

· 实验研究 ·

TIPSS 术中胆汁漏出对内皮细胞 NOS 活性影响的研究

卢勤 滕皋军

【摘要】 目的 探讨经颈静脉肝内门腔分流术(TIPSS)中胆汁漏出对内皮细胞一氧化氮合酶(NOS)及一氧化氮(NO)合成的影响,进一步了解胆汁对支架内皮化的影响。方法 取人脐静脉内皮细胞进行体外培养,加入不同浓度(5%、10%、15%、20%、25%)胆汁干预,观察内皮细胞生长状况,并测条件培养液中NO及细胞NOS活性。结果 含5%、10%、15%胆汁的细胞生长状况与不含胆汁者相似,含20%、25%胆汁的细胞明显减少并显幼稚,各浓度胆汁的细胞NOS活性较不含胆汁者明显降低,条件培养液中NO含量均无明显差异。结论 胆汁抑制内皮细胞的生长,并抑制内皮细胞NOS活性。

【关键词】 胆汁;内皮细胞;一氧化氮合酶

Bile leakage in transjugular intrahepatic portosystemic shunt: effect on endothelial NOS activity LU Qin TENG Gaojun. Department of Radiology, Zhongda Hospital, Southeast University, Nanjing 210009, China

【Abstract】 **Objective** To evaluate the effect of bile on endothelial nitric oxide synthase(NOS) activity. **Methods** Endothelial cells explanted from human umbilical vein were cultured in vitro, then bile of different concentrations 5%, 10%, 15%, 20%, 25% were mixed with the standard culture medium. Viability and morphology of the endothelial cells were studied, and NO(nitric oxide) content in conditioned medium and NOS activity were assessed. **Results** Viability and morphology of endothelial cells in the culture mediums presented as 5%, 10%, 15% bile were similar to the cells without bile medium while endothelial cells in mediums presented with 20% and 25% bile were markedly reduced in number and immature. Endothelial cell NOS activities in mediums presented with various concentration of bile were statistically decreased comparing with the cells in medium without bile. The quantity of NO in conditioned culture mediums with or without bile did not reach a statistical significance. **Conclusion** Bile appears to inhibit endothelial cells growth as well as endothelial NOS activity.

【Key words】 Bile; Endothelial cell; Nitric oxide synthase

一氧化氮(NO)作为重要的信息传递因子,在PTA及血管内放置支架后再狭窄中的作用近年来已引起人们的广泛重视。而TIPSS术后狭窄,虽然其病理改变与血管狭窄十分相似,但内膜增生却更快且更严重,影响TIPSS的疗效。TIPSS术中胆汁漏出是其独特的因素,也是引起狭窄及闭塞的原因之一^[1-3]。那么,胆汁对NO的合成有什么影响?人体内NO均由一氧化氮合酶(NOS)催化合成,胆汁对NOS又有什么影响?NOS主要来源于内皮细胞。本实验通过体外细胞培养,旨在探讨其中的关系。

材料与方法

一、内皮细胞的分离

无菌条件下取健康产妇分娩后6h内的脐带20cm,反复冲洗后,于脐静脉内灌注37℃含0.1%Ⅳ型胶原酶(美国Worthington biochemical corporation产品)消化10min,收集消化液,离心1000转/min 5min,弃上清,所得沉淀即内皮细胞,再用离心法洗涤1次后,将内皮细胞悬浮于含20%小牛血清(杭州四季青生物工程材料研究所)的1640培养液(美国GIBCO BRL公司产品),转移细胞悬液至6孔培养板(Denmark NUNC公司产品)培养,按 10^5 /ml的细胞密度接种,2ml/孔,接种16h后换液1次,以后每48h换液1次。

二、胆汁的准备

临床选择 1 例慢性胆囊炎、胆囊结石病人 ,行胆囊切除术、胆总管切开取石、T 管引流术后第 4 天 ,体温 37.2℃ ,无其他不适主诉 ,取 T 管引流胆汁 100ml ,分装冻存 ,备用。

三、胆汁干预内皮细胞的培养

实验组 :用不同浓度胆汁 + 20% 新生牛血清 + 1640 培养液进行内皮细胞培养 ;对照组 :培养方法及条件同实验组 ,但不加胆汁。收获的内皮细胞作 NOS 活性测定及条件培养液 NO 测定(NOS 测定试剂盒及 NO 测定试剂盒为南京聚力生物医学工程研究所产品 ,本实验严格按使用说明书操作)。

四、内皮细胞形态学检查

相差显微镜下观察内皮细胞的生长情况形态轮廓、细胞核、胞浆内细胞器、细胞的折光性、透明度等。

五、NOS 活性测定及 NO 测定

按上述方法获取人脐静脉内皮细胞后 ,接种于 96 孔培养板 ,培养 24h 后 ,分别加入不同浓度(5%、10%、15%、20%、25%)胆汁 ,继续培养 5d 后收获。吸取该条件培养液测 NO。再用小刮匙轻轻将细胞刮下使细胞悬浮于 PBS 液内 ,离心后 ,弃上清 ,再加入 100 μ l PBS 液 ,冻融法使细胞破碎 ,吸取上清液 ,进行 NOS 活性测定。

结 果

一、预实验情况

分别用不含胆汁、含 10%、20%、30%、40%、50% 胆汁的培养基(含 20% 血清的 1640 培养液)对分离的内皮细胞进行培养。结果 :用 10% 胆汁培养基进行培养的内皮细胞形态、数量与不含胆汁培养基培养者相似 ;含 20%、30% 胆汁培养基培养的细

胞形态较细长幼稚、数量也明显减少 ;而 40% 和 50% 胆汁培养基培养者基本无内皮细胞形态样细胞生长 ,且有较多胆汁内有色物质沉积。

二、分组培养的内皮细胞形态学观察

在倒置显微镜下 ,正常贴壁的内皮细胞呈扁平的短梭形或多角形 ,细胞透光性好 ,折光性强 ,边界不清 ,核明显而居中 ,核仁可见 ,细胞单层镶嵌呈“铺路石”状排列 ,在细胞密度较高时有时可见细胞融合现象 ,无重叠覆盖生长 ,有时可见细胞分裂现象。

加入含 5%、10%、15% 胆汁培养的内皮细胞形态与不加胆汁培养者相似 ,细胞呈扁平的短梭或多角形 ,核明显而居中 ,核仁可见 ,细胞单层镶嵌呈“铺路石”状排列 ,无重叠覆盖生长 ,有时可见细胞分裂现象。但细胞透光性及折光性均较不含胆汁者减低 ,边界也相对清楚 ,细胞边缘有时显不圆滑 ,细胞排列显得较杂乱 ,细胞融合现象也增多。这些表现随加入胆汁浓度的增高而更明显。但细胞生长数量无减少 ,且含 5% 及 10% 胆汁培养者 ,似生长更快。

加入含 20% 及 25% 胆汁培养的内皮细胞形态变化较大 ,细胞形态较细长幼稚 ,细胞边界清楚 ,胞核明显 ,核仁清晰 ,细胞透光性及折光性差 ,数量也明显减少 ,细胞排列稀疏而杂乱 ,细胞融合现象仍可见。

三、DOS 活性测定(见表 1)

四、条件培养液 NO 含量测定(见表 2)

讨 论

目前认为 ,血管内支架再狭窄是血管内膜损伤后正常或过度的血管修复反应的结果。其中 ,平滑肌细胞的增殖和内皮化形成是两个关键因素。以往的研究已经证实 :胆汁抑制 SMC 生长^[4,5]。本研究旨在了解胆汁对内皮化形成的影响。

表 1 不同浓度胆汁对应的 NOS 活性(U/ml)(n = 6)

胆汁浓度(%)	0	5	10	15	20	25
NOS 活性(U/ml)	1.00 \pm 0.21	0.57 \pm 0.19	0.46 \pm 0.19	0.35 \pm 0.12	0.23 \pm 0.06	—
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	

酶活性定义 :每毫克组织蛋白每分钟生成 1nmol NO 为一个活性单位 ,各浓度胆汁与不含胆汁组比较均为 P<0.05 ,即差异有统计学意义。

表 2 不同浓度胆汁对应的 NO 含量(μ mol/L)(n = 6)

胆汁浓度(%)	0	5	10	15	20	25
NO 含量(μ mol/L)	1776 \pm 54	1965 \pm 77	2018 \pm 43	2097 \pm 89	2097 \pm 108	2029 \pm 57

各浓度胆汁组与不含胆汁组比较差异均无统计学意义

TIPSS 术中有胆汁漏出与无胆汁漏出,虽然两者增生组织的组织学表现基本相同,但前者狭窄发生更快而严重,且增生组织中细胞成分少而血栓成分多,无内皮细胞覆盖通道内腔。本实验用胆汁干预内皮细胞的培养,可以得出以下结论:胆汁抑制内皮细胞的生长,并且抑制内皮细胞 NOS 活性。已知内皮细胞在凝血、抗凝血及溶栓过程中起重要的调节作用。内皮细胞的剥脱导致血小板附着和聚集及血栓形成。因此,我们认为:TIPSS 术损伤胆管并致胆汁漏出,阻断了支架内皮化过程,从而导致支架内血栓迅速形成和再狭窄或闭塞。

NO 在再狭窄中的作用是近年来的一个重要进展。NO 是重要的信息传递因子,具强大的舒张血管、抑制血管平滑肌细胞增殖、抑制血小板黏附和血栓形成的作用,在血管损伤、内膜增生的反应中,具有重要的保护作用^[6,7]。胆汁漏出作为 TIPSS 中特有的因素已在再狭窄中引起人们的重视,本研究试图阐明胆汁对 NO 及 NOS 的影响,得出结论为胆汁抑制内皮细胞 NOS 活性。因此,我们认为胆汁可能还通过影响内皮细胞 NOS 活性,从而抑制 NO 合成,使得支架内血栓形成增加而狭窄或闭塞。

TIPSS 术在肝脏中开通了一条无内皮细胞的血管性通道。而肝脏对其反应类似于内皮细胞剥脱后的血管反应。当然 TIPSS 假性内膜中内皮细胞同样影响着 SMC。Sanyal 等^[8]研究认为:TIPSS 分流通道内,内皮细胞促进 SMC 的迁移和增殖,从而促进假性内膜形成。虽然有研究者证实,正常的血管内皮细胞抑制血管平滑肌细胞迁移和增殖。但 Sanyal 等^[9]的实验结果表明,TIPSS 通道内的内皮细胞来源于肝窦内皮细胞,其特性与血管内皮细胞
万方数据

不同。虽然这两种内皮细胞都是阻隔血液与内皮下组织的,他们在内皮化形成中作用是否有差异,胆汁对其刺激又有什么潜在的不同从而影响到 TIPSS 术后狭窄的形成,尚有待于进一步研究。

参 考 文 献

1. Stout LC, Lyon RE, Murray NGC, et al. pseudointimal biliary epithelial proliferation and Zahn's infarct associated with a 6 $\frac{1}{2}$ -month-old transjugular intrahepatic portosystemic shunt. The Am J Gastroenterol, 1995 90 :126-130.
2. Laberge JM, Ferrell LD, Ring EJ, et al. Histological study of stenotic and occluded transjugular intrahepatic portosystemic shunts. JVIR, 1993 4 :779-786.
3. Saxon RR, Mendel-Hatvig J, Corless CL, et al. Bile duct injury as a major cause of stenosis and occlusion in transjugular intrahepatic portosystemic shunts: comparative histopathologic analysis in humans and swine. JVIR, 1996 7 :487-497.
4. 滕皋军, Bettmann MA, Hoopes PJ, 等. TIPS 术中胆汁漏出:刺激平滑肌细胞增生? 中华放射学杂志, 1998 32 :192-196.
5. Teng GJ, Bettmann MA, Hoopes PJ, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt: Effect of bile leak on smooth muscle cell proliferation. Radiology, 1998 208 :799-805.
6. Dubey RK, Gillespie DG, Jackson EK. Cyclic AMP-adenosine pathway induces nitric oxide synthesis in aortic smooth muscle cells. Hypertension, 1998 32 [part 2] :296-305.
7. 钟慈恩, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学. 北京:人民卫生出版社, 1997.
8. Sanyal AJ, Mirshahi F. Endothelial cells lining transjugular intrahepatic portosystemic shunts originate in hepatic sinusoids: implications for pseudointimal hyperplasia. Hepatology, 1999 29 :710-718.
9. Sanyal AF, Contos MJ, Yager D, et al. Development of pseudointima and stenosis after transjugular intrahepatic portosystemic shunts: characterization of cell phenotype and function. Hepatology, 1998, 28 :22-32.

(收稿日期 2001-04-12)

作者: 卢勤, 滕皋军
作者单位: 东南大学附属中大医院
刊名: 介入放射学杂志 **ISTIC PKU**
英文刊名: JOURNAL OF INTERVENTIONAL RADIOLOGY
年, 卷(期): 2001, 10(4)
被引用次数: 1次

参考文献(2条)

1. 滕皋军, BettmannMA, HoopesP TIPSS术中胆汁漏出:刺激平滑肌细胞增生[期刊论文]-中华放射学杂志 1998
2. 钟慈恩, 孙安阳 一氧化氮的生物医学 1997

相似文献(10条)

1. 学位论文 滕皋军 TIPSS术中胆汁漏出对其再狭窄的影响 2003

第一部分: TIPS动物(猪)模型的建立与组织学特征:目的:建立在组织病理学方面与人体相似的TIPS动物模型是研究TIPS再狭窄机制的重要步骤,但是,目前尚无有关TIPS动物模型的组织学特征的专题研究,因此,该研究将系统地评估有关TIPS猪模型的组织学特征. 材料与方法:用20只健康家猪建立TIPS模型,2-16天分别处死.所有动物在放置支架后和处死前分别进行门静脉造影,并分别从支架的门静脉段,肝静脉段及支架中段取标本作改良Giemsa染色,并用冰冻切片免疫组化染色(抗平滑肌细胞(SMC)α-胶原染色)甄别SMC.采用电子板标准面积计算技术对再狭窄增殖组织作定量分析. 第二部分: TIPS术中胆汁漏出:动物实验研究:目的:评价TIPS动物模型中胆道损伤并胆汁漏出极其对支架再狭窄的影响. 材料与方法:用45只猪建立TIPS模型,术后处死时间为10-16天.观察指标:分流道通畅率,支架内胆汁漏出染色,分流道内增生狭窄的定量分析. 第三部分:胆汁对猪平滑肌细胞增殖的影响:目的:研究胆汁对离体SMC培养的直接作用. 材料与方法:离体SMC培养分为三组: I组=1%血清+1%胆汁; II组=10%血清+1%胆汁; III组=10%血清.细胞收获点分别为3、10、14天.每一收获点中每组为6个样本.检测指标为DNA,总蛋白及DPM(每分钟[³H]-胸苷衰减量). 第四部分:胆汁对人脐静脉内皮细胞生长及功能的影响:目的:通过离体细胞培养研究胆汁在内皮细胞生长、繁殖过程中的作用,阐明TIPS术中胆道损伤并胆汁漏出与TIPS术后支架内皮化过程的关系.为TIPS分流道再狭窄的形成机制提供新的理论依据,并有助于理解血管内和其它腔道放置支架后再狭窄的形成机制. 材料与方法:无菌条件下取健康产妇分娩6小时脐带,充分洗涤后,灌注0.1%胶原酶进行消化,收集消化液,离心,所获沉淀即内皮细胞,在含20%新生牛血清及其它辅助因子的RPMI-1640培养液中进行培养.短期培养后加入不同浓度的胆汁,不加胆汁、含5%、10%、15%、20%及25%胆汁共6组继续培养,光镜下观察培养过程中细胞形态的变化.培养一定的时间后检测不同浓度胆汁培养的内皮细胞MTT光吸收值,绘制细胞生长曲线;并测vWF进行内皮细胞鉴定和功能测定;收获培养一段时间的细胞,测定其总蛋白含量及一氧化氮合酶活性.

2. 会议论文 卢勤, 滕皋军 TIPSS术中胆汁漏出对内皮细胞生长及功能的影响 2002

目的:经颈静脉肝内门腔分流术(TIPS)中胆汁漏出是引起术后支架再狭窄的重要因素.本研究意在探讨胆汁对离体培养的内皮细胞生长及功能的影响,进一步了解胆汁对支架内皮化的影响. 方法:取人脐静脉内皮细胞进行体外培养,加入不同浓度胆汁5%、10%、15%、20%、25%干预,观察内皮细胞生长状况,收获的细胞测总蛋白,MTT吸光度值.条件培养液测vWF行内皮细胞鉴定及功能测定. 结果:含5%、10%、15%胆汁的细胞生长状况与不含胆汁者相似,含20%、25%胆汁的细胞明显减少并显幼稚;含20%以上浓度胆汁的细胞MTT吸光度值及总蛋白较不含胆汁者降低,差异有统计学意义;含20%以上浓度胆汁的细胞条件培养液中vWF含量也明显降低.所收获的细胞vWF测定均阳性. 结论:一定浓度的胆汁抑制内皮细胞的生长及分泌vWF的功能.

3. 学位论文 卢勤 胆汁对人脐静脉内皮细胞生长及功能的影响 2001

目的:通过离体细胞培养研究胆汁在内皮细胞生长、繁殖过程中的作用,阐明TIPS术中胆道损伤并胆汁漏出与TIPS术后支架内皮化过程的关系.为TIPS分流道再狭窄的形成机制提供新的理论依据,并有助于理解血管内和其它腔道放置支架后再狭窄的形成机制. 结论:胆汁对血管内皮细胞生长的抑制作用是与浓度有关的:低浓度胆汁对内皮细胞生长无明显抑制作用;但随胆汁浓度的逐渐增大,对内皮细胞的抑制作用也越来越显著,至中高浓度,可完全抑制内皮细胞的生长.胆汁抑制血管内皮细胞NOS活性.胆汁抑制内皮细胞分泌vWF.

4. 外文期刊 Yang, W, Benjamin, IS, Sherwood, R, Alexander, B Correlation of endothelium-dependent and -independent vasodilatation with liver function tests during prolonged perfusion of the rat liver.

Twelve male Wistar rats were anaesthetized with pentobarbitone (3 mg 100g(-1) i.p.), the livers were excised and perfused in vitro through the hepatic artery and portal vein at constant flow rates of 0.32±/0.01 (mean±/S.E.) and 0.98±/0.03 ml min(-1) g liver(-1), respectively. The tone of the preparation was raised by methoxamine (7.5 x 10(-6) M). Responses to mid-range doses of acetylcholine (-11 log mol) and sodium nitroprusside (-9 log mol) produced submaximal degrees of vasodilatation (-log mol ED50 = 12.18±/0.08) and (-log mol ED50 = 9.95±/0.23), respectively, which did not subside until 5.5 h of perfusion. These did not coincide with the increase in activities of lactic acid dehydrogenase (LDH) and aspartate serine transaminase (AST) activity at 2.5 h, which were indicative of hepatocellular mitochondrial and cytoplasmic damage, respectively. Vascular responses suggested that there was little deterioration in endothelial or smooth muscle function in the hepatic artery up to 5 h perfusion. This model can be reliably used to investigate endothelium-dependent and -independent vasodilators in vascular pharmacological studies of the rat liver although some minimal increases may occur in AST and LDH activity before hemodynamic changes appear at 5.5 h.

5. 学位论文 李蓉 清胆补肾汤对肝内胆淤积孕鼠的实验研究 2006

目的: 本实验运用以清热利湿、滋阴补肾为立法的清胆补肾汤研究对肝内胆淤积孕鼠血清影响、肝脏病理结构变化及肝脏ICAM-1mRNA在不同部位的表达的影响。

方法: 动物及分组: 成年Wister雌性大鼠60只, 清洁级, 体重200-250g, 适应性饲养3天后, 与雄性大鼠2: 1合笼, 每日观察阴栓脱落, 阴栓脱落日定为妊娠第1日, 一直饲养到妊娠第12日待产。60只孕鼠随机分为6组(每组10只), 空白对照组、模型对照组、清胆补肾汤高剂量组、清胆补肾汤中剂量组、清胆补肾汤低剂量组、西药组。造模及给药方法: 除空白对照组肌肉注射生理盐水(2.5mg/kg·d-1)外, 其余各组于妊娠第12日起肌肉注射EE, 剂量为2.5mg/kg·d-1(EE溶于丙二醇中), 连续5天, 清胆补肾汤高、中、低剂量组及西药组于妊娠第17日给予100%、50%、25%清胆补肾汤, 地塞米松按0.1mg/100g体重皮下注射, 每只1次, 1日1次。取材及检测方法: 分娩第1天眶静脉采全血3ml, 室温下自凝20min后, 离心沉淀10min, 离心速度为3000r/min, 操作按试剂盒说明进行。由湖北省中医院检验科完成。断头法处死大鼠, 分离肝胆管, 灌流, 处理肝组织, 离心, 震荡, 加入ICAM-1荧光抗体; 取出肝组织置于10%甲醛内, 固定24h以上, 56℃石蜡包埋, HE染色, 观察光镜下肝脏组织学改变。统计方法: 均t检验。

结果:

1模型对照组孕鼠血清ALT、AST、ALP、TBIL、TBA均明显高于正常对照组(p<0.01), 清胆补肾汤高、中剂量组与空白对照组血清各项指标均无差异(p>0.05), 空白对照组与清胆补肾汤低剂量组除TBIL外(p>0.05)各项指标均有显著性差异(p<0.01, p<0.05), 模型对照组与清胆补肾汤高、中、低剂量组除TBIL、DBIL外各项指标均有显著性差异(p<0.01), 西药组与清胆补肾汤中剂量组除ALT外(p<0.05), 清胆补肾汤中剂量组血清AST、ALT值明显低

于西药组 (p<0. 01), 其余各项指标均无差异 (p>0. 05)。

2空白对照组肝脏无明显形态改变, 模型对照组孕鼠肝脏病理结构发现部分毛细血管内有胆栓形成, 清胆补肾汤高、中剂量组孕鼠肝脏病理结构肝小叶结构完整, 未见胆汁样物质沉积, 清胆补肾汤低剂量组及西药组肝脏病理结构见肝窦附近少许肝细胞水肿, 未见胆汁样物质沉积。

3ICAM-1在模型对照组肝细胞、胆管内皮细胞、门静脉内皮细胞上的表达明显高于空白对照组及清胆补肾汤中剂量组 (P<0. 01); ICAM-1在空白对照组肝细胞、胆管内皮细胞、门静脉内皮细胞上的表达与清胆补肾汤中剂量组及西药组有明显差异 (P<0. 01); ICAM-1在西药对照组肝细胞、门静脉内皮细胞上的表达与清胆补肾汤中剂量组有明显差异 (P<0. 01), 在胆管内皮细胞上的表达与清胆补肾汤中剂量组无差异 (P>0. 05)。

结论: 为了探讨清胆补肾汤治疗妊娠期肝内胆汁淤积症的可能作用机制, 我们设计了本课题以探讨清胆补肾汤对肝内胆汁淤积孕鼠肝脏血清、病理结构及ICAM-1的表达的影响, 以为其临床提供坚实的理论基础。从血清水平、肝脏病理结构及肝脏ICAM-1表达等不同水平论证了清胆补肾汤对肝内胆汁淤积孕鼠具有明显改善作用。本研究表明EE有诱导孕鼠肝内胆汁淤积的作用, 而清胆补肾汤清热利湿、滋阴补肾, 有明显的抗胆淤作用, 显著改善了肝内胆汁淤积程度, 总疗效方面与地塞米松组相当, 在降低血清ALT、AST及肝脏病理学结构变化方面, 其作用优于地塞米松 (P<0. 01), 细胞间粘附因子可能是ICP发病机理的一个重要部分。

6. 期刊论文 [卢勤. 滕皋军. 经颈静脉肝内门腔静脉分流术中胆汁漏出对内皮细胞生长及功能的影响](#) -中华放射学杂志

2002, 36 (8)

目的探讨胆汁对离体培养的内皮细胞生长及功能的影响, 进一步了解胆汁对支架内皮化的影响. 方法取人脐静脉内皮细胞进行体外培养, 分别加入5%、10%、15%、20%、25%胆汁干预, 观察内皮细胞生长状况, 收获的细胞测总蛋白, 四唑盐 (MTT) 吸光度值, 条件培养液测血管性假性血友病因子 (von Willebrand factor, 简称 vWF) 行内皮细胞鉴定及功能测定. 结果含5%、10%、15%胆汁的细胞生长状况与不含胆汁者相似, 含20%、25%胆汁的细胞明显减少并显幼稚; 含25%胆汁的细胞MTT吸光度值及总蛋白较无胆汁者降低, 差异有非常显著性意义 (Kruskal-Wallis秩和检验, $\chi^2=29.913, P=0.000$ 9及 $\chi^2=18.857, P=0.002$); 含20%以上浓度胆汁的细胞条件培养液中vWF含量也明显降低, 差异有非常显著性意义 (Kruskal-Wallis秩和检验, $\chi^2=27.213, P=0.000$ 1). 所收获的细胞vWF测定均阳性. 结论一定浓度的胆汁具有抑制内皮细胞的生长及分泌vWF的功能. 所收获的细胞vWF测定均阳性. 结论一定浓度的胆汁具有抑制内皮细胞的生长及分泌vWF的功能。

7. 学位论文 [李丽华. AQP1与AQP8在肝胆系统生理功能中的作用](#) 2009

水通道蛋白 (Aquaporin, AQP) 是广泛存在于细胞膜上转运水的特异性孔道。大量研究表明, 水通道蛋白在许多体液转运的生理及病理过程包括尿浓缩、外分泌腺功能、眼球房水代谢、脑脊液分泌和吸收以及脑水肿形成中发挥重要作用。近期的一些研究显示水通道蛋白还参与细胞的一些重要生命活动包括细胞增殖、迁移和凋亡等。

肝胆系统的主要生理功能不仅是生成胆汁, 而且还可以修饰和浓缩胆汁。正常情况下胆汁中含有98%以上的水。如何保证高效的水的转运, 对于维持肝胆系统的正常生理功能是十分重要的。目前已知在肝胆系统中有7种水通道蛋白: AQP0, AQP1, AQP4, AQP5, AQP8, AQP9, AQP11, 其分布遍及肝细胞、胆管上皮细胞、胆囊上皮细胞和血管内皮细胞。AQP0主要表达于肝细胞中央静脉周围区域; AQP1广泛存在肝脏血管内皮细胞、胆管上皮细胞和胆囊上皮细胞; AQP8分别在肝细胞毛细胆管膜和胆囊上皮细胞表达; AQP9主要集中在肝细胞的窦基底膜。肝胆系统中广泛分布着水通道蛋白AQPs, 但到目前为止, 究竟多少AQPs在胆汁形成、修饰及浓缩过程中起到什么样的作用? 一些研究仍然处在间接的、推测水平。

本课题利用AQP8和AQP1基因敲除小鼠模型, 系统地研究了水通道蛋白AQP8和AQP1在小鼠“原始”胆汁的形成和胆囊内胆汁浓缩过程中的作用。我们首先引取了小鼠的生理水平下的胆汁。与野生型小鼠相比, AQP8基因敲除小鼠的胆汁分泌量明显减少。为了避免胆管对胆汁形成修饰作用, 我们使用胆盐刺激小鼠, 加快胆汁分泌的速度, 结果仍显示, AQP8基因敲除小鼠的胆汁分泌量明显少于野生型小鼠。胆汁成分分析, 基础状态下的两组小鼠的胆汁无明显差异, 但是胆盐刺激后, AQP8基因敲除小鼠胆汁内的总胆酸与谷胱甘肽的含量明显高于野生型小鼠的, 表明水通道蛋白AQP8参与了胆汁的形成过程。为了更进一步确定AQP8在“原始”胆汁形成中的作用, 本课题组进行了细胞水平的实验研究, 分离了肝细胞对 (Couplets), 发现两组小鼠的肝细胞数量及形态无差异, 以及肝细胞对在肝细胞中的比例也无不同。利用荧光染料可被肝细胞分泌进入毛细胆管的原理, 分析了肝细胞的胆汁分泌情况, 荧光结果显示, 与野生型小鼠的肝细胞相比较, 在AQP8基因敲除小鼠的肝细胞对中, 有很少的胆汁被分泌进入毛细胆管。

另外, 胆囊可以重吸收肝胆汁中的大量水分, 在食物消化时, 胆囊收缩, 将浓缩的胆汁排入十二指肠以助于食物的消化和吸收, 提示胆囊上存在着高效转运水的水通道蛋白AQPs。从形态学上观察, 两组小鼠的胆囊结构无明显差异。但通过RT-PCR、Real-time PCR和免疫荧光分析发现水通道蛋白AQP1在野生型小鼠的胆囊上皮细胞上高表达, 本研究首次利用calcein荧光技术测量小鼠胆囊的跨上皮水转运, 结果发现, AQP1基因敲除小鼠的胆囊跨上皮水转运速度明显慢于野生型小鼠, 提示AQP1是胆囊水转运的主要途径。而且野生型小鼠胆囊的跨上皮水转运速度是目前已知哺乳动物中跨上皮水转运速度最快的。此外, 利用本实验室可以做显微手术的优势, 将小鼠的胆囊里层外翻, 结合荧光染料calcein-AM, 测量胆囊上皮细胞顶膜的水通透性。分析结果显示, 与野生型小鼠相比, AQP1基因敲除小鼠的胆囊上皮细胞顶膜的水通透性显著降低。根据结果我们估计, 胆囊上皮细胞膜上存在约4000/μm²个AQP1, 占20%质膜蛋白。由此可见, 胆囊上皮的水转运是跨细胞转运, 而不是细胞旁转运。但胆囊胆汁成分分析表示, 两组小鼠的胆汁成分含量基本相似。表明在胆囊胆汁浓缩过程中还存在其他的机制, 需进一步研究。

综上所述, 水通道蛋白AQP8表达定位于肝脏并在肝胆胆汁形成过程中发挥了重要的作用, 水通道蛋白AQP1介导了胆囊上皮细胞膜的高水通透性, 但在胆囊胆汁浓缩中并无重要作用。

8. 期刊论文 [杜雪寒. 蒋犁. 蒋小青. DU Xue-han. JIANG Li. JIANG Xiao-qing](#) 丹参注射液在妊娠肝内胆汁淤积症中的

治疗机制研究 -中国中药杂志2006, 31 (11)

目的:探讨丹参注射液在治疗妊娠肝内胆汁淤积症中的机制. 方法:采集妊娠肝内胆汁淤积症患者血清, 与脐静脉内皮细胞共培养模拟其宫内环境, 不同含量(1, 2, 4, 8 g·L⁻¹)的丹参注射液进行干预, MTT法检测内皮细胞的活力, ELISA法和免疫细胞化学法分别检测内皮细胞分泌血管内皮生长因子的变化. 结果:与空白组相比, 丹参注射液治疗组能使脐静脉内皮细胞活力增强, 脐静脉内皮细胞自分泌可溶性和膜结合性血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白增加, 并呈现剂量依赖性; 以8 g·L⁻¹的作用最佳. 结论:丹参注射液对妊娠肝内胆汁淤积症患者血清刺激后的脐静脉内皮细胞具有保护作用, 其保护作用可能与增强血管内皮生长因子的分泌有关.

9. 学位论文 [高慧. 胆酸对心血管组织的损伤在妊娠期肝内胆汁淤积症胎儿并发症发生机制中作用的研究](#) 2006

妊娠肝内胆汁淤积症 (intrahepatic cholestasis of pregnancy, ICP) 是妊娠中、晚期特有的并发症, 临床上以皮肤瘙痒和黄疸为特征, 主要危害胎儿, 使围产儿发病率和死亡率增高。其发病原因目前尚不清楚, 可能与雌、孕激素、遗传、免疫及环境等因素有关。

胆汁酸的毒性作用是近年来ICP的研究热点, 可致发生胎膜早破、胎儿宫内窘迫、自发性早产或孕早期羊水胎粪污染。特别是还有有胎儿生长受限, 不可预测的胎儿突然死亡, 新生儿颅内出血、新生儿神经系统后遗症等。其中, 不可预测的胎儿突然死亡已成为临床医生非常棘手的问题, 给社会和个人家庭带来了巨大的经济损失。

ICP孕妇血清胆脂酸的组份中, 以胆酸 (CA) 水平增高为主。因此胆酸可能是ICP中导致胎儿及新生儿死亡的罪魁祸首。本研究利用原代培养的乳鼠心肌细胞, 通过MTT法探究胆酸在体外对该细胞存活率的抑制作用, 并通过激光共聚焦显微镜技术结合细胞敏感的钙离子荧光指示剂Fiuo3/AM探讨胆酸对心肌细胞“钙超载”影响在ICP胎儿心源性猝死发病机制中的作用。此外, 本研究还利用原代培养的人脐静脉内皮细胞, 通过MTT和ELISA方法探讨胆酸对内皮系统增殖及其完整性和内分泌功能的影响, 从而明确胆酸对内皮系统的损伤在ICP胎儿并发症发病机制中的作用。通过临床体液内分泌和心肌酶谱学的研究来证实体外研究的发现, 进一步明确胆酸对心血管系统的损伤作用, 为临床上正确评估ICP孕妇的胎儿安危提供相关指标, 并针对该疾病给予早期的诊断和治疗, 以改善胎儿及新生儿的病情和预后, 降低围生儿的的发病率和死亡率, 减轻社会和个人家庭负担。

第一部分胆酸对乳鼠心肌细胞损伤机制的研究

目的: 通过研究胆酸对培养的乳鼠心肌细胞活性和细胞内“钙超载”的影响, 探讨胆酸对心肌细胞的损伤在ICP胎儿并发症发病机制中的作用。

结论: 胆酸对心肌细胞存活率的抑制作用有很强的时间-浓度依赖性, 这种抑制作用除了对心肌细胞的直接损伤外, 还可能与其造成细胞内“钙超载”有关。胆酸可能通过损害胎儿的心肌细胞引起ICP不可预测的产科意外。

第二部分胆酸对人脐静脉内皮细胞损伤机制的研究

目的通过研究胆酸对培养的人原代脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 生长率和分泌VEGF及释放vWF的影响, 探讨胆酸对内皮系统的损伤在ICP发病机制中的作用。

。

2. 随着胆酸浓度的增高, HUVEC分泌VEGF减少, 呈明显的负相关; 释放vWF增加, 呈明显的正相关。

结论胆酸对HUVEC的生长率有很强的时间-浓度依赖性抑制作用,这种抑制作用除了直接损伤内皮细胞外,还可能与其抑制内皮细胞本身的分泌VEGF有关。胆酸可能通过影响内皮系统引起ICP胎儿的一系列临床、病理及病理生理改变。

第三部分胆酸对胎儿心血管系统损伤的研究

目的通过对比研究ICP组胎儿与正常对照胎儿间脐血胆酸水平与脐血中内皮细胞分泌的VEGF、vWF浓度以及心肌酶谱的变化的相关性,探讨胆酸对内皮系统和心肌细胞的损伤在ICP胎儿并发症发生机制中的作用。

10. 期刊论文 [时青云](#). [王昕](#). [江森](#). [孔北华](#). [马开东](#) [细胞间粘附分子-1, 2在肝内胆汁淤积孕鼠肝脏不同部位表达及其](#)

[意义的研究](#) -[现代妇产科进展](#)2002, 11 (2)

目的:研究细胞间粘附分子-1, 2 (intercellular adhesion molecules-1, -2, ICAM-1, 2) 在肝内胆汁淤积 (intrahepatic cholestasis, IHC) 孕鼠肝脏不同部位的表达及其意义. 方法:应用雌二醇 (ethinyl estradiol, EE) 诱导孕鼠IHC, 用流式细胞仪检测肝脏ICAM-1, 2的表达. 结果: (1) 用药第5天, 孕鼠血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST)、总胆酸 (TBA)、碱性磷酸酶 (AKP) 明显升高, 肝脏组织学检查发现IHC; (2) 孕鼠ICAM-1, 2在肝细胞、肝门静脉内皮、肝胆管上皮的表达明显增高. 结论:粘附分子 (adhesion molecules, AM) 表达异常可能是妊娠肝内胆汁淤积 (ICP) 发病机理的一个重要环节.

引证文献(1条)

1. [滕皋军](#). [徐克](#) [TIPS再狭窄的研究现状和进展](#) [期刊论文] - [介入放射学杂志](#) 2005 (1)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_jrfsxzz200104014.aspx

授权使用: qkahy (qkahy), 授权号: 524763ad-02bb-4e81-95f1-9e38014f86a9

下载时间: 2010年11月24日