

聚乙二醇化人重组生长激素对去垂体幼鼠脏器功能的影响

程盼贵¹, 张知新^{1*}, 潘琳², 刘应科³, 杨晔³, 赵秋玲¹, 李鸿², 贺春²

1. 中日友好医院, 北京 100029

2. 中日友好临床医学研究所, 北京 100029

3. 北京市和平里医院, 北京 100013

摘要: **目的** 探讨聚乙二醇化重组人生长激素(PEG-rhGH)对去垂体幼鼠主要脏器的影响。**方法** SD 雄性幼鼠随机取88只进行去垂体手术造模,另18只假手术组为对照组。术后2周,选成模幼鼠54只,分为模型组、重组人生长激素(rhGH)组、PEG-rhGH组。每晚sc生理盐水0.25 mg/kg,并且rhGH组每晚sc注射用重组人生长激素0.25 mg/kg,PEG-rhGH组每周第1天晚上sc注射用重组人生长激素1.40 mg/kg。治疗4周后,检测肝功能ALT、AST、TBIL、DBIL水平,肾功能BUN、CREA水平,心肌酶谱CK、CKMB及肝脏、心脏、肾脏的病理组织和肝脏的转录生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$)和肾脏C-fos蛋白表达。**结果** 肝功能中AST、TBIL水平下降;肾功能中CREA水平升高;肝脏、肾脏、心脏病理未见明显异常;肝脏TGF- $\beta 1$ 、肾脏C-fos蛋白表达组间无差异。**结论** PEG-rhGH对肝脏、肾脏、心脏的组织形态和功能无明显不良影响。

关键词: 聚乙二醇化人重组生长激素;去垂体幼鼠;心脏;肝脏;肾脏;安全性

中图分类号: R965; R977 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2014)11-1219-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.11.006

Effects of PEG-rhGH on organ function of hypophysectomized rats

CHENG Pan-gui¹, ZHANG Zhi-xin¹, PAN Lin², LIN Ying-ke³, YANG Ye³, ZHAO Qiu-ling¹, LI Hong², HE Chun²

1. China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

2. Institute of Clinical Medical, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

3. Hepingli Hospital of Beijing City, Beijing 100013, China

Abstract: Objective To investigate the effects of polyethylene glycol recombinant human growth hormone (PEG-rhGH) on the major organs of hypophysectomized rats. **Methods** Eighty-eight Sprague-Dawley young male rats were underwent hypophysectomy, and another 18 rats with Sham operations were selected into the control group. Fifty-four qualified rats were randomly divided into the model, rhGH, and PEG-rhGH groups after two weeks. Saline was used with sc administration at dosage of 0.25 mg/kg every night. Recombinant Human Growth Hormone for Injection (0.25 mg/kg) was sc given every night in rhGH group, but Polyethylene Glycol Recombinant Human Growth Hormone for Injection (1.40 mg/kg) was sc given in first night every week in PEG-rhGH group. After treatment for 4 weeks, Liver function such as ALT, AST, TBIL, and DBIL levels, renal function such as BUN and CREA levels, myocardial enzymes CK, CKMB, and liver, heart, kidney pathology transcription, and the protein expression of transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) and renal C-fos in liver tissue were determined. **Results** There were decrease of levels of AST and TBIL in liver function, but increase of CREA level in renal function. No obvious abnormalities of pathology in liver, kidney, and heart. There were no difference for hepatic TGF- $\beta 1$ and the kidneys C-fos protein expression among groups. **Conclusion** No significant adverse effects of PEG-rhGH are observed on the liver, kidney, and heart morphology and function.

Key words: polyethylene glycol recombinant human growth hormone; hypophysectomized rats; heart; liver; kidney; security

目前临床治疗儿童生长激素缺乏症的有效方法是补充外源性的重组人生长激素(recombinant human growth hormone, rhGH)。rhGH是一种短效

生长激素,每天使用的不便捷性导致长期治疗中存在脱漏现象,影响疗效,而长效生长激素避免了该问题。长效生长激素是经聚乙二醇修饰的rhGH分

收稿日期: 2014-02-21

作者简介:程盼贵(1988—),男,北京中医药大学硕士研究生,研究方向:小儿内分泌遗传代谢病。Tel: 18046503110 E-mail: chengpanguizr@163.com

*通信作者 张知新(1963—),女,教授,主任医师,从事小儿内分泌遗传代谢病的研究。E-mail: Zhangzhixin032@163.com

子, 即聚乙二醇化重组人生长激素 (polyethylene glycol recombinant human growth hormone, PEG-rhGH), 其半衰期是 rhGH 的 20 倍^[1], 并维持稳定持久的血清 I 胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 水平^[2]。PEG-rhGH 在体内的药动学特点与机体自身生长激素的分泌和代谢不同, 其安全性问题值得观察。本实验采用去垂体大鼠幼鼠造成生长激素缺乏症模型, 采用 PEG-rhGH 进行干预, 并使用 rhGH 作对照, 观察 PEG-rhGH 对去垂体大鼠幼鼠心脏、肝脏、肾脏组织形态和功能的影响, 为 PEG-rhGH 的安全性用药提供实验依据。

1 材料

注射用重组人生长激素, 每支 30 U/10 mg, 批号 201105010; 注射用聚乙二醇化重组人生长激素, 规格 63 U/ (9 mg/mL), 批号 20110307011, 均购于长春金赛药业有限责任公司。转化生长因子 $\beta 1$ 抗体 (TGF- $\beta 1$) 购自美国 Santa Cruz 公司, 规格 0.1 mL, 批号 I1511; C-fos 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 规格 0.1 mL, 批号 G1411; 二抗及 DAB 购自上海基因科技有限公司, 规格 5 mL, 批号 GK500705。

清洁级 3 周龄雄性 SD 幼鼠, 体质量 60~80 g, 购于军事医学科学院实验动物中心, 动物许可证号 SCXK (京) 2009-0007。

2 方法

2.1 造模及分组

参考文献报道^[3], 采用去垂体术对 88 只幼龄大鼠进行生长激素缺乏症模型的建立。另取 18 只进行去垂体假手术作为对照组。选取去垂体手术后 2 周、体质量变化小于手术前 $\pm 10\%$ 的成模幼鼠, 并将体质量 (87.24 \pm 7.21) g 的 54 只随机分为模型组、rhGH 组、PEG-rhGH 组, 每组 18 只。干预期间隔日定点称量体质量、身长 (鼻尖长)、体长 (鼻尾长)。

2.2 给药方法

参照临床推荐剂量^[4], rhGH 组每晚颈部 sc

rhGH 0.25 mg/kg, PEG-rhGH 组每周第 1 天颈部 sc PEG-rhGH 1.40 mg/kg, 其余时间给予 0.25 mg/kg 生理盐水, 模型组每晚 sc 生理盐水 0.25 mg/kg。

2.3 检测指标

2.3.1 血样采取及生化指标检测 动物麻醉下腹主动脉取血, 4 °C 3 000 r/min 离心后取血清存于 -20 °C 冰箱待检, 所有生化指标均采用东芝 TBA-120FR 全自动生化分析仪检测, 包括肝功能: 空腹血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、直接胆红素 (DBIL); 肾功能: 尿素氮 (BUN)、肌酐 (CREA); 心肌酶谱: 肌酸激酶 (CK)、肌酸磷酸激酶同工酶 (CKMB)。

2.3.2 肝脏、心脏和肾脏病理观察 生长激素干预 4 周后每组处死 10 只幼鼠, 迅速取出新鲜胰腺固定于 10% 中性甲醛溶液中, 进行脱水、透明、浸蜡、包埋、制片、HE 染色, 光镜下观察肝脏、心脏、肾脏组织病理改变。

2.3.3 免疫组织化学检测 免疫组化 EnVision 法标记肝脏 TGF- $\beta 1$ 、肾脏 C-fos。采用美国 Media Cybernetics 公司 IPP (Image-Pro Plus) 图像分析软件分析肝脏 TGF- $\beta 1$ 、肾脏 C-fos 的蛋白表达量。每张免疫化样本在 20 倍物镜下选取 6 个视野, 读取阳性区域的平均吸光度值和积分吸光度值, 取每组均值进行比较。

2.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计分析软件, 所得数据符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均数比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 重组人生长激素对肝功能的影响

各组 TBIL 水平的差异均无统计学意义。PEG-rhGH 组幼鼠 ALT、AST 水平均低于模型组 ($P < 0.05$), 提示 PEG-rhGH 对肝功能并无明显影响, 且与 rhGH 组比较差异无统计学意义。见表 1。

表 1 重组人生长激素对肝功能的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 1 Effects of rhGH on liver function ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TBIL/(mmol·L ⁻¹)	DBIL/(μ mol·L ⁻¹)
对照	—	41.40 \pm 6.80	110.49 \pm 13.93	3.56 \pm 0.58	11.08 \pm 0.21
模型	—	30.88 \pm 9.98*	131.10 \pm 52.27	3.91 \pm 1.01	20.19 \pm 2.12
rhGH	0.25	33.67 \pm 5.81	98.14 \pm 13.18 [#]	3.79 \pm 1.09	14.25 \pm 2.07
PEG-rhGH	1.40	37.40 \pm 3.41 [#]	89.90 \pm 13.11 [#]	3.54 \pm 1.41	14.14 \pm 1.53

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

3.2 重组人生长激素对肾功能的影响

模型组去垂体幼鼠 BUN、CREA 水平较对照组高 ($P < 0.05$)。CREA 水平在 PEG-rhGH 干预后继续上升, 与 rhGH 组比较差异无统计学意义。推测血清 BUN、CREA 水平上升并非 PEG-rhGH 引起, 可能因大鼠去垂体模型引起的垂体功能低下, 进而导致蛋白合成不足而降解增加所致。生长激素通过抑制氨基酸降解和尿素生成, 抑制蛋白分解和促进蛋白合成, 进而促进机体的生长。去垂体大鼠生长激素缺乏, 生长激素的抑制氨基酸降解、尿素合成作用减弱, 使血清 BUN、CREA 水平增高。与文献报道相符^[5]。结果见表 2。

表 2 重组人生长激素对肾功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 2 Effects of rhGH on renal function ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	BUN/(μg·mL ⁻¹)	CREA/(μmol·L ⁻¹)
对照	—	5.75 ± 2.77	22.30 ± 6.82
模型	—	10.90 ± 3.46*	25.63 ± 6.39*
rhGH	0.25	9.82 ± 1.24	30.56 ± 6.56
PEG-rhGH	1.40	9.14 ± 1.38	32.70 ± 5.19 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

3.3 重组人生长激素对心肌酶谱的影响

模型组 CK 水平较对照组高, 但差异无统计学意义。干预组血清 CK 水平均较模型组明显改善 ($P < 0.05$)。模型组去垂体幼鼠血清 CKMB 水平较对照组低 ($P < 0.05$), 干预组均较模型组低 ($P < 0.05$)。PEG-rhGH 组与 rhGH 组差异无统计学意义。见表 3。

表 3 重组人生长激素对心肌酶谱的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 3 Effects of rhGH on myocardial enzymes ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	CK/(U·L ⁻¹)	CKMB/(μg·L ⁻¹)
对照	—	575.12 ± 99.43	360.50 ± 94.85
模型	—	636.71 ± 386.69	320.75 ± 155.78*
rhGH	0.25	303.94 ± 111.51 [#]	201.67 ± 64.83 [#]
PEG-rhGH	1.40	277.51 ± 86.88 [#]	173.00 ± 51.94 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group

3.4 PEG-rhGH 对肝脏、肾脏、心脏病理的影响

长效重组人生长激素 PEG-rhGH 干预后, 去垂体大鼠幼鼠肝脏肝细胞以中央静脉为中心, 未见明显异常, 肾脏、心脏心肌组织未见明显异常。HE 染色病理图见图 1。

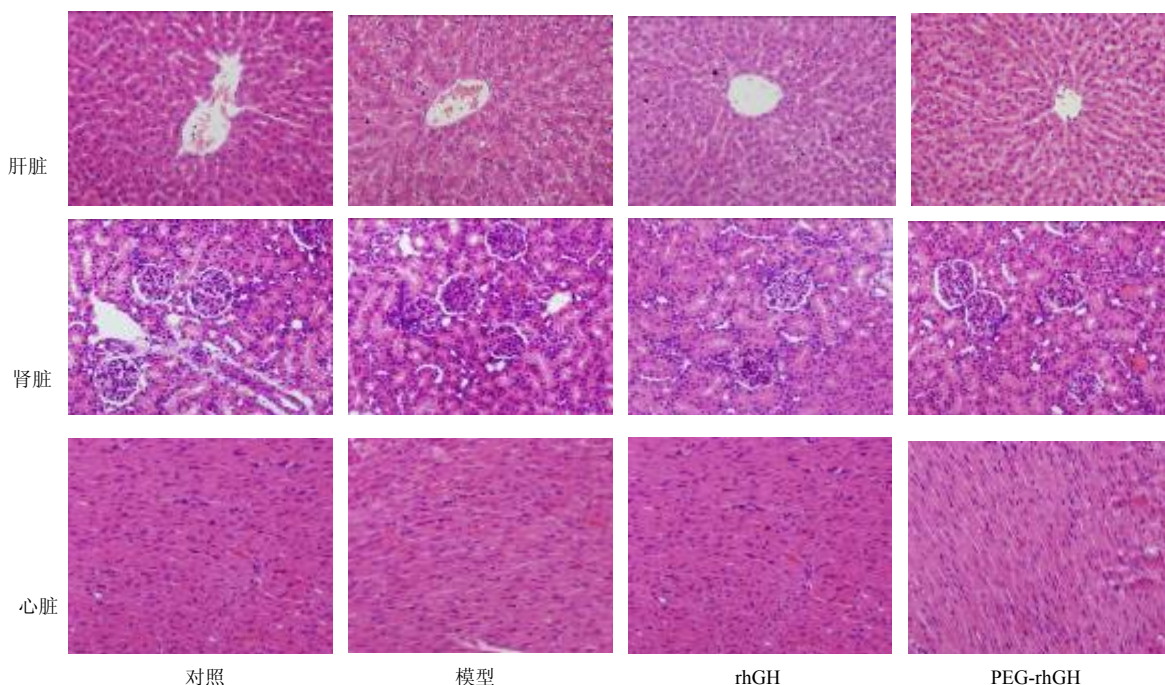


图 1 PEG-rhGH 对肝脏、肾脏、心脏病理的影响

Fig. 1 Effects of PEG-rhGH on pathology of liver, kidney, and heart

3.5 PEG-rhGH 的免疫组化结果

肝脏 TGF-β1 表达以中央静脉周围多见，阳性细胞呈棕黄色。肾脏无明显 C-fos 表达。见图 2。

3.6 重组人生长激素对肝脏 TGF-β1 表达的影响

各组间积分吸光度值和平均吸光度值无差异。PEG-rhGH 对肝脏 TGF-β1 的表达无明显影响。见表 4。

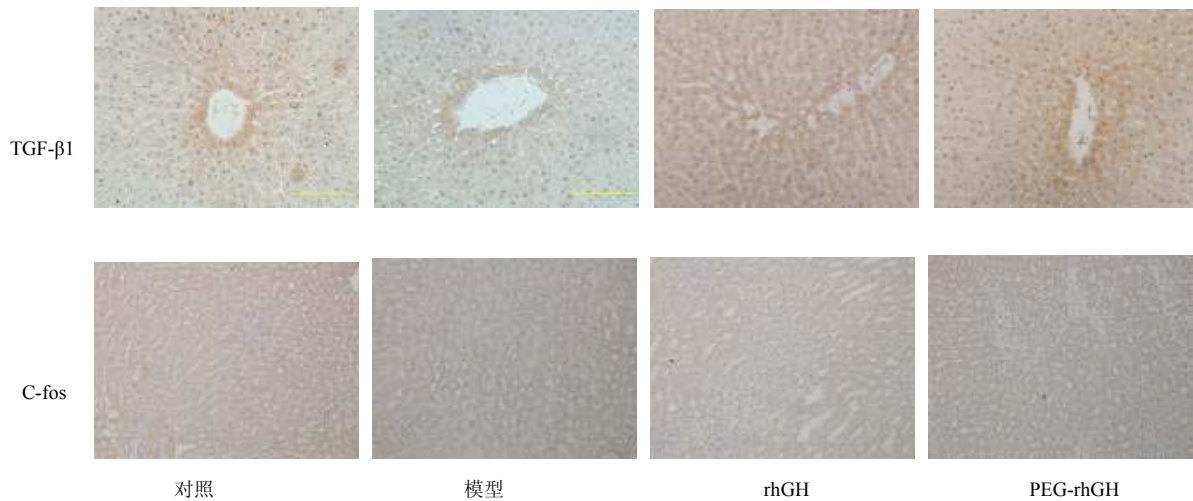


图 2 PEG-rhGH 对肝脏 TGF-β1 (A) 和肾脏 C-fos (B) 表达的影响

Fig. 2 Effects of PEG-rhGH on expression of liver TGF-β1 (A) and kidney C-fos (B)

表 4 重组人生长激素对肝脏 TGF-β1 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 4 Effects of rhGH on TGF-β1 expression ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	积分吸光度	平均吸光度
对照	—	16 694 561.57 ± 9 835 021.19	169.40 ± 4.12
模型	—	30 254 387.43 ± 6 008 271.72	165.56 ± 5.73*
rhGH	0.25	22 721 903.00 ± 8 275 863.09	163.85 ± 1.42
PEG-rhGH	1.40	25 157 168.36 ± 3 192 579.73	157.63 ± 13.51

4 讨论

PEG-rhGH 是在 rhGH 分子的 N-末端偶联 1 个聚乙二醇修饰剂分子从而构成 PEG-rhGH 共价偶联物，聚乙二醇化修饰在不改变 rhGH 分子的空间结构下，改善了 rhGH 分子在体内的药动学特点，降低肾脏清除率，从而延长药物代谢的半衰期，而目前临床用以治疗儿童生长激素缺乏症的短效生长激素在人体内只能持续 2~4 h^[6]。经过聚乙二醇修饰的 PEG-rhGH，其半衰期是短效生长激素的 20 倍^[1]。PEG-rhGH 在体内的药动学特点与机体自身生长激素的分泌和代谢不同。持续性的生长激素释放导致血清维持持久的血清 IGF-1 水平。IGF-1 被认为与肿瘤生长及心肌肥大密切相关的作用^[7-8]。目前关于 PEG-rhGH 的研究主要局限在对药物在体内的药动

学研究、有效性研究及对不良反应的观测^[9]，其对机体重要脏器的影响尚未见报道，因此本实验采用 PEG-rhGH 对去垂体幼鼠进行干预，并使用短效重组人生长激素做对照，观察 PEG-rhGH 对去垂体幼鼠重要脏器的影响。

实验中各干预组肝细胞与对照组无明显差异，均以中央静脉为中心呈放射状排列。肝功能各项指标也未发现异常。未观察到明显纤维化，且 4 组间 TGF-β1 表达无明显差异。TGF-β1 作为评价肝纤维化的重要指标，可以诱导静止状态的造血干细胞分化为肌成纤维细胞，分泌细胞外基质，促进肝纤维化的进展^[10]。下丘脑及垂体功能紊乱容易引起脂代谢异常，脂肪在肝脏的堆积以及脂肪氧化引起细胞因子、炎症因子，激活肝星形细胞^[11]，生长激素的次生因子 IGF-1 被证明在促进 HSC 增殖、活化方面起到重要的作用。本实验中并未观察到 PEG-rhGH 对肝脏的促肝纤维化作用。

C-fos 通过直接结合细胞因子启动区的激活蛋白 AP-1 启动细胞因子的表达，引起肿瘤坏死因子的生成，进而引起急性肾损伤^[12]。实验结果显示，PEG-rhGH 治疗组肾单位结构完整，未发现明显损伤，且对血清 BUN、CREA 水平无明显影响。实验中还观察到 PEG-rhGH 干预组幼鼠心肌细胞排列整齐，无明显肥大，且心肌酶谱中未发现 PEG-rhGH

对 CK、CKMB 水平的不良影响。

综上所述, PEG-rhGH 未对肝脏、心脏、肾脏的组织形态和功能产生明显影响, 但药物在临床上的长期使用安全性尚需进一步长期观察。

参考文献

- [1] 姜凌, 蔡永明, 曾勇, 等. 聚乙二醇化重组人生长激素在大鼠体内的药代动力学研究 [J]. 药学学报, 2009, 44(5): 506-509.
- [2] Biller B M, Ji H J, Ahn H, et al. Effects of once-weekly sustained-release growth hormone: a double-blind, placebo-controlled study in adult growth hormone deficiency [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, 96(6): 1718-1726.
- [3] 李湛军, 杨化新, 徐康森. 聚乙二醇化重组人生长激素长效作用及在体生物活性研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(11): 1270-1274.
- [4] 责长恩. 医学科研思路方法与程序 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 155.
- [5] Nørrelund H, Djurhuus C, Jørgensen J O, et al. Effects of GH on urea, glucose and lipid metabolism, and insulin sensitivity during fasting in GH-deficient patients [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2003, 285(4): E737-743.
- [6] Cox G N, Rosendahl M S, Chlipala E A, et al. A long-acting, mono-PEGylated human growth hormone analog is a potent stimulator of weight gain and bone growth in hypophysectomized rats [J]. *Endocrinology*, 2007, 148(4): 1590-1597.
- [7] Roddam A W, Allen N E, Appleby P, et al. Insulin-like growth factors, their binding proteins, and prostate cancer risk: analysis of individual patient data from 12 prospective studies [J]. *Ann Intern Med*, 2008, 149(7): 461-471.
- [8] Ebensperger R, Acevedo E, Meléndez J, et al. Selective increase in cardiac IGF-1 in a rat model of ventricular hypertrophy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 243(1): 20-24.
- [9] 程盼贵, 张知新, 潘琳, 等. 聚乙二醇化重组人生长激素对去垂体幼鼠胰岛分泌的影响及其机制 [J]. 现代药物与临床, 2014, 29(5): 465-470.
- [10] Breitkopf K, Godoy P, Ciucan L, et al. TGF-beta/Smad signaling in the injured liver [J]. *Z Gastroenterol*, 2006, 44(1): 57-66.
- [11] Adams L A, Angulo P, Lindor K D. Nonalcoholic fatty liver disease [J]. *CMAJ*, 2005, 172(7): 899-905.
- [12] Miyazaki H, Morishita J, Ueki M, et al. The effects of a selective inhibitor of c-Fos/activator protein-1 on endotoxin-induced acute kidney injury in mice [J]. *BMC Nephrol*, 2012, 13: 153.