

文章编号:1005-6947(2004)03-0224-04

· 简要论著 ·

# 药物性肝衰大鼠脾内移植异种肝细胞 治疗前后的 CD4, CD8 的变化及意义

何震宇<sup>1</sup>, 高蓓<sup>1</sup>, 朱泰来<sup>1</sup>, 陈永田<sup>1</sup>, 杨春<sup>2</sup>, 张萍<sup>2</sup>

(南京医科大学第二附属医院 1. 普外科 2. 病理科, 江苏 南京 210011)

**摘要:** 为探讨异种肝细胞脾内移植治疗大鼠药物性肝衰的意义, 观察大鼠肝功能、存活率及 CD4, CD8 在免疫排斥反应中的作用。笔者以豚鼠肝细胞为供体, SD 大鼠为受体, D-氨基半乳糖 (19.5 ml/kg) 腹腔内一次性注射, 制作肝衰模型。48h 后将微囊化的游离豚鼠肝细胞移植于大鼠脾脏内。以豚鼠裸肝细胞移植及生理盐水脾脏注射为对照。移植后 14d 测定存活率和肝功能, 检查病理切片及 CD4, CD8 的变化。结果示微囊化肝细胞移植组存活率 80.0%, 明显高于生理盐水组 (25.0%) 和裸肝细胞移植组 (70.0%) (分别为  $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ )。微囊肝细胞移植组 14d 总胆红素和 ALT, 明显低于生理盐水组和裸肝细胞组。移植后 72h 和 14d 分别测定受体脾脏 CD4, CD8 淋巴细胞, 移植后 72h, 14d 微囊化肝细胞组、裸肝细胞组 CD4, CD8 均呈阳性。提示: 大鼠药物性肝衰微囊化肝细胞脾内移植后可维持受体存活 14d, 体液和细胞免疫均参与排斥反应。肝细胞微囊化处理可延迟细胞免疫的发生时间。

**关键词:** 肝功能衰竭/治疗; 异种肝细胞脾内移植; CD4; CD8

**中图分类号:** R575.3; R331.144

**文献标识码:** B

暴发型肝衰的治疗目前正朝肝移植、肝细胞移植及生物性人工肝治疗的方向发展。同种肝细胞移植已在临床得到初步验证, 异种肝细胞移植亦有动物实验开展, 而生物性半透膜包裹微囊化异种肝细胞移植的报道较少。本文报道以海藻酸钠-氯化钡法微囊包裹豚鼠肝细胞移植于 SD 大鼠脾脏内治疗 D-氨基半乳糖 (D-GI) 诱发的暴发型肝衰, 观察该疗法大鼠存活率和肝功能的影响及 CD4, CD8 在免疫排斥反应中的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

供体: 杂种豚鼠, 雌雄不限, 体重 250 ~ 400g。  
受体: SD 大鼠, 雌雄不限, 体重 150 ~ 200g。动物均由南京医科大学动物实验中心提供。

### 1.2 实验方法

1.2.1 建立肝衰模型 D-GI (由重庆医科大学化学教研室提供) 用生理盐水配成 10% 的溶液, 0.1N NaOH 调 pH 至 7.0。以 D-GI 19.5 ml/kg 的剂量一

次性腹腔内注射<sup>[1]</sup>。

1.2.2 肝细胞悬液的配制 豚鼠用 2% 氯氨酮 3 ml/kg 腹腔内注射麻醉。取腹正中切口, 暴露肝脏并游离门静脉, 套线。全身肝素化后置管并结扎固定。用无钙 Hank's 液 (4℃) 灌洗 10 min, 约 50 ml。灌注压为 50 cmH<sub>2</sub>O (1 cmH<sub>2</sub>O = 0.098 kPa)。此时肝脏由红润变为苍白。剪开膈肌及下腔静脉, 开放流出道, 再用含钙及 0.05% 胶原酶 IV (活性 398 U/mg) 的 Hank's 液灌注 10 min。最后再用含钙的 Hank's 液灌注约 5 min。切取肝脏, 在 4℃ Hank's 液中研磨碎, 120 目尼龙网过滤。离心 (500 r/min, 3 min/次) 3 次后用胎盼蓝染色, 测定肝细胞活性为 80%。将 3% 海藻酸钠 5 ml 与肝细胞悬液 5 ml 混匀, 2h 内移植。每只豚鼠肝细胞悬液中可得肝细胞  $1.5 \times 10^8$  个, 供 7 ~ 10 只受体大鼠。

1.2.3 肝细胞脾内移植 48h 后, 同法麻醉受体大鼠, 氯氨酮用量减少 1/3。腹部正中切口, 提出充血肿大的脾脏, 以 7 号注射器沿脾脏长轴多点注射。压迫止血, 关腹。植入肝细胞数为  $1.5 \times 10^7$  个/只, 或 1.2 ~ 1.5 ml/只。

### 1.3 肝衰大鼠分组

肝衰大鼠分为 3 组。I 组 (对照组): 肝衰大鼠

**项目基金:** 南京医科大学科研基金资助项目 (NY99042)

**收稿日期:** 2002-09-07; **修订日期:** 2003-08-12。

**作者简介:** 何震宇 (1968-), 男, 江苏南京人, 南京医科大学第二附属医院讲师, 主要从事肝细胞移植方面的研究。

脾内注射生理盐水 1.2 ~ 1.5 ml, 共 20 只。II 组(异种裸肝细胞移植): 肝衰大鼠脾内移植入豚鼠裸肝细胞  $1.5 \times 10^7$  个/只, 共 20 只。III 组(微囊肝细胞移植组): 肝衰大鼠脾内植入海藻酸钠包裹的豚鼠肝细胞  $1.5 \times 10^7$  个/只或 1.2 ~ 1.5 ml/只, 共 20 只。

#### 1.4 观察项目

1.4.1 肝衰大鼠死亡率 用死亡鼠占各组大鼠总数的百分数表示(%)。

1.4.2 肝功能测定 于移植后 7d 取受体鼠 7 只, 于 14d 取 9 只全麻后进腹, 经肠系膜上动脉穿刺取血 1.0 ~ 1.5 ml, 分成 2 份。取 1 ml 测定总胆红素、总蛋白、球蛋白、及谷丙转氨酶(ALT)。

1.4.3 免疫球蛋白测定 取血标本 0.5 ml 测定 IgA, IgG 和 IgM。

1.4.4 CD4, CD8 测定 于移植后 12h, 72h, 14d 取 II, III 组受体鼠脾脏标本, 用免疫组化 ABC 法测定 CD4, CD8 淋巴细胞。新鲜肝化脾标本在液氮中保存, 8 ~ 10  $\mu\text{m}$  切片, 1 周内行免疫组化检查。如果细胞膜上出现棕黄色环状物质, 为阳性。

1.4.5 正常大鼠和肝衰大鼠肝脏的组织学变化 用 10% 甲醛固定标本, 石蜡包埋, 5 ~ 6  $\mu\text{m}$  切片, HE 染色, 加拿大树胶封片。

#### 1.5 统计方法

肝衰大鼠肝细胞移植后 14d 存活率用  $\chi^2$  检验; 肝功能各项指标及免疫球蛋白的数值用方差分析。

## 2 结果

### 2.1 各组肝衰大鼠移植后 14d 存活率

I 组为 25.0% (5/20), II 组为 70.0% (14/20), III 组为 80.0% (16/20)。I 组与 II, III 组的差异均有极显著性(均  $P < 0.01$ ), II 组与 III 组差异有显著性( $P < 0.05$ )。

### 2.2 肝衰大鼠肝细胞移植后肝功能变化

总胆红素和 ALT: I 组高于 II 组和 III 组的 7d 亚组; II 组和 III 组 7d 亚组高于 14d 组。总蛋白和球蛋白: I 组均低于 II 组和 III 组的 7d 亚组和 14d 亚组; II 组和 7d 亚组低于 14d 亚组, 差异均有显著性(表 1)。

### 2.3 各组免疫球蛋白测定结果

IgA, IgG: III 组 7d 亚组和 14d 高于 I 组, ( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ ); III 组中的 7d 组与 14d 组比较, 差异有显著性( $P < 0.05$ )。(2) IgM: III 组 7d 亚组与 II 组及 I 组差异无显著性, 但 III 组 14d 亚组明显高于 II 组及 I 组(均  $P < 0.01$ )及 7d 亚组( $P < 0.05$ )。

表 1 各组的肝功能检测结果

组别	例数	总胆红素( $\mu\text{mol/L}$ )	总蛋白(g/L)	球蛋白(g/L)	ALT(U/L)
I 组	5	0.82 $\pm$ 0.07	78 $\pm$ 6.9	43 $\pm$ 6.2	91 $\pm$ 8.0
II 组	14	0.76 $\pm$ 0.06 <sup>1)3)</sup>	96 $\pm$ 7.4 <sup>1)3)</sup>	52 $\pm$ 6.9 <sup>1)3)</sup>	74 $\pm$ 7.1 <sup>1)3)</sup>
III 组					
7d 组	7	0.75 $\pm$ 0.06 <sup>1)3)</sup>	101 $\pm$ 5.7 <sup>1)3)</sup>	54 $\pm$ 3.5 <sup>1)3)</sup>	70 $\pm$ 5.7 <sup>1)3)</sup>
14d 组	9	0.68 $\pm$ 0.05 <sup>2)</sup>	117 $\pm$ 8.4 <sup>2)</sup>	66 $\pm$ 5.6 <sup>2)</sup>	55 $\pm$ 6.7 <sup>2)</sup>

注: 1) 与 I 组比  $P < 0.05$ ; 2) 与 I 组比  $P < 0.01$ ; 3) 与 III 组 14d 亚组比  $P < 0.05$

表 2 各组免疫球蛋白测定结果(g/L) ( $\times 10^{-3}$ ,  $\bar{x} \pm s$ )

分组	例数	IgA	IgG	IgM
I 组	5	1.76 $\pm$ 0.13	1.03 $\pm$ 0.16	1.64 $\pm$ 0.56 <sup>4)</sup>
II 组	14	2.04 $\pm$ 0.23 <sup>1)3)</sup>	1.82 $\pm$ 0.17 <sup>1)3)</sup>	1.58 $\pm$ 0.27 <sup>4)</sup>
III 组				
7d 组	7	2.22 $\pm$ 0.30 <sup>1)3)</sup>	1.95 $\pm$ 2.0 <sup>1)3)</sup>	1.62 $\pm$ 0.35 <sup>4)</sup>
14d 组	9	2.55 $\pm$ 0.26 <sup>2)</sup>	2.23 $\pm$ 0.27 <sup>2)</sup>	2.36 $\pm$ 0.32

注: 1) 与 I 组比  $P < 0.05$ ; 2) 与 I 组比,  $P < 0.01$ ; 3) 与 III 组 14d 亚组比,  $P < 0.05$ ; 4) 与 III 组 14d 亚组比,  $P < 0.05$

## 2.4 病理检查

大鼠腹腔内注射 D-GI 48h, 肝脏组织学表现为大面积肝细胞坏死、嗜酸性变性和汇管区淋巴细胞浸润。肝衰大鼠脾内移植豚鼠裸肝细胞后 12h 出现细胞核浓缩, 72h 出现炎症细胞浸润。海藻酸钠微囊化包裹组在移植后 12h 未见炎症细胞浸润。72h 后在一些破裂的微囊周围则可见有炎症细胞

浸润并有巨噬细胞出现。

## 2.5 免疫组化结果

肝衰大鼠脾内移植豚鼠肝细胞后 12h 移植物周围即有 CD4 和 CD8 淋巴细胞出现(图 1, 2), 2 周后仍存在。海藻酸钠微囊化包裹组在移植后 72h 才出现 CD4 和 CD8 淋巴细胞(图 3, 4), 移植后 2 周仍存在。

图 1 肝衰大鼠移植裸肝细胞后 12h CD4 检阳性  
( $\times 20$ )

图 2 肝衰大鼠移植裸肝细胞后 12h CD8 检阳性  
( $\times 40$ )

图 3 肝衰大鼠移植裸肝细胞后 72h CD4 检阳性  
( $\times 40$ )

图 4 肝衰大鼠移植裸肝细胞后 72h CD8 检阳性  
( $\times 20$ )

## 3 讨论

同种异基因或异种肝细胞移植亦面临着受排斥反应, 许多学者致力于攻克这一难点。免疫抑制剂, 超紫外线照射 (ultraviolet-Irradiatde)<sup>[2]</sup>、半透膜微囊化 (encapsulation in a semipermeable membrane)<sup>[3,4]</sup>等技术已用于实验动物, 以减轻、延缓受体对移植肝细胞的排斥反应。近年来, 半透膜微囊化肝细胞移植的实验研究已取得进展。Balladur<sup>[3]</sup>等采

用水凝胶微囊化 (hydrosel based hollow fiber) 异种肝细胞移植在大鼠腹腔内, 结果是微囊化异种肝细胞的存活率和功能可维持 90d<sup>[3]</sup>。张阳德<sup>[4]</sup>等采用海藻酸钠-氯化钡法微囊化异种肝细胞移植在大鼠腹腔内, 观察到微囊化可为移植的肝细胞提供免疫屏障作用, 从而提高肝细胞移植的存活率, 但移植后 4d 开始, 微囊周围出现纤维增生现象, 影响肝细胞存活率。Gupats 等<sup>[5]</sup>的经验, 脾脏是肝细胞移植的最佳脏器, 脾脏体积大, 能容纳中量的肝细胞, 脾

内网状组织有俘获和保护移植肝细胞不被吞噬的功能。再者脾脏内丰富的血供也为肝细胞的长期存活和增殖提供了有利条件。然而肝细胞移植仍然面临免疫排斥反应问题,其反应的强弱程度与供受体组织相容性匹配程度有关。Bumgardner 等<sup>[6]</sup>将同种异体肝细胞分别经脾移植入 B 细胞、CD4 细胞或 CD8 细胞缺失的受体中,移植肝细胞存活均不超过 10d,而移植入 T 细胞缺失的受体中,存活超过 16 周,因此推测肝细胞移植免疫排斥反应主要由 T 细胞介导。

本组研究结果显示,微囊化异种肝细胞移植组 14d 内肝衰大鼠成活率为 80.0%,明显高于生理盐水对照组和裸肝细胞移植组。而 14d 的总胆红素和 ALT 则明显低于生理盐水对照组和裸肝细胞移植组。总蛋白和球蛋白明显高于生理盐水对照组和裸肝细胞移植组。提示微囊化异种肝细胞移植其生物膜具有免疫屏蔽作用,移植肝细胞能存活、增殖、恢复部分肝细胞的功能,从而提高了肝衰大鼠的存活率。同时观察到肝衰大鼠 IgM 值随存活期延长而升高,14d 时明显高于对照组和裸肝细胞移植组。提示受体鼠免疫球蛋白参与的排斥机制仍很活跃。分析其原因是生物膜长期留在体内可发生裂缝或破碎,免疫活性 T 细胞和免疫球蛋白仍可进入微囊,攻击移植的肝细胞。本实验结果还表明微囊化肝细胞包裹后移植,仍有体液免疫和细胞免疫的参与,但与裸肝细胞移植相比,CD4 和 CD8 淋巴细胞出现的时间稍晚,也证明了生物性半透膜有一定的阻隔作用。这除了由于生物膜可能破碎,而遭受脾内 T 淋巴细胞攻击外,还可能通过抗体介

导细胞毒作用(ADCC),即以 IgM, IgG 与细胞的结合为桥梁,CD4 和 CD8 再与之结合,杀伤靶细胞。此作用原理尚待研究<sup>[7]</sup>。其他作者也观察到微囊化细胞移植后的 4d,微囊周围出现纤维增生现象,影响微囊肝细胞的营养供应<sup>[4]</sup>,虽然肝细胞移植可适用于肝脏代谢性疾病,慢性肝病并发症,以及急性肝衰等,其研究前景很好,但临床应用尚有许多问题待深入探讨。

#### 参考文献:

- [1] 徐家善,张东兴,李宏为,等. 肝细胞移植实验研究中大鼠肝细胞悬液的制备[J]. 中华器官移植杂志,1983,4(2):73.
- [2] Kawai Y, Price JB, Hardy MA. Reversal of liver failure in rat by ultraviolet - Irradiated hepatocyte transplantation [J]. Transplantation of Hepatocytes, 1987, 19(19t2):989-991.
- [3] Ballardur P, Crema E, Honiger J. *et al.* Transplantation of allogeneic hepatocytes without immuno suppression: long-term survival [J]. Surgery, 1995, 117(2):189-193.
- [4] 张阳德,许毓敏,彭健,等. 微囊化大鼠肝细胞移植的组织学研究[J]. 中华器官移植杂志,2001,22(3):161-163.
- [5] Gupats, Gorla GR, Irani AN. Hepatocyte Transplantation [J]. Hepatology, 1999, 30(2):162-167.
- [6] Bumgardner GL, Li J, Heininger M, *et al.* In vivo immunogenicity of purified allogeneic hepatocytes in a murine hepatocyte transplant model [J]. Transplantation, 1998, 65(1):47-52.
- [7] 赵中辛,丁友成. 异种肝细胞移植排斥机理的探讨[J]. 中华器官移植杂志,2001,22(9):280-281.