论著

文章编号:1000-5404(2007)15-1500-04

IL-6/STAT3与冷保存大鼠部分肝移植肝再生的关系

袁晟光,王继见,董家鸿 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨冷保存对大鼠部分肝移植术后肝再生的影响及IL-6/STAT3与其的关系。**方法** 实验分为Ⅰ组(肝切除组)、Ⅱ组(冷保存1 h部分肝移植组)和Ⅲ组(冷保存8 h部分肝移植组)。观察比较各组术后1、6、12、24、48、72、168 h肝再生率、肝组织TNF-α、IL-6含量及增殖细胞核抗原(PCNA)、STAT3表达。**结果** Ⅰ组、Ⅱ组术后肝再生迅速,至术后第7天时分别接近和超过原来肝脏大小,Ⅲ组术后2~3 d大鼠肝再生率较Ⅰ组、Ⅱ组明显偏低($P<0.05$)。术后12 h内Ⅰ组、Ⅱ组肝组织TNF-α、IL-6水平明显高于Ⅲ组($P<0.05$)。Ⅰ组、Ⅱ组TNF-α、IL-6于术后12 h达高峰,后逐渐下降;而Ⅲ组24 h达高峰,此后一直维持较高水平。Ⅰ组、Ⅱ组PCNA表达于术后12~24 h达高峰;Ⅲ组术后12 h内PCNA表达明显低于其余两组($P<0.05$),48 h才达高峰,但至第7天仍有较多表达。Ⅰ组、Ⅱ组术后1 h STAT3表达最多,以后逐渐下降,7 d后表达基本消失。Ⅲ组STAT3 6 h才出现表达,12 h达高峰,7 d时仍有较多表达。**结论** 长时间冷保存降低了部分肝移植术后的肝再生能力,TNF-α、IL-6/STAT3的早期异常可能是长时间冷保存肝再生受损的主要原因之一。

关键词: 白细胞介素-6;信号传导蛋白和转录激活物3;肝再生;肝移植;大鼠

中图法分类号: R322.47; R392.3; R617 **文献标识码:** A

Relationship of IL-6/STAT3 with liver regeneration of partial grafts after cold preservation in rats

YUAN Sheng-guang, WANG Ji-jian, DONG Jia-hong (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of different cold preservation time on liver regeneration after partial liver transplantation in rats, and study the role of IL-6/STAT3. **Methods** SD rats were divided into 3 groups: group Ⅰ underwent liver resection, group Ⅱ received partial liver transplantation after one-hour cold preservation and group Ⅲ received partial liver transplantation after 8-hour cold preservation. Radioimmunoassay was used to measure the levels of TNF-α and IL-6 in liver tissues. The protein expressions of PCNA and STAT3 were assessed by immunohistochemical staining in paraffin sections. The liver regeneration ratio and the expressions of the proliferative cell nuclear antigen (PCNA) and STAT3 were compared among three groups at 1, 6, 12, 24, 48, 72 and 168 h after operation. **Results** The remnant liver in group Ⅰ and grafts in group Ⅱ grew rapidly; The regeneration ratio in group Ⅲ was significantly lower than that in group Ⅰ and group Ⅱ during postoperative day 2 to 3 ($P<0.05$). The levels of TNF-α and IL-6 in group Ⅰ and group Ⅱ were markedly higher than those in group Ⅲ in postoperative 12 h ($P<0.05$). The maximum levels of TNF-α and IL-6 appeared at postoperative 12 h in group Ⅰ and group Ⅱ, at 24 h in group Ⅲ. PCNA expressions in group Ⅰ and group Ⅱ were increased and reached the peak value at postoperative 24 h. PCNA expressions in group Ⅲ were markedly lower than groups Ⅰ and Ⅱ during postoperative 12 h ($P<0.05$), and reached the peak at 48 h. STAT3 expression reached the peak at postoperative 1 h in groups Ⅰ and Ⅱ, then decreased gradually to undetectable at postoperative day 7. In group Ⅲ, STAT3 expressions were detected at 6 h and reached the peak at postoperative 12 h, still more at 7 d. **Conclusion** Longer cold preservation time leads to more impairment of the regenerative ability of liver after partial liver transplantation. The abnormal changes of TNF-α, IL-6 and STAT3 in the early period of regeneration may be the main mechanism for impaired partial graft regeneration after long-time cold preservation.

Key words: IL-6; STAT3; liver regeneration; liver transplantation; rats

作者简介:袁晟光(1970-),男,四川省宣汉县人,博士,副主任医师,主要从事肝胆胰疾病方面的研究,发表论文10篇,现在桂林医学院附属医院肝胆外科。电话:(0773)2824373

收稿日期:2006-08-28;修回日期:2006-11-16

为满足不断增加的对供肝的需求,成人间劈裂式肝移植及活体肝移植得以广泛的开展。在移植过程中供肝将不可避免地遭受冷保存损伤[1],小体积供肝必须通过再生来满足受体的功能需求,然而对部分肝移植后肝再生调控及冷保存对其的影响目前仍知之甚少,本实验对此进行了初步研究。

1　材料与方法

1.1　动物及分组

雄性 SD 大鼠 140 只,体质量 190 ~ 300 g,由上海西普尔-必凯实验动物有限公司(Sino-British Sippr/BK Lab Animal Ltd., Shanghai, China)提供。实验分 3 组:Ⅰ组为肝部分切除组(n = 28),Ⅱ组为冷保存 1 h 部分肝移植组(n = 56,供、受体各 28 只),Ⅲ组为冷保存 8 h 后行部分肝移植组(n = 56,供、受体各 28 只)。于术后 1、6、12、24、48、72、168 h 处死动物(每个时相点 4 只大鼠),收集标本待检。

1.2　模型建立

1.2.1　部分肝移植　　动物术前禁食 12 h,不禁饮,清洁手术,乙醚持续吸入麻醉。参照文献[2]的方法建立无肝动脉血供、双袖套法大鼠肝脏移植模型。腹部横切口进腹,游离肝周韧带,游离结扎左膈静脉、右侧肾上腺静脉丛、右肾静脉、幽门静脉及肝动脉,将外径 1 mm 支架插入胆总管固定。从肝下下腔静脉注入含 200 U 肝素的平衡液 0.5 ml。以 0 ~ 4 ℃ UW 液 5 ml 从门静脉灌洗肝脏。于胸腔内剪断肝上下腔静脉。将供肝置入 0 ~ 4 ℃ UW 液中,切除左叶和尾叶。修剪肝下下腔静脉,安置门静脉和肝下下腔静脉袖套,5-0 丝线固定。然后将移植物保存于 20 ml 0 ~ 4 ℃UW 液中。受体肝切除前,由供肝门静脉注入 20 ml 乳酸钠平衡液,驱出供肝内的 UW 液。肝上下腔静脉置两针 8-0 无损伤缝线。阻断受体肝下下腔及门静脉,门静脉入肝处注入 2 ml 生理盐水,然后阻断肝上下腔静脉,移去肝脏置入供肝,连续缝合肝上下腔静脉,袖套法吻合门静脉,松开门静脉及肝上下腔的血管钳,无肝期约 15 min。同样袖套法吻合肝下下腔。支架连接胆管固定。术后肌注150 mg/kg氨苄青霉素,动物自由进食饮水。

1.2.2　部分肝切除　　乙醚麻醉,腹部正中线切口入腹,游离肝脏后将左叶及尾状叶结扎切除。术后处理同部分肝移植。

1.3　肝再生率测定

肝再生率(%) = 100 × [C - (A - B)]/(A - B),其中 A 为供肝减体积前肝重或肝切除组大鼠理论肝重,B 为切除肝重,C 为最后取下的再生肝重。

1.4　肝组织 PCNA 及 STAT3 表达

采用 S-P 免疫组化方法(Histostain™- Plus Kits, 北京中山生物技术有限公司,beijing zhongshan biotechnology CO., LTD)抗体为小鼠抗 PCNA 多克隆抗体及兔抗-STAT3 抗体(博士德公司,中国)。高倍(×400)视野下选取 10 个视野,计数 1 000 个肝细胞中 PCNA 阳性细胞数(细胞核染成棕黄色为阳性);每时相点选取 5 个高倍视野,于 Mias 图像分析系统下计算 STAT3 阳性面积比(细胞质染为棕黄色为阳性)。

1.5　肝组织 TNF-α 和 IL-6 测定

采用放免法,全自动 γ 计数器测定,结果除以相应蛋白量,定义为每毫克蛋白 TNF-α 和 IL-6 含量。

1.6　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。SPSS 10.0 软件包进行,多组间比较 ANOVA 检验,方差不齐则采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。

2　结果

2.1　术后各时点肝脏再生率

如表 1 所示,Ⅰ组、Ⅱ组术后肝再生迅速,至术后第 7 天时分别接近和超过原来肝脏大小,两组再生率比较差异不明显。Ⅲ组术后 2 ~ 3 d 大鼠肝再生率较Ⅰ组、Ⅱ组明显偏低。

表 1　各组术后再生率变化(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	术后时间(t/d)			
	1	2	3	7
Ⅰ组	2.70 ± 0.98	50.90 ± 8.90	72.25 ± 5.15	95.26 ± 1.36
Ⅱ组	6.53 ± 1.65	50.04 ± 4.47	74.08 ± 10.82	102.63 ± 3.96
Ⅲ组	5.45 ± 1.80	17.40 ± 3.79[ab]	25.68 ± 2.73[ab]	90.95 ± 6.36

a: P < 0.05, 与Ⅰ组同时点比较; b: P < 0.05, 与Ⅱ组同时点比较

2.2　肝细胞 PCNA 表达

Ⅰ组、Ⅱ组术后即有 PCNA 表达增加,12 ~ 24 h 达峰值,以后逐渐下降。Ⅲ组术后 12 h 内 PCNA 表达较其余两组明显偏低,48 h 才达高峰,至第 7 天阳性表达仍处高水平(表 2,图 1)。

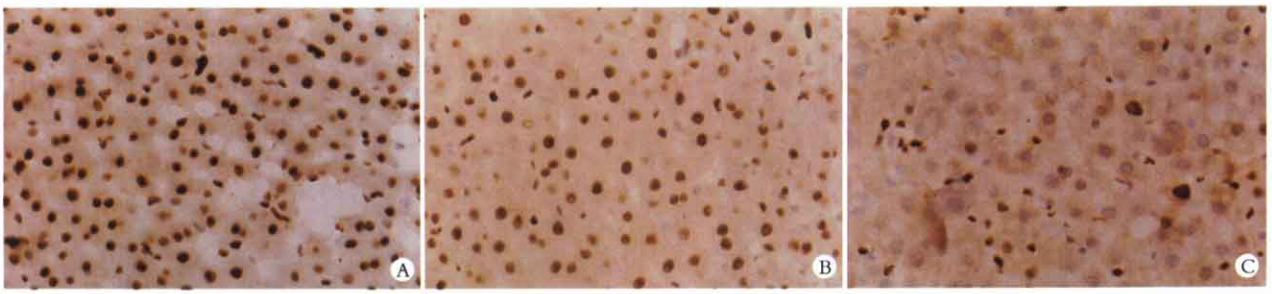
2.3　STAT3 表达

Ⅰ组、Ⅱ组术后 1 h STAT3 表达最多,以后逐渐下降,7 d 后表达基本消失。Ⅲ组 STAT3 表达延迟,6 h 出现,12 h 达高峰,7 d 时仍有较多表达(表 3、图 2)。

表 2　各组肝细胞 PCNA 标记指数(%)

组别	术后时间(t/h)						
	1	6	12	24	48	72	168
Ⅰ组	41.20 ± 3.92	46.40 ± 9.68	78.00 ± 7.20	76.00 ± 6.80	69.60 ± 7.28	47.60 ± 7.52	20.20 ± 4.24
Ⅱ组	49.80 ± 7.76	52.00 ± 10.00	76.00 ± 9.60	75.00 ± 7.20	67.60 ± 12.76	50.60 ± 9.92	37.80 ± 6.64[a]
Ⅲ组	13.60 ± 2.88[ab]	31.60 ± 4.48[ab]	36.20 ± 5.36[ab]	61.20 ± 10.56	73.20 ± 8.24	68.20 ± 6.24	61.00 ± 8.00[a]

a: P < 0.05, 与Ⅰ组比较; b: P < 0.05, 与Ⅱ组同时点比较



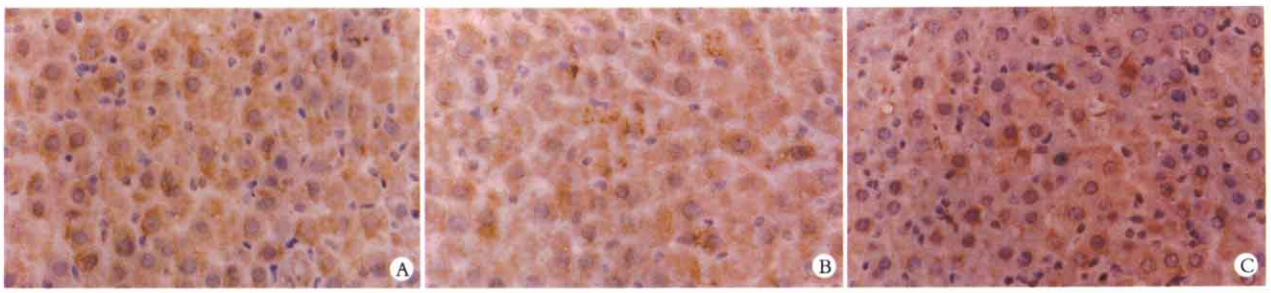
A、B、C 分别为Ⅰ组(肝部分切除组)、Ⅱ组(冷保存1 h部分肝移植组)、Ⅲ组(冷保存8 h后行部分肝移植组)术后12 h PCNA表达

图1 大鼠肝细胞PCNA表达比较 (S-P ×400)

表3 各组各时点STAT3阳性面积(%)

组别	术后时间(t/h)						
	1	6	12	24	48	72	168
Ⅰ组	45.43 ±4.13	38.47 ±4.65	26.58 ±7.07	27.17 ±5.80	26.63 ±4.50	15.85 ±1.45	0.12 ±0.06
Ⅱ组	49.16 ±5.70	33.21 ±3.40	27.90 ±6.38	29.61 ±6.40	27.54 ±4.30	18.53 ±2.30	0.79 ±0.25
Ⅲ组	1.76 ±0.50^{ab}	19.24 ±1.57^{ab}	26.15 ±5.27	25.23 ±4.90	26.54 ±4.06	20.35 ±3.22	14.10 ±1.61^{ab}

a：$P<0.05$，与Ⅰ组同时点比较；b：$P<0.05$，与Ⅱ组同时点比较



A、B、C 分别为Ⅰ组(肝部分切除组)、Ⅱ组(冷保存1 h部分肝移植组)、Ⅲ组(冷保存8 h后行部分肝移植组)术后6 h STAT3表达

图2 大鼠肝细胞STAT3表达比较 (S-P ×400)

2.4 肝组织TNF-α及IL-6水平

术后12 h内Ⅰ组、Ⅱ组肝组织TNF-α、IL-6水平明显高于Ⅲ组。Ⅰ组、Ⅱ组TNF-α、IL-6于术后12 h达高峰，后逐渐下降；而Ⅲ组24 h达高峰，此后一直维持较高水平(表4、5)。

表4 各组不同时点肝组织TNF-α水平(pg/mg)

组别	术后时间(t/h)						
	1	6	12	24	48	72	168
Ⅰ组	122.83 ±17.11	158.85 ±12.7	193.83 ±18.93	143.42 ±18.29	136.05 ±18.76	124.24 ±5.42	86.50 ±16.69
Ⅱ组	135.15 ±21.70	162.96 ±12.74	182.56 ±19.69	151.38 ±14.80	141.43 ±19.97	145.51 ±30.03	118.08 ±17.46
Ⅲ组	84.98 ±9.02^{a}	119.14 ±18.47^{ab}	139.88 ±12.35^{ab}	202.00 ±27.30^{ab}	178.32 ±29.34	175.64 ±35.57	175.35 ±20.40^{ab}

a：$P<0.05$，与Ⅰ组同时点比较；b：$P<0.05$，与Ⅱ组同时点比较

表5 各组不同时点肝组织IL-6水平(pg/mg)

组别	术后时间(t/h)						
	1	6	12	24	48	72	168
Ⅰ组	9.34 ±1.57	11.3 ±1.13	15.58 ±1.61	12.15 ±2.07	11.27 ±1.99	8.93 ±0.83	7.23 ±0.69
Ⅱ组	10.04 ±0.62	11.04 ±0.82	15.69 ±1.96	13.08 ±1.64	10.61 ±1.29	10.13 ±0.74	9.82 ±1.34^{a}
Ⅲ组	6.06 ±1.20^{ab}	8.15 ±1.27^{ab}	10.61 ±1.42^{ab}	12.36 ±0.51	11.86 ±1.07	10.36 ±0.33	11.94 ±0.93^{a}

a：$P<0.05$，与Ⅰ组同时点比较；b：$P<0.05$，与Ⅱ组同时点比较

3　讨论

增殖细胞核抗原(proliferative cell nuclear antigen，PCNA) 是 DNA 多聚酶的辅助蛋白，其合成与 DNA 的复制和细胞的增殖有着直接的关系。其含量和表达强弱的变化与 DNA 合成及 DNA 复制的活跃程度一致。PCNA 的表达可以反映出肝细胞内 DNA 的合成及肝细胞增生的活性。本实验显示 1 h 冷保存组肝移植大鼠术后 3 d 内，移植肝再生率及 PCNA 表达与部分肝切除组无明显差别，但至第 7 天 PCNA 表达差异显著，肝再生率也存在一定差异。造成肝移植后肝脏再生能力增加的原因可能是：①移植肝脏肝损害较重，原位大鼠肝移植后 24 h 10% ~15% 肝细胞无活力，从而需要更多的肝细胞来维持机体需要；②免疫系统的激活促进肝再生。Anders 等[3] 发现淋巴细胞的活化对肝再生有促进作用。我们在实验中观察到部分肝移植组和冷保存组大鼠术后 6 h 汇管区即出现各种炎性细胞的浸润，而肝切除组无此改变，提示肝移植后存在免疫系统的激活，这可能与缺血再灌注损伤[4] 及同种异基因移植有关。Dirsch 等[5] 采用在体减体积模型研究了冷保存后部分肝移植物再生情况，发现与肝切除相比，肝移植组溴脱氧尿嘧啶(5′-Bromodeoxyuridine，BrdU) 标记推迟了 24 h 出现，提示肝脏 S 期细胞增殖异常。我们的研究发现离体减体积移植肝冷保存 8 h 后其再生能力明显受损，表现为术后 3 d 肝再生率明显低于肝切除组，PCNA 阳性细胞数在 12 h 内较对照明显偏低，高峰延迟，阳性细胞强度也较对照弱。在术后 12 h 内，8 h冷保存组肝脏 TNF-α 及白细胞介素-6(interleukin-6，IL-6) 水平明显低于对照，而信号传导蛋白和转录激活物 3(signal transducers and activators of transcription3，STAT3) 蛋白表达在 1 ~6 h 内表达很少。IL-6 和肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-α，TNF-α) 是肝细胞增殖的主要启动因子。肝脏大块组织丧失后，枯否氏细胞释放大量 TNF-α 并通过 NF-κB 引起 IL-6 的释放，IL-6 作用于相邻细胞引起信号传导及转录活化子 3 活化，STAT3 进一步激活多种即早基因的表达，使肝细胞进入增殖周期[6]。研究证实无论是部分肝切除前或切除后一定时间的热缺血都会损害肝脏再生能力[7]。Selzner 等[8] 证实热缺血所致肝部分切除后再生能力的损害与 IL-6 有关。众所周知，冷保存主要对窦状内皮细胞及枯否氏细胞产生损伤[9]，同时部分肝移植的过度灌流也会造成窦状内皮细胞等肝脏非实质细胞的损伤[10]，而非实质细胞是肝再生时 TNF-α 及 IL-6 的主要产生来源，同时研究还表明枯否细胞刺激肝细胞生长[11]，对枯否细胞功能的抑止可通过减少 TNF-α 及 IL-6 释放而损害肝切除后肝再生[12]。结合本实验结果，我们推测长时间冷保存组肝再生异常可能是长时间冷缺血及过度灌流对肝脏非实质细胞功能造成严重损害，导致移植肝早期 TNF-α 及 IL-6 产生及 STAT3 表达的减少，影响肝再生正常启动，最终导致移植物再生障碍。而随着后期肝组织 TNF-α 及 IL-6 水平的上升及 STAT3 表达的增加，8 h 冷保存组肝脏最终出现肝细胞明显增殖及肝重的显著增长，这可能与肝脏非实质细胞功能的逐步恢复有关，这需要进一步通过对窦状内皮细胞和/或枯否细胞的功能研究来证实。

本实验研究显示：短时间冷缺血对部分肝移植后移植肝再生无明显影响，长时间冷保存导致部分移植肝再生受损，主要表现为细胞增殖程度及肝重恢复降低、减慢、延迟。TNF-α、IL-6/STAT3 的早期异常可能是长时间冷保存肝再生受损的主要原因之一。

参考文献：

[1] Bilzer M, Gerbes A L. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies[J]. J Hepatol, 2000, 32(3): 508 - 515.

[2] 袁晟光，王继见，董家鸿. 冷保存大鼠部分肝移植模型的建立[J]. 消化外科，2003，2(4)：274 - 276.

[3] Anders R A, Subudhi S K, Wang J, *et al*. Contribution of the lymphotoxin beta receptor to liver regeneration[J]. J Immunol, 2005, 175(2): 1295 - 1300.

[4] Hoffmann S C, Kampen R L, Amur S, *et al*. Molecular and immunohistochemical characterization of the onset and resolution of human renal allograft ischemia-reperfusion injury[J]. Transplantation, 2002, 74(7): 916 - 923.

[5] Dirsch O, Dahmen U, Gu Y L, *et al*. Influence of cold ischemia on liver regeneration after partial liver transplantation[J]. Transplant Proc, 2002, 34(6): 2303 - 2304.

[6] Fausto N. Liver regeneration[J]. J Hepatol, 2000, 32(Suppl 1): 19 - 31.

[7] Yamada F, Abe T, Saito T, *et al*. Ischemic preconditioning enhances regenerative capacity of hepatocytes after prolonged ischemia[J]. Transplant Proc, 2001, 33(1 - 2): 956.

[8] Selzner M, Camargo C A, Clavien P A. Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6[J]. Hepatology, 1999, 30(2): 469 - 475.

[9] Huet P M, Nagaoka M R, Desbiens G, *et al*. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver[J]. Hepatology, 2004, 39(4): 1110 - 1119.

[10] Man K, Lo C M, Ng I O, *et al*. Liver transplantation in rats using small-for-size grafts: a study of hemodynamic and morphological changes[J]. Arch Surg, 2001, 136(3): 280 - 285.

[11] Wang C P, Zhou L, Su S H, *et al*. Augmenter of liver regeneration promotes hepatocyte proliferation induced by Kupffer cells[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(30): 4859 - 4865.

[12] Meijer C, Wiezer M J, Diehl A M, *et al*. Kupffer cell depletion by CI2MDP-liposomes alters hepatic cytokine expression and delays liver regeneration after partial hepatectomy[J]. Liver, 2000, 20(1): 66 - 77.

(编辑　陈聪连)