DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.11.031
第23卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 11
1318 2001年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)11-1318-03

梗阻性黄疸大鼠肝脏GHR最大结合容量及结合力的改变

别 平,刘 冰 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 研究梗阻性黄疸大鼠肝脏生长激素受体(GHR)表达及结合力的改变。方法 采用受体放射配体结合分析(RBA)技术检测肝脏GHR的最大结合容量和解离常数,并与血清总胆红素、前白蛋白、肿瘤坏死因子-α作相关分析。结果 梗阻性黄疸大鼠肝脏GHR最大结合容量(B_{max})明显下降,解离常数(k_d)明显增加。B_{max}值与血清前白蛋白水平呈正相关,与血清总胆红素、肝组织匀浆肿瘤坏死因子-α水平呈明显负相关;而k_d值与血清前白蛋白呈负相关,与血清总胆红素、肝组织匀浆肿瘤坏死因子-α水平呈明显正相关。结论 梗阻性黄疸大鼠GHR的最大结合容量和结合能力均明显降低,可能与梗阻时TNF-α等炎症因子的高表达、肝细胞胆盐蓄积等有关。GHR容量和结合能力的降低,可显著下调肝脏蛋白合成,并且可加重肠粘膜屏障的损伤,促进内毒素的吸收、TNF-α等炎症因子的释放。因此GHR的最大结合容量及结合力的降低是梗阻性黄疸时病理生理改变的重要环节。

关键词:梗阻性黄疸;生长激素受体;
中图法分类号:R392.2;R575.02 文献标识码:A

Changes of maximum binding capacity and binding power of liver growth hormone receptor in obstructive jaundice rats

BIE Ping, LIU Bing (Institude of Hepatobiliary Surgery of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the changes of the expression and binding power of liver growth hormone receptor(GHR) in obstructive jaundiced rats. Methods A total of 170 Wistar rats were divided into sham operation group and jaundice group with common bile duct obstructed. All animals were observed on day 0, 7 and 14. The maximum binding capacity (B_{max}) and dissociation constant (k_d) of liver GHR were measured with radioligand binding assay of receptors (RBA). The results were studied with the serum levels of total bilirubin, prealbumin and TNF-α for correlation analysis. Results The Bmax of liver GHR was significantly lower in obstructive jaundiced rats than sham operation group, which was opposite to the k_d changes. The B_{max} values have a positive correlation with serum prealbumin and a negative correlation with serum total bilirubin and TNF-α in liver tissue homogenate. But the k_d negatively correlated with prealbumin in serum and positively with bilirubin in serum and TNF-α in liver tissue homogenate. Conclusion The decrease of B_{max} and binding power of liver GHR might be associated with the higher level of TNF-α and other factors and the increased concentration of potentially toxic bile salts in hepatocytes of obstructive jaundiced rats. The reduction of B_{max} and binding power of liver GHR not only decreases the synthesis of liver proteins but also deteriorates the bowel muscous membrane barrier that accelerates the absorption of endotoxin and the release of inflammation cytokines, such as TNF-α. Thus, the decreases of B_{max} and binding power of liver GHR play an important role in the pathophysiological alteration of obstructive jaundice.

Key words: obstructive jaundice; growth hormone receptor

梗阻性黄疸(Obstructive jaundice, OJ)是临床上常见的病症。胆汁肝肠流向的中断,可引起复杂而严重的病理生理改变,是导致梗阻性黄疸患者高并发症率和高病死率的主要原因。生长激素(Growth hormone, GH)—生长激素受体(GH receptor, GHR)轴具有广泛而重要的生物学效应。生长激素受体主要分布于肝细胞,在多种病理生理状态下GHR的表达和功能可发生异常。本实验拟采用受体放射配体结合分析(Radioligand binding assay of receptors, RBA)研究梗阻性黄疸大鼠GHR表达和结合力的变化。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

GH(Sigma company, 美国);^{125}I-GH(NEN Life Science Products, Inc.美国);肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor-α, TNF-α)放免试剂盒(北京中山生物试剂公司);前白蛋白(Prealbumin, PA)药盒(上海亚都生物技术研究所)。

1.2 实验动物分组及模型制作

实验动物,健康雄性2月龄Wistar大鼠(本校实验动物中心提供),体重(200±20)g,共170只。随机分为两组:①假手术(SHAM)组;②胆总管结扎(BDO)组。观察时相点为术后0、7、14 d。

手术模型制作:SHAM组:切断肝周韧带后,轻微骚扰肝门后关腹;BDO组:显露胆总管十二指肠段,双重结扎并在结扎线间切断胆总管,关腹。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 肝组织生长激素受体放射配体结合分析 由于生长激素受体为简单单位点系统,因此通过结合^{125}I-GH的能力,即可精确的反映GHR的最大结合容量即GHR的数量和结合能力。具体的方法如下:肝组织匀浆,离心弃沉淀;4.0 mol/L $MgCl_2$洗脱内源性GH。酚试剂法蛋白定量,将样品加至24个检测管中,每管含蛋白50 μg/50 μl。抽取^{125}I-GH,配成0.04 nmol/50 μl工作液,复管法分别加入5、10、15、20、25、30、40、50 μl至1~16号检测

作者简介:别 平(1957-),男,重庆市奉节县人,博士,主任医师,教授,主要从事肝胆胰外科临床与肝再生方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68754169

收稿日期:2001-02-13;修回日期:2001-09-15

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

管。抽取 GH, 配成 0.4 μmol/50 μl 工作液, 按复管法分别加入 5、15、30、50 μl 至 17～24 号检测管, 同时分别加入相同体积的 ^{125}I-GH。上述各管再加入 buffer(25 mmol/L Tris·HCl, pH 7.4, 10 mmol/L $CaCl_2$)至 500 μl。22 ℃孵育 3 h, 离心弃上清, 沉淀物测放射记数。1～16 号管所测的 cpm 值为总结合, 17～24 号管为非特异性结合, 总结合减去对应浓度点非特异性结合得出特异性结合的 cpm 值。RBA 专用分析软件处理数据, 换算出受体最大结合容量(B_{max})和解离常数(k_d), 并作出饱和曲线[1,8]。

1.3.2　放射免疫法测肝组织匀浆 TNF-α　　利用均相竞争抑制原理, 按药盒的说明书在 FT-608 放免测定仪上测定。

1.3.3　肝功能的测定　　各时相点的血清统一送本院检验科测定血清白蛋白(TP)、总胆红素(TBil)。

1.3.4　血清中前白蛋白(PA)的变化　　采用免疫浊度法在全自动生化分析仪(美国 Vir Tris 公司)上测量。PA 含量(mg/l)=参比品的浓度×(测定管的浊度值/参比管的浊度值)。

1.4　统计学处理

对同一指标的组内与组间差异作 t 检验, 指标间的相关性作直线相关分析。

2　结果

2.1　肝功能和血清 PA 变化

大鼠胆总管结扎术后肉眼符合梗阻性黄疸改变, 皮肤黄染、尿色深黄, 肝功能有明显损害, TBil 明显升高。ALB 下降, 但 BDO 术后 7 d 尚无统计学意义。大鼠 SHAM 术后 PA 水平略下降, 但无统计学意义。BDO 术后 7 d PA 下降至正常值的 1/2 左右, 术后 14 d PA 水平较术后 7 d 又有明显下降, 见表 1。

表 1　胆总管结扎术后大鼠的肝功能

Tab 1　Liver functions after ligation of bile duct

Group	TBil(μmol/L)	ALB(g/L)	PA(mg/L)
SHAM 0 d	14.63±2.1	56.35±7.59	287.4±14.78
SHAM 7 d	13.86±2.9	53.26±8.03	279.38±14.25
SHAM 14 d	13.08±3.2	59.71±8.59	281.47±12.3
BDO 7 d	185.24±26.08#	47.58±5.62	141.2±7.58#
BDO 14 d	312.47±46.25#※	29.31±4.15#※	71.6±4.02#※

#: $P<0.01$ *vs* SHAM group; ※: $P<0.01$ *vs* BDO 7 d group

2.2　肝组织匀浆 TNF-α 的变化

SHAM 组术后 7、14 d 肝组织匀浆 TNF-α 水平与正常组无明显改变, BDO 组术后 7 d 即明显增高, 术后 14 d 达到更高水平, 见表 2。

表 2　肝组织匀浆 TNF-α 的变化(ng/g, 肝组织)

Tab 2　Changes of TNF-α in the homogenate of liver tissues(ng/g, liver tissue)

	0 d	7 d	14 d
SHAM Group	0.805±0.102	1.18±0.124	0.95±0.117
BDO Group	0.805±0.102	4.142±0.513#	6.361±0.876#※

#: $P<0.01$ *vs* SHAM group; ※: $P<0.01$ *vs* BDO 7 d group

2.3　肝组织生长激素受体最大结合容量和解离常数的改变

令[B_{max}]、[Lt]分别为受体、配体的初始反应浓度, [R]、[L]、[RL]分别为受体、配体、受体配体复合物在结合反应达到动态平衡时的浓度, 利用 Goldstein 公式, 利用其符合 Goldstein 公式, 可换算出受体最大结合容量(B_{max})和反应的解离常数(k_d)。见表 3, 肝组织 GHR 浓度值在 BDO 后 7 d 明显降低, 术后 14 d 降低更为显著; 而 k_d 值则在 BDO 后 7 d 明显增高, 至术后 14 d 增高更为显著。并可得出结合反应的饱和曲线, 见图 1。大鼠 BDO 术后 7 d 肝脏 GHR 饱和曲线明显右移且压低, BDO 术后 14 d 上述改变更为显著, 直观的证实了 GHR 最大结合容量和结合力均有明显的降低。

表 3　肝组织 GHR 含量和 k_d 值

Tab 3　Changes of B_{max} and k_d value of GHR in liver tissues

	SHAM			BDO	
	0 d	7 d	14 d	7 d	14 d
B_{max}(fmol/mg pro)	29.6±3.2	28.36±3.13	27.69±2.98	13.2±1.51#	8.81±1.03#※
k_d(pM)	17.9±2.3	18.5±2.6	18.2±2.9	51.32±4.85#	80.18±7.59#※

#: $P<0.01$ *vs* SHAM group; ※: $P<0.01$ *vs* BDO 7 d group

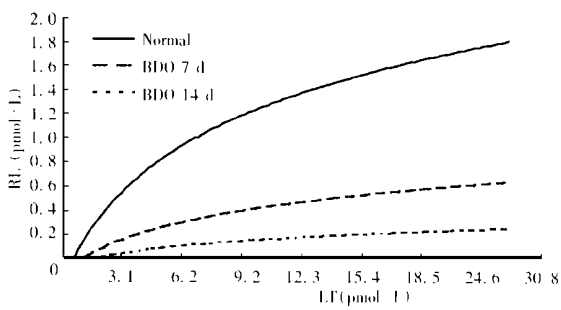


图 1　GHR 饱和曲线

Fig 1　Saturation curves of GHR

2.4　肝组织 GHR 浓度、k_d 值与 TNF-α、PA、TBil 的相关性检验

GHR 含量与 TNF-α 呈负相关, $r=-0.9852$($P<0.01$); 与 PA 呈正相关, $r=0.9963$($P<0.01$); 与 TBil 呈负相关 $r=-0.9792$($P<0.01$)。k_d 值与 TNF-α 呈明显正相关, $r=0.9973$($P<0.01$); 与 PA 呈负相关, $r=-0.9872$($P<0.01$)与 TBil 呈正相关, $r=0.9599$($P<0.01$)。

3　讨论

GH-GHR 轴具有广泛而重要的生物学效应, 已被确认在调节蛋白质、糖、脂肪代谢中发挥重要作用[2], 并且还具有逆转过高的急性期反应和促进细胞增殖等功能[3]。GHR 主要分布于肝细胞, GH 与其受体结合后, 导致信号转导转录活化因子 5b(Signal transducer and activators of transcription 5b, STAT5b)磷酸化及二聚化, 活化的 STAT5b 转运到细胞核内, 引起靶基因的转录, 进一步发挥其生物学效应[4]。已有的研究证实在严重创伤、烧伤、内毒素血症、严重的营养障碍等状态下, GHR 表达下调[5], 梗阻性黄疸时, GHR 表达和结合能力是否有类似改变, 尚未见有相关报道。

RBA 是研究受体表达及功能状态的重要分子生物学手段[6], 能够在蛋白水平上对受体同时进行容量

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

和功能状态的分析。我们采用 RBA 法测 GHR 发现，大鼠肝脏 GHR 最大结合容量在胆总管结扎后明显下降，并随着胆道梗阻的时间延长而加重，与血浆 TBil 水平等呈明显负相关，而且 GHR 的结合能力亦呈相似的变化趋势。这就提出在梗阻性黄疸状态下，肝脏 GHR 不但有总量的减少，而且结合能力也有降低。

梗阻性黄疸时胆汁胆肠流向的中断可导致内毒素吸收引起 TNF-α 等炎症因子的释放，导致全身炎性反应和机体高分解代谢状态障碍等进一步损伤[7]。肝组织 TNF-α 在梗阻性黄疸时显著增高，并随着黄疸程度的加深而进一步升高。肝组织 TNF-α 水平与 GHR 最大结合容量呈显著负相关，与 GHR 的 k_d 值呈显著正相关，提示梗阻性黄疸时 TNF-α 异常高表达可能降低了GHR 的表达和结合能力。TNF-α 等炎症因子的过高表达时可下调肝细胞核因子-1（Hepatocyte nuclear factor-1，HNF-1）进而可抑制 GHRmRNA 的转录和翻译导致 GHR 的表达下降[1]。但 TNF-α 等炎症因子的过高表达如何降低 GHR 的结合能力，具体机制尚不清楚，可能与肝细胞膜结构的损伤、GHR 分子构象的异常改变，导致 GH 嵌和困难有关。

由于 PA 的半衰期仅为 1.7 d，测定血清 PA 水平可简便而敏感的反映肝脏蛋白合成能力。我们实验发现，血清 PA 与肝组织 GHR 容量和结合能力呈明显的正相关。白蛋白、PA 基因启动子区域含有类干扰素活化序列，STAT5b 可与这些序列结合，启动基因转录。因此 GHR 表达和活性的降低是介导梗阻性黄疸时蛋白合成能力下降的重要原因。

GH 与其受体结合后，引起肝细胞合成、分泌轴胰岛素样生长因子-1（Insulin-like growth facto-1，IGF-1）。后者是保持肠粘膜上皮屏障完整性的重要因子[8]。在梗阻性黄疸时由于内毒素吸收 TNF-α 等炎症因子大量释放，导致 GHR 表达降低和结合能力下降；而 GHR 的表达和功能下降，引起 IGF-1 的表达减少，又导致肠粘膜通透性增加，加重了内毒素的吸收从而形成恶性循环。

总之，在大鼠梗阻性黄疸时，肝组织 GHR 的容量和结合能力都有明显的降低，其下调可能与内毒素的吸收、TNF-α 等炎症因子的释放有关。GHR 表达和结合能力的降低可引起肝细胞蛋白合成降低，并且可加重内毒素吸收和炎症因子释放，形成恶性循环。因而在梗阻性黄疸的病理生理改变中具有重要意义。

参考文献：

[1] Defalque D, Brandt N, Ketelslegers J M, *et al*. GH insensitivity induced by endotoxin injection is associated with decreased liver GH receptors[J]. Am J Physiol, 1999, 276(3 Pt 1): E565—572.
[2] Breier B H. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis[J]. Domest Anim Endocrinol, 1999, 17(2—3): 209—218.
[3] Jeschke M G, Herndon D N, Wolf S E, *et al*. Recombinant human growth hormone alters acute phase reactant proteins, cytokine expression, and liver morphology in burned rats[J]. J Surg Res, 1999, 83(2): 122—129.
[4] Herrington J, Smit L S, Schwartz J, *et al*. The role of STAT proteins in growth hormone signaling[J]. Oncogene, 2000, 19(21): 2 585—2 597.
[5] Dahn M S, Lange M P, Jacobs L A. Insulin-like growth factor-1 production is inhibited in human sepsis[J]. Arch Surg, 1988, 123(11): 1 409—1 414.
[6] 程绍钧 主编. 检验核医学[M]. 重庆：重庆大学出版社，1999. 99—107.
[7] Clements W D, Erwin P, McCaigue M D, *et al*. Conclusive evidence of endotoxaemia in biliary obstruction[J]. Gut, 1998, 42(2): 293—299.
[8] Scopa C D, Koureleas S, Tsamandas A C, *et al*. Beneficial effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on intestinal bacterial translocation, endotoxemia, and apoptosis in experimentally jaundiced rats[J]. J Am Coll Surg, 2000, 190(4): 423—431.

（编辑 薛国文）

消息

《生物技术通讯》征订启事

《生物技术通讯》是军事医学科学院生物工程研究所主办的关于生物技术的中央级专业性学术刊物（国内统一刊号 CN11-4226/Q，国际标准刊号 ISSN 1009-0002），是国家科技部中国科技论文统计与分析源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊。本刊主要报道生物技术（生物工程）及所有相关学科领域的最新科研成果与进展。主要栏目有：研究报告、技术方法、研究简报、专论、综述、论坛、讲座、经验交流等。读者对象主要为从事生物技术及其在生物医学、工业、农业、环保等领域应用的科研、教学、管理人员，大专院校相关专业师生及有关工程技术人员，以及其他对生物技术感兴趣的人员。欢迎订阅、欢迎供稿。

《生物技术通讯》为大 16 开本，双月刊，80 页，每期定价 9 元，全年 54 元。国内外公开发行，国内邮发代号：82-196，国外发行代号 1433Q。编辑部办理邮购业务。

地址：北京 丰台 东大街 20 号 邮编：100071
电话：(010)66948856 传真：(010)63895646 E-mail: biolett@bj163.com

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