DOI:10.16016/j.1000-5404.1990.04.004

无细胞人胎肝制剂的成分及其对大鼠肝衰竭的疗效观察

吴力克 向居正 胡仕琦 何长伦 张永明（西南医院 传染科）

提 要 本文观察了无细胞人胎肝制剂（胞浆液和透析液）及人胎肌细胞或成人肝细胞的胞浆液对实验性肝衰竭的治疗作用。结果发现：①胎肝胞浆液较其他3种制剂能显著提高肝衰竭大鼠存活率（$P<0.01$），②胎肝胞浆液治疗肝衰竭的关键性有效成分很可能是某些可溶性大分子活性物质，而非所含的激素、营养物质、微量元素、支链氨基酸等成分。

关键词 肝疾病；细胞溶质，肝细胞；细胞溶质，肌细胞；细胞溶质，成人肝；组织提取物；半乳糖胺

近年来，国内外许多学者致力于用肝细胞治疗实验性肝衰竭的研究，并认为可显著提高肝衰竭动物的存活率。但用胎肝细胞治疗实验性肝衰竭的报道罕见[1][2]。本文用只含可溶性成分的胞浆液和只含中、小分子物质的透析液两种无细胞人胎肝制剂，以及胎儿骨骼肌和正常成人肝胞浆液，治疗致死量D-氨基半乳糖（D-Gal）中毒20h的大鼠，观察这些制剂对肝衰竭动物存活率的影响，并对制剂成分进行初步分析。目的是：①寻找人胎肝细胞治疗肝衰竭的有效成分；②比较验证胎肝和非胎肝无细胞制剂对肝衰竭动物的治疗效果。现将实验结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 制剂的制备过程

1.1.1 人胎肝胞浆液的制备：人胎肝取自月龄4.5～5.5个月，水囊引产的正常胎儿，按徐淑云等[3]制备可溶性胞浆蛋白的方法制备成胞浆液。简要步骤见图。

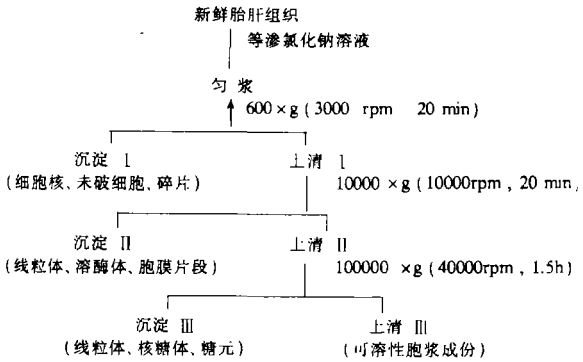


图 差速离心法制备胞浆液流程示意图

1.1.2 人胎肝透析液的制备：将胎肝胞浆液用冰生理盐水1∶1稀释后，用人工肾机透析。收集透析外液，置冰冻干燥机内冷冻浓缩，使样品容积与透析前相等，以无菌瓶收集备用。

1.1.3 人胎肌和成人肝胞浆液的制备 人胎肌取自胎儿腿部，成人肝取自意外死亡2h内的健康成人。用前述方法制备成胞浆液。

所有制剂均立即使用。同时做细菌培养和热原检测，均为阴性。每种制剂用6只正常大鼠做急性毒性试验，动物表现正常，无一死亡。

1.2 制剂成分的初步鉴定

测定了4种制剂中激素类、免疫活性物质、蛋白质、核酸、葡萄糖、脂类、微量元素、游离氨基酸以及纤维结合蛋白（Fn）、甲胎蛋白（AFP）等生物大分子含量。用高速凝胶层析法鉴定每种制剂大、中、小3种分子量物质各占的相对浓度比例，用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）粗略分离每种制剂中蛋白质并推算分子量。

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

1.3 肝衰竭动物模型制作及存活率观察

取健康Wistar大鼠75只，将致死剂量D-Gal（1.8g/kg）一次腹腔内注射，造成肝衰竭模型[4]。随机分为5组。于中毒后20h，A组给胎肝胞浆液（胎肝液）、B组给胎肝胞浆液的透析液（透析液）、C组给胎肌胞浆液（胎肌液）、D组给成人肝胞浆液（成肝液）、E组给生理盐水作对照，每只5 ml一次腹腔内注射。连续10天观察各组大鼠存活情况。另取未作任何处理的10只大鼠作正常对照组。

1.4 统计学处理

3种肝制剂游离氨基酸含量比较作方差分析。各组动物存活率比较作χ^2检验。

2 结果

2.1 制剂成分的测定结果 见表1。

表1 胎肝制剂成分初步分析结果

		胎肝胞浆液 含量	单位	胎肝透析液 含量	单位	成人肝胞浆液 含量	单位
激素类	胰岛素	0	μu/ml	0	μu/ml	0	μu/ml
	胰高糖素	41	pg/ml	55	pg/ml	0	pg/ml
	C肽	0.85	pmol/ml	0.62	pmol/ml	0	pmol/ml
	皮质酸	13.1	μg/dl	4.6	μg/dl	1.8	μg/dl
	生长激素	0.40	ng/ml	0 73	ng/ml	0	ng/ml
免疫活性物质	IgG	0	mg/ml	0	mg/ml	0	mg/ml
	IgN	0	mg/ml	0	mg/ml	0	mg/ml
	IgA	0	mg/ml	0	mg/ml	0	mg/ml
	G	0	mg/ml	0	mg/ml	0	mg/ml
	Fn	58.96	mg/dl	0	mg/ml	71.27	mg/dl
其它大分子物质	总核酸	85	μg/ml	4 35	μg/ml	127	μg/ml
	DNA	9.3	μg/ml	0.13	μg/ml	31.9	μg/ml
	RNA	75.7	μg/ml	4 22	μg/ml	95.1	μg/ml
	AFP	1050	ng/ml	0	ng/ml	5.8	ng/ml
	mAST	6.1	μ	0	μ	5.3	μ
	OCT	10.5	IU/L	0	IU/L	7.76	IU/L

		胎肝胞浆液 含量	单位	胎肝透析液 含量	单位	胎肌胞浆液 含量	单位
营养物质	总蛋白质	15	mg/ml	0	mg/ml	17.3	mg/ml
	葡萄糖	45	mmol/L	28	mmol/L	27.6	mmol/L
	甘油脂	0.71	mmol/L	45	mmol/L	19.2	mmol/L
	胆固醇	0 79	mmol/L	22.32	mmol/L	29.8	mmol/L
微量元素	Ca	103	μg/dl	139	μg/dl	147	μg/dl
	Mg	74	μg/dl	79	μg/dl	85	μg/dl
	Na	144	μg/dl	121	μg/dl	133	μg/dl
	K	92	μg/dl	77	μg/dl	101	μg/dl
	Cu	13.6	μg/dl	4.1	μg/dl	5.3	μg/dl
	Zn	22.3	μg/dl	19 8	μg/dl	29.4	μg/dl
	Fe	5.7	μg/dl	4.5	μg/dl	3.9	μg/dl

注：每种成分均同时测二份标本，取平均值。

2.2 3种肝制剂游离氨基酸测定结果

氨基酸谱比较中，计算出胎肝液、透析液和成肝液三种肝制剂必需与非必需氨基酸的比值，分别为0.68、0.61及0.36；支链与芳香族氨基酸的比值，分别为1.70、2.30和0.14。

2.3 不同制剂大、中、小三种分子量物质相对浓度比例测定结果

胎肝液、成肝液均以中分子物质浓度比例高，其次为大分子物质；透析液主要是中、小分子物质；胎肌液以大分子和小分子物质为主。

2.4 制剂中蛋白质SDS-PAGE结果

脱色后，胎肝液显示两条电泳区带；透析液未见明确区带；胎肌液显示3条区带；成肝液显示4条区带。查标准曲线推算出被测样品每一区带蛋白质的分子量见表2。

表2 胎肝液、胎肌液、成肝液显示区带的蛋白质分子量

样品名称		分子量(道尔顿)	样品名称		分子量(道尔顿)
胎肝液	区带1	91000	成肝液	区带1	89000
	区带2	24000		区带2	42000
胎肌液	区带1	88000		区带3	38000
	区带2	41000		区带4	26000
	区带3	27000			

2.5 不同处理组肝衰竭大鼠的存活率

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

治疗后第10天各组大鼠存活率为：胎肝液组40%（6/15只），透析液组和胎肌液组均13%（2/15只），成肝液组0%（0/15只，治疗后56h内全部死亡）、生理盐水组6.7%（1/15只）。胎肝液组与生理盐水组比，差异非常显著（$P<0.01$），透析液组及胎肌液组与生理盐水组比无显著差异（$P>0.05$），胎肝液组与透析液组、胎肌液组和成肝液组三者比，差异均非常显著（$P<0.01$）。

3 讨论

3.1 无细胞人胎肝制剂对肝衰竭大鼠存活率的影响

文献报道，部分肝切除后再生肝、刚断乳动物肝脏及胎肝的无细胞制剂（胞浆液、肝细胞培养上清液及胞浆粗提物）均能明显提高肝衰竭动物存活率，且无种属特异性[5-7]。我们用只含可溶性成分的人胎肝液治疗肝衰竭大鼠的存活率为40%；但用去除大分子物质的透析液和蛋白质含量与胎肝液相近似的胎肌液，治疗肝衰竭大鼠存活率仅13%。用成肝液治疗非但对病鼠无效，且在较短时间内导致病鼠全部死亡，鉴于细菌培养、热原检测和急性毒性试验均为阴性，似非感染或排斥反应所致，推测可能与成肝液中含有某些毒性物质有关。结果表明：胎肝液较其他3种制剂能明显提高肝衰竭大鼠存活率（$P<0.01$），提示胎肝液中存在对肝衰竭有特殊治疗作用的有效物质。

3.2 无细胞人胎肝制剂的成分分析

有关人胎肝成分分析的报道极少。苏先狮等发现胎肝胞浆液含有较高浓度的支链氨基酸、锌和β-葡萄糖醛酸酶，并认为这些物质在胎肝细胞治疗肝衰竭中有重要意义[8]。本实验发现胎肝液的成分有如下特点：①含有一定量的胰高糖素、皮质醇、C肽及生长激素，与以往的报道有所不同。这些激素可能大多来自母体和内分泌功能发达的胎盘。②不含免疫球蛋白和补体C_3，从而可排除这些免疫活性物质在胎肝液疗效中的作用。③大分子核酸和蛋白质含量均明显低于正常人和大鼠肝组织中含量。④含有多种营养物质和微量元素。⑤含有较高浓度的AFP和Fn。⑥支链氨基酸含量和必需与非必需氨基酸比值明显高于成肝液，而芳香氨基酸和氨含量则明显低于成肝液。

3.3 胎肝细胞治疗肝衰竭关键性有效成分的初步推测

胎肝细胞治疗肝衰竭的有效成分至今未明。有学者认为主要是起完整活细胞的代偿支持作用，但更多学者认为，胎肝细胞分泌或裂解后释放的某些生物活性物质是其关键性有效成分[9]。本实验胎肝液治疗肝衰竭大鼠存活率为40%，与郝飞等报告的疗效相近（47%）[8]，支持后一观点。但去除大分子物质的透析液，尽管含有多种营养素、支链氨基酸、微量元素和一定量的激素，且浓度接近甚至高于胎肝液，用以治疗后存活率仅13%。结果提示：胎肝细胞治疗肝衰竭的关键性有效成分，很可能在可溶性大分子这一物质层次。我们从胎肝液中分离出分子量为24000和91000道尔顿的两种蛋白质，是否就是治疗肝衰竭的主要活性物质，有待进一步鉴定。

参考文献

1. 长谷泰司,他.テツト急性肝不全モテルに対する腹腔内胎儿肝细胞移植の效果。肝脏 1987；28(Suppl):209
2. 张永新，等。大鼠外科型急性肝衰竭模型的制备及应用胎鼠肝细胞输注治疗的研究。中华医学杂志1989；69(2):95
3. 徐淑云，等。超离心法。药理实验方法学，人民卫生出版社 1982:281

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

4. Ohkawa M, et al. Effects of regenerating liver cytosol on drug-induced hepatic failure. Surgery 1985; 97(4):455
5. Miyazaki M, et al. Reversal of lethal, chemotherapeutically induced acute hepatic necrosis in rats by regenerating liver cytosol. Surgery 1983; 94(2):142
6. O'Neill PL, et al. Cell-free supernatant from hepatocyte culture improves survival of rats with chemically induced acute liver failure. J Surg Res 1982; 32(4):347
7. Francavilla A, et al. The effect of hepatic stimulatory substance, isolated from regenerating hepatic cytosol, and 50000 and 300000 subfractions in enhancing survival in experimental acute hepatic failure in rats treated with D-Galactosamine. Hepatology 1986; 6(6): 1346
8. 苏先狮：胎肝细胞治疗肝病的临床和实验研究进展。临床肝胆病杂志 1989；5(1):14
9. O'Neill PL, et al. Factors effects in reducing rats mortality due to acute liver failure as induced by D-Galactosmine poisoning. J Surg Res 1984; 36(4):371
10. 郝飞，等。人胎肝细胞对大鼠暴发性肝功能衰竭影响的初步研究。第三军医大学学报 1989；11(4):266

（收稿：1989.11.02；修回：1990.05.15）

Analysis of the Components of Cell-free Preparations of Human Fetal Liver and Its Effect on Survival of Experimental Hepatic Failure

Wu Like, et al (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical College)

Effect of cell-free preparation of human fetal liver (cytosol and its dialysate), human fetal muscle cytosol(FMC) and human adult liver cytosol (ALC) on survival rate of rats with acute hepatic failure induced by D-galactosamine was studied. The components of the 4 preparations were analysed preliminarily. Results: 1, fetal liver cytosol(FLC) could increase the survival rate(SR) of rats with hepatic failure(HF) comparing with normal saline($P<0.01$), while the fetal liver dialysate(FLD), which contains no large molecule substances prepared from FLC, and FMC with almost the same protein contents as FLC hadn't the same effect($P>0.05$). The SR of rats with HF was reduced by ALC markedly; 2, IgG, IgA, IgM and C_3 could not be detected in FLC, but a few kinds of hormones, trace elements, glucose and lipids, and biological large molecule substances (BLMS) such as nucleic acids and proteins were found. As to free amino acid, content of branch chain amino acids in FLC was significantly higher than that in ALC, but the content of aromatic amino acids and ammonia was markedly lower than that in ALC. The components in FLD were almost the same

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

as in FLC except BLMS. These data suggest that the soluble BLMS in FLC may play a key role in treating HF. ALC could reduce SR and contained a large amount of poisonous substances such as aromatic amino acids and ammonia.

Key words liver diseases/TH; cytosol, fetal liver; cytosol, fetal muscle; cytosol, adult liver, human; tissue extracts/TU; galactosamine

个案与短篇

皮肤放射线烧伤3例报告

刘素琴（西南医院 放疗室）

放射线皮肤烧伤在放射治疗中偶可发生，大多由于治疗剂量过大，速度太快所致。病员全身情况对烧伤局部的过程及预后也有重要影响。我院近年来遇见3例，具有一定特点，报道如下。

例1，李×，女36岁，诊断为右腰背部海绵状血管瘤，病变面积自右上腰背部至骶髂部约$30\times12cm^2$大小。分别采用上、中、下3个射野，$10\times12cm^2$和$6\times10cm^2$大小。条件为180KV，10MA、0.25mmCu+1mmAL滤片，皮焦距40cm，每次2Gy（200rad)(空)，每周5次，第一疗程总量为30Gy（3000rad)(空)/23天。7个月后行第二疗程，总剂量为30.1Gy（3010rad)（空）/17天。在第二疗程的最后一次照射时，由于工作粗疏，未加滤片，每野各照射2Gy（200rad)（空），发现后又再加上0.25mmCu+1mmAL，各野重复照射一次，致使当天每野剂量达6.04Gy（604rad)（空），第二疗程的剂量累加起来达30.1Gy（3010rad/17天，远远超过皮肤最大耐受量，导致皮肤严重损害而发生溃疡，面积为$12\times10cm^2$。

例2，刘×，男22岁，诊断为背部混合性血管瘤，约$20\times14cm^2$大小。照射条件为120KV，10MA，1mmAL，皮焦距50cm，每次2Gy（200rad)(空)，每周5次，A、B野交替照野，第一疗程总量每野为14Gy（1400rad(空)/19天，6个月后行第二疗程，总剂量每野为16Gy（1600rad)（空)/23天。该病员同时患早期肝硬化，有血小板减少和皮肤粘膜出血等症状。治疗结束后15天，发现受照局部皮肤形成$5\times5cm^2$的溃疡面。

例3，刘×，男50岁，诊断为直肠高分化腺癌，术后放疗。照射条件为^{60}Co，皮焦距70cm，射野骶尾部和下腹部各设一野，$11\times13cm^2$大小。200rad)/次。骶尾部总剂量为44Gy（4400rad)/49天，下腹部为3^4Gy（3400rad)/49天，盆腔中心剂量为78Gy（7800rad)/49天。两个月后，骶尾部发生$8\times5cm^2$溃疡面，骶骨外露，表面有坏死和肉芽组织。

原因分析：例1主原因照射剂量过大，加以照射面积又大，散射线也多，大大超过皮肤耐受量。例2的照射剂量虽在允许范围内，但病员有早期肝硬化，全身健康情况较差，影响照射局部皮肤的修复能力，仍发生了放射线溃疡。例3为直肠腺癌术后放疗，肿瘤剂量为78Gy(7800rad)/49天，比一般照射剂量(67.5Gy(6750rad)/35天)要高，此外，骶尾部又比下腹野的剂量更高。骶尾部软组织薄，加上术后血运差，导致皮肤及深层组织坏死。

经验教训 从上述3例中吸取的教训主要有3点：(1)对皮肤某些顽固性疾病进行放疗时，照射速度要放慢，每周限制在2～4Gy(200～400rad)(空）以内，照射条件限制在140～80KV以内。滤片应根据病变深浅而定，才能确保皮肤免受损害。(2)对于患有全身性疾病，影响正常皮肤新陈代谢和修复能力者，更应注意剂量和速度，有的作为禁忌症不是没有道理的。(3)照射局部软组织薄，血运不良者，^{60}Co深部照射时，剂量过大容易引起深部组织及骨坏死，一般宜成角斜向投射，避开骨组织为宜。

处理方法 通常按常规方法，在全身支持疗法下，局部创面清洁保护，涂布碘甘油和抗生素软膏等处理，均能达到愈合作用。如果创面渗出物过多，经久不愈，配合TDR（远红外线）照射，日2次，每次约30min，能促进局部血循环，消炎，止痛，减少渗出液，促进上皮生长，使创面愈合加速，本文3例均收

（下转294页）

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