigma 公司提供的试剂盒按照说明书的操作规范对 Caspase-3 活性进行测定。

1.3.5 凋亡细胞检测 按照脱氧核糖核酸转移酶介导的缺口末端标记法进行染色。采用武汉博士德生物工程公司提供的细胞凋亡试剂盒按照说明书的操作规范对采用 4% 多聚甲醛固定 24 h 并用石蜡进行包埋处理的切片厚度为 5 μ m 的肝组织的凋亡细胞进行检测。采用 40 $\times$ 10 倍的光镜观察每张切片的 5 $\times$ 100 个细胞,并按照每 100 个细胞中的阳性细胞数的平均值计算细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)。

1.4 统计学处理

统计资料以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。将所得数据导入 SPSS15.0 软件进行分析,计量资料采用 t 检验,计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 作为有统计学差异的标准。

2 结果

2.1 两组患者生化指标测量结果对比

术后 1 天、3 天、7 天时两组间的 AST、ALT、TBIL 等生化指标的的含量情况相比,观察组均显著优于对照组。差异有统计学意义($P < 0.05$)。术后 1 d,由于尚未进食,故此时的血清 ALB 浓度可真正反映肝脏的 ALB 合成能力。术后 1 d,两组患者 ALB 均有不同程度的降低,对照组低于观察组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组患者生化指标测量结果对比($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of measurement results of biochemical indicators between two groups ($\bar{x} \pm s$)

时间 Time	对照组(n=48) Control group(n=48)				观察组(n=48) Observation group(n=48)			
	AST (U/L)	ALT (U/L)	TBIL (μ mol/L)	ALB (g/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	TBIL (μ mol/L)	ALB (g/L)
术前 Before	58.49 $\pm$ 26.15	52.39 $\pm$ 31.95	20.73 $\pm$ 7.68	40.48 $\pm$ 3.77	53.41 $\pm$ 32.04	52.75 $\pm$ 27.95	17.62 $\pm$ 4.23	40.89 $\pm$ 2.63
术后 1 天 1 days after surgery	776.24 $\pm$ 193.85	776.53 $\pm$ 184.88	30.89 $\pm$ 14.85	33.29 $\pm$ 2.93	417.82 $\pm$ 90.16*	420.17 $\pm$ 109.29*	27.48 $\pm$ 6.67*	36.55 $\pm$ 2.64*
术后 3 天 3 days after surgery	368.69 $\pm$ 116.96	375.01 $\pm$ 97.67	44.92 $\pm$ 22.12		155.43 $\pm$ 32.68*	188.51 $\pm$ 53.46*	26.25 $\pm$ 6.14*	
术后 7 天 7 days after surgery	83.22 $\pm$ 30.61	131.15 $\pm$ 30.09	43.91 $\pm$ 20.24		54.52 $\pm$ 11.49*	81.92 $\pm$ 26.03*	22.15 $\pm$ 5.06*	

注:组间对比,* $P < 0.05$

Note: Compare between the two groups,* $P < 0.05$

2.2 两组患者术后并发症及术后住院时间对比

经分析可知,两组术中及住院期间均未发生死亡;术后观察组肝功能不全的发生率为 11.93%,对照组为 12.04%;观察组切口液化的发生率为 6.25%,对照组为 8.33%;观察组的手术时间为 105.98 ± 49.74 min、出血量平均为 154.27 ± 12.84 mL,对照组分别为 104.92 ± 48.41 min、 154.32 ± 11.36 mL。差异均无统计学意义($P > 0.05$)。术后住院时间观察组为 13.28 ± 3.85 天,对照组为 19.48 ± 4.92 天,观察组明显低于对照组,差异有统计学

意义($P < 0.05$)。

2.3 Fas-mRNA 表达、Caspase-3 活性及 AI 情况对比

术后 1 h, 两组患者的 Fas-mRNA 表达、Caspase-3 活性相比于阻断前均显著提高, 但观察组提高幅度明显低于对照组($P < 0.05$)。两组阻断前均未见肝细胞凋亡, 术后 1 h 时, 两组组均可见肝细胞凋亡, 且对照组明显高于观察组($P < 0.05$), 详见表 2。

表 2 两组患者 Fas-mRNA 表达、Caspase-3 活性及 AI 情况对比($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of Fas-mRNA expression, Caspase-3 activity and AI between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	Fas-mRNA (PU)		Caspase-3 活性($\mu\text{mol/hogotissue}$)		AI (%)
	阻断前	术后 1h	阻断前	术后 1h	术后 1h
	Before the blockade	1 days after surgery	Before the blockade	1 days after surgery	1 days after surgery
对照组 Control group	4.35 $\pm$ 0.63	9.75 $\pm$ 1.24 ^b	4.12 $\pm$ 0.93	9.95 $\pm$ 1.14 ^b	9.47 $\pm$ 1.63
观察组 Observation group	4.61 $\pm$ 0.87	6.51 $\pm$ 1.83 ^{ab}	4.11 $\pm$ 0.79	4.24 $\pm$ 0.75 ^{ab}	4.16 $\pm$ 0.92 ^a

注:组间对比,^a $P < 0.05$;组内与阻断前相比,^b $P < 0.05$ 。

Note: Compare between the two groups, ^a $P < 0.05$; Compared with the previous block in the group, ^b $P < 0.05$.

3 讨论

肝脏缺血再灌注损伤作为部分肝脏切除术经常出现的一种病理生理过程^[6,7],及时采取有效的措施进行预防干预至关重要。血流阻断的缺血预处理技术^[8-10]主要是通过即将持续性阻断血流之前保持短暂的缺血及再灌注的过程,有效地提高组织器官的对缺血的耐受性,从而降低长时间阻断血流对组织器官造成的伤害。不少研究证明^[11-13],在对肝脏进行血流阻断前应用缺血预处理技术,在保护肝功能方面具有显著地效果。AST、ALT 作为对再灌注损伤严重程度进行预测的最佳指标已经被广泛认可^[14-16]。在本研究中,术后 1 天、3 天及 7 天观察组患者的 AST、ALT 含量均显著低于对照组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。提示,观察组肝细胞损伤的程度明显低于对照组,进而说明血流阻断的缺血预处理技术对肝脏能够起到有效地保护作用。在研究中,观察组的 TBIL 含量随时间变化不甚明显,但对照组出现显著地增高趋势。说明,术后观察组黄疸的发生程度相对于对照组明显较轻。肝功能不全的发生率虽然两组间相比无统计学意义,但是,观察组患者的病情明显轻于对照组。观察组患者的住院时间明显短于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。考虑原因可能与此有关。

对肝活检的标本采用脱氧核糖核酸转移酶介导的缺口末端标记法进行染色并,通过电镜检查发现,肝门血流阻断前仅偶然存在部分细胞染色阳性。术后 1h,对照组可发现不少肝窦内皮细胞出现染色阳性,观察组则仅存在少量阳性肝窦内皮细胞,并且,对照组的肝窦内皮细胞出现细胞核与细胞质的比值增加、并脱离窦面的情况,部分细胞存在染色质凝集。可能与肝窦内皮细胞相比与肝细胞而言,对缺血的耐受性较差,一旦发生缺血,则容易出现不可逆损伤有关^[17,18]。除此之外,内皮细胞

和肝窦内表面的吞噬细胞库普弗细胞能够产生炎症介质,诱导中性粒细胞以及红细胞的粘附、聚集,使肝窦发生堵塞,导致缺血状态解除后微循环障碍。术后 1 h,两组患者的 Fas-mRNA 表达、Caspase-3 活性相比于阻断前均显著提高,但观察组提高幅度明显低于对照组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。主要考虑是由于在 Fas 介导的凋亡途径中,上游的 Fas-mRNA 表达以及下游的 Caspase-3 活性下调导致肝细胞凋亡减少,进而降低对缺血再灌注的损伤所导致^[19,20]。两组阻断前均未见肝细胞凋亡,术后 1 h 时,两组组均可见肝细胞凋亡,且对照组明显高于观察组($P < 0.05$)。

由此可见,血流阻断的缺血预处理技术具有操作简便、副作用小的重要特点,应用于肝癌切除术中在保护肝功能方面具有显著的优势。

参考文献(References)

- [1] Lee C, Yang JI, Byun HJ, et al. Status of Primary Liver Cancer Found through Routine Health Check-up [J]. J Korean Med Sci, 2013, 28 (10): 1449-1453
- [2] Lee IJ, Ahn CH, Cha EJ, et al. Improved Drug Targeting to Liver Tumors After Intra-arterial Delivery Using Superparamagnetic Iron Oxide and Iodized Oil: Preclinical Study in a Rabbit Model[J]. Invest Radiol, 2013, 48(12): 826-833
- [3] Buell JF, Gayet B, Han HS, et al. Evaluation of stapler hepatectomy during a laparoscopic liver resection[J]. HPB (Oxford), 2013, 15 (11): 766-769
- [4] Luca Viganò, Lorenzo Capussotti, Giovanni De Rosa, et al. Liver Resection for Colorectal Metastases after Chemotherapy: Impact of Chemotherapy-Related Liver Injuries, Pathological Tumor Response, and Micrometastases on Long-term Survival[J]. Ann Surg, 2013, 258 (5): 731-740

- [5] Barton JS, Riha GM, Differding JA, et al. Coagulopathy after a liver resection: is it over diagnosed and over treated [J]. HPB (Oxford), 2013, 15(11): 374-376
- [6] Wang S, Dai ZG, Dong XW, et al. Duplicate preconditioning with sevoflurane in vitro improves neuroprotection in rat brain via activating the extracellular signal-regulated protein kinase [J]. Neurosci Bull, 2010, 26 (6): 437-444
- [7] Zhao Yu-hui, Sun Zhong-ren. Effects of acupuncture pretreatment on ischemic cardiac muscle cell apoptosis and gene expression in ischemia-reperfusion rats[J]. Journal of Acupuncture and Tuina Science, 2009, 7(2): 71-74
- [8] Zhang W, Yan Z, Luo J, et al. Iodine-125 Seeds Strand for Treatment of Tumor Thrombus in Inferior Vena Cava: An Experimental Study in a Rabbit Model [J]. Cardiovasc Intervent Radiol, 2013, 36 (5): 1371-1382
- [9] 史斌, 李崇辉, 陈永卫, 等. 不同入肝血流阻断方式对荷瘤小鼠肝功能影响的实验研究 [J]. 现代生物医学进展, 2012, 12 (14): 2601-2604
- Shi Bin, Li Chong-hui, Chen Yong-wei, et al. Effect of Different Hepatic Occlusion on Liver Function in Tumor-bearing Mice [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2012, 12(14): 2601-2604
- [10] 张涛, 李明皓. 原发性肝癌切除术中选择性半入肝血流阻断法与 Pringle 法的应用研究[J]. 宁夏医科大学学报, 2012, 34(5): 489-491
- Zhang Tao, Li Ming-hao. Application of Selective Hemihepatic Vascular Occlusion and Pringle Maneuver in Hepatectomy of Primary Hepatic Carcinoma [J]. Journal of Ningxia Medical University, 2012, 34(5): 489-491
- [11] 王黎明, 荣维洪, 吴健雄, 等. 肝脏肿瘤切除术中三种解剖性血流阻断法的疗效比较[J]. 中华医学杂志, 2013, 93(22): 1730-1733
- Wang Li-ming, Song Wei-qi, Wu Jian-xiong, et al. Comparative study of three types of anatomical vascular occlusion method in hepatectomy for liver neoplasms [J]. National Medical Journal of China, 2013, 93(22): 1730-1733
- [12] 胡建军, 李崇辉, 王洪东, 等. 保留肝动脉入肝血流阻断法对肝硬化大鼠肝脏的保护作用[J]. 中华肝胆外科杂志, 2013, 19(1): 62-65
- Hu Jian-jun, Li Chong-hui, Wang Hong-dong, et al. Protective effect of portal vein occlusion without hepatic artery inflow control on cirrhotic rat liver[J]. Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery, 2013, 19 (1): 62-65
- [13] 吴健雄, 王黎明, 刘立国, 等. 肝区域血流选择性适时阻断在肝中央型大肿瘤切除中的应用 [J]. 中华肿瘤杂志, 2012, 34 (11): 850-854
- Wu Jian-xiong, Wang Li-ming, Liu Li-guo, et al. Application of selective and timely regional hepatic vascular occlusion for resection of large centrally located liver tumors: report of 133 cases [J]. Chinese Journal of Oncology, 2012, 34(11): 850-854
- [14] Marcin Maciaga, Michal Szkop, Andrzej Paszkowski. Biochemical characterization of aspartate aminotransferase allozymes from common wheat [J]. Central European Journal of Biology, 2013, 8 (12): 1183-1193
- [15] Mohammadizadeh M, Afkhami M, Bastami KD, et al. Preliminary observations on the plasma composition of *Liza klunzingeri* from the strait of Hormuz (Persian gulf)[J]. Springerplus, 2013, 2(1): 62
- [16] Khan A, Al Balwi MA, Tanaka Y, et al. Novel point mutations and mutational complexes in the enhancer II, core promoter and precore regions of hepatitis B virus genotype D1 associated with hepatocellular carcinoma in Saudi Arabia [J]. Int J Cancer, 2013, 133 (12): 2864-2871
- [17] Du J, Dianjun G. Cell cycle specificity of spermatogenic cell apoptosis in rats with experimental varicocele.[J]. Clin Lab, 2013, 59(7-8): 851-859
- [18] Arends SJ, Damoiseaux JG, Duijvestijn AM, et al. Immunoglobulin G anti-endothelial cell antibodies: inducers of endothelial cell apoptosis in pulmonary arterial hypertension?[J]. Clin Exp Immunol, 2013, 174 (3): 433-440
- [19] Angeloni MB, Guirelli PM, Franco PS, et al. Differential apoptosis in BeWo cells after infection with highly (RH) or moderately (ME49) virulent strains of *Toxoplasma gondii* is related to the cytokine profile secreted, the death receptor Fas expression and phosphorylated ERK1/2 expression[J]. Placenta, 2013, 34(11): 973-982
- [20] 夏锋, 王曙光, 别平, 等. Pringle 法导致的肝脏缺血再灌注损伤对肝癌切除患者预后的影响 [J]. 中华消化外科杂志, 2009, 8(2): 103-106
- Xia Feng, Wang Shu-guang, Bie Ping, et al. Influence of hepatic ischemia-reperfusion injury induced by Pringle maneuver on the prognosis of hepatocellular carcinoma patients after hepatectomy [J]. Chinese Journal of Digestive Surgery, 2009, 8(2): 103-106