

活动功能有关;是测定注意、记忆、智能等高级心理活动的客观指标<sup>[2]</sup>。Soares 等<sup>[3]</sup>报道,听觉事件相关电位 P<sub>300</sub>对 SHE 的诊断价值优于 SEP。Kugler 等<sup>[4]</sup>测定 SHE 的视觉事件相关电位 P<sub>300</sub>发现异常率达 78%,而心理测试仅 41%异常。我们对 36 例肝硬化患者进行 ERP P<sub>300</sub>检查,发现其异常率为 63.9%;且随 Child 肝功能分级增加,P<sub>300</sub>异常率亦增高;与 Soares 等报道基本一致。SHE 作为一种代谢性脑病,早期常表现有智能障碍,P<sub>300</sub>的异常可能是 SHE 的一种重要皮层电生理活动结果。另外,我们还发现肝硬化患者 P<sub>300</sub>异常高于 BAEP、VEP 和 SEP 中的任何一种,与三种 EP 总异常率相近。如以三种 EP 总异常作为诊断 SHE 的标准,则 P<sub>300</sub>对 SHE 诊断敏感性为 91.7%,特异性为 97.9%,假阳性率为 2.1%,假阴性率为 8.3%,阳性预测值为 95.6%,阴性预测值为 95.9%。说明 ERP P<sub>300</sub>对早期诊断 SHE 具有较高的价值。在为期 1 年的随访观察中,发现 P<sub>300</sub>异常者出现 HE 为 66.7%,与 EP 异常者 HE 的发生率(62.5%)无显著差异;而无异常者仅 10%发生 HE。可见 P<sub>300</sub>检测对诊断 HE 的敏感

性较高;P<sub>300</sub>检测较简便、客观且重复性强,每例检查仅需 20 min 左右,优于其它 EP 检查,可作为肝性脑病发生、发展的监测手段。

### 参考文献

- 1 陈昊湖,钟碧慧.亚临床肝性脑病的研究现状.新医学,1999,30:499-500.
- 2 吴文,吴宗耀.新奇 P<sub>300</sub>电位.中华物理医学与康复杂志,1999,21:178-179.
- 3 Soares EC, Balbino EPS, Sorena SLS, et al. Brain stem auditory evoked potential and cognitive evoked potential in subclinical portal systemics encephalopathy. 10th World Congress of Gastroenterology. Abstracts, Los Angeles. 1994, 942-943.
- 4 Kugler CF, Lotterer E, Petter J, et al. Visual event related P<sub>300</sub> potentials in early portosystemic encephalopathy. Gastroenterology, 1992, 103:302-310.

(收稿日期:2000-10-16)

(本文编辑 沈洁)

## 扶正化癥方对大鼠肝星状细胞旁分泌活化途径的抑制作用

刘成 姜春萌 刘平

肝星状细胞(HSC)活化是一复杂过程,涉及到细胞-细胞、间质-细胞间相互作用,其中旁分泌活化途径是 HSC 活化启动的关键因素,库普弗细胞(KC)是活化这一途径的主要细胞之一。我们观察中药扶正化癥方(319方)对 KC 激活 HSC 这一旁分泌活化途径的干预。

### 材料与方

#### 一、材料

雄性 Wistar 大鼠,SPF 级。体重 200~300 g,分离 KC 用;体重 300~400 g,制备药物血清用;体重 400~450 g,分离 HSC 用,均由上海中医药大学动物中心提供。链霉菌蛋白酶 E、型胶原酶、Nycodenz 及鼠尾型胶原标准品,均为 Sigma 公司产品;199 培养液、F12 培养液、DMEM 培养液及 RPMI 1640 培养液,均为 Gibco 公司产品;兔抗鼠型胶原抗体,为 Calbiochem 公司产品;辣根过氧化物酶标记羊抗兔抗体、噻唑蓝(MTT)及小牛血清(FBS),购自华美生物工程公司;兔抗人 Desmin 抗体,上海医科大学病理教研室提供;羊抗兔 CD<sub>68</sub>抗体,Santa Cruz 公司产品;VEGF 竞争性酶免疫试剂盒,Chemicon 公司产品。貂肺 Mv-1-LU 上皮细胞

株、L929 细胞株,购自中科院上海细胞生物研究所细胞库。319 方由杏仁、丹参、虫草菌丝等组成,配制成浓度为 0.04 g 浸膏/ml 的灌胃液。

#### 二、方法

1. 造模:大鼠以 50%四氯化碳(CCl<sub>4</sub>)-橄榄油溶液灌胃,0.05 ml/100 g,48 h 后分离 KC。

2. 含药血清制备:正常对照组与 319 方药物组各 4 只大鼠,药物组以 20 ml kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>剂量灌以 319 灌胃液(相当于 65 kg 成人每 kg 用量的 10 倍),分 2 次灌胃;对照组灌以等体积生理盐水。连续给药 3 d 后,晚间禁食 12 h,次日按常规量再灌 1 次,2 h 后处死取血,离心,吸取血清。同组血清合并混匀,分别制备成 319 含药血清与对照血清,56 30 min 水浴灭活,-70 保存。

3. KC 分离培养:参照文献[1]并改进,正常肝 KC 得率为 3 × 10<sup>6</sup> 个/肝,损伤肝为 1 × 10<sup>7</sup> 个/肝。经 CD<sub>68</sub>免疫细胞化学染色和 Latex Beads 吞噬实验鉴定,细胞纯度 > 90%。

4. HSC 分离培养:参照本所方法进行<sup>[2]</sup>。

5. KC 条件培养液制备:正常肝与损伤肝 KC 均以 10% FBS/F12 培养 24 h,弃培养液,换无血清 199 培养液继续培养 24 h,收集培养液,-70 保存。即为正常肝 KC 条件培养液(NKCM)与损伤肝 KC 条件培养液(IKCM)。

6. HSC 的条件培养液温育:NKCM 和 IKCM 分别用 199 培养液稀释成 5%、10%和 20%浓度,加入 10% FBS 混

基金项目:国家杰出青年科学基金资助项目(39825128)与上海市教育科技发展基金资助课题(98C14)

作者单位:200032 上海中医药大学肝病研究所

匀。将原代 HSC 随机分组,每组 4 个复孔,分别加入各稀释浓度的 KCM,100 μl/孔,分别作用 24 h、48 h 与 72 h。各时间均设对照组,加 10%FBS 199 培养液,培养至各时间点。

7. 含药血清作用的 IKCM 收集:急性损伤肝分离的 KC 原代培养 24 h,分 2 组,各 4 个复孔,分别更换含 10%319 含药血清和 10%对照血清的 F12 培养液,培养 24 h,弃上清,换无血清 199 培养液继续培养 24 h,即为含药血清作用过的 IKCM(319-IKCM)与对照 IKCM(C-IKCM)。

8. 药物血清对 HSC 的作用:原代 HSC 随机分成对照组、NKCM 组、C-IKCM 组与 319-IKCM 组,分别加入 10%FBS 199 培养液、20%NKCM/10%FBS 199 培养液、20%对照血清-IKCM/10%199 培养液与 20%319 含药血清-IKCM/10%FBS 199 培养液,培育 48 h。

9. HSC 增殖测定:上述各组培养至各时间点后用 MTT 法测定。

10. HSC 型胶原分泌量测定:上述各组添加 KCM 培养 48 h 后,换无血清 199 培养液,继续培养 24 h,收集上清与细胞层,用 ELISA 法检测 型胶原含量。

11. KCM 中转化生长因子<sub>1</sub>(TGF<sub>1</sub>)、血小板衍生生长因子(PDGF)及血管内皮生长因子(VEGF)生物活性测定:TGF<sub>1</sub>活性以未酸化的 KCM 对 Mv-1-LU 细胞的增殖抑制率反映,PDGF 活性用改良的 Herrik 方法测定,VEGF 含量(包括结合型和非结合型)按试剂盒说明书检测。

三、统计方法

统计学方法采用 t 检验。

结 果

一、KCM 对 HSC 增殖的影响

各浓度正常肝 KCM 在各时相对 HSC 增殖均无影响。损伤肝 KCM 有明显促 HSC 增殖作用,作用 48 h 有明显的量效关系,20%浓度与时间呈一定依赖性(表 1)。

二、含药血清对 IKCM 促 HSC 增殖的影响

NKCM 组与正常对照组对 HSC 增殖无影响,分别为 0.273 ± 0.007 与 0.316 ± 0.017; C-IKCM 组为 0.420 ± 0.050,明显高于 NKCM 组 (P < 0.01); 319-IKCM 组为 0.269 ± 0.014,明显低于 C-IKCM 组 (P < 0.01),反映药物能显著抑制 KC 病理性促 HSC 增殖作用。

三、KCM 对 HSC 分泌 型胶原的影响及含药血清作用

NKCM 组 HSC 的 型胶原分泌量为 (63.09 ± 9.72)

表 1 正常大鼠与损伤大鼠肝 KCM 对 HSC 增殖的影响 (A 值, n = 4,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	24 h	48 h	72 h
正常鼠			
对照组	0.173 ± 0.005	0.157 ± 0.010	0.168 ± 0.010
5% NKCM	0.163 ± 0.006	0.182 ± 0.009	0.175 ± 0.032
10% IKCM	0.161 ± 0.021	0.175 ± 0.004	0.195 ± 0.011
20% IKCM	0.151 ± 0.011	0.145 ± 0.070	0.195 ± 0.037
损伤鼠			
对照组	0.187 ± 0.016	0.164 ± 0.002	0.192 ± 0.009
5% NKCM	0.207 ± 0.027	0.168 ± 0.019	0.284 ± 0.075
10% IKCM	0.278 ± 0.018	0.222 ± 0.038 <sup>a</sup>	0.246 ± 0.092
20% IKCM	0.206 ± 0.013	0.282 ± 0.014 <sup>b</sup>	0.315 ± 0.045 <sup>b</sup>

与对照组比较:<sup>a</sup> P < 0.05, <sup>b</sup> P < 0.01

ng/ml, C-IKCM 组分泌量明显高于 NKCM 组,为 (128.75 ± 29.55) ng/ml (P < 0.01)。药物作用过的 319-IKCM 组为 (75.16 ± 7.04) ng/ml,显著低于 C-IKCM 组 (P < 0.01)。

四、TGF<sub>1</sub>、PDGF 与 VEGF 变化及药物对其影响

损伤肝 KC 分泌的 TGF<sub>1</sub> 与 PDGF 活性比正常肝 KC 分泌的明显增强,含药血清对其活性病理增强有明显抑制作用(表 2)。

正常肝 KC 与损伤肝 KC 分泌 VEGF 总量分别为 (4.96 ± 1.07) ng/ml 与 (8.03 ± 2.13) ng/ml,两者有明显差异 (P < 0.05),含药血清对 VEGF 分泌有抑制作用趋势,为 (6.57 ± 1.64) ng/ml,但差异无显著性。

讨 论

肝脏受损伤时,HSC 毗邻的 KC 被激活,活化的 KC 吞噬毒素与大量分泌炎性细胞因子,后者以旁分泌刺激 HSC 活化。在众多细胞因子中,TGF<sub>1</sub> 与 PDGF 起着关键作用,两者在细胞因子网络中相互影响。研究表明,正常肝 KC 对 HSC 无激活作用,而损伤后 KC 激活作用明显增强。进一步研究发现,KC 激活作用主要由 TGF<sub>1</sub> 与 PDGF 等介导,并可被 TGF<sub>1</sub> 与 PDGF 抗体所阻断。本实验也证实,正常肝 KCM 对 HSC 的增殖与 型胶原分泌无影响,而损伤肝 KCM TGF<sub>1</sub> 与 PDGF 活性明显增强,对 HSC 增殖与 型胶原分泌有明显促进作用,反映 KC 活化与 TGF<sub>1</sub> 及 PDGF

表 2 KC 分泌 TGF<sub>1</sub>、PDGF 的变化及含药血清对其的影响 (n = 4,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	TGF <sub>1</sub>		PDGF	
	A 值	抑制率 (%)	A 值	活性 (U/ml)
空白组	0.657 ± 0.069		0.357 ± 0.032	
NKCM	0.515 ± 0.117	21.58 ± 17.82 <sup>a</sup>	0.342 ± 0.026	- 16.85 ± 28.13 <sup>a</sup>
C-IKCM	0.288 ± 0.042	56.15 ± 6.41	0.407 ± 0.010	54.08 ± 11.06
319-IKCM	0.609 ± 0.045	7.35 ± 6.80 <sup>a</sup>	0.302 ± 0.011	26.63 ± 12.46 <sup>a</sup>

与 C-IKCM 比较:<sup>a</sup> P < 0.01

等细胞因子的旁分泌是激活 HSC 的重要方式。VEGF 近年来已成为损伤修复、血管发生、肿瘤发生和转移等许多病理领域研究热点,但在肝损伤和肝纤维化中的作用研究甚少。有文献报道,经 CCl<sub>4</sub> 损伤后分离的 HSC 可分泌 VEGF 和表达 VEGF 受体 Fit-1 和 Fik-1。Fik-1 激活后介导细胞增殖,Fit-1 激活后促进细胞迁移到趋化部位<sup>[3]</sup>。增殖和趋化性迁移是 HSC 激活后的基本功能变化。本实验中损伤肝 KC 分泌 VEGF 明显增加,推测 VEGF 也参与 HSC 旁分泌活化的途径。

通过临床与实验证实,319 方具有良好抗肝纤维化作用,体外实验显示,该方对 HSC 增殖与胶原分泌有直接抑制作用<sup>[4]</sup>。本实验中,含药血清作用过的 IKCM 对 HSC 的增殖与型胶原的分泌有明显抑制作用,反映药物尚可通过抑制旁分泌途径来抑制 HSC 活化。同时观察发现,含药血清尚可抑制损伤肝 KC 分泌 TGF- $\beta_1$  与 PDGF 活性,这一作用,可

能是抑制 HSC 活化旁分泌途径的主要机制。

### 参考文献

- 汪谦. 肝细胞、库普细胞和贮脂细胞的分离与培养. 现代医学实验方法. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 1997, 158-162.
- 徐列明, 刘成, 刘平, 等. 一种稳定和高产的肝贮脂细胞分离法. 细胞生物学杂志, 1995, 17: 143-封底.
- Ankoma Sey V, Wang Y, Dai Z. Hypoxic stimulation of vascular endothelial growth factor expression in activated rat hepatic stellate cells. Hepatology, 2000, 31: 141-148.
- Liu C, Liu P, Liu CH, et al. Effects of Fuzhenghuayu Decoction on collagen synthesis of cultured hepatic stellate cells, hepatocytes and fibroblasts in rats. WJG, 1998, 4: 548-549.

(收稿日期: 2000-11-06)

(本文编辑 沈洁)

## 功能性消化不良患者胃排空和胃肠激素的变化

王英德 唐海英 张延军 谷玲

功能性消化不良 (functional dyspepsia, FD) 是一种十分常见的临床病症。FD 的病因及发病机制至今仍未完全阐明,是 FD 缺少积极有效治疗的重要原因之一。我们从 FD 患者的胃排空情况、血浆胃肠激素浓度以及两者之间的相互关系方面对 FD 的发病机制进行初步探讨。

### 材料与与方法

#### 一、研究对象

按统一标准诊断的 FD 患者 21 例,男 9 例,女 12 例,平均年龄为 (41.0 ± 13.2) 岁。健康对照组 (HC) 15 例,男 6 例,女 9 例,平均年龄为 (39.9 ± 10.1) 岁。其中有 10 例行胃排空检查,男 5 例,女 5 例,平均年龄为 (41.1 ± 11.3) 岁。两组的年龄和性别分布差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。

#### 二、实验方法

受检者于检查前 1 天晚餐后禁食 12 h,次晨 8~9 时空腹抽取静脉血,采用放射免疫法同批测定血浆胃动素 (MOT) 及生长抑素 (SS) 浓度。参照文献<sup>[1]</sup>的胃排空测定法略加改动。试餐成分:由 1.5 mCi <sup>99m</sup>Tc-Ec 标记的油煎鸡蛋 3 个 (约 175 g),5% 葡萄糖液 300 ml。实验餐总热量为 350 kJ,内含蛋白质 25 g,脂肪 21 g,碳水化合物 15 g。共 31 人次 (其中 21 例 FD 患者,10 例健康对照者) 进行相同条件下胃的核素显像,记录胃内核素活性的变化,经衰变校正后输入计算机拟合出时间-活性曲线。

#### 三、观察指标

固体延迟排空时间 (Tlag, 定义为固体食物排空 10% 所需的时间); 全胃半排空时间 (T<sub>1/2</sub>); 120 min 全胃残余率 (R<sub>120</sub>); 血浆 MOT 和 SS 浓度

#### 四、统计学处理

采用两均数比较的 *t* 检验,秩和检验,单因素方差分析和直线相关分析。显著性水平设  $\alpha = 0.05$ 。

## 结 果

#### 一、胃排空情况

12 例 (57%) FD 患者的固体排空时间延迟,表现为固体 Tlag 延迟,固体 T<sub>1/2</sub> 延长, R<sub>120</sub> 增加,与对照组比较,差异有显著性,见表 1。胃排空的时间-活性曲线见图 1。

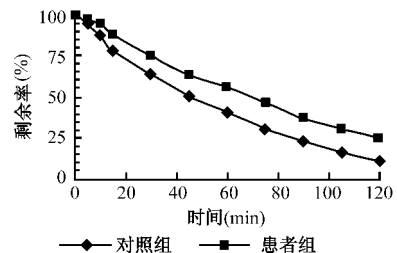


图 1 患者组和对照组胃排空的时间-活性曲线

#### 二、MOT 和 SS 浓度

FD 患者组 MOT 浓度较对照组降低,SS 浓度较对照组增高,两组比较差异有显著性 ( $P < 0.05$ )。按照全胃半排时间延迟与否将患者组分为两个亚组,胃排空正常的 FD 组

作者单位: 116011 大连医科大学第一医院消化内科 (王英德、唐海英), 核医学科 (张延军、谷玲)