DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.013

论著

文章编号:1000-5404(2001)08-0904-03

大鼠肝脏缺血再灌注合并肝部分切除诱导肝再生模型中EGFR及CyclinD$_1$的表达

戢 强,董家鸿,陈 平 (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)

提 要:目的 观察大鼠肝脏缺血再灌注合并肝再生诱导模型中EGFR及CyclinD$_1$的表达情况。**方法** 采用预先保留门静脉转流肝叶(约占全肝70%),阻断部分肝叶(约占全肝30%)血供,到预定观察终点后重新开放血供灌注缺血肝叶,同时切除门静脉转流肝叶(70%肝切除)模型,通过RT-PCR和免疫组化法分析EGFR及CyclinD$_1$在大鼠肝脏缺血再灌注对肝细胞再生功能影响过程中的变化。**结果** 大鼠术后12、24 h CyclinD$_1$ mRNA及此后相应的蛋白表达水平随着缺血时间的延长而显著降低。术后12 h内EGFR蛋白表达水平随着缺血时间的延长而显著降低、**结论** 术后EGFR以及CyclinD$_1$表达降低可能是肝脏缺血再灌注影响大鼠肝再生的原因之一。

关键词:大鼠;肝脏;缺血再灌注;肝再生;EGFR;CyclinD$_1$

中图法分类号:R333.4;R619.9;R657.3 **文献标识码**:A

Expressions of EGFR and CyclinD$_1$ in rat model of liver ischemia/reperfusion and liver regeneration after partial hepatectomy

JI Qiang, DONG Jia-hong, CHEN Ping (Institute of Hepatobiliary Surgery of PLA, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the expression of EGFR and CyclinD$_1$ in the model of liver ischemia/reperfusion with induction of liver regeneration by partial hepatectomy in rats. **Methods** Healthy male Wistar rats were subjected to segmental liver ischemia for 30, 60, 90 min respectively, ischemia liver lobes were then reperfused and non-ischemia liver lobes were resected (70% partial hepatectomy). Partial hepatectomy without prior liver ischemia was performed in the control group. By detecting expression of CyclinD$_1$ and EGFR during corresponding days after operation, we can evaluate the effect on liver regeneration after ischemia and reperfusion-injury in rat. **Results** With increasing in the duration of ischemia and reperfusion the liver expression of CyclinD$_1$ and EGFR became lower. Significant differences were observed between groups of N-PH and 60' PH, N-PH and 90' PH. **Conclusion** The low expression of EGFR and CyclinD$_1$ may be one of the reasons that hepatic ischemia reperfusion affects the hepatic regeneration of rats.

Key words: rat; liver; ischemia/reperfusion; liver regeneration; EGFR; CyclinD$_1$

以往有关缺血再灌注肝损伤及其保护的研究已做了大量的工作,近来有研究表明肝再生能力的高低也是缺血再灌注肝损伤后肝功能恢复的关键环节。为进一步了解缺血再灌注肝损伤程度与术后肝细胞再生功能的关系,本研究欲通过预先保留门静脉转流肝叶(约占全肝70%),阻断部分肝叶(约占全肝30%)血供,到预定观察终点后重新开放血供灌注缺血肝叶,同时切除门静脉转流肝叶(70%肝切除)这一动物模型来分析血清EGFR及CyclinD$_1$在大鼠肝脏缺血再灌注对肝细胞再生功能影响过程中的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性2月龄Wistar大鼠(第三军医大学实验动物中心提供)40只,体重(200±20)g,随机分为5组:①SO:不阻断肝门,不切除肝叶,关腹。该组可作为阴性对照组。②N-PH:行左、中叶切除,关腹。该组可作为阳性对照组。③30' PH:阻断右、尾叶血供30 min后复流,行左、中叶切除,关腹。④60' PH:阻断右、尾叶血供60 min后复流,行左、中叶切除,关腹。⑤90' PH:阻断右、尾叶血供90 min后复流,行左、中叶切除,关腹。

所有实验动物术前禁食24 h,不禁饮。术后腹腔注射5% GS 5 ml,自由进食水。

1.2 EGFR及CyclinD$_1$免疫组化染色试剂

由武汉博士德生物工程有限公司提供,采用ABC法,染色过程严格按试剂盒说明书。

1.3 β-actin和CyclinD$_1$扩增引物

由本校分子生物教研室提供。

1.3.1 β-actin 产物片段长度为281 bp。

22 PU 5'-ACC ACA GCT GAG AGG GAA ATC G-3'

23 PD 5'-AGA GGT CCT TAC GGA TGT CAA CG-3'

1.3.2 CyclinD$_1$ 产物片段长度为428 bp。

21 PU 5'-ATG CCA ACC TCC TCA ACG ACC-3'

21 PD 5'-TGG CAC AAG AGG CAA CGA AGG-3'

1.4 检测指标

1.4.1 观察肝脏大体变化及病理改变(包括缺血再灌注损伤及肝细胞增生状况描述)。

1.4.2 图像分析 将免疫组化染色后未作任何复染的肝组织切片于Olympus显微镜200倍下放大,输入Tiger 920型图像分析系统中,每只大鼠采用3张切片,每张切片随机选择5帧

作者简介:戢 强(1972-),男,四川省简阳市人,硕士,医师,主要从事缺血再灌注肝损伤及肝再生等方面的研究。电话:(023)65427100

收稿日期:2001-02-20;修回日期:2001-05-30

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

图像，经该系统中软件分析统计，最终阳性结果以积分光密度的大小来表示。

1.4.3　RT-PCR 检测 CyclinD$_1$ mRNA　　总 RNA 的提取严格按 Tripure 分离剂操作说明书。RT-PCR 法如下：

①反应体系：

模板 3.75～12.5μg/μl	1.0 μl
引物	1.5 μl
PCR buffer	2.0 μl
DNTP	各 0.5 μl
Rnasin	0.5 μl
AMV	2.0 μl
Taq	0.25 μl
加水至反应体系总量为 25 μl	

混匀后加 20 μl 石蜡油。

②PCR 扩增程序：

48 ℃ 45 min
↓
94 ℃ 2 min
↓
94 ℃ 30 s
55 ℃ 40 s
68 ℃ 60 s
} 35cycle
↓
68 ℃ 7 min

1.5　统计学处理

资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用方差分析、t 检验。

2　结果

2.1　肝脏病理改变

2.1.1　大体形态学观察　　各组缺血后肝叶由红褐色变为暗灰色，而未阻断肝叶则高度充血，颜色变为鲜红，肝包膜紧张，肠道无淤血；30'PH 组复流后 2～4 min 内肝脏颜色变为均匀的绛红色；60'PH、90'PH 组复流后 30 min 内花斑状改变仍很难消失。

2.1.2　光镜观察　　(1)缺血后：各组大鼠缺血后可见局灶性或弥漫性肝窦狭窄，广泛的肝细胞浊肿。(2)再灌注后：①30'PH 组病理改变较轻，无明显的肝细胞变性坏死，轻度的中性粒细胞聚集。②60'PH、90'PH 组再灌注后 12 h 内一方面缺血造成的肝细胞浊肿一定程度上得到减轻；一方面部分肝窦狭窄、部分肝窦高度扩张且伴有大量的红细胞淤滞，肝窦内亦可见细胞残片(怀疑是脱落的肝窦内皮细胞)，肝细胞点状溶解坏死，汇管区出现炎性细胞聚集但不十分显著。再灌注 12～24 h 期间病理改变急剧发展，大片肝细胞坏死后溶解，汇管区逐渐出现大量的淋巴及中性粒细胞聚集，部分肝小叶结构消失。③60'PH、90'PH 组再灌注后 7～10 d 则表现为仍有大量的中性粒细胞、淋巴细胞聚集的坏死组织被增生的纤维组织紧密包裹，包裹以外的肝组织有轻度的纤维组织增生。

2.1.3　肝组织超微结构变化特点　　(1)N-PH、30'PH 组术后 24 h 可见肝细胞体积较大，核仁增大，并有多个核仁，常染色质增多，异染色质减少，粗面内质网增多，细胞器丰富，胞浆糖原颗粒增多，可见核分裂像，整个细胞处于旺盛的增生状态。术后 48 h 更为明显。(2)60'PH、90'PH 组术后 24 h 可见肝细胞表面微绒毛减少，血窦及内皮细胞胞浆肿胀。线粒体肿胀变圆，嵴变短，甚至消失。细胞核较大。大片的胞浆溶解，基质肿胀。

2.2　EGFR 蛋白表达

术后 24 h 内各组大鼠肝脏 EGFR 蛋白表达呈现逐步增高的趋势，在同时相内进行比较，术后 6 h 各组与 N-PH 组比较肝脏 EGFR 蛋白表达明显偏低($P < 0.05$)，而术后 6～24 h 30'PH 组 EGFR 蛋白表达接近 N-PH 组，60'PH、90'PH 组与 N-PH 组相比差异仍然非常显著($P < 0.05$)，见表 1。

2.3　CyclinD$_1$ 蛋白表达

术后 24 h 内各组大鼠肝脏 CyclinD$_1$ 蛋白表达呈现逐步增高的趋势，在同时相内进行比较，术后 12～24 h N-PH 与 30'PH 组间肝脏 CyclinD$_1$ 蛋白表达无明显差异，而与 60'PH、90'PH 组相比相差则非常显著；另外各组术后 12～24 h 肝脏 CyclinD$_1$ 蛋白表达增幅最大，见表 2。

表 1　术后大鼠肝脏 EGFR 蛋白表达($\times 10^{-2}$)

Tab 1　Expression of EGFR in rat liver after operation($\times 10^{-2}$)

Group	n	Time after operation(h)			
		0	6	12	24
SO	10	0.32 ± 0.02#			
N-PH	10	0.25 ± 0.03#	2.59 ± 0.04*	2.99 ± 0.10*	3.21 ± 0.15*
30'PH	10	0.29 ± 0.04#	2.03 ± 0.04*	2.91 ± 0.07*	3.09 ± 0.12*
60'PH	10	0.33 ± 0.02#	1.09 ± 0.03*#	1.67 ± 0.09*#	2.25 ± 0.16*#
90'PH	9	0.30 ± 0.03#	1.00 ± 0.02*#	1.28 ± 0.11*#	2.09 ± 0.13*#

*：$P < 0.05$ *vs* SO group；#：$P < 0.05$ *vs* N-PH group

表 2　术后大鼠肝脏 CyclinD$_1$ 蛋白表达($\times 10^{-2}$)

Tab 2　Expression of CyclinD$_1$ in rat liver after operation($\times 10^{-2}$)

Group	n	Time after operation(h)			
		0	6	12	24
N-PH	10	0.23 ± 0.04#	0.45 ± 0.04*	2.17 ± 0.10*	2.66 ± 0.15*
30'PH	10	0.23 ± 0.05#	0.47 ± 0.04*	2.10 ± 0.07*	2.67 ± 0.12*
60'PH	10	0.21 ± 0.03#	0.35 ± 0.03*#	1.34 ± 0.09*#	2.03 ± 0.16*#
90'PH	9	0.18 ± 0.02#	0.29 ± 0.02*#	1.17 ± 0.11*#	1.86 ± 0.13*#

*：$P < 0.05$ *vs* SO group；#：$P < 0.05$ *vs* N-PH group

2.4　RT-PCR 检测 CyclinD$_1$ mRNA 表达见图 1

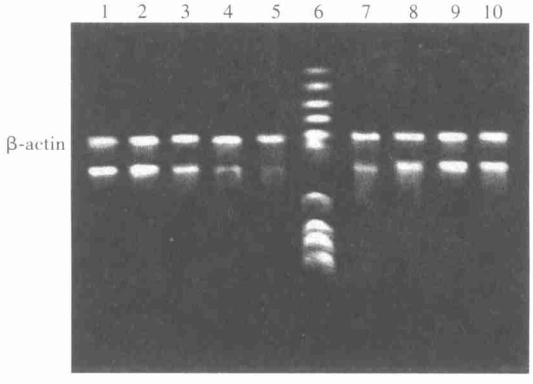


图 1　RT-PCR 法检测 CyclinD$_1$ mRNA 表达

Fig 1　Detection the expression of CyclinD$_1$ mRNA with RT-PCR

1：N-PH-12 h；2：30'PH-12 h；3：60'PH-12 h；4：90'PH-12 h；5：SO；6：Marker；7：90'PH-24 h；8：60'PH-24 h；9：30'PH-24 h；10：N-PH-24 h

以 β-actin 引物的扩增产物为内参照可以看出，大鼠术后 12 h SO 组 CyclinD$_1$ mRNA 表达极弱，N-PH 与 30'PH 组表达最强，60'PH、90'PH 组则表达依次递减；各组大鼠术后 24 h N-PH 与 30'PH 组仍呈强阳性表达与术后 12 h 无明显差异，60'PH、90'PH 组表达较术后 12 h 有所提高但仍不及 N-PH 与 30'PH 组表达。

3　讨论

临床和动物实验研究中通常采用 Pringles 法阻断肝十二指肠韧带内肝动脉和门静脉的向肝血流以达到控制大出血的目的，此法也造成门脉系统的血流淤滞。长时间的门静脉血流淤滞的后果有三：首先回心血量

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

下降，心输出量减少，全身血液动力血改变及生理机能紊乱；其次严重的失代偿性酸中毒[1]；再次肠粘膜屏障功能障碍，内毒素血症[2]。上述因素在肝脏复流后可加重肝脏再灌注损害。本研究所利用的动物模型具有以下特点：①无门静脉淤血。预先保留70%肝叶转流门静脉血能有效地防止小肠及肠系膜血液淤滞，从而排除全肝入肝血流阻断引起的肠粘膜损伤、通透性增高、肠道内毒素和细菌移位。②由于大鼠特殊的肝叶分叶结构，所以30%肝叶缺血较易进行，70%肝叶切除后断面小、无出血、胆漏，炎症反应较轻。③大鼠肝脏左、中叶切除后能显迅速地启动肝再生[3]。

TGFα与EGF作为参与肝再生的两大重要生长因子具有较大的同源性，且共用同一种受体EGFR，具有互补作用，当肝再生启动后，一方面大量的生长因子参与进来，另一方面肝细胞表面迅速表达EGFR[4]。作为配体的生长因子EGF、TGFα在肝细胞再生周期内与受体EGFR结合后，可诱导受体膜外区的构象改变，使其二聚化，形成活性的受体二聚体，并且使受体胞内区的PTK激活。激活的PTK先使受体自身的酪氨酸残基(Tyr)发生磷酸化，这些磷酸化的残基分别识别带有Src-homology的多肽复合物，受体与靶蛋白结合后，其PTK可催化靶蛋白分子中的Tyr磷酸化，由此调节靶蛋白的活性。这些靶蛋白中含有的pTyr序列又可被其它SH2或SH3蛋白所识别，通过这种识别和结合的方式可同时启动几条信号传导通路，并经过磷酸化的瀑布反应，将信号逐级放大，最终导致细胞的增殖与分化[5~7]。可见EGFR的表达水平能间接反映肝再生的能力。

另外，肝细胞进入G_1后期，导致Cyclin D_1/cdk4或cdk6将Rb磷酸化，形成超磷酸化形式的Rb，从而释放出E2F发挥转录活性，产生编码功能蛋白基因，其功能蛋白对细胞进入S期起关键作用，导致DNA合成[8~10]。因此Cyclin D_1表达水平也是反映肝再生的重要指标。

总之，大鼠术后24 h内CyclinD$_1$ mRNA及蛋白表达水平随着缺血时间的延长而显著降低。大鼠术后24 h内EGFR蛋白表达水平随着缺血时间的延长而显著降低。这种术后EGFR以及CyclinD$_1$表达降低可能是肝脏缺血再灌注影响大鼠肝再生的原因之一；而肝细胞膜上EGFR表达降低可能直接影响CyclinD$_1$的表达。

参考文献：

[1] 王 卫，徐 正，王万铁.门静脉阻断及开放对家兔酸碱平衡的影响[J].肝胆胰外科杂志，1997，9(3)：137－140.

[2] Ferri M, Gabriel S, Gavelli A, *et al*. Bacterial translocation during portal clamping for liver resection: A clinical study[J]. Arch Surg, 1997, 132(2): 162－165.

[3] Yamada Y, Kirillova I, Fausto N. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: Deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(4): 1 441－1 446.

[4] Simpson K J, Lukacs N W, Colletti L, *et al*. Cytokines and the liver[J]. J Hepatol, 1997, 27(6): 1 120－1 132.

[5] Shong Y Z, Shoelson S E, Chaudhuri M, *et al*. SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences[J]. Cell, 1993, 72(2): 767－778.

[6] Mayer B J, Baltimore D. Signalling through SH2 and SH3 domains[J]. Trends Cell Biol, 1993, 3(1): 8－13.

[7] Fantl W J, Escobedo J A, Martin G A, *et al*. Distinct phosphotyrosines on growth factor receptor bind to specific molecules that mediated different signalling pathway[J]. Cell, 1992, 69(3): 413－423.

[8] Jaumot M, Estanyol J M, Serratosa J, *et al*. Activation of Cdk4 and Cdk2 during rat liver regeneration is associated with intranuclear rearrangements of cyclin-Cdk complexes[J]. Hepatology, 1999, 29(2): 385－395.

[9] Aktas H, Cai H, Cooper G M. Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery *via* regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1 [J]. Mol Cell Biol, 1997, 17(5): 3 850－3 857.

[10] Kitamura T, Watanabe S, Sato N. Liver regeneration, liver cancers and cyclins[J]. J Gastroenterol Hepatol, 1998, 13(Suppl): S96－99.

（编辑 王 红）

（上接903页）

抗原水平，这些个体属稀有Lewis血稀有人群[3]。结果还提示血清CA19-9含量在黄疸病人中升高也很明显($P<0.05$)，有人认为这可能是由于肝胆系统的良性炎症和胆囊纤维化所致。胃癌病人的血清CA19-9水平敏感性高于血清[4]，因胃液取材困难，本实验未进一步研究，但血清CA19-9水平的检测与报道相符[5]。由于肠道肿瘤标本量少，无法说明问题，未对此进行研究。以正常人对照组的上限($\bar{x}+s$)37.4 U/ml为切割值，经统计学处理，胰腺癌和原发性肝癌患者血清CA19-9升高率分别为84.4%和75.0%。结果亦显示，对于胰腺癌患者的鉴别诊断也具有一定的指导意义。

关键词：CA19-9；肿瘤相关抗原；IRMA；胰腺癌

中图法分类号：R730.45 **文献标识码**：B

参考文献：

[1] Sakahara H, Endo K, Nakajima K, *et al*. Serum CA19-9 concentration and computed tomography findings in patients with pancreatic carcinoma [J]. Cancer, 1986, 57(7): 1 324－1 326.

[2] 齐为民.肿瘤相关糖蛋白的研究进展[J].国外医学：临床生物化学与检验学分册，1994，15(2)：56－58.

[3] 赵双罗，刘东刚，李建国，等.糖链抗原CA19-9放免测定对诊断胃肠道潜隐癌的诊断价值[J].中国肿瘤临床杂志，1995，22(5)：312－314.

[4] 罗家齐，于育敏，陈淑清，等.慢性肝病患者血清糖链抗原CA19-9含量变化计临床意义[J].临床肝病杂志，1995，11(2)：85－86.

[5] 吴秀梅，徐龙宝，于静萍，等.CEA CA19-9和CA50联合检测在胃肠道癌诊断中的作用[J].南京医科大学学报，1996.16(2)：19－21.

（编辑 薛国文）

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