DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.032
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
822 2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)07-0822-03

肝硬化脾行脾次全切除术前后脾脏基质金属蛋白酶及其抑制剂的表达

曾 仲[1],马宏敏[2],梁志清[3] (第三军医大学附属西南医院:[1]全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院;[2]普通外科;[3]妇产科;重庆 400038)

提 要:目的 了解肝硬化充血性脾肿大伴脾亢时行脾次全切除术前后脾脏基质金属蛋白酶及其抑制剂的表达变化。方法 用60%CCl_4加5%乙醇制作大鼠肝纤维化模型,然后行脾次全切除术,用原位杂交和免疫组化的方法观察手术前后脾脏中膜型基质金属蛋白酶-1(MT1-MMP)、基质金属蛋白酶2(MMP2)、基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP1)的表达。结果 原位杂交显示,脾脏中MT1-MMP、MMP2、TIMP1 mRNA的表达主要在血管内皮和血窦内皮细胞、成纤维细胞及网状细胞中,多位于红髓、脾索和脾小梁。蓝紫色阳性物质分布于胞质中。图像分析表明手术前后比较无明显差异($P>0.05$)。MMP9的免疫组化染色显示,棕黄色的阳性物质主要分布在红髓和边缘带的吞噬细胞和中性粒细胞中,图像分析表明手术前后比较均无统计学差异($P>0.05$)。结论 脾次全切除术后保留的残脾其纤维化程度未见加重。

关键词:脾次全切除术;脾纤维化;基质金属蛋白酶
中图法分类号:R345.69;R575.2;R657.6 文献标识码:A

Expression of TIMP and MMP in spleen of cirrhotic rats before and after subtotal splenectomy

ZENG Zhong, MA Hong-min, LIANG Zhi-qing (Center of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the expressions of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) and matrix metalloproteinase (MMP) in the spleen of cirrhotic rats with splenomegaly and hypersplenism before and after subtotal splenectomy. **Methods** Cirrhosis of liver was induced with 60% carbon tetrachloride and 5% alcohol in rats, then subtotal splenectomy was performed. The levels and cellular locations of TIMP1, MT1-MMP, MMP9, and MMP2 in the spleen of splenomegaly and hypersplenism before and after subtotal splenectomy were determind with immunohistochemistry and *in situ* hybridization. **Results** The amounts of TIMP1, MT1-MMP, MMP9, and MMP2 expressions had no significant differences in the spleen of cirrhotic rats with splenomegaly and hypersplenism before and after subtotal splenectomy ($P>0.05$). **Conclusion** Subtotal splenectomy did not enhance the fibrosis of the residual splenic tissue.

Key words: subtotal splenectomy; spleen fibrosis; tissue inhibitor of metalloproteinase; matrix metalloproteinase

随着对脾功能认识的不断深入,临床上各种保脾手术相继开展,但对肝硬化伴脾大脾亢患者行脾次全切除术后的残脾还能否保留其足够的免疫功能尚存在争议。其争论的焦点在于术后残脾的纤维化是否继续加重。为此,本研究采用原位杂交和免疫组化检测了大鼠肝硬化充血性脾肿大伴脾亢时行脾次全切除术前后脾脏纤维化基质代谢的主要酶类,即基质金属蛋白酶抑制剂-1(Tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP1),基质金属蛋白酶-2(Matrix metalloproteinase-2, MMP2),基质金属蛋白-9(Matrix metalloprotein-9, MMP9),膜型基质金属蛋白酶-1(Membrane type-1-MMP, MT1-MMP)的基因表达,从而在一定程度上评价残脾纤维化的进展情况。

1 材料和方法

1.1 动物模型及分组

30只雄性Wistar大鼠(由重庆市中医研究所提供),采用注射CCl_4同时饮用5%乙醇的方法,60 d后制成肝硬化模型。存活动物20只,全部行脾次全切除术,即保脾1/3,切下的2/3脾脏作为术前组标本保存备检。术后常规喂养60 d活杀取脾脏标本作为术后组备检。标本均置液氮及10%福尔马林固定。

1.2 原位杂交

将质粒MMP2、TIMP1(本校宋波博士馈赠)、MT1-MMP(日本Sato教授馈赠)转入JM109大肠杆菌后大量扩增、提取、纯化、酶切、回收cDNA片段;用地高辛标记试剂盒(德国BM公司)标记cDNA探针,按文献[1]的方法进行原位杂交。阴性对照不加探针或经RNase处理后再进行原位杂交。

1.3 免疫组化

按北京中山公司SPTM试剂盒说明书操作。MMP9多抗(美国癌症研究所William G. Stetler-Stevenson教授馈赠),浓度为1∶50。

1.4 图像分析

每一玻片任选5个视野,自动检测阳性细胞面密度,取其平均值,进行统计分析。

1.5 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用本校统计学教研室的统计程序包行方差分析。

2 结果

2.1 MT1-MMP mRNA的表达

术前、术后组大鼠脾脏中MT1-MMP mRNA的表达主要在血管内皮和血窦内皮细胞、成纤维细胞及星状细胞中,多位于红髓、脾索和脾小梁。蓝紫色阳性物质分布于胞质中。图像分析显示术前、术后组间比较无明显差异($P>0.05$),见图1,表1。

作者简介:曾 仲(1967-),男,湖南省汉寿县人,博士,主治医师,讲师,主要从事肝纤维化的发病机制和治疗研究,发表论文7篇。电话:(023)68754544

收稿日期:2002-01-19;修回日期:2002-03-21

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

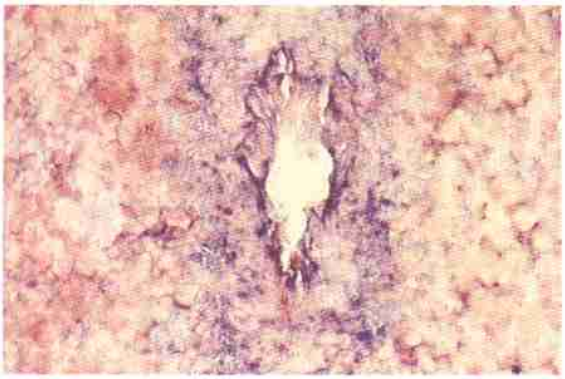


图 1　肝硬化大鼠脾脏中 **MT1-MMP mRNA** 的表达　(ISH× 200)

Fig 1　Expression of MT1-MMP mRNA in the spleen of cirrhotic rats　(ISH× 200)

2.2　TIMP1 mRNA 的表达

术前、术后组大鼠脾脏中 TIMP1 mRNA 的表达主要分布在血管内皮和血窦内皮细胞、成纤维细胞及星状细胞中, 多位于生发中心旁和白髓。蓝紫色阳性物质分布于胞质中。图像分析显示术前、术后组间比较无明显差异($P>0.05$), 见图 2, 表 1。

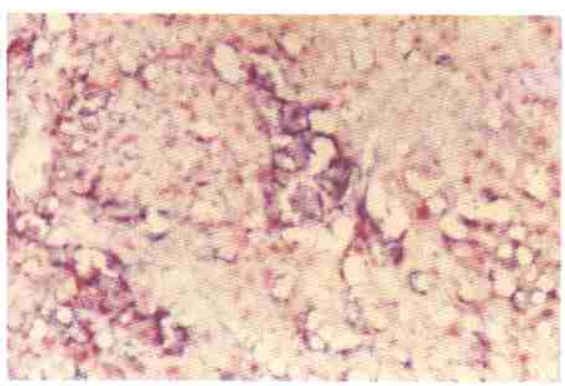


图 2　肝硬化大鼠脾脏中 **TIMP1 mRNA** 的表达　(ISH× 400)

Fig 2　Expression of TIMP1 mRNA in the spleen of cirrhotic rats　(ISH× 400)

2.3　MMP2 mRNA 的表达

术前、术后组大鼠脾脏中 MT1-MMP mRNA 的表达主要位于脾小梁的成纤维细胞和星状细胞中, 但表达量较少。蓝紫色阳性物质分布于胞质中。图像分析显示术前、术后组间比较无明显差异($P>0.05$), 见图 3, 表 1。

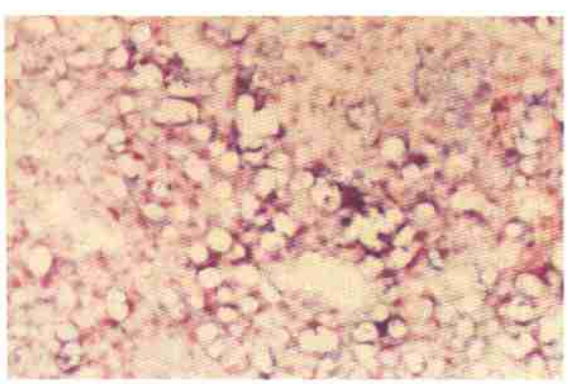


图 3　肝硬化大鼠脾脏中 **MMP2 mRNA** 的表达　(ISH× 200)

Fig 3　Expression of MMP2 mRNA in the spleen of cirrhotic rats　(ISH× 200)

表 1　肝硬化大鼠脾脏中 **MT1-MMP、MMP2** 和 **TIMP1 mRNA** 的表达 ($\times 10^{-4}$, $n=20$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Expressions of MT1-MMP, MMP2, and TIMP1 mRNA in the spleen of cirrhotic ratst($\times 10^{-4}$, $n=20$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Before operation	After operation
MT1-MMP	777.88±11.88	779.75±17.31△
TIMP1	643.13±17.95	644.00±14.56△
MMP2	335.00±13.38	338.38±14.03△

2.4　MMP9 蛋白的表达

术前、术后组大鼠脾脏中 MMP9 的免疫组化染色显示, 棕黄色的阳性物质主要分布在红髓和边缘带的吞噬细胞和中性粒细胞中。图像分析显示术前、术后组间比较无明显差异($P>0.05$), 见图 4, 表 2。

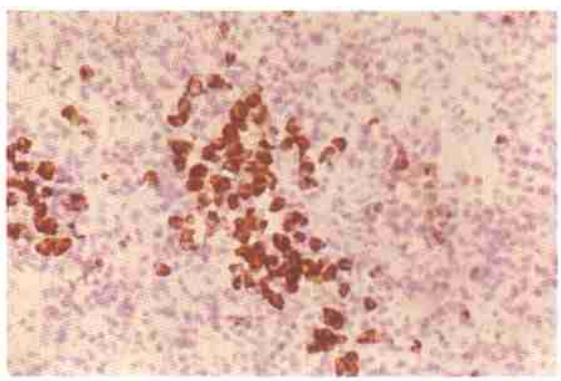


图 4　肝硬化大鼠脾脏中 **MMP9** 蛋白的表达　(S-P× 200)

Fig 4　Expression of MMP9 protein in the spleen of cirrhotic rats　(S-P× 200)

表 2　肝硬化大鼠脾脏中 **MMP9** 蛋白的表达($\times 10^{-4}$, $n=20$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Expressions of MMP9 protein in the spleen of cirrhotic rats($\times 10^{-4}$, $n=20$, $\bar{x}\pm s$)

Group	Before operation	After operation
MMP9	1 072.80±101.34	1 190.59±137.40△

3　讨论

由于全脾切除有并发凶险性感染(OPSI)的可能性, 加上肝硬化患者的免疫功能低下, 势必会增加感染的危险性[2]。基于上述考虑, 我们自 1982 年起自行设计了脾次全切除术, 现已在临床上治疗肝硬化巨脾症 120 例, 疗效满意[3]。但是, 有研究表明, 肝硬化门脉高压形成后, 脾脏红髓面积扩大, 白髓面积缩小, 脾内纤维组织增生活跃, 细胞外基质(ECM)沉积增多, 同时伴有脾脏的抗感染功能明显下降。因此, 了解保脾术后残脾的细胞外基质代谢和纤维化状况对指导临床保脾手术的开展有重要意义。

组织器官纤维化是一慢性病理过程, 是组织内细胞之间及其与细胞外基质(ECM)相互作用的结果, 最终导致 ECM 在器官组织的过度沉积。这种过度沉积不仅是由于 ECM 合成增多, 更大程度上特别是后期, 是由于降解减少所引起的, 在 ECM 降解过程中起主要

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

作用的基质金属蛋白酶(MMP)是一组锌离子依赖酶,其组织抑制剂(TIMP)是一组具有抑制 MMP 功能的活性多肽,膜型基质金属蛋白酶(MT1-MMP)的主要作用就是激活 MMP2 而发挥其降解 ECM 的作用。它们在 ECM 代谢中起着非常重要的作用[4,5]。MMP2 和 MMP9 以潜活形式的酶原(pro-MMP2, pro-MMP9)分泌到细胞外,必须经过 MT1-MMP 激活后方可发挥其降解 ECM 的作用,启动和加重组织器官纤维化,并在纤维化过程中持续升高。MMP 的活性还受 TIMP 的严密调控,在纤维化过程中 TIMP 抑制 MMPs 从而使 ECM 降解减少,形成和加重纤维化。

本实验结果表明,术前、术后组大鼠脾脏中 TIMP1、MMP2、MMP9 mRNA 的表达主要分布在血管内皮和血窦内皮细胞、成纤维细胞及星状细胞中,多位于生发中心旁、脾小梁、白髓中。蓝紫色阳性物质分布于胞质中。图像分析显示术前、术后组间比较无明显差异。脾脏 MMP9 的免疫组化染色显示,棕黄色的阳性物质主要分布在红髓和边缘带的吞噬细胞和中性粒细胞中。图像分析显示术前、术后组间比较无明显差异。同时,常规病理检查也表明,术前、术后脾脏纤维化程度无明显变化。因此,我们认为,肝硬化充血性脾肿大伴脾亢时行脾次全切除术后脾脏纤维化程度不再发展。这可能与门静脉压力降低有关,研究表明,脾脏纤维化与门脉高压的高血流动力学刺激有关。一方面术后停止注射 CCl4 而致肝组织炎症减轻,肝硬化不再发展,门脉压不再继续升高。另一方面,我们以往的研究发现脾次全切除术既能降低肝硬化后的门脉压,改善脾亢症状,又能保留脾脏的免疫功能[3,6]。因此,临床上对肝硬化伴巨脾症者开展脾次全切术对病人有益无害。

参考文献:

[1] 蔡文琴, 王伯弥云. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川省科学技术出版社, 1994. 406-434.

[2] 成 军, 陈易人, 胡振雄, 等. 脾切除对单核吞噬系统的影响[J]. 中华创伤杂志, 1994, 10(3): 119-120.

[3] 李晓阳, 马宏敏, 蔡志民. 脾次全切除治疗肝硬化充血性脾肿大伴脾亢保留脾功能的临床研究[J]. 腹部外科杂志, 1991, 4(4): 153-155.

[4] Albanis E, Friedman S L. Hepatic fibrosis. Pathogenesis and principles of therapy[J]. Clin Liver Dis, 2001, 5(2): 315-335.

[5] McCrudden R, Iredale J P. Liver fibrosis, the hepatic stellate cell and tissue inhibitors of metalloproteinases[J]. Histol Histopathol, 2000, 15(4): 1159-1168.

[6] 曾 仲, 马宏敏. 脾次全切除术对肝纤维化影响的实验研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2001, 7(6): 359-362.

(编辑 陈聪连)

(上接 821 页)

最后比较两组病人静脉穿刺一次成功率,静脉炎发生率及完成化疗情况。

2 结果

观察组静脉穿刺一次成功率明显高于对照组,静脉炎发生率也明显低于对照组,减轻了病人痛苦,保证了化疗顺利进行。见表 1。

表 1 两组临床情况观察比较

分组	例数	静脉穿刺一次成功	穿刺部位血管疼痛	液体外渗	静脉炎
观察组	60	56	6	2	12
对照组	60	48	20	13	33

3 讨论

乳癌主要发生于中年女性,术后禁止在患侧上肢静脉进行输液或抽血,因而只能选择健侧上肢血管输液。由于中年女性肥胖居多,脂肪厚,血管条件差,且输液疗程长,术后第一个月开始,每月进行一疗程化疗,连续 6 疗程,每个疗程为 8 d,因而静脉穿刺一次成功率逐渐下降。有报道反复多次从手背或前臂静脉穿刺以及化疗药物对血管的较强刺激,引起局部疼痛,静脉炎发生率高达 60%~78%[2],给病人带来了很大痛苦,甚至使化疗不能顺利进行。颈外静脉管径粗,显露明显,操作简便易行,安全,并发症少[3],因其血流量大,回心快,可迅速稀释血管刺激性抗癌药,减少抗癌药物与血管内膜接触的时间,从而减少静脉炎的发生或静脉炎的程度减轻。

对两组临床情况观察比较:观察组静脉穿刺一次成功率明显高于对照组;观察组出现穿刺部位血管疼痛及液体外渗明显低于对照组;观察组静脉炎的发生率也明显低于对照组,均表现为穿刺点周围红肿,对照组还出现局部疼痛,穿刺局部静脉变硬,少部分出现整个静脉呈条索状改变。

INTIMA-Ⅱ静脉留置针具有较多的优越性:套管长度适中,便于全部进入血管;针头锋利,利于穿刺;封闭的肝素帽避免空气进入血液及血液外渗;延长管带有小夹子,便于卡管,防止回血。但操作中应注意:穿刺前应松动针芯与套管,防止针芯刺破套管;确保套管针进入血管后再退针芯,退出的针芯不能再往前进,否则有穿破套管或血管的危险;有的病人套管针进入血管后未见回血,当退出针芯后才有回血,可能与针芯紧贴套管以及静脉压低有关;颈外静脉走向直,可右手持针柄,直接将套管针全部送入血管后再退针芯;为确保一次成功,穿刺前必须认真摆好体位,仔细选择血管,尤其是肥胖、颈子短的病人,血管不易显露,对于消瘦病人要防止血管滑动,穿刺时让病人屏气 5 s,充盈血管,便于穿刺。套管针留置时间过长,可引起局部静脉炎[4],静脉留置针常规留置时间为 5~7 d[5]。本组病人静脉留置针留置时间为 8 d,静脉炎的发生率仅为 20%,而且仅为穿刺点周围红肿,保证了化疗的顺利进行。

通过对 60 例乳癌术后病人采用颈外静脉留置针输入化疗药物的观察,认为 INTIMA-Ⅱ静脉留置针,不仅减少反复多次静脉穿刺给病人带来的痛苦,而且提高了工作效率及输液护理质量。

关键词: 静脉留置针; 乳癌; 化疗
中图法分类号: R472.9 文献标识码: B

参考文献:

[1] Dunavin M K, Lane C, Parker P E. Principles and continous quality improvement applied to intravenous therapy[J]. Intravenous Terapy, 1994, 17(5): 248-255.

[2] 张小云, 霍红岩, 李亚玲. 去甲长春花碱不同给药方式局部反应的观察与护理[J]. 中国肿瘤临床与康复, 1996, 6(1): 70.

[3] 郝用宁. 颈外静脉穿刺插管术 125 例护理分析[J]. 护理学杂志, 1987, 2(2): 73.

[4] 吴 勤. 静脉给药并发静脉炎的发病机理和防治进展[J]. 实用护理杂志, 1994, 10(2): 41-42.

[5] 李小燕, 刘 洋, 陈卫红. 套管针常规留置时间的探讨[J]. 中华护理杂志, 2000, 35(5): 300-301.

(编辑 陈聪连)

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