

肝素对大鼠肝切除术后肝再生的影响

柴军武 蒋文涛 王 辉 李 剑 陈洪磊 林 娜 郑 虹 沈中阳

摘 要 **目的** 观察普通肝素对大鼠 50% 肝切除术后肝再生的影响。**方法** 健康雄性 Wistar 大鼠 54 只, 体重为 230 ~ 290g, 随机分为: A、B、C 组。A 组为 50% 肝切除术后 3h 皮下给予生理盐水(4ml/kg), B 组为 50% 肝切除术后 3h 皮下给予肝素(1000U/kg), C 组为假手术组(术后给予同剂量生理盐水)。各组在分别在术后 72、120、168h 随即处死 6 只, 称取肝脏重量, 计算肝再生指数, 机械法制肝脏单细胞悬液, 碘化吡啶 PI 染色后流式细胞仪上机, ModFit LT forMacV. 3.0 软件分析, 计算肝细胞增殖指数。**结果** A、B 两组肝切除术后 72h、120h 肝再生指数比较有统计学差异($P < 0.05$), 而两组间术后 168h 肝再生指数无统计学差异($P > 0.05$)。A、B 两组肝切除术后 72、120、168h 肝细胞增殖指数计较有统计学差异($P < 0.05$)。A 与 C、B 与 C 各时间段流式细胞仪检测细胞增殖指数差异明显($P < 0.05$)。**结论** 普通肝素(1000U/kg)可促进大鼠 50% 肝切除术后肝脏再生。

关键词 肝切除 大鼠 肝素 肝再生

Effects of Heparin on Hepatic Regeneration after Fifty Percent Partial Hepatectomy in Rats. Chai Junwu, Jiang Wentao, Wang Hui, Li Jian, Chen Honglei, Lin Na, Zheng Hong, Shen Zhongyang. Tianjin Medical University, Tianjin First Center Hospital, Tianjin 300192, China

Abstract Objective To investigate the effects of heparin on hepatic regeneration after 50% hepatectomy in rats. **Methods** Fifty - four Wistar rats(230 - 290g) were randomly divided into three groups(A, B, C). Fifty percent of hepatectomy was performed in selected rats in group A and B. Heparin(1000 U/kg) and saline were given after partial hepatectomy through the subcutaneously at a 24h interval before sacrifice in group A and B respectively. Sham operation was performed in group C. The same volume of saline were given after operation through the subcutaneously at a 24h interval in group C. Six rats were randomly sacrificed in every group. The wet liver weights were measured separately, and the hepatocyte suspension was made. Portiefrate index(PI) was detected by flow cytometry. **Results** There were differences in hepatic regenerative ratio between group A and B three and five days after operation ($P < 0.05$). There was no differences in hepatic regenerative ratio between group A and B three and five days after operation ($P < 0.05$). There were conspicuous differences in PI index between group A and C, between B and C($P < 0.05$). **Conclusion** Heparin (1000U/kg) given through the subcutaneously can significantly accelerate hepatic regeneration after 50% partial hepatectomy in rats.

Key words Partial hepatectomy; Rats; Heparin; Hepatic regeneration

肝素临床中广泛用于防治血栓形成或栓塞性疾病, 各种原因引起的弥散性血管内凝血, 也用于血液透析、体外循环、导管术、微血管手术等操作中及某些血液标本或器械的抗凝处理。但近期研究发现其除了抗凝外尚有影响血管再生、抗血栓、影响肝再生等作用。本研究初步探讨肝素对大鼠肝切除术后肝再生的影响。

材料与方法

1. 实验器材及动物: 实验器材包括显微器械包(上海金钟医疗器械厂提供), 9-0 无损伤带线缝合针, 电子天平(500g/

0.05d), 细胞计数板, 倒置显微镜, 细胞周期检测试剂盒(BD 公司), 电动吸引器等。实验动物选用健康雄性 Wistar 大鼠, 清洁级, 体重为 230 ~ 290g, 由军事医学科学院动物实验中心提供, 共 54 只, 体重为 230 ~ 290g。普通肝素(sigma 公司)。

2. 实验方法: (1) 手术方法: 大鼠肝切除术前自由进食水。参照 Higgins 法行 50% 肝切除, 即切除尾状叶、左侧叶和左中叶。假手术组开腹后, 游离左半侧肝周韧带后关腹。(2) 实验指标: ①肝再生速率 $X = (W_2 - W_1)/W_1$: 肝切除术后剩余肝重(W_1), 处死时肝重(W_2)。肝切除后用电子天平称取切除肝脏重量(R), 估算公式为 $W_1 = R/r - R$ 。实验前期采用 50 例大鼠全肝摘除行 50% 切除, 分别称取全肝和去除肝重, $r = \Sigma_1^{50} (\text{切除肝重}/\text{全肝重})/50$, 求得 $r = 0.498$; ②肝细胞再生指数 PI: 大鼠处死后即刻用眼科剪取左中叶, 机械法制作肝脏单细胞悬液, 倒置显微镜下用细胞计数板调整细胞数为 $1 \times 10^5/\text{ml}$, PI(碘化吡啶)染色后流式细胞仪上机, 计算肝细胞再生指数 $[PI = (S + G_2M)/G_{0/1} + S + G_2M]$ 。(3) 实验分组: 54 只

基金项目: 天津市科技计划项目(08ZCZDSF03110)

作者单位: 300192 天津医科大学第一中心医院器官移植中心(柴军武、蒋文涛、李剑、陈洪磊、郑虹、沈中阳); 卫生部危重病重点实验室(王辉、林娜)

Wistar 大鼠随机分为 A、B、C 组, 每组 18 只。A 组为 50% 肝切除术后 3h 皮下给予生理盐水 (4ml/kg), B 组为 50% 肝切除术后 3h 皮下给予肝素 (1000U/kg), C 组为假手术组 (术后给予同剂量生理盐水)。各组分别在术后 72、120、168h 随即牺牲 6 只, 称取肝脏重量, 计算肝再生速率, 流式细胞仪分析计算肝细胞再生指数。

4. 统计学方法: 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 13.0 统计软件包, 统计方法: 不同时间段内组间比较采用小样本 t 检验。

结 果

A 组术后 72、120、168h 肝再生指数分别为: $(45.6 \pm 6.3)\%$ 、 $(56.9 \pm 5.4)\%$ 、 $(92.3 \pm 5.2)\%$ 。B 组术后 72、120、168h 肝再生指数分别为: $(58.9 \pm 4.9)\%$ 、 $(83.8 \pm 6.1)\%$ 、 $(98.4 \pm 4.6)\%$ 。A、B 两组术后 72、120h 均有统计学差异 ($P < 0.05$), 而术后 168h 无统计学差异 ($P > 0.05$) (图 1)。A 组术后 3、5、7 天流式细胞仪检测, ModFit LT for Mac V. 3.0 软件分析, 计算肝细胞增殖指数分别为 $(38.4 \pm 2.0)\%$ 、 $(36.9 \pm 2.0)\%$ 、 $(31.6 \pm 3.0)\%$ 。B 组术后 3、5、7 天流式细胞仪检测肝细胞增殖指数分别为 $(52.1 \pm 2.0)\%$ 、 $(48.4 \pm 3.0)\%$ 、 $(49.8 \pm 4.0)\%$ 。C 组同法检测肝细胞增殖指数分别为 $(25.7 \pm 3.0)\%$ 、 $(23.4 \pm 2.0)\%$ 、 $(13.2 \pm 3.0)\%$ 。A、B 两组各时间段细胞增殖指数有统计学差异 ($P < 0.05$), A 与 C, B 与 C 各时间段流式细胞检测细胞增殖指数有统计学差异 ($P < 0.05$) (图 2)。

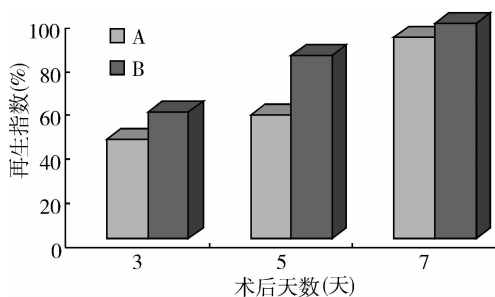


图 1 A、B 两组不同时间段术后肝再生指数的比较

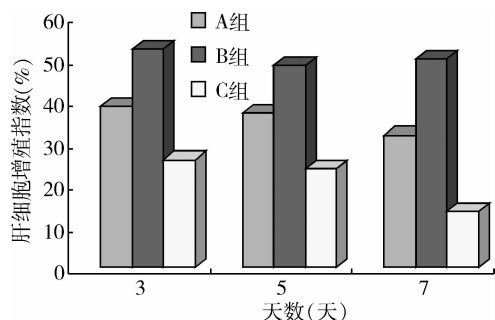


图 2 A、B、C 组流式细胞仪检测肝细胞增殖指数的比较

表 1 对照组和实验组肝切除后肝脏再生指数 ($\%, \bar{x} \pm s$)

术后天数	对照组 A	实验组 B	假手术组 C
3	38.4 ± 2.0	52.1 ± 2.0	25.7 ± 3.0
5	36.9 ± 2.0	48.4 ± 3.0	23.4 ± 2.0
7	31.6 ± 3.0	49.8 ± 4.0	13.2 ± 3.0

表 2 各组大鼠流式细胞仪检测肝细胞增殖指数 ($\%, \bar{x} \pm s$)

术后天数	对照组 A	实验组 B
3	45.6 ± 6.3	58.9 ± 4.9
5	56.9 ± 5.4	83.8 ± 6.1
7	92.3 ± 5.2	98.4 ± 4.6

讨 论

临床活体肝移植术后早期常应用普通肝素、低分子肝素钠或低分子肝素钙来预防或治疗肝动脉血栓形成, 而体内应用普通肝素对移植肝或供体残肝再生是否有明显影响, 目前尚无临床相关研究。国外就肝素对肝再生的影响基础研究文献较少, 观点尚不一致, 国内尚无相关文献报道。早在 1996 年, Kunio M 等^[1]报道: 肝素能使体外培养的细胞 (成纤维细胞、脐静脉内皮细胞) 分泌肝细胞生长素 (HGF) 3 ~ 6 倍以上, 且具有剂量依赖性, 能使大鼠血循环中的 HGF 水平增加 2 ~ 2.5 倍以上但在体外原代培养时却不能促进肝细胞的 DNA 合成。

实验中我们采取 50% 肝切除建立肝损伤后再生模型, 且所有手术均在每天 14 时以前完成避免了再生节律对术后肝再生的影响。肝素在术后 3h 给予, 避免了给予肝素后肝断面出血。有学者^[2,3]报道肝素通过腹膜注射给药, 而我们皮下多点给药避免了多次腹腔注射偶尔会损伤肠道, 甚至误伤腔静脉。

我们实验结果显示肝素明显促进肝脏的再生, 尤其是肝切除术后早中期, 而术后 168h 对照组和实验组无明显差异可能和肝容积恢复、肝再生逐渐停止有关。肝素促进体内 HGF 水平的升高主要可能机制有: HGF 可与许多细胞外基质分子结合, 如凝血酶敏感素、纤维结合蛋白和硫酸乙酰肝素等, HGF 也与细胞表面的肝素样分子具有高亲和力, 肝素可以结合 HGF 促进其释放^[2,4]。Naka 等用肝素洗涤肝细胞, 促进肝细胞表面的 HGF 释放。而 HGF 是首次被确认的肝脏有丝分裂原, 由非实质性肝细胞合成和分泌 HGF, 以旁分泌方式与其受体 c-Met 结合进一步促进肝再生, 可诱导肝细胞 DNA 合成, 且可促进转化生长因子合成^[5]。Teizo 等^[3]进行了肝素对肝硬化和正常鼠门静脉分支结扎后肝再生的影响的研究, 肝素剂

量为 1000U/kg, 腹膜内注射, 结果显示, 肝素促进 HGF 水平升高, 峰值在给药后 60、120min 后开始下降, 并且在肝硬化和正常鼠都促进了未结扎肝叶的再生, 提高了肝硬化大鼠的存活率。

然而, 香港 Li 等^[6]用 70% 肝切除大鼠观察发现肝素对肝再生无明显影响, 并不能促进肝功能恢复。土耳其学者 Yuceturk 等^[7]研究指出肝素不利于肝切除术后肝再生, 肝素组肝切除术后血清补体活性 (CH₅₀) 水平明显低于不给予肝素组, 阐述了肝素通过抑制补体 C1, 抑制补体参与的炎症级联反应, 肝再生也是一种炎症反应, 从这个角度上说肝素抑制了肝的再生。本实验初步结果显示肝素可促进大鼠 50% 肝切除术后肝再生, 进一步的肝素剂量分层, 不同给药方式和机制有待进一步研究。

参考文献

- 1 Kunio M, Toshikazu N. Heparin functions as a hepatotrophic factor by inducing production of hepatocyte growth factor[J]. Biochemical and biophysical research communications, 1996, 227: 455 - 461

- 2 Moreno E, Meneu J, Calle A, *et al.* Modulation of hepatocyte growth factor plasma levels in relation to the dose of exogenous heparin administered: an experimental studying rats [J]. Transplantation Proceedings, 2005, 37: 3943 - 3947
- 3 Teizo N, Shigeki A, Masayuki I, *et al.* Heparin accelerates liver regeneration following portal branch ligation in normal and cirrhotic rats with increased plasma hepatocyte growth factor levels [J]. Journal of Hepatology, 2002, 37: 87 - 92
- 4 Xu X, Jha AK, Jia X, *et al.* Heparin - decorated, hyaluronic acid - based hydrogel particles for the controlled release of bone morphogenetic protein 2 [J]. Acta Biomater, 2011, 7(4): 1508 - 1514
- 5 Go DP, Gras SL, Connor AJ, *et al.* Multilayered microspheres for the controlled release of growth factors in tissue engineering [J]. Biomacromolecules, 2011, 12(5): 1494 - 1503
- 6 Li Y, Wang HY, Chi HC. Effects of heparin on hepatic regeneration and function after partial hepatectomy in rats [J]. World Journal of Gastroenterology, 1999, 5(4): 305 - 307
- 7 Yuceturk H, Yagmurdu MC, Haberal M, *et al.* Role of Heparin on TNF - α and IL - 6 levels in liver regeneration after partial hepatic resection [J]. European Surgical Research, 2007, 39: 216 - 221

(收稿: 2011 - 05 - 24)

TrkA 与 snapin 蛋白的直接相互作用

王 岚 崔迎彬 马晓骊 陈 虹 王 欣 黄秉仁

摘 要 **目的** 确认 TrkA 与 snapin 蛋白间的直接相互作用。**方法** 采用 DNA 重组技术, 构建增强型荧光蛋白表达载体 pECFP - TrkAICD (TrkA 膜内区) 和 pEYFP - snapin, 共转染 HEK 293T 细胞后以激光扫描共聚焦显微镜观察并进行荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 分析。**结果** 成功构建了 snapin 和 TrkA 的重组质粒, 共转染细胞后激光扫描共聚焦显微镜分析表明两种蛋白分布在细胞质同一层面, 荧光共振能量转移 (FRET) 分析表明能量转移效率 > 5%, 与对照相比有显著区别 ($P < 0.05$)。**结论** 激光扫描共聚焦及 FRET 实验结果都证明了 TrkA 膜内区与 snapin 两个蛋白之间存在着直接的相互作用。

关键词 TrkA snapin 激光扫描共聚焦 荧光共振能量转移 蛋白质相互作用

Direct Interaction between TrkA and Snapin. Wang Lan, Cui Yingbin, Ma Xiaoli, Chen Hong, Wang Xin, Huang Bingren. National Laboratory of Medical Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract Objective To prove the presence of the direct interaction between TrkA and snapin. **Methods** By using DNA recombinant technique, the plasmids, pECFP - TrkAICD and pEYFP - snapin were constructed for expressing fused enhanced cyan fluorescent protein - TrkAICD and fused enhanced yellow fluorescent protein - snapin. After co - transfection of HEK 293 cell with these two plasmids, the study was performed with confocal laser scanning microscopy and fluorescence resonance energy transfer (FRET). **Results** It was successful to construct the fused fluorescent protein - expressing plasmids related with TrkAICD and snapin. After co - transfection of cells with them, confocal laser scanning microscopy analysis showed that these two protein were contributed to the same faultage in the cytoplasm. Fluorescence resonance energy transfer analysis showed that the energy transfer efficiency > 5%, and it was significant to com-