肺损伤时碱性成纤维细胞生长因子的变化及前列环素的作用

刘国建 王正国 朱佩芳 （第三军医大学 野战外科研究所）630042

提 要 本文报道应用核酸分子杂交、碱性成纤维细胞生长因子（bFGF）分离纯化和活性检测方法，研究肺损伤时前列环素（PGI_2）治疗肺损伤时bFGF的变化。实验发现：正常犬肺组织内没有具有生物活性的bFGF，亦检测不到bFGF mRNA。肺损伤后肺组织内可检出bFGF活性和bFGF mRNA。PGI_2治疗肺损伤时bFGF活性略有增高，bFGF mRNA含量明显增高。研究结果提示肺损伤后肺bFGF mRNA增加，前列环素影响bFGF的表达。bFGF可能在肺损伤后组织修复过程中起着重要作用。

关键词 肺/损伤；肺疾病/治疗；基因表达调节；纤维母细胞生长因子；前列腺素X类；DNA；RNA；核酸杂交

碱性成纤维细胞生长因子（Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF）是一种对中胚层来源细胞（如成纤维细胞、血管内皮细胞）有促增殖活性的生长因子[1]。已有研究表明bFGF参与组织的再生与修复过程[2]。目前有关肺损伤时bFGF变化的报道甚少。本文应用犬油酸性肺损伤模型研究肺损伤时bFGF的变化，并观察前列环素（PGI_2）治疗肺损伤时对bFGF变化的影响，以探讨bFGF在肺损伤后组织修复过程中的地位和作用。

1 材料与方法

1.1 动物致伤

22只健康成年家犬，性别不拘，体重22.4±1.8kg，随机分为3组。正常对照组6只，肺损伤组8只和肺损伤加PGI_2治疗组8只。所有动物经静脉注射3%戊巴比妥钠麻醉，行颈动脉、肺动脉和股动脉插管。肺损伤组按0.1ml/kg体重的剂量由肺动脉缓慢注入油酸致伤。肺损伤加PGI_2治疗组按同样方法致伤后，立即由肺动脉滴入PGI_2（20ng/min/kg体重），持续2.5h。观察6h后，放血活杀，取肺组织标本分离bFGF。

1.2 bFGF的分离与检测

按已往报道的方法[3]分离肺组织中的bFGF。采用NIH3T3细胞^{3}H-TdR掺入法和内皮细胞增殖法测定bFGF活性。每个活性单位为最大刺激3T3细胞^{3}H-TdR掺入的半数剂量。

1.3 bFGF探针的制备和标记

bFGFcDNA探针（美国、Abraham博士惠赠）大小约0.5kb，连接于PBR 322质粒EcoRI位点上[4]。将含bFGF cDNA的质粒转化大肠杆菌（HB101），经扩增、碱法抽提、Sepharose 2B层析纯化、酶切后，低溶点琼脂糖电泳回收bFGF cDNA。采用缺口平移法（nick translation）将bFGF cDNA行^{32}P标记，获得α-^{32}P-bFGF cDNA探针。

1.4 斑点杂交

采用盐酸法分离肺组织RNA[5]。将RNA点到硝酸纤维素膜上预杂交后，42℃杂交24h（杂交液为50%甲酰胺、4×SSC、1×Denhardt's液、2mmol/L EDTA、0.1%SDS、20mmol/L NaH_2PO_4、100μg/ml鱼精DNA和1×10^7cpm/ml探针）。杂交后硝酸纤维素膜用2×SSC（含0.1% SDS），50℃充分漂洗，放入X片匣内作放射自显影，于-40℃，放置7d后冲洗。显影结果用密度计测定密度值。

2 结 果

2.1 bFGF的分离与检测

各组动物肺组织标本经Heparin-Sepharose层

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

析时见损伤组和损伤加PGI_2治疗组在1.5～2.0mol/L氯化钠浓度洗脱区有洗脱峰。对照组未见有1.5～2.0mol/L氯化钠浓度洗脱峰。bFGF活性单位，在损伤组为92.4±3.5u/g肺组织，损伤加PGI_2治疗组为94.3±5.1u/g肺组织。对照组未检出bFGF活性。添加bFGF的内皮细胞数目在培养7 d后比对照组增加10倍以上。不同处理方法对bFGF活性的影响见表1。Heparin-Sepharose层析用<1.5 mol/L氯化钠浓度洗脱和加热后，bFGF活性明显降低。Sepharose 2B和Sepharose 4B层析不影响bFGF活性。各组动物肺组织中bFGF分离、纯化结果见表2。纯化倍数为378倍。

表1 各种处理方法对bFGF活性的影响

处理方法	处理后保留活性的百分数(%)
Heparin-Sepharose	5.8
Sepharose 2B	87.6
Sepharose 4B	88.4
90℃ 10min	5.3

表2 肺组织 bFGF 纯化结果

步骤	组别	蛋白 (μg) $\bar{x}\pm s$	3T3细胞 ^{3}H-TdRcpm $\bar{x}\pm s$	活性 (cpm/μg)	回收率 (%)	提纯倍数
硫酸胺提取	对照	5600±780	$6.2\times10^2\pm162$	0.1	100	
	损伤	6831±615	$2.5\times10^5\pm1756$	3.7×10	100	1
	治疗	7354±893	$2.8\times10^5\pm2013$	3.8×10	100	1
CM-sephadex	对照	310±24	$5.9\times10^2\pm234$	1.9	95	
	损伤	390±46	$3.1\times10^4\pm4243$	8.0×10	13	2
	治疗	443±59	$4.0\times10^4\pm5238$	9.0×10	14	2
Heparin-Sepharose	对照	0	0	0	0	
	损伤	0.34±0.13	$4.4\times10^3\pm851$	1.4×10^4	2	378
	治疗	0.34±0.18	$4.8\times10^3\pm658$	1.4×10^4	2	378

2.2 RNA斑点杂交

本实验中制备的^{32}P-bFGFcDNA探针(放射比活为1×10^7cpm/μgDNA。^{32}P的掺入率为32.4%)可检测出10pg的同源性cDNA。损伤组和PGI_2治疗组动物肺组织可检出bFGF mRNA，对照组未检出（图1、图2）。对比损伤组和PGI_2治疗组动物RNA杂交结果，见PGI_2治疗组bFGFmRNA的量约为损伤组的1.5倍（图3）。

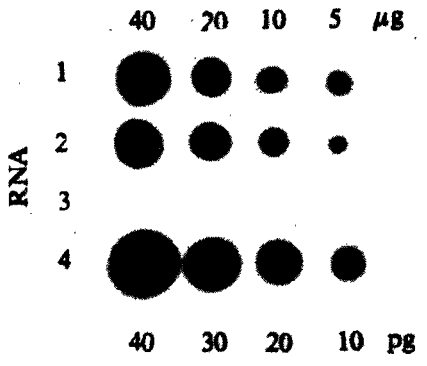


图1 损伤组动物肺组织bFGFmRNA表达

1、2为实验标本；3为对照；4为bFGFcDNA

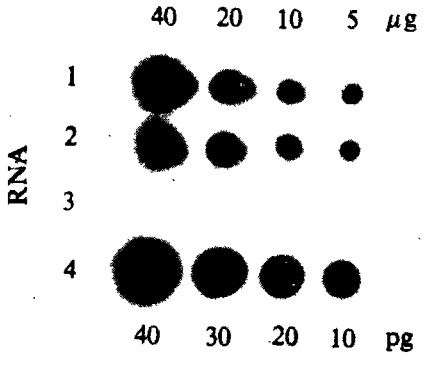


图2 PGI_2治疗组动物肺组织bFGFmRNA表达

1、2为实验标本；3为对照；4为bFGFcDNA

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

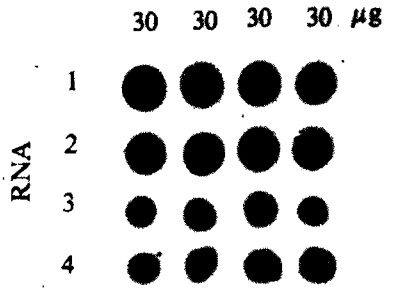


图3 损伤组与治疗组bFGFmRNA含量比较

1、2为PGI_2治疗组；3、4为未用PGI^2治疗组

3 讨 论

现有研究表明bFGF具有促进损伤组织再生、修复的作用[1][2]。然而，目前人们对bFGF生物学特性的认识多来自体外实验结果。机体内bFGF的生理作用以及bFGF调节紊乱与疾病的关系尚未完全明确。bFGF主要分布于从中胚层和外胚层分化而来的组织中。内胚层分化的组织中bFGF含量极少，不易检出。本研究结果表明肺损伤后肺组织中可检出bFGF，其依据为：（1）Heparin-Sepharose层析见有1.5～2.0mol/L氯化钠浓度洗脱峰；（2）促血管内皮细胞增殖；（3）不耐热；（4）与肝素的高度亲合性。正常肺组织未检出bFGF。研究结果提示bFGF可能参与肺损伤后的肺组织再生复修过程，同时还发现肺损伤后的肺组织可检出bFGFmRNA，而正常动物肺组织中未检出bFGFmRNA，表明肺损伤后bEGF的变化与转录水平的调控发生变化有一定关系，并进一步观察到应用PGI_2治疗的动物的bFGFmRNA含量明显高于未用PGI_2治疗动物的bFGFmRNA。肺损伤后PGI_2的变化已有较多研究。一般认为肺损伤后肺组织内或血液中PGI_2的含量增加，PGI_2起着抑制血小板聚集、扩张血管、维持正常血液动力学的作用。然而，亦有报道肺损伤后PGI_2增高与动物的存活时间呈负相关[6]。PGI_2及其类似物并不能改善实验动物的血液动力学紊乱和提高存活率[7]。因此，PGI_2在肺损伤病理变化过程中的作用还不十分清楚。本实验从基因转录表达的角度观察到PGI_2治疗肺损伤时bFGFmRNA的变化，提示肺损伤PGI_2的变化可能影响bFGFmRNA的转录表达。血管内皮细胞是主要的PGI_2合成细胞之一。体外实验发现bFGF促进血管内皮细胞增殖的同时抑制内皮细胞的PGI_2合成过程[8]。bFGF与PGI_2之间可能存在相互调节的关系。当bFGF增多时PGI_2的合成受到抑制，而PGI_2增多则可能反馈调节促使bFGF合成增多，促进组织损伤后的修复过程。然而由于PGI_2是一种具有多种生物活性的物质，它对bFGFmRNA含量的影响是其直接们用结果还是间接作用结果还难以确定，加之目前对bFGFmRNA转录表达的调控机理了解极少，因此肺损伤后PGI_2对bFGFmRNA影响的详尽过程是有待进一步研究的课题。

参 考 文 献

1. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L. Structural characterization and biological function of fibroblast growth factor. Endocr Rev 1987;8:95
2. Rifkin D, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. J Cell Bio 1989;109:1
3. 刘国建 王正国 朱佩芳，等。油酸性肺损伤时纤维细胞生长因子的变化。生物化学和生物物理进展 1990;17:215
4. 刘宗正。分子生物学在医学中的应用。北京：科学出版社 1986;39
5. Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, et al. Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. EMBO J 1986;5:2523

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

6. 胡 森 陆熙昶。山羊内毒素休克肺损伤时血栓素A_2和前列环素的变化。中华结核和呼吸杂志 1990;13:15
7. Smith EF, Tempel GE, Wise WC, et al. Experimental endotoximia in the rat, efficacy of prostacyclin or the prostacyclin analong -iloprost. Circ Shock 1985;16:1
8. Hasegawa N, Yamamoto M, Yamamoto K. Stimulation cell growth and inhibiton of prostacyclin production by heparin in human umbilical vein endothelial cells. J Cell Physilo 1988;137:603
(收稿: 1991-04-26;修回: 1992-02-10)

The effects of prostacyclin on the changes of basic fibroblast growth factor after lung injury in dogs

Liu Guojian, Wang Zhengguo, Zhu Peifang (Research Institute of Field Surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract The separation, purification and activity determination of basic fibroblast growth factor (bFGF) with nucleic acid molecular hybridization was described and the changes of bFGF in lung injury treated with prostacyclin were observed. It was found that bioactive bFGF and bFGF-mRNA could only be found in the injured lung tissues but not in the normal lungs. Administration of prostacyclin could slightly elevate the activity of bFGF and signficantly increase the level of bFGF-mRNA.

The findings of this study suggest that there is an increase of bFGF level after lung injury, prostacyclin can influence the expression of bFGF, and bFGF plays an important role in the repair of the injured lung tissues.

Key words lung/IN; lung disease/TH; gene expression regulation; fibroblast growth factor; prostaglandin X; DNA; RNA; nucleic acid hybridization

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net