

富含 BCAA 的 PN 对肝硬化大鼠肝部分切除术后肝脏 NK 的影响*

张 雷^{1△} 罗时敏² 张晓坤¹ 黄国威¹ 廖一鸣¹

(1 广州医学院附属荔湾医院 广东 广州 510170; 2 广州市第一人民医院 广东 广州 510180)

摘要 目的 探讨富含支链氨基酸的肠外营养对肝硬化大鼠肝部分切除术后肝脏自然杀伤细胞(NK 细胞)的影响。方法 20 只肝硬化大鼠随机分为肝部分切除术后行 8.5%Novamin 的肠外营养 5 d 组 10 只,肝部分切除术后行 10%Hepa 的肠外营养 5 d 组 10 只。应用流式细胞仪测定大鼠肝脏 NK 细胞的百分率;应用 4 小时 ⁵¹Cr 释放法测定肝脏 NK 细胞的杀伤活性。结果:与 8.5% Novamin 的肠外营养 5 d 组比较,10%Hepa 的肠外营养 5 d 组肝脏 NK 细胞占全部淋巴细胞的百分比和肝脏 NK 细胞杀伤活性明显升高(P<0.05)。结论 富含支链氨基酸的肠外营养可以增加肝脏 NK 细胞的百分率和肝脏 NK 细胞的杀伤活性。

关键词 肝硬化 肝切除术 支链氨基酸 自然杀伤细胞

中图分类号 Q95-3,R575.2 **文献标识码** A **文章编号** :1673-6273 (2012) 23-4442-02

Effect of Parenteral Nutrition with Branch-Chain Amino Acids Enrichment on the Natural Killer Cells in the Liver after Partial Hepatectomy in Rats with Liver Cirrhosis*

ZHANG Lei^{1△}, LUO Shi-min², ZHANG Xiao-kun¹, HUANG Guo-wei¹, LIAO Yi-ming¹

(1 Liwan Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510170, China;

2 Guangzhou First Municipal People's Hospital, Guangzhou 510180, China)

ABSTRACT Objective: To explore the effect of parenteral nutrition (PN) with branch-chain amino acids enrichment on the natural killer cells in the liver after partial hepatectomy in rats with liver cirrhosis. **Methods:** Twenty rats with liver cirrhosis were randomly divided into post-operation 8.5% Novamin PN 5 day group (n=10) and post-operation 10% Hepa PN 5 day group (n=10). Activity of NK cells was measured by 4h ⁵¹Cr-release assay. The percentages of the NK cells in the livers was examined by flow cytometry. **Results:** Compared with the 8.5% Novamine PN 5 day group, the percentages and the activity of NK cells in the livers were significantly increased in the 10% Hepa PN 5 day group (P<0.05). **Conclusion:** Parenteral nutrition with branch-chain amino acids enrichment after partial hepatectomy in rats with liver cirrhosis can ameliorate the percentages and the activity of NK cells in the livers.

Key words: Liver cirrhosis; Hepatectomy; Branch-chain amino acid; Natural killer cells

Chinese Library Classification: Q95-3, R575.2 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273 (2012) 23-4442-02

肝脏自然杀伤细胞(natural killer cells, NK 细胞)是肝脏非实质细胞的重要组成部分,是拥有大颗粒淋巴细胞(large granular lymphocyte, LGL)形态特征和 NK 细胞活性的一群独特的细胞,在肝脏免疫中发挥着重要的作用^[1]。通过对肝脏 NK 细胞的进一步研究,明确其抗肿瘤和免疫调节作用,从而可以在器官水平治疗肿瘤^[2]。本研究探讨富含支链氨基酸(BCAA)的肠外营养(PN)对肝硬化大鼠肝部分切除术后肝脏 NK 细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 复制肝硬化大鼠模型

雄性 SD 大鼠饮用 0.03% 硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)溶液 12 周来复制肝硬化模型^[3]。20 只 SD 大鼠造模成功后恢复 2 周。

1.2 动物分组

实验动物分为 2 组:肝硬化肝部分切除术后用 8.5% Novamin 的 PN 5 d 组(n=10),肝硬化肝部分切除术后用 10% Hepa 的 PN 5 d 组(n=10)。其中,切肝均按 Higgins 法^[4]切除肝中叶(约为肝脏的 35%),PN 均于切肝术后 1 d 开始。

1.3 营养液的配制及输液管理

PN 进行 5d,根据文献报道^[5],2 组大鼠给予非蛋白质热量 171.5kal/kg·d,氮量 1.22 g/kg·d,热氮比为 140:1,脂肪乳剂提供 36%的热量。其中脂肪乳选用 20%中/长链脂肪乳(广州侨光制药有限公司),一组氮源由 8.5% Novamin(华瑞公司)提供,含有 18 种氨基酸的溶液,BCAA 占 18.2%,另一组氮源由 10% Hepa(贝朗公司)提供,含有 20 种氨基酸的溶液,BCAA 占 33.0%。输液速度为每小时 3 mL。

1.4 观察指标及测定方法

* 基金项目 广州市荔湾区科技计划项目(20071209112)

作者简介 张雷(1961),男,医学本科,副主任医师,主要研究方向:营养对肿瘤防治的作用机制。

△通讯作者 张雷,电话 020-81346612, E-mail: zh_leo@163.com。

(收稿日期 2012-03-25 接受日期 2012-04-19)

(1) 淋巴细胞制备 根据文献报道的方法^[6], 2 组大鼠于术后 6 d 用乙醚麻醉后针刺心脏放血处死大鼠, 获得大鼠的肝脏, 以机械方法切碎, 磷酸缓冲液冲洗, 200 目滤网过滤, 收集细胞悬液。肝细胞梯度离心后, 用 0.83% NH₄Cl-Tris 缓冲液 (pH 7.6) 溶血。收集细胞悬液, 浓度调整至 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$ 。(2) 免疫荧光抗体标记 提取大鼠肝脏内淋巴细胞, 应用二重或三重免疫荧光染色, 认定 CD3⁺、NKR-P1⁺ 细胞为 NK 细胞。将调整后的细胞悬液分注于离心管内 (细胞数不超过 2×10^5)。2500 rpm, 4 °C 下离心 2 min, 吸去上清液, 振荡后加入 10 μL 2.4G2 (抗-Fc γ R II/III), 4 °C 下培育 10 min 后, 分别加入单克隆抗体 10 μL , 振荡后在 4 °C 下培育 20 min, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗一次。如为二重染色, 即可以用 0.5 ml PBS 稀释后, 经尼龙网过滤, 加入 5 μL PI 后进行流式细胞仪测定, 如为三重染色应加入抗生物素 (biotin) 的第二抗体 10 μL 后, 继续在 4 °C 下培育 20 min, 然后用 PBS 洗涤一次, 用 0.5 ml PBS 稀释, 经尼龙网过滤后进行流式细胞仪测定。流式细胞仪采用美国 BD 公司出品的 FACSsort 软件系统为 Cell Quest 3.0。(3) NK 细胞杀伤活性测定 采用标准 ⁵¹Cr 4 小时释放法检测, 即在对数生长的 1×10^6 的 YAC-1 细胞中加入 60 μCi 的 ⁵¹Cr, 用 RPMI-1640 补充体积到 200 μL , 37 °C 孵育 120 min, 摇动 1 次 /15 min, RPMI-1640 洗 3 次, 配成 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。将标记好的 YAC-1 加入到样品中, NK:YAC-1=50:1。混匀后, 培养 4 h, 取 100 μL 上清, 用 γ 计数器测定放射性释放量。按以下公式计算特异性杀伤率: 特异性杀伤率 (%) = (实验组释放量 - 自然释放量) / (最大释放量 - 自然释放量) $\times 100\%$ 。

1.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件行方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠肝脏 NK 细胞占全部淋巴细胞的百分比的变化

10%Hepa 的肠外营养 5 d 组肝脏 NK 细胞占全部淋巴细胞的百分比明显高于 8.5%Novamin 的肠外营养 5 d 组 ($17.1\% \pm 1.7\%$ vs $15.2\% \pm 1.9\%$, $P < 0.05$)。

2.2 大鼠肝脏 NK 细胞杀伤活性的变化

10%Hepa 的肠外营养 5 d 组肝脏 NK 细胞杀伤活性明显高于 8.5%Novamin 的肠外营养 5 d 组 ($36.9\% \pm 2.4\%$ vs $34.2\% \pm 2.4\%$, $P < 0.05$)。

3 讨论

肝脏 NK 细胞是发挥免疫作用的重要组成部分, NK 细胞在肝脏的分布要远比其它器官丰富^[7]。Wiltout 等^[8]首次从肝脏中分离出 NK 细胞和发现了 NK 细胞的特性, 表明 NK 细胞具有细胞毒功能, 并报道鼠中给予生物反应修饰因子可以增加肝脏 NK 细胞的数目。肝脏 NK 细胞在肝脏的平衡免疫调节作用, 也越来越被人们所认可^[9]。肝脏 NK 细胞, 来源于骨髓, 随外周血液循环而定居于肝脏, 在 Kuffer 细胞、肝窦内皮细胞和细胞因子的作用下, 活化、分化和增生, 调节 T、B 细胞免疫功能, 参与抗感染、抗肿瘤等作用, 同时活化的 NK 细胞还能分泌大量的细胞因子, 发挥抗肿瘤作用, 调节巨噬细胞的功能^[10]。研究

发现肝硬化肝内 NK 细胞数和活性明显降低, 与肝癌发生有一定关系。Shirachi 等^[11]用肝窦冲洗的方法和流式细胞分析仪分析肝硬化小鼠肝内 NK 细胞, 发现肝硬化肝内 NK 细胞数和活性明显降低, 注射 IFN- α 后 NK 细胞活性明显升高。可以设想恶性肿瘤细胞在肝脏的生长繁殖与机体的免疫功能、肝脏局部的免疫功能有关。耗竭肝 NK 细胞会导致肝内肿瘤转移发生率增高。可设想在原发性肿瘤被切除后, 采用激活 NK 细胞的免疫学方法来杀伤血行转移的癌细胞。

近年来, 由于人们发现营养与肿瘤的发病及预防、营养对肿瘤治疗以及营养对改善肿瘤病人的预后及生活质量方面均具有重要作用, 因此, 一个新学科——肿瘤营养学正逐渐形成并兴起。肿瘤营养学的研究及发展方向, 主要是利用营养学的理论和方法进行肿瘤的预防及治疗, 这为肿瘤的防治开辟了一个新的途径及方法^[12]。一系列的相关研究表明, 某些营养物质不仅能防治营养缺乏, 而且能以特定的方式刺激免疫细胞, 增强应答功能, 维持正常、适度的免疫反应, 调控细胞因子的产生和释放, 减轻有害的或过度的炎症反应, 维持肠屏障功能等^[13]。我国原发性肝癌患者 80% 以上合并有肝硬化, 众多研究表明, 肝硬化患者具有高的手术并发症发生率和死亡率, 而营养不良是一个重要的手术危险因素。研究结果表明, 肝细胞癌围手术期营养支持可以减轻术后的肝功能损害。营养支持可以改善肝硬化患者进行普外手术和肝移植手术的临床结果^[14]。而术后选择合理的营养方式, 维持和改善患者营养状况, 将可以起到维持机体术后免疫功能相对稳定并促进其恢复的功效。

从营养角度讲供给充足的蛋白质对支持蛋白质合成和肝细胞再生以及为免疫系统提供代谢底物等方面都是必要的。本实验应用的两种复合氨基酸溶液 8.5%Novamin (含 18 种氨基酸) 及 10%Hepa (含 20 种氨基酸 EAA/ 非必需氨基酸 (NEAA)) 均接近 1.0, BCAA 含量分别占 18.2%、33.0%。本实验结果显示, 与 8.5%Novamin 的肠外营养 5 d 组比较, 10%Hepa 的肠外营养 5 d 组肝脏 NK 细胞占全部淋巴细胞的百分比和肝脏 NK 细胞的杀伤活性明显升高。Tsukishiro 等报道^[15] 饲料中添加 BCAA 可以提高肝内淋巴细胞的免疫功能, 可能有潜在的抑癌作用。可见, 富含 BCAA 的肠外营养可以增加肝脏 NK 细胞的百分率和肝脏 NK 细胞的杀伤活性, 从而增强肝脏局部免疫功能。

参考文献 (References)

- [1] Nakatani K, Kaneda K, Seki S, et al. Pit cells as liver-associated natural killer cells: morphology and function [J]. Med Electron Microsc, 2004, 37(1):29-36
- [2] 罗时敏. 肝脏相关 NK 细胞的调节和抗肿瘤转移作用 [J]. 医师进修杂志 (外科版), 2005, 28(7):56-58
Luo Shi-min. Regulation and antimetastatic functions of liver-associated natural killer cells [J]. J Postgrad Med, 2005, 28 (7):56-58 (In Chinese)
- [3] 罗时敏, 谭卫民, 庄思敏, 等. 硫代乙酰胺诱导的肝硬化大鼠蛋白质代谢的变化 [J]. 中国医师杂志, 2005, 7(7):919-921
Luo Shi-min, Tan Wei-min, Zhuang Si-min, et al. The changes of protein metabolism in rats with thioacetamide-induced liver cirrhosis [J]. Journal of Chinese Physician, 2005, 7(7):919-921

(下转第 4529 页)

- Liu Yu-hua, Ou Xin-yuan. 1426 Cases Hospitalized Death Cases with Statistical Analysis [J]. Chinese Journal of Hospital Statistics, 2001, 8 (3): 186
- [10] 杨振洪, 陈建平. 2009 年天津市汉沽区居民死亡原因分析[J]. 流行病学与预防保健, 2011, 27(15): 1756-1758
Yang Zhen-hong, Chen Jian-ping. Analysis on Cause of Death among Residents in Hangu District of Tianjin in 2009 [J]. Epidemiology and Preventive Health Care, 2011, 27 (15): 1756-1758
- [11] 钱含笑. 2010 年浙江省温州市居民主要死亡原因分析 [J]. 疾病监测, 2011, 26(9): 727-731
Qian He-xiao. Leading causes of death among residents in Wenzhou in Zhejiang province, 2010 [J]. Disease Surveillance, 2011, 26(9): 727 - 731
- [12] 李艳芳, 李蕊, 郭军辉. 1700 例住院死亡病例分析[J]. 中华医院管理杂志, 1999, 15(4): 229
Li Yan-fang, Li Rui, Guo Jun-hui. 1700 Hospitalized Death Cases Analysis [J]. The Chinese Journal of Hospital Administration, 1999, 15(4): 229
- [13] 刘玲玲, 高亚礼, 季奎等. 2002-2007 年四川省死因监测点居民恶性肿瘤死因分析[J]. 预防医学情报杂志, 2011, 27(1): 8-9
Liu Ling-ling, Gao Ya-li, Ji Kui, et al. Analysis on Deaths Caused by Malignant Tumor in Death Cause Surveillance Areas in Sichuan Province, 2002-2007 [J]. Journal of Preventive Medicine Information, 2011, 27(1): 8-9
- [14] 杨建南, 郭小林. 四川省老年男性与女性住院疾病谱比较分析[J]. 中国病案, 2010, 10(10): 37-38
Yang Jian-nan, Guo Xiao-lin. Spectrum analysis on elderly male and female inpatient disease in Sichuan Province [J]. Chinese Medical Record, 2010, 10 (10): 37-38
- [15] 伍啸青, 戴龙, 何志城等. 厦门市 2004-2009 年居民恶性肿瘤死亡原因分析[J]. 中华疾病控制杂志, 2010, 14(8): 768-769
Wu Xiao-qing, Dai Long, He Zhi-cheng, et al. Analysis on death causes of malignant tumors of inhabitants in Xiamen City from 2004 to 2009 [J]. Chinese Journal of Disease Control & Prevention, 2010, 14 (8): 768-769
- [16] 张森乔, 王泽平, 李顺承等. 2004-2009 年张掖市甘州区居民恶性肿瘤死亡原因分析[J]. 中国自然医学杂志, 2010, 12(6): 436-439
Zhang Sen-qiao, Wang Ze-ping, Li Shun-cheng, et al. Cause-of-death analysis among residents with malignant tumors in Ganzhou district, zhangye city, 2004-2009 [J]. Chinese Journal of Natural Medicine, 2010, 12(6): 436-439

(上接第 4443 页)

- [4] Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal [J]. Arch path, 1931, 12(2): 186-202
- [5] 罗时敏, 梁力建, 胡文杰. 肝硬化大鼠肝部分切除术后肠外营养时氨基酸溶液的选择及评估[J]. 中国临床营养杂志, 2004, 12(2): 97-101
Luo Shi-min, Liang Li-jian, Hu Wen-jie. Selection and evaluation of amino acid solution for parenteral nutrition support after partial hepatectomy in the Rats with liver cirrhosis [J]. Chin J Clin Nutr, 2004, 12(2): 97-101 (In Chinese)
- [6] Sagiya K, Tsuchida M, Kawamura H, et al. Age-related bias in function of natural killer T cells and granulocytes after stress: reciprocal association of steroid hormones and sympathetic nerves [J]. Clin Exp Immunol, 2004, 135(1): 56-63
- [7] Chen Y, Wei H, Sun R, et al. Impaired function of hepatic natural killer cells from murine chronic HBsAg carriers [J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(13-14): 1839-1852
- [8] Wiltout RH, Mathieson BJ, Talmadge JE, et al. Augmentation of organ-associated natural killer activity by biological response modifiers. Isolation and characterization of large granular lymphocytes from the liver [J]. J Exp Med, 1984, 160(5): 1431-1449
- [9] 杨生玺, 张晓岩, 吕同德等. 青海高原藏族胃癌患者自然杀伤细胞活化性受体 D 及其配体 MICA 表达的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(5): 1002-1006
Yang Sheng-xi, Zhang Xiao-yan, Lu Tong-de, et al. Expression of natural killer cell stimulatory receptor NKG2D and its ligand MICA in Tibetan patients with gastric cancer at Qinghai plateau [J]. Chin J Pathophysiol, 2008, 24(5): 1002-1006 (In Chinese)
- [10] Wisse E, Luo D, Vermijlen D, et al. On the function of pit cells, the liver-specific natural killer cells [J]. Semin Liver Dis, 1997, 17 (4): 265-286
- [11] Shirachi M, Sata M, Miyajima I, et al. Liver-associated natural killer activity in cirrhotic rats [J]. Microbiol Immunol, 1998, 42(2): 117-124
- [12] 黎介寿. 肿瘤营养学的兴起及临床应用[J]. 肠外与肠内营养, 2004, 11(1): 1-2
Li Jie-shou. Nutritional oncology and its clinical application [J]. Parenteral & Enteral Nutrition, 2004, 11(1): 1-2 (In Chinese)
- [13] 姜洪池, 张新宇. 营养与免疫[J]. 临床外科杂志, 2004, 12(5): 306-308
Jiang Hong-chi, Zhang Xin-yu. Nutrition and immunity [J]. J Clin Surg, 2004, 12(5): 306-308 (In Chinese)
- [14] Merli M, Nicolini G, Angeloni S, et al. Malnutrition is a risk factor in cirrhotic patients undergoing surgery [J]. Nutrition, 2002, 18(11-12): 978-986
- [15] Tsukishiro T, Shimizu Y, Higuchi K, et al. Effect of branched-chain amino acids on the composition and cytolytic activity of liver-associated lymphocytes in rats [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2000, 15(8): 849-859