DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.006
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1143-03

论著

Kupffer细胞NF-κB激活对胆道梗阻合并肝部分切除鼠肝细胞再生的影响

徐明清[1],龚建平[1],薛 兰[2],韩本立[1],徐 凤[2] ([1]第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038;[2]解放军208医院,长春 130062)

提 要:目的 探讨Kupffer细胞(KCs)NF-κB激活在鼠非肝硬变性胆道梗阻肝部分切除后肝细胞再生过程中的作用。方法 Wistar大鼠随机分为正常大鼠70%肝部分切除组(N-PH)、胆总管梗阻1周70%肝部分切除组(BDO-PH)、BDO-PH IL-10或生理盐水治疗组。EMSA法检测KCs NF-κB激活、RT-PCR法检测肝内HGF、IL-6、TGF-β_1及IL-1β mRNA表达,ELISA法检测肝内TNF-α水平,免疫组化法检测肝细胞BrdU标记。结果 BDO-PH后0~72 h肝内IL-6 mRNA、TGF-β_1 mRNA、IL-1β mRNA及TNF-α表达增高而HGF mRNA表达减少,肝细胞BrdU标记减少。而IL-10能下调BDO-PH后KCs NF-κB活性、上调肝内HGF mRNA与下调肝内IL-6 mRNA、TGF-β_1 mRNA、IL-1β mRNA及TNF-α表达,从而促进肝细胞BrdU标记。结论 KCs NF-κB过度激活可能抑制非肝硬变性胆道梗阻肝部分切除后肝细胞再生,适当调节KCs NF-κB活性可能促进肝细胞再生。

关键词:肝再生;胆道梗阻;Kupffer细胞;NF-κB
中图法分类号:R329.2;R657.3;R657.43 文献标识码:A

Effects of Kupffer cell NF-κB activation on liver regeneration after partial hepatectomy in biliary obstructive rats

XU Ming-qing, GONG Jian-ping, XUE Lan, HAN Ben-li, XU Feng (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwestern Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of Kupffer cells(KCs) NF-κB activation on liver regeneration after 70% partial hepatectomy(PH) in rats with noncirrhotic bile duct obstruction(BDO). **Methods** Wistar rats were randomly divided into normal rats 70%PH group (N-PH), BDO-PH group in which 70%PH were performed after common bile duct obstruction for 1 week, BDO-PH IL-10 treatment group and sham control group in which recombinant murine IL-10 (10 mg/kg) or normal saline were injected via the dorsum vein of penis per 24 h after BDO. NF-κB activation of KCs were determined with electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Expression levels of hepatic HGF(Hepatocyte growth factor) mRNA, IL-6 mRNA, IL-1β mRNA, TGF-β_1 mRNA and TNF-α were measured with RT-PCR and ELISA. BrdU labelling of hepatocytes were determined with immunohistochemical analysis. **Results** NF-κB activities of KCs, expression levels of hepatic IL-6 mRNA, IL-1β mRNA, TGF-β_1 mRNA and TNF-α were significantly higher and the expression levels of hepatic HGF mRNA were significantly lower in BDO-PH group than in N-PH group rats from 0~72 h after 70%PH. BrdU labelling of hepatocytes reached the peak at 24 h after 70%PH in N-PH group, and at 48 h in BDO-PH group, and the peak levels of BrdU labelling of hepatocytes in BDO-PH group were decreased significantly compared with those of N-PH group; NF-κB activities of KCs, expression levels of hepatic IL-6 mRNA, IL-1β mRNA, TGF-β_1 mRNA and TNF-α were significantly lower and the expression levels of hepatic HGF mRNA were significantly higher in BDO-PH IL-10 treatment group rats than in BDO-PH group rats from 0~72 h afte 70%PH. BrdU labelling of hepatocytes reached the peak at 48 h after 70%PH in BDO-PH IL-10 treatment group, and the peak levels of BrdU labelling of hepatocytes in BDO-PH IL-10 treatment group were increased significantly compared with those of BDO-PH group. **Conclusion** The excessive NF-κB activation of KCs after BDO-PH inhibited regeneration of hepatocytes, and adjustment of KCs NF-κB activities to a appropriate level could promote liver regeneration after BDO-PH.

Key words: liver regeneration; bile duct obstruction; Kupffer cell; NF-κB

Kupffer细胞(KCs)激活对启动肝部分切除术后肝细胞再生具有重要的调控作用,而核转录因子NF-κB激活又是KCs激活的关键信号传导,因此,KCs NF-κB激活是调控肝部分切除术后肝细胞再生的重要信号传导。临床上常对肝内胆管多发结石病人行肝叶切除以彻底消除病灶,而胆道结石常并发或轻或重的胆道梗阻,可导致KCs损伤,此时KCs NF-κB激活对肝再生有何影响,目前并无研究报道。我们就胆道梗阻肝脏部分切除术后肝细胞再生的变化以及KCs NF-κB异常激活在其中的作用作了探讨,试图为临床肝部分切除术后肝细胞再生的调节提供理论依据与对策。

1 材料和方法

1.1 动物模型制作

健康雄性Wistar大鼠,随机分为正常70%肝部分切除(N-PH)组,胆道梗阻(BDO) 70%肝部分切除(BDO-PH)组和BDO-PH加IL-10(BDO-PH+IL-10)或生理盐水治疗组。胆总管双重结扎并切断制成BDO模型。BDO 1周后胆总管与十二指肠间架设一直径约2 mm的胶管制作胆流再通模型,70%肝叶切除采用Higgins创建的方法,即切除大鼠左肝叶和中肝叶。IL-10治疗组于BDO后每24 h尾静脉注入重组鼠IL-10(10 mg/kg),生理盐水治疗组则注入无菌生理盐水。观察时相为术后0、1、6、24、48、72 h,保证每时相点存活大鼠6只。取材前1 h尾静脉内注射溴脱氧核苷尿嘧啶(Bromodeoxyuridine, BrdU) 5 mg/kg,以使BrdU掺合入肝细胞DNA合成。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970719)
作者简介:徐明清(1968-),男,四川省乐山市人,博士,主治医师,主要从事肝再生研究,现在重庆医科大学附一院普通外科工作。电话:13022303642
收稿日期:2000-12-27;修回日期:2001-02-10

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 KCs 分离与培养

采用 Ikejima 等[1]介绍的方法分离与培养 KCs，调整 KCs 浓度为 1×10^6/ml，无菌吸取 KCs 培养液并收集 KCs 待测。

1.3 EMSA 检测 KCs NF-κB 激活

按 Chang 等[2]介绍的方法提取 KCs 核蛋白，参照 Jefferson 等[3]介绍的方法进行 EMSA 测定。NF-κB 寡核苷酸探针购于 Santa Cruz 生物公司。结果判定：测定每条电泳滞后带的相对光密度 ROD×面积，所得结果表示 NF-κB 与探针结合的相对量。

1.4 RT-PCR 法检测肝内 HGF、IL-6、IL-1β 及 TGF-β_1 mRNA 表达

肝组织总 RNA 提取，二步法 RT-PCR 扩增。引物序列参照文献[4,5]设计，扩增产物大小为 HGF 530 bp、IL-6 298 bp、IL-1β 378 bp、TGF-β_1 383 bp、β_2-microglobulin 231 bp，其中 β_2-microglobulin 为参照基因。所有引物退火温度均为 60 ℃，扩增 30 个循环，扩增产物在 2% 琼脂糖上电泳。以目的基因 mRNA 扫描密度值/参照基因 mRNA 扫描密度值的百分数(%)作为目的基因 mRNA 的相对表达量。

1.5 ELISA 法检测肝组织内 TNF-α 表达

参照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.6 肝细胞 BrdU 标记检测

参照武汉博士得生物工程有限公司提供的试剂盒说明书(SABC 法)进行操作。结果判定：随机观察 5 个高倍镜下(×400)视野，每视野约有肝细胞 1 000 个，计算肝细胞 BrdU 标记指数：肝细胞 BrdU 标记指数＝阳性核黄染细胞数/1 000 × 100%。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表达，采用 t 检验。

2 结果

2.1 70%PH 后 KCs NF-κB 激活

N-PH 后 0 h KCs NF-κB 相对活性为 0.04±0.02，术后 1～24 h KCs NF-κB 呈激活状态，但以术后 1 h 为高峰，其相对活性为 2.86±0.84。BDO-PH 后 0～72 h KCs NF-κB 均呈激活状态，仍以术后 1 h 为激活高峰，术后 0、1 h 的相对活性分别为 3.61±1.36 及 7.63±2.35，明显高于 N-PH 组($t=6.432$，$P<0.001$；$t=4.681$，$P<0.001$)，IL-10 治疗组 KCs NF-κB 激活受抑制，其活性高峰仍为术后 1 h，术后 0 h 与 1 h 的相对活性分别为 0.96±0.33 与 3.86±1.36，均明显低于 BDO-PH 组($t=4.641$，$P<0.001$；$t=3.403$，$P<0.01$)，且术后 1 h 相对活性与 N-PH 组差异不显著($t=1.531$，$P>0.05$)，见图 1。生理盐水则不具有抑制 KCs NF-κB 活性的作用。

2.2 70%PH 后肝内 HGF mRNA、IL-6 mRNA、IL-1β mRNA、TGF-β_1 mRNA 及 TNF-α 表达

BDO-PH 后肝内 HGF mRNA 表达少于 N-PH 组，而 IL-6 mRNA、IL-1β mRNA、TGF-β_1 mRNA 及 TNF-α 则高于 N-PH 组，见表 1。IL-10 能上调 BDO-PH 后肝内 HGF mNRA 表达并下调 IL-6 mRNA、IL-1β mRNA、TGF-β_1 mRNA 及 TNF-α 的表达，见图 2A～D。

2.3 70%PH 后肝细胞 BrdU 标记

N-PH 后 24 h 肝细胞 BrdU 标记达到高峰，标记指数(%)为 68.64±11.26，而 BDO-PH 后肝细胞标记高峰延后至 48 h，高峰标记指数(%)为 36.22±8.37，低于 N-PH 组($t=5.660$，$P<0.001$)。IL-10 治疗组肝细胞 BrdU 高峰标记仍为术后 48 h，但其标记指数(%)为 59.39±10.82，高于 BDO-PH 组($t=4.149$，$P<0.01$)而与 N-PH 组高峰标记值差异无显著性($t=1.451$，$P>0.05$)，说明 IL-10 通过抑制 KCs NF-κB 过度激活而促进 BDO-PH 后肝细胞再生。

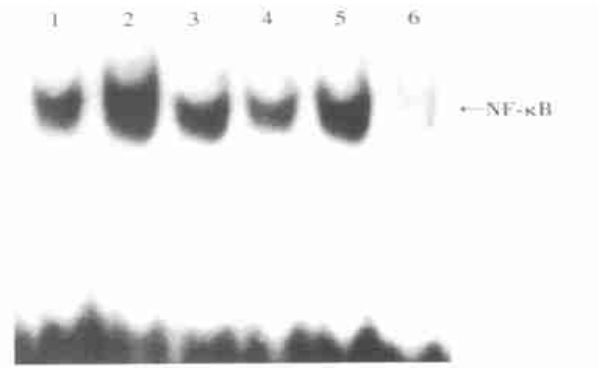


图 1 70%PH 后 Kupffer 细胞 NF-κB 活性变化(EMSA)

Fig 1 EMSA for the NF-κB activation of KCs after 70%PH

Lane 1, 2, 3: BDO-PH＋IL-10, BDO-PH, N-PH 1 h after 70% PH; Lane 4, 5, 6: BDD-PH＋IL-10, BDD-PH, N-PH 0 h after 70% PH

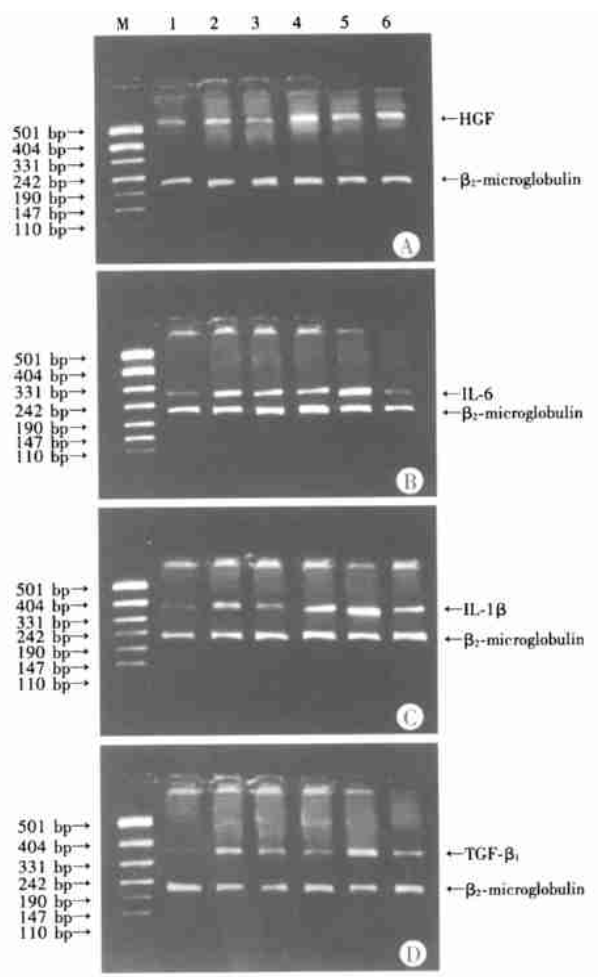


图 2 70%PH 后肝内 HGF mRNA、IL-6 mRNA、IL-1β mRNA、TGF-β_1 mRNA 表达(RT-PCR)

Fig 2 Expression of HGF mRNA, IL-6 mRNA, IL-1β mRNA, TGF-β_1 mRNA in liver after 70%PH

A: HGF mRNA; B: IL-6 mRNA; C: IL-β mRNA; D: TGF-β_1 mRNA; M: Marker; Lane 1, 2, 3: N-PH, BDO-PH, BDO-PH＋IL-10 0 h after 70% PH; Lane 4, 5, 6: N-PH, BDO-PH, BDO-PH＋IL-10 6 h (A, B), 24 h(C), 72 h(D) after 70%PH

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　ELISA 法检测 70%PH 后肝组织内 TNF-α 含量(ng/g, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Levels of TNF-α in the remnant liver after 70%PH by ELISA(ng/g, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	0 h	1 h	6 h	24 h	48 h	72 h
N-PH	6	0.46±0.12	0.30±0.14	1.63±0.24	0.33±0.14	0.42±0.14	0.47±0.13
BDO-PH	6	2.95±0.70 *	3.14±0.55 *	4.47±0.95 *	1.79±0.38 *	1.08±0.24 *	0.67±0.21
BDO-PH+IL-10	6	1.21±0.45 △△	1.73±0.49 △△	2.12±0.23 △△	0.79±0.36 △△	0.68±0.27 △	0.50±0.18

*: $P<0.01$ *vs* N-PH; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* BDO-PH

3　讨论

肝部分切除术后 KCs 受门静脉血中含量相对增高的内毒素脂多糖刺激活化并分泌肝再生因子如 TNF-α、IL-6、IL-1β、HGF 及 TGF-β 等, 继而调控肝细胞再生, 而核转录因子 NF-κB 激活又是 KCs 激活的关键信号传导[6,7], 因此, KCs NF-κB 激活是调控肝部分切除术后肝细胞再生的重要信号传导。

临床上常对肝内胆管多发结石病人行肝叶切除以彻底消除病灶, 而胆道结石又常并发或轻或重的胆道梗阻, 并可导致 KCs 损伤, 且研究发现受损的 KCs 激活后起抑制肝再生的作用, 因此可推测, 胆道梗阻肝脏部分切除术后 KCs 激活对肝细胞再生可能起抑制作用, 但 KCs NF-κB 激活异常是否是肝再生受抑制的关键信号传导, 目前并无研究报道。我们就胆道梗阻肝脏部分切除术后 KCs NF-κB 异常激活对肝细胞再生的影响作了探讨, 试图为临床病肝部分切除术后肝细胞再生的调节提供理论依据与对策。

我们在实验中发现胆道梗阻 1 周大鼠(胆道梗阻 1 周时 KCs 激活明显、肝功能损害明显但肝细胞无片状坏死, 且无肝硬变形成)70%PH 后 KCs NF-κB 呈现长时间与高水平激活, 肝内 HGF mRNA 表达明显减少, 而 IL-6 mRNA、IL-1β mRNA、TGF-β_1 mRNA 及 TNF-α 表达则显著增高, 由于 TNF-α、IL-6、IL-1 等促炎症因子表达增高可导致肝细胞损害, 加之 HGF mRNA 表达减少而 TGF-β_1 mRNA 表达增高, 结果导致肝细胞再生能力减弱与再生高峰延后。而 IL-10 能下调 BDO-PH 大鼠 KCs NF-κB 活性、上调肝内 HGF mRNA 表达、下调肝内 IL-1β mRNA 及 TGF-β1 mRNA 表达降低, 值得特别强调的是肝内 IL-6 mRNA 的表达亦被下调到近似正常肝 70%PH 后的水平, 即启动肝细胞再生的水平, 因此, IL-10 治疗组大鼠 70%PH 后肝细胞 BrdU 标记指数增高、DNA 合成能力增强。此结果提示 IL-10 通过抑制 KCs NF-κB 过度激活, 上调肝内 HGF 及下调肝内 IL-6、IL-1β、TGF-β1 与 TNF-α 的表达以减少对肝细胞的损害, 从而促进肝细胞再生。

NF-κB 激活既是 KCs 激活的重要标志, 亦是肝细胞增殖的重要信号传导, TNF-α 与 IL-6 就是通过激活肝细胞 NF-κB 而启动肝再生的。肝细胞 NF-κB 激活能防止 TNF-α 源性肝细胞损害, 而 70%PH 后肝细胞 NF-κB 激活受抑制时, 肝细胞再生能力明显减弱[8]。因此, 在下调胆道梗阻肝脏部分切除术后 KCs NF-κB 活性时不能明显影响到肝细胞 NF-κB 活性。IL-10 是强有力的抗炎因子, 它能抑制 Th1 T 细胞、单核/巨噬细胞及中性粒细胞源性促炎症因子的合成, 还能抑制巨噬细胞 NO 和活性氧中间产物的产生, 从细胞信号传导途经方面它能抑制此类细胞核转录因子 NF-κB 的激活[9]。我们在实验中发现 IL-10 在下调 KCs NF-κB 活性的同时却能促进肝细胞再生, 这就提示肝细胞 NF-κB 激活未受到明显抑制, 或是在此动物模型下 IL-10 对肝细胞 NF-κB 活性的影响(下调)远弱于对 KCs NF-κB 激活的影响。

综上所述, KCs 可能对非肝硬变性胆道梗阻肝脏部分切除术后的肝细胞再生起抑制作用, 而 KCs NF-κB 长时间高水平异常激活可能是其重要信号传导。

参考文献:

[1] Ikejima K, Enomoto N, Seabra V, *et al*. Pronase destroys the LPS-ride receptor CD14 on Kupffer cells[J]. Am J Physiol, 1999, 276(39): G591—G598.

[2] Chang C K, Lianes S, Schumer W. Inhibitory effect of dimethyl sulfoxide on nuclear factor-kB activation and intercellular adhesion molecular 1 gene expression in septic rats[J]. J Surg Res, 1999, 82(2): 294—299.

[3] Jefferson K K, Sminth M F, Bobak D A. Role of intracellular calcium and NF-κB in the clostridium difficile toxin A-induced up-regulation and secretion of IL-8 from human monocytes[J]. J Immunol, 1999, 163(9): 5 183—5 191.

[4] Qian S W, Kondaiah P, Roberts A B, *et al*. cDNA cloning by PCR of rat transforming factor beta[J]. Nucleic Acid Res, 1990, 18(10): 3 059—3 062.

[5] Masson S, Scotte M, Francois A, *et al*. Changes in growth factor and cytokine mRNA levels after hepatectomy in rat with CCl_4-induced cirrhosis [J]. Am J Physiol, 1999, 277(40): G838—G846.

[6] Nanji A A, Jokelainen K, Rahemtulla A, *et al*. Activation of nuclear factor kappa B and cytokine imbalance in experimental alcoholic liver disease in the rat[J]. Hepatology, 1999, 30(4): 934—943.

[7] Sakaguchi T, Nakamura S, Suzuki S, *et al*. Participation of platelet activating factor in the LPS- induced liver injury in partially hepatectomized rats[J]. Hepatology, 1999, 30(4): 959—967.

[8] Plumpe J, Malek N P, Bock C T, *et al*. NF-κB determines between apoptosis and proliferation in hepatocytes during liver regeneration[J]. Am J Physiol, 2000, 278(1): G173—G183.

[9] Yoshidome H, Kato A, Edwards M J, *et al*. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/ reperfusion injury in mice: Implication of a central role for nuclear factor κB[J]. Hepatology 1999, 30(1): 203—208.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net