

文章编号:1005-6947(2007)03-0258-03

· 基础研究 ·

# 围手术期肠内免疫营养对肝硬化肝切除大鼠肝再生的影响

郭跃华<sup>1</sup>, 余小舫<sup>1</sup>, 于会群<sup>2</sup>

(1. 暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院 临床医学研究中心, 广东 深圳 518020; 2. 广东省深圳市中医院 手术室, 广东 深圳 518033)

**摘要:**目的 探讨围手术期内使用肠内免疫营养支持对肝硬化肝切除大鼠肝再生功能的影响。方法 48只肝硬化大鼠随机均分为两组。A组为标准肠内营养组, B组为肠内免疫营养组。依标本采集时间的先后, A, B组再各分为4个亚组。两组大鼠用等热量肠内营养剂喂养8d后行68%肝切除术, 术后再喂养至取标本时间。分别于术前、术后1, 4和8d取相应亚组大鼠肝组织标本, 检测肝细胞有丝分裂指数(MI)和增殖细胞核抗原(PCNA)阳性细胞数。结果 两组大鼠肝切除术后残肝表现出一定的再生能力。B组肝细胞MI和PCNA阳性细胞计数在术后4d和8d显著高于A组( $P < 0.05$ )。结论 围手术期肠内免疫营养支持较之标准肠内营养支持更能增强肝硬化肝切除大鼠残肝再生能力, 使肝再生在术后较长时间内保持高水平。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(3):258-260]

**关键词:** 围手术期; 肠道免疫营养; 肝硬化; 肝切除术; 肝再生

**中图分类号:** R591; R657.3

**文献标识码:** A

## The effect of perioperative enteral immunonutrition on liver regeneration function in cirrhotic rats with partial hepatectomy

GUO Yue-hua<sup>1</sup>, YU Xiao-fang<sup>1</sup>, YU Hui-qun<sup>2</sup>

(1. Clinical Medical Research Center, Shenzhen People's Hospital, the Second Clinical Medicine College, Jinan University, Shenzhen, Guangdong 518020, China; 2. Operation Room, Shenzhen Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen, Guangdong 518033, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the effect of perioperative enteral immunonutrition (IMPACT) on liver regeneration in cirrhotic rats with hepatectomy. **Methods** Forty-eight cirrhotic rats were randomly divided into two groups: Group A, perioperative standard enteral nutrition group ( $n = 24$ ), receiving standard enteral nutrient NUTRISON during hepatectomy. Group B, perioperative enteral immunonutrition group ( $n = 24$ ), receiving enteral immunonutrient IMPACT after hepatectomy. According to the different time of taking specimens, each group was separated into four subgroups, each subgroup had six rats. The rats in the two groups received equal daily nutritional supplement intragastrically, which was 690 kJ/kg per day. Before the 68% hepatectomy, the rats were fed with enteral nutrient for 8 days, and after operation were fed until the day of taking specimens. On the day before hepatectomy and 1st, 4th and 8th postoperative day (POD), MI (mitotic index) of liver cell and PCNA (proliferating cell nuclear antigen) labeling index of hepatocyte were determined. **Results** MI increased significantly in both group on 4th and 8th postoperative day ( $P < 0.05$ ), with the maximal value on 4th day after hepatectomy. The values of MI in B3 and B4 subgroups were significantly higher than those in A3 and A4 subgroups ( $P < 0.05$ ). PCNA labeling index increased significantly in both groups on 1st, 4th and 8th day ( $P < 0.05$ ), with the maximal value on 1st day after hepatectomy. The values of PCNA labeling index in B3 and B4 subgroups were significantly higher than those in A3 and A4 subgroups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Compared with perioperative standard enteral nutrition, perioperative enteral immunonutrition can enhance the regeneration capacity of the remnant liver and maintain a high ability of regeneration for a longer time after resection of cirrhotic liver of rats.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(3):258-261]

收稿日期:2006-12-09; 修订日期:2007-02-28。

作者简介:郭跃华,男,河北唐山人,暨南大学第二临床医学院深圳市人民医院主治医师,主要从事肝癌治疗方面的研究。

通讯作者:余小舫 E-mail:gyuehua05@126.com。

**Key words:** Perioperative Period; Enteral Immunonutrition; Liver Cirrhosis; Hepatectomy;

Liver Regeneration

**CLC number:** R591; R657.3

**Document code:** A

在标准肠内营养配方基础上添加精氨酸、核苷酸和 $\omega$ -3脂肪酸等免疫调节素后即形成肠内免疫营养制剂。已知肠内免疫营养具有纠正机体蛋白质——能量营养不良和增强免疫力的功能<sup>[1-2]</sup>,现对其新功能的研究也在不断深入。研究<sup>[3-4]</sup>提示,精氨酸和核苷酸有促进肝细胞再生的功能。本研究以大鼠为对象,探讨含有上述营养素的肠内免疫营养制剂茆沛(Impact),对肝硬化肝切除机体的促肝再生作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 大鼠肝硬化模型的制备

SD 雄性大鼠,体重 220 ~ 250g (购于南方医科大学实验动物中心)。制模前 2 周,每周 2 次腹腔注射 40% CCl<sub>4</sub> 花生油溶液 [0.15 mL/100g (体重)];第 3 周开始,按个体化原则每一大鼠根据自身体重变化增减剂量,共 7 周成模,成模率 81.8%<sup>[5]</sup>。制模过程中大鼠自由进食及饮水。大鼠成模后恢复 2 周开始实验。

### 1.2 动物分组

根据随机化原则,将 48 只肝硬化大鼠分为两组。A 组 24 只,为标准肠内营养组,围手术期内用标准肠内营养制剂能全素(Nutrison)喂养。B 组 24 只,为肠内免疫营养组,围手术期内用肠内免疫营养制剂 Impact 喂养。根据标本采集时间的先后,两组再各自分为术前(A0 和 B0)、术后 1d (A1 和 B1)、术后 4d (A4 和 B4) 和术后 8d (A8 和 B8) 亚组;每一亚组动物 6 只。

### 1.3 肠内营养制剂的配方和用量及标本采集时间

标准肠内营养制剂采用荷兰 Nutricia 公司的 Nutrison;肠内免疫营养制剂采用瑞士 Novartis 公司的 Impact。两种制剂的配方见表 1。两组大鼠每日给予肠内营养液的热量相等,即 690kJ/[kg (体重)·d]<sup>[6]</sup>,分 4 次灌胃。各组大鼠实验过程中均自由饮水。A0 和 B0 组用不同肠内营养制剂喂养 8d,第 9 天上午称体重后麻醉开腹,从肝右叶切取 1 cm × 1 cm × 0.3 cm 肝组织标本,然后自腹主动脉放血处死。术后各亚组,均根据组别术前用不同肠内营养制剂喂养 8d,第 9 天上午行肝切除术,术后再用肠内营养制剂喂养,分别于术后 1, 4d 和 8d 将相应亚组大鼠再次称重、麻醉后开腹取肝组织标本。

表 1 Impact 和 Nutrison 营养液配方

营养指标	Impact	Nutrison
热量(kJ/L)	4 184	4 184
糖类(g/L)	130	123
蛋白质(g/L)	56	40
脂肪(g/L)	28	39
精氨酸(g/L)	14	-
RNA(g/L)	1.27	-
$\omega$ -3 脂肪酸(g/L)	1.68	-

### 1.4 肝切除方法

采用氯胺酮(150mg/kg)腹腔注射麻醉,术前背部皮下注射生理盐水 4mL。沿腹部正中中线进腹,游离肝左叶和中叶,以丝线结扎根部后切除;切除的肝叶约占全肝的 68%。彻底止血后关腹。术后将大鼠置代谢笼内,予自由饮水,6h 后进行肠内营养制剂灌胃。

### 1.5 检测指标及测定方法

1.5.1 肝细胞有丝分裂指数 (mitotic index, MI) 肝组织标本石蜡切片行 HE 染色,由不参与实验分组的病理科医生在 40 × 10 倍显微镜视野下计数 1 000 个肝细胞中处于有丝分裂前、中期的肝细胞数,并以百分数表示。

1.5.2 肝细胞增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 试剂:小鼠抗大鼠增殖细胞核抗原单克隆抗体和 PicTure™ 通用型二步法免疫组织化学检测试剂均为美国 Zymed 公司产品,购于北京中山生物技术有限公司。方法:肝组织标本石蜡切片按 PicTure™ 通用型二步法免疫组化染色后计数 PCNA 阳性肝细胞数。PCNA 阳性肝细胞是指细胞核内见棕黄色细颗粒状物质,而胞浆未着色的肝细胞。由不参与实验分组的病理科医生在 40 × 10 倍显微镜视野下,计数 1 000 个肝细胞中 PCNA 阳性染色细胞数,并以百分数表示<sup>[7]</sup>。

### 1.6 统计学处理

采用 SPSS10.0 统计学软件进行统计分析。 $P < 0.05$  为差异有显著性。A, B 组内各亚组间的比较用单因素方差分析,术后各亚组与术前亚组间的两两比较用最小显著差法;A, B 组间相应亚组的比较用成组  $t$  检验。

## 2 结果

### 2.1 实验动物肝大体及显微所见

A组和B组大鼠开腹后均见肝脏缩小,质硬,肝表面呈结节状。光学显微镜下可见有完整纤维分隔的假小叶形成,假小叶内肝细胞部分脂肪变性,纤维隔和汇管区炎性细胞浸润。病理提示两组动物肝硬化模型成立。两组大鼠在肝切除后4h即完全清醒,能自由活动,均存活至取标本时。

表2 不同肠内营养组围手术期内肝细胞MI和PCNA阳性细胞计数的变化( $\bar{x} \pm s$ )

	A组(标准肠内营养组)				B组(肠内免疫营养组)			
	A <sub>0</sub> 组	A <sub>1</sub> 组	A <sub>4</sub> 组	A <sub>8</sub> 组	B <sub>0</sub> 组	B <sub>1</sub> 组	B <sub>4</sub> 组	B <sub>8</sub> 组
MI(%)	0.13±0.05	0.13±0.04	0.3±0.13 <sup>1)</sup>	0.22±0.08 <sup>1)</sup>	0.12±0.04	0.21±0.13	0.95±0.5 <sup>2),3)</sup>	0.43±0.12 <sup>2),3)</sup>
PCNA(%)	15.87±2.99	68.65±8.12 <sup>1)</sup>	43.32±5.13 <sup>1)</sup>	26.63±4.52 <sup>1)</sup>	15.27±2.8	71.53±7.35 <sup>2)</sup>	52.65±7.62 <sup>2),3)</sup>	36.03±6.02 <sup>2),3)</sup>

注:1)与A<sub>0</sub>组相比, $P < 0.05$ ;2)与B<sub>0</sub>组相比, $P < 0.05$ ;3)与相应时点的标准肠内营养组比, $P < 0.05$

## 3 讨论

PCNA存在并合成于核内。静止细胞中PCNA含量很少;大部分G<sub>0</sub>~G<sub>1</sub>期细胞无明显的PCNA表达,至G<sub>1</sub>晚期表达量增加,S期达高峰,G<sub>2</sub>~M期下降。PCNA含量和表达强弱的变化与DNA合成及DNA复制的活跃程度一致。肝脏具有较强的再生能力,但肝硬化后肝再生潜能被明显削弱<sup>[8]</sup>。结果导致肝硬化肝切除的患者由于肝再生功能低下和残肝功能不全,术后并发症发生率居高不下,恢复缓慢,甚至部分患者因顾忌于此而不能行根治性肝切除术。

近年研究发现,某些免疫营养素如精氨酸、核苷酸具有促进肝再生的作用。精氨酸是体内合成一氧化氮(NO)的惟一底物。其促进肝再生的机制有:(1)肝切除后残肝血流量增加使血管的剪力升高,产生NO,从而引发了肝再生的级链反应<sup>[9]</sup>。(2)NO能下调细胞内S-腺苷蛋氨酸水平,从而促进肝再生<sup>[3]</sup>。核苷酸作为DNA和RNA合成的底物,能增强肝切除术后肝再生功能。其机制有:(1)增加肝切除术后肝细胞DNA和RNA的合成<sup>[4]</sup>。(2)增加肝切除术后细胞蛋白质合成<sup>[10]</sup>。(3)提高肝切除术后肝细胞线粒体磷酸化率,使ATP的合成增加。

本研究显示,肝切除术后两组大鼠PCNA阳性细胞计数在第1天时即达高峰,术后1,4和8d均显著高于术前;肠内免疫营养组在术后4d和8d时显著高于标准肠内营养组。两组大鼠肝细胞MI的变化与PCNA相近,只是前者在术后4d才达到高峰。以上结果说明,肝硬化肝切除后残肝具有再生能力。由于肝细胞数大量减少,刺激残留肝细胞迅速进入增殖期;术后第1天PCNA

### 2.2 两组肝细胞MI和PCNA阳性细胞计数的变化

A组和B组术后4,8d亚组MI的值较术前亚组均显著升高( $P < 0.05$ ),MI均在术后第4天达高峰。两组术后1,4和8d亚组PCNA阳性细胞计数的值比术前亚组均显著升高( $P < 0.05$ ),PCNA阳性细胞计数在术后第1天达高峰。B组术后4,8d亚组MI和PCNA阳性细胞计数的值较A组相应亚组显著升高( $P < 0.05$ )。

阳性细胞计数即达高峰,随后又逐渐下降,但B组下降显著慢于A组。因此,笔者认为,围手术期给予富含精氨酸和核苷酸的肠内免疫营养制剂支持,较标准肠内营养制剂支持,更能增强肝硬化肝切除大鼠残肝再生能力,使肝再生在术后较长时间内保持高水平。

### 参考文献:

- Montejo JC, Zarazaga A, Lopez-Martinez J, et al. Immunonutrition in the intensive care unit. A systematic review and consensus statement [J]. Clin Nutr, 2003, 22(3): 221-233.
- 郝胜华,刘飞龙,叶启发.肠内、肠外营养对门静脉高压症患者术后恢复的影响[J].中国普通外科杂志,2005,14(6):417-419.
- Garcia-Trevijano ER, Martinez-Chantar ML, Latasa MU, et al. NO sensitizes rat hepatocytes to proliferation by modifying S-adenosylmethionine levels [J]. Gastroenterology, 2002, 122(5): 1355-1363.
- Usami M, Saitoh Y. The effect of a nucleotide-nucleoside solution on hepatic regeneration in rats after partial hepatectomy and in primary monolayer culture of hepatocytes [J]. Nutrition, 1997, 13(4):365-368.
- 郭跃华,于会群,刘嘉林,等.个体化给药方案复制大鼠肝硬化模型[J].广东医学,2005,26(11):1484-1485.
- 罗时敏,梁力健.全胃肠外营养对肝硬化大鼠肝脏的影响[J].中国胃肠外科杂志,1999,2(1):49-52.
- 黄峰,黄峙,杨芳,等.硒螺旋藻对大鼠肝叶切除术后肝细胞再生和抗氧化能力的影响[J].中国普通外科杂志,2006,15(1):19-22.
- 朱洪,郭永章,李立,等.促肝细胞生长素对慢性肝损伤大鼠部分切除术后肝细胞的影响[J].中国普通外科杂志,2002,11(1):29-32.
- Schoen JM, Wang HH, Minuk GY, et al. Shear stress-induced nitric oxide release triggers the liver regeneration cascade [J]. Nitric Oxide, 2001, 5(5):453-464.
- Iwasa Y, Iwasa M, Omori Y, et al. The well-balanced nucleoside-nucleotide mixture "OG-VI" for special medical purposes [J]. Nutrition, 1997, 13(4):361-364.