

补锌对大鼠血清锌和实验性肝纤维化的影响

王育强, 蔡德海

王育强, 武警医学院附院传染病学教研室 天津市 300162
蔡德海, 武警医学院科研部 天津市 300162
武警医学院资助课题, No. WY2002-24
项目负责人: 王育强, 300162, 天津市, 天津武警医学院附属医院传染病学教研室. wangyuqiang12356@sohu.com
电话: 022-60578766
收稿日期: 2004-09-13 接受日期: 2004-10-11

摘要

目的: 观察不同剂量补锌对大鼠血清锌含量及实验性肝纤维化的影响。

方法: 将 Wistar 大鼠 46 只分为正常对照组、四氯化碳 (CCl₄) 模型组、高糖组、补锌高剂量组和低剂量组。后四组动物每只给 CCl₄ 油溶液 0.15 mL 腹腔内注射 2 次/wk, 共注射 8 wk; 后三组大鼠分别给予高糖、葡萄糖酸锌, 观察每一种情况对大鼠血清锌含量、肝功能和肝纤维化形成过程产生的影响。

结果: 实验的 4 wk 和 8 wk 时, 补锌组与模型组及高糖组血清 ALT 均增高, 各组间差异不明显, 但补锌组 AST 均明显降低, 与模型组及高糖组比较有较明显差异 (164.8 ± 54.72^a , 143.5 ± 46.6^b vs 262.0 ± 142.4 , 260.4 ± 125 , $^aP<0.05$, $^bP<0.01$)。补锌组大鼠血清锌含量在 8 wk 时均较模型组明显增高 (30.4 ± 4.6 , 30.4 ± 4.6 vs 16.2 ± 4.3 , $P<0.01$)。维持在正常水平, 并对大鼠肝纤维化有一定抑制作用, 但两个剂量组间未见明显差异 (36.3 ± 5.4 vs 30.4 ± 4.6)。高糖使大鼠的体重明显增加, 未见大鼠肝纤维化的改善。

结论: 补锌对肝损伤动物血清锌及肝纤维化的影响表现在后期, 采用低剂量较长期的补锌方法可能有效安全。

王育强, 蔡德海. 补锌对大鼠血清锌和实验性肝纤维化的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2896-2898
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2896.asp>

0 引言

微量元素锌制剂临床广泛应用于肝病的辅助治疗, 本组资料旨在观察持续补锌对四氯化碳所致肝纤维化大鼠血清锌含量的影响及对肝纤维化有无抑制作用。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar 大鼠 46 只, 体重 180 ± 20 g, 随机分为 5 组, 正常对照组 6 只、模型组 10 只、高糖组 10 只、葡萄糖酸锌高剂量和低剂量组各 10 只; 三精葡萄糖酸锌, 每 10 mL 含锌 3.35 mg, 批号 03082951。

1.2 方法 正常对照组腹腔内注射生理盐水 0.15 mL/次, 2 次/wk, 其余组每只动物给 CCl₄ 油溶液 0.15 mL (CCl₄ 用等容积花生油稀释) 腹腔内注射 2 次/wk, 共注射 8 wk^[1-4], 同时补锌高剂量组用三精牌葡萄糖酸锌 20 mL 溶于清水 80 mL 中, 低剂量组 10 mL 溶于清水 90 mL 中, 由这两组动物分别自由饮用, 饮完为止, 均隔日饲喂 1 次。高糖组按每只动物给 1.0 g 白糖的量溶于清水中饲喂, 1 次/d; 所有各组动物均饲喂同样普通饲料; 在第 4 wk 于大鼠眼眶内取血测血清锌含量及肝功能 1 次, 第 8 wk 处死动物前, 所有动物均测体重, 腹主动脉取血, 血清置于去离子试管内, 测血清锌含量, 测定仪器使用原子吸收分光光度计, 用 TRITON-X 液稀释, 使用火焰原子吸收法测定, 取三次的均值。剖取大鼠肝脏做病理检查, 通过 HE 常规染色和 Masson 三色胶原染色对肝组织切片进行病理组织学检查^[5]; 同时各组分别检查肝功能, 并观察其变化。

2 结果

2.1 各组动物之间肝功能的比较 (表 1) 实验中模型组和高糖组各死亡 2 只动物; 4 wk 和 8 wk 时除正常对照组外, 其余各组 ALT 均增高, 各组间差异不明显, 但补锌组 AST 和模型组与高糖组比较有较明显差异 ($^aP<0.05$, $^bP<0.01$)。

表 1 实验 4 wk 与 8 wk 时各组动物肝功能指标及组间的比较 (mean \pm SD)

分组	n	ALT (μ g/L)(4 wk)	AST (μ g/L)(4 wk)	ALT (μ g/L)(8 wk)	AST (μ g/L)(8 wk)
正常对照组	6	18.7 ± 7.3	73.3 ± 17.2	21.7 ± 6.3	84.3 ± 17.2
模型对照组	8	213.6 ± 133.2	262.0 ± 142.4	183.6 ± 133.2	262.0 ± 142.4
高糖组	8	198.4 ± 95.4	250.4 ± 125	191.4 ± 119.4	260.4 ± 125
高锌组	10	201.4 ± 39.9	164.8 ± 54.72^a	176.4 ± 39.9	164.8 ± 54.72^a
低锌组	10	196.6 ± 31.5	145.5 ± 50.6^b	173.6 ± 31.5	143.5 ± 46.6^b

$^aP<0.05$, $^bP<0.01$ vs 模型组和高糖组。

2.2 大鼠体重和各级的血清锌含量(表2) 动物在8 wk时各组体重差别增大,高糖组体重明显增高,各组血清锌值在4 wk时未显示明显差异,在8 wk时补锌组血清锌值与模型组和高糖组动物比较有明显差异($P<0.01$),补锌组未见与正常对照组的差异。

表2 各组动物在4 wk和8 wk时血清锌值及8 wk时体重状态比较(mean \pm SD)

分组	4 wk时血清锌值($\mu\text{mol/L}$)	8 wk时血清锌值($\mu\text{mol/L}$)	8 wk时各组体重(g)
正常对照	28.8 \pm 4.6	30.5 \pm 5.4	254 \pm 22.5
模型组	25.9 \pm 3.9	16.2 \pm 4.3	176 \pm 36.5
高糖组	26.6 \pm 4.5	14.6 \pm 5.6	356 \pm 56.6
高锌组	32.4 \pm 5.5	36.3 \pm 5.4 ^b	286 \pm 30.5
低锌组	30.1 \pm 4.4	30.4 \pm 4.6 ^b	264 \pm 36.6

^b $P<0.01$ vs 模型组及高糖组。

2.3 各组动物8wk时与正常对照组的肝病理状态比较(表3) 各组动物镜下病理状态比较显示,正常对照大鼠肝小叶结构正常,无肝纤维化;模型组全部呈肝细胞片状坏死,汇管区周围纤维化,广泛纤维增生,部分假小叶形成;高糖组均呈片状肝坏死,纤维组织增生重,细胞索排列紊乱,小叶结构紊乱;高锌组和低锌组多数动物肝细胞索排列尚整齐,广泛纤维组织增生,但小叶结构尚完整保留。

表3 光镜下大鼠肝纤维化状态比较

分组	n	第8 wk时各组大鼠肝纤维化程度				
		0	I	II	III	IV
正常对照	6	6				
模型组	8			1	6	1
高糖组	8			1	6	1
高锌组	10		2	6	2	0
低锌组	10		2	5	3	0

3 讨论

在肝病的治疗中,给予患者含锌的微量元素制剂是普遍采用的辅助治疗手段。目前,在临床上应用的含锌制剂有复合蛋白锌、施尔康、葡萄糖酸锌、安达美注射液等^[6-8],其多为复合制剂,我们给予大鼠的葡萄糖酸锌为单一的含锌制剂,我们认为更适合观察锌对血清锌含量的影响及显示锌对肝纤维化有无抑制作用。

大量研究表明,锌具有重要的抗氧化作用。一方面长期慢性锌摄入可诱导金属硫蛋白(MT)的产生从而发挥其长期有效的抗氧化作用;另一方面锌又可参与组成一些重要的抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GPX),通过这些抗氧化酶有效地清除自由基,无论人体或动物实验都表明,长期缺锌可导致这

些酶活性的下降,机体清除自由基能力减弱;补锌还能够有效增强DNA聚合酶活性,增强了DNA的结构稳定性和完整性^[9-11];锌还可以提高肝组织中被抑制的全部胶原酶的活性^[12];以往研究还显示锌不足导致体内锌平衡破坏,促进了胸腺、脾脏组织中淋巴细胞的凋亡,造成体内淋巴细胞数目减少,使机体免疫功能下降^[13]。上述机制均对肝脏损伤后的纤维化形成过程产生影响。

我们的实验显示,与模型组比较,实验大鼠持续补给葡萄糖酸锌4 wk时低锌剂量和高锌剂量组对大鼠肝功能均有一定保护作用,AST较模型组低,这一作用可持续至第8 wk,但对ALT始终无明显影响,这可能与四氯化碳对肝脏损害作用过强有关。在4 wk时,各组动物血清锌含量未显示明显差异,补锌组动物血清锌并未增高,这一结果需要进一步研究,但提示动物早期只要正常饲料喂养,对锌的摄取和调节尚能稳定;8 wk时,模型组动物血清锌含量明显降低,而补锌可纠正这一情况。低锌动物毛发晦暗,无光泽,生长慢,补锌组动物无此情况^[13-18];提示在肝损害后期,锌的摄取和调节出现问题,在临床上对存在长期肝损害的患者是否更需补锌,值得探讨。

我们在实验中还发现,补锌的两个剂量组肝纤维化程度均较模型组减轻,表明在慢性肝损伤过程中,适当补锌对肝细胞膜有稳定作用,可在一定程度上减轻肝纤维化。本实验高剂量组和低剂量组在对血清锌含量和肝纤维化影响方面未显示明显的剂量差异,是否提示锌作为某些金属酶的活性中心,如果缺乏会导致胶原酶活性降低^[14-19],但达一定量后,对机体的影响作用并未相应增强,因为锌浓度过大可造成肝肾损害^[18]从补锌的安全和有效考虑,对慢性肝损伤采用较低剂量和较长时期补锌这一辅助治疗手段可能更好。

在肝病的治疗中,医师和患者都在寻求合理营养疗法,以求更好疗效,由于肝病患者脂肪代谢障碍,作为供能物质,葡萄糖摄入明显增加^[6, 20-21],但营养摄入的差异会不会对肝纤维化的程度产生影响。我们的分析显示,实验大鼠持续摄入高糖后,实验终末和模型组比较并未显示大鼠肝纤维化程度的明显差别,高糖饮食对肝脏病理改变无明显影响,大鼠在持续摄入高糖后体重明显增加,可能对肝功能修复不利。因此肝病的饮食治疗应是营养平衡,易于吸收,不加重肝脏负担,同时,有利于肝细胞的恢复。与应用高糖比较,补锌不仅是营养补充,且有一定减轻肝细胞损害作用。

总之,我们的实验显示在慢性肝损伤过程中适当补锌是较好的辅助治疗措施。由于慢性肝损伤治疗过程中难以持续测定血清锌含量,因此采用低剂量较长期的补锌方法可能既有效,也安全。

4 参考文献

- 1 刘克辛. 抗肝疾患药物开发的工具. 肝疾患基础及其实验动物模型. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 2003: 48-49
- 2 李锋, 李宣海, 程五凤, 谢良民. 补充VE、Se对大鼠肝纤维化和

- 抗氧化功能影响的研究. 营养学报 2003;25:61-64
- 3 吕鹏. 四氯化碳腹腔注射制备肝纤维化模型的实验研究. 胃肠病学和肝病学杂志 2003;12:339-340
- 4 李校天, 高红旗, 蒋树林, 姚希贤. 四氯化碳和免疫血清法大鼠肝纤维化模型进程的时效关系对比研究. 中国医师杂志 2003;10:1315-1317
- 5 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床. 第2版. 北京: 人民卫生出版社, 2002:228-271
- 6 池肇春, 刘勇立, 马素真. 简明肝病诊疗手册. 第1版. 北京: 中国医药科技出版社, 1996:30-67
- 7 张叶青, 刘平, 都广礼, 王宪波, 李凤华. 二甲基亚硝胺肝硬化大鼠血清元素含量变化及其意义. 肝脏 2003;8:34-36
- 8 于占洋, 侯哲. 微量元素与疾病诊断及治疗. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 2001:170-171
- 9 张月红, 程义勇, 洪燕, 王冬兰, 李树田. 锌缺乏对大鼠骨骼矿化的影响. 中华预防医学杂志 2003;37:121-124
- 10 高围澈, 黄连珍, 李涛, 杨雪锋. 缺锌对衰老小鼠抗氧化系统和肝脏DNA损伤修复功能的影响. 中华老年医学杂志 2003;22:543-546
- 11 张越, 唐小云, 杨丽群, 贾秀坤, 梁再斌. 锌对天冬氨酸转氨酶和线粒体酶功能的影响. 工业卫生与职业病 2004;30:95-96
- 12 王慧芬, 王业东. 肝脏疾病. 第1版. 北京: 科学技术文献出版社, 2001:282-283
- 13 单延春, 盛晓阳, 洪昭毅. 锌缺乏对生长期大鼠免疫细胞凋亡的影响. 营养学报 2004;26:94-97
- 14 Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Matsuura W, Kohda A, Okumura K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, Kambe T. Zinc transporters, ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are GPI-anchored to cytoplasmic membrane. *J Biol Chem* 2004;2(待发表)
- 15 Zmarzly A, Simon K, Krause K, Rotter K, Gasiorowski J. Zinc status in ex-intravenous drug users infected by HIV, without clinical presentation of AIDS. *Wiad Lek* 2004;57:249-254
- 16 Rodovicius H, Viezeleiene D, Sadauskiene I, Valentukonyte S, Ivanov L. The effects of zinc ions on activities of tRNA^{Leu} and leucyl-tRNA synthetase of mice liver. *Medicina (Kaunas)* 2004;40:982-986
- 17 Hulisz D. Efficacy of zinc against common cold viruses: an overview. *J Am Pharm Assoc (Wash DC)* 2004;44:594-603
- 18 Hammond GM, Loewen ME, Blakley BR. Diagnosis and treatment of zinc poisoning in a dog. *Vet Hum Toxicol* 2004;46:272-275
- 19 Lim NC, Freake HC, Bruckner C. Illuminating zinc in biological systems. *Chemistry* 2004;14[Epub ahead of print]
- 20 Coutinho EM. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004;99(5 Suppl 1):85-92
- 21 Ming ZJ, Liu SZ, Cao L. Effect of total glucosides of centella asiatica on antagonizing liver fibrosis induced by dimethylnitrosamine in rats. *Zhongguo Zhongxiyi Jiehe Zazhi* 2004;8:731-734

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

全人源肝癌噬菌体单链抗体库的鉴定及筛选

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 药立波

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西省西安市 710032

药立波, 中国人民解放军第四军医大学生物化学与分子生物学教研室 陕西省西安市 710032

国家自然科学基金资助项目, No. 30371399

项目负责人: 窦科峰, 710032, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院肝胆外科. gdwk@fmmu.edu.cn

电话: 029-83375259

收稿日期: 2004-09-18 接受日期: 2004-10-11

结论: 利用噬菌体抗体库技术结合减数筛选得到了肝癌噬菌体单链抗体及其基因, 且筛选后的抗体片段与人肝癌细胞有特异性的结合活性。

薛国柱, 窦科峰, 赵爱志, 药立波. 全人源肝癌噬菌体单链抗体库的鉴定及筛选. 世界华人消化杂志 2004;12(10):2898-2901

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2898.asp>

摘要

目的: 对全人源肝癌噬菌体单链抗体库进行鉴定, 筛选肝癌抗体, 同时对抗体的活性进行鉴定。

方法: PCR鉴定阳性重组菌TG1中人肝癌ScFv的插入率. 先以人成纤维细胞黏附后再以肝癌细胞SMMC-7721为抗原对所建抗体库进行3轮“黏附-洗脱-扩增”的亲和筛选. 将筛选后的ScFv进行PCR鉴定及双酶切鉴定; 通过ELISA法鉴定其与人肝癌细胞的结合活性。

结果: ScFv基因插入率为70%. 在亲和筛选过程中, 肝癌噬菌体单链抗体得到富集, 收获率逐轮得到提高, 第3轮为第1轮的214倍. 筛选后的ScFv进行PCR鉴定及双酶切鉴定后, 均可检测到目的基因. 得到3株特异性肝癌单链抗体。

0 引言

有关抗肿瘤单链抗体(ScFv)的报道较多, 但大多是通过基因工程技术把鼠源杂交瘤抗体改造成小分子单链抗体, 仍属鼠源抗体^[1-3]. 我们已利用噬菌体抗体库技术, 从200例原发性肝癌患者的B淋巴细胞中克隆出抗体重链和轻链可变区基因, 以具有氨苄青霉素抗性的pDAN5为载体, 参照Sblattero *et al*^[4]的方法, 构建了全人源肝癌单链抗体噬菌体呈现库. 本文中我们利用该抗体库进行肝癌噬菌体单链抗体基因克隆并进行抗体的活性分析。

1 材料和方法

1.1 材料 表达载体噬菌粒pDAN5、大肠杆菌TG1、肝