

[文章编号] 1000-4718(2006)12-2360-04

## 脾切除对门脉高压症大鼠 CD4、CD8 和脾功能的影响\*

王文攀<sup>1</sup>, 郑树森<sup>1△</sup>, 贾长库<sup>1</sup>, 丁光超<sup>2</sup>( <sup>1</sup> 浙江大学医学院附属第一医院卫生部多器官联合移植研究重点实验室, 浙江 杭州 310003;<sup>2</sup> 浙江大学附属儿童医院, 浙江 杭州 310031)

**[摘要]** 目的: 研究肝硬化门脉高压症(PHT)大鼠脾次全切除术后 CD4、CD8 与脾功能的变化。方法: 皮下注射 60% 四氯化碳复制大鼠肝硬化模型。共分 5 组: 正常大鼠组、肝硬化(PHT)组、正常大鼠脾切除组、PHT 全脾切除组、PHT 脾次全切除组, 每组 10 只。手术后第 4 周检测各组血常规、肝功能、tuftsin、CD4、CD8 等指标。结果: PHT 高压症大鼠脾切除术后 tuftsin 水平[(171 ± 21) ng/L vs (433 ± 44) ng/L,  $P < 0.01$ ]、CD4/CD8(2.01 ± 0.22 vs 1.12 ± 0.12,  $P < 0.01$ )均显著低于 PHT 组; PHT 大鼠脾次全切除组 tuftsin[(434 ± 42) ng/L vs (171 ± 21) ng/L,  $P < 0.01$ ]、CD4/CD8(1.97 ± 0.18 vs 1.12 ± 0.12,  $P < 0.01$ )显著高于 PHT 大鼠脾切除组。肝功能两者无显著差异( $P > 0.05$ )。结论: PHT 脾次全切除组大鼠术后免疫和脾功能比 PHT 脾全切除组大鼠明显改善, 肝功能两者无显著变化。

**[关键词]** 肝硬化; 高压症, 门静脉; 脾切除术; 免疫功能**[中图分类号]** R363**[文献标识码]** A

### Effects of splenectomy on CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and spleen function in cirrhotic rats with portal hypertension

WANG Wen-bo<sup>1</sup>, ZHENG Shu-sen<sup>1</sup>, JIA Chang-ku<sup>1</sup>, DING Guang-chao<sup>2</sup>( <sup>1</sup>The First Affiliated Hospital, Medical School of Zhejiang University, Hangzhou 310003, China. E-mail: zhengshus@cae.cn; <sup>2</sup>The Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310031, China)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigate the effect of subtotal splenectomy on the expression of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> and tuftsin in cirrhotic rats with portal hypertension (PHT). **METHODS:** Rats liver cirrhosis was induced by subcutaneous injection of 40% CCl<sub>4</sub>. Fifty rats were randomly divided into five groups ( $n = 10$ ). Group A: control rats; group B: PHT rats; group C: normal rats with total splenectomy; group D: PHT with total splenectomy and group E: PHT with subtotal splenectomy. The hepatic function, the expression of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, the ratio of CD4<sup>+</sup> to CD8<sup>+</sup> and tuftsin were analyzed at the fourth week after treatment. **RESULTS:** The expression of tuftsin, the ratio of CD4<sup>+</sup> to CD8<sup>+</sup> was significantly decreased in PHT rats with total splenectomy compared with PHT rats [(171 ± 21) ng/L vs (433 ± 44) ng/L,  $P < 0.01$ ; (2.01 ± 0.22 vs 1.12 ± 0.12),  $P < 0.01$ ]. In the group of PHT rats with subtotal splenectomy, the expression of tuftsin, the ratio of CD4<sup>+</sup> to CD8<sup>+</sup> was higher than those in the PHT rats with total splenectomy [(434 ± 42) ng/L vs (171 ± 21) ng/L,  $P < 0.01$ ; (1.97 ± 0.18 vs 1.12 ± 0.12,  $P < 0.01$ ], however, the hepatic function was not show difference ( $P > 0.05$ ). **CONCLUSION:** Spleen and immune function is significantly improved in PHT rats after subtotal splenectomy, but the hepatic function is not changed significantly.

**[KEY WORDS]** Liver cirrhosis; Hypertension, portal; Splenectomy; Immune function

脾脏有抗感染、抗肿瘤等免疫功能, 对于肝硬化门脉高压症(portal hypertension, PHT)的脾脏是保留还是切除, 历来就有争议<sup>[1]</sup>, 本实验以肝硬化门脉高压症大鼠为研究对象, 观察脾切除术后 4 周时血常规、肝功能、Tuftsin、CD4、CD8 等指标变化, 来反映脾次全切除及脾切除术对 PHT 大鼠免疫和脾功能的影响。

### 材 料 和 方 法

#### 1 肝硬化门脉高压症大鼠模型的复制

Wistar 大鼠购自上海医学实验动物中心, 清洁级, 雄性, 5-6 周龄, 体重 230-250 g。皮下注射四氯化碳橄榄油溶液(3:2 体积配制), 按 3 mL · kg<sup>-1</sup>,

[收稿日期] 2005-05-02 [修回日期] 2005-12-05

\* [基金项目] 浙江省科学技术厅院士基金资助项目(No. 2003A1008-07)

△通讯作者 Tel: 0571-87236570; E-mail: zhengshus@cae.cn

每周2次,饮用5%乙醇。对照组注射0.9%氯化钠溶液,饮自来水,满16周后全部停止注射,正常喂养,随机选5只经肝脾病理切片检查证实全部符合肝硬化的病理模型要求。恢复1周后开始手术。

## 2 分组及处理

将大鼠随机分为5组,每组10只。A组为正常对照大鼠组(control),B组为PHT大鼠(PHT)组,C组为正常大鼠包括副脾的脾全切除(NTS: normal rats with total splenectomy)组,D组为PHT大鼠包括副脾的脾全切手术(PHTTS: PHT rats with total splenectomy)组,E组为大鼠PHT脾次全切(PHTSTS: PHT rats with subtotal splenectomy)组。方法:结扎供应脾上极3/5动脉后在分界面下缝扎脾脏,切除缺血脾。手术时采用氯胺酮100 mg/kg加安定5 mg/kg混合后肌肉注射麻醉。

## 3 血样采集与检测

术后4周同麻醉后,动脉取血,检测血常规、CD4、CD8和CD4/CD8(单克隆抗体购自德国Serotec公司;流式细胞仪,美国Backman-coulter公司),余放入干燥玻璃试管后立即离心,血清置于-80℃冰箱内保存,1个月内检测肝功能和高效液相色谱法检测tuftsin(tuftsin标准品购自美国Sigma公司;高效液相色谱仪,LC-10AT<sub>VP</sub>,日本岛津公司)。

## 4 病理学检查

肝和脾经10%甲醛固定后,常规HE染色。

## 5 统计学处理

全部数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各样本均数用SAS 7.0统计学软件作方差分析,组间差异采用 $q$ 检验。

# 结 果

## 1 血常规

PHT大鼠RBC、WBC、PLT显著低于正常对照组(均 $P < 0.01$ );PHT大鼠脾切除组PLT显著高于PHT大鼠( $P < 0.01$ );PHT脾次全切除组与PHT脾切除组比较无显著差异( $P > 0.05$ )(表1)。

## 2 肝功能

肝功能检测包括谷丙转氨酶(ALT)、白蛋白(AL)、胆红素(Bil),PHT大鼠Bil、ALT均显著高于正常大鼠( $P < 0.01$ ),AL显著低于正常大鼠( $P < 0.01$ );PHT脾次全切除组与PHT脾全切除组的ALT、AL、Bil无显著差异( $P > 0.05$ )(表2)。

## 3 CD4、CD8、CD4/CD8水平

PHT组、正常大鼠脾全切组、PHT脾全切组及脾次全切除组CD4、CD8和CD4/CD8表达率均显著低于正常大鼠( $P < 0.01$ );PHT脾全切组CD4、CD8和CD4/CD8也显著低于PHT组( $P < 0.01$ );PHT脾次

全切除组CD4/CD8显著高于PHT脾切组( $P < 0.01$ )(表3)。

表1 各组大鼠RBC、WBC、PLT检测结果

Tab 1 The levels of RBC, WBC and PLT among different groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Group	RBC( $\times 10^{12}/L$ )	WBC( $\times 10^9/L$ )	PLT( $\times 10^{12}/L$ )
Control	8.45 ± 0.37	14.32 ± 2.11	898 ± 121
PHT	7.42 ± 0.35	5.60 ± 1.63	784 ± 115
NTS	8.51 ± 0.42	13.91 ± 1.91	905 ± 117
PHTTS	8.18 ± 0.22	13.97 ± 1.05*	1 051 ± 109*
PHTSTS	8.20 ± 0.41	13.84 ± 1.83*	1 038 ± 121*

\*  $P < 0.01$  vs NTS group.

表2 各组大鼠Bil、AL、ALT检测结果

Tab 2 The levels of Bil, Al and ALT level among different groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Group	Bil(mmol/L)	AL(g/L)	ALT(U/L)
Control	6.54 ± 0.60	32.50 ± 1.30	36.0 ± 1.8
PHT	17.80 ± 1.20	8.90 ± 1.40	159.0 ± 9.2
NTS	6.42 ± 0.51	31.80 ± 1.23	34.0 ± 1.7
PHTTS	18.90 ± 1.30*	8.60 ± 1.30*	164.0 ± 9.4*
PHTSTS	19.50 ± 1.20*	7.90 ± 1.30*	161.0 ± 0.1*

\*  $P < 0.01$  vs NTS group.

表3 各组大鼠CD4、CD8和CD4/CD8检测结果

Tab 3 The levels of CD4, CD8, CD4/CD8 among different groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Group	CD4(%)	CD8(%)	CD4/CD8
Control	47.00 ± 2.16	20.10 ± 1.01	2.36 ± 0.31
PHT	42.80 ± 1.98	20.30 ± 1.20	2.01 ± 0.22
NTS	34.50 ± 2.18	17.50 ± 0.89	1.96 ± 0.23
PHTTS	22.90 ± 1.96*	19.48 ± 1.20*	1.12 ± 0.12*
PHTSTS	43.40 ± 1.90#	21.30 ± 1.04#	1.97 ± 0.10#

\*  $P < 0.01$  vs NTS group; #  $P < 0.01$  vs NTS group and PHTTS group.

## 4 血清促吞噬肽(tuftsin)

PHT组大鼠tuftsin水平与正常大鼠比无显著差异( $P > 0.05$ );正常脾切除组tuftsin水平显著低于正常大鼠( $P < 0.01$ )。PHT脾次全切除组与正常大鼠组比较无显著差异( $P > 0.05$ )。PHT脾次全切除组tuftsin显著高于PHT脾切组( $P < 0.01$ )(表4)。

表4 各组大鼠血tuftsin水平

Tab 4 The levels of serum tuftsin in different groups ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 10$ )

Group	Tuftsin (ng/L)
Control	425 ± 49
PHT	433 ± 44
NTS	215 ± 30
PHTTS	171 ± 21*
PHTSTS	434 ± 42#

\*  $P < 0.01$  vs control group and NTS group; #  $P < 0.01$  vs NTS group and PHTTS group.

## 5 病理学检查结果

PHT 大鼠脾增大被膜增厚,脾小梁增宽,脾小体周围淋巴鞘数量减少、结构疏松、淋巴细胞密度降低,脾窦扩张瘀血,脾索增厚、纤维组织增多、排列紊乱。PHT 脾次全切除大鼠脾窦扩张程度减轻,脾索内淋巴细胞增多、纤维组织减少。但与正常脾比较,白髓内淋巴细胞密度仍偏低,数量偏少,脾窦仍有扩张,脾索纤维组织仍多。

## 讨 论

肝硬化门脉高压症病人免疫功能问题日益受到重视。对门脉高压症的病理特点及治疗方法已有一定认识,在门脉高压情况下病理脾对机体是否有利,切脾后是否会引起机体免疫能力下降,门脉高压症中肿大脾的各种功能是否有所代偿? 有两种不同的意见<sup>[1]</sup>。

脾脏具有免疫、内分泌、滤血和毁血等功能。并发现其分泌具有促吞噬、杀菌和抗肿瘤作用的体液因子 tuftsin<sup>[2]</sup>。血清 tuftsin 水平与脾功能状态一致。可作为临床上评价脾功能及脾外科手术疗效的特异性指标,并可以从分子水平来评估脾脏的功能<sup>[3]</sup>。

我们观察到肝硬化门脉高压大鼠 tuftsin 水平无降低( $P > 0.05$ ),可能因为脾脏功能仍然存在<sup>[4]</sup>,但不论是正常大鼠还是肝硬化大鼠脾切除 4 周后 tuftsin 水平都显著降低,尤其肝硬化门脉高压大鼠更明显( $P < 0.01$ ),这与临床上观察到结果一致<sup>[5]</sup>。其原因可能有:脾内浆细胞合成 IgG 的功能不足或丧失使产生 tuftsin 的母体减少;脾脏产生内羧基肽酶减少或丧失;肝硬化时脾切除后导致体液功能紊乱而产生 IgG 减少;肝硬化时脾淤血、缺氧,脾源性内羧基肽酶活性和白细胞膜酶的活性可能处于代偿阶段,活性已经降低而脾切除后降低更显著。我们同时观察到肝硬化门脉高压大鼠脾次全切除组 tuftsin 水平并没有显著下降,说明脾功能仍然存在<sup>[6]</sup>。不过我们观察到不论是正常大鼠还是肝硬化门脉高压症大鼠,脾切除后 4 周时仍没有完全消失,这与国内外研究结果一致,可能与脾外产生 tuftsin 有关<sup>[7]</sup>。另外可能异位副脾未被切除,对此还需进一步研究。

T 淋巴细胞在淋巴器官和外周的数目及亚群的比例相对恒定,脾脏占约 30%。机体维持正常的免疫功能状态,有赖于各种免疫细胞特别是 T 细胞亚群之间的相互协作或制约,若 T 细胞总数或 CD4/CD8 比值发生变化,即可视为免疫调节功能异常。CD4/CD8 比例上升提示正相免疫占优势,反之则负向免疫占优。实验中观察到 CD4、CD8、CD4/CD8 在肝硬化门脉高压症大鼠显著降低( $P < 0.01$ ),其原因有:肝硬化时吞噬细胞功能降低,补体减少,肝脏处理体内抗原能力减弱且转移到脾后,而增加抗原性使体

液免疫亢进;肝功能损害时,其分泌 FN、IFN- $\gamma$ 、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$  等减少<sup>[8]</sup>;肝硬化时,受损肝细胞释放免疫抑制因子,抑制免疫反应,防御力降低,产生内毒素血症更易导致免疫功能紊乱。肝硬化门脉高压症大鼠脾切除术后 CD4、CD8、CD4/CD8 显著降低( $P < 0.01$ ),说明肝硬化门脉高压大鼠脾切除后免疫功能抑制更加明显,其改变与临床观察结果一致<sup>[9,10]</sup>,其原因可能有:肝硬化门脉高压脾脏是继发的充血性脾,虽非正常脾,但与病理脾仍有区别 - 还有功能。实验中我们观察到 tuftsin 无变化亦可证实,它不是脾原发性疾病,而肝硬化门脉高压症大鼠保留脾后 T 细胞亚群其亚群之间协调性改善,肝硬化门脉高压症大鼠脾次全切除 CD4/CD8 升高( $P < 0.01$ ),免疫功能有所改善。

综合试验结果,脾具有很多功能,在临床中应避免简单进行全脾切除,而使机体遭受不必要打击,从免疫和脾功能来说,治疗 PHT 时,保脾手术可能优于脾全切术。

## [参 考 文 献]

- [1] 夏穗生. 我国脾脏外科的发展回顾[J]. 中国实用外科杂志, 2004, 24(12): 705 - 707.
- [2] Fridkin M, Gottlieb P. Tuftsin, Thr - Lys - Pro - Arg [J]. Mol cell Biochem, 1981, 41(1): 73 - 77.
- [3] Lyer RR, Prasad HK, Bhutani LK, et al. Modulation of human lepromatous monocytomacrophage functions *in vitro* by tuftsin [J]. Int J Immunopharmacol, 1990, 12(7): 847 - 851.
- [4] Miura H, Kondo S, Shimada T, et al. Long - term effects of distal splenorenal shunt with splenopancreatic and gastric disconnection on hypersplenism due to liver cirrhosis [J]. Hepatogastroenterology, 1999, 46(29): 2995 - 2998.
- [5] Zhang H, Chen J, Kaiser GM, et al. The value of partial splenic autotransplantation in patients with portal hypertension: a prospective randomized study [J]. Arch Surg, 2002, 137(1): 89 - 93.
- [6] Trevisani F, Castelli E, Foschi FG, et al. Impaired tuftsin activity in cirrhosis: relationship with splenic function and clinical outcome [J]. Gut, 2002, 50(5): 707 - 712.
- [7] Audhya T, King R, Goldsfein G. Bovine probursin tetradecapeptide contains amino acid sequence from somatostatin, tuftsin and bursin [J]. Life Sci, 1991, 48(8): 773 - 780.
- [8] Kitani A, Fuss I, Nakamura K, et al. Transforming growth factor (TGF) - beta1 - producing regulatory T cells induce Smad - mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF - beta1 - mediated fibrosis [J]. J Exp Med, 2003, 198(8): 1179 - 1188.
- [9] 高德明, 马庆久. 脾大部切除加断流术治疗门静脉高压症的疗效评估 [J]. 中国实用外科杂志, 2004, 24

(12): 713 - 715.

疗门静脉高压症的价值[J]. 中国实用外科杂志, 2004, 24(12): 715 - 716.

[10] 陈积圣, 陈汝福. 自体脾移植联合食管横断吻合术治

## 中国病理生理学会 2007 年学术活动计划

序号	活动名称	时间	规模(人)	地点	联系人	联系方式
1	第九次全国动脉粥样硬化性疾病学术会议	7月21-24日		武夷山	唐雅玲	湖南衡阳南华大学北校区心研所 邮编:421001 电话:0734-8281277 E-mail:tangyaling7508@163.com
2	中国病理生理学会动物病理生理专业委员会第十四次学术讨论会	7或8月	120-140	哈尔滨市 东北农业大学动物医学学院	郑世民、 刘超男	黑龙江东北农业大学动物医学院病理教研室 邮编:150030 电话:0451-55190405 E-mail:zhengshiminbl@sohu.com;liuchaonan78@yahoo.com.cn
3	肿瘤专业委员会小型研讨会	7月	30左右	宁夏医学院	李敏	湖南长沙中南大学湘雅医学院 邮编:410078 电话:0731-4805451 E-mail:tingyi_lee6@hotmail.com
4	第四届海峡两岸心血管科学研讨会	7-8月	150-200	乌鲁木齐	朱广瑾	医科院基础所 邮编:100005 电话:010-65296476 E-mail:zhugj@pumc.edu.cn
5	免疫专业委员会第11届学术会议			宁夏	钱振超	大连医科大学病理生理室 邮编:116024 电话:0411-4720142 E-mail:xrblsl@yahoo.com.cn
6	缺氧与呼吸专业委员会学术会议	10月		浙江温州	高钰琪	重庆第三军医大学病理生理室 邮编:400038 电话:023-68752331 E-mail:gyq@mail.tmmu.com.cn
7	实验血液学第11届全国实验血液学会议	11月	400-500	长沙	陈方平、 唐佩弦	北京海淀太平路27号中化生物技术所三所2室 邮编:100850 电话:010-66930551 湘雅医院血液科 邮编:410008 E-mail:Xychenfp@public.cs.hn.cn
8	2007IAS中国行-全国巡讲	全年周末	600人/场 共30场	上海、北京等 省会城市	唐雅玲	湖南衡阳南华大学北校区心研所 邮编:421001 电话:0734-8281277 E-mail:tangyaling7508@163.com
9	全国大中专病理生理学教学研讨会	8月10日	80	云南大理	陈命家	安徽医学高等专科学校 邮编:230061 电话:0551-3611636 E-mail:cmj@ahyz.cn
10	中国病理生理学会炎症感染发热低温专业委员会和中医病理生理专业委员会第11届全国学术会议	7或8月	100	承德	颜亮	暨南大学医学院病理生理教研室 邮编:510632 电话:020-85226259 E-mail:tyl@jnu.edu.cn
11	第九次全国动脉硬化性疾病学术会议	7月20-24日	150	福建 武夷山	常玲、 胡必利	湖南省衡阳市、南华大学内,中国动脉硬化杂志编辑部 邮编:421001 电话:0734-8160765、8160523 E-mail:dmzshbl@126.com
12	AS新焦点:血栓日		200人/ 城市	北京、广州、 上海及周边 20个城市	唐雅玲	湖南衡阳南华大学北校区心研所 邮编:421001 电话:0734-8281277 E-mail:tangyaling7508@163.com
13	第八届2次常务理事会	7或8月	23	承德	吴立玲	北京大学医学部病理生理室 邮编:100083 电话:010-82802403 E-mail:pathophy@bjmu.edu.cn
14	《中国动脉硬化杂志》编辑委员会四届一次会议	7月20-24日	50	福建 武夷山	胡必利	湖南省衡阳市、南华大学内,中国动脉硬化杂志编辑部 邮编:421001 电话:0734-8160523 E-mail:dmzshbl@126.com