DOI:10.16016/j.1000-5404.1989.04.007

人胎肝细胞对大鼠暴发性肝功能衰竭影响的初步研究*

郝 飞 向居正 李奇芬 余曼英（西南医院 传染科）

提 要 本文报道用D-氨基半乳糖所致大鼠暴发性肝衰竭作模型，观察人胎肝细胞对其影响。结果显示，腹腔内注射人胎肝细胞悬液和胞质液均能显著提高肝衰竭大鼠的存活率，两者间比较无显著差别。人胎肝细胞质液可减轻中毒大鼠内毒素血症，降低肝内丙二醛水平，阻止肝坏死，促进肝再生。实验结果提示人胎肝细胞治疗肝衰竭可能主要通过胞质液中的生物活性物质起作用。

关键词 肝疾病；半乳糖胺；胞质液；丙二醛；内毒素；肝衰竭；^{3}H-胸腺嘧啶核苷

近年来国内少数单位用人胎肝细胞悬液输注治疗重型肝炎收到一定效果[1]，但其机理不清。鉴于移植或输注肝细胞或输注再生肝胞质液（cytosol）治疗肝衰竭的效果不受动物种属差异的影响[2][3]，本研究用D-氨基半乳糖（D-Gal）诱发大鼠暴发性肝衰竭（FHF）作模型，观察人胎肝细胞对其影响，以探讨人胎肝细胞治疗肝衰竭的机理，为临床应用人胎肝细胞治疗重型肝炎或其它原因并发的肝衰竭提供依据。

材料与方法

一、动物、主要试剂和仪器

大鼠：Wistar大白鼠，雌雄各半，体重150～250g。人胎肝：取自水囊引产正常胎儿，胎龄5～6个月。主要试剂：D-Gal（重庆医科大学合成），内毒素测定试剂盒（上海医化所提供），硫代巴比妥酸（TBA，上海生化试剂二厂产品），1，1，3，3-四乙氧基丙烷（TEP，Sigma公司产品），^{3}H-TdR（中国原子能科学研究院提供）。主要仪器：MPF-4型荧光分光光度仪（Hitachi），LKB-1217型液体闪烁计数器。

二、人胎肝细胞悬液和胞质液的制备

在严格无菌条件下取出胎肝，分离肝包膜，剔除结缔组织，洗尽残血，然后按肝与缓冲液（12mmol Tris-HCl，5mmol EDTA，0.27mol蔗糖，pH7.6）为1:4（W/V）比例分别制备细胞悬液和胞质液。

细胞悬液的制备：采用机械分离法。制备的悬液经台盼蓝染色其活细胞率在80%以上，有核细胞数为2.575×10^7个/ml。

胞质液的制备：按Francivilla等[4]和王宏恺等[3]两方法。胞质液经电镜检查不含细胞器，放免测定不含胰岛素，蛋白含量为25mg/ml。细胞悬液和胞质液均于制成后4h内使用。

三、实验过程

1. 肝衰竭模型的制造：按王宏恺等[3]的方法预试。结果，最适致死量为1.8g/kg，亚致死量为1.2g/kg（表1）。

2. 存活率观察：取57只大鼠随机分为3组，每组19只。腹腔内注射致死量D-Gal，20h后3组分别腹腔内注射细胞悬液、胞质液和缓冲液各4ml，注射后连续观察10天各组大鼠存活情况。

3. 胞质液对中毒大鼠血浆内毒素、丙氨酸转氨酶（ALT）、总胆红素（TB）和肝内丙二醛（MDA）水平的影响：取大鼠48只，随机分为两组，用亚致死量D-Gal致大鼠中毒，中毒前2h两组

表1 不同剂量D-Gal中毒大鼠存活情况（死亡数／总数）

D-Gal中毒后时间	1.2g/kg	1.4g/kg	1.6g/kg	1.8g/kg	2.0g/kg
～24h	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5 (0%)
～36h	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	0/5(0%)	1/5 (20%)
～48h	0/5(0%)	1/5(20%)	1/5(20%)	2/5(40%)	4/5 (80%)
～72h	0/5(0%)	1/5(20%)	2/5(40%)	4/5(80%)	5/5(100%)
～7天	0/5(0%)	1/5(20%)	2/5(40%)	4/5(80%)	5/5(100%)

*国家自然科学基金资助课题

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

分别给予4ml胞质液和缓冲液，腹腔注射。于中毒后6、12、24和48h两组分别随机取6只大鼠，取右心血和肝组织分别作内毒素（鲎试剂微量基质显色法）、ALT、TB和肝内MDA(Ohkawa法[5])水平测定。取1块肝组织作病理检查。另取15只大鼠，腹腔内注射4ml缓冲液，6h后按上述过程留取标本测定各项指标正常对照值。

4. 肝细胞再生的研究：实验过程同3。按15μCi/100g体重量1次腹腔内注射^{3}H-TdR，2h后打开腹腔，在肝中叶固定部位留取0.5g组织按Schmidt-Thaunhauser-Scheider(STS)法[6]提取DNA，然后加入定量闪烁液，在同位素液闪计数器上测定，其掺入量用DPM/OD260表示。

四、统计学处理

各组存活率比较作χ^2检验，各均数组间比较作Student's t检验，个别方差不齐用秩和检验。

结　果

一、存活率

治疗后4天，细胞悬液组和胞质液组存活率分别为73.68%和63.15%，与对照组(5.26%)相比差别非常显著（P<0.001），治疗后10天，细胞悬液组和胞质液组存活率分别为47.37%和42.11%，与对照组（5.26%）相比分别呈非常显著和显著差别（P<0.01和P<0.05），治疗后4天和10天细胞悬液组和胞质液组比较无显著差别（P>0.05）（图1）。

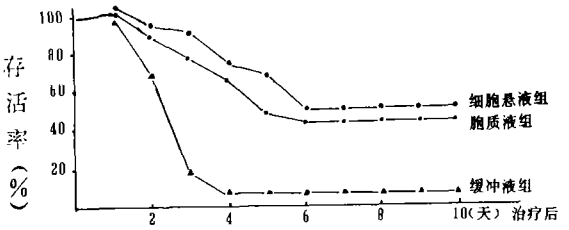


图1　不同处理组的FHF大鼠存活率比较（各组n=19）

二、胞质液对中毒大鼠血浆内毒素、ALT、TB和肝内MDA水平影响

胞质液组其血浆内毒素和肝内MDA水平在各观察时相与缓冲液组相比水平降低（P<0.05、<0.01或<0.001），胞质液组在中毒后6h其血浆ALT水平较缓冲液组高（P<0.05），12h两组无显著差别，在24和48h与缓冲液组相比水平降低（P<0.05或<0.01），两组TB水平在6～48h均无显著差别（P>0.05）（表2）。

三、胞质液对中毒大鼠肝再生的影响

胞质液组和缓冲液组在中毒后6和12h其肝内DNA合成速率无显著差别（P>0.05），24和48h胞质液组肝内DNA合成速率显著高于缓冲液组（P<0.001）（图2）。

表2　胞质液对中毒大鼠血浆内毒素、肝内MDA、ALT和TB水平（$\bar{X}\pm SD$）的影响

	中毒时间（h）	数目（只）	内毒素 (pg/ml)	肝内MDA (nmol/mg蛋白)	血浆ALT (u)	TB (μmol/L)
正常组	-	15	43.8±6.7	0.99±0.14	19.80±7.99	2.73±2.05
缓冲液组	6	6	229.78±98.98	4.73±0.69	89.33±16.91	3.07±1.20
胞质液组			90.63±31.22***	3.24±0.76**	138.00±123.71*	5.99±3.25
缓冲液组	12	6	380.21±68.03	6.28±0.59	255.67±58.15	9.23±8.72
胞质液组			123.12±68.73***	3.81±0.72***	201.00±79.14	5.81±2.05
缓冲液组	24	6	359.03±76.56	7.08±0.88	606.00±279.39	9.41±8.04
胞质液组			144.17±24.73***	2.67±0.46***	285.00±275.03*	7.01±6.16
缓冲液组	48	6	120.56±43.88	7.29±0.84	876.33±417.63	20.86±15.22
胞质液组			56.73±22.69*	2.17±0.43***	120.33±184.05**	7.35±7.52

注：* **,***分别表示与缓冲液组相比P<0.05，P<0.01和P<0.001。

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

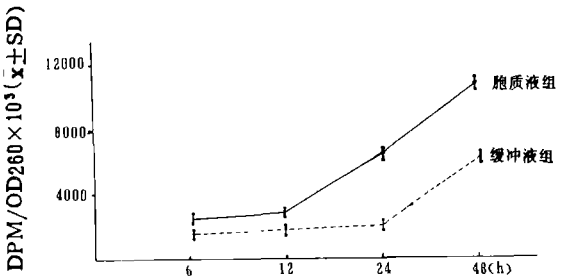


图 2　胞质液对D-Gal中毒所致大鼠肝内DNA合成的影响

四、肝脏病理

两组在中毒后6h其肝损伤程度无明显差别，12h缓冲液组见散在灶性和片状坏死，胞质液组仅见灶性坏死。24h和48h缓冲液组见较多片状或大片坏死区，肝小叶结构破坏，胞质液组在24h见散在片状坏死，小叶结构尚完整，至48h病变已开始恢复，并见肝细胞再生活跃。

讨　论

一般认为，移植或输注肝细胞或输注再生肝胞质液提高实验性FHF动物存活率的机理主要有两方面，即：（1）移植或输注肝细胞短暂代谢支持作用；（2）促进病损肝细胞再生[2][4][7]。本实验发现用人胎肝细胞悬液和胞质液均能显著提高FHF大鼠存活率，而两组间比较无显著差别，且胞质液经电镜检查不含细胞器，故认为此疗效可能主要不是通过完整细胞或细胞器起代谢支持作用，而可能是通过胎肝细胞中某些生物活性物质对FHF大鼠影响而实现的。

胞质液可有效地减轻中毒大鼠内毒素血症，降低肝内MDA水平，其机理尚不清楚。多数学者认为D-Gal中毒大鼠发生内毒素血症主要由于枯否氏细胞（KC）功能障碍和肠源性内毒素吸收增多，而内毒素血症和KC功能障碍可诱发或促进肝内脂质过氧化反应[8][9]。Ohkawa等[9]用再生肝胞质液治疗D-Gal中毒大鼠，发现可显著提高单核吞噬细胞系统功能。我们推测胞质液减轻中毒大鼠内毒素血症的机理可能通过改善KC功能，以增强其对肠源性内毒素的清除。内毒素的减轻和KC功能的改善又可能是胞质液降低肝内MDA水平的原因，另外胎肝细胞中含有某些微量元素、维生素及其它不明抗氧化物质，这些物质对稳定生物膜，阻止脂质过氧化反应也可能起一定作用。

目前相继有许多学者的实验提示肝细胞本身就存在促进肝细胞再生的物质[4][7]。Labrecque等[11]从刚断奶幼鼠和部分肝切除成年大鼠的肝脏中提取出一种刺激肝细胞DNA合成的物质叫肝再生刺激因子(Hepatic stimulator substances, HSS)，研究发现此物质有器官特异性，无种属特异性。本实验结果发现胞质液可显著增强中毒大鼠肝内DNA合成速率，提示人胎肝细胞中可能同样存在有促进肝细胞再生的物质，对此有必要作进一步研究。

（本实验得到本院检验科胡珍国技师协助，本院病理科柳凤轩副主任医师对病理部分进行了审阅，特此致谢）。

参考文献

1. 陈成伟，等。人胎肝细胞悬液治疗重型肝炎—7例报告。中华消化杂志 1987；7（2）：24
2. Makowka L, et al. Reversal of anoxic and toxic induced hepatic failure by syngeneic, allogeneic and xenogeneic hepatocyte transplantation. Surgery 1980; 88(2):244
3. 王宏恺，等。肝细胞质液治疗大鼠暴发性肝功能衰竭的研究。中华器官移植杂志 1986;7(2):75
4. Francavilla A, et al. The effect of hepatic stimulating substance, isolated from regenerating hepatic cytosol, and 50,000 and 300,000 subfractions in

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

enhancing survival in experimental acute hepatic failure in rats treated with D-galactosamine. Hepatology 1986; 6(6):1346
5. Ohkawa H, et al. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979;95(2):351
6. 朱 验，等。生物化学实验：肝脏组织中DNA和RNA的分离与测定。上海：上海科技出版社，1981:133～134
7. O'neill PL, et al. Factors effecting in reducing rat mortality due to acute liver failure as induced by D-galactosamine poisoning. J Surg Res 1984;36(4):371
8. Ogawa R, et al. Changes in hepatic lipoperoxide concentration in endotoximic rats. Circ Shock 1982;9(4):369
9. Shiraton Y, et al. Superoxide anion generating capacity and lysosomal enzyme activities of Kupffer cells in galactosamine induced hepatitis. Gastroenterol Jpn 1986;21(2):137
10. Ohkawa M, et al. Effects of regenerating liver cytosol on drug-induced hepatic failure. Surgery 1985;97(4):455
11. Labrecque DR, et al. Hepatic regeneration substances: physiochemical characteristics and specifity. Am J Physiol 1982;242(3):G281

(收稿：1988.9.26；修回：1989.6.21)

Preliminary Study of the Effects of Human Fetal Liver Cells on D-galactosamine-induced Fulminant Hepatic Failure in Rats

Hao Fei, et al. (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical College)

The effects of human fetal liver cells on the fulminant hepatic failure induced by D-galactosamine in rats are observed and the mechanism is investigated. The survival rates of rats injected intraperitoneally with single cell suspension and cytosol are 47.37% and 42.11% and are significantly higher than that of the buffer control(5.26%)($P<0.05$), but there is no statistical difference between the two preparations. Administration of cytosol 2 h before intoxication shows that the values of plasma endotoxin and liver malondialdehyde(MDA) in rats are significantly lower($P<0.05$, <0.01, or <0.001) and ^{3}H-thymidine incorporation into hepatic DNA(DPM/OD260)higher($P<0.001$)than those of the buffer control. The results suggest that some biological active substances in human fetal liver cells may be related to the effects.

Key words: liver diseases/CI; galactosamine; cytosol; malondialdehyde; endotoxin; hepatic failure; H-thymidine

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