

远端缺血预处理对接受活体肝移植的胆道闭锁患儿预后的影响

齐波 张松 李佩盈 陈灵科 杨立群 俞卫锋

上海交通大学医学院附属仁济医院麻醉科 200127

通信作者:俞卫锋, Email: ywf808@yeah.net

【摘要】 目的 探讨远端缺血预处理(remote ischemic preconditioning, RIPC)是否可以改善胆道闭锁(biliary atresia, BA)肝移植患儿的缺血/再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/R)和对患儿早期临床结局的影响。**方法** 择期行活体肝移植的 BA 患儿 90 例,采用随机数字表法分成两组(每组 45 例):对照组(Control 组)和远端缺血预处理组(RIPC 组)。RIPC 组患儿在开始手术前,将止血带绑于右下肢并充气至 150 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),持续 5 min,然后放气 5 min 以重新灌注腿部,随后重复 2 次共 3 个循环。观察患儿术前和术后 2 h、1 d、3 d 的血清 ALT、AST 水平,统计主要并发症的发生情况、患儿 ICU 停留时间、总体住院天数、需要再次移植比例、术后 1 年全因死亡率等参数。**结果** 两组患儿接受肝移植手术前及术后 2 h、1 d、3 d 血清 ALT、AST 水平差异无统计学意义($P>0.05$)。术后主要并发症的发生率差异均无统计学意义($P>0.05$)。尽管 RIPC 组患儿 ICU 停留时间、总体住院天数小于 Control 组,但差异没有统计学意义($P>0.05$)。两组患儿术后 1 年全因死亡率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 本实验条件下尚未观察到 RIPC 对接受肝移植的 BA 患儿有保护效果。延长随访期、增加评价指标。改变 RIPC 的参数将有助于明确 RIPC 在 BA 患儿肝移植过程中作用。

【关键词】 胆道闭锁; 肝移植; 远端缺血预处理; 缺血/再灌注损伤

基金项目: 上海仁济医院临床科研创新培育基金(PYIII-17-002)

临床试验注册: 美国临床试验数据库, NCT02830841

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.12.003

Effects of remote ischemic preconditioning on the prognosis of biliary atresia child patients receiving living donor liver transplantation

Qi Bo, Zhang Song, Li Peiying, Chen Lingke, Yang Liqun, Yu Weifeng

Department of Anesthesiology, Renji Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China

Corresponding author: Yu Weifeng, Email: ywf808@yeah.net

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of remote ischemic preconditioning (RIPC) on the ischemia/reperfusion injury (I/R) and early outcome of biliary atresia (BA) child patients receiving living donor liver transplantation. **Methods** Ninety BA child patients receiving living donor liver transplantation were randomly divided into two groups ($n=45$): a control group and an RIPC group. Before surgery, patients in the RIPC group were tied with tourniquets at the right lower extremity before inflation to 150 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa) for 5 min, followed by deflation over 5 min for re-infusion of the leg. The cycle was repeated three times. Then, their levels of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) before surgery and 2 h, 1 day and 3 days after surgery were examined. Moreover, their intensive care unit (ICU) stay, total hospitalization stay, the percentage of re-transplantation, and the mortality within one year were recorded. **Results** No differences were found between the two groups in ALT and AST levels before surgery and 2 h, 1 day and 3 days after surgery. There was also no statistical difference between the two groups in the incidence of main complication after surgery. Compared with the control group, the RIPC group presented decreases in ICU stay and total hospitalization stay without statistical differences ($P>0.05$). No statistical differences were found in the mortality of one year after surgery between the two groups. **Conclusions** The current study does not demonstrate the protective effects of RIPC on BA child patients receiving liver transplantation. Extended follow-up visits, an increased number of evaluation indicators and alternation of RIPC parameters will be useful to determine the clinical efficacy of RIPC in BA child patients during liver transplantation.

【Key words】 Biliary atresia; Liver transplantation; Remote ischemic preconditioning; Ischemia/reperfusion injury

Fund program: Renji Hospital Clinical Innovation Foundation (PYIII-17-002)

Trial Registration: ClinicalTrials.gov, NCT02830841

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2019.12.003

胆道闭锁(biliary atresia, BA)是婴儿慢性胆汁淤积最常见的原因,并可导致淤胆性肝硬化而最终发生肝功能衰竭,是小儿外科领域中最重要消化外科疾病之一。肝移植是 BA 发展至终末期唯一有效的治疗手段,自 2012 年,以婴幼儿为主的 BA 在我国肝移植手术中占比达 75%以上^[1]。

然而在移植过程中,供体肝不可避免地要受到缺血/再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/RI)。I/RI 发生在器官血流阻断和恢复血流阶段,是肝移植术后肝功能障碍及一系列并发症发生和患者死亡的主要原因^[2],然而到目前为止,针对 I/RI 尚无有效的治疗手段。因此,探究改善 I/RI 的策略,提高肝移植手术的安全性,增加患者的生存率显得尤为重要。

远端缺血预处理(remote ischemic preconditioning, RIPC)是通过对远端组织器官进行短暂、非致命性缺血/再灌注预处理,达到减轻后续发生的更加严重的 I/RI,保护重要组织器官功能的方法^[3],因其简单、安全、易于实施,受到了越来越多的关注。早前的基础和临床研究表明,RIPC 有可能减少肝移植过程中的 I/RI^[3-7]。然而,RIPC 对接受活体肝移植患儿的预后是否有积极作用尚不明确。因此,本实验拟探讨 RIPC 是否可以改善肝移植 BA 患儿的 I/RI 和对患儿早期临床结局的影响。

1 资料和方法

1.1 病例选择与分组

本研究经上海交通大学医学院附属仁济医院伦理委员会批准,患儿家属签署知情同意书(仁济伦审[2016]002K)。2015 年 12 月至 2017 年 7 月在上海交通大学医学院附属仁济医院择期行活体肝移植手术的 BA 患儿,ASA 分级 I~III 级,年龄 3~36 个月。排除标准:合并周围血管疾病、既往有血栓栓塞性疾病史、术前存在全身或局部感染、合并自身免疫性疾病、既往有肝移植手术史。最终入选患儿 90 例,采用随机数字表法分成两组(每组 45 例):对照组(Control 组)和远端缺血预处理组(RIPC 组)。

1.2 麻醉和手术

所有患儿均未接受术前用药,入室后常规心电图监测,给予患儿 8%七氟醚(生产批号:19032231,上海恒瑞医药有限公司),氧气 5 L/min 面罩通气,待患儿安静后,开放上肢外周静脉通路,常规全身麻醉诱导:咪达唑仑(生产批号:20141212,江苏恩华药业股份有限公司)0.1 mg/kg、罗库溴铵(生产批号:150108,浙江仙琚制药股份有限公司)1 mg/kg、舒芬太尼(生产批号:91B03011,宜昌人福药业有限责任公司)1 μ g/kg 行气管插管术,机械通气(潮气量 8 ml/kg),调整呼吸频率,维持 $P_{ET}CO_2$ 在 35~40 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)。然后行桡动脉穿刺测量有创血压,右颈内静脉穿刺置管。术中麻醉维持采用七氟醚、罗库溴铵和舒芬太尼,术中按肝移植麻醉常规处理,维持生命体征平稳和合适的循环容量,受体患儿术中 Hb<70 g/L 时输血,维持 Hb>70 g/L。

供体肝劈离和受体肝移植术分别在两个不同手术室内进行,由两组麻醉医师及肝脏外科医师完成。获取移植肝后,使用背驮式肝移植技术将移植植物植入受体的腹腔中。所有患儿均接受 Roux-en-Y 胆管空肠吻合术进行胆管重建。术中进行彩色多普勒超声检查,测量血管吻合术后的血流速度和模式。

在整个手术过程中监测电解质和动脉血气水平并根据需要进行校正。所有肝脏受体患儿在手术后均被送往 ICU 进行术后护理。

1.3 缺血预处理

在 RIPC 组中,在患儿接受全身麻醉后、腹部切口前,右下肢用两层弹力织物覆盖后在右侧大腿上方放置气动止血带。为了诱导 RIPC,将止血带充气至 150 mmHg,持续 5 min,然后放气 5 min 以重新灌注腿部,随后重复 2 次共 3 个循环。在 Control 组中,止血带被放置在右大腿上部而没有充气。

1.4 观察指标

本实验的主要观察指标为患儿血清 ALT、AST 水平。分别在术前及术后 2 h、1 d、3 d 留取患儿静脉血进行测量和记录。此外,我们还记录患儿术后主要并发症发生情况、患儿 ICU 停留时间、总体住

院天数、需要再次移植比例、术后 1 年全因死亡率等参数。

1.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 5.0 统计学软件进行数据分析,正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间计量资料比较采用非配对 t 检验。分类变量以数目(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher's 确切概率法。两组间各时间点血清 AST、ALT 水平比较采用重复测量的双因素方差分析,两两比较采用 Bonferroni 分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况比较

两组患儿一般情况、葛西手术史情况及手术时长、麻醉时长、冷缺血时间、患儿无肝期时间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

2.2 血清转氨酶水平比较

两组患儿术前及术后 2 h、1 d、3 d 血清 ALT、AST 水平差异无统计学意义($P>0.05$,表 2、图 1)。

2.3 临床结局比较

两组患儿术后急性细胞排斥的发生率及主要并发症的发生率差异均无统计学意义($P>0.05$)。Control 组有两例患儿术后发生门静脉血栓,其中 1 例进行了再次肝移植手术。尽管接受缺血预处理的 RIPC 组患儿 ICU 停留时间及总体住院天数少于 Control 组,但差异没有统计学意义($P>0.05$)。两组患儿术后 1 年全因死亡率比较,差异无统计学意义($P>0.05$,表 3)。

3 讨 论

目前,I/RI 仍然是肝移植过程中必然要面临的问题,引发了肝移植术后一系列不良事件的发生。本研究首次评价了肝移植受体 BA 患儿进行 RIPC 对肝移植后 I/RI 以及早期临床结局的作用,发现本实验条件下受体行 RIPC 对 BA 患儿接受肝移植后移植物的功能及患儿的术后的短期临床转归没有影响。

表 1 两组患儿一般情况比较($\bar{x}\pm s$)

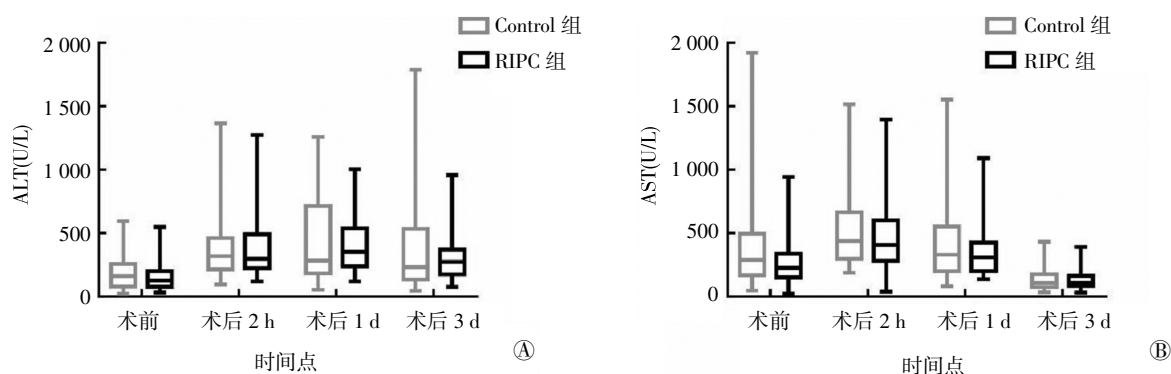
组别	例数 (例)	年龄 (月, $\bar{x}\pm s$)	身高 (cm, $\bar{x}\pm s$)	体重 (kg, $\bar{x}\pm s$)	BMI (kg/m ² , $\bar{x}\pm s$)	葛西手术史 (例,是/否)	术中情况(min, $\bar{x}\pm s$)			
							手术时长	麻醉时长	冷缺血时间	无肝期时间
Control 组	45	9 \pm 8	68 \pm 7	8.0 \pm 1.9	17.1 \pm 1.8	27/18	393 \pm 61	484 \pm 63	66 \pm 16	38 \pm 13
RIPC 组	45	9 \pm 4	68 \pm 6	7.7 \pm 1.4	16.8 \pm 2.0	24/21	386 \pm 69	483 \pm 65	65 \pm 18	38 \pm 10

注:Control 组:对照组;RIPC 组:远端缺血预处理组

表 2 两组患儿围手术期血清转氨酶水平比较($\bar{x}\pm s$)

指标	组别	例数(例)	术前	术后 2 h	术后 1 d	术后 3 d
ALT(U/L)	Control 组	45	182 \pm 128	407 \pm 285	438 \pm 338	371 \pm 347
	RIPC 组	45	166 \pm 132	374 \pm 233	409 \pm 232	314 \pm 187
AST(U/L)	Control 组	45	389 \pm 356	504 \pm 274	415 \pm 300	138 \pm 88
	RIPC 组	45	271 \pm 190	446 \pm 234	367 \pm 218	130 \pm 73

注:Control 组:对照组;RIPC 组:远端缺血预处理组



注:Control 组:对照组;RIPC 组:远端缺血预处理组

图 1 两组患儿围手术期血清转氨酶水平比较 A:两组患儿血清 ALT 水平比较;B:两组患儿血清 AST 水平比较

表 3 两组患儿肝移植术后临床结局比较

组别	例数 (例)	急性细胞排斥 [例(%)]	再次肝移植 [例(%)]	主要术后并发症[例(%)]				ICU 停留 时间 (h, $\bar{x} \pm s$)	总体住院 天数 (d, $\bar{x} \pm s$)	术后 1 年 全因死亡率 [例(%)]
				胆漏	胆管狭窄	动脉血栓 形成	门静脉血栓 形成			
Control 组	45	1(2.2)	1(2.2)	0(0)	0(0)	0(0)	2(4.4)	133±104	24±22	3(6.7)
RIPC 组	45	1(2.2)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1(2.2)	124±62	22±10	3(6.7)

注:Control 组:对照组;RIPC 组:远端缺血预处理组

缺血预处理是指通过对目标器官进行短暂的缺血处理,为器官面临以后更为严重的缺血时提供保护。动物实验结果表明,直接的缺血预处理可以为肝脏提供保护作用^[5]。近期一项 Meta 分析的结果表明,对肝移植供体行肝的缺血预处理可以显著减少肝损伤,减少受体术后 1 年死亡率^[8]。尽管如此,有实验表明,直接的缺血预处理会影响肝脏的再生^[8-9]。此外,Konopke 等^[10]通过多变量分析发现直接缺血预处理是肝脏手术术后并发症发病率的独立预测因子。而 RIPC 是通过远端组织器官进行短暂的、非致命性缺血/再灌注预处理,达到减轻后续发生的更加严重的 I/RI,能同时对多器官提供保护,是一种安全、廉价、无创、易于实现的技术,因此受到大量的关注,所以本实验选取 RIPC 方法来评价其对接受肝移植 BA 患儿的保护作用。

自 2008 年 Pryzklenk 等^[11]第一次提出 RIPC 对心脏 I/RI 的保护作用以来,RIPC 在肝脏手术中的保护作用也已经被报道,然而其具体机制仍未被阐明。多种假说,包括体液源性和神经源性途径,已被用来解释 RIPC 如何将保护作用从远端肢体转移到靶器官^[3]。然而在肝移植手术中,我们认为直接神经源性途径的参与较少,因为移植过程中移植物是被去神经支配的。根据体液途径的假设,接受预处理的器官或组织通过释放体液介质(如腺苷、缓激肽、一氧化氮、内源性大麻素等),通过循环系统运输到目标器官,作用于单核细胞、巨噬细胞和淋巴细胞,激活多条细胞内级联反应通路,通过自噬、抗氧化应激、调节免疫炎症反应等作用,最终减少肝细胞死亡,改善器官微循环,起到保护作用。

目前,针对 RIPC 对肝移植影响的研究,主要集中在动物实验,并且被证实 RIPC 可以对啮齿类动物肝移植后移植物的功能以及受体的恢复提供有效的保护^[3]。尽管如此,关于 RIPC 在肝移植中保护作用的临床研究则进展缓慢。Robertson 等^[12]对成年肝移植受体患者进行了 RIPC,结果显示 RIPC 并

未减少术后血清 AST 水平、并发症发生率以及术后 90 d 病死率。与上述结果相似,本研究对接受活体肝移植的 BA 患儿进行 RIPC,发现并未降低患儿术后血清 ALT、AST 水平,亦未降低术后并发症的发生率以及患儿术后 1 年全因死亡率。分析可能的原因是:① 我们所进行的 150 mmHg、5 min×3 次的缺血/再灌注操作可能不足以引起肢体的完全缺血,或者时长不足以使缺血产生保护作用。预处理刺激的最佳状态需要建立在足够长的时间内释放足够量的保护物质,但不会太长以至于同时释放有毒代谢物之间的微妙平衡之上^[5]。然而到目前为止,尚没有研究者对最佳的缺血时间和参数进行过研究,同时也未发现何种物质可以作为标记物反应 RIPC 的成功与否,因此需要广大临床和科研人员进行进一步的研究。② 由于 BA 患儿的单中心移植手术例数较少,使我们未能发现两组患儿预后之间的差异。因此,需要将来进行多中心、有足够样本量的进一步实验,以明确 RIPC 在 BA 患儿肝移植中的作用。

本研究发现,与 Control 组比较,RIPC 组患儿 ICU 停留时间平均缩短 9.1 h,总体住院天数平均缩短 1.9 d,尽管这些差异都没有统计学意义,但这两个变量都与肝移植后的不良后果直接相关,长时间的 ICU 停留或住院时间延长使患者需要更多的器官支持或促使移植后并发症的发生发展^[8]。因此仍需进一步具有更强统计学效力研究以全面评估 RIPC 是否会对患者的临床转归产生有利的影响。

RIPC 产生靶器官保护作用可以分为两个时间窗,第 1 个迅速发挥作用,但在 2~3 h 内消退;第 2 个在 12~24 h 后再次出现并持续长达 3 d^[13-15]。因此我们选择了术后 2 h、1 d、3 d 作为我们的检测时间点。血清 ALT、AST 水平作为评价术后移植物功能的指标被广泛使用,然而也有研究质疑二者的可靠性^[16],因此将来可以把能更可靠地反映肝功能状态的指标(如吲哚菁绿清除率)或更敏感的指标(如肝脏脂肪酸结合蛋白和谷胱甘肽 S-转移酶水平)纳入

检测,以更好地评价移植术后肝功能状态。本实验仅对患儿术后 1 年以内的情况进行了随访,因此,RIPC 对移植后结局的长期影响仍然未知。此外,没有包括关于移植后受体患儿生活质量的数据。这也是肝移植的一个重要终点,因为移植的目的不仅是提高生存率,还要提高生活质量。

总之,未来仍需设计更为完善的实验来明确 RIPC 对接受活体肝移植 BA 患儿的作用和影响,以期减少移植过程中的 I/RI 和提高患儿生存率提供有用的临床参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Li QG, Wan P, Zhang JJ, et al. Liver transplantation for biliary atresia: a single-center study from mainland China [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21 (32): 9638-9647. DOI:10.3748/wjg.v21.i32.9638.
- [2] Clavien PA, Harvey PR, Strasberg SM. Preservation and reperfusion injuries in liver allografts. An overview and synthesis of current studies [J]. *Transplantation*, 1992, 53 (5): 957-978. DOI:10.1097/00007890-199205000-00001.
- [3] Zhou D, Ding J, Ya J, et al. Remote ischemic conditioning: a promising therapeutic intervention for multi-organ protection[J]. *Aging (Albany NY)*, 2018, 10(8): 1825-1855. DOI:10.18632/aging.101527.
- [4] Kim WH, Lee JH, Ko JS, et al. Effect of remote ischemic post-conditioning on patients undergoing living donor liver transplantation[J]. *Liver Transpl*, 2014, 20(11): 1383-1392. DOI:10.1002/lt.23960.
- [5] Robertson FP, Fuller BJ, Davidson BR. An evaluation of ischaemic preconditioning as a method of reducing ischaemia reperfusion injury in liver surgery and transplantation [J/OL]. *J Clin Med*, 2017, 6(7): pii E69. DOI:10.3390/jcm6070069.
- [6] Li DY, Liu WT, Wang GY, et al. Impact of combined ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning on ischemia-reperfusion injury after liver transplantation[J/OL]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 17979. DOI:10.1038/s41598-018-36365-5.
- [7] Czigan Z, Bleilevens C, Beckers C, et al. Limb remote ischemic conditioning of the recipient protects the liver in a rat model of arterialized orthotopic liver transplantation [J/OL]. *PLoS One*, 2018, 13(4): e0195507. DOI:10.1371/journal.pone.0195507.
- [8] Robertson FP, Magill LJ, Wright GP, et al. A systematic review and meta-analysis of donor ischaemic preconditioning in liver transplantation[J]. *Transpl Int*, 2016, 29(11): 1147-1154. DOI:10.1111/tri.12849.
- [9] Eipel C, Glanemann M, Nuessler AK, et al. Ischemic preconditioning impairs liver regeneration in extended reduced-size livers [J]. *Ann Surg*, 2005, 241 (3): 477-484. DOI:10.1097/01.sla.0000154264.41201.51.
- [10] Konopke R, Kersting S, Bunk A, et al. Colorectal liver metastasis surgery: analysis of risk factors predicting postoperative complications in relation to the extent of resection [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2016, 24(6): 687-697. DOI:10.1007/s00384-009-0669-3.
- [11] Przyklenk K, Maynard M, Darling CE, et al. Aging mouse hearts are refractory to infarct size reduction with post-conditioning[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2008, 51 (14): 1393-1398. DOI:10.1016/j.jacc.2007.11.070.
- [12] Robertson FP, Goswami R, Wright GP, et al. Remote ischaemic preconditioning in orthotopic liver transplantation (RIPCOLT trial): a pilot randomized controlled feasibility study [J]. *HPB (Oxford)*, 2017, 19(9): 757-767. DOI:10.1016/j.hpb.2017.05.005.
- [13] Marber MS, Latchman DS, Walker JM, et al. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction[J]. *Circulation*, 1993, 88(3): 1264-1272. DOI:10.1161/01.CIR.88.3.1264.
- [14] Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, et al. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia[J]. *Circ Res*, 1993, 72 (6): 1293-1299. DOI:10.1161/01.RES.72.6.1293.
- [15] Hausenloy DJ, Yellon DM. The second window of preconditioning (SWOP) where are we now?[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2010, 24 (3): 235-254. DOI:10.1007/s10557-010-6237-9.
- [16] Boleslawski E, Vibert E, Pruvot FR, et al. Relevance of postoperative peak transaminase after elective hepatectomy [J]. *Ann Surg*, 2014, 260(5): 815-820. DOI:10.1097/SLA.0000000000000942.

(本文编辑:孙婷)