DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.017

论著

文章编号:1000-5404(2003)10-0880-04

大鼠脂肪变性供肝移植的可行性研究

叶 晟,韩本立,董家鸿 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠脂变供肝用于肝移植的可行性及术前病理评估。方法 采用酒精加高脂、高胆固醇的喂饲方法诱导成大鼠不同级别和类型的脂变肝脏,通过双袖套、胆管端端缝合法的肝移植模型来评估适宜用于供肝的脂变肝脏。结果 Ⅲ级大泡脂变供肝术后存活率低,早期死于肝功能不全,肝细胞坏死多;Ⅰ级大泡脂变供肝术后生存率和正常供肝无异,脂变可较快地逆转;Ⅱ级大泡脂变供肝术后存活比正常供肝低(2周存活率66.7%),但检验尚无显著性差别,术后脂变不同程度减轻并有肝细胞再生(28 d),坏死较少;小泡为主的脂变供肝术后存活率反而较高。结论 Ⅲ级大泡脂变肝脏不宜用作供肝;Ⅰ级大泡或Ⅲ级小泡脂变肝脏可较安全地用于肝移植,术后脂变肝脏可较快地逆转;Ⅱ级大泡脂变肝脏用于肝移植时要考虑肝细胞坏死及缺血性损害因素;脂变肝脏炎症活动度计分大于2.7者术后存活低,采用此类供肝应慎重。

关键词:大鼠;脂变供肝;肝移植
中图法分类号:R575.5;R617;R657.3 文献标识码:A

Experimental study of the steatotic donor liver transplantation in rats

YE Sheng, HAN Ben-li, DONG Jia-hong (Institute of Hepatobiliary Surgery of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of fatty liver on graft survival, especially with reference to macrovesicular and microvesicular steatosis and to evaluate the relationship between histological grading and inflammation activity. Methods Different degrees of rat fatty liver model were established by feeding rats a diet consisting of 79% standard diet, 20% lard and 1% cholesterol. By modified two cuff vascular anastomoses and end to end suture for bile duct, rat orthotopic liver transplantation was performed to evaluate the relationship between donor histological grading and survival rate. Results Low survival rate of macrosteatosis (grade Ⅲ) was found. Most rats died of liver failure in early days after transplantation. Pathological findings showed frequent hepatic necrosis. There was no significant difference between macrosteatosia (grade Ⅰ) and the normal group. After transplantation, almost all of the fat was cleared by the end of the fourth week. Diminished steatosis and liver regeneration were found in macrosteatosis (grade Ⅱ), while microsteatotic donors had higher survival rate than the other groups except the normal group. Conclusion Macrovesicular steatosis (grade Ⅲ) affects graft survival and these steatotic livers should not be used as donors. However, steatotic livers with mild macrovesicular steatosis (grade Ⅰ) and microvesicular steatosis (grade Ⅲ) do not influe
damage should be considered when using livers of macrovesicular steatosis (grade Ⅱ). Donors with numbering score more than 2.7 are correlated with the poor survival.

Key words: rat; steatotic donor; liver transplantation

肝移植治疗终末期肝病已广泛开展,但人体供肝短缺的矛盾很突出。现已将传统的器官来源寻求到了极限,因此能否利用边缘供肝如脂变肝脏行肝移植以拓宽肝移植的供体库?据统计西方国家脂肪肝发病率较高,意外死亡尸检中占13%~28%,肝移植供肝中约占20%[1]。近年我国脂肪肝的发病率也日益增加,将来我国肝移植与国际接轨,加强交流与合作必将促使"脑死亡"的立法,加上活体肝移植的开展都会增加

作者简介:叶 晟(1968-),男,浙江省台州市人,博士,主治医师,主要从事肝移植的临床和基础方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68754000-73079

收稿日期:2002-06-26;修回日期:2002-12-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

脂变供肝的比例。因此, 哪些类型脂变供肝可用于移植? 其"易主"后病变可否"异地自愈"或改善? 等均未完全清楚。本研究采用大鼠脂肪变性肝设计了以下的实验。

1　材料与方法

1.1　实验动物及分组

同批同月龄 Wistar 雄性大鼠 116 只, 体质量(180±10) g, 第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物中心提供, 二级动物。随机选取 48 只分成 4 组供肝鼠, 喂以标准饲料 79%+猪油 20%+胆固醇 1%的高脂高胆固醇饲料, 同时每天以 50%酒精灌胃(1 ml·100 g^{-1}·d^{-1})。分别诱导 A 组(4 周, n=12)、B 组(6 周, n=12)、C 组(8 周, n=12)、D 组(10 周, n=12)以形成不同程度的脂变。受体鼠手术前后均给予标准饲料。另 20 只随机配对作正常对照 E 组(n=10)。每对供受体体质量相差≤10 g。

1.2　大鼠肝移植模型

参照 Kamada 等[2] 法采用二袖套、胆管端端缝合行大鼠肝移植[3]。受体肝上下腔静脉缝合在 4 倍显微镜下完成, 供、受体胆管的缝合采用 11-0 线在 10 倍显微镜下完成。

1.3　供肝组织学评估

供肝移植前均取组织活检, 由不参加实验的病理诊断者按下列标准行盲法判定脂变程度。Ⅰ级脂变: 肝细胞脂变占肝细胞总数≤30%; Ⅱ级脂变: 30%~60%的肝细胞脂变; Ⅲ级脂变: 脂变肝细胞≥60%。炎症活动度计分参考 Knodell[4] 和王泰龄等[5] 提出的计分方案, 分为汇管区炎症(P)、小叶内炎症(L)、碎屑坏死 PN、桥接坏死 BN。每项依病变程度分别计为 1、2、3、4 分, 计分公式为 P+L+2(PN+BN), 结果见表 1。

表 1　各组炎症活动度计分的比较　($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Comparison of assessing histological inflammation activity using numerical scoring system in different groups ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Scoring of inflammation activity
A	12	0.72±0.43
B	12	1.89±0.69 *
C	12	4.05±1.51 *
D	11	2.67±0.78 *
E	10	0.69±0.52

*: $P<0.05$ *vs* group E

1.4　观测指标及统计学方法

大鼠术后存活超过 36 h 视为手术成功, 观测存活时间、肝功能及病理改变。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 各组间均数比较采用 SPSS10.0 独立样本 t 检验, 生存时间采用 SPSS10.0 软件包绘制成 Kaplan-Meier 曲线, 比较采用对数秩检验(log-rank)。

2　结果

2.1　各组大鼠脂变肝脏的诱导结果

见表 2。

表 2　各组肝脂肪变结果比较

Tab 2　Comparision of various hepatic steatosis in different groups

Group	n	Grade of hepatic steatosis				Pathological type	Numbers of steatosis	steatotic rate(%)
		0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ			
A	12	0	12	0	0	Macrosteatosis	12	100
B	12	0	1	11	0	Macrosteatosis	12	100
C	12	0	0	2	10	Macrosteatosis	12	100
D	12	0	0	1	10 *	Microsteasis	11	100
E	10	10	0	0	0	No steatosis	0	0

*: One rat died in the 8th week

2.2　不同时间诱导的大鼠脂变供肝病理改变

见图 1~4。

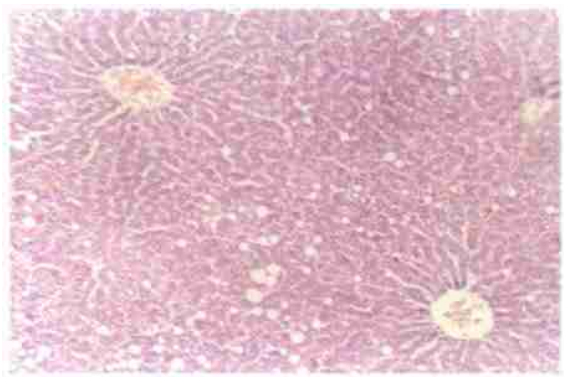


图 1　A 组Ⅰ级大泡性脂变　(HE×100)

Fig 1　Group A (4 weeks) macrosteatosis gradeⅠ　(HE×100)

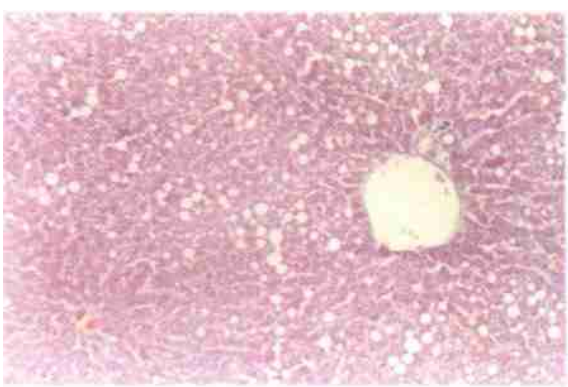


图 2　B 组Ⅱ级大泡性脂变　(HE×100)

Fig 2　Group B (6 weeks) macrosteatosis gradeⅡ　(HE×100)

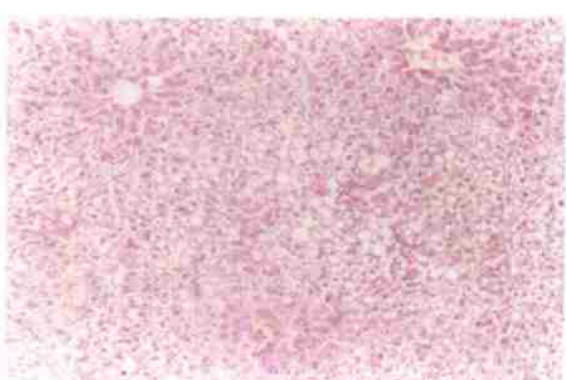


图 3　C 组 Ⅲ级大泡为主脂变　(HE×100)

Fig 3　Group C (8 weeks) more macrosteasis gradeⅢ　(HE×100)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

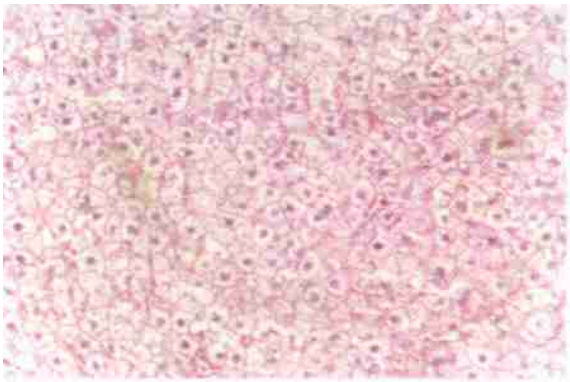


图4 D组 Ⅱ级小泡为主脂变 (HE×200)

Fig 4 Group D (10 weeks) microsteasi grade Ⅲ (HE×200)

2.3 各组大鼠生存率曲线

C组和A、B、D、E组相比差别显著(χ^2=9.67, 6.94, 8.07, 11.76 P=0.0019, 0.0084, 0.0045, 0.0006); A组、B组和E组相比差别不明显(χ^2=0.28, 1.72, P=0.5937, 0.1893); D组和E组相比差别无显著性(χ^2=0.84, P=0.359)。

2.4 术后肝脏病理改变

Ⅰ级脂变供肝术后3周脂变消失; Ⅱ级脂变供肝4周后脂变减轻和肝再生, 见图5; 大泡为主的Ⅲ级脂变供肝术后大多早期死亡, 肝细胞坏死多; 而小泡为主的Ⅱ级脂变供肝术后4周脂变消失。各组均未见明显的免疫排斥病理损害, 如汇管区的炎性浸润、胆管上皮损害、血管内皮炎。

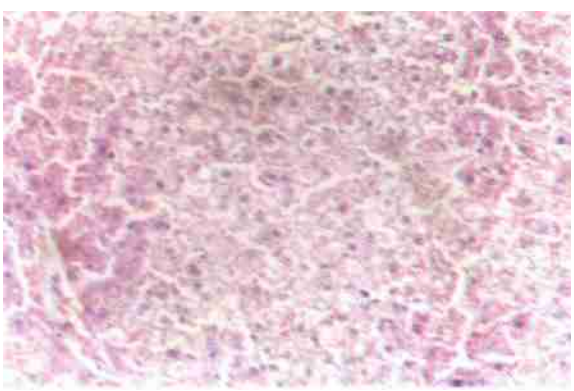


图5 术后28 d, 少量肝细胞小泡性脂变, 肝细胞再生 (HE×200)

Fig 5 On postoperative 28th day, microsteasis in minor hepatocytes and regeneration (HE×200)

3 讨论

脂变的动物模型国外多采用胆碱-蛋氨酸缺乏饮食(Choline methionine deficient diet, CMDD)或用遗传性肥胖大鼠或小鼠[1], 与人类自然发病情况相差较大, 而采用高脂高胆固醇和酒精的方法诱导不同程度的脂变肝脏, 虽然诱导的时间较长, 但结果更接近于临床。

脂变供肝的程度和肝移植术后的预后现仍知之不多, 尚缺乏明确的入选和排除标准。肝脏脂变以大泡性脂变(Macrosteatosis)多见, 小泡性脂变(Microsteatosis)较少。供肝中脂变亦以大泡为主, 小泡性脂变主要见于肥胖及外伤死亡的供体[6]。脂变供肝移植术后存活率下降可能与冷保存时脂滴从破裂的肝细胞中释出、损害肝窦微循环及与脂质过氧化、氧应激等有关[7]。

本实验结果显示C组即Ⅲ级大泡脂变的术后存活率低, 早期死于肝功能不全, 病理示肝细胞坏死多, 此类供肝应排除; A组即Ⅰ级脂变供肝术后生存率和正常供肝相似, 术后脂变可较快逆转, 可用作供肝; 而B组即Ⅱ级脂变供肝术后生存率比正常供肝要低, 但差别无显著性, 术后病理示脂变移植肝有不同程度的减轻并有肝细胞再生, 坏死较少。临床上脂变供肝移植后减轻或消失约需1年时间[6,8]。大脂滴易挤压肝窦影响微循环, 造成移植肝早期功能不良, 降低存活率, 积极探索其机制有助于进一步拓宽肝移植的供体库, 对此类供肝的取舍还应考虑缺血性损害和冷保存时间等; 临床回顾性资料显示大泡性脂变(≥25%的肝细胞)是脂变供肝可移植的边缘值[8], 但尚缺少前瞻性的病例对照研究。对于D组即小泡为主的脂变供肝, 其术后的存活率反而较高, 术后脂变清除快, 似乎是一暂时的、可逆的病变, 可较安全地用于肝移植。临床病例分析也发现小泡脂变预后较好[6,10]。我们在供肝诱导中发现8周时大鼠ALT、TBIL水平达到最高, 一般情况较差, 进食减少、不喜动, 移植术后的存活率最低, 而D组的大鼠一般情况反而好转, 其血清ALT、TBIL水平呈下降的趋势, 病理主要以小泡性脂变为主, 移植术后的存活率明显好于B组和C组。大鼠这种可逆性改变的机制现仍不清楚, 可能是大鼠对酒精和高脂、高胆固醇饲料产生了耐受, 中止了脂变的发展, 引起脂肪变的改善。CMDD饲料诱导的脂变大鼠也有类似的结果[11]。

病理炎症活动度计分对于术前评估脂肝移植术后的预后也有较大意义, 汇管区及小叶内的坏死较多者术后存活明显下降, 本实验中炎症活动度计分在2.7分以上者术后难活过2周(碎屑坏死和桥接坏死的计分加倍), 说明供肝细胞的坏死和术后的存活具有明显的相关性。脂变肝细胞对缺血损害更敏感, 易发生坏死, 对这类供肝进行术前或在获取供肝过程中进行合适的预处理, 增加脂变肝脏对冷、热缺血的耐受性, 提高其移植术后的存活率, 是今后进一步探索的方向。

参考文献:

[1] Koneru B, Dikdan G. Hepatic steatosis and liver transplantation current clinical and experimental perspectives[J]. Transplantation, 2002, 73(3): 325-330.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[2] Kamada N, Calne R Y. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat[J]. Surgery, 1983, 93(1): 64—69.
[3] 叶 晟, 韩本立, 董家鸿. 大鼠原位肝移植的显微外科技巧[J]. 中华显微外科杂志, 2003, 26(1): 49—50.
[4] Knodel R G, Ishak K G, Black W C, *et al*. Formulation and application of a numerical scoring system for assessing histological activity in asymptomatic chronic active hepatitis[J]. Hepatol, 1981, 1(5): 431—435.
[5] 王泰龄, 刘 霞, 周之平, 等. 慢性肝炎炎症活动度及纤维化程度计分方案[J]. 中华肝脏病杂志, 1998, 66(4): 195—197.
[6] Fishbein T M, Fiel I M, Emre S, *et al*. Use of livers with microvascular fat safely expands the donor pool[J]. Transplantation, 1997, 64(2): 248—251.
[7] Teramoto K, Bowers J L, Khettry U, *et al*. A rat fatty liver transplant model[J]. Transplantation, 1993, 55(4): 737—741.
[8] Marsman W A, Wiesner R H, Rodriguez L, *et al*. Use of fatty donor liver is associated with diminished early patient and graft survival[J]. Transplantation, 1996, 62(9): 1246—1251.
[9] Zamboni F, Franchello A, David E, *et al*. Effect of macrovescicular steatosis and other donor and recipient characteristics on the outcome of liver transplantation[J]. Clin Transplant, 2001, 15(1): 53—57.
[10] Urena M A, Moreno Gonzalez E, Romero C J, *et al*. An approach to the rational use of steatotic donor livers in liver transplantation[J]. Hepatogastroenterology, 1999, 46(26): 1164—1173.
[11] Cheng Y F, Chen C L, Lai C Y, *et al*. Assessment of donor fatty livers for liver transplantation[J]. Transplantation, 2001, 71(9): 1221—1225.

（编辑 陈聪连）

文章编号: 1000-5404(2003)10-0883-01

个案与短篇

指血与静脉血检测结核抗体结果对照分析

Analysis of the level of Tb-antibody from finger blood and vein blood

陈小玲, 张 治 （重庆医科大学第二临床学院肺科, 重庆 400010）

国内有文献报道用指血测定结核抗体, 以代替静脉血清, 但均无两者同时测定的对比分析, 本研究同时测定肺结核病人指血及静脉血清中结核抗体, 观察两者的符合程度及对肺结核病的辅助诊断价值, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 检测对象

肺结核组: 本院及市中区结核病防治所初诊病人根据临床及X胸片线表现, 初步诊断肺结核, 经抗结核治疗后临床症状减轻, 胸部X线病灶减少。随访1年, 共104例。其中男性66例, 女性40例, 平均年龄40岁。对照组: 中心血站献血员52例。

1.2 材料

包被抗原: 人型PPD, 批号90-1, 由中国医药生物制品检定所提供。酶: 辣根过氧化物酶标记兔抗人IgG, 批号91001, 兰州生物制品研究所提供。底物: 邻苯二铵, 检测用CXM-202型酶标光度计系四川分析仪表厂生产。

1.3 方法

每份指血同时做一份静脉血清, 同时作结核抗体对比测定, 指血200 μl+10%小牛血清PBS缓冲液1 ml作为作用液, 血清100 μl+10%小牛血清PBS缓冲液1 ml, 抗原包被PPD20 μl/ml, 100 μl/孔, 放入43 ℃水浴箱30 min, 次日用10%小牛血清PBS缓冲液封闭50 μl/孔, 放入43 ℃ 30 min。采用ELISA方法[1], 用酶标光度计测光密度值 A_{492}。

1.4 统计学处理

采用 t 检验, χ^2 检验及相关分析。

2 结果

2.1 指血与静脉血清结核抗体测定结果

见表1。

表1 肺结核及正常对照组结核抗体浓度测定 $A_{492}(\bar{x}\pm s)$

分组	n	指血	静脉血清
肺结核组	104	0.343±0.199	0.315±0.193
正常对照组	52	0.029±0.011△	0.028±0.014△

△: $P<0.01$ 与肺结核组相比较

如果以正常对照组静脉血清抗体浓度评价值 $\bar{x}+2s=0.056$ 为上限, 即测定值> 上限者为阳性, 测定值< 上限者为阴性, 则肺结核组, 阳性率为78.9%(82/104), 阴性率为21.1%(22/104)。正常对照阳性率为4%(2/52), 因此本组肺结核静脉血清阳性率为78.9%, 假阳性率为4%, 假阴性率为21.1%, 准确率为84.6%, 特异性96%。肺结核指血抗体浓度经正态性检验呈正态分布。如果以正常对照组指血抗体浓度评价值 $\bar{x}+2s=0.051$ 为上限, 计算出指血阳性率为82.7%(86/104), 静脉血清阳性率78.9%($P>0.05$)。

2.2 静脉血清与指血结核抗体浓度的相关与符合程度

对104例同时取样测定的肺结核静脉血清、指血结核体浓度进行相关与回归分析处理, 得两者相关系数 $r=0.869$, $P<0.01$。二者符合程度85.6%。

3 讨论

用酶联免疫吸附试验测定PPD特异抗体的研究已有很多

（下转886页）

作者简介: 陈小玲(1959—), 女, 重庆市人, 主管技师。电话: (023)63849075-2049
收稿日期: 2002-12-30; 修回日期: 2003-01-28

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net