

• 基础研究 •

急性血栓性肺栓塞兔体内肝细胞生长因子的变化

梁明亭, 李义波, 杨永, 侯新华, 孔静博, 徐俊龙

【摘要】 目的 观察实验性急性血栓性肺栓塞(PTE)对兔血清和组织中肝细胞生长因子(HGF)水平的影响,探讨HGF对于肺栓塞的诊断价值。方法 将32只家兔随机分为血清HGF检测组(16只)和组织HGF检测组(16只),每组又分为对照组和实验组各8只。实验组采用自体血栓回输法建立肺栓塞模型,对照组以与自体血栓等量生理盐水注入。ELISA法检测0,1,3,6,12,24,48,72 h血清HGF含量;组织HGF检测组12 h处死家兔,取其肺、右心和肝组织,免疫组织化学法检测其HGF的表达。结果 模型组血清HGF水平显著高于对照组,并在家兔PTE后1 h开始升高,血清HGF含量在6,12,24,48 h升高幅度较大,于12 h升高最明显,与对照组比较差异显著 (1.7 ± 0.5) vs (0.26 ± 0.23) $\mu\text{g/L}$, $P < 0.001$],72 h开始回落。对照组则在较低水平 $(< 0.5 \mu\text{g/L})$ 。模型组肺和右心组织HGF的表达量明显高于对照组和其肝组织。两组间肝脏HGF的表达没有显著差异。HGF在肺组织的表达明显高于右心和肝组织。结论 HGF可作为早期PTE的辅助诊断。

【关键词】 肺栓塞;模型,动物;细胞因子类;肝细胞生长因子

【中图分类号】 R363

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2010)01-0073-05

Change of hepatocyte growth factor levels in rabbit with acute pulmonary thromboembolism

LIANG Mingting, LI Yibo, YANG Yong, et al

Department of Cardiology, Peoples Hospital of Liaocheng City, Liaocheng 252000, China

【Abstract】 Objective To study the influence of experimental acute pulmonary thromboembolism (PTE) on hepatocyte growth factor (HGF) levels in plasma and tissue of rabbit, and to explore the diagnostic value of HGF in PTE. Methods Thirty-two rabbits were randomly used for detection of HGF in plasma ($n=16$) and tissues ($n=16$). For each detection, the rabbits were further divided into control group and PTE model group, with 8 in each. The PTE model was established by intravenous injection of autologous blood clots, and the control group was injected with isometric normal saline. The HGF (0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h) level in plasma was detected by ELISA. The rabbits were sacrificed at 12 h, and the expression of HGF in tissue of lung, liver, and right side of the heart was detected by immunohistochemistry. Results The plasma HGF level was significantly higher in PTE group than in control group. It began to elevate at 1h after PTE, and reached its peak at 12 h, significantly higher than that in control group $[(1.74 \pm 0.49)$ vs (0.26 ± 0.23) $\mu\text{g/L}$, $P < 0.001$]. Then, it began to reduce gradually at 72 h. However, it remained at low level in control group through the whole experimental duration ($P < 0.5 \mu\text{g/L}$). In tissue of lung and right side of the heart, the expression of HGF was significantly higher in PTE group than in control group, while in liver tissue, it was not significantly different between PTE group and control group. The HGF expression in lung tissue was significantly elevated compared with right side of the heart and liver tissues. Conclusion HGF can be used for the adjunctive diagnosis of PTE.

【Key words】 pulmonary thromboembolism; model, animal; cytokines; hepatocyte growth factor

急性血栓性肺栓塞(pulmonary thromboembolism, PTE)是一种常见的外周血管疾病,约占肺栓塞全部病因的90%以上^[1]。在心血管病中其发病率仅次于冠心病和高血压,极易误诊和漏诊,PTE在我国开始一直被认为是少见病,而近十年来的临

床流行病学调查发现其发病率呈稳步上升趋势^[2]。有关研究显示^[3],血中肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor, HGF)水平在急性肺损伤的早期可升高,提示HGF对于PTE的早期诊断有价值。作者以家兔为研究对象,观察了PTE后血清HGF变化特征,

作者单位:252000 山东聊城市,聊城市人民医院心内科(梁明亭,李义波,杨永,侯新华,孔静博),病理科(徐俊龙)

通讯作者:李义波,E-mail:liyibolyb@126.com

为 HGF 在 PTE 早期诊断中的应用提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和分组 健康新西兰纯种白兔 32 只,体重 2.5~3.0kg,雌雄不限,购于山东省动物实验中心。将 32 只家兔随机分为 2 组,即血 HGF 检测组(16 只)和组织 HGF 检测组(16 只),每组又分为对照组和模型组各 8 只。模型组采用自体血栓回输法建立肺栓塞模型^[4],对照组以与自体血栓等量的生理盐水注入。

1.2 制作模型 苯巴比妥钠 150~200 mg/kg 腹腔注射麻醉后,将家兔置于固定架,股部剪毛,常规消毒,循股动脉波动内侧切开皮肤,分离皮下组织找到股静脉,应用类似 seldinger 法穿刺股静脉^[3],将 5F 鞘管扩张管(由 Cordis 公司生产,内径为 0.056in)插至右心房或接近右心房的下腔静脉处,将预制栓子(直径为 1 mm,长约 3 mm)通过鞘管扩张管分次注入,每次 4~6 个,并用 2 ml 生理盐水冲洗,以防栓子滞留在鞘管扩张管中,每隔 3~5 min 重复注入,直至家兔出现呼吸急促、口唇及耳朵紫绀等缺氧症状,且血氧饱和度降至 80%~85%,心率较术前增加 35~45/min,停止继续注入,对照组则给予等量生理盐水。拔除扩张管,局部压迫止血,缝合切口,整个过程中家兔应保持仰卧位。密切观察家兔生命体征及心电图变化,必要时予以心肺复苏等抢救措施。

1.3 血 HGF 的检测 血 HGF 检测组造模后 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 72 h 自家兔耳缘静脉采集血样,将血样转移到 Na₂EDTA(1g/L)的试管中,离心半径 17.5 cm 3000 r/min 离心后,-80℃ 冷存,待完成各组家兔处理后,同时进行 HGF 的 ELISA 检测,采用双抗体夹心法进行操作,在酶标仪上,于 450 nm 处,

以空白对照孔调零后测各孔吸光度(A)值,绘制吸光度-浓度曲线,通过 A 值,计算 HGF 含量。

1.4 组织中 HGF 的检测 组织 HGF 检测组造模后 12 h,过量麻醉处死家兔取其肺、右心(包括右房和右室,尽量在同一平面切取,并将房室组织固定在同一蜡块,下同)和肝,10%中性甲醛固定 24 h 以上,每个组织切成 3 块,分别用石蜡包埋。将石蜡包埋组织连续切片,每个蜡块至少两张,切片厚度约为 4 μm,其中一张用于常规 HE 染色,另一张脱腊、水化后用于免疫组化染色,一抗为兔多克隆抗体,二抗包含在即用型 SABC 免疫组化试剂盒内(均购于武汉博士德生物工程有限公司),按照 SABC 法进行免疫组化检测。

1.5 结果判断 HGF 阳性表达为细胞浆中或胞核有棕黄色颗粒沉着,每片观察 5 个视野(400 倍),根据着色程度和着色细胞数综合判断 HGF 表达:≤1 分为阴性(-),2~3 分为弱阳性(+),≥4 分为强阳性(++)。

1.6 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件包进行分析,血清 HGF 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较用单因素方差分析,各个时间点间比较采用两样本 *t* 检验;组织 HGF 表达量为计数资料,采用 χ^2 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学显著意义。

2 结 果

2.1 模型建立验证^[5] 模型组随着栓子量的增加,家兔呼吸和心率加快,口唇、双耳紫绀,偶有肌颤、抽搐,可闻及干湿啰音,监护仪示血氧饱和度下降,心电图Ⅲ导联示 T 波倒置,对照组没有上述变化。病理切片镜下找到栓子,可观察到肺间质水肿,炎细胞浸润等变化(图 1)。

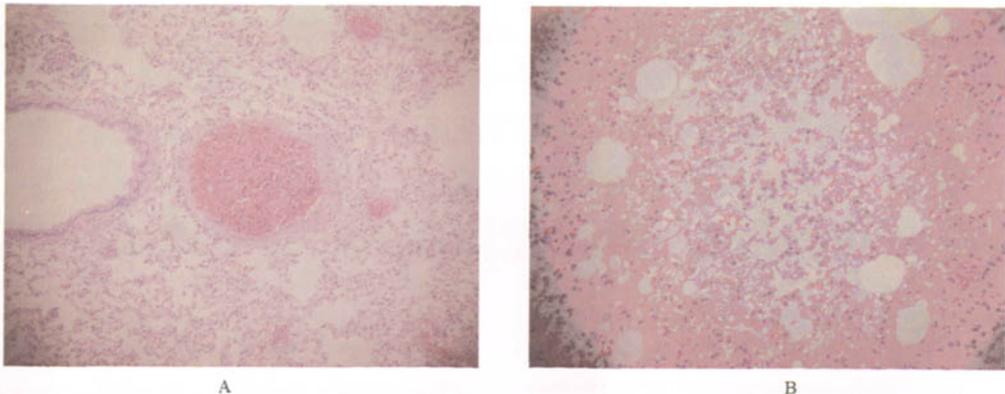


图 1 显微镜下肺动脉中的栓子(A,×200)及肺组织淤血、充血及炎细胞浸润等病理改变(B,×200)

2.2 血清 HGF 的变化特征 模型组在 1,3,6,12, 24,48,72 h 血 HGF 值均高于对照组,在 6,12,24, 48 h 升高更为显著(表 1)。对照组没有明显变化特征,保持在较低水平。

2.3 HGF 在各个组织的表达 k 模型组 HGF 在肺和右心组织的表达高于对照组和肝组织($P < 0.05$),在肝组织两组差异没有统计学意义。其中肺组织的 HGF 表达显著高于对照组($P < 0.01$),同时高于右心和肝组织($P < 0.01$;表 2)。

2.4 HGF 的免疫组织化学检测 见图 2。

3 讨论

HGF⁶⁷ 是一种间质源性的多功能细胞因子,

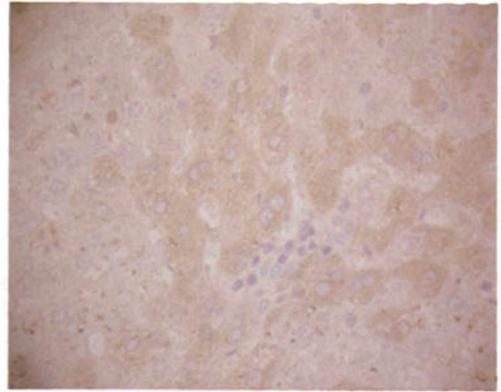


图 2B HGF 在肝组织的胞浆着色(×400)

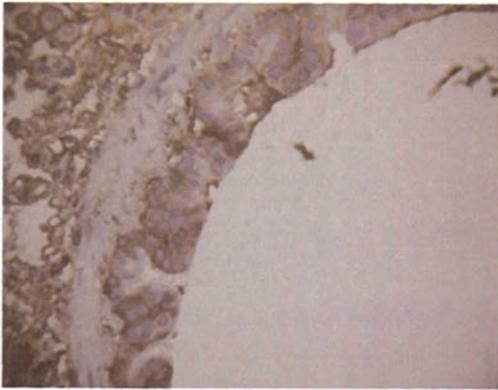


图 2A HGF 在肺组织的表达(×400)



图 2C HGF 在右心组织的表达(×400)

表 1 对照组和模型组在各个时间点的血清 HGF 浓度($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	血 HGF 浓度							
	0	1	3	6	12	24	48	72(h)
对照组	0.34±0.26	0.4±0.3	0.28±0.23	0.24±0.12	0.26±0.23	0.26±0.24	0.34±0.24	0.24±0.19
模型组	0.5±0.3	0.9±0.3*	0.72±0.23*	1.0±0.4*	1.7±0.5*	1.0±0.4*	1.4±0.5*	0.72±0.27*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,* $P < 0.01$ 。HGF:肝细胞生长因子

表 2 HGF 在肺、右心、肝组织的表达水平

组别	组织类型	组织 HGF 表达水平			P 值
		阴性	弱阳性	强阳性	
对照组	肺脏	19	4	1	$P < 0.01$
模型组		2	5	17	
对照组	右心	19	4	1	$P < 0.01$
模型组		6	9	9	
对照组	肝脏	20	3	1	$P > 0.05$
模型组		16	5	3	

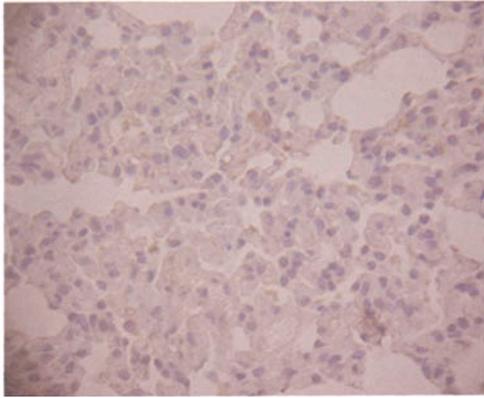


图 2D HGF 在肺组织表达的阴性对照($\times 400$)

由一条含有 728 个氨基酸残基的单链前体蛋白裂解而来,其活性形式是一条重链和一条轻链通过二硫键连接而成的异二聚体双链结构,因最初被发现可以刺激肝细胞 DNA 合成而得名,后来通过研究证明,HGF 并没有肝脏特异性,而是在多种细胞和组织表达,包括成纤维细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞等都可以合成和分泌 HGF,在肺脏则可以在支气管和肺泡上皮细胞检测到 HGF 的表达。

3.1 肺栓塞后血清 HGF 的测定及意义 本实验通过 ELISA 法检测了 PTE 后不同时间点的血清 HGF 浓度,显示 HGF 在 PTE 后 1 h 开始升高,12 h 升高最明显,并持续至 72 h 开始下降,变化趋势与国外 Nagai 等^[3]的研究结果大体一致,且峰值时间都为 12 h。即血清 HGF 在肺栓塞后较早升高,提示了 HGF 对于肺栓塞有早期辅助诊断价值,如果血清 HGF 主要来源于损伤的肺脏可能意义更大,并据此以 12 h 为时间点,处死家兔,取其肺脏、右心及肝脏,通过免疫组化法检测 HGF 在不同组织的表达,进而探讨血 HGF 的来源及升高机制问题。

3.2 HGF 在不同组织的表达及其意义 结果发现,HGF 在正常的肺,肝和心脏组织都可以表达,免疫组化显示主要表达在胞浆,且以间质细胞为主,在右心组织可以看到较少的胞核表达,与对照组比较,模型组中 HGF 在肺组织为强阳性表达,明显高于右心和肝组织,常规 HE 染色可以观察到肺淤血、水肿、炎细胞浸润等损伤,而成纤维细胞、中性粒细胞和巨噬细胞等间质细胞表达 HGF 最为显著;支气管和肺泡上皮细胞也有表达,但和对照组相比两组变化不大,即在肺栓塞时血 HGF 主要由间质细胞和炎细胞合成分泌,肺组织损伤较重的区域炎细胞浸润较多,HGF 表达量也相应增多,提示了血 HGF 水平与肺栓塞程度的相关性。而在右心组织

表达为阳性的肺栓塞兔,镜下观察到心肌纤维间隙明显增宽,部分有轻度淤血,提示右心负荷显著增加,可能由于偶有几个栓子黏连成大个栓子栓塞肺主动脉,造成家兔短时间出现大面积栓塞而致。由于总体上肝组织在栓塞前后损伤变化不明显,所以 HGF 在两组肝脏的表达没有统计学差异。在对照组出现的部分阳性表达,可能为建模、取切组织、免疫组化等操作过程中人为因素影响。可以看到,HGF 可在多种组织细胞表达,且以胞浆为主,在肺栓塞时,血清 HGF 则主要由肺脏特别是损伤的肺叶合成分泌。

3.3 血清 HGF 的升高机制 业已证实,HGF 不仅在肺泡上皮细胞表达,间质细胞如巨噬细胞、中性粒细胞、成纤维细胞等也可分泌 HGF,许多炎症因子可使血 HGF 升高则可能与 PTE 时血 HGF 含量增加有关,但 HGF 升高的机制还没有被完全阐明,Nagai 等^[3]以大鼠为研究对象的研究结果显示,PTE 时白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 的 mRNA 水平升高峰值早于 HGF mRNA 的升高峰值大约 5h,推测 IL-1 β 上调了 HGF 基因的表达,而 IL-1 是由巨噬细胞、中性粒细胞、血管内皮细胞等产生的一种多功能因子,在 PTE 急性期 IL-1 作为一种重要的炎症因子参与急性期蛋白合成等过程,另有研究^[7]证实,IL-1 β 可增加培养的人皮肤成纤维细胞中 HGF mRNA 的表达,所以 PTE 时 IL-1 大量增加可能与血清 HGF 升高有关。另外,在 HGF 转录起始区有 IL-6 核因子结合域^[8],提示 IL-6 可以促使 HGF 转录,而在急性肺损伤患者中 IL-6 血清水平是升高的^[9],据此血浆 HGF 水平在 12h 达到峰值也和上述基因调节机制相关。除基因调节外,Miyazawa 等^[10]发现急性肺损伤时,在肝脏一种可水解 HGF 前体蛋白的水解酶可被诱导激活,提示局部 HGF 前体蛋白的水解活性也参与了血 HGF 升高的调节。具体发生机制尚待深入研究。

本实验通过检测 PTE 后不同时间点血 HGF 水平及其在不同组织的表达,证实了 HGF 在肺栓塞后早期即可升高,12 h 达高峰,而血 HGF 主要来源于损伤的肺组织,HGF 在模型组肺脏中的阳性表达为 91.7%,强阳性表达为 70.8%,而在对照组肺脏中的阴性率为 79.2%,当然其诊断价值还需要大量的临床试验来论证,不过该结果为其临床应用提供了实验依据,提示 HGF 可作为早期 PTE 的辅助诊断,而其特异性尚有待实验观察,其阴性可能有助于排除 PTE 的诊断。

(下转第 78 页)

2.3 PCI患者不同包扎材料术后舒适度比较(表3) 在两组不同包扎材料的PCI患者中,“优力舒”腰背部酸痛的发生率明显少于“耐乐固”组(63.6% vs 75.3%),VAS评分明显少于“耐乐固”组(5.9±2.0 vs 6.4±1.6)。

表3 PCI患者不同包扎材料术后舒适程度比较

组别	腰背部酸痛[n(%)]	VAS评分
优力舒组	152(63.6)	5.9±2.0
耐乐固组	140(75.3)*	6.4±1.6*

注:与优力舒组比较,*P<0.05。VAS:视觉模拟量表

3 讨论

随着医疗水平的提高,越来越多的患者愿意接受冠状动脉造影检查及PCI治疗,但术后血管并发症已成为患者及介入医师共同关注的焦点。传统术后的包扎方式是以厚纱布及纱布卷压迫患处,再以绷带八字型包扎。近来,新型弹力绷带“优力舒”及“耐乐固”逐步取代了传统的绷布卷。“优力舒”为低敏弹力胶布,十字交叉固定敷料,患者腰背部不受

压,操作亦较便捷。“耐乐固”为自黏性弹力绷带。八字型包扎固定敷料,因绷带自身有较强回缩力,与传统绷带相比较固定力更强,理论上血肿发生率应低于“优力舒”组。但在本组研究中,两组不同包扎材料血肿发生率无统计学差异。其原因可能与“耐乐固”八字型包扎方式较为复杂,有关患者多次作挺腰抬臀动作,增加了早期出血的机会。另外患者因前后腰均受绷带压迫,局部不适,常因腰背部不适或心情烦躁做早期活动从而增加出血机会。

本研究结果表明,经股动脉途径行PCI术后“优力舒”及“耐乐固”两种弹力绷带对与血肿发生情况无明显差异,腰背部疼痛“优力舒”优于“耐乐固”。对胶布过敏的患者可选用“耐乐固”。

【参考文献】

[1] 梁兆光,周玉杰,陈柯萍,主编.现代心脏疾病介入诊疗基础[M].北京:人民卫生出版社,2007.36.

(收稿日期:2008-12-1;修回日期:2009-05-04)

(上接第76页)

【参考文献】

[1] 翟振国,王辰.肺栓塞-深静脉血栓形成的研究现状与展望[J].中国实用内科杂志,2006,26(14):1050-1052.

[2] Gotway MB, Edinburgh KJ, Feldstein VA, et al. Imaging evaluation of suspected pulmonary embolism[J]. Curr Probl Diagn Radiol, 1999,28(5):129-184.

[3] Nagai K, Aoe M, Shimizu N. Rapid response of hepatocyte growth factor in pulmonary ischemia in a rat model[J]. Acta Med Okayama, 2004,58(3):119-125.

[4] 李晓光,刘雅君,王乐民,等.急性肺栓塞的动物实验研究[J].中华心血管病杂志,2001,8(5):47-49.

[5] 谭焱,殷桂林,胡建才,等.不同栓塞范围的急性肺栓塞动物模型建立[J].中国病理生理杂志,2006,22(11):2287-2288.

[6] Chirgadze DY, Hepple J, Byrd RA, et al. Insights into the structure of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) and implications for receptor activation[J]. FEBS letters,1998,430(1-2):126-129.

[7] Ware LB, Matthay MA. Keratinocyte and hepatocyte growth factor in the lung: roles in lung development, inflammation, and repair[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002, 282(5): L924-L940.

[8] Deborah D, Chen G, Khalil N. Increase in the beta chain of hepatocyte growth factor precedes c-Met expression after bleomycin-induced lung injury in the rat [J]. Exp Lung Res, 2002, 28(4): 301-314.

[9] Kinoshit AM, Miyamoto T, Ohashi N, et al. Thrombosis increases circulatory hepatocyte growth factor by degranulation of mast cells[J]. Circulation, 2002, 106(24): 3133-3138.

[10] Miyazawa K, Shimomura T, Naka D, et al. Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury[J]. J Biol Chem, 1994, 269(12): 8966-8970.

(收稿日期:2008-12-03;修回日期:2009-05-15)