DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.01.034
第26卷第1期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 1
2004年1月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jan. 2004

文章编号:1000-5404(2004)01-0087-02

经验交流

碱性成纤维细胞生长因子在实验性胆汁性肝硬变形成过程中的作用

Role of basic fibroblast growth factor in experimental biliary cirrhosis

赵永忠[1],王 波[2],王天才[2],张 国[2] ([1]广西桂林医学院附属医院消化内科,桂林 541001;[2]华中科技大学同济医学院附属同济医院肝病研究所,武汉 430030)

临床和实验研究证实胆道梗阻可导致肝纤维化、肝硬变及门静脉高压,是影响预后的重要因素。近年来研究表明碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)在体内发挥着极其广泛的生物学作用。本研究通过胆总管结扎复制大鼠胆汁性肝硬变模型,旨在探讨bFGF在肝硬变形成过程中所起的作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制作

健康雄性SD大鼠40只,体质量200~250 g(购于同济医学院实验动物中心),分为肝硬变(cirrhotic, CIR)组30只和假手术(sham-orperated, SO)组10只。参照文献[1]采用胆总管结扎的方法建立肝硬变模型,假手术组仅分离出胆总管后关腹,相同条件下饲养4周。

1.2 观测指标及方法

1.2.1 肝功能测定 抽取下腔静脉血,测定血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、白蛋白和总胆红素水平。

1.2.2 肝脏病理学检查 处死大鼠后,肉眼观察肝脏形态学改变,同时取少许肝组织置10%中性福尔马林中固定后,常规脱水、石蜡包埋、连续切片(4 μm),作HE染色观察肝脏组织学改变。

1.2.3 肝内胶原染色和bFGF免疫组化染色及图像半定量分析 对肝组织切片作VG染色,观察胶原纤维分布;采用SABC法作免疫组织化学染色,观察bFGF染色的部位及强度(bFGF免疫组化试剂盒购自武汉博士德生物工程公司),用PBS代替一抗作阴性对照。采用HPIAS-1000型医学图像彩色分析系统测定肝内胶原及bFGF含量,每只大鼠随机选取5张切片,每张切片随机选取5个视野,分别测定肝内胶原纤维的面密度和bFGF积分光密度值,然后取均值。

1.3 统计学处理

所有数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,作 t 检验。

2 结果

术后4周CIR组死亡4只,SO组全部存活。

2.1 肝功能指标检测结果

CIR组大鼠血清ALT、ALP活性及总胆红素、直接胆红素水平与SO组相比差异有极显著性($P<0.01$),见表1。

表1 两组大鼠肝功能变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The varying of liver function between two groups($\bar{x}\pm s$)

Group	n	ALT(IU)	ALP(IU)	D-BIL (μmol/L)	T-BIL (μmol/L)
CIR	26	231.4±23.2*	331.4±28.4*	124.6±16.2*	178.7±25.3*
SO	10	29.3±8.7	38.5±9.6	6.8±2.5	15.2±3.9

*:与SO组比较,$P<0.01$

2.2 肝脏大体及组织学改变

CIR组所有大鼠均出现黄疸、胃肠淤血、脾脏肿大,部分大鼠有腹水形成,肝脏表面呈细颗粒状,色泽呈黄褐或绿褐色。光镜下见肝细胞变性坏死,汇管区胆管明显扩张,结缔组织增生明显,有大量新生胆管形成及炎性细胞浸润,增生的结缔组织向小叶间及小叶内延伸形成假小叶,小叶内毛细胆管高度扩张,部分可见胆湖形成;SO则无此改变。

2.3 肝组织bFGF表达和胶原分布及半定量分析

CIR组bFGF表达部位主要在纤维间隔内、汇管区、肝窦内皮细胞,呈棕黄色颗粒状,着色较深,范围广;而SO组bFGF表达仅见于汇管区、肝窦内皮细胞,且着色较浅,范围窄。胶原纤维被染成红色,主要位于汇管区结缔组织、肝窦及纤维间隔内,相互交织成网状,CIR组面积显著大于SO组,且胶原纤维的表达与bFGF的表达呈一致性。CIR组肝组织内bFGF平均积分吸光度值(0.120±0.039)和胶原纤维平均吸光度值(0.304±0.131)显著大于SO组(0.038±0.019, 0.060±0.038)($P<0.01$),差异有非常显著性意义。

3 讨论

肝纤维化是肝硬变的前期组织学改变,尚处于可逆阶段,此时,若阻断或遏制肝纤维化发展,将能有效防止肝硬变的发生。肝纤维化时细胞外基质尤其是胶原合成和沉积增多,而细胞因子可促进肝脏胶原合成与沉积,加速肝纤维化发生。

bFGF是一种由157个氨基酸组成的多肽,它能调节细胞的增殖和细胞外基质的生成,是一个强有力的有丝分裂原[2]。有报道,它在眼底损伤修复过程中起着重要作用,但有关bFGF与肝纤维化关系国内报道甚少。本研究采用胆总管结扎复制大鼠胆汁性肝硬变模型,经肝脏病理学检查证实模型复制成功。

基金项目:广西科技厅社发课题(0235024-7)
Supported by the Funds of Department of Science and Technology of Guangxi Province (0235024-7)
作者简介:赵永忠(1968-),男,广西省桂林市人,硕士,主治医师,主要从事慢性肝病方面的研究 电话:(0773)2823740
收稿日期:2003-05-14;修回日期:2003-06-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

免疫组化和 VG 染色结果表明: CIR 组 bFGF 染色呈强阳性, 范围广; 而 SO 组呈弱阳性, 且范围窄。CIR 组胶原纤维染色的强度和面积均大于 SO 组, 具有极显著性差异。半定量分析结果亦显示: CIR 组肝组织内 bFGF 平均积分光密度值和胶原纤维平均面密度值显著大于 SO 组。值得一提的是, 我们发现, 胶原纤维的表达部位、强度与 bFGF 的表达部位、强度呈一致性, 其结果与国外学者报道一致[3]。提示 bFGF 与胶原纤维的产生和沉积有一定的关联性。国内学者研究亦表明 bFGF 与肝纤维化形成有密切关系[4]。

细胞因子与胶原沉积的关系是通过对胶原生成细胞的调节作用而实现的。实验证明 bFGF 刺激肌纤维母细胞转化为肌成纤维细胞即储脂细胞, 而储脂细胞已被证实能产生诸多细胞外基质成分如胶原蛋白等, 从而促进肝纤维化的发生, 最终导致肝硬变。

综上所述, bFGF 可能在肝纤维化和肝硬变的发生发展过程中起着重要作用。

关键词: 碱性成纤维细胞生长因子; 肝硬变; 胶原
中图法分类号: R575.220.2 文献标识码: B

参考文献:

[1] Kountouras J, Billing B H, Scheuer P J. Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat[J]. Br J Exp Pathol, 1984, 65(3): 305—311.

[2] Rosenbaum J, Blazejeweski S. Regulation of Ito cell proliferation by soluble factors[J]. J Hepatol, 1995, 22(2 Suppl): 65—70.

[3] Napoli J, Prentice D, Niinami C, *et al*. Sequential increases in the intrahepatic expression of epidermal growth factor, basic fibroblast growth factor, and transforming growth factor beta in a bile duct ligated rat model of cirrhosis[J]. Hepatology, 1997, 26(3): 624—633.

[4] 陈文笔, 严家春, 马 勇, 等. 碱性成纤维细胞生长因子与乙型肝炎致肝纤维化的相关性分析[J]. 中国临床康复, 2002, 6(1): 145—148.

(编辑 陈聪连)

经验交流

文章编号: 1000-5404(2004)01-0088-02

6 种吉林抗癌中药清除羟自由基及其抗 DNA 损伤体外实验研究

Scavenging of hydroxyl radical and protection of DNA damage by 6 Jilin anti-tumor Chinese traditional medicines

陈 彪, 焦淑萍, 尹 荣, 段大航 (北华大学医学院机能实验室, 吉林 132001)

吉林中药东北天南星(*arisaema amurense maxim*); 白屈菜(*chelidonium majusl*); 甘草(*glycyrrhiza uralensis fisch*); 龙葵(*solanum nigrum L*); 光慈菇(*tulipa edulis bak*); 苣荬菜(*sonchus arvensis L*)具有抗肿瘤等多方面的作用[1], 但他们的作用机制尚未完全解释, 它们清除羟自由基(·OH)及抗 DNA 氧化损伤的作用也少有报道。本研究采用生物化学发光分析技术研究了这 6 种吉林中药醇提取物清除·OH 及抗 DNA 氧化损伤的作用, 从而解释它们防治疾病的部分作用机制。

1 材料与方法

1.1 药材和试剂

天南星、白屈菜、甘草、龙葵、光慈菇、苣荬菜由北华大学附属医院提供, 小牛胸腺 DNA、邻菲罗啉(Phen)为美国 Sigma 产品, Vit C、$CuSO_4$、磷酸盐均为国产分析纯。

1.2 仪器

SHG-1 型生物化学发光仪(上海上立检测仪器厂)。

1.3 样品制备

分别将以上药材适量用乙醇回流提取, 浓缩成 1 ml 相当于 1 g 药材备用。临用时用蒸馏水稀释为所需浓度。

1.4 对·OH 的清除作用[2]

各测量管中分别加 1.7×10^{-3} mol/L Vit C 200 μl, 2.8×10^{-3} mol/L $CuSO_4$ 400 μl, 酵母菌 200 μl, 然后分别加入梯度浓度的样品液 600 μl, 空白对照管加 600 μl 磷酸钠缓冲液, 分别测定各管本底 10 s 发光强度(CPIOS)。最后加入 1% H_2O_2 600 μl, 摇匀, 启动发光反应, 连续测定 10 s 发光强度, 计算药材各浓度的发表抑制率, 求出抑制发光强度 50%的样品浓度(IC_{50})。

$$发光抑制率(\%)=\frac{空白对照发光强度(cpl0\ s)-样品发光强度}{空白对照发光强度(cpl0\ s)}\times100\%$$

1.5 对 DNA 化学发光的影响[3]

各测量管中分别加入不同浓度的样品液 50 μl(空白对照管加入同等体积的蒸馏水), 再加入 2.0×10^{-3} mol/L Phen 50 μl, 2.0×10^{-3} mol/L Vit C 20 μl, 2.0×10^{-4} mol/L, $CuSO_4$ 50 μl, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液(pH 5.5) 730 μl, 100 μg/ml 小牛胸腺 DNA 50 μl, 测定各管本底 6 s 发光强度。最后加入 0.5% H_2O_2 50 μl, 启动反应[反应终体积为 1 发光强度(cp6s), 计算药材各浓度 ml], 检测体系 6 s 的发光抑制率, 求出各种药材对 DNA 保护作用的 IC_{50}。

$$发光抑制率(\%)=\frac{空白对照发光强度(cp6s)-样品发光强度(cp6s)}{空白对照发光强度(cp6s)}\times100\%$$

作者简介: 陈 彪(1956—), 男, 吉林省吉林市人, 博士, 教授, 主要从事中草药开发应用方面的研究, 发表论文 7 篇。电话: (0432)2452575-2174

收稿日期: 2003-03-07; 修回日期: 2003-09-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net