

改构型和野生型 aFGF 对肠缺血-再灌注损伤后肝肾功能的影响

翁立新 付小兵 李秀霞 孙同柱 郑曙云 陈伟

【摘要】目的 观察肠缺血-再灌注损伤后的肝、肾功能的变化,并探讨不同类型酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)对肠缺血-再灌注损伤后的肝、肾功能的保护作用。**方法** 将 78 只 Wistar 大鼠分成假手术组(C)、生理盐水治疗组(R)、改构型 aFGF 治疗组(rhF)和野生型 aFGF 治疗组(wtF),后 3 组根据再灌注时间又分为 2、6、12 和 24 h 4 个时间点。阻断肠系膜上动脉 45 min 后松夹制备肠缺血-再灌注模型。于不同时间点腹主动脉抽血 5 ml,检测肝、肾功能的变化。**结果** 与 C 组比较,R 组、rhF 组和 wtF 组肝、肾功能都有明显下降,以 R 组下降更明显,rhF 组次之,wtF 组肝、肾功能恢复得最好。组织病理学检查发现,3 组动物均有小肠绒毛脱落、黏膜下层炎细胞浸润等改变,其严重程度与肝、肾功能指标水平一致。**结论** 肠缺血-再灌注损伤导致多脏器功能损伤,野生型、改构型 aFGF 对脏器功能有明显的保护作用。

【关键词】 缺血-再灌注损伤,肠; 肝功能; 肾功能; 酸性成纤维细胞生长因子

中图分类号: R364.1; R363.27 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-0603(2004)01-0019-03

Effects of acidic fibroblast growth factor on hepatic and renal functions after intestinal ischemia/reperfusion injury WENG Li-xin*, FU Xiao-bing, Li Xiu-xia, SUN Tong-zhu, ZHENG Shu-yun, CHEN Wei. * 304th Hospital of PLA, Beijing 100037, China

【Abstract】Objective To investigate the change in hepatic and renal functions parameters after intestinal ischemia-reperfusion(I/R) injury, and to explore the effects of acidic fibroblast growth factor(aFGF) on hepatic and renal functions after intestinal I/R injury in rats. **Methods** Seventy-eight Wistar rats were divided into four groups, which are sham-operated(C) group, ischemia (45 minutes) plus reperfusion (R), reconstructive human aFGF treatment (rhF), and wild type aFGF treatment (wtF) groups. The animals were sacrificed at 2, 6, 12 and 24 hours, respectively. Hepatic and renal functions was analyzed. **Results** In comparison with those in group C, the hepatic and renal functions were damaged in group R, rhF and wtF decreased. Treatment with rhF and wtF markedly abated the hepatic and renal dysfunction. The desquamation of intestine villi and infiltration of inflammation cells in the submucosa were observed in all groups. **Conclusion** Hepatic and renal functions are damaged after intestinal I/R injury. Treatment with rhF and wtF could protect against multiple organ dysfunction associated with intestinal ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 intestinal ischemia-reperfusion injury; hepatic function; renal function; acidic fibroblast growth factor

CLC number: R364.1; R363.27 **Document code:** A **Article ID:** 1003-0603(2004)01-0019-03

我们以往的研究已注意到野生型酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)在缺血性内脏损伤修复中的作用,并且已经观察到野生型 aFGF 基因表达与肝、肾创伤后转归的关系^[1]。但是,由于野生型 aFGF 的促分裂活性与细胞增殖、分化以及肿瘤发生存在一定

基金项目:国家重大基础研究规划项目(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,解放军第三〇四医院(翁立新,付小兵,孙同柱,郑曙云,陈伟);内蒙古医学院(翁立新,李秀霞)

通讯作者:付小兵,Email: fuxb@cgw.net.cn

作者简介:翁立新(1966-),女(汉族),江苏省人,内蒙古医学院在读医学硕士,主治医师,主要从事改构型 aFGF 对肠缺血-再灌注损伤保护作用的研究,发表论文 5 篇,现在解放军第三〇四医院创伤修复实验室完成硕士课题。

的联系,因而在大规模应用时受到一定的限制。为此我们通过基因工程技术,将野生型 aFGF 进行了改构,产生一种突变体 aFGF,该突变体 aFGF 失去了促分裂效应,但仍保留了非促分裂激素样活性。在本研究中,我们进一步研究外源性应用两种 aFGF 对肠缺血-再灌注损伤后肝、肾功能损伤的保护作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型:健康雄性 Wistar 大鼠 78 只,平均体重 250 g。随机将动物分为假手术组(C)、生理盐水治疗组(R)、改构型 aFGF 治疗组(rhF)和野生型 aFGF 治疗组(wtF),后 3 组又分为再灌注后 2、6、12 和 24 h 4 个时间点。给每只动物股部肌肉注

射速眠新注射液 0.1 ml, 麻醉后, 无菌条件下开腹, 钝性分离肠系膜上动脉根部。除假手术组外, 其余 3 组用微血管夹夹闭, 完全阻断血流 45 min, 然后放松血管夹, 同时各组分别静脉注射生理盐水、改构型 aFGF、野生型 aFGF; 按设定时间点从腹主动脉取血 5 ml, 注入抗凝管, 然后活杀动物取材, 血液离心 3 000 r/min, 离心 10 min, 抽取上清液于 -70 ℃ 保存, 取距回盲部 10 cm 以上的小肠 2 cm 浸泡于体积分数为 10% 的甲醛溶液中。行苏木素-伊红(HE)染色, 观察组织形态的改变。

1.2 给药剂量和方法: aFGF 由广东暨南大学生物医药研发中心提供, 剂量参照文献 [2] 中用量, 1.6 μg/kg, 在松夹的同时静脉注射 1 次。

1.3 常规组织学观察: 标本置 100 ml/L 甲醛溶液固定, 梯度乙醇脱水, 透明, 石蜡包埋, 切片, 脱蜡至水, 常规 HE 染色, 组织学观察。

1.4 肝、肾功能的测定: 分别取血浆约 1 ml, 用全自动生化分析仪检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、血尿素氮(BUN)和血肌酐(Cr)。每组选择 6 只动物血浆。

1.5 结果分析与统计学处理: 采用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学处理, 检测结果用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 常规组织学观察: 常规 HE 染色发现, 肠系膜上动脉夹闭 45 min 并行再灌注后, R 组损伤最重, 肠黏膜及黏膜下层重度充血、水肿、部分黏膜糜烂、坏死和脱落, 黏膜下层大量炎细胞浸润, 肠绒毛结构消失(图 1)。rhF 组(图 2)和 wtF 组(图 3)损伤较轻, 肠黏膜及黏膜下轻度充血、水肿, 黏膜下层少量炎细胞浸润, 肠绒毛结构尚存。

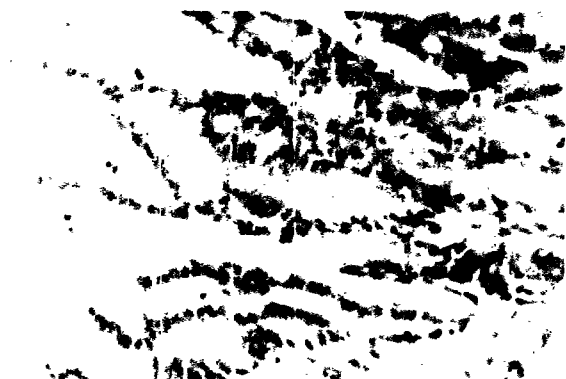


图 1 R 组肠缺血-再灌注 12 h 肠黏膜病理改变(HE, ×200)

Fig. 1 Intestinal mucosa of R group at 12 hours after intestinal I/R injury(HE, ×200)

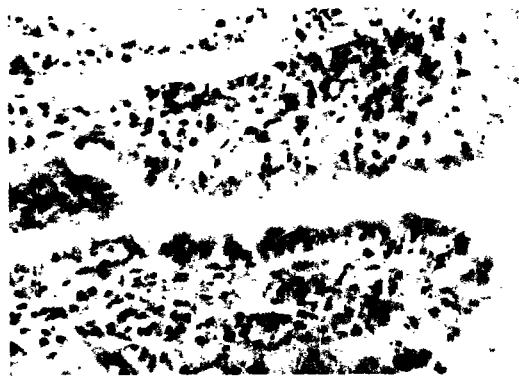


图 2 rhF 组再灌注后 12 h 肠黏膜病理改变(HE, ×200)

Fig. 2 Intestinal mucosa of rhF group at 12 hours after intestinal I/R injury(HE, ×200)

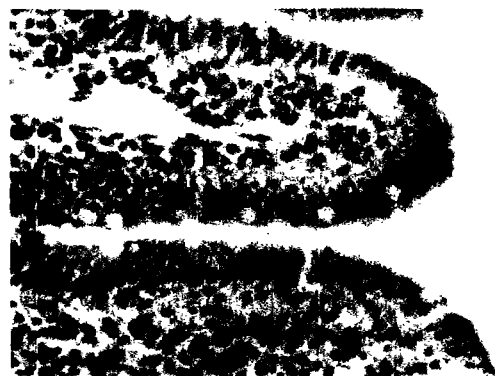


图 3 wtF 组再灌注后 12 h 肠黏膜病理改变(HE, ×200)

Fig. 3 Intestinal mucosa of wtF group at 12 hours after intestinal I/R injury(HE, ×200)

2.2 肝功能改变: R 组大鼠伤后 2、6 和 12 h 血浆 AST 比 C 组分别增加 2.3 倍、2.9 倍和 3.3 倍(P 均 < 0.01); ALT 分别增加 3.8 倍、3.9 倍和 5.0 倍(P 均 < 0.01)。rhF 组、wtF 组大鼠血浆中 AST 和 ALT 都显著增高(P 均 < 0.01), 但增加的幅度与 R 组相比明显减轻(P 均 < 0.05), rhF 组大鼠血浆中 AST 和 ALT 增高幅度高于 wtF 组(P 均 > 0.05)。见表 1。

2.3 肾功能改变: 在肠缺血-再灌注后血浆 BUN 和 Cr 升高, 前者升高幅度大于后者, 且持续时间较长, 至再灌注后 24 h 仍高于对照组, 但 Cr 已恢复正常。rhF 组大鼠血浆 BUN 和 Cr 升高的幅度明显减轻; wtF 组大鼠血浆 BUN 和 Cr 升高的幅度与 rhF 组相比有所下降(P 均 > 0.05)。见表 1。

3 讨论

严重创伤后多器官功能障碍综合征(MODS)或多器官衰竭(MOF)发生时常累及肝、肾、小肠器官。研究发现, 除肝、肾直接遭受创伤外, 低血容量性休克以及肠道缺血-再灌注所致的间接打击均可以通

过细菌毒素、炎性介质如肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)以及免疫介质等造成严重的间接损伤,表现为炎性反应增加,组织 ATP 含量减少,组织细胞变性坏死,最终致功能下降^[3]。

表 1 大鼠肠缺血-再灌注中脏器功能的变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 1 Changes of hepatic and renal functions after intertinal I/R injury($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)	BUN(mmol/L)	Cr(μ mol/L)
C组	231±53	68±15	7.2±1.1	29.8±5.6
R2组	541±100**	268±50**	11.9±1.0	43.4±11.1
R6组	670±80**	264±90**	17.6±2.9**	41.9±11.5*
R12组	765±80**	344±79**	23.0±6.5**	57.7±11.0**
R24组	587±112**	126±33	13.2±7.0	30.5±8.1
rhF2组	343±33**#	212±45**#	10.9±1.2	33.6±7.1#
rhF6组	568±92**#	245±39**#	17.8±1.8**	42.8±9.3*
rhF12组	672±56**#	271±34**#	21.4±3.1**	30.4±7.0**#
rhF24组	560±32**	171±56	29.6±3.1	27.6±2.5
WtF2组	425±126**#△	190±60**#△	9.5±1.1	44.2±9.7*
WtF6组	421±78**#△	232±88**#△	16.8±3.8*△	46.8±24.7*
WtF12组	500±93**#△	162±32**#△	18.2±7.7**#△	36.4±9.1**#△
WtF24组	438±137**#△	136±67**#△	6.2±2.7**	20.2±8.7*△

注:与 C 组比较:* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 R 组相应时间点比较:# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与 rhF 组相应时间点比较:△ $P > 0.05$

我们以前的研究表明:轻度适宜缺血等打击下,创伤又将成为内源性生长因子释放或合成增加的促进剂而使其参与受创组织的自我修复过程,而严重创伤引起脏器组织结构的破坏而致内源性生长因子减少,在这种情况下,需要补充外源性生长因子来促进内脏损伤修复^[4,5]。aFGF 是成纤维细胞生长因子家族成员之一,对胚层及神经外胚层来源的细胞具有促分裂作用^[6]。人的 aFGF 基因位于第 4 号染色体上,为单拷贝基因,由两个大的内含子和 3 个外显子组成。aFGF 主要分布于大脑,它以自分泌或旁分泌的方式作用于周围细胞,但本身缺乏信号肽结构。aFGF 蛋白由 154 个氨基酸残基组成,等电点 5~7。aFGF 功能区主要包括肝素结合区、受体结合区和核转位区^[7]。受体结合区就是 aFGF 与其受体结合的部位,结合后可发生自我磷酸化而被激活,激活的受体通过信号转导使基因活化产生多种生物应答。aFGF 的 N 端 21~27 位的 Asn Tyr Lys Lys Pro Lys Leu 序列对 aFGF 的丝裂原活性十分重要,删去该序列后 aFGF 诱导 DNA 合成和细胞增殖能力丧失,但仍能与 aFGF 受体结合并诱导受体介导的酪氨酸磷酸化和 c-fos 的表达^[8]。此序列被称为核定位序列(NLS),也称核转位区,删除此序列即失去促分裂活性。改构型 aFGF 去掉了促分裂活性,减

少了人们对临床应用 aFGF 诱发肿瘤形成的担心^[9,10],可它的促修复作用是否会随之下降呢?基于此,本实验中利用改构型 aFGF 和野生型 aFGF 治疗肠缺血-再灌注损伤后大鼠,观察两种 aFGF 对其肝、肾功能损伤的保护作用。

本研究表明:改构型和野生型两组 AST、ALT、BUN、Cr 均有升高,与 C 组比较有统计学意义;但与 R 组相应时间点比较却明显降低,有统计学意义;而改构型和野生型两组之间比较无统计学差异。说明两种 aFGF 对肠缺血-再灌注损伤后的肝、肾功能均有保护作用。进一步证明了 aFGF 的促修复作用也许不依赖于其促分裂活性,而通过其非促分裂激素样活性和其它相关作用,启动信号转导机制而诱导多种细胞分化、增殖,具有营养和保护神经元,促进损伤修复,诱导缺血区血管形成等多方面的作用而对肠缺血-再灌注损伤后肝、肾损害起到保护作用。因此,改构型 aFGF 在将来的临床应用中可能有更广泛的前景。

参考文献:

- 1 付小兵.生长因子治疗消化系统脏器损伤[J].新消化病学杂志,1997,5(10):663-664.
- 2 Zeytinn F M, Rusk S F, Baird A, et al. Induction of c-fos calcitonin in gene expression and acidic FGF production in a multipitide-secreting neuroendocrine cell line [J]. Endocri, 1988,122:1144-1156.
- 3 Turnage R H, Guice K S, Oldham K T, et al. Endotoxemia and remote organ injury following intestinal reperfusion [J]. J Surg Res, 1994,56:571-578.
- 4 Fu Xiaobing, Cueras P, Gimenez-Gallego G, et al. Ischemia and reperfusion reduce the endogenous basic fibroblast growth factor in rat skeletal muscles; an immunohistochemical study [J]. Wound Rep Reg, 1996,4(3):381-385.
- 5 Fu Xiaobing, Yang Yinhui, Li Xiaokun, et al. Ischemia and reperfusion impair the gene expression of endogenous basic fibroblast growth factor (bFGF) in rat skeletal muscle [J]. J Surg Res, 1998,80:88-93.
- 6 付小兵,王亚平,叶一秀,等.碱性成纤维细胞生长因子对肠道与肝缺血性损伤的影响[J].解放军医学杂志,1996,21(2):121-122.
- 7 Pellegrini L, Burke D F, von Delft F, et al. Crystal structure of fibroblast growth factors receptor ectodomain bound to ligand and heparin [J]. Nature, 2000, 407:1029-1034.
- 8 杨银辉,付小兵,孙同柱,等.碱性成纤维细胞生长因子对缺血-再灌注损伤后肠道细胞信号转导途径的影响[J].中国危重病急救医学,2002,14(7):407-410.
- 9 赵志力,付小兵.修复细胞分化的调控机制与鉴别[J].中国危重病急救医学,2002,14(2):120-123.
- 10 付小兵,程颢,盛志勇.有关创伤修复与组织再生的现代认识[J].中国危重病急救医学,2002,14(2):67-68.

(收稿日期:2003-10-13 修回日期:2003-12-19)

(本文编辑:李银平)