DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.029

论著

文章编号:1000-5404(2000)04-0372-04

胰脾联合移植在胰腺移植中的作用

李占京,韩本立,吴 军 (第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心,重庆 400038)

提 要:目的 观察胰腺移植后的自然过程,了解供脾在延长胰腺移植存活中的作用。方法 采用封闭群 Wistar 大鼠作供体和受体,受体动物在移植前肌注链脲霉素诱导糖尿病发生,术后通过非空腹血糖监测胰腺存活,定期处死动物切取移植胰,观察组织学变化。实验分为2组:单纯胰腺移植(A组)和胰脾联合移植(B组)。结果 非空腹血糖变化:A组术前及术后2、6、10、14d分别为(25.59±4.50)及(8.10±1.59)、(10.11±2.17)、(19.02±4.66)和(24.46±1.13)mmol/L(n=7);B组术前及术后2、6、10、14、20、28、36、44d分别为(25.30±3.57)及(8.11±1.59)、(7.95±0.99)、(8.12±1.16)和(10.01±1.51)、(11.40±2.61)、(14.26±2.92)、(18.14±6.41)和26.01 mmol/L(术后36d内n=7)。胰腺存活时间:A组为(11.71±1.80)d,B组为(39.00±2.77)d,两组相比$P<0.01$。组织学观察,A组第3天表现为淋巴细胞小量游出浸润,第7天大量淋巴细胞游出和浸润,第12天胰腺自身结构严重破坏,第20天广泛纤维化替代;B组淋巴细胞游出和浸润缓和,胰腺结构损害轻且缓慢。结论 胰脾联合移植能明显延长移植胰存活。单纯胰腺移植和胰脾联合移植后,移植胰均受到急性排斥反应损害,但胰脾联合移植后移植胰的排斥性损害相对较轻。

关键词:大鼠;胰腺移植;组织学;血糖;移植免疫
中图法分类号: R657.5;R657.6 文献标识码:A

Effects of combined transplantation of pancreas-spleen on the survival of pancreatic graft in non-inbred rats

LI Zhan-jing, HAN Ben-li, WU Jun (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the natural course of pancreatic transplantation and the effect of donor spleen on the prolongation of the survival of pancreatic allograft. **Methods** Non-inbred Wistar rats were used in the study. About 10 days before the transplantation, the recipient rats received an intramuscular injection of streptozotocin (70 mg/kg) to induce diabetes and were divided into group A in which the rats received a simple transplantation of the pancreas and group B in which the rats were operated on for a combined pancreas and spleen transplantation. Non-fasting samples of blood were examined for glucose level to evaluate the survival of the pancreatic grafts. **Results** The average survival time of the pancreatic graft was (11.71±1.80) days in group A and (39.00±2.77) days in group B ($P<0.001$). It was found with histological examination that the pancreatic graft as completely replaced with fibroblasts on the 20th day after operation in group A and a slight and slow course of the damages of the pancreatic graft was seen in group B. **Conclusion** Combined transplantatine of pancreas and spleen prolongs significantly the survival of the pancreatic graft. After simple pancreas transplantation or combined pancreas and spleen transplantation, the pancreatic graft will be replaced with fibrous tissue sooner or later and this process of replacement is significantly delayed when a splenic graft exists.

Key words: pancreas transplantation; histology; blood glucose; immunity; rat

胰腺移植作为治疗Ⅰ型糖尿病的有效手段在国外已较为普及,年开展达数千例之多[1,2]。国内则明显落后,仅有少数医院作过为数不多的报道[3]。在动物实验方面,大鼠胰腺移植模型在国外使用最多,但手术操作

作者简介:李占京(1957—),男,河南省洛阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事器官移植方面的研究,发表论文7篇。电话:(023)68757247

收稿日期:1999-11-15;修回日期:2000-01-27

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

难度大，国内仅见少数报道[4]。我们建立了稳定的大鼠胰腺移植模型，本组通过对大鼠胰腺移植后的自然过程进行观察，以期为临床胰腺移植研究奠定基础。

近来，大量文献强调“微嵌合”机制在免疫耐受形成中的作用[5,6]。通过给受体动物输注供体脾细胞能明显延长同种移植物的存活时间[7,8]。为了验证并重新认识供体脾细胞的这种作用，本组采用胰脾联合移植，与单纯胰腺移植进行比较，期望为了解供、受体的免疫反应性提供更多实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物

封闭群（非近交系，群体内连续繁殖 15 代以上）Wistar 大鼠，鼠龄 3～6 个月，供体动物雌雄不拘，受体动物均为雄性，体重 250～350 g，由第三军医大学实验动物中心提供。

1.2　分组设计

实验分为 2 组，A 组：单纯胰腺移植组，共作 12 例移植，其中 5 例用作定期病理取材，另 7 例用作术后血糖检测；B 组：胰脾联合移植组，共作 13 例，其中 6 例用作定期病理取材，另 7 例用作术后血糖检测。所有动物均不使用免疫抑制剂。

1.3　糖尿病模型制作

给拟作受体的大鼠肌注链脲霉素（Boehringer Mannheim 产品）70 mg/kg，以非空腹血糖 >20 mmol/L 持续 10 d 作为稳定的糖尿病模型。血糖测定采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法，血糖测定试剂盒为长城临床试剂公司产品。

1.4　胰腺移植手术方法

供体动物术前不禁食。受体动物术前禁食 12 h。麻醉方法采用乙醚开放吸入。

供体手术：入腹后，游离胰腺与十二指肠，近肝门处剪断胆总管任其开放，结扎肝总动脉，游离门静脉拟作血管吻合用。以分出腹腔动脉和肠系膜上动脉的腹主动脉段拟作动脉重建血管，分别结扎切断该段腹主动脉的其它分支。在肠系膜上动脉起始部下方结扎腹主动脉，经腹主动脉上段穿刺，用含肝素 100 U/ml 的冷平衡盐液作原位灌洗，同时剪断门静脉放出灌洗液，至胰腺呈苍白色，脾脏呈间白色，一并切取包括脾脏、胰腺及其腹主动脉段，立即置 4 ℃ 平衡盐液备用。

受体手术：腹正中全长纵切口入腹，在左肾血管远端游离一段腹主动脉和下腔静脉，将供胰的腹主动脉和门静脉端分别与受体的腹主动脉和下腔静脉作端侧吻合，动脉吻合采用间断缝合，静脉吻合采用连续缝合，均用 8-0 无损伤缝线。开放血流后，胰脾联合移植组不作供体脾脏切除，单纯胰腺移植组作供体脾脏切除。胰管引流采用胆总管开放腹腔内引流。冲洗腹腔，分两层连续缝合关腹。供体手术约需 2 h，受体手术约需 1.5 h。移植物缺血时间 25～40 min，平均 31 min。

1.5　血糖监测及移植物功能判断

术前与术后第 2、6 天剪尾采血测定非空腹血糖，继后约 3～5 d 测定 1 次，直至胰腺被完全排斥。非空腹血糖 <11 mmol/L 作为移植物功能良好的标准。移植 1 周后非空腹血糖连续 2 d >20 mmol/L 判为移植胰被完全排斥。

1.6　组织学检查

术后第 3、7、12、20、30、45 天于每组各处死 1 只动物，切取移植胰，10% 中性缓冲甲醛固定，石腊包埋切片，HE 染色，观察移植胰腺的排斥情况。A 组根据血糖测定结果未再作术后 30 d 和 45 d 的组织学检查。

1.7　数据统计学处理

非空腹血糖值比较和移植胰存活时间比较均采用 t 检验。结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2　结果

2.1　动物一般情况

2 组动物术后均恢复良好，24 h 后精神状态趋于好转，活动自如，48 h 后恢复胃肠道功能，开始进食，有粪便排出。实验中曾遇到因腹腔感染 3 例，其中，单纯胰腺移植 1 例，胰脾联合移植 2 例，均于 1 周内死亡（资料未计入），1 周后未再发生自然死亡。

2.2　移植胰功能存活情况

移植胰 A 组存活 10 d 3 例，12 d 2 例，14 d 2 例，平均存活（11.71±1.80）d，B 组存活 36 d 2 例，38、39 d 各 1 例，40 d 2 例，44 d 1 例，平均存活（39.00±2.77）d，两组相比差异非常显著（P <0.001）。非空腹血糖变化见表 1。

表 1　胰腺移植后非空腹血糖的变化（C_B/mmol·L^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

Tab 1　The changes of non-fasting blood glucose after pancreatic transplantation（C_B/mmol·L^{-1}，$\bar{x}\pm s$）

Group	Days after transplantation								
	0	2	6	10	14	20	28	36	44
A	25.59±4.50	8.10±1.59	10.11±2.17	19.02±4.66	24.46±1.13	–	–	–	–
B	25.30±3.57	8.11±1.59	7.95±0.99*	8.12±1.16#	10.01±1.51#	11.40±2.61	14.26±2.92	18.14±6.41	26.01

A：Simple pancreas transplantation；B：Combined pancreas spleen transpleatation；*：P <0.05，#：P <0.001 *vs* A

2.3　胰腺组织学检查

A 组，第 3 天即可见胰腺小叶间隙及血管周围散在淋巴细胞浸润，腺泡、导管和胰岛结构均无明显损害改变；第 7 天见大量淋巴细胞成簇状游出血管进入胰腺组织，间质内淋巴细胞浸润更加明显，腺泡间隙加宽，腺泡结构受压体积萎缩，腺泡细胞酶原颗粒明显减少或消失，有核固缩现象，可见少量成纤维细

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

胞增生，导管结构尚正常，血管内皮可见淋巴细胞附着，内皮完整，血管周围大量淋巴细胞浸润，胰岛结构外观正常；第12天见大量成纤维细胞增生伴淋巴细胞浸润，腺泡和导管明显减少，被增生的纤维组织分割和环绕，腺泡结构大量破坏，残存的腺泡细胞核固缩，酶原颗粒消失，导管结构可见，上皮细胞排列紧密，但基底膜间隙水肿加宽，血管数量明显减少，内皮有脱落现象，胰岛细胞核梭形或卵圆形改变明显；第20天成纤维细胞大量增生，整个胰腺组织被广泛纤维组织代替，无残存腺泡、导管和胰岛结构，淋巴细胞浸润也趋减轻。4个时相点存在明显组织学变化特征，第3天主要为淋巴细胞少量游出和浸润，第7天大量淋巴细胞游出并浸润，第12天表现为胰腺组织自身结构严重破坏，第20天为广泛纤维组织替代。

B组，整个变化过程也由淋巴细胞游出浸润开始至后期胰腺组织结构被完全破坏消失，广泛纤维化形成，但淋巴细胞游出和浸润较为缓和，未见到第7天的大量淋巴细胞簇状游出现象，腺泡和导管结构在术后30 d仍有少量残存，胰岛结构损害程度轻且缓慢，直至术后45 d才完全破坏消失，代之以大量增生的纤维组织和少量浸润细胞。

3 讨论

封闭群大鼠个体间的移植免疫生物学反应接近于同种异体移植物，主要取决于其基因型的异源性。通过封闭群大鼠胰腺移植实验，对于临床异体胰腺移植具有较大参考价值。本组采用封闭群Wistar大鼠进行实验，通过非空腹血糖测定判断移植胰腺的存活情况，结果表明，在没有任何免疫抑制剂干预的情况下，单纯胰腺移植后移植物存活最短10 d，最长14 d，平均11.71 d。

组织学检查表明，单纯胰腺移植后移植胰经历了一段短促而典型的急性排斥反应，主要特征表现为4个阶段：①术后第3天的淋巴细胞小量游出期；②术后第7天的淋巴细胞大量游出期；③术后第12天的胰腺组织严重破坏期；④术后第20天的广泛纤维化期。

功能和形态学检查结果表明，单纯胰腺移植后急性排斥反应极为突出，移植物在短期内即被完全排斥，彻底丧失其组织结构和功能，代之以广泛纤维化形成，表明，这种单纯胰腺移植危险性极大，远不能当作临床治疗手段，必须辅助性采取其它有效措施，延长移植胰存活时间。

先前的文献报道，供体动物的脾脏移植能够延长移植胰的存活时间[9]，但由于供脾移植后所产生的致命性移植物抗宿主反应（GVHD）[10]，后来多未再采用。1993年以来，在探讨成年动物免疫耐受研究方面，大量文献强调微嵌合机制在免疫耐受形成中的重要作用[5,6]，这一理论的中心观点是，器官移植后，由于供体免疫细胞与受体的免疫系统细胞发生反应，通过相互攻击而达到免疫抑制，从而延长供体移植物的存活。因此，近来采用静脉或胸腺内注射供体脾细胞延长器官移植物存活的报道日渐增多[7,8]。为了重新认识供体脾细胞的这种作用，为进一步探讨诱导成年动物免疫无反应性机制，本组采用胰脾联合移植与单纯胰腺移植进行比较，以观察供脾的作用及效果，结果表明，胰脾联合移植组移植胰腺存活平均39 d，明显长于单纯胰腺移植。其作用机制可能与攻击受体免疫系统有关。

组织学检查发现，胰脾联合移植后移植胰的变化也是一个急性排斥过程，但与单纯胰腺移植相比反应强度明显缓和，损害程度相对较轻，胰腺功能持续时间明显延长，组织学变化主要表现为没有明显的淋巴细胞大量游出现象，但仍然存在持续性淋巴细胞浸润；胰腺组织，包括腺泡、导管、胰岛等结构的受损轻而且过程延长，术后30 d时仍可见到残存的腺泡、导管和胰岛结构，但至45 d左右，这些结构均被大量纤维组织所取代。表明，供脾的联合移植只能相对延长移植胰的存活时间，并不能完全达到长期无反应状态。

文献记载[10]，胰脾联合移植后由于供脾的作用可发生致命性GVHD，多发生在术后45 d左右。本实验中，2例胰脾联合移植动物于术后1周内死亡，尸检发现腹腔内大量脓性渗出物，而无受体脾脏肿大反应（资料未列出），存活动物中亦无受体脾脏肿大和皮肤反应等GVHD征象，可能系观察期不够长或动物遗传学差异的缘故。

结论：封闭群Wistar大鼠单纯胰腺移植后胰腺平均存活时间为11.71 d。胰脾联合移植能明显延长移植胰的存活，平均存活39.00 d。单纯胰腺移植和胰脾联合移植后，移植胰均受到急性排斥反应损害，最终被广泛纤维组织所代替，但胰脾联合移植后移植胰的排斥性损害相对较轻，纤维化替代形成较晚。

参考文献：

[1] Jones J W, Mizrahi S S, Bentley F R. Success and complications of pancreatic transplantation at one institution[J]. Ann Surg, 1996, 223(6):757—762.

[2] Kinkhabwala M, Wilkinson A, Danovitch G, *et al*. The role of whole organ pancreas transplantation in the treatment of type Ⅰ diabetes[J]. Am J Surg, 1996, 171(5):516—520.

[3] 沙 波，陈知水，文志向，等. 中华医学会1996年会全国器官移植学术会议纪要[J]. 中华器官移植杂志，1997，18(2)：127—128.

[4] 鄢业鸿，夏穗生. 胰腺移植对大鼠糖尿病早期肾病的治

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

疗[J]. 中华器官移植杂志, 1995, 16(4): 154－155.
[5] Jankowski R A, Ildstad S T. Current progress in chimerism and donor-specific tolerance[J]. Transplant Proc, 1996, 28(4): 2 071－2 074.
[6] Kawai T, Cosimi A B, Colvin R B, *et al*. Mixed allogeneic chimerism and renal allograft tolerance in cynomolgus monkeys [J]. Transplantation, 1995, 59(2): 256－262.
[7] Yue X, Ye C, Zhao P, *et al*. Long-term survival of heterotopic heart transplants in allogeneic rats without using anti-rejection drugs after inducing immune tolerance[J]. Chin Med J Engl, 1995, 108(12): 887－891.
[8] Murase N, Starzl T E, Tanabe M, *et al*. Variable chimerism, graft-versus-host disease, and tolerance after different kinds of cell and whole organ transplantation from Lewis to Brown Norway rats[J]. Transplantation, 1995, 60(2): 158－171.
[9] Winter J B, Petersen A H, Westra A L, *et al*. Prolonged survival of pancreas grafts by combined transplantation of lymphoid tissue: the combi-effect[J]. Transplant Proc, 1990, 22(4): 1 965.
[10] Deierhoi M H, Sollinger H W, Bozdech M J, *et al*. Lethal graft-versus-host disease in a recipient of a pancreas-spleen transplant[J]. Transplantation, 1986, 41(4): 544－546.

（编辑 郭建秀）

文章编号: 1000-5404(2000)04-0375-02

经验与短篇

肺癌组织表皮生长因子受体表达及其对肺癌预后的意义

Expression and prognostic significance of epidermal growth factor receptor (EGFR) in lung cancer tissues

王志新[1], 王水明[2], 张哉根[1], 高广正[1] （第三军医大学: [1] 附属新桥医院全军肿瘤中心, 重庆, 400037; [2] 附属西南医院病理研究所, 重庆 400038）

近年研究已表明, 表皮生长因子受体(EGFR)和肿瘤的恶性增殖关系密切。我们采用免疫组化 S-P 法检测 EGFR 在肺癌组织及转移淋巴结表达, 探讨其在非小细胞肺癌 (NSCLC) 预后价值。

1 材料与方法

1.1 标本

非小细胞肺癌 64 例, 男性 58 例, 女性 6 例。年龄 37～68 岁, 平均 56.4 岁。标本取自我院胸外科 1991～1995 年手术切除的肺癌组织和淋巴结存档石蜡块。鳞癌 30 例, 腺癌 34 例, 同一患者配对淋巴结组织 64 份, 其中有淋巴结转移 35 例。所有病例按国际 TNM 分期: Ⅰ期 23 例, Ⅱ期 17 例, Ⅲ期 21 例, Ⅳ期 3 例。标本常规切片 5 μm。

1.2 方法

鼠抗人 EGFR 单抗及免疫组化试剂盒为美国 Maxin 公司生产, 购自福州迈新公司。免疫组化采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法 (Streptavidin-peroxidase conjugated meth-od, S-P), 操作参照说明书进行。EGFR 表达阳性强度判断: (－) 无显色; (＋) ＜15%癌细胞阳性; (＋＋) 15%～50%癌细胞阳性; (＋＋)＞50%癌细胞阳性。试验中分别设阴性和阳性对照(公司提供)。

统计学处理采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 肺癌组织 EGFR 表达

细胞染色阳性信号呈棕黄色或棕褐色, EGFR 定位于癌细胞膜或细胞浆, 胞核无着色, 少许正常支气管旁腺呈阳性反应。癌组织阳性细胞以片状, 局灶状分布为主。64 例肺癌组织 43 例 EGFR 表达阳性, 其中鳞癌 24 例(80%), 腺癌 19 例(55.9%), 肺鳞癌以细胞膜型表达为主, 占 71.9%(17/24), 肺腺癌以胞浆或膜浆表达为主(100%)。35 例转移淋巴结中 22 例 EGFR 表达阳性(63%), 其中 4 例原发灶肺癌组织 EGFR 表达阴性, 而淋巴结转移灶呈阳性表达。无淋巴结转移标本均为阴性。

2.2 EGFR 表达与肺癌的临床病理关系

肺癌组织 EGFR 表达与部分临床病理关系显示: Ⅲ～Ⅳ期患者 EGFR 表达 (91.7%) 明显高于Ⅰ～Ⅱ期患者 (52.5%), 低分化组(82.9%)显著高于中高分化组(39.1%)。淋巴结转移组(80.0%)高于淋巴结阴性组(51.7%)。结果提示: EGFR 表达与肺癌临床分期、分化程度、淋巴结转移密切相关 ($P<0.01$, $P<0.05$)。

3 讨论

EGFR 是原癌基因 C-erbB-1 的表达产物, 具有酪氨酸激酶活性, 当和其配体 EGF、TGFα 结合, 通过激活酪氨酸蛋白激酶途径, 促进细胞生长, DNA 合成, 癌基因(fos, jun)表达。近年研究

(下转 378 页)

作者简介: 王志新(1953－), 女, 河北省徐水县人, 硕士, 主任医师, 主要从事肺癌转移发病机制方面的研究, 发表论文 30 余篇。电话: (023)68754114-74701

收稿日期: 1999-04-15; 修回日期: 1999-07-22

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