

# 肝细胞生长因子与三七皂苷对自体 肝细胞脾内移植的影响<sup>①</sup>

邓小耿 陈积圣 陈伟强 区庆嘉

(中山医科大学孙逸仙纪念医院肝胆外科; 广州, 510120)

**摘要 目的:**探索促进肝化脾增量及缩短其再生周期的新途径。**方法:**应用肝细胞生长因子(PHGF)与三七皂苷(PNGS)于自体肝细胞脾内移植(IHAP)的动物模型上,分别于移植术后2周、12周时对病理组织学、电镜形态、肝化脾匀浆谷丙转氨酶含量及脾内肝细胞增殖指数等指标进行观察分析。**结果:**移植术后2周,三七皂苷组脾内肝细胞水肿、变性程度较轻,肝化脾匀浆丙氨酸转氨酶(ALT)含量达 $(928.0 \pm 268.1) \text{ U/g}$ ,较对照组 $[(639.4 \pm 138.4) \text{ U/g}]$ 明显增高( $P < 0.01$ );移植术后12周,肝细胞生长因子组脾内肝细胞生长好,数量、面积大,肝化脾匀浆ALT含量达 $(2324.8 \pm 400.8) \text{ U/g}$ ,增殖指数( $I_p$ 达 $3.83\% \pm 0.42\%$  [对照组分别为 $(1839.4 \pm 368.4) \text{ U/g}$ 、 $2.89\% \pm 0.44\%$ ],与对照组相比差异均有显著性意义( $P < 0.05$ )。**结论:**三七皂苷在早期对脾内肝细胞有一定的抗损伤保护作用,而肝细胞生长因子对加速肝化脾增量及缩短其再生周期有明显作用。

**主题词** 肝移植; 肝再生; 肝细胞生长因子/治疗应用; 人参皂甙/治疗应用; 细胞移植

**中图分类号** R 657.3

## EFFECTS OF HEPATOCYTE GROWTH-PROMOTING FACTOR (PHGF) AND PANAX NOTOGINSENG (PNGS) ON INTRASPLENIC HEPATOCELLULAR AUTOTRANSPLANTATION

Deng Xiaogeng Chen Jisheng Chen Weiqiang Ou Qingjia

(Department of Surgery, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Memorial Hospital, Guangzhou, 510120)

**Abstract Objective:** To increase the weight of liver tissue mass present in spleen and to shorten the regeneration period of transplanted hepatocytes by means of stimulating DNA synthesis and by protecting against ischemic reperfusion injury. **Methods:** PHGF and PNGS were used in the experiment of intrasplenic hepatocellular autotransplantation (IHAT) with 70% partial hepatectomy. PHGF is a strong stimulator of hepatocellular DNA synthesis. PNGS is a new blocker of calcium channels. Histological examinations were carried out under both light and electron microscopy and content of ALT of hepatized spleen homogenate were assayed in two weeks after transplantation. Furthermore, detected proliferation index  $I_p$  of transplanted hepatocytes was by flow cytometry in twelve weeks after operation. **Results:** Hepatocellular regeneration was significantly better in Group B as compared with the other groups in two weeks after transplantation, but Group A was significantly better than the other group in twelve weeks postoperation. **Conclusions:** PHGF has significant effects on increasing the weight of liver tissue contained in spleen and shortening the regeneration period of the transplanted hepatocytes, while PNGS has certain effects on protecting the hepatocytes against ischemic reperfusion injury in the early stage of transplantation.

**Subject headings** liver transplantation; liver regeneration; hepatocyte growth factor/therapeutic use; panaxosides/therapeutic use; cell transplantation

肝化脾增量不足及其再生周期太长是阻碍脾内肝细胞移植在临床上进一步推广应用的主要原因

因。本实验应用肝细胞生长因子(PHGF)及三七皂苷(PNGS),以期通过对脾内肝细胞 DNA 合成的促进及对抗其缺血再灌注损伤等作用来达到加速肝化脾增量及缩短其再生周期的目的,为脾内肝细胞移植的临床研究提供一定的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组和模型制作

采取SD大鼠103只(清洁级动物,由中山医科大学实验动物中心提供),200~300 g,雌雄不限,用随机数据表达法随机分成4组,各组均行肝大部切除术(70%);实验A组(IHAT+PHGF G·);28只,自体肝细胞脾内移植(IHAT)加肝细胞生长因子;实验B组(IHAT+PNGS G·);28只,自体肝细胞脾内移植加三七皂苷;实验C组(IHAT G·);28只,自体肝细胞脾内移植,术后不用药物;D组(伪手术组)(NS G·);19只,脾内仅注射生理盐水。

### 1.2 脾内肝细胞移植与计数

先用常规方法麻醉、消毒后,切除鼠肝左前叶、右前叶、右后叶,仅保留中肝叶(切肝约70%),随即用改良的直接机械法将切下的肝前叶制成肝细胞悬液,迅速镜下台盼蓝染色法计肝细胞存活百分比、血细胞计数板计数量。随后暂时阻断脾蒂,通过脾实质内直接注射法将自体肝细胞移植于脾内。A组术后每天肌注肝细胞生长因子(阳江制药厂生产)5 mg/kg,每天1次,持续2周,以后隔天1次,持续1月。B组每天肌注三七皂苷液(昆明制药厂生产)25 mg/kg,每天1次,持续2周。

### 1.3 病理组织学观察

分别于手术后1 d、2周及12周时各取3只动

物的肝化脾标本,常规进行大体标本观察、HE及PAS染色切片光镜下观察。

### 1.4 电镜观察

分别于手术后2周、12周时A、B、C3组每组各取2例肝化脾标本,切成1 mm<sup>3</sup>小块,戊二醛-四氧化锇双固定,EPON812包埋,AO-E型钻石切片机制片,CM<sub>10</sub>及H-6000透射电镜观察。

### 1.5 肝化脾组织匀浆丙氨酸转氨酶含量测定

分别于手术后2周、12周时每组各取8只动物的肝化脾标本,称取质量后将其用直接机械法制成组胞悬液,再用MSE型超声波粉碎仪制成细胞匀浆(波长22 μm,30 s共4次),离心后取上清液检测其丙氨酸转氨酶含量( $y_{ALT}/U \cdot g^{-1}$ )。

### 1.6 脾内肝细胞增殖指数的检测

分别于手术后12周时A、B、C3组每组各取6只动物,将其肝化脾剪碎后用 $\rho$ (胰蛋白酶)=2.5 g/L消化制成单细胞悬液,室温下置于玻璃培养皿内1 h,再加入淋巴细胞分离液上,以转速2 000 r/min(离心半径为12 cm)离心25 min,将淋巴细胞分出。将剩下的肝细胞混合液用FASTAR PLUS型流式细胞仪对其DNA含量及细胞周期进行分析,算出每组脾内肝细胞增殖指数[ $I_P/(%)$ ],即处于S期细胞百分数)后进行组间比较。

### 1.7 统计学方法

移植肝细胞的数量、活率、酶学检测结果用F检验;肝细胞增殖指数结果采用秩和检验;酶学检测结果在进行组内比较时用t检验。

## 2 结果

### 2.1 各组移植肝细胞数量及存活百分比

表1 各组移植肝细胞数量及存活百分比<sup>1)</sup>

Table 1 The number and survival rate of transplanted hepaocytes<sup>1)</sup> ( $\bar{x} \pm s, n=28$ )

	Group A	Group B	Group C
Hepatocyte number ( $\times 10^6$ )	5.78 $\pm$ 2.12	5.67 $\pm$ 1.90	6.12 $\pm$ 1.66
Hepatocyte survival rate(%)	68.6 $\pm$ 9.9	68.0 $\pm$ 8.2	67.9 $\pm$ 9.2

1) No significant difference was observed among groups ( $P>0.05$ )

### 2.2 病理组织学改变

2.2.1 大体形态变化 移植术后各时期各组肝化脾的大体形态无明显区别。

2.2.2 早期病理改变 移植后1 d,光镜下可见大

量肝细胞成团散在分布于脾组织内,形态接近正常肝细胞,但有明显受压迫表现。

2.2.3 中期病理变化 移植术后2周,各组脾内肝细胞都出现早期大量变性坏死,伴有新生的幼稚

肝细胞,肝细胞数目较前明显减少,且大部分细胞水肿、体积增大,胞浆轻度嗜碱性,PAS染色弱阳性。胞核形态不规则,核膜尚清楚,可见多核的畸形肝细胞。仅见少数与正常肝细胞相似的细胞,还有小部分肝细胞样细胞呈退行性改变,核固缩、浓染,胞浆嗜酸性。但B组(三七皂苷)切片示脾内肝细胞变性程度较轻,PAS染色相对强阳性。

2.2.4 晚期病理改变 移植术12周,切片内肝细胞又明显增多,形态接近正常,结构趋于分化。各组切片可较容易见到肝细胞群,呈团状、索状,部分排列成铺砖样,且PAS染色强阳性。核分裂现象明显,可见双核细胞、多核细胞。以上各种变化以A组(肝细胞生长因子组)显著。

### 2.3 电镜观察

2.3.1 早期改变 移植术后2周,脾内存活的肝细胞水肿变性,体积增大。胞浆疏松,线粒体肿胀,嵴模糊或消失,内质网、糖原减少。核皱缩,形态不

规则,核内异染色体成份相对增多,核仁、核孔减少。以上各种变化B组相对较轻。

2.3.2 晚期改变 移植术后12周脾内可较容易见到存活的肝细胞。其细胞器丰富,线粒体数目增多,大小不一,嵴清晰,粗面内质网密集粗大,糖原明显增多状如玫瑰花瓣样。核增大,呈圆形或椭圆形,核膜清楚,核仁可见,部分细胞有核分裂现象,可见双核、多核细胞,偶见毛细胆管。以上变化以A组显著。

### 2.4 肝化脾匀浆丙氨酸转氨酶测定结果

组织化学研究中发现谷氨酸脱氢酶(GLDH)在肝脾中含量及活性差别很大,而丙氨酸转氨酶(ALT)的特异性较GLDH更强。通过测定肝化脾组织匀浆ALT含量的变化,不仅可反映脾内肝细胞的相对含量,且可反映肝细胞的功能状况及受损程度。本测定结果如表2。

表2 各组肝化脾匀浆ALT含量检测结果

Table 2 The content of alanine transaminase of hepatized spleen [ $Y_{ALT}/(U \cdot g^{-1})$ ]

	<i>n</i>	2 weeks <sup>1),3)</sup>	12 weeks <sup>2),3)</sup>
Group A <sup>3)</sup> (IHAT+PHGF G.)	8	611.3±171.8	2 324.8±400.8
Group B <sup>3)</sup> (IHAT+PNGS G.)	8	928.0±268.1	1 900.3±424.8
Group C <sup>3)</sup> (IHAT G.)	8	639.4±138.4	1 839.3±368.4
Group(NS G.)	8	202.8±47.3	220.4±29.9

1) 2 weeks ( $F=23.2$ ): group D vs the other group,  $P<0.01$ ; group B vs group C,  $P<0.01$ ; group A vs group C,  $P>0.05$ . 2) 12 weeks ( $F=57.4$ ) group D vs the other group,  $P<0.01$ ; group A vs group C,  $P<0.05$ ; group B vs Group C,  $P>0.05$ . 3) group A (2 weeks) vs group A (12 weeks),  $P<0.01$ ; group B (2 weeks) vs group B (12 weeks),  $P<0.01$ ; group C (2 weeks) vs group C (12 weeks),  $P<0.01$

### 2.5 脾内肝细胞增殖指数检测结果

用流式细胞仪直接对脾内肝细胞DNA含量及

细胞周期进行分析,计算每组脾内肝细胞增殖指数,结果如表3。

表3 各组脾内肝细胞增殖指数比较<sup>1)</sup>

Table 3 Detection of proliferation index of transplanted hepatocytes [ $I_P/(\%)$ ]

	1	2	3	4	5	6	$\bar{x} \pm s$
Group A (IHAT+PHGF G.)	3.30	4.40	4.13	3.97	3.74	3.44	3.83±0.42
Group B (IHAT+PNGS G.)	3.50	2.70	2.60	3.26	3.28	2.66	3.00±0.39
Group C (IHAT G.)	3.10	2.80	3.55	2.30	3.03	2.58	2.89±0.44

1) Group A vs group C,  $P<0.05$  ( $H=8.99$ ); group B vs group C,  $P>0.05$  ( $H=8.99$ )

## 3 讨论

众多研究表明,移植肝细胞能在脾内长期存

活、生长、增殖,并表现一定的肝细胞功能,在急性肝功能衰竭病人中可作为肝器官移植之前的辅助过渡治疗手段。脾内肝细胞移植被认为是临床上一些难治性肝病、终末期肝病继肝器官移植之后的

又一种可供选择的治疗方法。但目前尚停留在实验阶段,阻碍其在临床上进一步推广应用的主要原因是肝化脾增量不足及其再生周期太长等关键问题难以解决<sup>[1~3]</sup>。

移植肝细胞在脾内的生长和增殖受诸多因素的影响<sup>[4]</sup>,见如剂量一效应曲线、活率一效应曲线、肝切除一效应曲线、各种肝细胞营养因子特别是门脉源性肝营养因子(如胰岛素、胰高血糖素)的作用等研究中。有学者曾用经典的电压依赖性钙通道阻滞剂(VOC)异博定等以对抗缺血再灌注损伤,另有学者制成微胶囊包裹的肝细胞(IEH)后再行移植等,但以上各法作用皆不显著。目前肝化脾仅占2.2%~3.7%,再生指数也在3%以下。本研究则通过新的途径攻此难点。

PHGF是肝细胞DNA合成的强大刺激剂,能特异性地促进肝细胞增殖<sup>[5]</sup>。另外,游离肝细胞异位移植从广义看也将经历一个缺血再灌注损伤的过程,钙通道阻滞剂则可对抗这种损伤。PNGS是近来发现的一种新型钙通道阻滞剂,它能特异性地阻断受体操纵性钙通道(ROC),对经典的电压依赖性钙通道(VOC)作用较弱,而肝细胞钙内流以ROC方式为主,而非VOC方式<sup>[6]</sup>。所以本实验分别应用PHGF及PNGS于自体肝细胞脾内移植,以期通过对脾内肝细胞DNA合成的促进及对抗其缺血再灌注损伤等作用来达到加速肝化脾增量及缩短其再生周期的目的。实验结果表明,移植术后2周,B组(IHAT+PNGS G.)脾内肝细胞变性程度相对较轻,肝化脾匀浆谷丙转氨酶含量较对照组高( $P < 0.01$ ),提示PNGS在早期对脾内肝细胞有一定的抗损伤保护作用。而PHGF无明显作用,原因可能有三:①内源性肝细胞生长因子的作用;②残余肝的优势抑制;③可能与外源性肝细胞生长因子的作用时间不够长有关。在移植术后12周,A组(IHAT+PHGF G.)脾内肝细胞生长最好,ALT含量较对照组高( $P < 0.05$ ),尤其是直接反映脾内肝

细胞增殖能力的( $I_P$ )达 $(3.83 \pm 0.42)\%$  [对照组 $I_P$ 为 $(2.89 \pm 0.44)\%$ , ( $P < 0.05$ )],说明PHGF对促进肝化脾增量及缩短其再生周期有明显作用。而PNGS无明显作用,可能的原因分析:①影响脾内肝细胞生长增殖的因素众多,其中肝细胞DNA合成是增殖能力的决定因素;②PNGS对ROC的特异性作用还不够强;③ $Ca^{2+}$ 在肝细胞DNA合成中的作用机制尚有待于进一步研究。

近年来,随着分子生物学的迅猛发展,如能应用基因工程方法使移植肝细胞自我表达、自我分泌一些细胞因子,以促进它们自身不断地生长、增殖,对解决肝化脾增量问题可望有所突破。再者,体外肝细胞基因治疗的临床应用亦需要有肝细胞移植的可靠性。脾内肝细胞移植亦为肝细胞基因治疗开拓了一条有待研究的新路。

#### 参 考 文 献

- 1 Eroles G, Maganto P, Cienfuegos J, et al. Improvement of liver mass function in cirrhotic animals by hepatocellular transplantation. *Transp Proc*, 1992, 24(6):2993
- 2 Takeshita K, Ishibashi H, Kodama M. Hepatocellular transplantation for metabolic support in experimental acute ischemic liver failure in rats. *Transp Proc*, 1992, 24(6):3022
- 3 Mito M, Kusano M, Kawaura Y. Hepatocyte transplantation in man. *Transp Proc*, 1992, 24(6):3052
- 4 Inne H, Boral S, Amelie B, et al. Proliferative response of hepatocytes transplanted into spleen of solid support. *J Surg Res*, 1994, 56:417
- 5 张宜俊,陈光明,孙祥平,等. 肝细胞生长素的研制及临床应用. *临床肝胆病杂志*, 1991, 7(1):15
- 6 关永源,陈克敏,孙家均,等. 三七皂苷对血管平滑肌 $\beta$ 受体引起 $^{45}Ca$ 外溢与内流的影响. *中国药理学通报*, 1990, 6(4):229

(1997-05-14 收稿 1998-02-20 修回)