文章编号:1000-5404(2008)11-1037-03

论著

VEGF 对大鼠 50%肝脏移植术后血清 HGF、IL-6 浓度的影响

董晓灵,王曙光,张玉君,江 燕 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 探讨血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)对大鼠部分肝移植术后血清肝细胞生长因子(hepatocyte growth factor,HGF)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)浓度的影响。方法 建立大鼠 50% 部分肝移植模型。实验动物分 3 组:VEGF 治疗组、anti-VEGF 组、对照组。分别于术后注射鼠重组 VEGF、anti-VEGF、生理盐水。在术后不同时相点(0、12、24、72、168 h)测血清中 HGF、IL-6 含量及肝脏生化指标。结果 VEGF 组血清 HGF、IL-6 水平较对照组明显增高,anti-VEGF 组较对照组明显降低,有显著差异。anti-VEGF 组天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)、丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)较 VEGF 组及对照组明显升高,有显著差异。结论 VEGF 治疗能明显促进大鼠部分肝脏移植术 HGF、IL-6 的释放。

关键词:部分肝移植;VEGF;anti-VEGF;HGF;IL-6;大鼠
中图法分类号:R392.7;R446.11;R657.3 文献标识码:A

VEGF enhances serum levels of HGF and IL-6 in rats following 50 percent partial liver transplantation

DONG Xiao-ling, WANG Shu-guang, ZHANG Yu-jun, JIANG Yan (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To determine the effects of exogenous VEGF on the serum levels of HGF and IL-6 in rats following partial liver transplantation. Methods Totally 180 SD rats were subjected to 50 percent partial liver transplantation, then each 60 rats were treated either with VEGF, anti-VEGF or normal saline. HGF, IL-6 and hepatic biochemical markers were assessed at 0, 12, 24, 72, 168 h after operation. Results In the VEGF group, the serum levels of HGF and IL-6 were significantly increased as compared with those of anti-VEGF group or control group. Blockage of endogenous VEGF led to a marked increase of ALT and AST. Conclusion VEGF can markedly increase the secretion of HGF and IL-6, which may be related to its enhancing liver regeneration and improving liver function.

Key words: partial liver transplantation; VEGF; anti-VEGF; HGF; IL-6; rat

活体肝移植为解决供肝来源问题开拓了新的途径,但临床上活体肝移植仍存在许多问题尚待解决,如供肝的大小和受体的匹配,术后受体肝功能损害导致的肝功能不全,这严重制约了部分肝移植术广泛开展。术后肝功能不全除与排斥、免疫等因素外,还与肝脏再生活性的损害等密切相关。关于肝脏再生活性国内外有大量相关研究,目前研究最多的是 HGF、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等。HGF 是最强的丝裂原,能明显促进肝脏细胞的分裂和增殖,体外实验均证实这种作用。IL-6 能活化下游的信号诱导转录活化因子 3(signal transducers and activators of transcription, STAT3)、核转录因子激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)和细胞核因子酉乙蛋白(NF-κB)能明显促进肝脏的再生活性,促进肝脏再生[1,2]。肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cell, LSEC)是肝细胞增生的'感受器",能产生 HGF、TNF-α、VEGF、内皮素、IL-6、一氧化氮合酶等。在肝脏移植术后,由于肝脏移植前低温保存和缺血再灌注可造成 LSEC 的损伤,LSEC 损伤可以通过细胞水肿或血小板和白细胞黏附到损伤的内皮细胞表面导致肝脏微循环障碍,继而发生肝实质细胞的损伤。并且由于 LSEC 的损害导致肝脏再生活性的损害,也是导致移植后肝脏功能不良的一个重

作者简介:董晓灵,男,湖北省武穴市人,博士研究生,主治医师,主要从事肝胆胰腺外科疾病治疗方面的研究,发表论文 6 篇。电话:13594124259
通信作者:王曙光,电话:(023)68754681,E-mail:sgwang90@yahoo.com
收稿日期:2008-01-17 修回日期:2008-02-10

要因素。那么能否通过促进肝窦内皮细胞增生,影响HGF、IL-6等细胞因子的释放来改善肝脏移植术后肝细胞的增生活性,增强肝细胞的增生能力,促进肝脏再生,改善术后肝功能?本研究证实VEGF能明显提高大鼠肝部分移植术后血清HGF、IL-6,有助于肝脏再生活性的恢复。这对预防和治疗肝脏移植术后肝功能不全有非常重要的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性SD大鼠180只(第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心),体质量230~250 g,按随机数字表法分为3组:A组(VEGF治疗组):50%肝移植+VEGF治疗;B组(anti-VEGF组):50%肝移植+anti-VEGF;C组(对照组):50%肝移植+NaCl。每组大鼠各60只,在0、12、24、72、168 h 5个时相点受体、供体各6只大鼠,鼠重组VEGF购自美国Biological公司,polyclonal anti-VEGF (Asbach, Germany),大鼠HGF和IL-6 ELISA KIT购自美国TPI公司。术前8 h禁食,不禁饮,清洁手术,在手术显微镜下进行。

1.2 方法

1.2.1 供体手术 采用Kamada法。大鼠乙醚麻醉,腹部横形切口进腹,2%硫化钠溶液切口脱毛,碘伏消毒。无损伤供肝切取:上腹部横切口打开腹腔,游离肝上下腔静脉,结扎右肾静脉,游离胆总管,于下端楔形切开,内置胆总管支架并固定。游离腹主动脉,肝总动脉平面,自腹腔静脉注入1%肝素2 ml,穿刺腹腔干,乳酸林格液灌注,结扎肝总动脉以上腹主动脉,剪开左肾静脉以下的下腔静脉,快速游离肝脏。紧贴膈肌环形剪断肝上下腔静脉,于脾静脉水平剪断门静脉,肝脏颜色逐渐失去血色,取出供肝。

1.2.2 供肝50%肝叶切除 采用Higgin's法。保留左外叶及右中叶,分别结扎左中叶、尾状叶,右后叶根部,切除之。得到50%的供肝。称质量,置入林格液中4 ℃保存。

1.2.3 受体肝脏切除 静脉钳阻断下腔静脉及门静脉,进入无肝期,分别切断门静脉、肝上下腔静脉、肝下下腔静脉、胆总管,切除整个肝脏。

1.2.4 重建受体肝脏血供及胆管 将受体50%的供肝置入受体腹腔,9-0丝线连续缝合肝下下腔静脉,用显微镊提起门静脉管壁,将袖套置入门静脉内,并环行结扎固定,松开门静脉及肝上下腔静脉,结束无肝期,同时安置固定肝下下腔静脉的袖套。胆总管支架套接,重建胆总管,并固定。检查腹腔内无出血,无血管、肝脏扭曲,关闭腹壁,术毕。

1.2.5 术后经阴茎背静脉实验 A、B、C组在0 h及12、36 h分别各输注VEGF(100 ng/只)、anti-VEGF(40 μg/只)及100 μl的NaCl。予适当复温,术后饮水,进食,不用免疫抑制剂。

1.3 检测指标

两组动物分别于术后0、12、24、72、168 h 5个时相点分别处死,经腹腔静脉取血4~5 ml,3 000 r/min离心10 min,分离血清,OLYMPUSAV800全自动生化分析仪检测AST和ALT。

HGF、IL-6浓度检测按试剂盒说明书操作。

1.4 统计学处理

数据用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 10.0软件进行方差分析。

2 结果

2.1 ALT、AST变化

术后12 h开始3组ALT及AST开始明显升高,72 h到达高峰,然后开始下降。A组较C组明显降低,B组较C组和A组明显升高。经方差分析在12 h,A组与C组有显著差异($P<0.05$),B组与C组有显著差异($P<0.05$);24 h A组较C组有显著差异($P<0.05$);与C组有非常显著差异($P<0.01$);B组与C组有显著差异($P<0.05$);72 h,A与B组和对照组均有非常显著差异($P<0.01$);B组和C组有非常显著差异($P<0.01$);168 h B组与A组及C组之间均有非常显著差异($P<0.01$),其余各时相点之间比较均无统计学意义。提示外源性VEGF能明显改善肝部分移植术后肝功能,阻断内源性VEGF能加剧大鼠肝部分肝脏移植术后肝功能的损害。见表1。

表1 大鼠50%肝移植术后各时相点血清ALT、AST浓度变化(U)

组别	0 h	12 h	24 h	72 h	168 h
ALT					
A组	34.6±6.1	120.8±2.4[a]	189.5±11.4[ab]	218.5±7.6[ab]	103.2±14.8[a]
B组	41.4±3.1	296.6±5.5[b]	558.6±5.6[b]	1140.2±4.6[b]	980.4±4.9[b]
C组	38.1±1.4	190.4±11.8	335.2±24.5	718.6±39.2	113.2±21.8
AST					
A组	31.5±3.5	141.5±24.1[a]	249.2±24.1[ab]	318.4±9.1[ab]	133.8±26.3[a]
B组	38.9±4.6	287.1±36.4[b]	519.2±56.3	1301.4±8.2[b]	1119.6±8.1[b]
C组	36.4±2.4	160.4±13.5	385.7±45.1	726.2±51.4	233.7±27.8

a:$P<0.05$,与anti-VEGF组比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

2.2 血清HGF、IL-6测定

术后12 h A、C组HGF开始升高,72 h到达高峰,然后开始下降,168 h后仍高于正常。B组HGF有所升高,但增幅不大,且没有明显高峰期。A组较对B、C组明显增高,B组较C组明显降低。经方差分析12 h,B组与A组和C组均有显著差异($P<0.05$);24 h A组较C组有显著差异($P<0.05$),与B组有非常显著差异($P<0.01$),B组与C组有显著差异($P<0.05$);72 h A组与B组和C组均有非常显著差异($P<0.01$),B组和C组有非常显著差异($P<0.01$);168 h B组与A组及C组之间均有显著差异($P<0.05$),其余各时相点之间比较均无统计学意义。

IL-6结果与HGF类似,但高峰期提前至24 h出现,经方差分析,12 h B组与A组和C组均有显著差异($P<0.05$);24 h A组与B组和C组均有非常显著差异($P<0.01$),B组和C组有非常显著差异($P<0.01$),A组较C组有显著差异($P<0.05$);72 h A与B组有非常显著差异($P<0.01$),A组和C组有显著差异($P<0.05$),B组与C组有显著差异($P<0.05$);168 h B组与A组及C组之间均有显著差异($P<0.05$),其余各时相点之间比较均无统计学意义。提示外源性VEGF能明显促进HGF、IL-6的产生,阻断内源性VEGF能减少其产生。见表2。

表 2　大鼠 50% 肝移植术后各时相点血清 HGF、IL-6 浓度变化[$\bar{D}$(260)]

组别	0 h	12 h	24 h	72 h	168 h
HGF					
A 组	124.5 ± 6.8	340.9 ± 41.4[a]	645.3 ± 45.1[ab]	1176.5 ± 89.4[ab]	496.5 ± 15.3[a]
B 组	108.6 ± 4.1	124.6 ± 59.7[b]	166.6 ± 26.7[b]	180.2 ± 27.6[b]	140.4 ± 24.7[b]
C 组	9.6 ± 2.5	260.1 ± 20.6	334.7 ± 41.8	507.8 ± 34.2	346.1 ± 30.6
IL-6					
A 组	137.4 ± 1.2	541.5 ± 35.7[a]	1149.3 ± 7.6[ab]	818.4 ± 5.3[ab]	443.8 ± 40.7[a]
B 组	8.6 ± 4.6	187.1 ± 24.8[b]	309.2 ± 28.6[b]	267.6 ± 20.4[b]	219.1 ± 14.6[b]
C 组	130.9 ± 2.5	460.4 ± 34.2	785.7 ± 54.2	426.2 ± 41.0	333.7 ± 41.2

a $P<0.05$，与 anti-VEGF 组比较；b $P<0.05$，与对照组比较

3　讨论

VEGF 是一种具有多种潜能的细胞因子，与其特异性受体结合后，可导致蛋白激酶激活，以及大量离子内流，造成内皮细胞分裂增生，并形成新生血管，为组织细胞生长提供营养和氧份，并减少细胞凋亡。许多肝脏病变导致肝血管系统的构造和功能发生改变，都会改变肝脏的血流，并造成肝细胞缺血缺氧，进而影响肝功能。在肝部分切除术后 VEGF 能促进肝脏增生[3]。最近研究表明，VEGF 能显著降低由 D-半乳糖胺和脂多糖诱导的急性肝损害的血清 ALT 水平，促进肝细胞及肝窦内皮细胞的增生，并降低其死亡率，同时发现 VEGF 能明显阻止肝窦内皮细胞结构的破坏。有研究报道给予外源性 VEGF 能显著降低四氯化碳诱导的大鼠肝脏损害[4]。研究报道，大鼠肝部分切除术后，给予高压氧治疗，能明显降低术后血清 ALT 及 TBIL 的水平，促进 VEGF 分泌，并且认为高压氧治疗可以作为肝脏大部分切除术的一种治疗模式[5]。Donahower 等[6]研究扑热息痛诱导的 B6C3F1 小鼠肝毒理作用时发现外源性 VEGF 对于扑热息痛诱导的肝脏损伤的肝细胞增生恢复有非常重要的作用。

肝细胞生长因子首先被证实为培养的肝细胞的血源性丝裂原，HGF 及其受体是肝细胞增殖的基本因子，是促使肝细胞由 G_1 期向 S 期转化的最主要因素。HGF 主要是由非实质肝细胞（LSEC）分泌，通过旁分泌、自分泌等途径刺激肝再生[7]。研究表明 HGF 能显著促进肝细胞再生，有利于肝细胞膜的稳定性及肝功能的恢复。IL-6 在部分肝切除术后由肝脏（主要为非实质性细胞）及肠道内产生，并且被证实是肝再生必不可少的介质[8-10]。

在肝部分切除术后肝细胞和 LSEC 激活通过旁分泌、自分泌产生 HGF、IL-6，24 h 达到高峰期，本实验结果与其相一致。在 24、72 h 时相点 VEGF 组较 anti-VEGF 组及对照组有显著差异。提示外源性 VEGF 能明显促进 HGF、IL-6 的产生。VEGF 在体外实验证实能明显促进 LSEC 的增生，抑制其凋亡。我们既往研究证实在大鼠肝脏部分切除术后，肝窦内皮细胞的活化能促进子 HGF、TNF-α、IL-6 的分泌，能明显促进肝细胞的增生[11,12]。因此，可以认为大鼠肝部分移植术后 VEGF 治疗组血清 HGF、IL-6 的升高可能与 VEGF 促进 LSEC 的增生、降低其凋亡有关。同时我们发现术后 VEGF 组较 anti-VEGF 组及对照组的肝功能改善有显著差异，并且 HGF、IL-6 升高的时相点与肝功能改善的时相点基本一致。

因此我们推断 VEGF 可能通过促进 LSEC 的增生和损伤的及时修复，增强 LSEC 的功能，促进 HGF、IL-6 等细胞因子的产生，从而增强肝再生活性，改善肝功能。其作用机制和途径有待进一步研究。

参考文献：

[1] Pietrangelo A, Dierssen U, Valli L, *et al*. STAT3 is required for IL-6-gp130-dependent activation of hepcidin *in vivo*[J]. Gastroenterology, 2007, 132(1): 294-300.

[2] Ciecierski R, Wisniewski M, Paczek L. Liver regeneration[J]. Pol Merkur Lekarski, 2005, 18(106): 473-477.

[3] Shimizu H, Mitsuhashi N, Ohtsuka M, *et al*. Vascular endothelial growth factor and angiopoietins regulate sinusoidal regeneration and remodeling after partial hepatectomy in rats[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(46): 7254-7260.

[4] Namisaki T, Yoshiji H, Kojima H, *et al*. Salvage effect of the vascular endothelial growth factor on chemically induced acute severe liver injury in rats[J]. J Hepatol, 2006, 44(3): 568-575.

[5] Ijichi H, Taketomi A, Yoshizumi T, *et al*. Hyperbaric oxygen induces vascular endothelial growth factor and reduces liver injury in regenerating rat liver after partial hepatectomy[J]. J Hepatol, 2006, 45(1): 28-34.

[6] Donahower B, McCullough S S, Kurten R, *et al*. Vascular endothelial growth factor and hepatocyte regeneration in acetaminophen toxicity[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 291(1): G102-G109.

[7] Suzuki A, Iwama A, Miyashita H, *et al*. Role for growth factors and extracellular matrix in controlling differentiation of prospectively isolated hepatic stem cells[J]. Development, 2003, 130(11): 2513-2524.

[8] Sakamoto T, Liu Z, Murase N, *et al*. Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy[J]. Hepatology, 1999, 29(2): 403-411.

[9] Kovalovich K, DeAngelis R A, Li W, *et al*. Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice[J]. Hepatology, 2000, 31(1): 149-159.

[10] 袁晟光，王继见，董家鸿. 冷保存对大鼠部分移植肝再生的影响[J]. 中华消化外科杂志, 2007, 6(5): 363-365.

[11] Cressman D E, Greenbaum L E, DeAngelis R A, *et al*. Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice[J]. Science, 1996, 274(5291): 1379-1383.

[12] Ping C, Xiaoling D, Jin Z, *et al*. Hepatic sinusoidal endothelial cells promote hepatocyte proliferation early after partial hepatectomy in rats[J]. Arch Med Res, 2006, 37(5): 576-583.

（编辑　龙　亮）