文章编号:1000-5404(2006)19-1983-03

论著

射频消融治疗脾功能亢进症前后血清 Tuftsin 含量的变化

冯　凯,马宽生,董家鸿　　(第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提　要: 目的　探索肝硬化门脉高压性脾功能亢进症在射频消融(radiofrequency ablation,RFA)治疗前后血清 Tuftsin 含量的变化。**方法**　将 33 例肝硬化门脉高压性脾大脾功能亢进症患者分为 RFA 治疗组 17 例(实验组)和脾切除组 16 例(对照组)。实验组在全麻、超声引导下经腹腔镜及开腹术中行 RFA 治疗;对照组行脾脏切除术。2 组患者于手术前后不同时期使用反相-高效液相色谱法检测血清中 Tuftsin 的含量。**结果**　2 组患者脾亢症状均得到较好的缓解,但是对照组由于切除了脾脏,其血清中 Tuftsin 含量明显下降($P<0.01$);RFA 术后血清中 Tuftsin 含量虽有下降,但是由于保留了部分脾脏,手术前后比较差异并无统计学意义($P>0.05$)。**结论**　射频消融治疗脾功能亢进症在有效缓解脾亢症状的同时维持了血液内的 Tuftsin 含量,对维持机体抗感染、抗肿瘤功能有一定的意义。

关键词: 脾功能亢进; 射频消融; 脾脏切除术; Tuftsin
中图法分类号: R392.11; R446.62; R657.63　　**文献标识码**: A

Changes of serum Tuftsin content among hypersplenism patients before and after radiofrequency ablation or splenectomy

FENG Kai, MA Kuan-sheng, DONG Jia-hong (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective　To examine the serum Tuftsin content of hypersplenism patients treated by radiofrequency ablation (RFA) or splenectomy, and compare the influence of two curative methods. **Methods**　Totally 33 patients of hypersplenism were randomly assigned to receive RFA ($n=17$) and splenectomy ($n=16$). Before and after operation, the serum Tuftsin content was detected by reverse phase-high performance liquid chromatography. **Results**　Relief of hypersplenism was achieved in both group. Because the spleen was resected, serum Tuftsin content in splenectomy group significantly decreased ($P<0.01$). In RFA group, due to the part preserved spleen, serum Tuftsin content decreased but insignificantly as compared with the preoperative values ($P>0.05$). **Conclusion**　Radiofrequency ablation for hypersplenism has good curative effect and significantly preserves body's resistance to infections and tumors.

Key words: hypersplenism; radiofrequency ablation; splenectomy; Tuftsin

Tuftsin 是一个仅产生于脾脏的免疫调节因子,具有抗感染、抗肿瘤的免疫活性。射频消融(radiofrequency ablation,RFA)治疗脾功能亢进症是我所首先开展的治疗脾亢的微创方法[1,2],具有安全、有效及可控制性好的优点。但 RFA 治疗脾亢时血清 Tuftsin 含量变化目前少见报道。经医院伦理委员会批准,我们对我所 2004 年 1 月至 2005 年 3 月收治的 33 例肝硬化门静脉高压性脾功能亢进症患者分别进行 RFA 治疗和脾脏切除治疗,对 2 种治疗方法前后 Tuftsin 含量的变化进行了前瞻性的随机对照研究。

1　资料与方法

1.1　临床资料

1.1.1　RFA 治疗组(实验组)　17 例患者,其中男性 10 例,女性 7 例,年龄(42.37±5.42)岁。其中肝炎后肝硬化 16 例,酒精性肝硬化 1 例。术前 WBC:(2.32±0.65)×10^9/L;PLT:(28.44±15.68)×10^9/L。术前肝功能 Child 分级:A 级 11 例,B 级 6 例。脾脏轻度肿大 5 例,中度肿大 12 例。

1.1.2　脾切除组(对照组)　16 例患者,其中男性 9 例,女性 7 例,年龄(45.84±6.88)岁。其中肝炎后肝硬化 15 例,酒精性肝硬化 1 例。术前 WBC:(2.54±0.82)×10^9/L;PLT:(32.05±18.30)×10^9/L。术前肝功能 Child 分级:A 级 12 例,B 级 4 例。脾脏轻度肿大 3 例,中度肿大 10 例,重度肿大 3 例。

1.1.3　手术方式　实验组:对有上消化道出血病史,食道静脉中重度曲张,红色征、紫色征阳性,有破裂出血可能性的患者,在行贲门周围血管离断术或分流术中行 RFA 治疗(11 例);对单纯的脾功能亢进症患者采用腹腔镜下 RFA 治疗(6 例)[3]。对照组:单纯脾脏切除术(5 例);联合分流术或断流术(11 例)。

1.2　检测指标与方法

1.2.1　外周血常规检测　分别于术前及术后(1、3 d、1 周、1、6、12 个月)取外周静脉血由自动血细胞计数仪 Sysmex(K-

作者简介:冯　凯(1976-),男,山东省泰安市人,硕士,医师,主要从事射频消融术方面的研究。电话:(023)68765298, E-mail: fengkai7688@hotmail.com

收稿日期:2005-11-02;修回日期:2006-03-28

4500)完成血常规检测并取 WBC、RBC 及 PLT 为观察指标。

1.2.2　Tuftsin 含量检测

1.2.2.1　待测标本的前处理　　按照 Naim 等[4]1987 年首创的 RP-HPLC 法(反相-高效液相色谱仪法)分别于术前和术后 1 周、1 个月及半年采患者静脉血 10 ml,立即离心,取血清 2 ml,-70 ℃冰箱保存待测。测量前用 0.05 mol/L $(NH_4)_2CO_3$ 6 ml 稀释血清并加入胰蛋白酶 2 mg,37 ℃水浴 1 h 后,加入 95% 乙醇 35 ml,80 ℃热浴 15 min,冰上冷却,3 000 r/min 离心 30 min,取上清液移至锥形底的平皿内,吹风蒸发一夜,收集干燥残余物,作为血清 Tuftsin 标本。

1.2.2.2　标准工作曲线的制作　　将人工合成的 Tuftsin 标准品(美国 Sigma 公司产品,批号 98F78265)用甲醇稀释为 10 ~ 1 000 ng 不同含量的 Tuftsin 标准溶液,准确进样 40 μl。用 RP-HPLC 测得不同 Tuftsin 含量的响应峰面积,绘制标准工作曲线,利用此曲线定量。美国 Waters 公司生产的 RP-HPLC 仪所测的人工合成 Tuftsin 标准品的保留时间是 7 min,Tuftsin 标准品的含量与峰面积的工作曲线,呈直线相关,$r=0.999\ 87$,直线回归方程 $y=1\ 837.864\ 3+48.142\ 5x$。

1.2.2.3　RP-HPLC 检测　　① 用美国 Waters 公司生产的高效液相色谱仪检测,色谱条件为:Whatman ODS 柱(5-octadecylsilyl 柱,25 nm × 107 nm × 4.6 nm)流动相为含 25% 氰化甲烷(CH_3CN)和 75% 水(H_2O)的 0.3% 七氟丁酸(heptafluorobutyric acid, HFB)溶液,流速 0.9 ml/min,Waters 484UV 探测器、0.03AUFS 灵敏度、214 nm 波长,柱温为环境温度,注射容量 40 μl,最大压力 10.0 MPa ,Waters 510 泵,Waters U6K 进样器,EC2000 色谱工作站。② 用 200 μl 流动相溶液稀释待测血清 Tuftsin 样本,进样器抽取 40 μl,保留时间 12 min,在 7 min 时得到 1 个与人工合成 Tuftsin 标准品一致的峰,经 EC2000 色谱工作站数据处理,得出待测血清标本的 Tuftsin 含量。

1.3　统计学分析

实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差齐性分析和两样本均数的比较,方差齐的数据采用 t 检验,方差不齐的数据采用 t' 检验。

2　结果

2.1　手术前后门静脉压力变化

实验组中 11 例联合分流或断流手术的患者手术后检测自由门静脉压力(free portal press FPP)与术前相比有显著降低[3]。所有患者随访至术后 1 年,无 1 例患者出现或再次出现上消化道大出血。

2.2　2 组患者手术前后外周血细胞计数的变化趋势

与术前比较,2 组术后外周血细胞均呈现上升趋势。其中实验组术后白细胞和血小板与术前比较差异显著($P<0.01$),红细胞在术后半年时与术前比较有统计学意义($P<0.05$, $P<0.01$)。对照组术后血小板短时间内上升至峰值再缓慢回落。而实验组血小板的变化趋势为缓慢上升,与对照组有明显不同。见表 1、图 1。

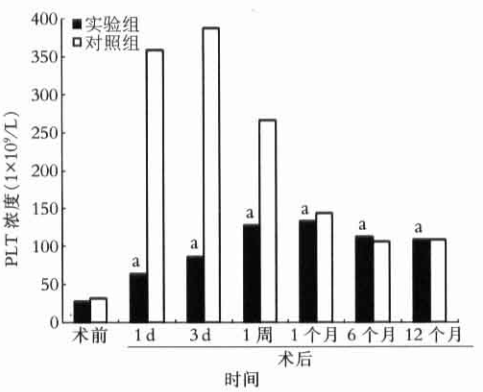
2.3　2 组患者血清 Tuftsin 含量手术前后的变化

实验组血清 Tuftsin 含量在手术后各时相点与术前相比虽有下降趋势,但无统计学意义($P>0.05$),而对照组在手术后 1 周血清 Tuftsin 含量即下降($P>0.05$),术后 1 个月时与术前相比差异有统计学意义($P<0.05$),并随术后时间的延长下降趋势明显。见图 2。

表 1　2 组患者手术前后血常规检测结果($\bar{x}\pm s$)

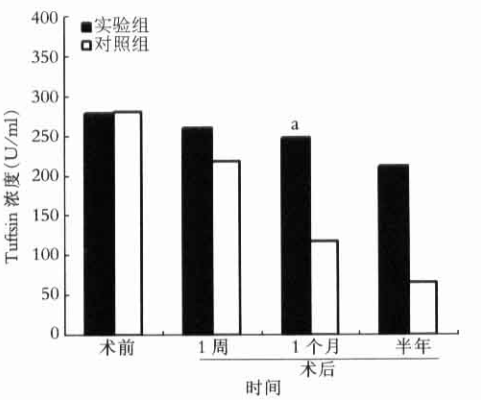
组别	术前	术后					
		1 d	3 d	1 周	1 个月	6 个月	12 个月
WBC(1×10^9/L)							
实验组	2.32 ± 0.65	9.28 ± 4.27[a]	8.87 ± 5.23[a]	5.19 ± 1.91[a]	5.24 ± 1.89[a]	5.87 ± 2.21[a]	4.66 ± 3.32[a]
对照组	2.54 ± 0.82	10.14 ± 5.42[a]	9.45 ± 6.24[a]	6.33 ± 2.21[a]	7.24 ± 2.13[a]	6.82 ± 2.84[a]	5.76 ± 2.54[a]
RBC(1×10^{12}/L)							
实验组	3.08 ± 0.62	2.97 ± 1.26	3.06 ± 1.87	3.22 ± 1.81	3.31 ± 0.89	3.68 ± 1.42[b]	4.22 ± 2.31[a]
对照组	3.24 ± 1.55	2.68 ± 1.47	3.23 ± 1.56	3.35 ± 1.16	3.58 ± 1.34	4.23 ± 2.11[b]	4.35 ± 2.78[a]

a: $P<0.01$, b: $P<0.05$,与术前比较



a: $P<0.01$,与术前比较

图 1　2 组患者术后血小板浓度变化趋势图



a: $P<0.05$,与术前比较

图 2　2 组患者手术前后血清 Tuftsin 含量变化趋势图

3　讨论

Tuftsin 又名血清促吞噬素，是 Najjar 等于 1970 年在美国 Tufts 大学首次发现并因此而得名。研究表明它是一种人体自然存在的天然性生理四肽，位于 IgG 重链 Fc 段 CH_2 区域残基 289 ~ 292 部分。1972 年 Nashioka 成功的化学合成了这种四肽，其结构为苏-赖-脯-精氨酸（Thr-Kys-Pro-Arg）。由于 Tuftsin 的产生需要经过位于吞噬细胞膜上的白细胞膜酶（leukokininase）和脾脏产生的内羧基肽酶（endocarboxy peptide）两步酶的作用，因此是 1 个仅产生于脾脏的四肽。血清 Tuftsin 含量目前已成为临床上评价脾功能和脾外科手术疗效的特异性指标。

Tuftsin 是一种具有广泛生物活性的物质，其从母体上游离后，与多形核白细胞（polymorphonuclear leukocytes，PMN）、吞噬细胞和单核细胞膜上的 Tuftsin 专一性受体结合即可发挥其促吞噬、杀菌、抗肿瘤及其他生物学活性作用[5,6]。脾切除后 Tuftsin 水平明显下降，对中性粒细胞及吞噬细胞吞噬功能的增强作用也丧失，脾切除后患者易感性增强和易发生 OPSI 与 Tuftsin 水平降低有关。作为一个仅产生于脾脏的免疫因子，Tuftsin 在肿瘤免疫中有着不容忽视的作用：①增强了巨噬细胞的吞噬功能；②巨噬细胞溶解瘤细胞作用增强；③增强了巨噬细胞的过氧化酶作用；④激活巨噬细胞分泌骨髓刺激因子，使白细胞总数增多；⑤增强杀伤 T 细胞活性，增强单核细胞和中性粒细胞毒性；⑥使 NK 细胞活性增强。有实验研究也表明在脾切除组中肿瘤生长快，生存时间短，NK 细胞活性低[7]。因此，尽可能采取保脾术式对于维持 Tuftsin 水平，保护脾脏的肿瘤免疫功能就显得相当重要。国内外许多研究均证实脾切除术后血清中 Tuftsin 水平明显下降[8]，这与本研究结果一致，亦进一步证实了 Tuftsin 和脾脏之间存在着必然联系。此外有研究发现在全脾切除术后，血清 Tuftsin 水平虽呈进行性下降趋势，但仍未降至零，而维持在一定的低水平[9]，可能为脾组织自然植入所致，也可能与脾外产生 Tuftsin 的器官有关。由于本组病例观察时间较短，尚未观察到实验组血清 Tuftsin 在低水平上维持的现象。Chu 等[10]认为 Tuftsin 的抗肿瘤机制不仅通过增加巨噬细胞的肿瘤趋向性、吞噬能力和分泌能力，更重要的是增加巨噬细胞产生氧自由基—超氧阴离子的能力，巨噬细胞定向性向肿瘤细胞内释放 O^- 对肿瘤细胞杀伤具有重要作用意义。实验证实，随着肿瘤的生长，Tuftsin 的这种作用也随之减弱，测定巨噬细胞的 O^- 产生量减少。这对 Tuftsin 的抗肿瘤机制提出了新观点，同时也为脾脏抗肿瘤的双相性学说提供了理论基础。目前国外已将人工合成的 Tuftsin 用于某些晚期肿瘤及 AIDS 的治疗，并取得了一定的疗效，大剂量使用也未见明显的毒副作用。

Tuftsin 在机体的抗感染、抗肿瘤免疫中具有重要作用，因此本研究中实验组由于保留了部分脾脏，血清 Tuftsin 水平虽有所下降但与术前无明显差别，对维持机体的抗感染、抗肿瘤免疫功能有一定的意义。

参考文献：

[1] 刘全达，马宽生，何振平，等. 射频消融治疗继发性脾肿大、脾功能亢进可行性和安全性的实验研究[J]. 中华外科杂志，2003，41(4)：299 - 302.

[2] 马宽生，吴　乔，刘全达，等. 射频消融治疗脾功能亢进症的临床研究[J]. 中华外科杂志，2004，42(15)：944 - 946.

[3] 冯　凯，马宽生，吴　乔，等. 射频消融治疗脾功能亢进症对门静脉系统血流动力学的影响[J]. 消化外科，2005，4(4)：261 - 264.

[4] NAIM J O, DESIDERIO D M, TRIMBLE J, *et al*. The identification of serum tuftsin by reverse-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometry[J]. Anal Biochem, 1987, 164(1): 221 - 226.

[5] NISHIOKA K, WAGLE J R, RODRIGUEZ T Jr., *et al*. Studies of human granulocyte phagocytosis stimulation by tuftsin[J]. J Surg Res, 1994, 56(1): 94 - 101.

[6] CILLARI E, ARCOLEO F, DIELI M, *et al*. The macrophage-activating tetrapeptide tuftsin induces nitric oxide synthesis and stimulates murine macrophages to kill leishmania parasites in vitro[J]. Infect Immunal, 1994, 62(6): 2649 - 2652

[7] 姚英民，刘青光，扬威，等. 肝癌合并肝硬化时脾脏对机体免疫状态影响的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志，2002，8(7)：428 - 430.

[8] TREVISANI F, CASTELLI E, FOSCHI F G, *et al*. Impaired tuftsin activity in cirrhosis: relationship with splenic function and clinical outcome[J]. Gut, 2002, 50(5): 707 - 712.

[9] ZOLI G, CORAZZA G R, D'AMATO G, *et al*. Splenic autotransplantation after splenectomy: tuftsin activity correlates with residual splenic function[J]. Br J Surg, 1994, 81(5): 716 - 718.

[10] CHU D Z, NISHIOKA K. Tuftsin increases survival in murine peritoneal carcinomatosis[J]. J Biol Response Med, 1990, 9(2): 264 - 267.

（编辑　周　芳）