DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.023
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

文章编号:1000-5404(2001)09-1051-04

论著

人肝细胞生成素受体的确定及特性

王 阁[1],房殿春[1],刘为纹[1],冷恩仁[2],胡 辂[2],王 军[2],杨晓明[3],张 咏[3],贺福初[3] (第三军医大学:[1]附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038;[2]附属大坪医院野战外科研究所消化内科,重庆 400042;[3]北京军事医学科学院放射医学所,北京 100850)

提 要:目的 研究人重组肝细胞生成素(rhHPO)特异性刺激肝细胞增殖的信号转导是否通过特异性受体结合介导。方法 通过受体结合和特异性竞争抑制实验及Scatchard分析原代培养大鼠肝细胞、人胎肝细胞和肝癌细胞的特性。结果 原代培养大鼠肝细胞、人胎肝细胞和肝癌细胞存在HPO受体,受体数量分别为10 000个/细胞、20 000个/细胞和55 000个/细胞,平衡解离常数(Kd)分别为2、1.4及0.7 pmol,HPO与受体结合的复合物分子量约为90×10^3,推算出HPO与该受体结合具有饱合性和特异性,此结合不能被EGF、TGF-α和胰岛素所竞争抑制。通过交联反应在SDS-PAGE电泳上显示此受体分子量约75×10^3。结论 HPO促肝细胞增殖作用是通过肝细胞表面这种特异性膜受体介导的。

关键词:肝细胞生成素;受体;放射配基结合分析法;肝再生
中图法分类号:R322.47;R329.28;R392.11 文献标识码:A

Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin

WANG Ge, FANG Dian-chun, LIU Wei-wen, LENG En-ren, HU Lu, WANG Jun, YANG Xiao-ming, ZHANG Yong, HE Fu-chu (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine the posible role of specific receptor binding in the transduction HPO. Methods Specific displacement test and Scatchard analysis were used to analyze the character of primarily cultured rat hepatocyte, human fetal hepatocyte and human hepatoma cells. Results HPO receptor existed in the primary cultured rat hepatocyte, human fetal hepatocyte and human hepatoma cells, the density was 10 000, 20 000 and 55 000 sites/cell respectively. The dissociation constant (Kd) was 2, 1.4 and 0.7 pmol respectively. Affinity cross-linking of the receptor with ^{125}I-HPO revealed a polypeptide of Mr. approximately 90×10^3 by SDS-PAGE. The molecular mass of HPO receptor was calculated to be about 75×10^3. The binding was saturable and specific since it was replaceable by HPO but not by EGF, TGF-α or insulin. Conclusion Data demonstrates the existence of HPO receptor in hepatocytes and hepatoma cells and the proliferation promotion effect of HPO is mediated by the specific receptor.

Key words: hepatopioetin; receptor; radioactive ligand binding analysis; liver regeneration

肝细胞生成素(Hepatopoietin, HPO)是一类来源于肝脏自身、特异性刺激肝细胞增殖的小分子物质。已证实HPO在体外不仅对原代培养的大鼠肝细胞、人胎肝细胞有刺激DNA合成作用,而且对肝癌细胞也有直接刺激增殖作用。HPO是一种与肝再生相关的重要生长因子,可促使肝细胞从G_0/G_1期进入S期[1~11]。有关HPO发挥作用的具体机制尚不清楚,是否与其它肝再生相关多肽生长因子一样存在膜受体以及是否通过受体介导而发挥生物学效应,国内外至今未见任何报道。放射配基结合分析法是研究受体特性的经典方法,因此我们利用前面具有高活性低失活已碘标记的HPO[4],通过受体配基结合竞争实验,首次证实HPO膜受体的存在,并对HPO受体的特性进行初步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性Wistar大鼠,体重(200±20) g,本院实验中心提供。$HePG_2$、HTC、SMMC7721、L02、COS-7、K562、Hep2和CHO细胞株,本科室保存[8]。Ⅳ型核乳胶、Na ^{125}I购自Amersham公司。rhHPO为自行构建的PBV-hHPO表达菌株,经诱导表达,纯化,获纯度>95%rhHPO[12]。BS^3,Ⅳ型胶原酶为Sigma产品。细胞培养耗材均为GIBCO产品。

1.2 方法

1.2.1 大鼠原代肝细胞、人胎肝细胞和细胞株的分离及培养 大鼠原代肝细胞和人胎肝细胞的分离参考Seglen[13,14]方法,将细胞悬液于含10%FCS、10^{-9}mol/L胰岛素、10^{-9}mol/L地塞米松、青链霉素的DMEM中,计数后将细胞铺于24孔培养板,每孔1 ml,在37 ℃,5%CO_2的孵箱中培养,细胞密度为1×10^4/ml。

分离及培养$HePG_2$、HTC、SMMC7721、L02、COS-7、K562、Hep2和CHO细胞株,将细胞悬液置于10%FCS、DMEM培养液中,铺于24孔培养板,每孔1 ml,细胞密度为5×10^3/ml,于37 ℃、5%CO_2孵箱中培养。

1.2.2 ^{125}I-HPO受体结合实验[12,15] 原代大鼠肝细胞、人胎肝细胞和各种组织来源细胞株培养24 h后,观察细胞贴壁生长良好,用结合缓冲液(20 mmol/L Hepes, 0.2%BSA/Hanks, pH 7.0)冲洗2遍,一组用不同浓度的^{125}I-rhHPO加入每孔反应,另一组在加入不同浓度的^{125}I-rhHPO的同时加入相应浓度为1 000倍的未标记rhHPO进行反应,在25 ℃下摇床内反应60 min,再用4 ℃的结合缓冲液冲洗5遍,用0.25%胰蛋白酶消化后收集细胞,进行γ-计数仪计数(cpm),完成受体结合曲线及Scatchard作图。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870005, 29900073)
作者简介:王 阁(1968-),男,重庆市人,博士,主治医师,主要从事肝脏疾病方面的研究,发表论文15篇,现在附属大坪医院野战外科研究所消化内科工作,重庆 400042。电话:(023)68757342
收稿日期:2001-07-27;修回日期:2001-09-04

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

选择一组^{125}I-rhHPO 浓度为恒定反应浓度(1 pmol),再分别加入 500 倍,100 倍,50 倍,20 倍,10 倍,5 倍,2 倍于^{125}I-rhHPO 反应浓度的未标记 rhHPO,另外一组加入不同浓度的 TGF-α,EGF,胰岛素,反应条件同前,最后收集细胞进行γ-计数仪计数(cpm),制作竞争抑制曲线。

1.2.3 ^{125}I-rhHPO 与膜受体亲和力的交联反应[16~18] 选定^{125}I-rhHPO与膜受体结合反应的饱和浓度与 $HePG_2$ 进行受体结合实验,步骤同前。反应后用 4 ℃ PBS 冲洗 5 遍,加入新配制 BS^3,反应浓度为 0.25 mmol/L。在摇床中 4 ℃下反应 15 min,完成交联分离后,再用 2 ml 4 ℃ PBS 冲洗 1 遍,加入 1 ml 4 ℃裂解液(pH=7.4 10 mmol/L Tris,1 mmol/L EDTA,0.25 mol/L 蔗糖,1 mmol/L PMSF),收集细胞,4 ℃离心 10 000× g 1 min,沉淀物加入样品缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl,20%甘油,2%SDS,0.002%溴酚蓝,1% Triton X-100)50 μl,煮沸 4 min 后于 12.5%SDS-PAGE 上样电泳,电泳带干燥后在-70 ℃下曝光 5~7 d。

1.2.4 $HePG_2$ 上 HPO 受体的放射自显影 接种 $HePG_2$ 细胞悬液于加有盖玻片的 35 mm 平皿中,细胞密度为 5×10^2/孔,每孔加入含 10%FCS 的 DMEM 1 ml,37 ℃,5% CO_2 孵箱培养 24 h 后,用 Hanks 液冲洗细胞 1 次,加入预先在 37 ℃预热 20 min 的含^{125}I-rhHPO,5% FCS 的 DMEM 培养液,浓度为 1 μCi/ml,37 ℃孵育 2 h,用 Hanks 液冲洗 3 次,再用 70%酒精固定 30 min,暗室中涂抹核乳胶,-20 ℃暗盒曝光 3~5 d,显影定影后用 Giemsa 染色 5 min,酒精逐级脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,光镜观察。

2 结果

2.1 ^{125}I-HPO 与膜受体结合实验

通过受体结合实验和结合竞争抑制实验发现,肝源性细胞包括正常肝细胞(如原代培养大鼠肝细胞、人胎肝细胞和 L02 细胞等)与非正常肝细胞(如 $HePG_2$、HTC 和 SMMC7721 肝癌细胞等)与^{125}I-rhHPO 反应具有剂量效应关系,以原代培养大鼠肝细胞、人胎肝细胞和 $HePG_2$ 细胞为代表进行分析。图 1A 示^{125}I-rhHPO 原代培养大鼠肝细胞受体结合实验的典型饱和结合曲线,饱和浓度为 1.5 pmol,图 1B 为 Scatchard 作图分析,其受体数量为 10 000 个/细胞,Kd 值为 2 pmol;图 1 代表^{125}I-rhHPO 与 $HePG_2$ 肝癌细胞受体结合实验的典型饱和曲线,饱和浓度为 1.5 pmol,图 1D 为 Scatchard 作图分析,其受体数量分别为 55 000 个/细胞,Kd 值为 0.7 pmol;图 1E 示^{125}I-rhHPO 人胎肝细胞受体结合实验的典型饱和结合曲线,饱和浓度为 1.5 pmol,图 1F 为 Scatchard 作图分析,其受体数量为 20 000 个/细胞,Kd 值为 1.4 pmol。来源于其它组织的非肝源性细胞,如 COS-7 细胞、K562 细胞、Hep2 细胞和 CHO 细胞,与^{125}I-rhHPO 均无明显的剂量效应关系。

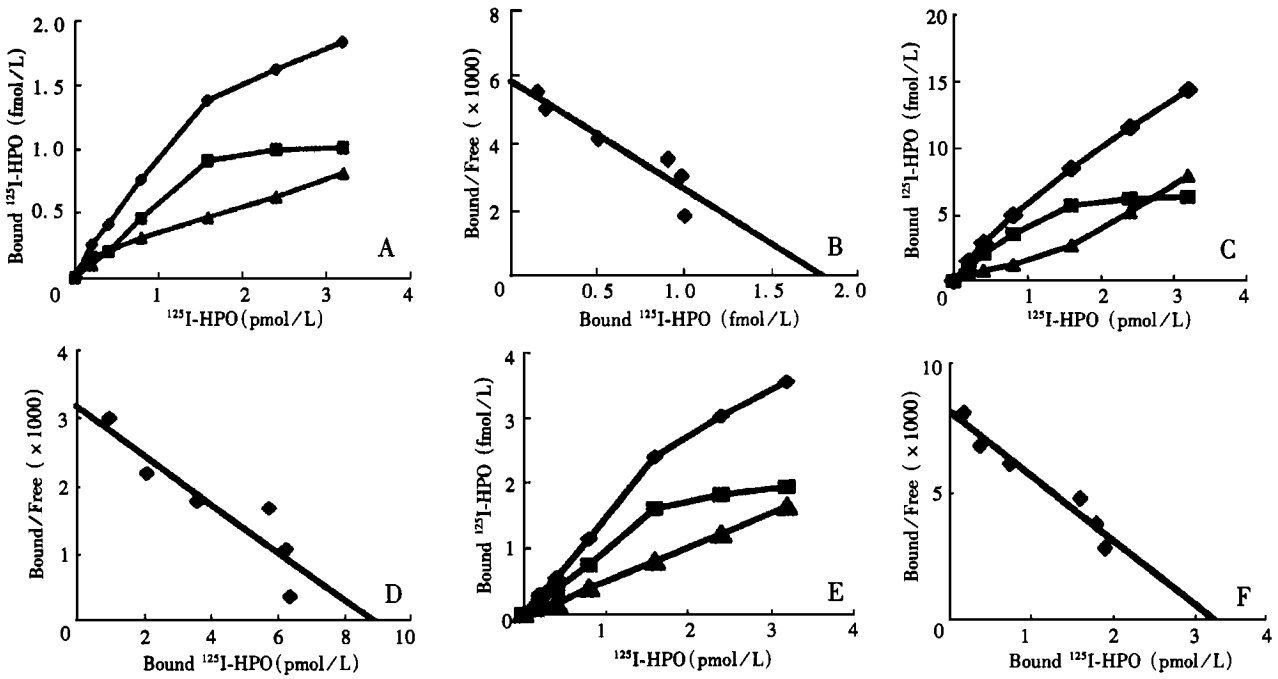


图 1 ^{125}I-HPO 与肝细胞受体结合典型饱和结合曲线和 Scatchard 作图

Fig 1 Identification of a high affinity receptor for HPO

◆: Total binding; ■: Specific binding; ▲: None specific binding

2.2 ^{125}I-HPO 与膜受体结合的特异性实验

^{125}I-rhHPO 与膜受体特异性结合典型的竞争抑制曲线,见图 2。只有未标记的 HPO 可竞争抑制^{125}I-HPO 与膜受体的结合,并呈剂量效应关系,在浓度为反应浓度的 100 倍左右时可发生完全竞争抑制,而胰岛素、EGF 和 TGF-α 却不能竞争抑制^{125}I-HPO 与膜受体的结合。

2.3 $HePG_2$ 细胞 HPO 受体的放射自显影

在受体与配基已发生结合的 $HePG_2$ 细胞上,可见以细胞为中心簇集着直径为 1~2 μm 的黑色圆形颗粒,代表^{125}I-rhHPO 与膜受体结合后形成的复合物,表明 HPO 膜受体的存在,见图 3。

2.4 ^{125}I-HPO 与受体交联反应

结合反应后,加入交联剂 BS^3,受体与^{125}I-rhHPO 复合物在 SDS-PAGE 上电泳,放射自显影显示分子量大约在 90×10^3 左右。在结合反应时加入 100 倍未标记 HPO,在 90×10^3 无条带出现,而加入 EGF 不影响复合物条带的出现。已知 HPO 分子量,因此推测 HPO 受体的分子量大约为 75×10^3。

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

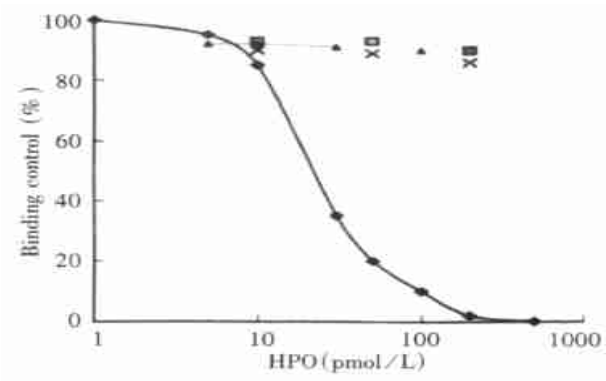


图 2　^{125}I-HPO 与膜受体特异性结合典型的竞争抑制曲线

Fig 2　Specificity of ^{125}I-HPO binding to the receptor

●: HPO; ▲: EGF; □: TGF-α; ×: Insulin

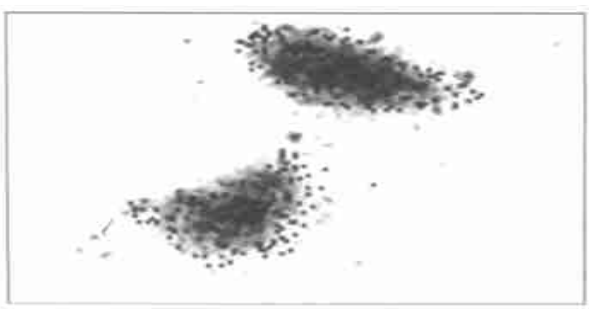


图 3　$HePG_2$ 细胞 HPO 受体的放射自显影　(× 600)

Fig 3　Autoradiograph of HPO receptor　(× 600)

3　讨论

HPO 与肝再生关系密切, 能特异刺激肝细胞增殖, 促进肝细胞从 G_0/G_1 进入 S 期, 但有关 HPO 促肝细胞增殖的机制至今国际上尚未见报道。受体是细胞内或细胞膜上的大分子物质, 它以特异性结合配基的方式传递生理反应, 是生长因子发挥生物学效应及调控作用的关键成分, 本实验证实 HPO 与其它多肽生长因子一样, 是通过与靶细胞膜上特异性受体结合而发挥生物学效应的。

通过^{125}I 标记的 rhHPO, 观察^{125}I-rhHPO 与大鼠肝细胞、人胎肝细胞和肝癌细胞的结合, 发现^{125}I-HPO 与肝细胞结合位点有剂量效应关系, 且有饱和趋向及可逆性, 即结合后若再加入大量未标记 HPO, 则^{125}I-HPO 与结合位点的结合下降; 另外, 其结合具有特异性, 即加入胰岛素、TGF-α 和 EGF, ^{125}I-hHPO 与肝细胞膜上结合位点不受影响, 结果证明肝细胞膜上的特异性位点可能就是 HPO 的受体, 具有高度特异性, 可逆性和饱和性。

通过受体结合实验和结合竞争抑制实验发现, 肝源性细胞包括正常肝细胞(如原代培养大鼠肝细胞、人胎肝细胞和 L02 细胞等)与非正常肝细胞(如 $HePG_2$、HTC 和 SMMC7721 肝癌细胞等)上均存在 HPO 受体, 无种属特异性, 而来源于其它组织的非肝源性细胞, 如 COS-7 细胞(肾)、K562 细胞(血液)、Hep2 细胞(喉)和 CHO 细胞(卵巢)等, 与^{125}I-rhHPO 均无明显的剂量效应关系, 提示 HPO 受体的组织分布和细胞定位具有特异性, 这可能是 HPO 特异刺激肝细胞增殖的作用机制之一。

虽然原代大鼠肝细胞、肝癌细胞和人胎肝细胞上均有 HPO 的受体, 但在数量和亲和力上存在明显的差异。原代大鼠肝细胞上受体的数量少, 亲和力低; 肝癌细胞上受体的数量多, 亲和力高; 胎肝细胞上受体数量和亲和力介于两者之间。胎肝含有丰富的造血干/祖细胞和 肝细胞的干/祖细胞, 它的正常生理发育需要生长因子定向诱导和分化。正常成年大鼠肝细胞可基本反应肝细胞在正常生理条件下的生长状态, 而肝癌细胞是反应肝细胞异常增殖的一种病理状态。HPO 受体在不同的生理发育阶段和不同生理病理状态下所表现的不同状况, 提示 HPO 可能是维系肝细胞生长发育最重要的生长因子之一。此作用通过肝细胞膜受体介导, 是通过调节受体的数量和亲和力发挥着 HPO 在肝细胞生长发育中的重要作用。由于肝细胞和肝癌细胞自身可以产生 HPO, 其膜上又存在特异性受体, 表明 HPO 可能通过自分泌循环方式调控肝细胞的生长发育, 受体数目与亲和力的变化或 HPO 产生的异常可能是肝癌发生的机制之一。

参考文献:

[1] LaBrecque D R. Hepatic stimulator substance-discover, characterization and mechanism of action[J]. Dig Dis Sci, 1991, 36(6): 669—673.

[2] He F C, Wu C T. Human hepatopiotin and its relationship with liver regeneration[J]. Chin Sci Bul, 1997, 42(18): 1 505—1 511.

[3] LaBrecque D R, Pesch L A. Preparation and partial characterization of hepatic regeneration stimulator substance (ss) from rat liver[J]. J Physiol, 1975, 248(2): 273—284.

[4] Wang G, Yang X M, Zhang Y, *et al*. Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1 [J]. J Biol Chem, 1999, 174(17): 11 469—11 472.

[5] Tu Q, Wu C T. Stugy on biological activity of hepatocytes growth factor in human fetal liver[J]. Clin J Appl Physiol(in Chinese), 1990, 6(4): 199—200.

[6] He F C, Wu C T, Tu Q, *et al*. Human hepatic stimulator substance: A product of gene expression of human fetal liver tissue[J]. Hepatology, 1993, 17(2): 225.

[7] Yang X M, Qiu Z H, Xie L, *et al*. Human augmenter of liver regeneration: molecular cloning biological activity and roles in liver regeneration[J]. Sci Chin (Series C), 1997, 40(6): 642—647.

[8] Hagiya M, Francavilla A, Polimena L, *et al*. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution [J]. PNAS, 1994, 91(11): 8 142—8 146.

[9] Lisowsky T, Weinstat-Saslow D L, Barton N, *et al*. A new human gene located in the PKD1 region of chromosome 16 is a functional homologue to ERV1 of yeast[J]. Genomics, 1995, 29(3): 690—697.

[10] Yang X M, Wang A M, Zhou P, *et al*. Human hepatopoietin-A hepa-

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

totrophic factor for liver regeneration, and its potential antihepatitis effect *in vivo*[J]. Chinese Sci Bull, 1998, 43(22): 1 026—1 031.

[11] Xie L, Yang X M, He F C. Experimental studies on rescue of acute hepatic failure with a recombinant enhancer of rat liver regeneration[J]. Chin J Appl Physiol. (in Chinese), 1996, 12(6): 324—328.

[12] Morley C G D, Kingdon H S. Use of ^{3}H-thymidine for measurement of DNA synthesis in rat lifer awaring[J]. Anal Biochem, 1972, 45(2): 298—305.

[13] Seglen P O. Preparation of isolated rat liver cells[J]. Methods Cell Biol, 1976, 13(1): 29—35.

[14] Moshage H, Yap S H. Primary cultures of human hepatocytes: a unique system for studies in toxicology, virology, parasitology and liver pathophysiology in man[J]. J Hepatol, 1992, 15(3): 404—413.

[15] Habibullah C M, Syed I H, Qamar A, *et al*. Human fetal hepatocyte transplantation in patients with fulminant hepatic failure[J]. Transplantation, 1994, 58(8): 951—952.

[16] Higuchi O, Nakamura T. Identification and change in the receptor for hepatocyte growth factor in rat liver after partial hepatectomy or induced hepatitis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1991, 176(2): 599—607.

[17] Zarnegar R, DeFrance M C, Oliver L, *et al*. Identification and partial characterization of receptor binding sites for HGF on rat hepatocytes[J]. Biochem Biophy Res Commun, 1990, 176(3): 1 179—1 185.

[18] Baglioni C, McCandless O, Travernier J, *et al*. Binding of human tumor necrosis factor to high affinity receptor on HeLa and lymphoglastoid cells sensitive to growth inhibition[J]. J Biol Chem, 1985, 260(5): 13 955—13 397.

(编辑 薛国文)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2001)09-1054-01

经皮穿刺腰椎间盘切吸术的护理配合

Nursing care of automated percutaneous lumbar diskectomy

陈 洁, 游 箭, 陆 明 (第三军医大学附属西南医院放射科, 重庆 400038)

自 Hijikata[1] 首次报道用经皮穿刺腰椎间盘切吸术(Automated percutaneous lumbar disctomy, APLD)治疗腰椎间盘突出症以来, 近年因设备器材的不断改进和完善, 使该法得到了迅速的发展[2,3], 为顺利的完成该手术, 手术前后的护理准备和术中配合是十分重要的, 现将我科 20 例 APLD 护理配合的初步体会介绍如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

本组共 20 例, 其中男性 16 例, 女性 4 例, 年龄 24～50 岁, 平均(38±6.2)岁; 均有频繁发作的腰腿痛、下肢麻木、跛行或一侧肢体感觉异常、活动受限等表现, 直腿抬高试验均程阳性; 本组病例全部经保守治疗两个月以上而疗效不佳者。

1.2 术前准备

首先向病人及家属说明本手术创伤小、恢复快、安全性高的特点以消除病人的思想顾虑, 争取病人配合。术前 1 d 给患者清洗背部, 检查血常规、出凝血时间、血小板及肝肾功能, 做奴夫卡因和青霉素过敏试验。检查机器设备, 特别是吸引器的性能情况。备好术中用品, 如庆大霉素、生理盐水等。

2 手术方法和术中配合

患者取侧卧位, 有症状一侧在上, 根据 CT 或 MRI 横断面扫描结果标定穿刺点, 在透视下沿穿刺途径用 1%奴夫卡因局麻, 注意不能将神经根麻醉。在 X 线透视双向定位下将穿刺针插入髓核中心, 退出针芯后依次由细到粗将套管针插入。最后将直径 4.2 mm 的套管针留在椎间盘内。用纤维环切割针切开纤维环, 植入电动旋切刀进行切割和抽吸。切割时用加有 24 万U 庆大霉素的生理盐水 500 ml 进行冲洗, 其冲洗流率为 100 ml/min。抽吸最大负压为 1 个大气压, 抽吸时间约 20 min; 抽吸完毕, 拔除套管针并加压包扎。术中除连接好各种管道, 核查好抽吸时的压力外, 还必须随时注意观察病人有无突然发生或加重的疼痛以及突然的肌肉收缩, 这往往是血管和神经损伤的唯一和强烈的提示信号。这时, 应立即提醒术者改变进针的角度和方向, 以避免损伤血管和神经。本组 20 例均成功, 无严重并发症发生。

3 术后护理

术后严密观察病人生命体征及下肢感觉和运动情况, 注意穿刺部位有无渗血。术后 30 min 给患者进行直腿抬高试验, 手术成功时应呈阴性。常规预防性应用抗菌素 3 d, 并可口服呋喃硫胺, 地巴唑及布洛芬。术后患者应睡硬板床 1～2 周。1 月后复查 CT 或 MRI。

通过 20 例手术的配合, 我们初步体会到, 只要准确的手术操作, 熟练的术中配合和观察, 本手术是安全可靠的, 并且具有损伤小、恢复快、费用低的优点, 值得进一步推广应用。

关键词: 腰椎间盘切吸术; 外科护理
中图法分类号: R473.6 文献标识码: B

参考文献:

[1] Hijikata S. A method of percutaneous medeus extraction: A new therapy modulity for intervertebral disc herniation[J]. J Oden Hospital, 1975, 5(3): 309—311.

[2] 王 峰, 焦天民, 郎志谨. 经皮穿刺切割腰 5-骶 1 间盘切除术[J]. 介入放射学杂志, 1998, 7(2): 109—110.

[3] 周义成, 王承缘, 郭俊渊 等. 经皮穿刺切割腰椎间盘切除术治疗腰椎间盘突出症[J]. 临床放射学杂志, 1991, 3(2): 144.

(编辑 谢义霞)

作者简介: 陈 洁(1960—), 女, 江苏省南京市人, 主管技师, 主要从事介入放射学护理工作的研究, 发表论文 8 篇。电话: (023)68754426

收稿日期: 2001-03-20; 修回日期: 2001-05-15

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