DOI:10.16016/j.1000-5404.1991.05.003

人胎肝再生刺激物质对大鼠中毒性肝坏死的治疗作用*

周 平 向居正 李奇芬 胡仕琦 （第三军医大学西南医院 传染科）630038

提 要 本文报道了人胎肝再生刺激物质（h-HSS）、人胎肝胞溶质（h-FLC）对D-氨基半乳糖中毒大鼠的存活率和肝功能的影响，和对h-HSS的理化性质及其分子量进行了初步分析与测定。结果发现：h-HSS和h-FLC均能显著提高中毒大鼠的存活率；显著降低其血清OCT和m-AST活性；提高HPT-A及促进^{3}H-TdR掺入肝内DNA的速率。加热95℃、30min，h-HSS仍保留其活性，而经胰蛋白酶处理后，其活性丧失。在SDS-PAGE上，h-HSS显示1条主带和3条次带，各带分子量依次为1.5、2.4、3.4和4.0万道尔顿，主带相对含量占47.57%。

关键词 肝再生刺激物质；胎肝胞溶质；人胎肝；中毒性肝坏死；D-氨基半乳糖

1975年LaBrecque等[1]首先从断乳鼠肝中提取到一种能刺激肝细胞分裂和增殖的物质，并命名为肝再生刺激物质（Hepatic Stimulator Substance，HSS）。进一步研究发现HSS对肝细胞增殖和再生的刺激作用有专一性，对损伤的肝脏的刺激作用尤为显著。在人或动物的胚胎肝中也存在HSS，并能成功地提高药物性肝衰竭大鼠的存活率[2]，h-HSS能促进小白鼠及34%肝叶切除大鼠的肝细胞DNA合成增加2～3倍[3]。我们从人胎肝中粗提HSS，利用D-氨基半乳糖（D-Gal）诱发大鼠中毒性肝坏死模型，通过观察人胎肝HSS（h-HSS）对中毒大鼠存活率和肝功能的影响，并与人胎肝胞溶质（h-FLC）进行比较，以探讨h-HSS对肝损伤的治疗作用及其作用机理。并对其理化性质和分子量进行初步分析。

1 材料和方法

全部实验用Wistar大鼠，雌雄各半，体重198±23g，腹腔内注射10%D-Gal溶液诱发中毒性肝坏死。在观察h-HSS对中毒大鼠存活率的实验中，D-Gal的剂量为1.6g/kg；在观察h-HSS对中毒大鼠肝功能和肝DNA合成影响的实验中，D-Gal的剂量为1.0g/kg。

1.1 h-HSS、h-FLC和h-HSS酶处理液（h-HSS酶液）的制备

按Fleig等[4]的方法制备h-HSS。将人胎肝（取自水囊引产4.5～6个月正常胎儿）按35%（w/v）加冷生理盐水制成肝匀浆，加热95℃、30min，4℃离心，100 000×g，90min，取上清。按上述方法将人胎肝制成肝匀浆后，4℃离心，11 000×g，60min，取上清制备h-FLC。用CBB-SDS法测定其蛋白质含量，h-HSS为0.8mg/ml，h-FLC为18mg/ml。参照Fleig[5]和Morley[6]的方法，用胰蛋白酶处理h-HSS制备h-HSS酶液。

1.2 实验过程

1.2.1 存活率观察 取大鼠64只，随机分为4组，各组于注射D-Gal后20h开始分别注射h-HSS、h-FLC、h-HSS酶液及生理盐水，剂量均为4ml/只，连续观察10d。另取10只大鼠，腹腔内注射等量生理盐水作为正常对照组。

1.2.2 h-HSS和h-FLC对中毒大鼠肝损伤和肝储备功能的影响 取大鼠72只，随机等分为8组，各组于注射D-Gal后20h开始分别注射h-HSS、h-FLC和生理盐水，剂量均为4ml/只。在中毒后12h、24h、48h和72h每组任取6只，检测血清鸟氨酸氨甲酰转移酶（OCT，用比色法）、血清天冬氨酸转氨酶线粒体同工酶（m-AST，用化学抑制法）及肝促凝血活酶活动度（HPT-A），同时取小块肝组织作病理学检查。

1.2.3 h-HSS、h-FLC对中毒大鼠肝DNA合成的影响 大鼠分组和处理同实验过程1.2.2。^{3}H-TdR按150 μCi/kg体重一次腹腔内注射，2h后打开腹腔，取一定量的肝组织作^{3}H-TdR掺入肝内DNA含量测定。

*国家自然科学基金资助课题

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

1.2.4 h-HSS的分子量测定　参照Laemmli等[7]的方法，采用SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）。浓缩胶浓度为3.2%，分离胶浓度为15%，凝胶用考马斯亮兰R-250进行染色。

1.3 统计学处理

各组间存活率比较用χ^2检验，各均数组间差异用Student's t检验。

2 结　果

2.1 存活率

中毒后第3天，h-HSS组和h-FLC组大鼠存活率分别为68.75%和56.25%。而h-HSS酶和生理盐水组仅为18.25%（$P<0.05$）。中毒后第10天，h-HSS组为62.5%，h-FLC组为56.25%，h-HSS酶溶组则为12.5%（$P<0.01$～$P<0.05$）。正常对照组全部存活（见图1）。

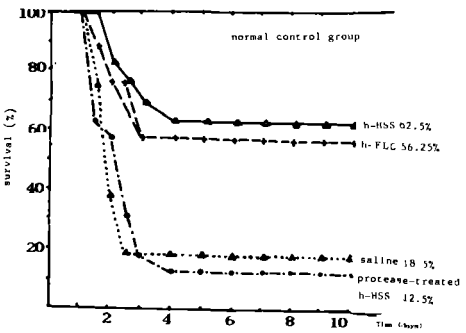


图1　h-HSS和h-FLC对中毒大鼠存活率的影响

Fig. Effect of h-HSS and h-FLC on survival of toxic rat

2.2 h-HSS和h-FLC对中毒大鼠血清OCT、m-AST和HPT-A的影响

在中毒后48h和72h，h-HSS组和h-FLC组大鼠血清OCT和m-AST活性显著或非常显著低于生理盐水组（$P<0.05$或$P<0.01$），而HPT-A则相应显著或非常显著高于生理盐水组（$P<0.05$、$P<0.01$或$P<0.001$）。在中毒后48h，h-HSS组的HPT-A也非常显著高于h-FLC组（$P<0.01$）（见附表）。

附表　h-HSS和h-FLC对中毒大鼠OCT、m-AST及HPT-A的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab. Effects of h-HSS and h-FLC on serum level of OCT and m-AST and HPT-A（$\bar{x}\pm s$）

Group	hour	number of rats	OCT (IU/L/min)	m-AST (IU/L)	HPT-A (%)
Normal control	—	14	4.5± 4.3	10.5± 6.6	150 ±31.7
h-HSS	12	6	141.7±54.0	37.6± 9.2	42.7±23.8
h-FLC	12	6	140.3±47.9	37.0±13.0	39.2±10.9
saline	12	6	145 ±49.8	34.6± 8.4	42.0±14.9
h-HSS	24	6	113.9±28.4	52.5±18.2	41.4± 6.0
h-FLC	24	6	104.1±36.2	58.3±25.6	40.4± 6.6
saline	24	6	127.6±29.4	69.2±22.7	38.2±11.3
h-HSS	48	6	85.4±22.5**	70.6±32.1*	71.1±20.4***ΔΔ
h-FLC	48	6	92.3±24**	86.3±30.5*	40.7± 9.5
saline	48	6	132 ±24	178 ±92.9	15.4±16.5
h-HSS	72	6	27.5±10.6*	28.7± 8.9**	123 ±24.4**
h-FLC	72	6	26.6±12.7*	35.9±16.2*	108 ±30.8*
saline	72	6	50.5±22.5	91.2±40.6	69.2±30.3

Note to the table: *means $P<0.05$, **$P<0.01$ and ***$P<0.001$ as compared with the value of the saline group.

ΔΔm　$P<0.01$ as compared with the value of the h-FLC group.

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

2.3 h-HSS和h-FLC对中毒大鼠肝DNA合成的影响

中毒后48h和72h，h-HSS组和h-FLC组大鼠肝DNA合成速率均非常显著高于生理盐水组（$P<0.01$或$P<0.001$），而前两组之间无显著差异（$P>0.05$）（见图2）。

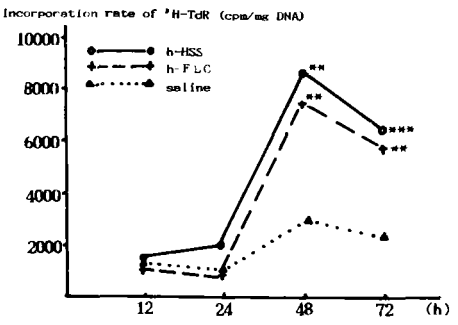


图2 h-HSS和h-FLC对中毒大鼠肝DNA合成的影响

Fig.2 Effect of h-HSS andh-FLC on liver DNA synthesis

Note. $^{**}P<0.01$. $^{***}P<0.001$ compared with saline group

2.4 病理组织学检查

中毒后12h，各组肝细胞肿胀和胞浆疏松化明显，小叶周围可见点状或灶性坏死，3组病变程度大致相同。中毒后48h，生理盐水组肝细胞高度肿胀、气球样变明显，并见大片状坏死和弥漫性炎性细胞浸润。h-HSS组和h-FLC组仍以细胞肿胀变性和少量炎性细胞浸润为主，双核细胞和核分裂相易见。

2.5 h-HSS的理化性质

经加热95℃、30min处理后的h-HSS仍能显著提高中毒大鼠的存活率，保留其生物活性，而经胰蛋白酶消化后其生物活性完全丧失。在SDS-PAGE上，h-HSS显示1条清晰的主带和3条次带，各带的分子量依次为1.5、2.4、3.4和4.0万道尔顿，主带相对含量为47.57%。h-FLC除显示有h-HSS所含的区带外，还显示出许多杂带。

3 讨 论

部分肝切除术后的再生肝、断乳鼠肝脏与人胎肝的胞溶质以及肝细胞培养上清液等，均能显著提高急性肝衰竭动物的存活率[8-9]。沈耕荣等报道[11] 8例重型病毒性肝炎病人经人胎肝细胞静脉输注治疗后，6例痊愈。虽然这些疗效的机理尚未完全阐明，但多数学者认为可能与肝细胞中所含的HSS有关。文献报告[12][13]在肝功能衰竭和行部分肝叶切除术后的病人的血清中也发现有HSS的存在。我们发现h-HSS和h-FLC均能显著提高D-Gal中毒大鼠的存活率，提示h-HSS和h-FLC对D-Gal引起的大鼠中毒性肝坏死有治疗作用。

我们发现D-Gal中毒后12h，大鼠血清OCT和m-AST的活性均显著增高，而HPT-A则显著降低，经腹腔注射h-HSS或h-FLC后28h和52h（即中毒后48h和72h）血清OCT和m-AST活性显著或非常显著地低于生理盐水组，而HPT-A则相应非常显著地高于生理盐水组，说明h-HSS和h-FLC均有阻止肝细胞损伤和改善肝储备功能的作用。肝组织学检查也证实了这一点。据报道，大鼠在肝部分切除后72h，其残余肝摄取氨基酸的能力明显增强[14]，而切除后18h～36h，残余肝内即含有丰富的HSS[1][5]。提示HSS能促进肝脏蛋白质合成代谢，但HSS能否阻断D-Gal引起的肝细胞坏死，还需进一步证实。

HSS在体外能刺激不同种属动物肝细胞DNA合成，已被许多学者所证实。本实验发现，中毒大鼠注入h-HSS或h-FLC后28h和52h，^{3}H-TdR掺入其肝内DNA含量非常显著高于生理盐水组。提示h-HSS和h-FLC在体内对损伤的肝细胞的DNA合成也有明显的刺激作用。两者促进中毒大鼠肝DNA合成的速率，在给药后48h达高峰，从时间上看，与两者的降酶时间基本一致。提示通过再生的肝细胞迅速恢复肝脏功能可能是h-HSS和h-FLC发挥治疗作用的主要机理。在整个实验过程中，h-HSS和h-FLC效疗无显著差别，说明h-FLC的治疗

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

作用与其所含的h-HSS有关。

目前国内外对HSS理化性质及其分子量的研究报道较多，并证实HSS具有耐热性、组织器官特异性和种属非特异性，活性成份为蛋白质[1][4][15]。但研制的HSS均来自大鼠等动物肝脏。我们发现h-HSS经加热95℃、30min后仍保留生物活性，而经胰蛋白酶处理后的h-HSS，不能提高中毒大鼠的存活率，提示h-HSS的有效成份系蛋白质。在SDS-PAGE上，h-HSS显示1条主带和3条次带，分子量依次为1.5、2.4、3.4和4.0万道尔顿，主带相对含量为47.57%，与文献报道基本一致[4][15]。

参考文献

1. LaBrecque DR and Pesch LA. Preparation and partial characterization of hepatic regenerative stimulator substance (ss) from rat liver. J Physiol 1975;248(2):273～284
2. 姚志强 杨为松 张文彬，等。肝再生刺激因子对D-半乳糖胺所致大鼠急性肝功能衰竭存活率的影响。中华传染病杂志 1990;8(2):88～91
3. 姚志强 张文彬 陈勇，等。人胎肝再生刺激因子的提纯及活性测定。第四军医大学学报 1989;8(1):1～4
4. Fleig WE and Hoss G. Partial purification of rat hepatic stimulator substance and characterization of action on hepatoma cell and normal hepatocytes. Hepatology 1989;9(2):240～248
5. Fleig WE, Lehmann H, Wagner H, at al. Hepatic regeneration stimulator substance in the rabbit relation to liver regeneration after partial hepatectomy. J Hepatology 1986;3(1):19～26
6. Morley CGD and Kingdon HS. The regulation of cell grownth. Part 1, Identification and partial characterization of DNA synthesis stimulating factor from the serum of partially hepatectomized rats. Biochem Biophys Acta 1973; 308(2) :260～275
7. Laemmli UK, Favre M. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA pac kingevents. J Mol Biol 1973;80:525～599
8. Ohkawa M, Hayashi H, Chaudry IH, et al. Effect of regenerating liver cytosol on drug-induced hepatic failure. Surgery 1985;97(4):455～462
9. 徐 柯 陈九莉 哈团柱。人胎肝细胞液对大鼠实验性急性肝功能衰竭的治疗作用。江苏医学 1988;14(2):650～652
10. O'Neill PL, Baumgartner D, Leweis WI, et al. Cell-free supernatant from hepatocyte culture improve survival of rats with chemically induced acute liver failure. J Surg Res 1982;32(4):347～359
11. 沈耕荣 谢 青 周霞秋，等。人胎肝细胞移植治疗重症肝炎的初步研究。上海第二医科大学学报 1988;8(1):1～4
12. Kubo S, Matsui Yuasa I, Otani S, et al. Characterization of liver regeneration stimulatory factor in human portal serum. Am J Gastroenterology 1988;83(10):1103～1107
13. Tsubouchi H, Hirono S, Gohda E, et al. Clinical significance of human hepato-

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

cyte growth factor in blood from patients with fulminant hepatic failure. Hepatology 1989;9(6):875～881

14. 徐 柯 陈九莉 苗 凯，等。大鼠肝部分切除后血清氨基酸的代谢变化。中国病理生理杂志 1988;4(3):165

15. LaBrecque DR, Steels G, Fogerty S, et al. Purification and physical-chemical characterization of hepatic stimulator substance. Hepatology 1987;7(1):100～106

(收稿：1990.06.15；修回：1991.01.21)

Effects of human fetal hepatic stimulator substance on D-galactosamine-induced liver necrosis in rats

Zhou Ping, Xiang Juzheng, Li Qifen, et al (Department of Infectious Diseases, Southwest Hospital, Third Military Medical College, Chongqing 630038)

Abstract The effects of human fetal hepatic stimulator substance (h-HSS) and liver cytosol (h-FLC) on the survival rate, the intensity of liver damage, and liver regeneration in rats with liver necrosis induced with D-galactosamine were observed. The physico-chemical properties of h-HSS were preliminarily determined.

It was found that both h-HSS and H-FLC could markedly increase the survival rate of the rats with toxic liver necrosis, significantly decrease the serum level of ornithine carbamoyl transferase and mitochondria aspartic transaminase, improve the hepaplastin activity, and elevate the incorporation rate of ^{3}H-thymidine with liver DNA. h-HSS was stable after heated to 95° C for 30 minutes, and sensitive to trypsin treatment. It demonstrated one major band at 15 000 daltons and 3 minor ones at 24 000, 34 000, and 40 000 daltons respectively on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The relative content of the major band was 47.57%.

Key words hepatic stimulator substance; cytosol; human fetal liver; toxic liver necrosis; D-Gal

---

(上接420页)

瘤[1]。肿瘤组织的显微镜观察，主要由原始粒细胞及早幼粒细胞构成，中幼、晚幼粒细胞较少[2]。绿色瘤的死亡率极高，一般在数周及半年内死亡。临床表现有发热、头痛，眼球突出，肿胀等。在周围血象改变之前，往往先出现一些骨质改变，所以X线检查对早期诊断有重要价值。最易受累的是颅骨，特别是眼眶骨质破坏和明显的眼球突出，为其特征性表现[3]。其它骨骼如脊柱、肋骨、骨盆等亦易受累。本例主要为双上颌窦、双眶骨质破坏，顶骨破坏轻微，其它部位未摄片。破坏特点为骨质疏松、模糊、毛刷状、网织状等不规则改变，与文献记载类似。入院后用HOCP方案治疗，疗效不明显，两周后家属要求而出院。

关键词 绿色瘤，X线诊断

参 考 文 献

1. 李景学，主编。骨关节X线诊断学。北京：人民卫生出版社，1987:451

2. 袁树南。绿色瘤两例。中华医学杂志 1958；7:710

3. 上海第一医学院。X线诊断学。第2版。上海：上海科技出版社，1986:595

(收稿：1991.01.22；修回：1991.07.18)

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