DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.02.040

肝硬化及肝癌患者血浆内皮素水平变化的初步观察

Preliminary study on changes of plasma endothelin in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma

陈东风 冷恩仁 徐有奇 (第三军医大学附属大坪医院消化内科)重庆,630042
刘为纹 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆,630038

内皮素(Endothlin,ET)是由血管内皮细胞产生的由21个氨基酸组成的活性多肽,是迄今所知的体内最强的缩血管物质,对心血管、内分泌、呼吸及消化系统等都有重要作用[1]。目前关于ET与肝硬化、肝癌的关系报道较少,我们检测了50例肝硬化、肝癌患者血浆ET水平,报道如下。

1 研究对象和方法

1.1 研究对象

经临床、B超、CT、MRI检查确诊的肝硬化42例,男28例,女14例,平均年龄48.2岁;原发性肝癌患者8例,男7例,女1例,平均年龄42.5岁。正常对照组25例,均系本院健康献血员,平均年龄31.2岁。

1.2 标本采集

患者于清晨空腹时自肘静脉采血10 ml,其中3 ml置于酶抑制试管(内含抑肽酶500 KIU,10%EDTANa$_2$ 50 μl),离心取血浆置于-20℃冰箱保存待测,另7 ml送检作常规肝功能检查。

1.3 研究方法

ET药盒由解放军总医院提供。利用放射免疫法测定ET含量,仪器为FJ2008型γ免疫计数器。肝功能测定用全自动生化测定仪进行。用B超检查测量门静脉、脾静脉的宽度。

1.4 数据处理

数据均以$\bar{x}\pm s$表示,使用本校数学教研室编制的医用统计分析软件进行t检验及相关分析。

2 结果

肝硬化、肝癌患者血浆ET水平及肝功能、门静脉、脾静脉宽度见附表。

附表 肝硬化、肝癌组血浆ET、肝功能水平及门、脾静脉宽度($\bar{x}\pm s$)

组 别	例数	ET(ng/L)	白蛋白(g/L)	胆红素(μmol/L)	门静脉宽度(mm)	脾静脉宽度(mm)
对照组	25	56.2±6.3	—	—	—	—
肝癌组	8	115.4±31.2*	33.2±2.2	24.3±7.8	10.2±1.5	6.3±1.7
肝硬化组	42	80.35±24.3*	30.5±3.4	23.7±6.3	13.4±2.6	9.2±2.4

*:与对照组比较 $P<0.01$

肝硬化、肝癌组血浆ET水平均较对照组显著升高($P<0.01$),肝癌组显著高于肝硬化组($P<0.05$)。经相关分析发现在肝硬化组ET与门、脾静脉宽度呈现显著正相关($r=0.821$、0.834、$P<0.05$),与血清白蛋白呈显著负相关($r=-0.721$,$P<0.05$),与总胆红素呈显著正相关($r=0.8712$,$P<0.01$)。在肝癌组ET与白蛋白、胆红素及门、脾静脉宽度间无显著相关性。

3 讨论

内皮素最先是在猪主动脉内皮细胞培养上清液中发现的。人内皮素初始合成时为含203个氨基酸的内皮素原,后降解为38个氨基酸的大内皮素,再经特殊裂解酶加工为含21个氨基酸的内皮素活性形式[2]。内皮素受体不仅存在于心血管系统,也广泛存在于肝、肺、肾等器官。肝硬化患者血浆ET水平增高的原因可能是:在肝硬化时,肝细胞除不断变性坏死外,部分肝细胞增生,肝内血管重建,增生的血管内皮细胞合成、分泌ET的能力增加,同时肝硬化再生结节压迫肝窦,使肝细胞、内皮细胞缺血、缺氧,致ET的合成、分泌增加。我们研究表明,在肝硬化时,血浆ET水平与白蛋白呈显著负相关,与胆红素呈正相关,提示ET与肝功能状态有一定关系。肝门静脉、脾静脉对ET非常敏感[3],ET可使门静脉收缩,加重门脉高压。从我们的结果可以看出,ET与门静脉、脾静脉宽度呈正相关,门、脾静脉越宽,门脉高压越重,ET水平越高,提示ET可能参与了门脉高压的形成。

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

肝癌患者ET水平增高，除部分肝癌患者伴有肝硬化而致ET升高外，可能还因为肝癌组织中肿瘤血管增生活跃，新生的血管内皮细胞合成和分泌大量的ET。Nakamuta等[4]测定了肝癌及肝硬化组织匀浆的ET含量分别为0.50±0.38 ng/g蛋白和0.40±0.28 ng/g蛋白，同血浆水平变化一致，肝癌组ET水平高于肝硬化组，且肝癌直径越大，ET越高，但与AFP无相关性。至于ET与肝硬化、肝癌的确切关系，ET是否可作为肝癌的标志物有待于进一步研究。

关键词 肝硬化；肝肿瘤；内皮素

中图法分类号 R575.2

参考文献

1 Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S *et al*. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. Nature, 1988; 332: 411

2 Sawamura T, Kimura S, Shinmi O *et al*. Analysis of endothelin-related peptides in culture supernatant of porcine aortic endothelial cells: Evidence for biosynthetic pathway of endothelin-1. Biochem Biophs Res Commun, 1989; 162: 1287

3 Mustafa SB, Ganshi CR, Harvey SAK *et al*. Endothelin stimulates platelet-activating factor synthesised by cultured rat Kupffer cells. Hepatology, 1995; 21(2): 545

4 Nakamuta M, Ohashi M, Tabata S *et al*. High plasma concentrations of endothelin-like immunoreactivities in patient with hepatocellular carinoma. Am J Gastroenterol, 1993; 88(2): 248

（收稿：1995-08-10；修回：1996-02-20）

（编辑 冯崇英）

肝细胞的直接分离与培养

The direct separation and culture of liver cell

吴喜贵 许森水 （第三军医大学基础部生物化学教研室）重庆，630038

肝细胞的分离、培养是细胞生物学和细胞工程的必需技术。亦广泛应用于生物化学、分子生物学和药理学等方面的研究中。传统的肝细胞分离方法是采用含胶原酶的缓冲液对肝脏进行原位灌注。我们在研究工作中建立一种用不含胶原酶的无钙离子的Hank's溶液对大鼠进行肝脏原位灌注直接分离肝细胞的方法，本方法制备的细胞用于培养和实验获得相当满意的结果，现总结如下。

1 材料与方法

1.1 材料

Wistar雄性大鼠150～180 g，由本校动物饲养中心提供。LDB-M电子恒流泵。尼龙布(200目)。其余试剂为AR级。

1.2 方法

1.2.1 大鼠肝脏原位灌注 大鼠乙醚麻醉后，打开腹腔行肝门静脉插管，用37℃无钙离子的Hank's缓冲溶液(含0.1% BSA；500 U/ml肝素)pH7.4，用电子恒流泵进行肝脏原位灌注，待肝脏表面湿润变软呈现淡黄色均匀纹理时停止灌注。

1.2.2 肝细胞的分离 摘取灌注后的肝脏置于小烧杯内，在冰浴中用组织镊轻轻挤压，然后加适量的0.1%BSA Krebs-Ringer碳酸盐缓冲液pH7.4，轻轻摇动，200目尼龙布过滤以去除肝组织块。细胞滤液用50× *g* 离心60 s，弃上清，细胞再用同样条件洗2～3次，尽量除去细胞碎片及杂质。最后用Krebs-Ringer碳酸盐通过冲液制成一定浓度的细胞悬浮液备用。

1.2.3 原代肝细胞培养 制备的肝细胞按常规的细胞培养的方法进行，以1640增养基为介质，于37℃ CO_2孵箱中培养生长。6 h后换第一次培养基，以后每24 h换一次培养基。

1.2.4 肝细胞胰岛素受体结合试验按文献[1]方法操作。

2 结果

采用不含胶原酶的Hank's溶液原位灌注大鼠肝脏，直接分离的细胞显微镜下观察其形态完整，分散度好(见图1)。台盼蓝排异试验细胞成活率平均为84.4%($n=5$)。细胞产率大约为(7～10×10^6个/g(湿重)。用1640培养基培养细胞，6 h可见细胞完全贴壁，24 h后细胞大量生长(见图2)。正常大鼠肝细胞胰岛素受体结合试验，Scatchard作图分析为一条凹面向上的曲线(见图3)，其最大结合率(B/T%)平均为25.06±0.52；最大结合容量(RO)平均为18.6×10^{-9} mol/L。

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