DOI:10.16016/j.1000-5404.1998.04.016

活化的Kupffer细胞对肝硬变肝脏细胞再生功能的影响*

陈 平** 韩本立 李 昆 段恒春 (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**:通过对肝硬变大鼠行肝部分切除术基础上,体外活化Kupffer细胞(KC),观察其对肝细胞再生过程的影响。**方法**:分为肝硬变大鼠部分肝切除术组(C-PH)、正常大鼠部分肝切除术组(N-PH)和假手术组(SO)。皮下注射四氯化碳油溶液加口服乙醇制作大鼠肝硬变模型,切除大鼠肝脏的左叶和中叶。观察时相为大鼠术后6 h,行^{3}H-TDR掺合法,^{3}H-亮氨酸的测定,用LPS体外活化KC,观察其对肝再生过程的影响。**结果**:用小剂量LPS可活化KC,其联合培养的肝细胞DNA合成功能和蛋白质的合成功能均有明显提高,表明活化的KC能促进肝细胞再生。相反,未经活化的KC和肝细胞联合培养(C-PH组),其DNA合成功能和蛋白质合成功能均较单纯的肝细胞培养时的功能有明显降低。能使肝细胞DNA合成达到最大值的LPS浓度为10 μg/ml,随着LPS浓度的增高,其肝细胞DNA合成功能反而下降。**结论**:KC具有促进和抑制肝细胞再生的能力。因此适当地调节KC功能,对促进肝细胞再生具有重要意义。

关键词 肝再生;Kupffer细胞;肝硬变
中图法分类号 R575.2

大量研究表明,Kupffer细胞(KC)和肝细胞相互依赖,共同处于一个微环境中,在生理和病理状态下,相互作用。Robert[1]认为KC在机体防御和调节中发挥重要作用,而来自肠道的存在门脉的内毒素(LPS)能活化KC。但在不同的病理状态下,这种活化的KC对肝再生的启动和进程有何影响,现在尚不清楚。本实验通过在肝硬变大鼠行肝部分切除术基础上,体外活化KC,观察其对肝再生过程的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及模型制作

50只健康的雄性Wistar大鼠,重220 g~250 g,分为肝硬变大鼠部分肝切除术组(C-PH)、正常大鼠部分肝切除术组(N-PH)和假手术组(SO)。大鼠肝硬变模型制作参考吴孟超等[2]的方法进行。简言之,每5 d每百克体重大鼠皮下注射60%的四氯化碳油溶液0.3 ml,用3%~5%的乙醇代替饮用水,一月半后停止用药,动物稳定一周后可进行实验。肝切除的动物模型采用Goss介绍的Higgin创建的方法[3],即将正常的或有肝硬变的大鼠在乙醚麻醉下,腹部正中切口入腹,切除大鼠肝脏的左叶和中叶(切除量为全肝的70%)。所有的模型制作是在上午8:00~9:00之间进行。SO组方法同上,但不切除肝脏,即正常对照组。手术后腹腔内注射5%GS 5 ml。观察时相为大鼠术后6 h。

1.2 枯否氏细胞的分离与培养

采用Callery[4]的方法,稍加改变。简言之,到时相点的动物乙醚麻醉,门静脉游插管,向肝内均匀灌注Hanks液和0.05%胶原酶。切除肝脏,通过多次离心,分离出KC,通过台盼蓝染色,可观察到细胞活性>90%,将KC悬液加入含10%小牛血清的RPMI 1640培养基,细胞浓度为1×10^6/ml,放入24孔培养板在CO_2孵箱内孵育。

1.3 培养细胞分组和^{3}H-TDR掺合法,^{3}H-亮氨酸的测定

培养细胞分组:C-PH组肝细胞+C-PH组KC上清液;C-PH组肝细胞+N-PH组KC上清液;C-PH组肝细胞+SO组KC上清液;C-PH组肝细胞。

用24孔细胞培养板分别培养肝细胞和KC,每孔加入含10%小牛血清RPMI1640培养基,24 h后换培养基并在KC培养板内加入不同浓度的内毒素(0111B4)培养。培养24 h后,分别取KC培养的上清液,加入肝细胞培养板中。

^{3}H-TDR掺合法和总蛋白质的测定:参考Billiar[5]的方法。即将上述各组培养细胞继续培养18 h,培养基换成含有^{3}H-胸腺嘧啶(2.0 μCi/孔)的Williams B培养基,或^{3}H-亮氨酸(1.0 μCi/孔)DMEM培养基,分别培养6 h或4 h中断培养,将细胞收集在纤维滤纸上,分别在液闪上计数。

统计学处理:资料表达采用$\bar{x}\pm s$,采用Microsoft excel软件在微机上进行方差分析、t检验。

2 结果

2.1 KC上清液对肝细胞DNA和蛋白质合成功能的影响

术后6 h测定结果见表1,因为术后6 h点是肝细胞再生启动的关键时期。从表中可以看出,用小剂量LPS可活化KC,其联合培养的肝细胞DNA合成功能和蛋白质的合成功能均有明显提高,也就是说,活化的KC能促进肝细胞再生。相反,未经活化的KC和肝细胞联合培养(C-PH组),其DNA合成功能和蛋白质合成功能均较单纯的肝细胞培养时的功能有明显降低。这说明KC未活化时,在C-PH组其分泌的细胞因子具有抑制肝细胞生长的作用。

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39670712
** 陈 平,男,34岁,主治医师,讲师,博士

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

表1 KC上清液对肝细胞DNA和蛋白质合成功能的影响

Tab 1 Effects of KC supernate on the synthesis of hepatocyte DNA and protein

Group	Control	LPS
^{3}H-TDR incorporation		
Hepatocytes of C-PH+KC supernate of C-PH	643±67*	532±162*
Hepatocytes of C-PH+KC supernate of N-PH	684±146*	783±241*
Hepatocytes of C-PH+KC supernate of SO	842±95	1156±213
Hepatocytes of N-PH	801±179	867±142
Hepatocytes of C-PH	697±101*	703±256*
Hepatocytes of SO	1034±156	1231±214
^{3}H-Leucine incorporation		
Hepatocytes of C-PH+KC supernate of C-PH	1521±293*	1191±216*
Hepatocytes of C-PH+KC supernate of N-PH	1723±152*	1689±351*
Hepatocytes of C-PH+KC supernate of SO	1963±316	2319±325
Hepatocytes of N-PH	1795±274	1931±241
Hepatocytes of C-PH	1674±356*	1642±326*
Hepatocytes of SO	2782±231	2534±179

LPS 10 μg/ml, *: $P<0.05$ *vs* hepatocytes of SO

2.2 不同浓度的LPS对肝细胞再生的影响

从表2可以看出,能使肝细胞DNA合成达到最大值的LPS浓度为10 μg/ml,随着LPS浓度的增高,其肝细胞DNA合成功能反而下降,这说明虽然LPS具有活化KC作用,但随着LPS剂量的增大,KC反而被抑制。

表2 不同浓度的LPS对肝细胞再生的影响

Tab 2 Effects of LPS on the regeneration of hepatocyte

The concentration of LPS (ρ_B/μg·ml^{-1})	C-PH	N-PH	SO
1	621±131*	623±115*	1031±131
10	703±256*	867±142*	1231±214
100	642±210*	807±167	1131±142
1000	547±217*	619±191	904±159

*: $P<0.05$ *vs* SO

3 讨论

大量研究表明[6],KC活化后会分泌大量细胞因子如EGF,TGF-α,HGF等,促进肝细胞再生,另一方面,它又分泌TGF-β等细胞因子抑制肝细胞生长。也就是说KC具有促进和抑制肝细胞再生的双重能力。因此适当地调节KC功能,对促进肝细胞再生具有重要意义。

Nghia研究表明,60%~70%的肝切除术后KC功能受抑制,其抑制的程度与切除量的大小有关,且对内毒素易感,动物死亡率明显上升。但Robert等[1]发现,小剂量的LPS能活化KC,促使其大量分泌细胞因子(包括一些能促使肝细胞生长的物质)。因此LPS刺激KC后在肝细胞再生中的作用仍不清楚,特别是在病理状态下(如肝硬变)。所以我们选用LPS刺激KC来活化KC,进一步观察这种活化的KC对病理状态下部分肝切除术后肝细胞再生的影响。我们选择肝部分切除术后6 h为研究的重点,因为我们考虑到术后6 h是肝细胞再生的最关键时期(我们以往对肝细胞再生规律的研究已经证实了这一点)。表1为肝部分切除术后6 h观察的结果。从表中可以看出,小剂量LPS可活化KC,当用正常大鼠的KC上清液培养肝细胞时,肝细胞DNA合成功能和蛋白质的合成功能均有明显提高,也就是说,活化正常的KC后,其分泌的细胞因子能明显促进肝细胞再生。相反,当使用受损的KC(肝硬变状态下)经LPS活化后的上清液培养肝细胞后,其DNA合成功能和蛋白质合成功能均较单纯的肝细胞培养时的功能有明显降低。这说明KC均能被LPS活化,但活化后对肝细胞再生功能会产生不同的结果,即正常状态下的KC被活化后,可促进肝细胞再生,而受损的KC被活化,其KC会抑制肝细胞再生。

Bolliar分析了LPS浓度对KC产生PGE2的影响,他发现随着LPS浓度的升高,KC产生的PGE2含量也越多。但LPS浓度的大小对肝细胞再生的影响是不一样的。从表2可以看出,能使肝细胞DNA合成达到最大值的LPS浓度为10 μg/ml,以后随着LPS浓度的增高,其肝细胞DNA合成功能反而下降,这说明虽然LPS本身具有活化KC作用,但随着LPS剂量的增大,它也有直接抑制KC的作用。这就能较好地解释Nghia的研究结果,即不同病理状态下行部分肝切除术时,刺激KC的LPS的量是造成不同肝再生结果的关键。

参考文献

1 Robert S M, Patricia A M. Kupffer cell function in host defence. Rev Infect Dis, 1987; 9(5): S616

2 吴孟超,杨广顺. 大鼠肝硬变模型复制的研究. 中华实验外科杂志, 1984; 1(4): 145

3 Goss J A, Mangino M J, Callery *et al*. Prostaglandin E2 downregulates Kupffer cell production of IL-1 and IL-6 during hepatic regeneration. Am Physio Soc, 1993: G601

4 Callery M P, Kamei T, Flye M W. Kupffer cell tumor necrosis factor-alpha production is suppressed during liver regeneration. J Surg Res, 1991; 50(5): 515

5 Billiar T R, Lysz T W, Curran R D. Hepatocyte modulation of Kupffer cell prostaglandin E2 production *in vitro*. J Leuko Bio, 1990; 47(3): 304

6 Nelson F, Janet E M. Regulation of liver growth: protooncogenes and transforming growth factors. Lab Invest, 1989; 60(1): 4

(收稿:1998-02-17;修回:1998-06-05)

(编辑 张大春)

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

The effects of activated Kupffer cells on liver cell regeneration in cirrhotic rats*

Chen Ping, Han Benli, Li Kun, Duan Henchun (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To observe the effects of activated Kupffer cells on liver cell regeneration, and to probe the mechanism of Kupffer cell regulation during liver regeneration. Methods: The cirrhotic rats after partial hepatectomy were used as the animal model. Hepatocytes and Kupffer cells were cultured *in vitro* and ^{3}H-TDR and ^{3}H-Leucine incorporation in the cultured cells were determined. Results: When the hepatocytes were cocultured with the Kupffer cell supernatant of the cirrhotic rats after operation, the hepatocyte DNA and protein synthesis functions were obviously decreased, however, when the liver cells were cocultured with Kupffer cell supernatant of the normal rats, these functions were increased significantly. When the KCs were cultured in the condition of 10 μg/ml LPS, KCs could obviously promote liver regeneration. Conclusion: Kupffer cells can both inhibit and accelerate liver regenertion, thus it is important to modulate the KC functions properly in order to enhance the regeneration of hepatocyte.

Key words liver regeneration; Kupffer cell; liver cirrhosis

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670712

球结膜囊肿一例

A case of bulbar conjunctiva cyst

黄晓勇* 刘 翔 张啸峰 (第三军医大学附属新桥医院眼科) 重庆, 400037

患者男, 52 岁, 因右眼球结膜包块 1 年半于 1996 年 6 月 10 日到我院就诊。患者无结膜外伤或眼部手术史, 但有长期结膜炎病史, 未曾治疗。初起时发现右眼颞侧球结膜一米粒大小包块, 有时有痒感, 曾多次到当地医院就诊, 未明确诊断, 予"抗生素眼液、可的松眼液"滴眼治疗无效, 肿物进行性增大到花生米大小, 伴有眼睑闭合不全。眼部检查: 双眼视力均 1.2, 右眼颞侧球结膜距角膜缘 0.5 cm 处球结膜可见 11 mm×10 mm×8 mm 肿物, 质软, 表面光滑, 与巩膜无粘连, 具囊性感, 右睑球结膜均充血, 肿块周围尤甚。右眼球向右运动受限, 右上、下眼睑闭合不全 3 mm。拟诊"右球结膜囊肿", 予抽液治疗, 抽出 0.8 ml 半透明粘性液, 基本抽尽囊内液体, 检查未发现异物, 送细胞学检查未发现肿瘤细胞。半月后患者来复诊, 肿块又长至 5 mm×5 mm×3 mm 大小, 行球结膜下完整剥离术, 完整剥离出一个 5 mm×4 mm×3 mm 卵圆形半透明物, 囊壁薄, 无血管长入。病理报告证实为球结膜囊肿, 其中无异物。两月后复诊未见复发。

讨论

球结膜囊肿长至 11 mm 大小, 引起眼睑闭合不全很少见, 尤其在抽出其中半透明液体半月后迅速发展至 5 mm 大小更为少见, 经文献检索, 80 年以来未见该病种报道。本病临床上易与上皮植入性球结膜囊肿、感染性肉芽肿、乳头状瘤相混淆。其中上皮植入性球结膜囊肿有明确的外伤史[1]或手术史[2]。而该病例反复追问并无外伤或手术史。确诊需仔细追问外伤及手术史, 详细眼部检查, 送病理检查。抽液治疗由于囊壁仍然存在, 可以导致迅速复发, 完整剥离达根治效果, 本例治疗效果好。该病进展缓慢, 长期慢性炎症刺激为主要原因, 引起球结膜细胞向内生长, 伸入结膜下组织, 因球结膜含有杯状细胞产生粘液而形成囊肿。预防方法为及时治疗结膜炎。

关键词 球结膜囊肿

中图法分类号 R777.3

参考文献

1 姜 慧. 球结膜下植物性异物囊肿一例. 眼外伤职业眼病杂志, 1994; 16(1): 74

2 李 永, 高 岩. 人工晶体植入术后结膜下植入性囊肿一例. 中华眼科杂志, 1995; 31(2): 225

(收稿: 1997-10-22; 修回: 1998-06-03)

(编辑 汪勤俭)

* 黄晓勇, 25 岁, 住院医师, 硕士研究生

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