

## 鲨鱼肝刺激物的促肝细胞增殖和抗小鼠急性肝损伤作用

### Shark hepatic stimulator substance promoting proliferation of hepatocyte and preventing acute hepatic injury in mice

范秋领<sup>1,2</sup>, 金艳<sup>2</sup>, 黄才国<sup>2</sup>, 冯波<sup>2</sup>, 魏善建<sup>2</sup>, 缪辉南<sup>2</sup>, 焦炳华<sup>2</sup>, 袁勤生<sup>1</sup>

(1. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; 2. 第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

[关键词] 肝刺激物; 肝细胞增殖; 急性肝损伤

[中图分类号] R 575

[文献标识码] B

[文章编号] 0258-879X(2005)02-0227-02

肝刺激物(hepatic stimulator substance, HSS)是从初断乳大鼠肝和部分肝切除后的再生肝中发现的一种肝脏刺激因子,它存在于新生肝和再生肝的肝细胞胞液中,能刺激肝细胞有丝分裂,促进肝细胞再生和肝细胞 DNA 的合成。与其他肝细胞因子不同, HSS 的作用只有组织特异性,而没有种属特异性,目前已从猪、狗、兔等多种动物的乳肝组织及人胎肝组织中提取出 HSS。大量研究证明,从哺乳动物提取的 HSS 对 CCl<sub>4</sub>、D-(+)-氨基半乳糖、硫代乙酰胺(TAA)、乙醇造成的大鼠急性肝损伤有明显的保护作用<sup>[1,2]</sup>。研究表明鲨鱼组织提取物有可能用于提高和改善人类机体免疫状况<sup>[3]</sup>。本文探讨了其对小鼠急性肝损伤的影响。

#### 1 材料和方法

1.1 材料和试剂 昆明系小鼠 144 只, 7~8 周龄, 雄性, 体重 18~22 g, 购自第二军医大学动物实验中心; 幼鲨采自浙江省舟山群岛, 取出肝脏置于 -80℃ 冰箱保存; 人肝癌细胞株 HepG 2 源于 ATCC, 购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所细胞库; D-(+)-氨基半乳糖购自嘉兴恒杰生物工程有限公司; [<sup>3</sup>H]-TdR 购自中国科学院上海原子能研究所; MEM 培养基购自 Sigma 公司; 分析纯 TAA(纯度 99.0%)、CCl<sub>4</sub>(纯度 95.0%) 购自上海凌峰化学试剂有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 鲨鱼肝 HSS 的制备 300 g 幼鲨的肝脏加入到预冷的 1 L pH 7.2 PBS 中, 高速匀浆, 匀浆液 70℃ 保温 20 min, 4℃ 27 000 × g 离心 60 min, 取上清, 过滤, 滤液按 1:6 加入 -20℃ 预冷的 40% 乙醇, 继续搅拌 2 h, 4℃ 27 000 × g 离心 20 min, 沉淀用三蒸水溶解, -20℃ 冰箱备用。

1.3 促肝细胞增殖活性测定 人肝癌细胞 HepG 2 以含 10% 胎牛血清的 MEM(含非必需氨基酸, Earle 盐)培养基培养, 将 1 × 10<sup>5</sup> /ml 的细胞悬液接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μl, 于 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱培养 12 h, 换用无血清 MEM 培养基继续培养 12 h, 加入 sHSS 溶液(对照组加入蒸馏水), 补加无血清 MEM 培养基至 200 μl, 培养 24 h 后, 每孔加入 0.185 MBq [<sup>3</sup>H]-TdR 继续培养 4 h, 以胰蛋白酶消化细胞, 收集细胞并进行液闪计数, 结果以刺激指数(IS)表示, IS = A<sub>实验组</sub> / A<sub>对照组</sub>。

1.4 CCl<sub>4</sub>、TAA 所致小鼠急性肝损伤模型 取健康昆明系

小鼠, 随机分为 4 组(每组 36 只): 正常对照组、CCl<sub>4</sub> 模型组、TAA 模型组、治疗组。治疗组按 20、50、80 mg/kg 注射 2 次 sHSS(每个剂量 6 只小鼠), 间隔 4 h, 正常对照组注射相应体积的橄榄油或生理盐水。第 2 次注射后 1 h, CCl<sub>4</sub> 模型组按 10 ml/kg 腹腔注射 0.1% CCl<sub>4</sub>(CCl<sub>4</sub> 溶于橄榄油), TAA 模型组按 400 mg/kg 腹腔注射 40 mg/ml TAA, CCl<sub>4</sub> 模型组及对应的治疗组 16 h 后, TAA 模型组及对应的治疗组 24 h 后, 小鼠经眼眶静脉丛采血(采血前 12 h 禁食不禁水), 取血清分别用日立 7600-020 自动化生化分析仪测定丙氨酸转氨酶(ALT)、门冬氨酸转氨酶(AST)活性。

1.5 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 *t* 检验。

#### 2 结果

2.1 sHSS 促肝细胞增殖作用 在肝癌细胞 HepG 2 增殖的过程中, [<sup>3</sup>H]-TdR 能掺入到合成的 DNA 中, 与加入生理盐水的细胞组相比, 加入 sHSS 的细胞组 [<sup>3</sup>H]-TdR 掺入到 DNA 中的量与 sHSS 的浓度呈正相关( $r = 0.9957$ ,  $P < 0.01$ )。随着 sHSS 浓度的增加, 其对 HepG 2 细胞的刺激指数逐渐增加, 当 sHSS 浓度为 160 μg/ml 时, 其对 HepG 2 细胞的刺激指数达到 5.33 ± 0.04(表 1)。

表 1 sHSS 对肝细胞 HepG 2 的促增殖作用

( $n = 6, \bar{x} \pm s$ )

组别	[ <sup>3</sup> H]掺入 DNA 的量 (Bq/μgDNA)	刺激指数
对照组(生理盐水)	286.0 ± 8.1	1.00 ± 0.00
sHSS(μg/ml)		
5	395.2 ± 10.2**	1.38 ± 0.04**
10	577.9 ± 6.6**	2.02 ± 0.02**
20	726.8 ± 12.9**	2.54 ± 0.05**
40	962.2 ± 10.3**	3.37 ± 0.04**
80	1 358.2 ± 11.2**	4.75 ± 0.04**
160	1 524.9 ± 11.7**	5.33 ± 0.04**

\*\*  $P < 0.01$  与对照组比较

[基金项目] 上海-SK 研究与发展基金(2003003-S)。

[作者简介] 范秋领(1971-), 男(汉族), 博士生, 讲师。