

酸性成纤维细胞生长因子对大鼠缺血/再灌注损伤肠上皮细胞丝裂素活化蛋白激酶的影响

郑曙云 付小兵 徐建国 孙同柱

【摘要】 目的 观察外源性酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)对大鼠缺血/再灌注(I/R)损伤后肠上皮细胞丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)活性的影响,并探讨其与肠上皮细胞增殖能力变化的关系。方法 采用大鼠肠系膜上动脉夹闭法制备缺血 45 min 后再灌注动物模型。132 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组、I/R 组、aFGF 处理组(再灌注即刻颈静脉注射 aFGF 4 μ g)及细胞外信号调节蛋白激酶(ERK 1/2)阻断剂 PD98059 预处理组(缺血前尾静脉注射 PD98059 7.5 μ g,再灌注即刻颈静脉注射 aFGF 4 μ g)。检测缺血前,I/R 15、30 min 及 1、2、6、12 和 24 h 时肠上皮细胞增殖能力和 MAPK 活性。结果 aFGF 处理后肠上皮细胞增殖明显增加,同时 MAPK 活性显著增高。用 p44/p42 MAPK(ERK1/2)阻断剂 PD98059 可抑制 ERK1/2 的活性,使肠上皮细胞增殖减少。结论 aFGF 可促进 I/R 损伤后肠上皮细胞增殖,并可能与其激活肠上皮 MAPK 有关。

【关键词】 酸性成纤维细胞生长因子; 缺血/再灌注损伤; 肠上皮; 丝裂素活化蛋白激酶

Effect of acidic fibroblast growth factor on mitogen - activated protein kinase activity in small intestinal epithelium after ischemia/reperfusion injury in rat ZHENG Shu - yun*, FU Xiao - bing, XU Jian - guo, SUN Tong - zhu. * Affiliated Nanjing the First Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu, China

Corresponding author: FU Xiao - bing (Email: fuxb@cqw.net.cn)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of acidic fibroblast growth factor (aFGF) on p44/p42 mitogen - activated protein kinase (p44/p42 MAPK, extracellular signal - regulated protein kinase, ERK1/2) activity in small intestinal epithelium in rat after ischemia/reperfusion (I/R) injury and its relation with the change in small intestinal epithelium in rat after I/R injury as well as the change in proliferation of epithelial cells. **Methods** Superior mesenteric artery (SMA) was occluded to produce ischemia of the intestine for 45 minutes followed by reperfusion to reproduce I/R injury. One hundred and thirty - two Wistar rats were randomly divided into sham - operation group, I/R group, aFGF treatment group (4 μ g of aFGF was injected into jugular vein after reperfusion), and PD98059 (antagonist of ERK 1/2) pretreatment group (7.5 μ g of PD98059 was injected via tail vein before ischemia and 4 μ g of aFGF was injected via jugular vein after reperfusion). The activity of ERK1/2 and proliferation rate of small intestinal epithelial cells were determined before ischemia and 15 minutes, 30 minutes, 1 hour, 2 hours, 6 hours, 12 hours and 24 hours after reperfusion. **Results** The activity of ERK1/2 in small intestinal epithelium was higher in aFGF treatment group than in I/R control group, and the proliferation rate in small intestinal epithelial cells was significantly enhanced in aFGF treatment group. PD98059, the specific inhibitor of ERK1/2, inhibited ERK1/2 activity and reduced the proliferation rate of small intestinal epithelial cells in aFGF treatment group. **Conclusion** aFGF can promote small intestinal epithelial cell proliferation in I/R injury rats, and this may be related to activation of ERK1/2 in small intestinal epithelium.

【Key words】 acidic fibroblast growth factor; ischemia/reperfusion injury; intestinal epithelium; mitogen - activated protein kinase

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

作者单位:210006 南京医科大学附属南京第一医院(郑曙云);100037 北京,解放军总医院第一附属医院(原解放军第三〇四医院,郑曙云,付小兵,孙同柱);210002 南京大学医学院临床学院(徐建国)

通讯作者:付小兵,博士(西班牙),博士研究生导师,研究员 (Email:fuxb@cqw.net.cn)

作者简介:郑曙云(1958 -),男(汉族),浙江杭州人,医学博士,副主任医师,主要从事 ICU 基础与临床研究,已发表论文 10 余篇。

近年来发现的成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factor,FGF)是对肠上皮生长和功能有重要调节作用的多肽,它包括酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)和碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)两大类。研究证实,aFGF 和 bFGF 均能够减轻肠道及其他内脏器官缺血性损伤,促进其主动修复^[1-6],但其机制尚不明确。缺血/再灌注(I/R)损伤后的肠屏障功能恢复与肠上皮细胞和肠血管内皮细胞的增殖、分化密切相关,而丝裂素活化蛋白激酶(MAPK)是信号从细胞表面传到细胞核内部的重要传递者。

MAPK 具有调节细胞生长、发育、分裂、死亡及细胞间功能同步化等多种细胞的生理过程等作用^[7,8]。其亚类细胞外信号调节蛋白激酶(ERK1/2)信号转导通路是多种细胞外有丝分裂信号引起细胞增殖的共同通路,与细胞增殖有密切关系。本研究中通过观察 aFGF 对 I/R 损伤后肠上皮细胞 ERK1/2 活性和细胞增殖能力的影响,探讨 aFGF 促进 I/R 损伤后肠上皮细胞修复的分子机制。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂:清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重(230±20)g,购自军事医学科学院实验动物研究所。aFGF 由暨南大学医药生物技术研究开发中心提供。BCA 蛋白分析试剂盒购自美国 Pierce 公司。ERK1/2 阻断剂 PD98059 购自美国 CalBiochem 公司。p44/p42 MAPK(ERK1/2)活性检测试剂盒购自美国 Cell Signaling 公司。增殖细胞核抗原(PCNA)抗体及 Power Vision™ 两步法免疫组化试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。

1.2 动物模型制备及分组:132 只大鼠,适应性饲养 5 d,术前 12 h 禁食,自由饮水。将动物按照随机数字表法分为 5 组:假手术组、I/R 组、aFGF 处理组及 PD98059 预处理组。用质量分数为 3% 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,暴露肠系膜上动脉(SMA),夹闭 45 min 后松开形成再灌注。I/R 组与 aFGF 处理组分别于 SMA 夹闭 45 min 后松夹即刻从颈静脉注射生理盐水(0.15 ml)或 aFGF(每只 4 μg, 0.15 ml);PD98059 预处理组于 SMA 夹闭前从尾静脉注射 PD98059(每只 7.5 μg)进行预处理,然后于 SMA 夹闭 45 min 后松夹即刻从颈静脉注射 aFGF(每只 4 μg, 0.15 ml)。假手术组仅分离 SMA 但不夹闭,作为正常对照。假手术组动物分离 SMA 45 min 后活杀,其余各组动物则分别于松夹后 15、30 min 以及 1、2、6、12 和 24 h 各时间点活杀。选择小肠回盲部 10 cm 以上肠管,一部分肠管经体积分数为 10% 的中性甲醛固定,石蜡包埋,切片,检测小肠组织 PCNA 表达;另一部分肠管立即放入液氮中冻存,用以检测小肠组织 ERK1/2 活性。

1.3 观察指标及方法

1.3.1 肠上皮细胞增殖指数:用 PCNA 免疫组化染色法。石蜡切片常规脱蜡至水,经体积分数为 3% 的过氧化氢(H₂O₂)处理后进行抗原热修复,然后滴加经 1:100 稀释的 PCNA 抗体(一抗),37℃ 孵育 40 min。磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,37℃ 孵育 20 min。PBS 冲

洗后,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染、透明、封片。用 PBS 代替一抗作为阳性对照。光学显微镜下见到细胞核着棕褐色者为阳性染色细胞。随机选取 10 根完整的小肠绒毛,计数每根小肠绒毛中阳性染色细胞,计算其阳性染色细胞所占的百分数,即肠上皮细胞增殖指数。

1.3.2 肠上皮细胞 ERK1/2 活性的测定:采用免疫沉淀-激酶活性测定法。取近端空肠黏膜组织约 100 mg 加入 1 ml 预冷的 MAPK 提取液^[9],冰浴中匀浆、离心,取上清液以 BCA 法行蛋白定量。取上清液 200 μl(约含 200 μg 蛋白),加特异性磷酸化 ERK1/2 单抗 4℃ 过夜,免疫沉淀 ERK1/2,沉淀物经激酶缓冲液洗涤以后,加入到 50 μl 含 200 mmol/L ATP、2 μg Elk-1 合成蛋白的激酶反应体系中,37℃ 孵育 30 min,加 3×十二烷基硫酸钠(SDS)加样缓冲液终止反应,样品煮沸 5 min。取 30 μl 行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE),电泳后电转移到硝酸纤维素膜上,于质量分数为 5% 的脱脂牛奶中封闭 3 h, TBST 洗 5 min×3 次,加入抗磷酸化 Elk-1(pElk-1)抗体(一抗,1:1 000)4℃ 反应过夜, TBST 洗 5 min×3 次,加入抗兔 IgG-HRP(二抗,1:2 000)室温孵育 1 h, TBST 洗 5 min×3 次,用免疫印迹化学发光法(ECL)检测膜上阳性信号,每组实验独立重复 3 次,以保证结果可靠。用 Leica Q550IW 图像分析系统采集 X 线片上的实验结果图像,Leica Qwin 软件对图像条带进行灰度扫描,计算其积分吸光度(IA)以反映信号相对强弱。

1.4 统计学分析:数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 10.0 软件中的方差分析和 *t* 检验进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 aFGF 对 I/R 损伤肠上皮细胞增殖的影响(表 1):正常肠绒毛根部可见少量散在 PCNA 阳性细胞。aFGF 处理后,I/R 损伤肠绒毛根部 PCNA 阳性细胞较 I/R 组显著增加,表明 aFGF 能促进 I/R 损伤肠上皮细胞增殖,而用 PD98059 阻断 ERK1/2 活性后,aFGF 促进 I/R 损伤肠上皮细胞增殖的作用大部分被取消。

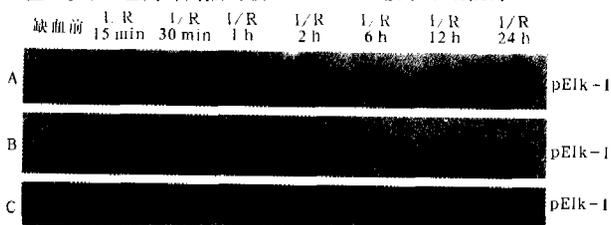
2.2 aFGF 对 I/R 损伤肠上皮 ERK1/2 活性的影响(图 1,图 2):经 aFGF 处理后,I/R 损伤肠上皮 ERK1/2 活性在 15 min、30 min 及 6 h 较 I/R 组显著升高(P 均 < 0.05)。说明 aFGF 能早期激活受损肠上皮 ERK1/2。应用 ERK1/2 阻断剂 PD98059,aFGF 激活 ERK1/2 活性作用明显受抑制。

表 1 aFGF 对 I/R 损伤肠上皮增殖的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of aFGF on proliferation of small intestinal epithelia after I/R injury in rats($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	肠上皮细胞增殖指数(%)						
	I/R 15 min	I/R 30 min	I/R 1 h	I/R 2 h	I/R 6 h	I/R 12 h	I/R 24 h
I/R 组	4.30±0.57	6.32±0.68	3.47±0.65	10.27±0.91	14.73±0.68	24.20±0.98	12.17±0.59
aFGF 处理组	5.27±0.62	6.97±0.73	4.37±0.44	13.47±1.23*	19.00±1.05*	31.18±1.08*	15.27±0.69*
PD98059 预处理组	4.50±0.75	6.76±0.70	3.73±0.84	10.97±1.00	15.96±1.11	25.15±1.05	13.23±0.89

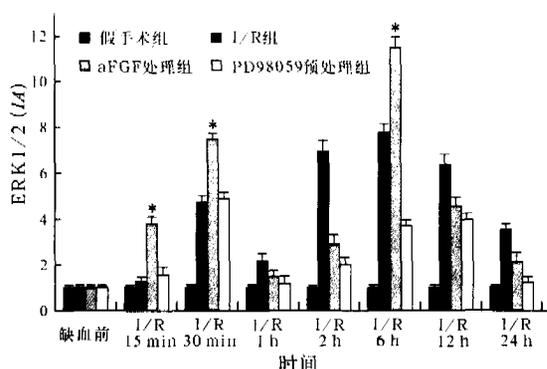
注:与 I/R 组同时时间点比较; * $P < 0.05$; 假手术组值为(4.70±0.65)%



A: I/R 组; B: aFGF 处理组; C: PD98059 预处理组

图 1 各组 ERK1/2 活性表达

Figure 1 Expression of ERK1/2 in each group



注:与 I/R 组同时时间点比较; * $P < 0.05$

图 2 aFGF 对 I/R 损伤肠上皮 ERK1/2 活性影响

Figure 2 Effects of aFGF on activity of ERK1/2 in intestinal epithelia after I/R injury

3 讨论

肠上皮 I/R 损伤后的再生与修复主要取决于残存的隐窝上皮细胞数目及其增殖分化潜能。研究表明,一些多肽类生长因子如表皮生长因子(EGF)、转化生长因子- α (TGF- α)等促进受损伤肠上皮修复作用主要通过肠上皮细胞增殖这一途径^[10]。我们在前期的研究中证实,FGF 对 I/R 损伤肠上皮细胞有明显促修复作用^[5],但其作用机制是否与 EGF、TGF- α 类似尚不清楚。本实验中以 PCNA 反应肠上皮细胞增殖能力,发现经 aFGF 处理后,I/R 损伤肠上皮 PCNA 阳性细胞数量较 I/R 损伤组显著增多。表明 aFGF 可促进 I/R 损伤后肠上皮细胞增殖,aFGF 加快 I/R 损伤后肠上皮细胞再生修复与其促进肠上皮细胞增殖作用密切相关。

MAPK 信号转导通路是由一系列蛋白激酶及其磷酸化作用构成的级联反应。大量研究表明,

MAPK 家族中的 ERK 信号转导通路是最为普遍的促进细胞增殖和分化的信号途径^[11],能被多种生长因子、细胞因子及促分裂剂激活^[12,13]。生长因子与其相应受体结合后能通过膜上的蛋白酪氨酸受体将信号传给 Ras,Ras 发生膜转位并激活丝氨酸/苏氨酸激酶 Raf,通过 MAPK 激酶使 ERK 1/2 磷酸化而激活,后者又激活转录因子 E2F,促使多种 DNA 合成前期/DNA 合成期(G1/S 期)转换及 DNA 复制所需基因表达,从而使整个细胞周期向前推进。使处于无增殖活动的细胞静止期(G0 期)/G1 期细胞进入增生活跃的 S 期和有丝分裂期(M 期),细胞出现增殖、分化。本研究结果显示,aFGF 处理后 I/R 损伤肠上皮细胞 ERK 1/2 活性短时间内迅速增强,在 I/R 后 15 min 和 30 min 时,其活性分别为假手术组的 3.0 倍和 7.5 倍,而 I/R 组 ERK 1/2 活性增加仅为 aFGF 处理组的 1/3 和 1/2。提示给予外源性 aFGF 能迅速激活肠上皮细胞内 ERK 1/2,使其活性短时间内成倍增加。同时发现,经 aFGF 处理后,ERK 1/2 活性峰值也较 I/R 组高 1.0 倍。相应 aFGF 处理后肠上皮 PCNA 阳性细胞数在 2、6、12 和 24 h 均较 I/R 组显著增加,这可能与 aFGF 通过 ERK 1/2 信号通路早期启动肠上皮细胞再生与修复程序,以及促进肠上皮细胞增殖有关。而预先给予 ERK 1/2 通路阻断剂,再给予 aFGF,则 ERK 1/2 的活性明显降低,肠上皮细胞增殖活动也减弱。提示 aFGF 促进肠上皮细胞再生与修复作用可能是通过激活 ERK 1/2 信号通路实现的。

参考文献:

- Xiaobing F, Cuevas P, Huiming T, et al. Acidic fibroblast growth factor reduces renal morphologic and functional indicators of injury caused by ischemia and reperfusion [J]. Wound Repair Regen, 1996, 4: 297-303.
- 付小兵, Cuevas P, 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.
- 付小兵, 杨银辉, 孙晓庆, 等. 激活内源性 bFGF 对肠缺血-再灌注所致肝肾及肠道损伤的保护作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12: 69-72.
- Fu Xiaobing, Yang Yinhui, Sun Tongzhu, et al. Effect of intestinal ischemia-reperfusion on expression of endogenous basic fibroblast growth factor and transforming growth factor in

- lung and its relationship with lung repair [J]. World J Gastroenterol, 2000, 6: 353 - 355.
- 5 Fu Xiaobing, Cuevas P, Gimenez - Gallego G, et al. The effects of fibroblast growth factor on ischemic kidney, liver and gut injury [J]. Chin Med J, 1998, 14: 398 - 403.
- 6 翁立新, 付小兵, 李秀霞, 等. 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 [J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 19 - 21.
- 7 Cano E, Mahadevan L C. Parallel signal processing among mammalian MAPKs [J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20: 117 - 122.
- 8 Seger R, Krebs E G. The MAPK signaling cascade [J]. FASEB J, 1995, 9: 726 - 735.
- 9 李田昌, 庞永政, 苏静怡, 等. 丝裂素活化蛋白激酶活性测定 [J]. 基础医学与临床, 1996, 16: 78 - 80.
- 10 Goke M, Kanai M, Lynch - Devancy K, et al. Rapid mitogen - activated protein kinase activation by transforming growth factor alpha in wounded rat intestinal epithelial cells [J]. Gastroenterology, 1998, 114: 697 - 705.
- 11 Robinson M J, Cobb M H. Mitogen - activated protein kinase pathway [J]. Curr Opin Cell Biol, 1997: 180 - 186.
- 12 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: 407 - 410.
- 13 Fu Xiaobing, Yang Yinhui, Sun Tongzhu, et al. Rapid mitogen - activated protein kinase by basic fibroblast growth factor in rat intestine after ischemia/reperfusion injury [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9: 1312 - 1317.

(收稿日期: 2005 - 08 - 16 修回日期: 2005 - 12 - 20)
(本文编辑: 郭方)

• 经验交流 •

血浆吸附治疗高胆红素血症临床观察

车龙 牛殿吉 金福东 孙兴安

【关键词】 血浆吸附; 高胆红素血症; 临床分析

高胆红素血症是肝细胞大量坏死的危险信号, 长期高胆红素血症极易发展为重型肝炎。为尽快降低肝病患者的血清胆红素含量, 减少重型肝炎的发生率, 我院采用血浆吸附法治治疗 40 例高胆红素血症患者, 报告如下。

1 临床资料

1.1 病例: 选择我院 2004 年 3 月 - 2005 年 3 月接受血浆吸附治疗的住院患者 40 例为治疗组, 男 28 例, 女 12 例; 年龄 22 ~ 75 岁, 平均 (48 ± 21) 岁; 急性乙型肝炎 8 例, 慢性重度乙型肝炎 5 例, 甲型肝炎 + 乙型肝炎 3 例, 戊型肝炎 12 例, 甲型肝炎 + 戊型肝炎 2 例, 戊型肝炎 + 乙型肝炎 10 例; 均未合并或并发症、肺、肾、脑等器官的严重病变或功能衰竭, 血清胆红素 > 171.1 μmol/L, 平均 (248.2 ± 56.1) μmol/L。另以同期住院患者 40 例为对照组, 其性别、年龄、病型及肝功能与治疗组基本一致, 除未采用血浆吸附治疗外, 其他治疗与治疗组一致, 具有可比性。

1.2 治疗: 两组均采用相同内科综合治疗。治疗组采用 P₁S 或 P₂S 血浆分离器, 以及一次性血液灌流器 (HA330 II, 丽珠公司) 和 Plasauto - IQ 型血浆分离机进行血浆吸附。观察治疗组治疗前后血清

作者单位: 110006 辽宁省沈阳市传染病院

作者简介: 车龙 (1965 -), 男 (汉族), 辽宁沈阳人, 副主任医师。

丙氨酸转氨酶 (ALT)、血清总胆红素 (TBIL)、白蛋白 (Alb)、凝血酶原活动度 (PTA)、血小板计数 (PLT) 和两组治疗前及治疗后 1、2 和 4 周 TBIL 变化, 以及两组发展成重型肝炎的比例和预后。

1.3 统计学处理: 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 使用 SPSS10.0 统计软件, 采用 *t* 检验, 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗组血浆吸附治疗后血清 TBIL 明显下降, PTA 明显上升 (P 均 < 0.05), ALT 和 PLT 略有下降 (表 1)。

表 1 治疗组血浆吸附治疗前后
血生化指标变化 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

指标	治疗前	治疗后
ALT (U/L)	452.1 ± 96.5	256.2 ± 32.4
TBIL (μmol/L)	248.2 ± 56.1	189.1 ± 41.6*
Alb (g/L)	31.7 ± 4.3	32.3 ± 4.1
PTA (%)	44.3 ± 0.2	60.5 ± 1.6*
PLT (× 10 ⁹ /L)	166.0 ± 20.4	158.0 ± 19.3

注: 与治疗前比较: * $P < 0.05$

2.2 两组治疗后 TBIL 均有所下降, 治疗组与对照组比较差异均有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 以治疗后 2 周最为明显。表明血浆吸附治疗 2 周对血清

胆红素的清除能力最强 (表 2)。

2.3 治疗组最终发生重型肝炎 2 例 (占 5%), 无一例死亡。对照组最终发生重型肝炎 10 例 (占 25%), 死亡 4 例 (占 10%)。

3 讨论

病毒性肝炎出现高胆红素血症而尚未发展成重型肝炎者, 目前仅使用促进胆红素代谢和促进胆汁分泌药物治疗, 效果不理想。若高胆红素血症不能及时控制, 极易发展为重型肝炎。

血浆吸附, 特别是新型树脂材料的血浆吸附, 作为一种人工肝支持系统可起到明显吸附胆红素及解毒功能。HA 型树脂灌流器属中性大孔树脂, 其吸附特点是容量大、速度快、机械强度高、生物相容性好, 具有相对特异性。主要吸附分子质量 500 ~ 5 000 u 的物质, 特别是与多种蛋白结合的毒性物质。胆红素分子质量为 584.67 u, 因此 HA 型树脂灌流器可用于临床治疗高胆红素血症。

总之, 血浆吸附治疗高胆红素血症可迅速降低血清胆红素水平, 以治疗后 2 周最明显, 还可清除体内其他有害物质, 改善肝功能, 降低重型肝炎发生率。

表 2 两组治疗前后 TBIL 变化 ($\bar{x} \pm s, n = 40$) μmol/L

组别	治疗前	治疗后 1 周	治疗后 2 周	治疗后 4 周
治疗组	248.2 ± 56.1	123.4 ± 36.4*	74.3 ± 34.1**	37.2 ± 17.2*
对照组	236.3 ± 61.4	202.7 ± 97.4	176.2 ± 64.5	94.6 ± 45.4

注: 与对照组同时点比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

(收稿日期: 2005 - 09 - 18) (本文编辑: 李银平)