

文章编号:1005-6947(2006)07-0504-04

· 肝移植专题研究 ·

肝移植对肝硬化大鼠脾功能及脾组织形态学的影响

黄陈¹, 裘正军¹, 张放¹, 谈燚², 高涌², 刘金新²

(1. 上海交通大学附属第一人民医院 普通外科, 上海 200080; 2. 蚌埠医学院附属医院 肝胆外科, 安徽 蚌埠 233004)

摘要:目的 探讨肝移植对肝硬化大鼠脾功能及脾组织形态学的影响。方法 制备四氯化碳中毒性肝硬化大鼠模型, 采用“二袖套法”进行肝移植。观测肝移植前后大鼠门静脉压力(portal vein pressure, PVP)以及脾脏组织形态学的变化; 检测肝移植前后大鼠血清中促吞噬肽(tuftsins)含量的变化。结果 肝移植前, 肝硬化大鼠 PVP 从 6.28 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 升至 14.03 mmHg ($P < 0.01$); 脾脏病理切片示白髓面积从 23.47% 缩小至 7.70% ($P < 0.01$); 脾小梁面积从 1.75% 扩大至 4.46% ($P < 0.01$)。血清 tuftsins 含量自 466.7 ng/mL 减少至 321.8 ng/mL ($P < 0.01$)。肝移植后, 随着时间的延长, PVP 从 14.03 mmHg 明显降至 6.33 mmHg ($P < 0.01$)。脾脏病理切片示白髓面积从 7.70% 扩大至 15.07% ($P < 0.01$); 脾小梁面积从 4.46% 缩小至 3.11% ($P < 0.05$)。血清 tuftsins 含量从 321.8 ng/mL 升至 432.5 ng/mL ($P < 0.01$)。结论 肝硬化大鼠肝移植后门静脉高压症可明显缓解, 异常的脾功能逐渐得到改善。

关键词: 肝移植; 肝硬化; 脾/病理生理学; 脾/病理学

中图分类号: R657.3; R571.3 **文献标识码:** A

Effects of liver transplantation on function and morphological changes of spleen in hepatic cirrhosis rat

HUANG Chen¹, QIU Zheng-jun¹, ZHANG Fang¹, TAN Yi², GAO Yong², LIU Jin-xin²

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Anhui 233004, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of liver transplantation on function and morphological changes of spleen in hepatic cirrhosis rats. **Methods** Hepatic cirrhosis model was established in rats by subcutaneous injections of carbon tetrachloride. Liver transplantation model was established with two-cuff technique. The portal vein pressure, and morphological changes of spleen were observed before and after liver transplantation in hepatic cirrhosis rats. The serum tuftsins level before and after liver transplantation were detected. **Results** Before liver transplantation, PVP was increased from 6.28 mmHg to 14.03 mmHg ($P < 0.01$). Pathological sections of spleen showed that the areas of white pulp were decreased from 23.47% to 7.70% ($P < 0.01$), and the areas of spleen trabecula were increased from 1.75% to 4.46% ($P < 0.01$). Meanwhile, the level of serum tuftsins was significantly decreased from 466.7 ng/mL to 321.8 ng/mL ($P < 0.01$). After liver transplantation, PVP was significantly decreased from 14.03 mmHg to 6.33 mmHg ($P < 0.01$). Pathological sections of spleen showed that the areas of white pulp were increased from 7.70% to 15.07% ($P < 0.01$), and the areas of spleen trabecula were decreased from 4.46% to 3.11% ($P <$

收稿日期:2005-05-13; 修订日期:2006-01-13。

作者简介:黄陈,男,安徽滁州人,上海交通大学附属第一人民医院博士研究生,主要从事肝移植及消化道肿瘤方面的研究。

通讯作者:黄陈 电话:021-33010955; E-mail:hc6466@sohu.com。

0.05)。Meanwhile, the level of serum tuftsin was increased from 321.8 ng/mL to 432.5 ng/mL ($P < 0.01$)。)

Conclusions Portal vein hypertension in hepatic cirrhosis rats could be relieved after liver transplantation. Liver transplantation can improve the impaired function of spleen.

Key words: Liver Transplantation; Hepatic Cirrhosis; Spleen/physiopathol; Spleen/pathol

CLC number: R657.3; R571.3

Document code: A

肝硬化门静脉高压症手术治疗方法尽管有断流、分流术等,但肝移植术无疑是治疗该症最有效、最根本的方法^[1]。在一些发达国家,肝移植已成为治疗终末期肝病的常规手术。目前我国的肝移植工作也已经进入稳步、快速的发展时期。但在对肝硬化患者行肝移植时,是保留还是切除脾脏,目前仍存有争议^[2]。本研究通过对肝硬化大鼠行肝移植术,观察肝移植后受体的脾脏功能的变化,旨在对肝硬化患者行肝移植时保留脾脏的可行性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

采用健康、雄性SD大鼠(购自南京医科大学实验动物中心),每3只一笼置于恒温动物房中(18~25℃)饲养。

1.2 方法

1.2.1 肝硬化大鼠模型制备 用50%四氯化碳油溶液,按0.3 mL/100 g皮下注射,2次/周;同期用普通饲料喂养,以5%乙醇为饮料。8周后肉眼观察可见大鼠肝脏显著肿大,质地变硬,边缘变钝,多已形成肝硬化结节;光学显微镜下可见肝细胞排列紊乱,纤维组织增生以及假小叶形成等肝硬化的组织学特征,此时即认为肝硬化模型已建立。

1.2.2 大鼠原位肝移植模型制备 供体系正常大鼠,体重为250~300 g;受体系肝硬化大鼠,体重为270~350 g。供体术前不禁食水。受体术前禁食12 h,但饲喂糖水以补充能量。参照Kamada“二袖套法”^[3],并根据如下理论进行改进:(1)由于缺血预处理能够提高血清一氧化氮(NO)水平,降低血清肿瘤坏死因子(TNF)含量,对大鼠移植肝微循环的早期再灌注损伤有保护作用^[4],故笔者在获取肝前阻断肝门血供10 min,再恢复灌注10 min,以改善移植肝脏的功能和受体的存活率。(2)经腹主动脉和门静脉对供肝进行双重灌注较传统的单独经腹主动脉或门静脉灌注更均匀、彻底,可确保获取一个质量良好的供肝^[5]。本实验经腹主动脉灌洗

4℃乳酸钠林格液20 mL(含肝素100 U)后,再经门静脉灌洗4℃乳酸钠林格液10 mL(含肝素50 U)。(3)乌司他丁可降低髓过氧化物酶水平,抑制中性粒细胞聚集和氧自由基生成的,减轻中性粒细胞造成的肝损伤,从而在肝硬化大鼠肝移植围手术期起到保护作用^[6]。故在受体手术前30 min自阴茎背静脉注射乌司他丁(2×10^4 U/L)1.5 mL/kg,以增强肝硬化大鼠抗手术侵袭的能力,提高肝移植的手术成功率。

1.3 实验动物分组

36只SD大鼠随机分为6组,每组6只。A组为正常对照组,6只;B组为肝硬化非肝移植组,6只;C组为肝硬化肝移植后3 d组,6只;D组为肝硬化肝移植后1周组,6只;E组为肝硬化肝移植后2周组,6只;F组为肝硬化肝移植后3周组,6只。正常对照组动物饲养1周后处死,进行检测;肝硬化组动物于肝硬化模型制成后1周处死,进行检测;肝硬化行肝移植组动物分别于肝移植术后3 d、1周、2周和3周时处死,进行检测。

1.4 检测指标

1.4.1 门静脉压力(PVP) 用肝素盐水处理过的连导管针头刺入门静脉主干,将导管经压力换能器连接于多导记录仪,测定PVP。0点定于手术台上方1 cm处(相当于鼠腋中线水平)。

1.4.2 脾脏病理学检查 切除大鼠脾脏,取一半用中性福尔马林固定,HE染色;网状测微仪测量白髓面积比和脾小梁面积比(40倍放大,观察6个视野,计算被测物所占面积的百分比)。

1.4.3 血清促吞噬肽(tuftsin)含量的检测 (1)标准工作曲线的制作:将人工合成的tuftsin标准品(Sigma公司,美国)稀释为10~1 000 ng/10 mL不同浓度的标准溶液,准确进样。利用高效液相色谱仪测得不同tuftsin含量的峰面积,绘制标准工作曲线,利用此曲线定量。(2)血清tuftsin测定:采血后立即离心,取血清1 mL,用0.1 mol/L(NH₄)₂CO₃稀释并加入胰蛋白酶1 mg,37℃水浴1 h后,加入95%乙醇17.5 mL,80℃热浴15 min,冰上冷却,3 000 r/

min 离心 30 min。将上清液用旋转蒸发器蒸干,收集干燥残余物,作为血清促吞噬肽标本, -83℃ 保存待测。标本使用美国 Waters 公司生成的高效液相色谱仪进行检测。色谱条件: Whatman ODS 柱规格(25 cm × 4.6 nm), 流动相为 22% 的乙腈和 78% 的纯水, 加入 0.0023 mol/L 的七氟丁酸, 流速为 1 mL/min, 0.03 AUFS 灵敏度, 波长 214 nm, 注射容量 25 μL, 最大柱前压力 2 100 Pa。用流动相稀释血清标本, 过滤后准确进样。利用 Waters 810 色谱工作站进行数据处理, 依据标准曲线计算出待测血清标本的 tuftsin 含量。

1.5 统计学方法

全部数据均以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用 SPSS 11.0 统计软件作方差分析 (ANOVA)。各组均数两两比较采用 q 检验 (Newman-Keuls 法)。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 肝移植对肝硬化大鼠 PVP 的影响

A 组的 PVP 远低于 B 组 ($P < 0.01$); C 组 PVP

远低于 B 组 ($P < 0.01$); D 组 PVP 与正常对照组间已无明显差异 ($P > 0.05$); D, E, F 各组间 PVP 差异均无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 肝移植对肝硬化大鼠 PVP 的影响

| 分组 | 例数 | PVP (mmHg) |
|-----------------|----|----------------------------|
| 正常对照组(A) | 6 | 6.28 ± 0.71 |
| 肝硬化非肝移植组(B) | 6 | 14.03 ± 0.94 ¹⁾ |
| 肝硬化肝移植后 3d 组(C) | 6 | 9.08 ± 0.86 ²⁾ |
| 肝硬化肝移植后 1 周组(D) | 6 | 6.63 ± 1.16 ³⁾ |
| 肝硬化肝移植后 2 周组(E) | 6 | 6.35 ± 0.87 ⁴⁾ |
| 肝硬化肝移植后 3 周组(F) | 6 | 6.33 ± 0.82 ⁵⁾ |

注: 与邻近的上位组比较: 1), 2) $P < 0.01$; 3), 4), 5) $P > 0.05$

2.2 肝移植对肝硬化大鼠脾脏形态学的影响

结果见表 2。

2.3 肝移植对大鼠血清 tuftsin 含量的影响

A 组 tuftsin 含量远高于 B 组 ($P < 0.01$); D 组 tuftsin 含量高于 B 组 ($P < 0.05$); E 组 tuftsin 含量高于 D 组 ($P < 0.05$); F 组 tuftsin 含量高于 E 组 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 2 肝移植对肝硬化大鼠脾脏形态学的影响

| 分组 | 例数 | 白髓面积 (%) | 脾小梁面积 (%) |
|-----------------|----|--|---------------------------------------|
| 正常对照组(A) | 6 | 23.47 ± 2.30 | 1.75 ± 0.61 |
| 肝硬化非肝移植组(B) | 6 | 7.70 ± 2.01 ¹⁾ | 4.46 ± 0.71 ¹⁾ |
| 肝硬化肝移植后 3d 组(C) | 6 | 7.88 ± 2.34 ¹⁾ | 4.40 ± 0.61 ¹⁾ |
| 肝硬化肝移植后 1 周组(D) | 6 | 8.85 ± 1.82 ¹⁾ | 4.37 ± 0.60 ¹⁾ |
| 肝硬化肝移植后 2 周组(E) | 6 | 11.99 ± 2.00 ^{1), 2), 4), 5)} | 3.85 ± 0.59 ¹⁾ |
| 肝硬化肝移植后 3 周组(F) | 6 | 15.07 ± 1.97 ^{1), 2), 4), 5), 6)} | 3.11 ± 0.51 ^{1), 3), 4), 5)} |

注: 1) 与 A 组比较 $P < 0.01$; 2) 与 B 组比较 $P < 0.01$; 3) 与 B 组比较 $P < 0.05$; 4) 与 C 组比较 $P < 0.05$; 5) 与 D 组比较 $P < 0.05$; 6) 与 E 组比较 $P < 0.05$

表 3 肝移植对肝硬化大鼠血清 Tuftsin 的影响

| 分组 | 例数 | tuftsin (ng/mL) |
|-----------------|----|--|
| 正常对照组(A) | 6 | 466.7 ± 29.9 |
| 肝硬化非肝移植组(B) | 6 | 321.8 ± 25.9 ¹⁾ |
| 肝硬化肝移植后 3d 组(C) | 6 | 325.3 ± 18.5 ¹⁾ |
| 肝硬化肝移植后 1 周组(D) | 6 | 363.2 ± 23.1 ^{1), 4), 5)} |
| 肝硬化肝移植后 2 周组(E) | 6 | 400.7 ± 16.3 ^{1), 3), 5), 6)} |
| 肝硬化肝移植后 3 周组(F) | 6 | 432.5 ± 19.8 ^{2), 3), 5), 6), 7)} |

注: 1) 与 A 组比较 $P < 0.01$; 2) 与 A 组比较 $P < 0.05$; 3) 与 B 组比较 $P < 0.01$; 4) 与 B 组比较 $P < 0.05$; 5) 与 C 组比较 $P < 0.05$; 6) 与 D 组比较 $P < 0.05$; 7) 与 E 组比较 $P < 0.05$

3 讨论

肝移植对脾脏形态学和脾脏免疫功能的影响少有报道。为此, 笔者在建立大鼠肝移植模型的基础上, 观察肝硬化大鼠肝移植前后脾功能及脾组织形态学的变化。

门静脉高压是肝硬化时主要的病理生理改变, 本实验观察到硬化大鼠 PVP 显著高于正常大鼠, 而肝移植术后 3d 时 PVP 即开始明显下降, 术后 1 周已恢复至正常水平, 这与 Cao 等^[7] 的研究结果

相似。肝硬化时假小叶压迫肝内小静脉及肝窦,导致肝门静脉系统阻力增加,这是肝硬化门静脉高压形成的重要机制,而移植后供肝的肝窦和血管无闭塞性改变,故肝移植后 PVP 可迅速降低。

骨髓是脾脏内的淋巴组织,也是发生细胞免疫应答和体液免疫应答的主要场所。陈双^[8]发现肝硬化大鼠脾脏红髓面积扩大,白髓面积缩小,纤维组织增生。本实验亦表明肝硬化大鼠脾脏白髓面积缩小,伴有脾内纤维组织增生、脾小梁面积扩大。在实施肝移植后,白髓面积在术后 2 周即开始增加,且有随术后时间延长而逐渐上升的趋势;白髓作为免疫应答的主要场所,其面积扩大说明脾脏的免疫功能有所改善。本实验还观察到肝硬化大鼠行肝移植后脾小梁面积较移植前有所缩小,说明脾内纤维组织增生亦有缓解的趋势。有动物实验表明,若将脾脏保留在人工制造的门静脉高压系统内,脾脏的纤维化程度呈进行性加重,其功能也逐渐降低;相反,若将脾脏移植于压力正常的髂内血管,其纤维化程度可有所减轻,功能也有所改善^[9]。因此推测肝移植后脾脏组织形态学的变化可能与肝移植后 PVP 下降有关。

tuftsin 是脾脏产生的一种生理性四肽,大量研究证实 tuftsin 具有促吞噬、抗感染、抗肿瘤等作用。血清 tuftsin 水平能反映脾脏的功能,可作为评价脾脏体液免疫功能的特异性指标,也可部分反映机体的免疫状态^[10]。Trevisani 等^[11]发现肝硬化患者脾脏免疫功能低下,血清 tuftsin 含量显著降低。本实验亦显示,肝硬化门静脉高压时,大鼠血清 tuftsin 含量显著降低。在实施肝移植后,血清 tuftsin 含量在术后 1 周即开始上升,且有随术后时间延长而逐渐上升的趋势,说明脾脏体液免疫功能逐渐改善,但其确切机制还有待研究。

基于本实验结果和上述分析,可以看出,肝硬化大鼠肝移植后门静脉高压症明显缓解,脾脏免疫功能也有所改善。因此,肝硬化大鼠在行肝移植后,其脾脏仍有一定的保留价值;这为临床肝硬化患者行肝移植时保留脾脏提供了理论依据。Troisi 等^[12]在 6 年间对 180 例肝硬化患者行原位肝移植手术,其中 10 例因不同原因被迫切除脾

脏,术后竟有 4 例发生致命性脓毒败血症,发生率高达 40%,说明肝移植时切除脾脏易发生术后凶险性感染。但是,肝硬化患者行肝移植是保留还是切除脾脏不仅涉及手术复杂程度及手术风险等问题,而且涉及患者围手术期凝血状态和血流动力学状态等变化问题^[13-15]。因此,肝硬化患者行肝移植时是否保脾仍需更深入的研究。

参考文献:

- [1] Klupp J, Kohler S, Pascher A, *et al.* Liver transplantation as ultimate tool to treat portal hypertension [J]. *Dig Dis*, 2005, 23(1):65-71.
- [2] 郑树森. 肝移植[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001. 377-378.
- [3] Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat [J]. *Surgery*, 1983, 93(1):64-69.
- [4] 涂兵,严律南,程微波,等. 缺血预处理对大鼠移植肝脏微循环的保护作用[J]. *中华器官移植杂志*, 2002, 23(6):327-329.
- [5] 黄陈,谈焱,李宗狂,等. 二袖套法大鼠原位肝移植的手术技巧及并发症的预防[J]. *蚌埠医学院学报*, 2003, 28(6):471-473.
- [6] 黄陈,谈焱,高涌,等. 蛋白酶抑制剂对肝硬化大鼠肝移植围手术期的影响[J]. *实用全科医学*, 2003, 1(3):163-164.
- [7] Cao H, Wu ZY, Zhang XJ, *et al.* The role of vasoactive substances in hyperhemodynamics after orthotopic liver transplantation [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2003, 116(3):405-409.
- [8] 陈双. 大鼠肝硬化门脉高压病程中脾脏形态及功能的演变[J]. *中华实验外科杂志*, 1995, 12(5):271-272.
- [9] 汪谦,程庆君,郭金鹏,等. 门脉高压症巨脾原位保留与异位移植组织及功能的比较[J]. *蚌埠医学院学报*, 1991, 16(6):55-58.
- [10] 夏穗生. 现代脾脏外科学[M]. 第 2 版. 南京:江苏科学技术出版社, 2000. 33-35.
- [11] Trevisani F, Castelli E, Foschi FG, *et al.* Impaired tuftsin activity in cirrhosis: relationship with splenic function and clinical outcome [J]. *Gut*, 2002, 50(5):707-712.
- [12] Troisi R, Hesse UJ, Decruyenaere J, *et al.* Functional, life-threatening disorders and splenectomy following liver transplantation [J]. *Clin Transplant*, 1999, 13(5):380-388.
- [13] 计勇,甄作均,苏树英,等. 肝硬化脾功能亢进肝移植围手术期血小板的调控[J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(12):948-949.
- [14] 黄祖发,赵于军,叶启发,等. 肝硬化患者原位肝移植术后的内脏循环血流动力学变化[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(8):602-605.
- [15] Jacquet E, Puche P, Jaber S, *et al.* Cirrhosis: candidates for liver transplantation [J]. *Rev Prat*, 2005, 55(14):1560-1561.