

文章编号:1005-6947(2008)07-0641-04

· 肝移植专题研究 ·

Wistar-SD 大鼠原位肝移植急性排斥反应的观察

周天保¹, 杨广顺²

(1. 解放军第一七五医院 普通外科, 福建 漳州 363000; 2. 第二军医大学附属东方肝胆外科医院, 上海 200438)

摘要:目的 观察 Wistar-SD 大鼠原位肝移植(OLT)术后发生急性排斥反应时的表现及其判断方法。方法 观察大鼠术后生存状况,采用肝功能检查及组织病理学检查等方法研究 OLT 模型大鼠发生急性排斥反应的表现。结果 Wistar-SD 实验组 OLT 术后发生中、重度急性排斥反应。实验组大鼠肝移植术后血清 ALT, AST, TB 于第 1~3 天及第 7 天各指标数值呈明显上升,高于对照组各相应时点,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 Wistar-SD 大鼠 OLT 模型可发生中、重度急性排斥反应,其肝功能指标的变化可用以说明急性排斥反应是否已发生。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(7): 641-644]

关键词: 肝移植; 移植排斥, 急性; 大鼠

中图分类号: R 617 **文献标识码:** A

Observations on acute rejection reaction of orthotopic liver transplantation in Wistar-SD rats

ZHOU Tianbao¹, YANG Guangshun²

(1. Department of General Surgery, the 175 PLA Hospital, Zhangzhou, Fujian 363000; 2. Affiliated Eastern Hepato-biliary Surgery Hospital, the Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Abstract: Objective To observe the manifestations and judgement methods of acute rejection reaction of orthotopic liver transplantation in Wistar-SD rats. **Methods** The survival conditions after operation in rats was observed, and liver function tests and histopathology examination were used to study the manifestations of acute rejection reaction of orthotopic liver transplantation in Wistar-SD rats. **Results** Wistar-SD experiment group had moderate to severe acute rejection reaction after OLT. Alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, total bilirubin in blood serum after orthotopic liver transplantation in rats was obviously elevated on 1-3 d and 7 d after OLT, which are significantly different from every corresponding time point of control group ($P < 0.05$). **Conclusions** Liver transplantation from donor Wistar rats to recipient SD rats can result in moderate to severe acute rejection reaction, and changes in results of liver functional parameters can indicate whether the acute rejection reaction has occurred.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(7): 641-644]

Key words: Liver Transplantation; Transplant Rejection, Acute; Rats

CLC number: R 617 **Document code:** A

由于外科技术的不断完善,新的免疫抑制剂的不断问世以及患者围手术期综合管理水平的进

步,近年来,临床原位肝移植的成功率有了显著的提高^[1],在我国现已成为一种较常规的解救患者终末期生命的手术治疗方法。然而在临床上,肝移植术后免疫排斥反应,尤其是急性排斥反应仍有发生,严重影响肝移植物的功能^[2]。本实验观察 Wistar-SD 大鼠组合 OLT 术后的急性排斥反应并探讨其判断方法。

收稿日期:2007-12-04; 修订日期:2008-03-21。

作者简介:周天保,男,解放军第一七五医院副主任医师,主要从事肝胆方面的研究。

通讯作者:周天保 E-mail:zhoutb68@126.com

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 选用成年、健康雄性、二级SD和Wistar大鼠,体重270~320 g(中科院上海实验动物中心),受体体重略大于供体。动物饲养条件符合SPF标准。随机将大鼠分为2组,每组受体20只。A组(实验组):选用Wistar→SD大鼠。B组(对照组):选用SD→SD大鼠。每组取受体5只观察移植后存活情况,余作进一步实验用。

1.1.2 实验器械及药物 自制动物手术台、常用显微外科手术器械、自制用聚乙烯管和硬膜外导管、自制无菌冰盒及冰块、1~50 mL注射器、无菌纱布及绵球若干、自制作为维持麻醉的吸入面罩。药物包括乙醚、乳酸钠林格液、肝素、5%碳酸氢钠注射液、阿托品注射液、生理盐水及先锋VI号抗生素(上海新明制药厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠原位肝移植模型的建立 按“二袖套法”建立模型,手术均按常规操作。术后从阴茎背静脉或尾静脉注入常温乳酸钠林格液2 mL,5% NaHCO₃液0.5 mL,保温2 h,单笼喂以5%葡萄糖水。

1.2.2 标本收集 分别于术后第1,3,7天处死大鼠(横断颈椎)。处死前用5 mL注射器穿刺自下腔静脉采血2 mL送作肝功能检查。切取肝中叶约1 g,用中性福尔马林固定备病理检查。

1.2.3 观察指标及检查方法 (1)大鼠生存情况:大鼠精神状态、活动情况、进食水量、体重、对外界刺激反应及生存数。(2)肝功能检查:血清总胆红素(TB)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)。(3)组织病理学检查:将肝组织标本制成石蜡切片,HE染色后,光学显微镜下观察。(4)急性排斥反应诊断参照1997年制定的

“Banff”国际标准进行分级^[3],综合各项评分后,得出排斥评分或排斥活动性指数(rejection activity index,RAI)。RAI:0~2分为无排斥;3分为不确定性或交界性改变;4~5分为轻度排斥;6~7分为中度排斥;8~9分为重度排斥。

1.3 统计学处理

所有数据采用均数±标准差表示。应用SPSS11.0软件包进行数据处理。多组资料均数间比较先用F检验,若差异有统计学意义(方差不齐),则进一步进行q检验。以P<0.05为差异有显著性。

2 结果

2.1 手术情况

本实验共行大鼠原位肝移植手术56次。供体手术时间平均(24±3) min,供肝修剪时间(15±3) min。受体肝切除时间(16±4) min,肝上下腔静脉吻合时间(12±5) min,门静脉袖套吻合时间(2±2) min,无肝期(24±6) min。供肝热缺血时间为0,冷缺血时间(36±7) min。

手术完成及麻醉期过后,受体大鼠基本能翻身爬起,1~3 h后能自主饮葡萄糖水,但精神较差,行动迟缓,对外界刺激淡漠,不喜饮食。一般于3 d后行动逐渐恢复敏捷,精神恢复,饮食量正常。对照组移植后受体大鼠较实验组恢复较快,较早。大鼠存活状态良好,表现在精神较好,对刺激反应正常,能自由活动,主动进食水。良好状态持续24小时以上为手术成功标准。

2.2 各组大鼠术后肝功能检测结果

A组大鼠肝移植术后血清ALT,AST,TB于第1~7天时各值均明显上升;而B组大鼠肝移植术后各时点血清ALT,AST,TB均显著低于A组(均P<0.05),且呈逐步下降(表1)。

表1 两组术后1,3,7 d肝功能检测结果(μmol/L, $\bar{x} \pm s$)

术后	n	实验组(A组)(Wistar-SD组合)			对照组(B组)(SD-SD组合)		
		ALT	AST	TBIL	ALT	AST	TBIL
1 d	5	621.5 ± 136.2	524.6 ± 98.3	56.2 ± 12.1	432.1 ± 14.2 ¹⁾	387.1 ± 86.2 ¹⁾	15.8 ± 2.1 ¹⁾
3 d	5	811.9 ± 102.5	876.7 ± 53.1	136.4 ± 41.3	313.6 ± 68.9 ¹⁾	295.3 ± 47.1 ¹⁾	9.8 ± 3.2 ¹⁾
7 d	5	986.4 ± 215.7	912.6 ± 165.7	256.8 ± 64.9	204.2 ± 53.1 ¹⁾	199.1 ± 53.7 ¹⁾	8.6 ± 1.6 ¹⁾

注:1)与实验组比较,P<0.05

2.3 两组移植肝组织病理学检查结果

A组于术后第1天病理组织检查见肝细胞及肝血窦内皮细胞部分肿胀变性,肝血窦轻度扩张充血,汇管区增宽,有少量的炎性细胞浸润,少部分小胆管和中央静脉亦有炎性细胞浸润。RAI平均为 (4.5 ± 1.3) 分,属轻度排斥反应;术后第3天上述变化进一步发展,可见肝细胞肿胀变性,静脉内皮炎明显,内皮细胞肿胀,肝血窦扩张充血,汇管区增宽,门静脉周围汇管区和中央静脉周围出现以大量单核、淋巴细胞为主的炎症细胞浸润,多数小胆管上皮有炎性细胞浸润,部分小胆管上皮细胞变性、脱落,胆管结构被破坏,RAI

平均为 (6.8 ± 1.2) 分,属中度排斥反应;术后第7天炎症细胞增多,范围进一步膨胀扩大并向肝实质延伸,大部分胆管上皮变性或灶性管腔破坏明显,肝实质可见点状坏死为主,少量肝实质可见桥状坏死,肝小叶结构不清晰(图1)。RAI平均为 (8.6 ± 0.4) 分,属重度排斥反应。

B组于术后1,3,7d仅见部分标本汇管区有少量炎症细胞浸润,肝实质细胞偶见轻度肿胀变性,肝窦偶有轻度扩张充血,但肝小叶结构完整,无肝细胞桥接坏死(术后第7d有1例可疑轻度排斥),RAI平均为1~3分,说明B组所有移植肝的组织病理学检查均未出现急性排斥反应。

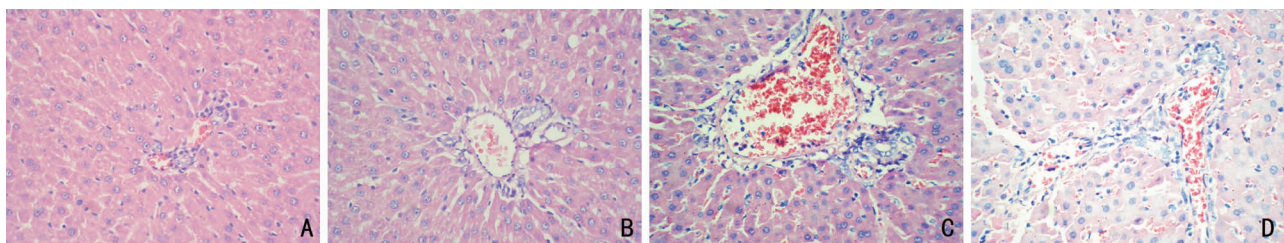


图1 肝组织病理改变 A:对照组;B:实验组术后第1天;C:实验组术后第3天;D:实验组术后第7天

2.4 两组大鼠术后存活时间

此次实验共行移植术40例,以每组5例用于观察移植植物存活时间。A组大鼠3d存活率为100%(5/5),7d为60%(3/5),成活期限为5~10d;B组大鼠3天成活率为100%(5/5),7d为100%(5/5),平均为18~28d,最后死于胆道并发症。结果表明实验组存活时间 (7.4 ± 1.7) d低于对照组 (18.9 ± 7.6) d,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

本实验是采用Kamada的二袖套法进行SVC(下腔静脉肝上段),IVC(下腔静脉肝下段),PV(门静脉)的血管重建,即:缝合SVC、双袖套吻合IVC及PV。通常认为雄性大鼠较雌性大鼠耐受手术创伤的能力强,且雄性大鼠的阴茎背静脉在术后补液方面独具优势。另外相关文献表明,Wistar-SD或SD-WistarROLT模型均有明显排斥反应现象^[4],但根据Weiming等^[5]的研究报告认为Wistar大鼠的肝脏作供肝比SD大鼠者更能耐受冷缺血保存等的损伤,已知这类保存方法会影响肝窦内皮细胞,促使并加重移植后的肝脏缺血再灌注损伤,所以本实验选择Wistar大鼠作供体以减小上述原因可能会导致的实验结果的偏差。

目前国外主要选用DA(RT1a)→AUG(RT1c),DA(RT1a)→LEW(RT11)等大鼠作肝移植急性排斥反应模型,但这些品系大鼠国内尚未大量饲养,价值昂贵,不易购买。目前国内饲养量最大的两个大鼠品系为Wistar和SD,Wistar大鼠是我国于1953年引进,可用于一般医学试验模型使用。SD(Sprague-Dawley)大鼠由Wistar大鼠增殖而成,体形略大于Wistar大鼠^[6-7]。

Wistar-SD大鼠的移植组合,其主要组织相容性复合物(MHC)分型类似于目前国外较常用的大鼠肝移植模型^[8]。本实验即以Wistar和SD大鼠作为实验对象,发现当Wistar作供体,SD作受体时,受体大鼠1~3d左右即开始出现急性排斥反应表现如大鼠精神差、食欲降低、黄疸、伴随肝功能各项酶学指标如ALT,AST,TB升高较明显等。本组大鼠存活时间5~10d,移植肝病理检查提示符合急性排斥反应的病理表现,说明该组合为排斥组合,并多为中高级,与国外其他品系大鼠组合相比毫不逊色^[9]。这与许赤等^[10]的发现相似,证实Wistar-SD大鼠原位肝移植模型是一种较为理想的急性排斥反应模型,可产生确切而稳定的排斥反应^[11]。

有关急性排斥反应程度的分级标准在国际上尚未取得完全一致的意见。有多种分级方法,但

基本上都是根据汇管区炎症、胆管炎性损伤、静脉炎及肝小叶病变程度来分级。1997年在加拿大制定的Banff国际标准是目前被普遍接受的诊断标准。按此标准,本文实验组均出现排斥反应,且随时间推移而加重,但对照组无1例出现排斥反应。

参考文献:

- [1] 叶启发. 21世纪肝移植现状与相关进展[J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(7): 481-483.
- [2] 刘骅, 吴志勇, 曹晖. 联合免疫治疗对肝移植大鼠移植肝组织学和外周血 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(8): 754-757.
- [3] An international panel. Banff schema for grading liver allograft rejection; An international consensus document [J]. Hepatology, 1997, 25(3): 658-663.
- [4] 孙倍成, 王学浩, 胡建平, 等. 大鼠肝移植技术改进及免疫排斥初步观察[J]. 南京医科大学学报, 2001, 7(2): 281-283.
- [5] Weiming Yu, Douglas C, Hinrich BS. Rat live preservation-The components of UM solution that are essential to its success [J]. Transplantation, 1990, 49(6): 1060-1066.
- [6] Liu Y, Chen N, Chen G, et al. The protective effect of CD8 + CD28 - T suppressor cells on the acute rejection responses in rat liver transplantation [J]. Transplant Proc, 2007, 39(10): 3396-3403.
- [7] Cao H, Liu H, Wu ZY. Effects of combined immune therapy on survival and Th1/Th2 cytokine balance in rat orthotopic liver transplantation [J]. Chin Med J (Engl), 2007, 120(20): 1809-1812.
- [8] Toyokawa H, Nakao A, Bailey RJ, et al. Relative contribution of direct and indirect allorecognition in developing tolerance after liver transplantation [J]. Liver Transpl, 2008, 14(3): 346-357.
- [9] Nakano T, Goto S, Lai CY, et al. Experimental and clinical significance of antinuclear antibodies in live transplantation [J]. Transplantation, 2007, 83(8): 1122-1125.
- [10] 许赤, 黄洁夫, 陈规划, 等. 胆汁细胞学及细胞因子基因表达诊断大鼠肝移植急性排斥反应的实验研究[J]. 中华普通外科杂志, 2001, 10(5): 1602-1604.
- [11] Lin YC, Chen CL, Nakano T, et al. Immunological role of indoleamine 2, 3-dioxygenase in rat liver allograft rejection and tolerance [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2007, 23(4): 512-518.

欢迎订阅《中国普通外科杂志》

《中国普通外科杂志》是国内外公开发行的国家级期刊 (ISSN1005-6947/CN43-1213/R), 面向广大从事临床、教学、科研的普外工作者, 以实用性为主, 及时报道普通外科领域的新知识、新技术、临床研究及实用性临床经验。办刊宗旨是: 传递学术信息, 加强相互交流; 提高学术水平, 促进学科发展; 注重临床研究, 服务临床实践。

《中国普通外科杂志》由国家教育部主管, 中南大学主办, 中南大学湘雅医院承办。主编吕新生教授, 顾问由中国科学院及工程院院士汤钊猷、吴孟超、吴咸中、郑树森、夏家辉、黄志强、裘法祖、黎介寿等多位国内外著名普通外科专家担任, 编委会成员由国内外普通外科资深专家学者组成。出版周期短, 时效性强。开设栏目有述评、专题研究、基础研究、临床研究、简要论著、临床报道、文献综述、误诊误治与分析、手术经验与技巧、国内外学术动态, 病案报告。《中国普通外科杂志》已进入多个国内外重要检索系统和大型数据库, 如: 美国化学文摘 (CA), 俄罗斯文摘 (AJ), 中国科学引文数据库 (CSCD), 中国科技论文与引文数据库 (中国科技论文统计源期刊), 中国学术期刊综合评价数据库, 中国期刊网全文数据库 (CNKI), 中文科技期刊数据库, 中文生物医学期刊文献数据库 (CMCC), 万方数据-数字化期刊群, 中国生物医学期刊光盘版等, 影响因子已居同类期刊前列, 并在科技期刊评优评奖活动中多次获奖。

2008年《中国普通外科杂志》由每期80页增至96页。中国普通外科杂志编辑部已全面采用远程投稿、审稿、采编系统, 出版周期和时效性将进一步提高。欢迎订阅, 欢迎赐稿。

《中国普通外科杂志》为月刊, 国际标准开本 (A4幅面), 每期96页, 每月15日出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷, 图片彩色印刷, 封面美观大方。定价12.0元/册, 全年144元。国内邮发代号: 42-121; 国际代码: M-6436。编辑部可办理邮购。编辑部地址: 湖南省长沙市湘雅路87号 (湘雅医院内) 邮政编码: 410008

电话 (传真): 0731-4327400 网址: <http://www.zpwz.net> E-mail: pw4327400@126.com; jcgsyxc@126.com; zpwzcn@gmail.com