

促肝细胞生长素肠溶胶囊与其注射剂对大鼠肝切除后肝再生影响的对照实验研究

李宁¹, 赵晓飞¹, 俞保彬², 周正兵², 高英², 周天琼² (1. 首都医科大学附属北京佑安医院, 北京 100069; 2. 杭州华锦药业有限公司, 杭州 310013)

摘要:目的 通过应用不同剂量的促肝细胞生长素 (HGF) 肠溶胶囊剂与注射剂, 来判断两种给药方式和不同剂量对肝再生的影响。方法 本试验采用雄性 SD 大鼠 144 只, 随机分为 4 组, 分别于肝部分切除术后 12, 24, 48, 72, 120, 168 h 麻醉后, 腹主动脉取血提取血清测量 ALT、AST、ALB 和 TBIL, 完整取出大鼠肝脏并称重残肝重量, 并计算肝再生率 (HRR), 切取新鲜肝组织应用流式细胞分析技术测量细胞周期, 其余组织以 10% 中性福尔马林固定后行 HE 染色观察标本大体形态, 并行免疫组化观察增殖细胞核抗原 (PCNA)。结果 当静脉组和口服组应用相同剂量的 HGF 时, 口服组与静脉组的促进肝再生效果相似。当口服应用 HGF 剂量是静脉剂量的 3 倍时, 口服应用 HGF 促进肝再生效果优于静脉应用, 尤其以术后 24 h 更明显。用药途径同为口服时, 3 倍剂量组的促进肝再生效果优于 1 倍剂量组, 其中以术后 24 h 和 48 h 最明显。结论 HGF 肠溶胶囊避免了胃酸对本品的破坏, 综合疗效优于静脉注射 HGF。

作者简介: 李宁, 男, 博士, 教授

Tel: (010) 63293375

E-mail: lining@bjyah.com.cn

Controlled Experiment on the Effect of Hepatocyte Growth-Promoting Factors Enteric-Coated Capsules or Its Injection on the Liver Regeneration in Rats after Hepatectomy

LI Ning¹, ZHAO Xiao-fei¹, YU Bao-bin², ZHOU Zheng-bing², GAO Ying², ZHOU Tian-qiong² (1. Beijing You'an Hospital Affiliated of Capital University of Medical Sciences, Beijing 100069, China; 2. Hangzhou Huajin Pharmaceutical Co., Ltd, Hangzhou 310013, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE With different doses of hepatocyte growth-promoting factor (HGF) by different administrations to investigate the effect of these two routes of administration on liver regeneration. **METHODS** Healthy male SD rats were randomly divided into four groups. Rats were sacrificed at different time points (12, 24, 48, 72, 120, 168 h). The blood was sampled to measure the serum of ALT, AST, ALB and TBIL. Relative liver weight was measured too. The mitotic index and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling index were evaluated as histopathologic parameters. **RESULTS** The effects of HGF administered orally and intravenously was similar on liver regeneration at the same dose. And orally administered HGF had better effect on liver regeneration when the dose was triple of that of intravenously administered HGF, especially at 24 h after partial hepatectomy (PH). When HGF administered orally, the effect of HGF was better if the dose was triploid, especially at 24 h and 48 h after PH. **CONCLUSION** Hepatocyte growth-promoting factors enteric-coated capsules avoid the destruction of gastric acid, the synthesis effects is superior to intravenously.

KEY WORDS: hepatocyte growth-promoting factor; liver regeneration; partial hepatectomy; proliferation cell nuclear antigen; proliferation index

我国是病毒性肝炎的高发区,其发病率约占全球肝炎患者总数的一半。据统计^[1],全国至少有1亿以上的乙肝病毒携带者和3000万以上的丙肝病毒感染者,3000万以上慢性肝炎患者,他们不仅构成肝炎的传染源,而且其中不少人经久不愈,可发展为肝硬化甚至演变为原发性肝癌。迄今为止,手术切除是治疗原发性肝癌的首选治疗方法,虽然随着诊断、手术技术以及围手术期治疗水平的提高,肝切除术后并发症和死亡率均有所下降,但是相对于其他普外科手术相比,其术后并发症仍然维持在较高水平。肝功能衰竭(liver failure)是肝切除术后早期最重要并较常见的并发症之一,是导致术后死亡的重要原因。我国肝癌病人多伴有肝硬化,肝再生能力有限,肝功能难以承受手术的打击而发生肝衰竭。因此,肝切除术后早期保护肝功能对于术后病人恢复,降低术后死亡率很重要。保护肝功能的中心是保护肝细胞和促进肝再生。最初从断乳大鼠和部分肝切除后的再生肝脏中提取出来的促肝细胞生长素(HGF)既能促进肝细胞损伤后的再生和修复,又能保护肝细胞,因此在肝病治疗占据了重要的位置。1994年该品种被卫生部批准为一类生化新药。目前国内临床应用的剂型主要有肠溶胶囊剂、注射剂。已有报道,HGF在治疗重症肝炎、慢性活动性肝炎、肝硬化、丙肝、戊肝以及郁胆型肝炎的治疗均取得了优于对照组的效果。近年来又有用HGF辅助治疗乙型病毒性肝炎和原发性肝癌的报道,显示了HGF具有极为广阔的应用前景。

本试验的研究基础为肝脏的双重血供,肝脏由肝动脉和门静脉双重供血,而门静脉主要收纳胃肠道及腹腔脏器的血

液,故胃肠道吸收的HGF可直接到达肝脏发挥作用,而静脉制剂需经血液循环后再分布至肝脏发挥作用。本试验应用不同剂量的口服及静脉2种途径来比较HGF对肝再生的影响,从而了解HGF在不同的给药方式下对促进肝再生效果的差异,指导临床治疗。

1 材料与方法

1.1 材料

电子显微镜(Motic B5 professional series motictek 3.1 preview);组织切片机(LEICA RM21357);流式细胞仪(CYTOMIC FC 500, multicycle for window 32 bit version分析系统);MB-80微生物快速动态检测系统;IMAGE 800(BECKMAN coulter immunochemistry system);酶标仪(The molabsystems multiskan Ascent 126);促肝细胞生长素肠溶胶囊由杭州华锦药业有限公司生产,批号071001,规格250 mg·粒⁻¹(含多肽50 mg);注射用促肝细胞生长素由广东省药物研究所制药厂生产,批号070902,规格每瓶含多肽20 mg。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 健康雄性2月龄SPF级Sprague-Dawley大鼠(中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心)^[2],体重200~250 g,共144只,经适应性饲养1周,随机分为4组:对照组、口服1组、口服2组、静脉组,观察术后12, 24, 48, 72, 120, 168 h各时相点^[3],每组6只,并保证每组至少5只存活。对照组行肝部分切除术,术后6 h尾静脉注射生理盐水2 mL·d⁻¹。口服1组行肝部分切除术,术后6 h

尾静脉注射生理盐水 2 mL·d⁻¹,并口服给予 HGF 肠溶胶囊 (2 mg·d⁻¹)。口服 2 组行肝部分切除术,术后 6 h 尾静脉注射生理盐水 2 mL·d⁻¹,并口服给予 HGF 肠溶胶囊 (6 mg·d⁻¹)。静脉组行肝部分切除术,术后 6 h 尾静脉注射生理盐水与注射用 HGF 混合液 2 mL·d⁻¹ (2 mg·d⁻¹)。

1.2.2 肝部分切除模型 术前大鼠禁食水 8 h,将大鼠称重后,按体重腹腔注射 1%戊巴比妥钠 (20 mg·kg⁻¹),麻醉满意后取仰卧位,固定在自制的手术台上,刮毛,3%碘伏消毒腹部皮肤,Higgins^[4]经典方法,上腹正中切口入腹,自剑突下纵形剪开腹壁,约 4 cm,用自制的腹部拉钩牵拉腹腔,显露大鼠肝脏,游离肝脏周围的韧带,用 7 号丝线分别于肝左叶及中叶蒂部结扎。以眼科剪完整剪除大鼠肝中叶和肝左叶,避免残留组织过多影响切除肝脏重量,以及坏死组织多影响大鼠恢复并清理腹腔。检查结扎切断处有无出血,一切正常,进行双层缝合腹壁,关闭腹腔。术后大鼠常规分笼饲养,自由饮水。

静脉注射:采用尾静脉注射,注射完毕后把尾部向注射侧弯曲以止血。

口服给药:左手抓住鼠背部及颈部皮肤将动物固定,助手辅助使大鼠嘴张开,以镊子垂直夹住胶囊,沿咽后壁徐徐插入食道。并以注射少量大鼠饮用水至口腔,刺激吞咽反射,促使大鼠吞咽胶囊。

1.2.3 残余肝组织形态的观察 预定相点处死大鼠,切取全部肝脏,生理盐水冲洗后称量,然后迅速切取肝右叶固定部位约 1.0 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小肝组织块,浸入 20 倍于肝组织块体积的 10%中性甲醛中固定 24 h,常规脱水、透明、石蜡包埋、切片及 HE 染色,光镜观察。

1.2.4 肝脏再生功能的评价 肝再生是肝损伤后肝脏修复的必经过程。有多种方法可用于肝再生状态的评价,但各有优缺点^[5],目前还没有公认的金标准,本试验从以下方面进行观察。

1.2.4.1 术后残肝重量的变化 于预定相点,称量大鼠体重,腹主动脉取血处死大鼠,切取全部残余肝脏,生理盐水冲洗后称量,并计算肝再生率 (HRR),公式如下:

$$HRR/\% = \frac{C - (A - B)}{A \times 100}$$

A: PH 术前大鼠肝脏总重量,总肝重量 (A)是大鼠体重的 3.4%^[6]; B:术中切除肝脏重量; C:处死大鼠时再生肝脏重量。

1.2.4.2 流式细胞仪检测肝脏组织增殖指数 (PI)

1.2.4.3 增殖细胞核抗原 (PCNA)阳性指数

表 1 PCNA 阳性指数 (%) ($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Proliferation cell nuclear antigen (%) ($\bar{x} \pm s$)

	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h
对照组	0.23 ± 0.10	0.19 ± 0.06	0.17 ± 0.02	0.21 ± 0.03	0.21 ± 0.01	0.18 ± 0.07
口服 1 组	0.27 ± 0.05	0.20 ± 0.05	0.21 ± 0.07	0.25 ± 0.05	0.30 ± 0.06	0.22 ± 0.08
口服 2 组	0.37 ± 0.03	0.32 ± 0.58	0.32 ± 0.07	0.32 ± 0.11	0.26 ± 0.11	0.26 ± 0.07
静脉组	0.44 ± 0.16	0.21 ± 0.12	0.31 ± 0.03	0.25 ± 0.03	0.22 ± 0.03	0.23 ± 0.05

1.2.5 肝功能的评价 取血:在术后 12 h,1,2,3,5 d 和 7 d 不同预定时间点,称量体重,腹腔注射 1%戊巴比妥钠 (20 mg·kg⁻¹)麻醉,开腹后,分离腹主动脉,用止血钳夹上腹主动脉上部,用真空采血针管无菌采取肝素抗凝血和非抗凝血各 5 mL,3 500 r·min⁻¹离心 10 min,吸取上清后,置 -80℃ 保存,备测白蛋白 (ALB)、谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST)总胆红素 (TBIL)。将各时相点的血清统一进行检测。

1.2.6 统计学处理 统计资料表达采用 $\bar{x} \pm s$ 。统计学处理采用 SPSS 15.0 软件进行秩和检验,以 $P < 0.05$ 为具有显著性差异。

2 结果

2.1 残余肝组织光镜下大体结构表现

在 HE 染色之后于光学显微镜 (40 倍)下观察发现:在 PH 术后可见损伤肝细胞,表现为细胞质疏松,细胞水肿。在损伤的肝细胞周围可见较多的再生肝细胞,其特点为:再生肝细胞胞浆深染,可见一部分双核肝细胞。

PH 术后 12,24,48 h 可见损伤肝细胞较多,肝窦结构紊乱,部分肝窦有淤血表现,72 h 之后肝脏结构基本正常,再生肝细胞减少,直至消失。PH 术后 24 h,静脉组与口服 2 组相比,损伤肝细胞较多,细胞膜破坏,组织结构紊乱,再生肝细胞较少,间叶细胞亦减少,口服 1 组与静脉组之间无明显差异。

2.2 肝再生指标

2.2.1 PCNA 指数 术后 12 h 静脉组、口服 2 组与对照组相比 PCNA 阳性指数均明显升高;术后 24 h 口服 2 组 PCNA 明显高于静脉组 ($P < 0.05$);48 h 静脉组与口服 2 组 PCNA 阳性指数均较口服 1 组明显升高 ($P < 0.05$, $P < 0.05$);72 h 3 组 PCNA 阳性指数由高至低依次为口服 2 组,静脉组和口服 1 组,但三者之间无显著性差异;120 h 与 168 h 静脉组 PCNA 阳性指数比口服 2 组稍低 ($P = 0.154$, $P = 0.682$)。见表 1。

2.2.2 PI 指数 PH 术后 12 h,静脉组 PI 较口服 1 组和口服 2 组均无显著性差异;24 h 口服 2 组 PI 指数明显高于静脉组和口服 1 组 ($P < 0.05$, $P < 0.05$);48 h 口服 2 组与静脉组的 PI 指数相似;于 72,120 和 168 h 口服 2 组的 PI 均高于静脉组,其中 168 h 差异明显 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2.3 肝再生率 PH 术后 12 h,口服 2 组较静脉组高并有显著性差异 ($P < 0.05$);24 h 口服 1 组和口服 2 组的再生率较静脉组高,48 h 至 168 h (除 120 h),口服 1 组和口服 2 组的再生率均高于静脉组,口服 2 组在 12 h 和 120 h 比口服 1 组的再生率略高之外,其余各时间点两者的肝再生率无明显差异。见表 3。

表 2 PI指数 (%) ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Proliferation index(%) ($\bar{x} \pm s$)

	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h
对 照 组	41.99 $\pm$ 9.53	51.17 $\pm$ 6.303	39.61 $\pm$ 12.66	38.56 $\pm$ 8.95	17.23 $\pm$ 1.04	26.90 $\pm$ 5.02
口服 1组	40.87 $\pm$ 18.51	59.57 $\pm$ 14.45	60.17 $\pm$ 11.20	48.98 $\pm$ 9.22	43.97 $\pm$ 16.83	45.65 $\pm$ 4.20
口服 2组	37.03 $\pm$ 16.16	70.72 $\pm$ 23.15	65.83 $\pm$ 22.16	45.67 $\pm$ 21.26	57.50 $\pm$ 3.33	57.40 $\pm$ 0.00
静 脉 组	44.51 $\pm$ 24.13	53.01 $\pm$ 21.11	67.68 $\pm$ 17.37	40.70 $\pm$ 5.51	43.60 $\pm$ 4.08	38.80 $\pm$ 0.73

表 3 肝再生率 (%) ($\bar{x} \pm s$)

Tab 3 Hepatic regeneration rate(%) ($\bar{x} \pm s$)

	12 h	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h
对 照 组	0.8 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.15	0.58 $\pm$ 0.13	0.71 $\pm$ 0.13	0.67 $\pm$ 0.13	0.74 $\pm$ 0.13
口服 1组	0.34 $\pm$ 0.34	0.39 $\pm$ 0.08	0.69 $\pm$ 0.12	0.75 $\pm$ 0.12	0.57 $\pm$ 0.12	0.75 $\pm$ 0.12
口服 2组	0.38 $\pm$ 0.38	0.37 $\pm$ 0.11	0.66 $\pm$ 0.10	0.71 $\pm$ 0.10	0.67 $\pm$ 0.10	0.79 $\pm$ 0.10
静 脉 组	0.22 $\pm$ 0.22	0.29 $\pm$ 0.10	0.61 $\pm$ 0.13	0.64 $\pm$ 0.13	0.68 $\pm$ 0.13	0.72 $\pm$ 0.13

2.3 肝功能指标

2.3.1 ALT ALT在 PH术后 12 h升高明显,24 h达高峰,48 h后迅速下降。12 h口服 1组、口服 2组和静脉组 ALT水平明显低于对照组,但三者之间无明显差别;24 h口服 1组和口服 2组 ALT低于静脉组,口服 2组与静脉组具有明显差异 ($P < 0.01$);术后 48 h至 168 h之间,ALT水平迅速回落,各组之间均无明显差异。

2.3.2 AST AST在 PH术后变化大体趋势与 ALT一致,12 h对照组与口服 1组、口服 2组及静脉组相比 AST水平明显升高 ($P < 0.01$);术后 24 h口服 2组 AST水平明显低于静脉组 ($P < 0.05$);72 h口服 2组 AST较高,与静脉组相比无明显差异;120 h和 168 h各组间 AST水平无明显差别。

2.3.3 ALB 术后 12 h口服 1组 ALB明显高于静脉组 ($P = 0.002$);24 h静脉组 ALB则高于口服 1组和口服 2组 ($P = 0.013$, $P = 0.010$)。

2.3.4 TBIL 术后 TBIL整体呈逐渐下降趋势,12 h静脉组较口服组减低明显 ($P < 0.05$);24 h口服 2组较静脉组和口服 1组均减低,差异不显著;48 h静脉组较口服 1组和口服 2组均减低 ($P = 0.226$, $P = 0.502$);72 h口服 1组和口服 2组较静脉组低 ($P = 0.327$, $P = 0.316$)。

3 讨论

HGF最初是 1975 年 Labrecque^[4]从初断乳大鼠和部分肝切除后的再生肝脏中提取出来的一种生物活性物质,其主要生物学功能表现为:直接刺激肝细胞增殖和再生、对肝细胞的保护作用、参与组织器官的形成与发育、免疫调控作用以及抑制肝癌细胞增殖等。

既往的研究表明,对实验大鼠进行腹腔注射¹²⁵I气标记的 HGF水溶液,1 h后血液中含量达最高峰,36 h后血中含量为最高峰值的 6%,内脏中 HGF的含量以肝及胃为最高,并从尿及粪排泄^[7]。本实验通过大鼠肝部分切除模型来研究不同途径、剂量的 HGF对肝再生的影响,当静脉组和口服组应用相同剂量的 HGF时,口服组与静脉组的促进肝再生效果相似;当口服应用 HGF剂量是静脉剂量的 3 倍时,口服应用 HGF促进肝再生效果优于静脉应用,尤其以术后 24

h更明显;用药途径同为口服时,3 倍剂量组的促进肝再生效果优于 1 倍剂量组,其中以术后 24 h和 48 h最明显。同时发现口服给药时,HGF肠溶胶囊在人工胃液中 2 h释药不超过 10%,在人工肠液中 2 h释药可达 100%,口服给药后 3 h血药浓度达高峰。口服剂量是注射剂量 6 倍时,其绝对生物利用度可达 48.3%。口服应用生物利用度虽较低,但药物均随门静脉进入肝脏直接发挥作用。由此可以指导临床用药,即在术后即刻给药应用静脉制剂,而在术后 24 h之后则应口服给药。这不仅使 HGF的给药途径更加科学,使 HGF发挥最佳效果,而且使给药方法更加简单、安全;既减少了 HGF长期静脉用药的不良反应,也使用药成本减低,病人的开支减少。

REFERENCES

[1] LIU H Y, CAO W G, YU D L. The drug of viral hepatitis prevention and treatment(病毒性肝炎防治药物) [M]. Hubei Science and Technology Publishing House, 1995.

[2] TANG T X, HASHIMOTO T, CHAO L Y, *et al*. Effects of partial pancreatectomy on liver regeneration in rats [J]. J Surg Res, 1997, 72(1): 8-14.

[3] HAMADA T, EGUCHI S, YANAGA K, *et al*. The effect of denervation on liver regeneration in partially hepatectomized rats [J]. J Surg Res, 2007, 142(1): 170-174.

[4] HIGGINS G M, ANDERSON R M. Restoration of liver following partial surgical removal [J]. Arch Pathol 1931, 12: 186-202.

[5] WU Z W, XU K J, LI L J, *et al*. 78 cases of liver cirrhosis in patients with bacterial translocation and its associated research [J]. Chin J Surg(中华外科杂志), 2006, 44(21): 1456-1459.

[6] KOGURE K, ZHANG Y Q, SHIBATA H, *et al*. Immediate onset of DNA synthesis in remnant rat liver after 90% hepatectomy by an adm inistration of follistatin [J]. J Hepatol, 1998, 29(6): 977-984.

[7] ZHANG Y J, CHEN G M, KONG X P, *et al*. The development and clinical application of Promoting Hepatocyte Growth-Factor [J]. Chin J Clin Hepatol(临床肝胆病杂志), 1991, 7(1): 15-17.

收稿日期: 2008-08-28