

不同途径肝细胞移植对肝硬化大鼠模型肝脏血流灌注的影响

向贤宏¹, 陈伟¹, 陈柳琴², 庄文权¹, 关键¹, 杨建勇^{1*}

(1.中山大学附属第一医院医学影像科,广东广州 510080;2.广东省人民医院检验科,广东广州 510080)

摘要:【目的】采用 CT 灌注成像的方法评价不同途径移植肝细胞对肝硬化大鼠模型肝脏血流灌注的影响,进而筛选出针对肝硬化大鼠模型安全、有效的细胞移植途径。【方法】50 只经证实成模的肝硬化大鼠模型随机分为 5 组,前 4 组分别自肝动脉、门静脉、脾动脉及尾静脉移植肝细胞悬液 2 mL(细胞数量 2×10^6),对照组不干预。各组大鼠在细胞移植前 1 周及移植后第 4、8 周行 CT 灌注扫描,计算肝动脉灌注量(HAP)、门静脉灌注量(PVP)、总肝灌注量(THBP)等参数,死亡大鼠或第 8 周后处死大鼠取肝脏、肺行病理切片检查。【结果】移植后 4 周,G1 组、G2 组与 G3、G4、G5 组间 HAP 水平有显著性差异($P < 0.05$);移植后第 8 周 5 组间 HAP 没有显著性差异($P > 0.05$)。移植后 4、8 周,G1 组、G2 组与 G3、G4、G5 组间 PVP 水平差异没有统计学意义($P > 0.05$)。5 组大鼠肝纤维化均未见明显改善,肝假小叶未见明显改建。【结论】不同途径肝细胞移植虽不能有效地改善肝脏的血流灌注,但肝动脉、门静脉及尾静脉途径移植大鼠有较高的病死率,而经脾动脉途径移植相对较为安全。

关键词:肝细胞;移植;CT 灌注;肝硬化;病死率

中图分类号:R374 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-3554(2012)03-0357-04

Influence of Hepatocyte Transplantation by Different Pathways on Liver Perfusion of Rats with Cirrhosis

XIANG Xian-hong¹, CHEN Wei¹, CHEN Liu-qing¹, ZHUANG Wen-quan², GUAN Jian¹, YANG Jian-Yong^{1*}

(Department of Medical Imaging, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To evaluate the influence of hepatocyte transplantation by different pathways on liver perfusion of rats with cirrhosis using CT perfusion imaging scans to select safe, reliable and effective means of transplantation. 【Methods】Fifty rats of the hepatic cirrhosis model were randomly divided into 5 groups. The first 4 groups (G1, G2, G3, and G4) were transplanted 2 mL epatocytes suspension (cell number of 2×10^6) through intra-hepatic artery (G1), portal vein (G2), splenic artery (G3), and tail vein (G4), respectively. The control group (G5) were not intervened with at all. Liver CT perfusion imaging scans were performed in the rats of each group before 1 week and 4, 8 weeks after transplantation. The amount of hepatic artery perfusion (HAP), portal vein perfusion (PVP), total hepatic perfusion (THBP) was calculated and analyzed statistically. 【Results】Four weeks after transplantation, the differences of HAP levels in G1 group, G2 group versus G3, G4, G5 groups were statistically significant ($P < 0.05$). Eight weeks after transplantation, the differences of HAP levels among 5 groups were not statistically significant ($P > 0.05$). Four and 8 weeks after transplantation, there was no statistically significance in the variation of PVP levels in G1 group, G2 group versus G3, G4, G5 difference ($P > 0.05$). 【Conclusion】The results show that hepatocytes transplantation by different pathways can not be effective in improving liver perfusion. On the contrary, liver transplantation by hepatic artery and portal vein increased the risk of disorders.

Key words: hepatocytes; transplantation; CT perfusion imaging; cirrhosis; case fatality rate

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(3): 357-360; 367]

细胞移植作为肝硬化失代偿期通往原位肝移植的“桥梁”或替代治疗手段,有操作简便易行、医

疗费用低廉且不受供体短缺影响等优势。先前的研究对细胞移植的部位进行过积极的探索^[1-3],但

收稿日期:2011-12-11

基金项目:广东省自然科学基金(S2011040002502);中山大学学生业余科研项目(2011)资助

作者简介:向贤宏,医学博士,主治医师,E-mail: med.interventional@163.com; *通信作者:杨建勇,E-mail: cjr.yangjianyong@vip.163.com

研究者仅对不同部位的优缺点作简单的描述,缺乏针对不同移植部位的随机对照研究。本研究拟采用 CT 灌注扫描比较不同途径细胞移植对肝硬化大鼠模型肝脏血流动力学的影响,以筛选出针对肝硬化大鼠模型安全、有效的细胞移植途径。

1 材料和方法

1.1 实验动物

10 只健康成年 SD 大鼠用于分离大鼠成熟肝细胞(由中山大学实验动物中心提供,SPF 级,动物质量合格证号:0038286),雌雄不限,体质量 200~250 g,普通大鼠饲料喂养。50 只经病理证实成模的肝硬化大鼠模型备用^[4]。

1.2 实验材料

100 g/L 水合氯醛(购自中山大学附属第一医院)、胶原酶(Collagenase IV)和 DNA 酶(DNase I)购自 Sigma 公司,RPMI1640 培养基、D-Hanks 液、胰蛋白酶、10 g/L 小牛血清、DMEM 培养基等购自 Gibco 公司。显微手术器械一套。

1.3 实验方法

1.3.1 成熟肝细胞的制备 参照 Mao 等^[4]的方法制备出浓度 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$,分装 2 mL/份备用。细胞移植 5 组肝硬化大鼠模型经水合氯醛麻醉满意后,分别自肝动脉、门静脉、脾动脉^[5]及尾静脉移植肝细胞悬液 2 mL,对照组不作干预。

1.3.2 大鼠肝脏 CT 灌注 各组大鼠在细胞移植前 1 周及移植后 4、8 周应用 TOSHIBA Aquilion 64 slices CT 行肝脏灌注扫描。先平扫定位选取肝门部同时含有肝脏、腹主动脉和门静脉的层面,然后进行动态灌注扫描,将 CT 灌注图像及数据传递至 PACS 系统及 Work Station 存储。采用手动绘制感兴趣区(ROI)法,计算肝脏、腹主动脉及门静脉 CT 值变化;绘制时间-密度曲线 TDC,并应用工作站自带 CT 灌注处理软件,采用去卷积法,计算肝动脉灌注量(HAP)、门静脉灌注量(PVP)、肝脏总灌注量(THBP)等参数(图 1~4)。

1.3.3 组织病理学检查 死亡大鼠或细胞移植后 8 周处死所有大鼠,取出肝脏、肺脏。观察肝硬化大体标本情况。常规 HE 染色,光镜下观察各组标本肝假小叶形成及肝细胞坏死情况,并根据 Madden 标准对纤维化程度、肝细胞脂肪变性及坏死程度进行病理分级评分。

1.4 统计学处理

一般资料数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各参数之间的统计学分析采用随机区组设计资料的方差分析, $P < 0.05$ 时认为差异有统计意义。所有统计处理均使用 SPSS 16.0 软件。

2 结果

2.1 移植前各组 HAP

移植前各组 HAP 位于一个较高的水平(719 ± 133) $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$,组间 HAP 没有显著性差异($P > 0.05$);G1 组移植后第 4 周 HAP 水平较移植前明显下降,移植后第 8 周回升(687 ± 113) $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$;G2 组移植后第 4 周 HAP 水平较移植前稍有上升,移植后第 8 周回落(696 ± 58) $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$;移植后 4 周,G1 组、G2 组与 G3、G4、G5 组间 HAP 有显著性差异($P < 0.05$),表现为 G2 组最高、G3、G4、G5 组其次、G1 组最低;G3、G4、G5 组间没有显著性差异($P > 0.05$);移植后第 8 周五组间 HAP 没有显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 移植前各组 PVP

移植前各组 PVP 位于一个较低的水平(302 ± 70) $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$,组间 PVP 没有显著性差异($P > 0.05$);G1 组移植后第 4 周 PVP 水平较移植前稍有上升,移植后第 8 周回落(300 ± 74) $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$;G2 组移植后第 4 周 PVP 水平较移植前明显下降,移植后第 8 月回升(306 ± 65) $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$;移植后 4 周,G1 组、G2 组与 G3、G4、G5 组间 PVP 水平表现为 G1 组最高、G3、G4、G5 组其次、G2 组最低,组间没有显著性差异($P > 0.05$);G3、G4、G5 组间没有显著性差异($P > 0.05$);移植后 8 周五组间 PVP 基本在同一水平,组间没有显著性差异($P > 0.05$)。

2.3 各组 THBF

各组 THBF 移植前后没有显著性差异($P > 0.05$)。

2.4 各组大鼠肝纤维化

各组大鼠肝纤维化未见明显改善,肝假小叶未见明显改建;G1、G2 组肺内出现少量肝细胞,其余组未见类似细胞。

3 讨论

肝脏的血流量是维持其功能的重要因素。血

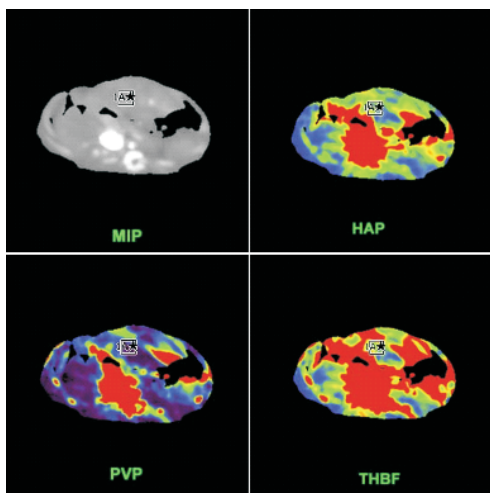


图 1 实验组 CT 灌注伪彩地形图 (以脾动脉组为例)

Fig.1 The CT perfusion pseudo-color topographic map of experimental group (splenic artery group)

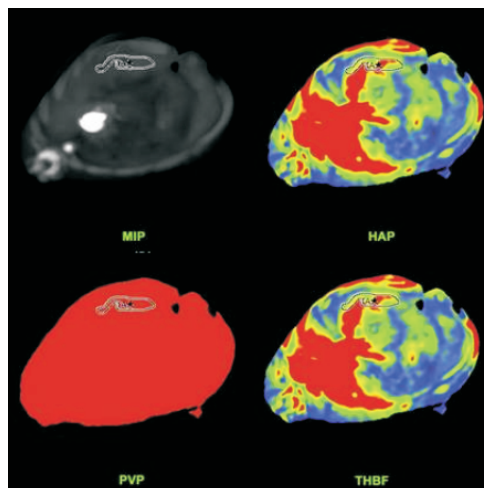


图 3 对照组 CT 灌注伪彩地形图 (以脾动脉组为例)

Fig.3 The CT perfusion pseudo-color topographic map of control group (splenic artery group)

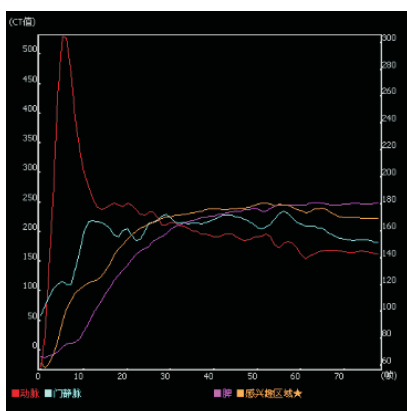


图 2 实验组 CT 灌注扫描曲线图 (以脾动脉组为例)

Fig.2 The CT perfusion scanning curve of experimental group (splenic artery group)

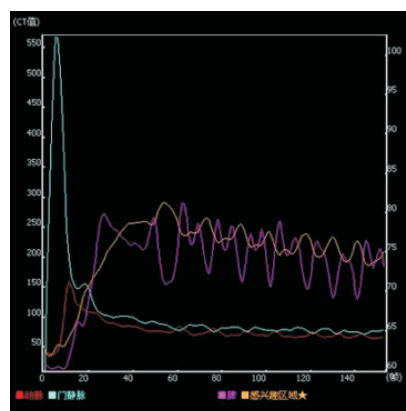


图 4 对照组 CT 灌注扫描曲线图 (以脾动脉组为例)

Fig.4 The CT perfusion scanning curve of control group (splenic artery group)

流灌注的降低,可引起循环血液与肝细胞间物质交换的减少并最终导致肝脏功能的损害,所以肝脏的血流动力学参数是判断其功能的重要指标。CT灌注成像(CTPI)通过检测活体肝脏肝动脉灌注量(HAP)、门静脉灌注量(PVP)、总肝灌注量(THBF)等参数的变化来准确评价肝硬化时肝脏的血流灌注变化^[6]。

肝硬化时,肝内血管床缩小、闭塞或扭曲,血管受到再生结节挤压,肝内门静脉、肝静脉和肝动脉小支三者之间失去正常关系,并相互出现交通吻合支等,这些严重的肝内血流循环紊乱,不仅是形成门静脉高压症的病理基础,而且加重肝细胞的营养障碍,促进肝硬化病变的进

一步进展。

对于有门脉高压症的受体而言,直接经门静脉或经肝动脉移植肝细胞可使肝细胞在血管内聚集,导致门静脉或肝动脉的栓塞,引起门静脉或肝动脉灌注的下降,进而增加肝功能衰竭或加重已有的门静脉高压症的风险。本研究中肝细胞移植后4周G1组出现肝动脉灌注量下降,G2组出现门脉灌注量下降的结果验证了上述推论。结果中我们还发现G1、G2、G4组大鼠肺内出现少量肝细胞且有较高的术后病死率,G3组未见类似细胞且病死率较低。这说明移植的细胞可经过肝内广泛的动-静瘘或门-体静脉循环或直接经过体循环迁移到肺组织内,从而导致肺动脉高压或通气换气

表 1 移植前 1 周各组大鼠肝脏 CT 灌注参数

Table 1 One week before transplantation experimental rats in each group liver CT perfusion parameters

($\bar{x} \pm s$)		
Group	HAP/(mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)	PVP/(mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)
G1(n = 10)	731 ± 57	302 ± 70
G2(n = 10)	731 ± 110	300 ± 78
G3(n = 10)	732 ± 135	300 ± 62
G4(n = 10)	725 ± 125	290 ± 72
G5(n = 10)	675 ± 206	301 ± 63

表 2 移植后 4 周各组大鼠肝脏 CT 灌注参数

Table 2 Four weeks after transplantation experimental rats in each group liver CT perfusion parameters

($\bar{x} \pm s$)		
Group	HAP/(mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)	PVP/(mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)
G1(n = 7)	602 ± 58	330 ± 89
G2(n = 5)	885 ± 38	264 ± 64
G3(n = 8)	732 ± 100	290 ± 58
G4(n = 7)	723 ± 124	281 ± 85
G5(n = 8)	727 ± 135	290 ± 70

表 3 移植后 8 周各组大鼠肝脏 CT 灌注参数

Table 3 Eight weeks after transplantation experimental rats in each group liver CT perfusion parameters ($\bar{x} \pm s$)

Group	HAP/(mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)	PVP/(mL·min ⁻¹ ·kg ⁻¹)
G1(n = 7)	687 ± 11	300 ± 74
G2(n = 5)	696 ± 51	306 ± 65
G3(n = 8)	750 ± 81	313 ± 77
G4(n = 7)	730 ± 113	301 ± 72
G5(n = 6)	749 ± 153	306 ± 31

功能障碍。临床研究也表明^[7-8],经门静脉移植可以引起短暂的门脉高压和肺功能不良。一项研究表明^[9]:对于原来就有门脉高压的(肝硬化或门脉结扎)的大鼠,虽然经门静脉移植细胞后门静脉的压力变化并不大,但有较多的肝细胞迁移到肺组织中,引起右心房压力的升高,移植细胞的数量增加 1 倍,并发症如呼吸暂停或死亡就明显增多。对于处于失代偿期的肝硬化大鼠模型来讲,肝动脉栓塞、门静脉栓塞或肺栓塞导致的肝功能恶化、肺功能不良以及肺动脉或门静脉高压等并发症对于肝脏处于失代偿期的受体而言可能是致命性的。

G3 组的结果表明,尽管细胞移植后肝脏的血

流灌注改善有限,但肝脏血流动力学的变化总体平稳。同时,与移植技术或移植的细胞相关的病死率为 2/10,低于其它实验组(均来自于本实验尚未发表的结果)。脾脏有与肝脏相似的微环境,适宜于移植的肝细胞的生存。同时,经脾动脉细胞移植还可降低受体对异体蛋白(供体)的排斥反应。从经脾动脉细胞移植后肝脏稳定的灌注参数可以看出,经脾动脉途径移植细胞造成严重的门脉栓塞或门脉高压的可能性很小,即使移植的细胞造成血管栓塞,其范围也会局限于脾内^[7]。也就是说,经脾脏细胞移植不仅能充分发挥移植细胞的功能,还可起到使门脉压力升高或门脉分支栓塞发生得以“缓冲”的效果。

G4 组肝脏亦有较稳定的灌注参数。临床上经外周静脉输注是最为常用、最易被患者接受的治疗途径。但从我们未发表的研究结果表明,经尾静脉途径移植肝细胞在肝功能及肝脏组织病理学等各方面的改善均较其他途径差且术中术后有较高的病死率(3/10)。由于肝细胞的直径与肺毛细血管管径大小的巨大差异(15 ~ 30 μm 比 3 μm),肝细胞一旦进入肺组织,可定殖或被吞噬于肺毛细血管床,从而引起各种各样严重的并发症,如肺动脉高压、通气障碍、肺栓塞等^[10]。

如前所述,不同途径肝细胞移植在有限的观察期间内并不能有效地改善肝脏的血流灌注。经肝动脉、门静脉或尾静脉途径移植增加了肝功能衰竭或肺功能不良的风险。相对而言,经脾动脉途径肝细胞移植治疗肝硬化大鼠模型有更为稳定的肝脏血流灌注和较低的术后病死率。

参考文献:

- [1] Naito T, Goto K, Morioka S, et al. Administration of granulocyte colony-stimulating factor facilitates the regenerative process of injured mice skeletal muscle via the activation of Akt/GSK3α signals [J]. *Eur J Appl Physiol*, 2009, 105(4): 643-651.
- [2] Cubero FJ, Maganto P, Mula N, et al. Functional response of hepatocytes transplanted into Gunn rats stimulated with thyroid hormone [J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(1): 210-216.
- [3] Sebben GA, Rocha SL, Von Bahten LC, et al. Infection on polypropylene mesh implantation site in the abdominal wall of rats with induced bacterial peritonitis