DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.12.004
第22卷第12期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 12
2000年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2000

文章编号:1000-5404(2000)12-1129-03

论著

非肝硬化性胆道梗阻对大鼠肝部分切除术后肝细胞再生的影响

徐明清[1],韩本立[1],薛 兰[2],龚建平[1],董家鸿[1],王曙光[1] ([1]第三军医大学附属西南医院肝胆外科中心、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 观察非肝硬化性胆道梗阻(BDO)对大鼠70%肝部分切除(PH)术后肝细胞再生的影响。方法 Wistar大鼠分为正常肝部分切除组(N-PH)、胆道梗阻胆流再通(RBF)肝部分切除组(BDO-RBF-PH)及胆道梗阻胆流再通组(BDO-RBF)。BDO-RBF-PH组大鼠胆总管梗阻1周后行胆流再通及70%PH。免疫组化法检测再生肝细胞增殖细胞核抗原(PCNA)及溴脱氧核苷尿嘧啶(BrdU)标记,Western-Blot法检测肝细胞PCNA蛋白表达,RT-PCR与ELISA法检测肝内TNFα mRNA与TNFα表达。结果 N-PH组肝细胞PCNA表达及BrdU阳性标记指数于70%PH术后24 h达到高峰,而BDO-RBF-PH组肝细胞DNA合成高峰延后至术后48 h,其PCNA高峰表达量及BrdU高峰标记指数均低于N-PH组;BDO-RBF-PH组大鼠70%PH后0~72 h肝内TNFα mRNA及TNFα表达量显著高于N-PH组。结论 非肝硬化性胆道梗阻胆汁淤积大鼠70%PH术后肝细胞再生受抑制,肝内长时间异常高表达的TNFα可能是肝细胞再生受抑制的重要原因。

关键词:胆道梗阻;肝再生;肝部分切除;TNFα
中图法分类号:R575;R657.3 文献标识码:A

Effect of noncirrhotic biliary obstruction on the liver regeneration after partial hepatectomy in rats

XU Ming-qing, HAN Ben-li, XUE Lan, GONG Jian-ping, DONG Jia-hong, WANG Shu-guang (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of noncirrhotic biliary duct obstruction (BDO) on the liver regeneration after 70% partial hepatectomy (PH) in rats. Methods The rats were divided into normal PH group (N-PH), BDO-RBF group in which restoration of bile flow (RBF) was obtained after 1 week's common bile duct obstruction, and BDO-RBF-PH group in which 70% PH was performed after the same procedures as BDO-RBF group. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and labeling of bromodeoxyuridine (BrdU) were determined with immunohistochemical methods in the regenerating hepatocytes. The expressions of PCNA protein, TNFα mRNA and TNFα were measured with Western-Blot, RT-PCR and ELISA respectively. Results The expression of PCNA and labeling of BrdU reached the peak at 24 h after PH in N-PH group, and at 48 h in BDO-RBF-PH group, and the peak levels of PCNA and BrdU of hepatocytes in BDO-RBF-PH rats were decreased significantly compared with those of N-PH group. The expression levels of TNFα mRNA and TNFα were significantly higher in BDO-RBF-PH rats than in N-PH group from 0~72 h after 70% PH. Conclusion The hepatocyte proliferation is inhibited in the rats with BDO and 70% PH, and the increased expression of TNFα may be one of the causes of the inhibited liver regeneration.

Key words: biliary duct obstruction; liver regeneration; partial hepatectomy; TNFα

作者简介:徐明清(1968-),男,四川省乐山市人,博士,主治医师,主要从事肝再生方面的研究。电话:13022303642

收稿日期:2000-04-05;修回日期:2000-06-04

梗阻性黄疸肝脏行肝部分切除(Partial hepatectomy,PH)在临床上已是常见手术,而肝部分切除术后肝衰的防止亦是临床医生所必须考虑的。非肝硬化性胆

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

道梗阻对肝部分切除术后肝细胞再生能力的影响目前并不十分清楚，本实验应用胆总管梗阻肝部分切除模型，检测了胆道梗阻 1 周大鼠 70％PH 术后肝细胞 PCNA表达和 BrdU 标记、以及肝内 TNFα mRNA 和 TNFα 的表达变化，以探讨非肝硬化性胆道梗阻对肝部分切除术后肝细胞再生的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组及模型制作

健康雄性大鼠 90 只，随机分为正常大鼠 70％肝部分切除（N-PH）组，胆道梗阻（Biliary duct obstruction，BDO）胆流再通（Restoration of biliary flow，RBF）70％肝部分切除（BDO-RBF-PH）组和胆道梗阻胆流再通（BDO-RBF）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 的硅胶管制作胆流再通模型[1]。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，70％PH 术后腹腔内注射 5％葡萄糖液 5 ml 以防止低血糖。观察时相为术后 0、6、12、24、48、72 h，每个时相点 5 只动物。取材前 1 h 腹腔内注射溴脱氧核苷尿嘧啶（BrdU）5 mg/kg[2]，以使 BrdU 掺合入肝细胞 DNA 合成。

1.2 免疫组化法检测肝细胞 PCNA 及 BrdU 标记

参照武汉博士得生物工程有限公司提供的试剂盒说明书（S-ABC 法）进行操作。结果判定[3]：随机观察 5 个高倍镜下（×400）视野，每视野约有肝细胞 1 000 个，统计核黄染肝细胞数，计算阳性细胞指数，阳性细胞指数＝阳性核黄染细胞数/1 000×100％。

1.3 Western-Blot 法检测肝细胞 PCNA 蛋白表达

采用 Callery 等[4]的方法分离肝细胞。参照 F. 奥斯伯等[5]介绍的 Western-Blot 法检测肝细胞 PCNA 蛋白表达。即肝细胞总蛋白提取后考马斯亮蓝法浓度测定（根据样品浓度调整上样蛋白量为每孔 100 μg）、蛋白质聚丙烯酰胺电泳、蛋白质转膜、蛋白杂交、DAB 显色。蛋白含量以相对密度 ROD× 面积表示，并以其占 N-PH 组、BDO-RBF-PH 组、BDO-RBF 组所有 PCNA 蛋白含量的百分率（％）为统计资料。

1.4 RT-PCR 法检测肝内 TNFα mRNA 表达

一步法肝组织总 RNA 提取，二步法 RT-PCR 扩增。参照文献[6]设计引物序列，由上海生工合成，扩增产物大小为：TNFα（目的基因）692 bp，β-actin（内参照基因）281 bp。引物退火温度为 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 TNFα 的表达

参照 TNFα ELISA Kit（北京，邦定泰克）说明书进行操作。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 t 检验。

2 结果

2.1 肝细胞 PCNA 表达

免疫组化及 Western-Blot 法检测显示 N-PH 组大鼠 70％PH 后 24 h 为肝细胞 PCNA 高峰表达时间，肝细胞 PCNA 阳性标记指数（％）为 59.62±7.36，PCNA 蛋白表达量（％）为 22.07±1.86。而 BDO-RBF-PH 组肝细胞 PCNA 表达高峰延后至 70％PH 后 48 h，肝细胞 PCNA 阳性标记指数及 PCNA 蛋白表达量（％）分别为 32.97±4.61 及 12.37±1.02，均显著低于 N-PH 组峰值（t＝6.869，P＜0.001；t＝10.221，P＜0.001）。BDO-RBF 及 BDO-RBF-PH 二组肝细胞在术后 0 h 的 PCNA 表达量相似，但前者在胆流再通术后逐渐减少，说明两组肝细胞 PCNA 表达差异是由肝部分切除所致。

2.2 肝细胞 BrdU 免疫组化标记

N-PH 组大鼠 70％PH 后 24 h 肝细胞 BrdU 免疫组化标记达到高峰值，肝细胞 BrdU 阳性标记指数（％）为 63.57±9.56，BDO-RBF-PH 组肝细胞 BrdU 高峰标记时间延后至 70％PH 后 48 h，高峰标记指数（％）为 34.78±6.37，低于 N-PH 组峰值（t＝5.603，P＜0.001）。BDO-RBF 及 BDO-RBF-PH 二组肝细胞在术后 0 h 的 BrdU 标记指数相似，但前者的标记指数在胆肠再通术后逐渐减少，说明两组肝细胞 BrdU 标记差异是由肝部分切除所致。

2.3 肝组织 TNFα mRNA 及 TNFα 的表达

N-PH 组大鼠 70％PH 后 6 h 为肝内 TNFα mRNA 及 TNFα 高峰表达时间，以后降低至基础水平以下，至术后 72 h 才回升到基础水平。而 BDO-RBF-PH 组大鼠 70％PH 后 0～72 h TNFα mRNA 与 TNFα 表达量显著高于 N-PH 组，其中 TNFα mRNA 的表达量为 N-PH 组的 2～3 倍（P＜0.001），72 h 后方有明显下降（肝内 TNFα mRNA 见图 1，TNFα 值见表 1）。BDO-RBF 组肝组织 0 h TNFα mRNA 与 TNFα 表达量与 BDO-RBF-PH 组相似，但术后呈持续下降趋势，说明两组的 TNFα 表达差异是由 70％PH 所致。

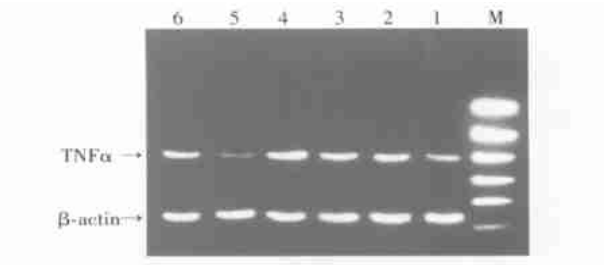


图 1 70％PH 后肝内 TNFα mRNA 表达（RT-PCR）

Fig 1 RT-PCR for expression of TNFα mRNA in liver after 70％PH

M: Marker; Lane 1, 3, 5: Expression of TNFα mRNA in liver 0, 6, 12 h after 70％PH in N-PH group respectively; Lane 2, 4, 6: Expression of TNFα mRNA in liver 0, 6, 12 h after 70％PH in BDO-RBF-PH group respectively

?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 TNFα 含量(ω_B/ ng·g^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Level of TNFα in liver after 70% PH by ELISA (ω_B/ ng·g^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Group	0 h(n=5)	6 h(n=5)	12 h(n=5)	24 h(n=5)	48 h(n=5)	72 h(n=5)
N-PH	0.46±0.10	1.63±0.24	0.30±0.14	0.33±0.14	0.42±0.14	0.47±0.13
BDO-RBF-PH	2.95±0.70 *	4.47±0.95 *	3.14±0.55 *	1.79±0.38 *	1.08±0.24 *	0.67±0.21
BDO-RBF	2.91±0.63	1.73±0.49	1.29±0.43	0.99±0.36	0.68±0.27	0.50±0.16

*: $P<0.001$ *vs* N-PH

3　讨论

临床上常对肝功能受损的非肝硬化性梗阻性黄疸肝脏(如肝门部胆管癌、肝内胆管结石等伴短时间胆道梗阻)行部分切除, 而肝功能损害又可能影响肝部分切除术后肝细胞再生, 从而限制肝切除量而影响手术效果, 这就需要探讨病肝部分切除术后肝细胞再生机制以防治可能发生的肝衰。研究表明正常大鼠 70%PH 后 24～48 h 为肝细胞 DNA 合成高峰期, 各种病因所引发的肝硬化抑制 70%PH 后的肝细胞再生。非肝硬化性胆道梗阻对 70%PH 后肝细胞再生有何影响目前并不十分清楚, 我们通过检测胆道梗阻 1 周大鼠(此时大鼠肝功损害明显但肝细胞无片状坏死, 且无肝硬变形成)70%PH 后肝细胞 PCNA 蛋白表达与 BrdU 标记以及肝内 TNFα 表达变化, 以探讨非肝硬化性胆道梗阻肝脏部分切除术后肝细胞的再生机制。

PCNA 是 DNA 聚合酶 δ的一种辅助性蛋白, 它的表达具有细胞周期依赖性, 在 G_1 后期开始表达, 于 S 期表达最明显[3], 它与其它的细胞增殖指标有很好的相符性。BrdU 是一种胸腺嘧啶脱氧核苷类似物, 在 DNA 合成过程中掺合入 DNA, 是检测肝细胞 DNA 合成的敏感指标[3], 免疫组化法应用抗 BrdU 抗体可检测到 BrdU 的掺入。我们应用免疫组化与 Western-Blot 法检测了梗阻性黄疸 1 周大鼠 70%PH 后肝细胞 PCNA 蛋白表达与 BrdU 标记变化, 发现肝细胞 PCNA 蛋白表达与 BrdU 标记结果相似, N-PH 组大鼠 70%PH 术后 24 h 肝细胞 PCNA 蛋白表达与 BrdU 标记均达到高峰, 即 DNA 合成达到高峰, 而 BDO-RBF-PH 组大鼠 70%PH 术后肝细胞再生延缓, 肝细胞 PCNA 蛋白表达与 BrdU 标记高峰均延后至术后 48 h, 其高峰表达量亦显著低于 N-PH 组大鼠, 说明胆道梗阻 1 周大鼠 70%PH 术后肝细胞再生受抑制。

既往研究表明 TNFα 是肝细胞再生的重要调节因子, 适量表达的 TNFα 在肝部分切除术后的肝再生过程中启动肝再生[7], TNFα 在以下的肝再生启动信号传导途径中是必不可少的[8]: ①TNF-α→肝细胞膜 TNFα Ⅰ型受体→肝细胞 AP-1、NFkB 激活→肝细胞增殖. ②TNFα→Kupffer 细胞→IL-6→肝细胞 AP-1、NFkB 激活→肝细胞增殖。既往研究还发现 TNFα 对肝细胞具有双重作用, 由于表达量的不同, TNFα 既能促进肝细胞再生, 又能通过多种途径导致肝细胞损害, 表现为肝细胞坏死与凋亡, 高剂量的 TNFα 还可引起类似内毒素诱发的多器官损伤症状。由于胆道梗阻常并发胆道感染, 我们因此检测了 70%PH 后肝内 TNFα 的表达变化, 结果发现梗阻性黄疸 1 周大鼠 70%PH 术后 72 h 前肝内 TNFα mRNA 及 TNFα 表达量均数倍于 N-PH 组, 明显高于正常大鼠, TNFα 如此大量而持久的表达, 产生的功效可能有别于 N-PH 组。从梗阻性黄疸大鼠 70%PH 术后肝细胞再生受抑制来看, 持续异常高表达的 TNFα 可能不是启动肝再生而是导致肝细胞损害, 从而延缓肝细胞再生。

参考文献:

[1] 杨翔, 吴天鸣, 石民生, 等. 胆道梗阻再通前后病理转归的研究[J]. 中华实验外科杂志, 1996, 13(1): 43－45.

[2] Boulton R A, Allison M R, Golding M, *et al*. Augmentation of the early phase of liver regeneration after 70% PH in rats following selective Kupffer cell depletion[J]. J Hepatology, 1998, 29(2): 271－280.

[3] Assy N, Minuk G Y. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications[J]. J Hepatol, 1997, 26(4): 945－952.

[4] Callery M P, Kamei T, Flye M W. Kuffer cell tumor necrosis factor-α production is suppressed during liver regeneration[J]. J Surg Res, 1991, 50(2): 515－519.

[5] F. 奥斯伯 著, 颜子颖 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 366.

[6] Ikejima K, Enomoto N, Iimuro Y, *et al*. Estrogen increase sensitivity of hepatic Kupffer cells to endotoxin[J]. Am J Physiol, 1998, 274(4) (Gastrointest. Liver Physiol. 37): G669－G676.

[7] Michalopoulos G K, DeFrances M C. Liver regeneration[J]. Science, 1997, 276(5 309): 60－66.

[8] Taub R, Greenbaum I, Peng Y. Transcriptional regulatory signals define cytokine-dependent and-independent pathways in liver regeneration[J]. Semin Liver Dis, 1999, 19(2): 117－127.

(编辑　汪勤俭)

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