DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.03.039

传统的分离HSCs的方法分二步进行，首先由肝脏中分离获得非实质细胞，一般采用链霉蛋白酶合并胶原酶消化法，然后采用密度梯度离心由非实质细胞中获得HSCs[3,5]。这种方法虽然能获得较高纯度的HSCs，但却具有一些明显的缺点：①HSCs的收获量不大；②操作步骤繁琐，费时长；③不能同时分离获得肝细胞。我们在实验中省略链霉蛋白酶消化，单用Ⅳ型胶原酶消化，使肝脏细胞充分分散，再采用低速离心(50×*g*)去除未受损的肝实质细胞，将获得的非实质细胞直接接种在玻璃附着底物上，24 h内经两次换液，去除悬浮的未贴壁细胞，7～10 d时，细胞铺满长成单层，大多呈现较典型的成纤维细胞样形态，α-SMA及Ⅰ型前胶原表达阳性细胞达96%以上。对原代培养后期的细胞进行传代，接种后4 h即贴壁，对传1代培养24 h的细胞进行免疫细胞化学染色，波形蛋白、α-SMA及Ⅰ型前胶原染色阳性细胞均接近100%，而其Ⅷ因子相关抗原及CD68染色阴性，提示传代细胞为HSCs而不是肝窦内皮细胞及Kupffer细胞。采用该分离法，由于省去了密度梯度离心，不会造成HSCs的丢失。刚分离接种的细胞为肝脏非实质细胞的混合，其中还含有非常少量的肝细胞，由于肝窦内皮细胞在玻璃上很难贴壁，经过换液能被去除，而经胰蛋白酶消化传代后能去除绝大部分Kupffer细胞，再加上HSCs增殖后其数量明显增加，因此传1代后HSCs的纯度几乎能达到100%，我们的观察证实了这一点。由于刚分离的细胞为各种非实质细胞的混合，而且其中混杂有少量的红细胞，经过培养后，HSCs出现明显增殖，数量成倍增加，因此不易估计HSCs的收获量。根据酶灌流及细胞分散效果，由每10克肝组织收获的细胞可原代接种75 cm^2培养瓶10～20瓶，传代后细胞数量增加2～3倍，能满足多种实验要求。

体外培养后激活(Activation)是HSCs的一大特点，经过更换培养液及传代，HSCs的纯度在提高的同时，其表型亦由刚分离时的静息型转变为培养后期及传代后的激活型。激活的HSCs呈现典型的成纤维细胞样形态，表达Ⅰ型前胶原及α-SMA明显增强。一般认为，α-SMA表达阳性被认为是HSCs激活的重要标志[6]，由于肝窦内皮细胞及Kupffer细胞α-SMA表达阴性，α-SMA也被认为是鉴定HSCs纯度的一个指标。结蛋白及GFAP被认为是鉴定大鼠HSCs纯度的标志，但我们未观察到人HSCs表达结蛋白及GFAP，这与我们以前观察的结果相似[4]。

参考文献：

[1] Olaso E, Friedman S L. Molecular regulation of hepatic fibrogenesis[J]. J Hepatol, 1998, 29(5): 836－847.
[2] Burt A D. Pathobiology of hepatic stellate cells[J]. J Gastroenterol, 1999, 34(3): 299－304.
[3] Friedman S L, Rockey D C, McGuire R F, *et al*. Isolated hepatic lipocytes and Kupffer cells from normal human liver: morphological and functional characteristics in primary culture[J]. Hepatology, 1992, 15(2): 234－243.
[4] 朱永红，胡大荣，谢 青，等. 正常人肝脏星形细胞的分离、培养及鉴定[J]. 细胞生物学杂志，1999, 21(3): 插页.
[5] Alpini G, Phillips J O, Uroman B, *et al*. Recent advances in the isolation of liver cells[J]. Hepatology, 1994, 20(2): 494－508.
[6] Bachem M G, Meyer D, Schafer W, *et al*. The response of rat liver perisinusoidal lipocytes to polypeptide growth regulator changes with their transdifferentiation into myofibroblast-like cells in culture[J]. J Hepatol 1993, 18(1): 40－52.

(编辑 郭建秀)

文章编号：1000-5404(2002)03-0235-01

个案与短篇

侧卧位病人硬膜外改全麻应用喉罩2例报道

Application of laryngeal mask in 2 side-lying patients from epidural to general anesthesia

张 铭，李勇帅，崔 剑 (第三军医大学附属西南医院麻醉科，重庆 400038)

喉罩以其操作简便，置入时无需扭曲气道及显露声门，勿需喉镜及肌肉松弛，消除气管插管对喉头及气管的机械性刺激，不影响气道的正常排痰功能等优点而在临床应用日益增多，可广泛应用于各种短小手术及气管插管困难病人[1]。我科先后在2例侧卧位病人硬膜外改全麻中应用喉罩，结果令人满意，现报道如下。

例1：患者男性，43岁，因患输尿管结石拟在硬膜外麻醉下行输尿管切开取石。经T_{11-12}硬膜外穿刺成功，置管顺利，注入1.75%碳酸利多卡因5 ml，出现麻醉平面后给予2%盐酸利多卡因10 ml，麻醉平面控制在T_8-L_2。调整体位为左侧卧位，切皮时无体动反应及疼痛感，肌肉松弛欠佳，牵拉反射明显，改用0.3%丁卡因8 ml后仍无明显改善。在不改变体位条件下，给以2%硫贲妥钠10 ml＋氟-芬全量后顺利置入4#喉罩，调整位置至无明显漏气。术中辅以万可松、芬太尼、氧化亚氮，手术顺利，麻醉平稳，术后清醒后拔管，无喉部不适感。

(下转327页)

作者简介：张 铭(1964－)，男，重庆市人，主治医师，讲师，主要从事血液保护之血液稀释方面的研究。电话：(023)65389581
收稿日期：2001-04-05；修回日期：2001-08-24

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

表 1　坐骨神经的 MBP 含量变化($\mu g/L$)

Tab 1　Changes of MBP content in Sciatic nerve ($\mu g/L$)

Group	Pre-injury	Post-injury		
		24 h	2 weeks	4 weeks
Ⅰ	0.38±0.06	7.39±0.91(1)	3.04±0.88(1)	1.41±0.38(1)
Ⅱ	0.36±0.08	2.75±0.45(1)(3)	0.97±0.14(1)(3)	0.79±0.26(2)(4)
Ⅲ	0.35±0.10	2.55±0.35(1)(3)	0.67±0.29(1)(3)	0.51±0.29(3)

(1): $P<0.01$, (2): $P<0.05$ *vs* pre-injury; (3): $P<0.01$, (4): $P<0.05$ *vs* group Ⅰ

表 2　脊髓的 MBP 含量变化($\mu g/L$)

Tab 2　Changes of MBP content in spinal cord ($\mu g/L$)

Group	Pre-injury	Post-injury		
		24 h	2 weeks	4 weeks
Ⅰ	0.64±0.22	4.81±1.57(1)	2.71±0.61(1)	1.79±0.79(2)
Ⅱ	0.65±0.24	1.97±0.75(2)(3)	0.89±0.33(3)	1.11±0.52
Ⅲ	0.60±0.25	1.67±0.65(2)(3)	1.10±0.42(3)	0.61±0.29(4)

(1): $P<0.01$, (2): $P<0.05$ *vs* pre-injury; (3): $P<0.01$, (4): $P<0.05$ *vs* group Ⅰ

3　讨论

MBP 是不含糖和脂质的单纯蛋白质, 分中枢型和周围型两种。中枢型由少突胶质细胞合成和分泌, 在少突胶质细胞内以共价键结合于髓磷脂浆膜面, 同时也与细胞骨架微管、微丝相连, 其中在白质含量最高。周围型存在于周围神经髓鞘膜中, 由雪旺氏细胞合成和分泌。生理状态下, 脊髓和坐骨神经中的 MBP 的含量很低, 只有在神经组织变性发生脱髓鞘改变时才会显著升高, 故 MBP 含量变化能特异地反映脱髓鞘损害程度进而反映神经组织病损程度[3]。

本实验观察到周围神经损伤后脊髓和坐骨神经中 MBP 含量急性期(2 周内)均比伤前显著升高, 表明坐骨神经损伤后 2 周, 周围神经和脊髓髓鞘损伤、崩解, MBP 从神经纤维髓鞘上脱落。伤后一个月 MBP 下降, 表明周围神经损伤后病理性改变趋于稳定。给予 NGF 治疗后 MBP 含量有所降低, 特别是连续 2 周肌肉注射 NGF 后 MBP 含量更接近伤前。资料表明, 在桥接神经缺损的硅胶管中运用 NGF 有提高神经再生的作用。当神经受到损伤时, NGF 在雪旺氏细胞或成纤维细胞中释放, 在神经末端内化, 并被逆行运输到神经元, 感觉和交感神经元被认为是 NGF 的主要靶。NGF 的内化、运输和信号转导机制由 2 种已知的受体调控, 既 P75 受体和 trkA。当周围神经损伤后, 雪旺细胞中 P75 受体高表达, 当雪旺细胞与轴突膜相接触, 神经再生完成后, 又回到基础水平[4~6]。说明随着神经损伤的修复, MBP 的脱落与释放减少基本平行。提示 NGF 能减少周围神经髓鞘的脱落, 促进周围神经损伤后的修复, 且以局部应用加肌肉注射效果最好。

参考文献:

[1] 邵　阳, 杨恒文, 伍亚民, 等. NGF 对大鼠坐骨神经损伤的影响[J]. 中国临床药学杂志, 2001, 10(3): 164.

[2] 陈俊杰, 王若菡, 李昌隆, 等. 简易的髓鞘碱性蛋白及其抗体酶联免役吸附同步定量测定法[J]. 华西医科大学学报, 1995, 26(2): 125.

[3] Omana-Zapata I, Khabbaz M A, Hunter J C, *et al*. QX-314 inhibits ectopic nerve activity associated with neuropathic pain[J]. Brain Res, 1997, 771(2): 228.

[4] Xu L Y, Ishikawa M, Huang Y M, *et al*. The complexicity of cytokine in ongoing EAE induced with MBP peptide 68~86 in Lewis rats[J]. Clin Immunol, 2000, 95(): 70.

[5] Matsumoto Y, Jee Y, Sugisaki M, *et al*. Fine T cell receptor repertoire analysis of spinal cord T cells responding to the major and minor epitopes of myelin basic protein during rat autoimmune encephalomyelitis[J]. J Neurosci Res, 2000, 59(1): 145.

[6] Moller J R, Durr P G, Quarles R H, *et al*. Biochemical analysis of myelin proteins in a novel neruological mutant: the taiep rat[J]. J Neurochem 1997, 69(2): 773.

(编辑　陈聪连)

(上接 325 页)

例 2: 患者男性, 63 岁, 因左肾功能不全拟行左肾切除术。经 $T_{11\text{-}12}$ 硬膜外穿刺, 进针顺利, 落空感明显, 置管顺利。注入 1.75% 碳酸利多卡因 5 ml, 出现麻醉平面后给予 2% 盐酸利多卡因 8 ml, 麻醉平面控制在 T_6-L_2。调整体位为右侧卧位, 切皮有微痛, 肌松欠佳, 牵拉反射明显, 拟改为全身麻醉。给以 2% 硫贲妥钠 10 ml+ 芬太尼 0.1 mg+ 司可林 100 mg 后顺利置入 4 #喉罩, 调整位置至无明显漏气。术中辅以万可松, 芬太尼, 氧化亚氮维持麻醉。手术顺利, 麻醉平稳, 术后清醒后拔管, 无咽喉部不适感。

讨论

与气管插管相比较, 喉罩的突出优点是容易置入, 消除了气管插管引起的心血管反应, 无须特殊器械, 术中术后能保持气道排痰功能, 咽喉部刺激小等优势而在临床应用日趋广泛[2,3]。主要适用于短小手术及声门暴露困难的病人。硬膜外麻醉时神经阻滞不完全时有发生, 有时需改作全身麻醉。特殊手术体位如侧卧位、俯卧位等致使声门显露不便, 增加了气管插管的难度。喉罩的临床应用为解决这一矛盾提供了新的途径, 为硬膜外阻滞不完全病人术中改全麻提供了便利的工具。本研究中 2 例病人在不改变体位的条件下利用喉罩改硬膜外麻醉为全身麻醉, 结果令人满意, 保证了手术的顺利完成。但在应用喉罩时应注意: 通气压力不宜超过 20 cmH_2O(可引起部分气体压入胃内); 喉罩不能有效防止胃内容物返流及误吸的发生; 喉罩放置时应防止尖端打折; 喉罩不适宜于有慢性肺部疾病、气管分泌物过多、过度肥胖及有颈部手术史等病人[4~6]。

关键词: 硬麻外麻醉; 全身麻醉; 喉罩
中图法分类号: R614　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 许海芳. 喉罩及插管型喉罩的进展[J]. 国外医学: 麻醉学与复苏分册, 2000, 21(1): 51-54.

[2] 曲成业, 赵　俊. 喉罩利弊的评价[J]. 国外医学: 麻醉学与复苏分册, 1997, 18(2): 91-92.

[3] Lopez-Gil, Brimacombe, Cebrian, et. Laryngeal Mask Airway in pediatric practice[J]. Anesthesiology, 1996, 84(): 807-811.

[4] Ronald D, Miller, Anesthesia, 5th ed[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 1 414-1 424.

[5] 齐国华, 兰志勋, 陈树德. 喉罩在腹腔镜胆囊切除术中应用的观察[J]. 华西医学, 1995, 10(4): 460-462.

[6] 谢柏樟. 编著. 麻醉科主治医生 500 问[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 124-127.

(编辑　郭建秀)

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