维普资讯 http://www.cqvip.com

18-23 脾;保留;切除术;疟原虫;免疫学;形态

局解手术学杂志 1995 年第 4 卷第 1 期总第 13 期

小鼠脾保留、脾切除抗疟原虫感染的免疫作用及形态改变的实验研究

第三军医大学应用解剖与手术学教研室 侯会池 陈维佩

(四川重庆，邮政编码 630038)

R657.6
R602

A

[提要]采用非致死性约氏疟原虫感染是研究脾脏功能和形态改变的一个很好的实验模型，具有简便易行，重复性好，结果可靠等优点。非致死性疟原虫感染的保脾组小鼠，依据红细胞感染率，血中^{51}Cr－RBC 残存率，脾脏^{51}Cr－RBC 清除率，血清抗体水平等动态变化，可分为三期：早期呈现微弱的保护性免疫力，中期已有一定保护性免疫力，晚期表现有效的保护性免疫力。非致死性疟原虫感染的切脾组动物的外周血红细胞感染在 30 天仍不能转阴，抗疟抗体（IgG）下降，血内^{51}Cr－RBC 残存率升高，外周血红细胞计数持续性降低，小鼠在短期内不能痊愈。半脾切除后剩余的半脾能够替代正常的脾脏，在抗疟抗体（IgG）的生成，血内^{51}Cr－RBC 残存率及单位重量脾组织对^{51}Cr－RBC 的清除等方面与假手术组无差异。半脾组织薄片自体大网膜内移植在抗疟抗体（IgG）生成，血内^{51}Cr－RBC 残存率和单位重量脾组织^{51}Cr－RBC 清除等方面，能够替代部分脾功能，明显优于全脾切除组。非致死性疟疾感染的脾移植小鼠能够自愈，贫血可以改善。组织学动态观察半脾切组、脾移植组和假手术组的脾脏，提示在感染染中期红髓内形成血－脾屏障，阻断了正常的血流途径，保护了脾脏内 M_ϕ、淋巴细胞、单核细胞、浆细胞和造血原始细胞的增生分化，而晚期血－脾屏障的开放，大量成熟 M_ϕ、淋巴细胞、浆细胞等进入血液循环，使外周血疟原虫短期内消失，贫血改善。脾窦内皮细胞在感染的不同时期增生，萎缩，其间隙的增宽、变窄、构成了血－脾屏障的一部分。

[关键词]小鼠；脾；疟原虫；免疫；形态；研究。

基于人们对脾脏功能和脾切除后易发生“OPSI”的认识，如何保留脾脏成为临床和实验研究的焦点，国外在 60 年代、国内 70 年代已广泛开展各种保脾手术，但保留脾组织体积多少为妥，各家观点不一。自体脾组织移植对机体的作用怎样，能否替代正常脾脏的功能，尚无定论。本实验通过建立小鼠约氏疟原虫感染的动物模型，观察了全脾保留、全脾切除、半脾切除和脾切除后半脾自体大网膜移植等与脾脏有关的指标，并对脾脏在感染后不同时期进行组织学观察，探讨了脾脏在急性疟原虫感染中所发挥的作用和移植脾组织的代偿作用程度，为临床脾脏组织保留和脾脏移植提供基础研究资料。

材料与方法

一、材料 动物分组：健康昆明株小白鼠 336 只，随机分为全脾切除组、半脾切除组、脾移植组、假手术组、初次感染后切脾组和初次感染后假手术组。动物分组及准备见表 1。

约氏疟原虫（Plasmodium yoelii yoelii）：由本校寄生虫教研室提供。

羊抗鼠 IgG 荧光抗体：由中国军事医学科学院微生物流行病研究所提供。

铬酸钠－^{51}Cr 注射液：中国科学院原子能研究所提供。

846 复麻液：中国人民解放军兽医大学军事兽医研究所和军事医学科学院药理毒理研究所研制。

二、动物模型的建立

1. 脾脏手术方式

动物在 846 复麻液腹腔麻醉下，剖腹探查，Ⅰ组切除全脾；Ⅱ组切除游离端半

11160(8)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1. 实验动物分组

组别	动物数（只）	动物准备
全脾切组（Ⅰ）	72	Ⅰ—Ⅳ组动物按要求进行手术，术后三个月各组分别接种疟原虫，其中非致死性疟原虫感染 60 只，致死性疟原性感染 12 只。
半脾切组（Ⅱ）	72	
脾移植组（Ⅲ）	72	
假手术组（Ⅳ）	72	
初次感染后全脾切组（Ⅴ）	24	Ⅴ、Ⅵ组动物接种非致死性疟原虫，一个月动物康复后进行手术，15 天后再次感染致死性疟原虫。
初次感染后假手术组（Ⅵ）	24	

脾；Ⅲ组切除全脾，将游离端半脾剪成 2×1×1mm³ 的脾小块，包埋于大网膜内；Ⅳ组不切脾；Ⅴ组、Ⅵ组接种疟原虫，一个月后Ⅴ组切除脾脏，Ⅵ组作为假手术对照。

2. 疟原虫感染：(1) Ⅰ—Ⅳ组动物术后三个月，动物腹腔接种感染约氏疟原虫，造成小鼠急性非致死性疟疾感染和急性致死性疟原虫感染。(2) Ⅴ组、Ⅵ组动物腹腔内初次接种疟原虫，一个月后进行手术，术后 15 天再次接种感染。

三、观测指标：1. 红细胞计数；2. 红细胞感染率：外周血感染红细胞所占比例；3. 间接免疫荧光抗体（IFA）试验：IFA 法测定小鼠血清抗疟抗体（IgG）滴度；4. ^{51}Cr 标记异种红细胞测 血液残存率及主要脏器的清除率；5. 大体解剖及组织学观察：应用透射电镜、扫描电镜和光镜观察组织结构改变。

四、数据处理：数据均以 $\bar{x}\pm S$ 表示，经方差齐性检验后，用单因素及双因素方差分析进行处理（采用本校数学教研室编制的数据统计程序包）。

结　果

一、小鼠感染疟疾后的发病过程

1. 非致死性感染的各组动物于接种后第 1～6 天一般状况尚佳；第 7 天开始精神差，食欲减退，活动少、毛发竖立，以 11～19 天最为严重。脾切除组动物发病早，症状重，病程长，恢复慢，脾移植组次之，半脾切除组稍轻，假手术组发病迟，症状轻，病程短，恢复快。

2. 致死性感染的各组动物接种后第 3 天精神差，食欲减退，第 3 天开始死亡，于第 15 天全部死亡。

二、小鼠感染疟疾后外周血红细胞计数变化

感染疟疾的四组（Ⅰ—Ⅳ）小鼠外周血红细胞计数均明显减少，一个月内尚未恢复正常。假手术组和半脾切除组在接种后第 18 天外周血红细胞计数最低，以后呈回升趋势，脾移植组在接种第 24 天最低，以后略有恢复，全脾切除组则持续下降。

三、感染疟疾的四组（Ⅰ—Ⅳ）小鼠外周血红细胞感染率的变化

1. 初次感染　非致死性感染：根据约氏疟原虫在昆明株小鼠外周血中红细胞的感染率，将初次感染过程分为感染早期、感染中期和感染晚期。在感染 18 天后，切脾组红细胞感染率明显高于保留脾组。致死性感染后第 3 天动物精神差并开始死亡，各组动物外周血红细胞感染率均较非致死性小鼠为高，各组动物的平均存活时间以全脾切组最长，脾移植组次之，半脾切组较短，假手术组最短，但四组之间无差异。

2. 再次感染　再次致死性感染后小鼠无死亡，与第一次感染比较，外周血原虫出现晚，消失早，红细胞感染率峰值低，切

维普资讯 http://www.cqvip.com

脾组红细胞感染率均高于假手术组。

四、小鼠感染疟疾后血中抗疟抗体（IgG）的变化

结果表明各组小鼠初次腹腔感染约氏疟原虫后血清中抗疟抗体（IgG）呈动态变化，在第6天各组1:20稀释均为阴性，以后各组呈上升趋势，全脾切组小鼠血清抗疟抗体（IgG）滴度明显低于假手术组和半脾切组。再次感染切除脾组小鼠血清抗体IgG明显高于初次感染切脾组小鼠。

五、各组感染小鼠血中^{51}Cr—RBC残存率及主要脏器的清除率

1. 各组感染小鼠血中^{51}Cr—RBC残存率

结果表明各组感染小鼠血中^{51}Cr—RBC残存率随着感染的时间而呈动态变化，脾保留各组均在感染晚期（21天）最低，而全脾切组在接种后第12天最低。

2. Ⅰ—Ⅳ组感染小鼠单位重量脾组织^{51}Cr—RBC清除率

半脾切组和假手术组在接种感染后的第6、12、15天每克脾组织对^{51}Cr—RBC的清除无差异，而在第21天，其清除率分别明显提高10～29倍和2～3倍；脾移植组每克脾组织在感染后的第6、12、15、21天对^{51}Cr—RBC的清除率无差异。Ⅰ—Ⅳ组小鼠感染后第6、12、15天每克脾组织对^{51}Cr—RBC的清除率无差异，在感染后21天，半脾切组和假手术组清除率明显高于脾移植组。

3. 各组感染小鼠^{51}Cr—RBC肝脏、肺脏清除率

各组小鼠肝脏和肺脏对^{51}Cr—RBC的清除率达峰值的时间不同，经双因素方差分析各组小鼠肝脏和肺脏对^{51}Cr—RBC的清除均不受切脾因素的影响，表明脾切除后肝脏、肺脏对^{51}Cr—RBC清除不具有代偿吞噬功能。

4. 再次感染小鼠血内^{51}Cr—RBC残存率

小鼠感染疟疾后第12天脾脏对^{51}Cr—RBC的清除呈抑制状态，再次感染后也呈抑制状态。

六、大体解剖及组织形态学观察

1. 大体解剖：脾保留各组在感染早期脾脏肿大，明显充血，表面光滑、质软、易碎裂，晚期脾脏呈灰褐色，较硬，富有韧性，弹性差，表面光滑。移植组的脾脏成活良好，呈鲜红色，被大网膜所包裹，较假手术组脾脏硬，具有较大韧性，腹腔内无游离的脾组织种植块，移植的脾组织无坏死及化脓。

2. 光镜观察结果：脾保留组动物的脾脏在疟原虫感染后显示不同程度的病变，以移植脾的改变最为明显。感染早期脾小体萎缩，生发中心缩小或消失，脾窦及小血管淤血，少数MØ多位于脾被膜下或移植组脾组织的边缘。感染中期脾小体萎缩更加明显，MØ较感染早期增多，散在脾实质内，疟色素沉着增多，成片状。移植的脾组织内可见纤维组织向脾实质内生长，感染晚期脾组织病变趋向恢复，MØ较多，体积明显增大，成为多核巨细胞，散在或聚集，其中移植组脾组织病变恢复较半脾切除组和假手术组慢，但组织存活良好，结构趋于正常。

3. 电镜观察结果：各组动物脾脏的超微结构变化基本一致。

（1）TEM：感染早期白髓内充满大量的淋巴细胞和少量浆细胞，部分淋巴细胞向母细胞转化，浆细胞胞浆内含大量粗面内质网和线粒体。红髓内受刺激的网状细胞胞核增大，胞浆内有发育良好的内质网，网状细胞伸出分枝，深入细胞间脾索内可见原始红细胞和巨核细胞。

感染中期白髓向母细胞转化的淋巴细胞数目增多，浆细胞胞浆内线粒体、粗面内质网更加丰富，红髓内受刺激的网状细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞核增大，核仁明显，胞浆内有大小不等的小泡，线粒体增多，并可见少量中间丝样、巨噬细胞增多，功能活跃，胞浆内含大量线粒体、粗面内质网和初级、次级溶酶体，可见被MØ包裹的RBC上有庞状突起，并可见网织红细胞。移植的脾组织较之半脾切除和假手术组的脾组织，含有较多的纤维细胞。

感染晚期白髓改变与感染中期大致相同，脾索内MØ数目较前明显增多，可见被MØ吞噬破坏的RBC及受疟原虫和其代谢产物刺激形成的多核巨细胞和嗜酸性粒细胞。

(2) SEM：白髓变化不明显，淋巴细胞密集，其大小均匀一致，表面有绒毛样突起。红髓在感染早期脾窦扩张，内含各种血细胞，网状细胞与网状纤维初步构成支架，窦内皮细胞界限不清，有大量网眼，脾窦所占比例高于脾索。在感染中期脾索明显增厚，内皮细胞所形成的网眼较前明显缩小，脾索占据大部分空间，在感染晚期，脾窦内皮细胞增生，体积增大，表面光滑，形成很多皱折，细胞连接紧密。

讨　论

一、动物实验模型：本实验设计了小鼠不同保留术式的[illegible]手术和疟疾感染的实验模型，证明全脾手术简便易行，手术死亡率低，副脾移植采用大网膜内移植，成活率高，脾组织不易播散，便于检测。

在疟原虫感染实验中，用小量（3×10^5）感染约氏疟原虫的红细胞（RBC）腹腔接种能建立非致死性疟疾感染的动物模型，无论是脾保留组和脾切除组，小鼠外周血红细胞感染率上升速度较快，下降又较平稳。本实验建立的动物手术和疟原虫感染模型具有稳定性好，重复性强的特点，为动态地系统地观察脾脏抗疟作用的多种指标提供了必要条件。

二、脾脏切除对机体抗疟原虫感染的影响

(一) 动物死亡率和外周血红细胞感染率：对致死性感染小鼠，脾脏切除使小鼠平均存活时间延长，但与脾保留组无差异；对非致死性约氏疟原虫感染的脾切除组动物，其外周血红细胞感染率在接种后的早、中、晚期均较假手术组高，在接种后第30天仍不消失，而假手术组在感染后的第24天其红细胞感染率转阴，第27天、30天复查仍为阴性，和Quinn等所得结果一致。本实验中两组（Ⅴ、Ⅵ）动物再次接种致死性约氏疟原虫，不引起动物死亡，其外周血红细胞感染率较初次感染低，说明小鼠经初次非致死性感染已具有一定免疫力。

(二) 吞噬清除能力：本实验采用测定^{51}Cr标记异种红细胞，假手术组半脾组动物的脾脏对^{51}Cr－RBC的清除在晚期突然升高，血内^{51}Cr－RBC残存率在晚期降低，而切脾组动物在感染后第6天血内^{51}Cr－RBC残存率最高，第12、15和21天无明显改变，说明动物有脾和无脾对^{51}Cr－RBC的清除有明显差别。再次感染后，假手术组动物外周血^{51}Cr－RBC明显低于切脾组，说明再次感染时，脾脏在清除^{51}Cr－RBC方面发挥重要作用。与此同时未发现切除脾脏动物的肝脏和肺脏对^{51}Cr－RBC清除率升高现象，说明肝脏和肺脏未发生代偿吞噬作用。本实验结果与wyler等资料基本一致。

(三) 抗体生成：小鼠初次非致死性感染后，假手术组动物血清抗疟抗体在中、晚期保持较高水平，而切脾组小鼠则明显减少，在接种感染后第10、14、18、24、30天均较假手术组低。本实验初次感染后切除脾脏后再次感染血清抗体较初次感染全切脾组（Ⅰ组、切脾后感染）明显提高，结果提示脾脏在抗体生成过程中具有重要作用，切除脾脏能使抗体生成量下降，本实验

维普资讯 http://www.cqvip.com

证实保脾组小鼠在初次感染时在早、中期，抗体水平较低，巨噬细胞的吞噬作用比较弱，表现为血中^{51}Cr－RBC 残存率高，脾组织的^{51}Cr－RBC 清除率低，但到晚期在高水平抗体的介导下，巨噬细胞的吞噬功能发挥较大作用，表现为中^{51}Cr－RBC 残存率低，脾组织的^{51}Cr－RBC 清除率高。而全脾切组动物感染后早、中、晚期血清抗体均处于低水平状态，吞噬功能也大大降低，表现为血中^{51}Cr－RBC 残存率持续较高水平。

三、半脾保留及自体脾组织移植在抗疟疾感染中作用

本实验中首次应用疟原虫攻击小鼠较系统地观察半脾切除及半脾自体大网膜内移植的脾脏功能变化后发现：半脾组在最大抗体产生量方面与假手术组无差异，在每克脾组织清除^{51}Cr－RBC 方面，半脾切组的最大值超出假手术组最大值；对于血内^{51}Cr－RBC 残存率的影响，除感染后第 15 天半脾切除较假手术组高以外，感染后第 6、12、21 天与假手术组无差异。在非致死量疟疾感染后，半脾切组同样能够在感染后的第 27 天自愈，感染后小鼠红细胞计数在第 18 天呈上升趋势并与假手术组比较无差异。感染后早、中、晚期光电镜变化与假手术组相似，说明半脾保留组能够替代全脾发挥抗疟原虫感染的作用。

脾移植组采用的半脾薄片法自体大网膜内移植，术后脾组织成活率高，术后 12 周，光镜检查有血管生长，可见典型的红、白髓结构，动物血清抗疟抗体（IgG）在感染后的第 10、14、18、24、30 天均低于假手术组，但明显高于脾切除组，与半脾切除组无差异；每克脾脾组织对^{51}Cr－RBC 清除率，在感染后的第 6、12、15 天与假手术组及半脾切组无差异，在第 21 天，明显低于假手术组和半脾切除组；血内残存^{51}Cr－RBC 方面，在感染第 12、15 天明显高于假手术组和半脾组，非致死性约氏疟原虫感染后脾移植组能够自愈，第 30 天外周血红细胞感染率转阴，而全脾切除后其红细胞感染率在感染后第 30 天为 2%。外周血红细胞计数在第 24 天有上升趋势，而脾全切组呈持续下降。

观察各组术式脾保留的实验结果，认为疟原虫性脾肿大的处理，从保留脾脏的免疫功能观点出发，以内科药物治疗为宜，如巨脾症或脾破裂需要外科手术时，则以半脾保留为首选措施，如不能保留，则采用自体脾组织移植。

四、脾脏组织学的改变及意义

本实验电镜观察，在感染早期网状细胞胞核增大，胞浆突出成分支，与网状纤维形成支架，同时脾窦扩张淤血，尤如“峰窝状”，脾窦内皮细胞间隙增宽；感染中期网状细胞核增大，核仁明显，胞浆内可见大小不等小泡，内质网扩大，分支更长，各网状细胞之间，网状细胞与网状纤维之间，相互连接成网，网眼较前缩小，血细胞（如淋巴细胞、浆细胞，M∅，网织细胞）聚集在网架内，同时外周血表现红细胞感染率升高，提示此时形成血—脾屏障，血—脾屏障一方面阻止 PRBC 流经脾索，保护了脾索内淋巴细胞，单核细胞，浆细胞、M∅，和造血原始细胞的增殖分化，另一方面由于 PRBC 不流经脾索，导致“暂时性脾功能丧失”，使外周血红细胞感染率持续上升、贫血进行性加重；在晚期网状细胞渐恢复常态，脾窦内皮细胞出现明显增生，大量 PRBC，发育成熟的网织细胞，淋巴细胞，单核细胞，浆细胞等进入外周血液循环，巨噬细胞捕捉吞噬红细胞，并形成多核巨细胞，光镜下见多核巨细胞明显增多，疟色素大量沉积，外周血红细胞感染的下降和贫血的改善等均提示血—脾屏障的开放。本实验结果与 Weiss 报道一致。因此，推测血—脾屏障可能为脾脏中处于小血管血流与

骨关节炎,膝关节,关节不稳定,兔,实验动物,

维普资讯 http://www.cqvip.com

脾脏微循环血流之间的组织结构总体，其中滤过床、巨噬细胞等各种血细胞以及脾窦内皮细胞和其不完整的基底膜，共同形成了血—脾屏障。其主要作用为保护脾内微循环的相对稳定，有利于血细胞的生成、发育、转化。因本实验中未进行脾脏的血液变学的研究，其详细的机制有待进一步深入探讨。

参考文献 略

（收稿：1994—06—02）

23—24

关节不稳定诱发家兔膝关节骨关节炎的实验研究

中国医科大学第一临床学院 路 磊 王 竞

（辽宁沈阳，邮政编码 110001）

R684.302

骨关节炎是以关节软骨及软骨下骨退行性改变为特征的关节疾患，关节不稳定是其病因之一。本实验通过造成家兔膝关节不稳定，成功诱发膝关节骨关节炎。

材料与方法

1. 实验方法及观察指标：27 只雄性家兔，体重 2.5～3.5Kg，随机分为甲、乙、丙三组，每组九只。右膝为实验侧，左膝为对照侧，用氯胺酮以 40mg/Kg 肌肉注射麻醉。切除一侧髌韧带 4mm，切除同侧腓侧副韧带 3mm，将外侧半月板前半部切除 4mm。左膝关节仅切开皮肤，皮下作为对照。甲乙丙三组分别于术后 3、6、10 月拍 x 光片后取材。先行大体观察，再行 HE 染色，镜下观察。将实验组与对照组的骨关节炎评分均数行配对七检验。

结 果

一、大体观察：术后 3 周关节液增多，关节软骨糜烂。术后 6 周广泛糜烂，关节囊肥厚。术后 10 周关节软骨剥脱，并可见到斑片状骨外露及骨赘增生。

二、镜下观察：对照侧软骨表面光滑，软骨细胞层结构：表层、移行层、放射层及钙化层排列清晰，潮线完整。实验侧术后 3 周软骨细胞排列轻度紊乱，表层轻度糜烂，可见散在的软骨细胞簇及溃疡。术后 6 周软骨剥脱更明显，出现纵形裂隙及囊肿。术后 10 周的特征改变是大量软骨细胞缺失，骨软骨赘形成及大量骨外露，软骨下骨硬化，形成“象牙骨”。术后 3、6、10 周实验侧与对照侧骨关节炎评分七检验结果，差异非常显著。术后 x 光片显示：3 周双侧无明显差异，6 周关节间隙狭窄，10 周关节间隙明显狭窄并有骨硬化。

讨 论

目前，常用的造成膝关节不稳定的手术方法主要包括：切断内侧付韧带，切断前及后交叉韧带，切除内侧半月板及切除髌骨[1,2]。本实验将切除韧带与切除半月板结合，成功地诱发膝关节骨关节炎，且模型制作期限合理，病灶典型。术后病理表明：术后 3 周就出现了骨关节炎的早期改变，包括软骨细胞排列紊乱，表层轻度糜烂，可见散在的软骨细胞簇及局部溃疡。术后 6 周出现了明显的骨关节炎改变，6 周 x 线显示了关节间隙异常及胫骨上端变形。所以本实验结果显示，关节的不稳定是造成关节软骨破坏，形成骨关节炎的原因。由于膝关节韧带切断后关节软骨受的应力不均，关节软骨受到不规则的应力撞击，同时，应力的紊乱使得关节腔内滑液挤压不均，关节软骨得不到充分的营养，故而导致了关节软骨的破坏。这一损伤机制目前已广泛