

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.01305

## 脾切除对门脉高压大鼠种植性肝肿瘤的影响

范鲁峰<sup>1</sup>, 杨宁<sup>1</sup>, 汪慧<sup>2</sup>, 邵卓<sup>3</sup>, 赵文超<sup>1</sup>, 陈本栋<sup>1</sup>, 付雍<sup>1</sup>, 杨广顺<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院肝外五科, 上海 200438
2. 第二军医大学东方肝胆外科医院肝胆内一科, 上海 200438
3. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 通过建立大鼠门脉高压背景下肝肿瘤模型, 观察病理性脾脏的切除对肝肿瘤发生发展的影响。 **方法** 按照四氯化碳复合、梯段用药法制备大鼠肝硬化门脉高压模型, 后将 Walker-256 肿瘤块种植在大鼠肝脏左外叶上, 随机分组的 A 组大鼠在种植瘤块同时切除脾脏, B 组大鼠保留脾脏。10 d 后分别测定两组大鼠的 T 细胞亚群 CD4、CD8 及 CD4/CD8; 切除大鼠肝脏左外叶, 测量种植肿瘤块最大直径, 并用免疫组织化学染色方法检测肿瘤组织 Ki-67 的表达。 **结果** 门脉高压模型建成后, 大鼠的血常规以及肝功能指标出现明显异常。A 组大鼠的 CD4 值和 CD4/CD8 比值均高于 B 组大鼠 ( $0.36 \pm 0.01$  vs  $0.35 \pm 0.02$ ,  $1.33 \pm 0.08$  vs  $1.24 \pm 0.05$ ;  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而 CD8 值则低于 B 组大鼠 ( $0.27 \pm 0.01$  vs  $0.29 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ )。A 组大鼠的肝脏肿瘤直径与 B 组大鼠比较差异无统计学意义。A 组大鼠肿瘤组织的 Ki-67 阳性率较 B 组降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。 **结论** 门脉高压状态下病理性脾脏的切除既有利于提高机体抗肿瘤的免疫力, 又可以在一定程度上减弱肝肿瘤的侵袭能力。

**[关键词]** 脾切除术; 门静脉高压; 肝肿瘤; 免疫

**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)12-1305-04

### Effect of splenectomy on implanted hepatic tumor rat model with portal hypertension

FAN Lu-feng<sup>1</sup>, YANG Ning<sup>1</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>, SHAO Zhuo<sup>3</sup>, ZHAO Wen-chao<sup>1</sup>, CHEN Ben-dong<sup>1</sup>, FU Yong<sup>1</sup>, YANG Guang-shun<sup>1\*</sup>

1. Fifth Department of Hepatic Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
2. Department of Hepatobiliary Disease I, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
3. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the effect of splenectomy on development and progression of implanted hepatic tumors by establishing implanted hepatic tumor rat model with portal hypertension. **Methods** Rat cirrhosis with portal hypertension models were built by subcutaneous injection of carbon tetrachloride, and then the rats were randomly divided into two groups. Group A was subjected to splenectomy and implantation of Walker-256 tumor tissue on the left lobe of liver, and group B was only subjected to implantation of tumor tissue. T-lymphocyte subsets CD4, CD8 and CD4/CD8 of two groups were examined 10 days after implantation of tumor tissue; the left lobe of liver was resected and the maximal tumor size was measured; expression of Ki-67 was detected by immunohistochemical method in the tumor tissues. **Results** The results of blood routine test and liver function test were obviously abnormal in rat model of portal hypertension. The levels of CD4 and CD4/CD8 in group A were higher than those in group B ( $0.36 \pm 0.01$  vs  $0.35 \pm 0.02$ ,  $1.33 \pm 0.08$  vs  $1.24 \pm 0.05$ ;  $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and the level of CD8 in group A was lower than that of CD8 in group B ( $0.27 \pm 0.01$  vs  $0.29 \pm 0.02$ ,  $P < 0.01$ ). There was no significant difference in the diameter of hepatic tumor between the two groups. Ki-67-positive rate of tumor in group A was lower than that in group B ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Splenectomy in portal hypertension rats can not only help to improve the immunity against hepatic tumor, but also decrease the invasive ability of the hepatic tumor to some extent.

**[收稿日期]** 2012-10-18 **[接受日期]** 2012-11-22

**[基金项目]** 国家传染病重大科技专项课题(2012ZX10002-017). Supported by Special Project of National Science and Technology for Major Infectious Diseases (2012ZX10002-017).

**[作者简介]** 范鲁峰, 硕士生. E-mail: fanlufeng1986@126.com

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81875292, E-mail: oasis60527@gmail.com

[Key words] splenectomy; portal hypertension; liver neoplasms; immunity

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(12): 1305-1308]

肝癌是临床上较常见的恶性肿瘤之一,其起病隐匿,病死率较高。我国的肝癌多在乙型肝炎硬化的基础上发展而来,目前已经成为严重威胁国民健康和生命的疾病。正常脾脏在机体免疫反应中具有重要作用,它的缺失可导致机体免疫功能下降,削弱机体的抗肿瘤能力,因此对正常脾脏破裂后行保脾手术已达成共识。但肝硬化门脉高压状态下病理性脾脏是否仍具有正常脾脏的免疫功能,是否仍具有抗肿瘤作用,对其是切除还是保留,目前仍颇具争议<sup>[1-2]</sup>。本实验旨在通过建立大鼠肝硬化门脉高压背景下肝肿瘤模型,观察病理性脾脏的切除对肝肿瘤发生发展的影响。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物及瘤株 清洁级SD雄性大鼠60只,体质量200~220 g,由第二军医大学实验动物中心提供。所有大鼠分笼饲养,采用标准化光照,室温控制在22℃左右,自由进食进水。另取健康的SD雄性幼鼠4只,体质量60~80 g,用于腹腔传代以及皮下制备肿瘤组织块。大鼠Walker-256肿瘤细胞株购自上海艾研生物科技有限公司。

1.2 大鼠肝硬化门脉高压模型制备 SD大鼠适应性饲养1周后,按照徐义军和王超<sup>[3]</sup>介绍的四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)复合、梯段用药法制备大鼠门脉高压模型,即按0.4 ml/100 g的标准予以背部皮下注射50% CCl<sub>4</sub>橄榄油溶液,每周2次,持续4周,第5周开始按0.5 ml/100 g的标准注射,每周2次,持续4周。

1.3 Walker-256肿瘤细胞株皮下荷瘤鼠制备 将Walker-256细胞株解冻后,加入PBS配制成密度为 $2 \times 10^7$ /ml的细胞悬液,取0.5 ml注入1只SD幼鼠腹腔内,14 d后幼鼠形成腹腔积液。抽取此幼鼠腹腔积液,111×g离心3 min,弃上清,PBS洗3次,再制成密度为 $2 \times 10^7$ /ml的细胞悬液,注射接种于另外3只幼鼠左、右臀部外侧皮下,每处0.5 ml。1周后可见3只幼鼠皮下均形成瘤块,引颈处死3只幼鼠,无菌操作取下肿瘤组织块,选取白色鱼肉状瘤组织,切成1 mm<sup>3</sup>大小,置于PBS中备用。

1.4 大鼠分组以及手术操作 将建模成功的肝硬化门脉高压大鼠随机分为A、B两组,每组21只。将A组大鼠用10%水合氯醛按0.5 ml/100 g标准

进行腹腔注射麻醉,四肢牵拉固定于手术台板上后,行上腹部剃毛、常规消毒,然后剑突下沿正中线剪开腹壁约2 cm。先充分暴露脾脏,钝性分离、切断、结扎脾带及脾周韧带,将脾脏完整切除,后脱出肝脏左外叶,用斜头显微镊在肝脏表面斜行穿刺一深约0.3 cm的隧道,将备用瘤块接种埋藏于隧道内,完毕后用3-0缝线“8”字缝合固定肿瘤块,还纳肝左外叶于腹腔。检查腹腔无明显出血后,逐层缝合切口关腹。B组大鼠除保留脾脏外,其余处理措施均与A组大鼠相同。

### 1.5 观测指标

1.5.1 大鼠门脉高压建模前后血常规及肝功能测定 大鼠适应性饲养1周后以及肝硬化门脉高压模型制备完成后,分别从每只大鼠的内眦静脉采集血液1.0 ml,其中0.5 ml注入含有肝素的抗凝瓶中混匀用于检测血常规,另外0.5 ml则用于肝功能的测定。

1.5.2 免疫指标测定 大鼠肝肿瘤种植10 d后,分别从A、B组大鼠的内眦静脉采集血液1.0 ml注入含有肝素的抗凝瓶中混匀,用MoFlo XDF流式细胞仪(Beckman公司)测定T细胞亚群CD4、CD8及CD4/CD8。

1.5.3 肿瘤指标测定 免疫指标抽血测定后,通过套扎大鼠左外叶肝蒂方法完整切除大鼠肝脏左外叶,测量每一种肿瘤块的最大直径,后将肿瘤块浸于中性甲醛溶液中固定,经过脱水、石蜡包埋、切片后,用Ki-67单克隆抗体(Abcam公司)进行免疫组织化学染色。Ki-67阳性为胞核着色,阳性细胞数≤5%者为阴性,阳性细胞数>6%者为阳性,按(阳性细胞数/计数肿瘤细胞总数)×100%计算阳性细胞百分比。

1.6 统计学处理 应用SPSS 19.0软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 $t$ 检验比较肝硬化门脉高压大鼠建模前后以及两组大鼠间各观测指标的差异,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 门脉高压大鼠模型建立结果 SD大鼠在皮下注射CCl<sub>4</sub>阶段精神萎靡,对外界刺激反应迟钝,毛色黯淡无光泽,活动减少,食欲不振,体质量增长缓慢。建模结束时死亡18只大鼠,存活42只大鼠,死亡率

为 30%。大鼠的红细胞计数、血红蛋白含量、白细胞计数以及血小板计数在建模后均较建模前下降, 总胆红素、丙氨酸转氨酶数值建模后相对建模前均升

高, 而白蛋白含量则降低 ( $P < 0.001$ ), 结果详见表 1。肝肿瘤种植时可见大鼠的肝脏体积缩小, 表面凹凸不平, 满肝弥漫斑点状小结节, 脾脏都略有增大。

表 1 门脉高压大鼠建模前后血常规、肝功能比较

Tab 1 Comparison of blood routine test and liver function in rats before and after establishment of portal hypertension

Group	$n=42, \bar{x} \pm s$						
	RBC count ( $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$ )	Hemoglobin $\rho_B/(g \cdot L^{-1})$	WBC count ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	Platelet count ( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )	Total bilirubin $c_B/(\mu mol \cdot L^{-1})$	GPT $z_B/(U \cdot L^{-1})$	Albumin $\rho_B/(g \cdot L^{-1})$
BME	7.63±0.54	150.63±11.63	6.92±1.36	858.10±63.91	4.54±0.43	40.51±1.66	30.48±1.98
AME	6.31±0.53	104.28±9.56	5.58±0.61	638.17±48.89	7.26±0.79	193.99±14.48	17.37±0.87
<i>t</i> value	39.596	109.431	11.066	85.369	-42.212	-77.368	74.184
<i>P</i> value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

BME; Before model establishment; AME; After model establishment; RBC; Red blood cell; WBC; White blood cell; GPT; Glutamic-pyruvic transaminase

2.2 免疫指标检测结果 A 组大鼠的 CD4 值以及 CD4/CD8 比值高于 B 组大鼠 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 而 CD8 值则低于 B 组大鼠 ( $P < 0.01$ ), 结果详见表 2。

2.3 肿瘤指标检测结果 A 组大鼠的肝脏肿瘤最大直径为 (10.23±1.12) mm, B 组大鼠为 (10.60±1.03) mm, 两组比较差异无统计学意义 ( $P = 0.270$ )。A 组大鼠肿瘤组织的 Ki-67 阳性率低于 B 组大鼠, 两组间差异有统计学意义 ( $P = 0.036$ ), 结果见图 1。

表 2 两组门脉高压大鼠的免疫指标比较

Tab 2 Comparison of immunity indices between two groups' of rats with portal hypertension

Group	$n=21, \bar{x} \pm s$		
	CD4	CD8	CD4/CD8
A	0.36±0.01	0.27±0.01	1.33±0.08
B	0.35±0.02	0.29±0.02	1.24±0.05
<i>t</i> value	2.154	-2.834	4.465
<i>P</i> value	0.037	0.007	<0.001

Group A; Rats with splenectomy; Group B; Rats without splenectomy

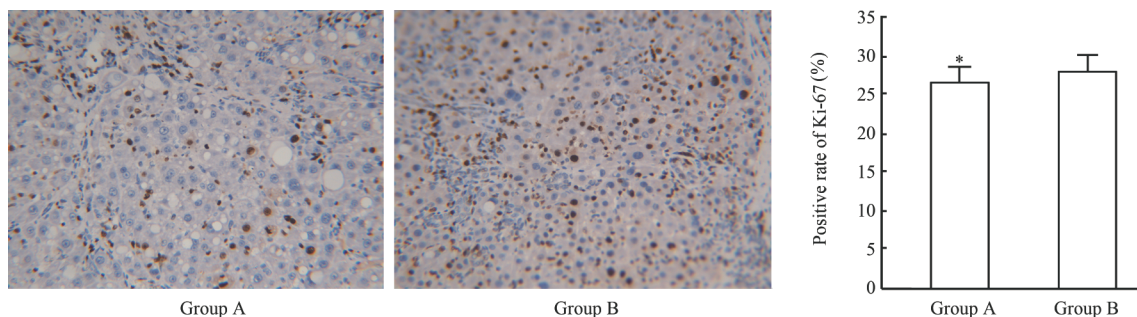


图 1 两组门脉高压大鼠肝脏肿瘤组织 Ki-67 的表达及阳性率

Fig 1 Expression and positive rate of Ki-67 in hepatic tumors of rats with portal hypertension in two groups

Group A; Rats with splenectomy; Group B; Rats without splenectomy. Original magnification;  $\times 200$ . \*  $P < 0.05$  vs group B;  $n=21, \bar{x} \pm s$

### 3 讨论

制作门脉高压动物模型有多种方法, 可以通过结扎门静脉的方式建立肝前型门脉高压, 也可以通过化学性肝毒物诱发肝硬化造成门脉高压, 不同方法诱导产生门脉高压的机制不同。其中  $CCl_4$  是诱导实验动物形成肝硬化较广泛使用的肝毒物之一, 作为一种活性代谢产物, 能够通过引发活性氧自由基的产生和脂质过氧化而诱导肝损伤形成肝硬

化<sup>[4-5]</sup>。由于其肝脏致毒作用迅速且剧烈, 可能造成在建模阶段实验动物死亡相对较多, 本实验中死亡率为 30%, 与文献<sup>[3]</sup>报道接近。但  $CCl_4$  造模相对简单且费用低廉, 诱导形成的肝硬化在形态学、病理组织学以及血流动力学等方面的改变都与人类肝硬化类似, 而且实验大鼠所表现出的肝功能异常与临床上慢性肝病肝硬化接近。徐义军和王超<sup>[3]</sup>通过  $CCl_4$  制备的大鼠门脉高压模型门静脉压力增高显著, 我们按照此方法建模后测得的红细胞计数、血红

蛋白含量、白细胞计数以及血小板计数均减少,与建模前比较差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),且脾脏肉眼观察明显增大,这充分反映了门脉高压造成的脾脏功能亢进。总胆红素、丙氨酸转氨酶相对建模前均升高,白蛋白含量则降低( $P$ 均 $< 0.001$ ),肝功能的这些变化也反映出了肝硬化所造成的肝细胞损伤。此模型完全可以满足我们实验中对门脉高压脾脏功能亢进的研究。

Walker-256 是实验研究中被广泛认可的大鼠可移植性肿瘤细胞株,用其制作的大鼠肿瘤模型能够很好地模拟肝癌的生长特性,并具有生物学特性稳定、成瘤周期短、成功率高等优点<sup>[6]</sup>。我们通过在SD大鼠上序贯建立肝硬化门脉高压、肝肿瘤模型来模拟临床上肝硬化发展为肝癌的情况。

正常脾脏是机体单核巨噬细胞系统的重要组成部分,可以分泌和储存多种免疫活性细胞和因子,能够发挥抗肿瘤的免疫功能<sup>[7]</sup>。机体抗肿瘤免疫以T细胞免疫为主,其中CD4细胞主要通过分泌细胞因子发挥抗肿瘤免疫作用,而CD8细胞主要通过抑制性T细胞因子的分泌而调节特异性免疫抑制<sup>[8]</sup>。因此我们可以通过测定CD4、CD8以及CD4/CD8的变化来反映门脉高压脾脏功能亢进状态下的抗肿瘤免疫功能,进而研究脾脏在这种病理状态下的存在价值。

本研究结果显示肝硬化门脉高压行脾脏切除组大鼠的CD4和CD4/CD8高于未行脾脏切除组,而CD8则低于未行脾脏切除组,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ),这在一定程度上说明了门脉高压状态下病理性脾脏的功能由正性免疫效应转向了负性免疫效应,提示此状态下脾脏通过产生正常情况下不会产生的某些毒素或因子,对机体起到了负面影响,削弱了机体的抗肿瘤免疫力,而脾脏的切除可能更加有利于机体T细胞亚群平衡的恢复,可以提高机体抗肿瘤免疫功能。近年来的研究表明在肝癌合并肝硬化脾脏功能亢进的患者行肝脾联合切除后,脾脏的切除能够促进机体T细胞亚群恢复平衡,改善机体抗肿瘤免疫功能<sup>[9-10]</sup>。我们的研究显示切脾组实验大鼠的肝脏种植性肿瘤的最大直径略小于未切脾组大鼠,但是两组差异无统计学意义。这可能与种植性肿瘤的生长时间较短,脾脏切除所造成的免疫功能改善作用尚未完全在肿瘤大小上显现有关,而且肿瘤大小也并不是反映肿瘤发生发展的唯一指标。与肿瘤增殖活性相关的Ki-67蛋白是一种能反映细胞增殖情况的核抗原<sup>[11]</sup>。在本

研究中,未行脾脏切除组大鼠的肝脏种植性肿瘤组织的Ki-67表达较脾脏切除组高( $P < 0.05$ ),反映了病理性脾脏切除后肿瘤侵袭力有所下降。董晓平等<sup>[12]</sup>的临床研究也得出脾切除术可以降低肝硬化脾亢患者肝癌发生危险的结论。

综上,我们的研究表明,肝硬化门脉高压状态下病理性脾脏的切除既有利于机体抗肿瘤免疫功能的改善,又可以在一定程度上减弱将来可能发生的肝肿瘤的侵袭能力。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] 夏穗生. 肝硬化门静脉高压症时不宜盲目施行脾切除术[J]. 中华肝胆外科杂志, 2006, 12: 583-584.
- [2] 汪 谦. 倡导脾功能研究新思维[J]. 中华外科杂志, 2009, 47: 81-82.
- [3] 徐义军, 王 超. 四氯化碳复合、梯段用药法制备大鼠门脉高压模型的研究[J]. 中外医疗, 2010, 29: 1-2.
- [4] Hernández-Muñoz R, Díaz-Muñoz M, Chagoya de Sánchez V. Possible role of cell redox state on collagen metabolism in carbon tetrachloride-induced cirrhosis as evidenced by adenosine administration to rats[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1200: 93-99.
- [5] 仲来福, 张瑾岗, 张富勤, 夏元洵. 四氯化碳致大鼠肝损伤的机理[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1989, 3: 298-303.
- [6] 王锦波, 何振平. 移植法建立大鼠肝癌模型[J]. 实验动物科学与管理, 1999, 16: 26-27.
- [7] Yang X, Guo D, Zhang J, Wu M. Characterization and antitumor activity of pollen polysaccharide[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7: 427-434.
- [8] 陈 中, 倪家连, 刘鲁岳, 晏建军, 黄 亮, 严以群. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>调节性T细胞在肝癌微环境中的分布状况与局部免疫状态的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16: 690-692.
- [9] 左朝晖, 张柏和, 姜小清, 谭春祁, 莫胜川, 欧阳永忠. 肝癌伴脾脏功能亢进症行肝脾联合切除术后肝功能和免疫功能的变化[J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17: 6-9.
- [10] 仇慧模, 劳景茂, 何文海. 肝癌伴脾脏功能亢进肝-脾联合切除术后临床分析[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2011, 25: 199-200.
- [11] Nagy B, Tiszlavicz L, Eller J, Molnar J, Thurzo L. Ki-67, cyclin D1, p53 and bcl-2 expression in advanced head and neck cancer [J]. In Vivo, 2003, 17: 93-96.
- [12] 董晓平, 杨 帆, 周 侗, 姜 巍, 陈 勇. 脾切除术对肝癌发生的影响[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11: 715-718.

[本文编辑] 商素芳, 邓晓群