

• 论著 •

改构型酸性成纤维细胞生长因子对肠缺血-再灌注的保护作用

孙同柱 付小兵 陈伟 郑曙云 翁立新 赵京禹 黎君友 孙丹

【摘要】目的 观察改构型酸性成纤维细胞生长因子(rhaFGF)对大鼠肠缺血-再灌注所致肠道损伤的保护作用。**方法** 用夹闭肠系膜上动脉(SMA)造成肠缺血 45 min、松夹形成缺血-再灌注的方法制备肠缺血-再灌注损伤模型。生理盐水对照组和 rhaFGF 治疗组于再灌注即刻分别经静脉注射生理盐水 0.1 ml 和 rhaFGF 4 μ g。缺血-再灌注后 2、6、12 和 24 h 取血及小肠组织,分别测定 D-乳酸含量,观察小肠组织学改变;用末端脱氧核糖转移酶介导的生物素化脱氧尿嘧啶缺刻标记技术(TUNEL)检测肠道细胞凋亡率,并与假手术组比较。**结果** 缺血-再灌注 6 h 生理盐水对照组 D-乳酸含量较假手术组明显升高,达到(0.34 \pm 0.09)mg/L, rhaFGF 治疗组为(0.23 \pm 0.07)mg/L(P 均 $<$ 0.05)。组织学检查显示,缺血-再灌注 2~24 h 生理盐水对照组肠道损伤严重, rhaFGF 治疗组肠道损伤有所减轻。细胞凋亡检测显示,假手术组肠道细胞凋亡率很低;随着缺血-再灌注损伤时间的延长,生理盐水对照组和 rhaFGF 治疗组细胞凋亡率均明显升高,于缺血-再灌注 12 h 达峰值[生理盐水对照组细胞凋亡率高达(62.8 \pm 1.7)%],而 rhaFGF 治疗组为(42.5 \pm 2.6)%]后均呈下降趋势,两者各时间点均有统计学差异(P 均 $<$ 0.05)。**结论** rhaFGF 能降低大鼠肠缺血-再灌注所致的血浆 D-乳酸含量和肠道细胞凋亡率,提示对肠道损伤有一定的保护作用。

【关键词】 酸性成纤维细胞生长因子; 缺血-再灌注损伤; 小肠; D-乳酸; 细胞凋亡

Protective effects of modified recombinant human acidic fibroblast growth factor on small intestine after ischemia/reperfusion injury in rats SUN Tong-zhu, FU Xiao-bing, CHEN Wei, ZHENG Shu-yun, WENG Li-xin, ZHAO Jing-yu, LI Jun-you, SUN Dan. Key Laboratory of Wound Repair, 304 th Clinical Department of General Hospital of PLA, Beijing 100037, China

【Abstract】Objective To explore the protective effect of modified recombinant human acidic fibroblast growth factor (rhaFGF) on small intestine after ischemia/reperfusion(I/R) injury in rats. **Methods** The clamp on the superior mesenteric artery(SMA) was removed after clamping it for 45 minutes to replicate I/R injury of the intestine in the rat. Rats were then divided randomly into sham operation group, normal saline treatment group and rhaFGF treatment group, in which the rats of the normal saline treatment group were injected 0.1 ml of normal saline and that of the rhaFGF group were given 4 μ g of rhaFGF immediately after reperfusion. The content of D-lactate in the plasma was determined and the changes in intestinal pathology were observed. At the same time, the rates of apoptosis of intestinal epithelial cells were assessed 2, 6, 12 and 24 hours after I/R, and compared to the sham operation group. **Results** The plasma content of D-lactate in the saline treatment group at 6 hours after I/R reached (0.34 \pm 0.09) mg/L and was significantly higher than that in the rhaFGF treatment group[(0.23 \pm 0.07)mg/L, P $<$ 0.05]. It was shown histologically that the intestinal structures were damaged more seriously in saline treatment group than in rhaFGF group. The apoptosis rates in the saline treatment group and rhaFGF group were elevated significantly, peaking at 12 hours after I/R injury [(62.8 \pm 1.7)% in saline group and (42.5 \pm 2.6)% in rhaFGF treatment group], then the rate began to fall. There was statistically significant difference between the two groups at 12 hours after I/R injury. **Conclusion** rhaFGF can reduce content of D-lactate in the plasma and rate of apoptosis of epithelial cells in the intestine after I/R injury, thus it seems to afford a protective effect on the small intestine after I/R injury in rats.

【Key words】 acidic fibroblast growth factor; ischemia/reperfusion injury; small intestine; D-lactate; apoptosis

我们以往的研究结果表明,酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)可以减轻缺血引起的内脏损伤^[1]、组

基金项目:国家重大基础研究规划资助项目(G1999054204);国家自然科学基金重点项目(30230370);国家自然科学基金面上项目(30170966);国家“863”资助项目(2001AA215131)

作者单位:100037 北京,解放军总医院三〇四临床部全军创伤修复重点实验室

作者简介:孙同柱(1960-),男(汉族),河北省衡水人,主管技师,主要从事创伤修复实验工作,发表论著 18 篇。

织坏死和细胞凋亡^[2,3]。细胞凋亡作为细胞死亡的一种形式正在逐步引起人们的关注。本实验中我们将改构型酸性成纤维细胞生长因子(rhaFGF)用于大鼠肠缺血-再灌注损伤模型,观察 rhaFGF 对大鼠肠缺血-再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型:雄性 Wistar 大鼠 54 只,体重 230~250 g。将大鼠随机分为假手术组、生理盐水对照组

和 rhaFGF 治疗组,后两组再各自分为缺血-再灌注 2、6、12 和 24 h 4 个亚组,每组 6 只大鼠。生理盐水对照组和 rhaFGF 治疗组大鼠经股部肌肉注射速眠新注射液 0.15 ml 麻醉后,按无菌操作开腹,钝性分离肠系膜上动脉(SMA),用无创血管夹夹闭 SMA 根部阻断血流 45 min,松夹,恢复肠道血流形成缺血-再灌注损伤模型^[3]。假手术组大鼠只分离 SMA,不夹闭,维持 45 min。

1.2 rhaFGF 应用:生理盐水对照组和 rhaFGF 治疗组于缺血-再灌注形成即刻从大鼠阴茎背静脉注射生理盐水 0.1 ml 和 rhaFGF 0.1 ml (40 μg/ml)。关腹,皮下注射生理盐水 10 ml 进行复苏(rhaFGF 由暨南大学医药生物技术研究中心研制)^[4]。

1.3 标本采集及检测指标:假手术组大鼠于分离 SMA 45 min、生理盐水对照组和 rhaFGF 治疗组大鼠于缺血-再灌注 2、6、12 和 24 h 采集标本。从腹主动脉取血 5 ml,注入肝素抗凝管,以 3 000 r/min 离心 10 min,取血浆分装,-70 °C 下保存,用于检测 D-乳酸含量。在距离回盲部 10 cm 处取小肠组织,置于体积分数为 10% 的甲醛中固定,常规石蜡包埋切片,进行组织学检查和细胞凋亡检测。

1.3.1 血浆 D-乳酸的含量测定:采用酶联紫外分光光度法^[5]。取血浆 0.4 ml,加 5.8 mmol/L 过氧酸(PCA)0.04 ml,震荡混匀后冰浴 10 min,离心(4 °C,4 000 r/min)10 min,取上清液 0.2 ml,KOH 调 pH 10~12,混匀震荡后冰浴 10 min,离心(4 °C,3 200 r/min)10 min 后取上清液 0.125 ml,加入烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)-甘氨酸-胍缓冲液 0.375 ml、D-乳酸脱氢酶(D-LDH)0.025 ml,混匀后置 25 °C 水浴 90 min,取出后在室温下立即测吸光度(A₃₄₀)。根据标准曲线计算 D-乳酸浓度,结果以 mg/L 表示。

1.3.2 病理组织学检查:小肠组织切片采用苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察组织学改变。

1.3.3 细胞凋亡检测:细胞凋亡检测试剂盒购自德国 Roche 公司,实验操作按说明书要求进行。切片(5 μm)脱蜡至水,加蛋白酶 K,在 37 °C 条件下孵育 30 min;磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗 2 次,切片浸泡在 Tris-HCl 液[含 30% 的牛血清白蛋白(BSA)和 20% 的正常胎牛血清]中 30 min;PBS 冲洗 2 次,加 50 μl 末端脱氧核糖转移酶介导的生物素化脱氧尿嘧啶缺刻标记技术(TUNEL)反应液,37 °C 下暗室湿盒孵育 60 min;PBS 冲洗 3 次,加 50 μl 过氧化物酶转换液,37 °C 下湿盒孵育 30 min;PBS 冲洗 3 次,

最后加显色底物 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色;PBS 冲洗 3 次,苏木素复染,脱水封片,胞核呈棕色为阳性染色。镜下观察组织中细胞凋亡的定位,每张切片选择有代表性的视野,计数细胞凋亡百分率。

1.4 统计学处理:血浆 D-乳酸测定结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行方差分析,有差异时进一步作各组间相互比较。细胞凋亡百分率用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。每个数据(p)经反正弦函数转换($x' = \arcsin \sqrt{p}$)后作方差分析。

2 结果

2.1 血浆 D-乳酸含量(表 1):假手术组大鼠血浆 D-乳酸含量很低。生理盐水对照组和 rhaFGF 治疗组缺血-再灌注 2~24 h 血浆 D-乳酸含量均明显升高,而且维持在较恒定水平。rhaFGF 治疗组 D-乳酸含量略低于相应时间点生理盐水对照组。

表 1 大鼠肠缺血-再灌注后血浆 D-乳酸含量的变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	再灌注 2 h	再灌注 6 h	再灌注 12 h	再灌注 24 h
生理盐水对照组	0.31±0.10*	0.34±0.09*	0.25±0.05*	0.22±0.06
rhaFGF 治疗组	0.25±0.07*	0.23±0.07*#	0.24±0.11*	0.20±0.08

注:与假手术组[(0.13±0.09)mg/L]比较:* $P < 0.05$;与生理盐水对照组比较:# $P < 0.05$

2.2 组织学观察:假手术组小肠呈现正常的小肠组织结构(彩色插页图 1)。缺血-再灌注 2~24 h 模型动物小肠损伤均较重,生理盐水对照组损伤更重,表现为肠黏膜水肿、脱落,黏膜下层炎细胞浸润,肠绒毛结构消失(彩色插页图 2)。rhaFGF 治疗组损伤较轻,主要变化为肠黏膜充血、水肿,黏膜下层少量炎细胞浸润,部分肠绒毛结构尚存(彩色插页图 3)。

2.3 细胞凋亡定位:假手术组细胞凋亡仅发生在肠绒毛顶端的上皮细胞(彩色插页图 4)。生理盐水对照组和 rhaFGF 治疗组均发生在小肠组织的全层,包括黏膜层的上皮细胞和固有层的淋巴细胞、浆细胞,黏膜下层的血管和淋巴管,以及肌层的平滑肌细胞和浆膜层(彩色插页图 5,图 6)。

2.4 细胞凋亡率(表 2):假手术组细胞凋亡率很低。生理盐水对照组和 rhaFGF 治疗组缺血-再灌注 2~24 h 细胞凋亡率明显增高,均显著高于假手术组(P 均 < 0.05)。生理盐水对照组缺血-再灌注 12 h 细胞凋亡率高达(62.8±1.7)%,而 rhaFGF 治疗组为(42.5±2.6)%($P < 0.05$)。其余各时间点 rhaFGF 治疗组细胞凋亡率也略低于生理盐水对照组,但无统计学意义。

表 2 rhaFGF 对缺血-再灌注后肠道细胞
凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effects of rhaFGF on apoptosis in intestine
after I/R injury($\bar{x} \pm s, n=6$) %

组别	再灌注 2 h	再灌注 6 h	再灌注 12 h	再灌注 24 h
生理盐水对照组	47.1±2.4*	51.8±2.4*	62.8±1.7*	52.5±2.4*
rhaFGF 治疗组	36.5±11.1*#	38.1±8.5*#	42.5±2.6*#	38.6±11.8*#

注:与假手术组(6.5±1.8%)比较: * $P<0.05$;与生理盐水对照组比较: # $P<0.05$

3 讨论

以往研究表明, aFGF 具有多种生物学功能: 对多种组织有较强的促有丝分裂活性, 能够促进创面肉芽组织生长, 诱导毛细血管胚芽形成与再上皮化, 对创面修复有明显的促进作用^[4,6]; 作用于缺血脏器, 对肾急性缺血-再灌注损伤有治疗作用^[7]。这些研究结果充分反映出生长因子的广阔临床应用前景。由于野生型 aFGF 的促分裂活性与细胞的增殖、分化以及肿瘤发生可能存在一定的联系, 因而在临床大规模应用时受到一定限制。为此人们通过基因工程技术, 将野生型 aFGF 进行重构, 删去其核转位区后使 aFGF 诱导 DNA 合成和细胞增殖的能力丧失, 但仍保留着与 aFGF 受体结合并诱导受体介导的酪氨酸磷酸化和 c-fos 表达^[8], 这样一种突变体的 aFGF, 称之为 rhaFGF。rhaFGF 失去了促分裂效应, 但仍保留非促分裂激素样活性。在本研究中我们进一步研究了外源性 rhaFGF 对缺血-再灌注后血浆 D-乳酸含量的变化及对肠道细胞凋亡的影响, 旨在探讨 rhaFGF 对肠道损伤的保护作用。

D-乳酸是肠道细菌特有的代谢产物, 进入机体后不参与代谢反应, 因此, 血浆 D-乳酸含量的变化可以反映肠黏膜通透性的改变^[9]。本实验中测得肠缺血-再灌注后血浆 D-乳酸含量较假手术组明显升高, 表明缺血-再灌注后肠道损伤严重。rhaFGF 治疗组的 D-乳酸含量较生理盐水对照组有所降低, 提示 rhaFGF 可以减轻肠缺血-再灌注引起的肠道损伤。组织学检查也显示, 生理盐水对照组和 rhaFGF 治疗组缺血-再灌注后肠道部分肠绒毛变性、坏死、脱落, 炎性细胞浸润, 肠道组织结构破坏。rhaFGF 治疗组损伤程度较生理盐水对照组略轻。rhaFGF 降低血浆 D-乳酸含量和减轻肠道组织学改变的机制可能是 rhaFGF 通过其非促分裂激素样活性和其他相关作用, 启动信号转导机制而诱导多种细胞分化、增殖, 从而表现出对肠道损伤的保护作用。细胞凋亡是机体自身的一种病理生理现象, 存在于机体生长发育的各个阶段, 对组织细胞的生理功

能产生着重要影响。细胞凋亡本身也受创伤以及其他疾病因素的影响^[7]。组织变性、坏死与细胞凋亡共同构成了一些致伤因子和疾病导致机体损伤的某些表现。本实验中我们观察到, rhaFGF 能减少缺血-再灌注后肠道细胞的凋亡, 其中在缺血-再灌注后 12 h, rhaFGF 治疗组的细胞凋亡率明显低于生理盐水对照组, 有统计学差异, 说明 rhaFGF 有减轻缺血-再灌注后肠道细胞凋亡的作用。其机制可能为: ①rhaFGF 与其受体结合, 激活了磷酸肌醇三磷酸 (PI-3K) 和蛋白激酶 B (PKB), 从而减轻了细胞凋亡。有研究表明, 整合素抑制细胞凋亡主要是通过 PI-3K 和 PKB 途径实现的^[10], 而 PI-3K 和 PKB 上游的 ras 蛋白可以由受体酪氨酸蛋白激酶激活。②rhaFGF 能减轻缺血-再灌注后肠道上皮细胞损伤。因为缺血-再灌注作为一种致伤因素可导致小肠上皮细胞凋亡增多, 能减轻缺血-再灌注损伤程度的因素可能会减轻小肠上皮细胞凋亡数目。rhaFGF 有可能通过改善缺血-再灌注后小肠的血液循环, 减轻小肠损伤, 因而使小肠上皮细胞凋亡数目减少。

结论: rhaFGF 能降低肠缺血-再灌注后血浆 D-乳酸含量, 减少肠道细胞凋亡, 其在缺血-再灌注损伤治疗中可能具有一定的效果。

参考文献:

- 1 付小兵, P Cuevas, 田惠民, 等. 酸性成纤维细胞生长因子减轻急性肠道缺血-再灌注对肝脏的损伤[J]. 中国危重病急救医学, 1995, 7: 355-357.
- 2 付小兵, 蒋礼先, 杨银辉, 等. 缺血-再灌注致肠道细胞凋亡的特征及碱性成纤维细胞生长因子对其转归的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10: 455-458.
- 3 杨银辉, 付小兵, 孙同柱, 等. 外源性碱性成纤维细胞生长因子对肠道缺血再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 中华实验外科杂志, 2002, 19: 426-428.
- 4 Mellin T H, Cashen D E, Ronan J J, et al. Acidic fibroblast growth factor accelerates dermal wound healing in diabetic mice [J]. J Invest Dermatol, 1995, 104: 850-855.
- 5 Qin R Y, Zou S Q, Wu Z D, et al. Influence of splanchnic vascular infusion on the content of endotoxins in plasma and the translocation of intestinal bacteria in rats with acute hemorrhage necrosis pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2000, 6: 577-580.
- 6 Pandit A, Ashar R, Feldman D, et al. Investigation of acidic fibroblast growth factor delivered through a collagen scaffold for the treatment of full-thickness skin defects in a rabbit model [J]. Plast Reconstr Surg, 1998, 101: 766-775.
- 7 Fu X B, Cuevas P, Gimebez-Gallego G, et al. Acidic fibroblast growth factor reduces renal morphologic and functional indicators of injury caused by ischemia and reperfusion[J]. Wound Rep Reg, 1996, 4: 297.
- 8 翁立新, 付小兵, 李秀霞, 等. 重构型和野生型 aFGF 对肠缺血-再灌注损伤后肝肾功能的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 19-21.
- 9 Smith S M, Eng R H K, Buccini F. Use of D-lactic acid measurement in the diagnosis of bacterial infections [J]. J Infect Dis, 1986, 154: 658-664.
- 10 金伯泉, 主编. 细胞和分子免疫学 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2001. 643-645.

(收稿日期: 2004-03-24 修回日期: 2004-12-20)

(本文编辑: 李银平)

改构型酸性成纤维细胞生长因子对肠缺血-再灌注的保护作用

(正文见46页)

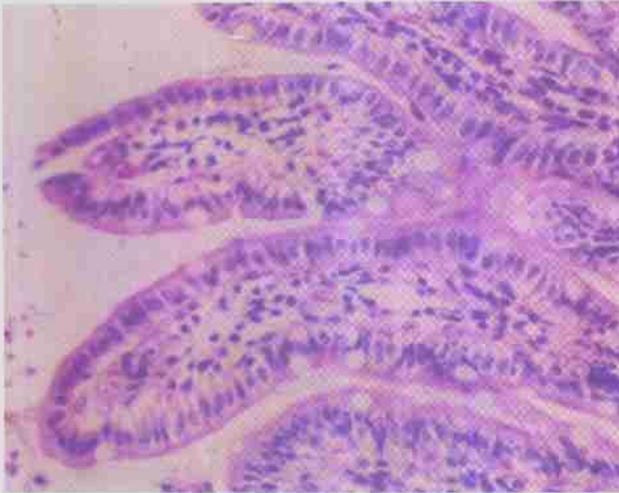


图1 假手术组肠道组织 (HE, x100)
Figure 1 Intestine of sham-operation group (HE, x100)

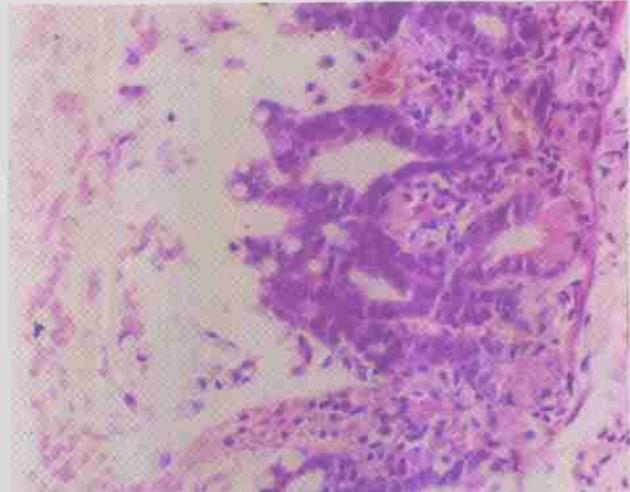


图2 生理盐水治疗组肠缺血-再灌注6 h肠道病理改变 (HE, x100)
Figure 2 Intestine of normal saline treatment group at 6 hours after intestinal I/R injury (HE, x100)

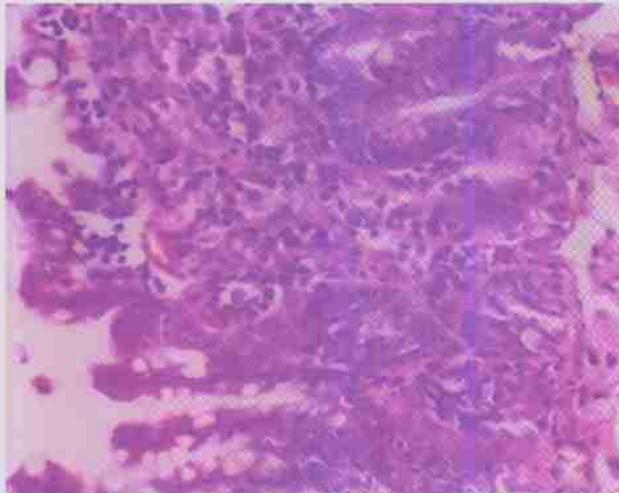


图3 rhaFGF治疗组肠缺血-再灌注6 h肠道病理改变 (HE, x100)
Figure 3 Intestine of rhaFGF treatment group at 6 hours after intestinal I/R injury (HE, x100)

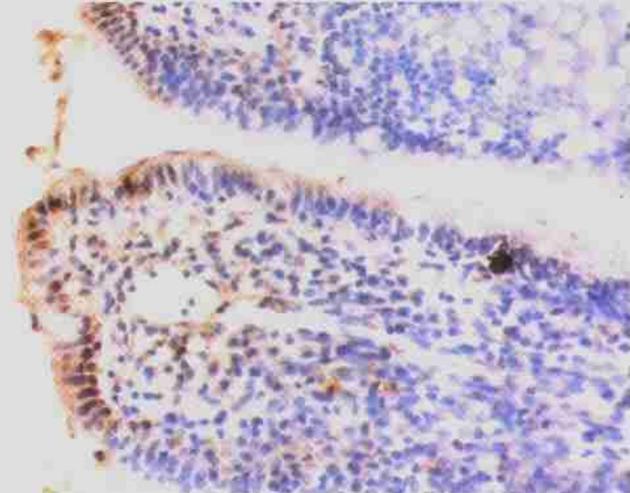


图4 假手术组肠道细胞凋亡变化 (TUNEL, x200)
Figure 4 Changes of apoptosis in intestine in sham-operation group (TUNEL, x200)

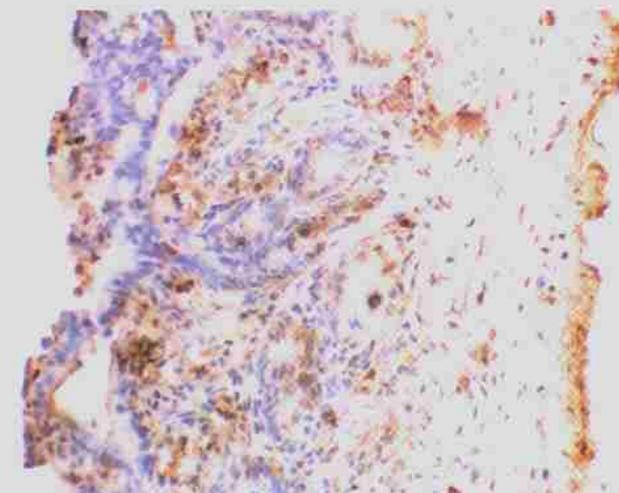


图5 生理盐水治疗组缺血-再灌注12 h肠道细胞凋亡变化 (TUNEL, x200)
Figure 5 Changes of apoptosis in intestine in saline treatment group at 12 hours after I/R (TUNEL, x200)

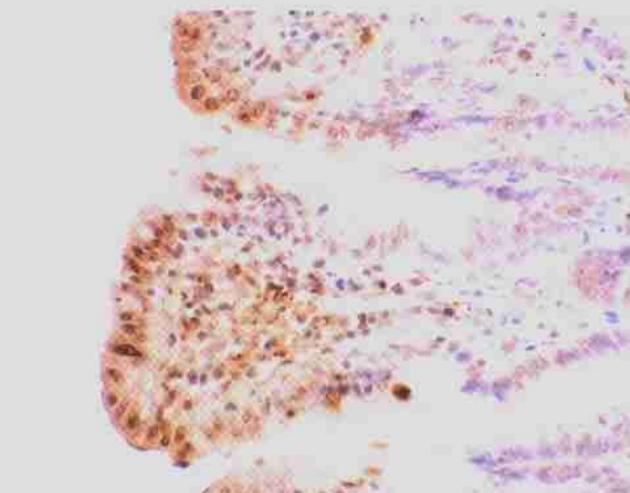


图6 rhaFGF治疗组缺血-再灌注12 h肠道细胞凋亡变化 (TUNEL, x200)
Figure 6 Changes of apoptosis in intestine in rhaFGF treatment group at 12 hours after I/R (TUNEL, x200)