文章编号:1000-5404(2014)21-2207-04

论著

不同灌注方法肝细胞脾内移植治疗急性肝损伤小鼠的效果

陈 睿,李德卫 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 对比分析经门静脉、下腔静脉灌注所得小鼠肝细胞的产率、纯度、存活率,以及分别脾内移植治疗急性肝损伤小鼠的疗效。**方法** 42只小鼠部分肝切建立急性肝损伤(acute liver injury,ALI)模型,按随机数字表法分为3组:门静脉组脾内注射经门静脉灌注所得肝细胞悬液0.1 mL(1.0×10^6),下腔静脉组脾内注射经下腔静脉灌注所得肝细胞悬液0.1 mL(约1.0×10^6),对照组脾内注射D-Hank's液0.1 mL。观察移植术后1、5、9 d肝功变化及第9天脾内肝细胞分布、脾内白蛋白合成情况。**结果** 经门静脉灌注所得肝细胞的产量($P=0.014$)、纯度($P=0.010$)、存活率($P=0.001$)显著高于下腔静脉组;治疗组ALT($P=0.02$)、AST($P=0.01$)均值下降幅度远高于对照组,且门静脉组下降幅度高于下腔静脉组;术后第9天,门静脉、下腔静脉2组白蛋白免疫荧光定性分析门静脉组强于下腔静脉组;HE染色光镜下门静脉组肝细胞形态正常,结构清楚;下腔静脉组肝细胞结构模糊,细胞器显示不清。**结论** 经门静脉灌注提取获得肝细胞的产率、纯度、存活率均优于经下腔静脉灌注所得,且对急性肝损伤小鼠疗效门静脉组优于下腔静脉组。

[关键词] 门静脉;下腔静脉;肝细胞脾内移植;急性肝损伤
[中图法分类号] R-332; R657.305; R657.6 [文献标志码] A

Outcomes of different perfusion methods in hepatocyte transplantation in treatment of acute liver injury in mice

Chen Rui, Li Dewei (Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To analyze the yield, purity and viability of hepatocytes obtained through portal vein or inferior vena cava perfusion, and determine their efficiencies in the treatment of acute liver injury (ALI) *via* intrasplenic injection. **Methods** After mouse ALI model was successfully established in 42 mice through partial hepatectomy, the mice were randomly and equally divided into 3 groups: the portal vein group [receiving an injection of 0.1 mL (1.0×10^6) hepatocyte suspension which primed by portal vein perfusion from donor mice into the receiver mice' spleen], the inferior vena cava group (receiving same injection of same dose of cell suspension but primed by inferior vena cava perfusion), and the control group (receiving same injection of 0.1 mL D-Hank's solution). The liver function, hepatocytes distribution and albumin synthesis in the spleen were detected and observed on the first, fifth and ninth days after transplantation. **Results** The hepatocytes obtained through portal vein perfusion had higher yield ($P=0.014$), purity ($P=0.010$) and viability ($P=0.001$) than the cells by inferior vena cava perfusion. The serum levels of ALT ($P=0.02$) and AST ($P=0.01$) were obviously declined in the 2 treatment groups than in the control, with the portal vein group more significant. On the ninth day after cell injection, laser confocal immunofluorescence microscopy displayed that the intensity of albumin was stronger in the portal vein group than the inferior vena cava group. HE staining indicated that the hepatic cells in the portal vein group were normal in morphology and clear in structure, but the cells in the inferior vena cava group fuzzy were indistinct in cell structure and vague in the organelles. **Conclusion** The hepatocytes obtained through portal vein perfusion are superior to the cells by inferior vena cava perfusion in the yield, purity and viability, and also in the treatment of ALI in mice.

[**Key words**] portal vein; hepatic inferior vena cava; hepatocyte intrasplenic transplantation; acute liver injury

Corresponding author: Li Dewei, E-mail: lidewei406@sina.com

[通信作者] 李德卫,E-mail:lidewei406@sina.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140918.0842.009.html(2014-09-18)

肝细胞移植被认为是治疗急、慢性肝功能衰竭,以及各种终末期肝病安全、有效的方法[1-3]。目前供肝严重短缺,肝细胞移植为患者提供暂时、有效的肝功能支持,为患者争取等待供肝时间。目前体外分离、培养肝细胞已广泛应用到病毒学、药理学等领域。本实验通过对比门静脉与下腔静脉2种不同灌注方法提取小鼠肝细胞,将2种不同灌注途径所获得的肝细胞移植到同种异体60%肝脏切除小鼠的脾脏,观察2种灌注方法所得肝细胞脾内移植治疗小鼠急性肝损伤(acute liver injury,ALI)的疗效。

1 材料与方法

1.1 动物及试剂

56只成年昆明小鼠,雌雄各半,体质量25~30 g,由重庆医科大学实验动物中心提供,实验动物许可证号:SCXK(渝)2007-0001。饲养条件:20~25 ℃,充足的水和食物。实验过程中对动物的处理符合医学伦理学标准。

实验试剂:胶原酶Ⅳ(美国Sigma公司),D-gal(重庆医科大学化学教研室),兔抗小鼠白蛋白单克隆抗体(美国Abcam公司),D-Hank's、Hank's液(北京Solarbio公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 急性肝损伤小鼠模型建立 42只昆明小鼠3%水合氯醛腹腔麻醉后,碘伏消毒皮肤,沿腹白线逐层开腹,暴露肝脏,分叶顺次无菌切除小鼠肝脏的左外叶、左中叶和右中叶,建立肝脏大部切除的ALI模型[4-6]。

1.2.2 经门静脉灌注提取肝细胞 7只昆明小鼠做肝细胞移植供体,1只供体小鼠的肝细胞供给2只受体小鼠。小鼠肝细胞分离采用Seglen改良两步法,3%水合氯醛腹腔麻醉,常规消毒,分离门静脉,门静脉下留置6-0丝线5 cm,5.5# Y型留置针穿刺门静脉,成功穿刺后丝线固定留置针,退出金属针头。通过门静脉插管灌注37 ℃ D-Hank's液2 mL,阻断肝动脉、上腔静脉、下腔静脉、肝总管,换用37 ℃含0.05%胶原酶Ⅳ的Hank's液2 mL灌注4 min,肝脏表面出现裂纹后剪下肝脏,置于冰浴UW液中,100目网晒过滤,低温离心后制成肝细胞悬液[7-9]。

1.2.3 经下腔静脉灌注提取肝细胞 7只昆明小鼠做肝细胞移植供体,1只供体小鼠的肝细胞供给2只受体小鼠。肝细胞分离采用Seglen改良两步法[7-9]。通过下腔静脉插管灌注D-Hank's液及换用含0.05%胶原酶Ⅳ的Hank's液,余操作同1.2.2。

1.2.4 经门静脉、下腔静脉灌注提取小鼠肝细胞产量、纯度、存活率比较 显微镜下用血细胞计数板计数肝细胞悬液细胞产量,计算单位体积肝细胞的纯度=红细胞/肝细胞×100%;用体积分数为0.4%台盼蓝与肝细胞悬液体积比=1∶9的比例混合,细胞存活率=未着色细胞/细胞总数×100%。

1.2.5 肝细胞移植 ALI建模3 d后,建模成功的42只小鼠分为3组,分别为门静脉组、下腔静脉组、对照组,每组14只。3%水合氯醛腹腔麻醉后,碘伏消毒皮肤,沿原有切口开腹,暴露脾脏,门静脉组脾内注射经门静脉灌注所得肝细胞悬液0.1 mL(1.0×10^6),下腔静脉组脾内注射经下腔静脉灌注所得肝细胞悬液0.1 mL(约1.0×10^6),对照组脾内注射D-Hank's液0.1 mL,细线结扎穿刺点,缝合皮肤。模型成功率100%。

1.2.6 各组肝功能变化 移植第1、5、9天,每组随机取4只昆明小鼠经颈动脉采血,分别检测肝功能谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST),观察肝功能的变化情况。

1.2.7 组织学检测 移植第9天,取下小鼠脾脏,4%多聚甲醛固定24 h,石蜡包埋,切片,HE染色,观察脾内移植肝细胞分布情况。

1.2.8 白蛋白免疫荧光检测 移植第9天,取下脾脏组织快速冰冻,6 μm连续切片;4%多聚甲醛固定;室温下解冻30 min;PBS水化2次,每次10 min;3% BSA封闭,30 min;加入Ⅰ抗兔抗大鼠白蛋白单克隆抗体孵育2 h,避光;PBS水化组织2次,每次10 min,避光,风干;60%甘油封片;共聚焦荧光显微镜观察荧光信号。

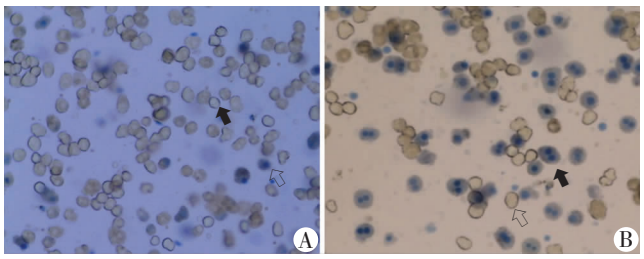
1.3 统计学分析

采用SPSS 22.0统计软件,对经门静脉、下腔静脉灌注提取肝细胞产量、纯度、存活率比较采用独立样本t检验,对各组不同时间点的比较采用方差分析。

2 结果

2.1 经门静脉、下腔静脉灌注提取肝细胞产量、纯度、存活率比较

经双侧t检验,门静脉组的产量、纯度、存活率显著高于下腔静脉组($P<0.05$,图1、表1)。



A:门静脉组(⬆:存活肝细胞;⇧:死亡肝细胞);B:下腔静脉组(⬆:死亡肝细胞;⇧:存活肝细胞)

图1 2种灌注方法提取肝细胞 (×100)

表1 经门静脉、下腔静脉灌注提取肝细胞产量、纯度、存活率比较($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

组别	产量(10^7/mL)	纯度(%)	存活率(%)
门静脉组	8.490±1.211	85.401±2.729	82.402±2.458
下腔静脉组	7.506±1.192	78.001±1.953	75.201±2.613
P值	0.014	0.010	0.001

2.2 2种灌注方法肝细胞脾内移植对ALI小鼠肝功能的影响

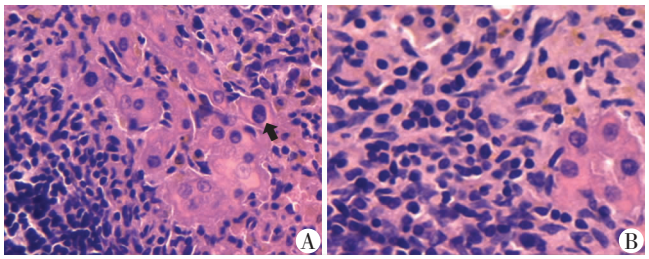
治疗组ALT、AST均值下降幅度远远高于对照组,且门静脉组下降幅度高于下腔静脉组($P<0.05$),且随着时间的增加,疗效越来越显著(表2)。

表 2 2 种灌注方法肝细胞脾内移植对 ALI 小鼠肝功能的影响($n=5$, UI/L)

组别	ALT			AST		
	1 d	5 d	9 d	1 d	5 d	9 d
门静脉组	501.39 ±1.237	400.62 ±0.916	320.30 ±2.138	543.34 ±1.784	455.59 ±2.107	384.47 ±1.237
下腔静脉组	568.88 ±0.913	488.72 ±0.843	398.85 ±1.794	597.61 ±1.290	515.86 ±1.648	430.29 ±1.649
对照组	614.05 ±0.805	553.44 ±1.689	464.01 ±0.914	650.66 ±1.089	578.21 ±0.904	542.20 ±1.287
P 值	0.03	0.02	0.02	0.02	0.01	0.01

2.3 2 种灌注方法肝细胞脾内移植对 ALI 小鼠肝脏组织学的影响

移植后第 9 天,HE 染色光镜下门静脉组可见脾脏有散在肝细胞分布,肝细胞形态正常,结构清楚,细胞质丰富,圆形或椭圆形核位于中央,还可见双核,细胞核膜清楚,核仁 1 ~2 个,核仁较大。下腔静脉组小鼠脾脏内移植的 S 肝细胞结构模糊,细胞器显示不清,细胞器变形、肿大,细胞核碎裂(图 2)。

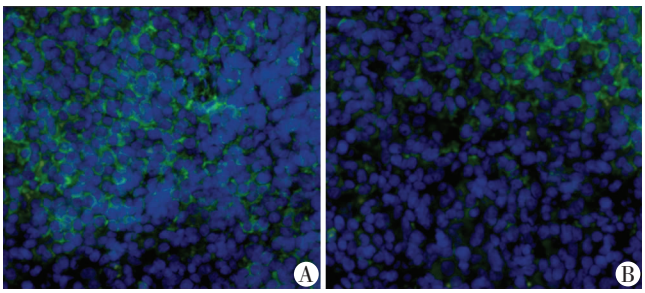


A:门静脉组,箭头示脾内存活肝细胞;B:下腔静脉组

图 2 2 种方法灌注所得肝细胞脾内移植 HE 染色观察 (×100)

2.4 2 种灌注方法肝细胞脾内移植对 ALI 小鼠肝脏白蛋白免疫荧光表达的影响

移植术后第 9 天,门静脉组、下腔静脉组白蛋白免疫荧光均可见脾脏内有绿色荧光阳性表达,证实脾内移植的肝细胞具有合成白蛋白的功能,且门静脉组脾内表达的白蛋白数量要大于下腔静脉组(图 3)。



A:门静脉组;B:下腔静脉组

图 3 2 种方法灌注所得肝细胞脾内移植白蛋白荧光观察 (×100)

3 讨论

自 Seglen 肝脏原位两步灌流法提出以来,大鼠肝细胞分离方法日趋成熟,但该方法主要应用于大鼠等实验动物。小鼠下腔静脉较粗,易于插管操作,因此小鼠肝细胞的提取、培养常选用下腔静脉灌注,而门静脉较细,相对下腔静脉插管成功率较低。本实验通过多次练习,采用 5.5# Y 型留置针成功进行门静脉穿刺灌注,留置针针管细且金属针头可抽出,提高了穿刺成功率,且减少对门静脉的损伤。将 2 种不同灌注途径所获得的肝细胞移植到同种异体 60% 肝脏切除小鼠的脾脏,观察 2 种灌注方法所得肝细胞脾内移植治疗 ALI 小鼠的效果。

肝脏由门静脉、肝动脉双重供血:1/4 的血液来自肝动脉,3/4 来自门静脉。经由门静脉灌注,预先结扎肝动脉,灌注的 D-Hank's 液顺应血流方向,充分冲洗肝内红细胞,不易形成血栓,从而提高分离所得肝细胞的纯度;且利于胶原酶消化,提高分离所得肝细胞存活率、产率。而下腔静脉灌注则由于是逆血流方向,且分支较多,肝脏灌注不充分,大量红细胞存积容易形成血栓导致灌注胶原酶不充分,影响胶原酶消化,影响分离肝细胞的存活率和产率[10]。

研究表明,当受体肝脏受到损伤后可以刺激一些细胞因子促进移植肝细胞的增殖。本实验采用部分肝脏切除,建立急性肝脏损伤的模型,主要切除小鼠肝左外叶、左中叶和右中叶合计约占小鼠肝脏总质量的 60%,本实验通过肝叶切除诱导小鼠肝功能损伤模型,移植后 2 组在改善小鼠的肝功能方面与对照组比较差异有统计学意义,提示 2 组脾内移植的肝细胞提供了肝功能支持,且门静脉组肝功支持显著优于下腔静脉组。移植后 2 组脾脏内白蛋白免疫荧光均可见脾脏内有绿色荧光阳性表达,说明移植到脾脏的肝细胞存活且有合成白蛋白的功能,且定性分析门静脉组分泌强于下腔静脉组。

肝细胞移植所致的免疫排斥反应中起主要作用的是组织相容性抗原(MHC),Fondevila 等[10]研究无免疫抑制剂的情况下纯化的肝细胞移植效果,发现纯化的肝细胞可降低免疫原性。通过门静脉灌注所得肝细胞的纯度明显优于下腔静脉灌注组,HE 染色显示下腔静脉组小鼠脾脏中移植的肝细胞被巨噬细胞吞噬后的细胞碎片,形成大片的坏死区,门静脉组脾内肝细胞形态规则、细胞结构清晰。2 种不同的灌注方法所得的肝细胞主要差异在于肝细胞的纯度、存活率,下腔静脉灌注法所得的肝细胞中混杂着大量红细胞,红细胞在移植过程中容易引起抗原免疫排斥反应,移植到体内的肝细胞容易水肿、变性、液化坏死,从而影响移植后的疗效。

本研究发现经门静脉灌注所得肝细胞的产率、纯度、存活率优于经下腔静脉灌注分离的肝细胞,经门静脉灌注所得肝细胞脾移植治疗ALI效果优于经下腔静脉灌注所得,其推广应用尚需更多的研究验证。

参考文献:

[1] Hughes R D, Mitry R R, Dhawan A. Current status of hepatocyte transplantation[J]. Transplantation, 2012, 93(4): 342-347.

[2] Lucifora J, Vincent I E, Berthillon P, *et al*. Hepatitis B virus replication in primary macaque hepatocytes: crossing the species barrier toward a new small primate model[J]. Hepatology, 2010, 51(6): 1954-1960.

[3] 郭晓钟, 刘旭, 王迪, 等. 自体骨髓干细胞移植对不同病因肝硬化的疗效研究[J]. 中华消化杂志, 2011, 31(1): 53-54.

[4] 马明, 盛哲津, 张梦杰, 等. 小鼠动物实验方法系列专题(二)肝脏大部分切除实验在小鼠肝再生研究中的应用[J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(2): 112-118.

[5] Masseroli M, Ghisalberti G, Ceri S. Bio Search Computing: Bioinformatics web service integration for data-driven answering of complex Life Science questions[J]. Procedia Computer Science, 2011, 4: 1082-1091.

[6] Liang J, Naveed H, Jimenez-Morales D, *et al*. Computational studies of membrane proteins: models and predictions for biological understanding[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1818(4): 927-941.

[7] Li W C, Ralphs K L, Tosh D. Isolation and culture of adult mouse hepatocytes[J]. Methods Mol Biol, 2010, 633: 185-196.

[8] 王燕, 周露婷, 章卫平, 等. 高活力原代小鼠肝细胞的分离与纯化[J]. 医学研究杂志, 2011, 40(3): 28-31.

[9] Ye J F, Zhu H, Zhou Z F, *et al*. Protective mechanism of andrographolide against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice[J]. Biol Pham Bull, 2011, 34(11): 1666-1670.

[10] Fondevila C, Hessheimer A J, Flores E, *et al*. Step-by-Step guide for a simplified model of porcine orthotopic liver transplant[J]. J Surg Res, 2011, 167(1): e39-e45.

(**收稿**:2014-04-13;**修回**:2014-08-28)

(编辑 邓强庭)

个案与短篇

文章编号:1000-5404(2014)21-2210-01

军团菌肺炎并发尿崩症1例

汪 松[1],雷乾兰[1],龙仙萍[2],段海真[1],喻安永[1],肖 雪[1]

(563003 贵州 遵义,遵义医学院附属医院:急诊科[1],心内科[2])

[**关键词**] 军团菌肺炎;尿崩症

[**中图法分类号**] R517.9 [**文献标志码**] B

军团菌广泛存在于自然界水源中,感染后主要引起肺炎和肺外器官损害,临床表现各异,目前世界多个国家和地区均有军团菌病的报道[1],但军团菌肺炎并发尿崩症目前国内外文献尚少见报道。本院收治1例,现报告如下。

1 临床资料

患者女性,60岁,因"咳嗽、咳痰3 d,伴间隙高热1 d"于2012年11月3日入急诊病房。3 d前因受凉后出现咳嗽、咳痰、呼吸困难,1 d前出现纳差、恶心、乏力、发热,体温最高40 ℃。查体:体温36.6 ℃,脉搏93次/min,呼吸23次/min,血压80/50 mmHg。神志清楚,精神萎靡,脉搏细弱。口唇轻度发绀,双肺部可闻及大量湿啰音,心率93次/min,四肢冰凉,其余(-)。检查:血常规:白细胞9.61×10^9/L。血气分析:氧分压54.2 mmHg,二氧化碳分压27.3 mmHg,未吸氧血氧饱和度82%。中心静脉压波动在2~5 cmH_2O。胸部CT:左肺上叶团块及双肺多发结节病变,双侧胸腔少量积液。入院后予以头孢西丁抗感染、抗炎、吸氧、扩容、升压等处理,血压升至107/67 mmHg,吸氧4 L/min血氧饱和度维持在94%~96%。11月4日开始尿量增多,24 h尿量1 900 mL,11月6日达到高峰为7 700 mL。曾于11月5日出现3次痰中带血,量约3~5 mL/次。血间接荧光抗体嗜肺军团菌IGM 2次阳性,支原体、流感病毒等IGM阴性。11月9日复查胸部CT无好转,双侧胸腔积液增多。患者被诊断为:重症军团菌肺炎、急性呼吸衰竭、脓毒症休克、尿崩症。11月9日开始予以左氧氟沙星加阿奇霉素静脉滴注,限制液体摄入,去氨加压素4 μg肌肉注射2次/d,氢化可的松琥珀酸钠0.2 g静脉滴注。11月11日查血渗透压280~300 mOsm/kg,尿渗透压328~364 mOsm/kg,尿比重1.005。11月12日咳嗽、咳痰、呼吸困难较前好转。11月20日无咳嗽、咳痰、咯血等,肺部未闻及干湿啰音,尿量正常,好转出院。

2 讨论

军团菌是社区或医院获得性肺炎的重要病原体,尤其在重症感染病例[2]。流行病学调查发现,军团菌肺炎的发病率有上升趋势,2000-2009年,美国50个州和哥伦比亚特区向法定传染病监测系统上报22 418例军团菌肺炎患者,从0.39/10万人增加到1.15/10万人,发病率增加192%,有74%的患者≥50岁[3]。其临床表现无特异性,包括发热、咳嗽、头痛、肌肉疼痛、呼吸困难、腹泻、精神错乱等,很难和其它肺炎区分开来[4],临床上应给予重视。

(下转2215页)

[**通信作者**] 肖 雪,E-mail:ws0715@163.com

[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141020.1013.004.html(2014-10-20)