

大鼠部分肝移植后早期肝内细胞因子的变化

王国栋¹, 马毅¹, 陈规划²

(中山大学 1. 附属第一医院移植外科, 广东 广州 510080; 2. 附属第三医院移植外科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】研究不同冷缺血损伤条件下,肿瘤坏死因子- α 和白介素-6等细胞因子在大鼠部分肝移植后的变化规律与肝脏再生的关系。【方法】建立 Lewis 大鼠 50%部分原位肝移植模型。实验组分为:冷缺血 1 h、8 h 和 16 h 组,每组 20 只。观察各组的生存率,并在术后 90 min、1、2、4 和 7 d 收集标本。检测不同冷缺血时间肿瘤坏死因子- α 、白介素-6 等细胞因子的表达。检测溴脱氧尿核苷摄取观察肝细胞 DNA 合成情况。【结果】共行 60 例大鼠部分肝脏移植,肝移植手术的成功率是 100%。冷缺血 1 h、8 h 组的部分肝移植植物存活率均为 100%(>7 d)。冷缺血 16 h 后部分肝移植组存活率为 20%(>7 d)。与冷缺血 1 h 相比,8 h 和 16 h 的冷缺血损伤诱导大鼠部分肝移植植物白介素-6($P < 0.05$)和肿瘤坏死因子- α ($P < 0.05$)等因子表达增加。与冷缺血 1 h 相比,冷缺血 8 h 组的移植肝在移植术后 24 h 摄取溴脱氧尿核苷明显增多($P < 0.05$)。冷缺血 16 h 组的移植肝在移植术后 24 h 仅有少数溴脱氧尿核苷染色阳性的肝细胞存在。【结论】肿瘤坏死因子- α 和白介素-6 等细胞因子的上调表达在启动和完成部分肝移植后早期肝脏再生的过程中非常重要。轻度(1 h)和中度(8 h)的冷缺血损伤可以启动并完成部分肝移植植物移植后的肝脏再生,但重度(16 h)的冷缺血损伤即使在早期启动信号存在的情况下,不能完成移植后的肝脏再生。

关键词:冷缺血损伤;肝移植;白介素-6;肿瘤坏死因子;肝;再生

中图分类号:R363

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)01-0063-04

Pattern of Early Intra-graft Cytokines Following Rat Partial Liver Transplantation

WANG Guo-dong¹, MA Yi¹, CHEN Gui-hua²

(1. Transplantation Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China;
2. Transplantation Surgery, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract:【Objective】To explore the effect of different cold ischemia (CI) times on the patterns of intra-graft cytokines of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) and their correlation with regeneration after rat partial liver transplantation. 【Method】Model of Lewis rat 50% partial liver transplantation (LT) was established. The rats were divided into 3 groups: group of 1 h CI (20 cases), group of 8 h CI (20 cases) and group of 16 h CI (20 cases). Survival rate of each group was recorded. Specimens were collected at predetermined intervals from 90 min, 1, 2, 4, and 7 d post-reperfusion. Expression pattern of TNF- α and IL-6 were determined in liver grafts with different CI times following transplantation. Progression of DNA synthesis of hepatocyte was confirmed by bromodeoxyuridine (BrdU) uptake. 【Results】A total of 60 Partial LTs were performed and operative success rate of partial LT was 100% in all groups. Survival in groups with 1 h and 8 h CI was 100% (>7 d). Survival in group with 16 h CI was 20% (>7 d). Compared with 1 h CI, IL-6 and TNF- α expression in partial liver grafts preserved for 8 h and 16 h were markedly increased post-transplantation ($P < 0.05$). Positively BrdU-stained nuclei were quantitated and analyzed between experimental groups. Number of positively stained nuclei in 8 h CI group were more than those in 1 h CI groups at 24 h after transplantation ($P < 0.05$), indicating the initiated and completed

收稿日期:2006-03-17

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(973,2003CB515500)

作者简介:王国栋(1970-),男,河南唐河人,博士,副主任医师,主要从事肝移植的临床和基础研究;陈规划,通讯作者,教授,博士生导师,E-mail:wgdgd@163.com

cell cycle progression and liver regeneration. At 24 h after transplantation, BrdU uptake was minimal in the rat livers with 16 h cold ischemia. [Conclusion] Upregulation of cytokines of TNF- α and IL-6 is an important factor in initiating and completing early partial liver graft regeneration. Mild (1 h) and moderate (8 h) CI could initiate and complete liver regeneration after rat partial LT, but partial grafts with severe CI (16 h) fail to achieve liver regeneration despite the presence of early initiating signals.

Key words: cold ischemic injury; liver transplantation; IL-6; TNF- α ; liver; regeneration

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(1):63-66, 71]

在影响临床劈裂式肝移植后移植物功能存活的因素中,冷缺血再灌注损伤仍然是一个重要因素^[1]。研究发现大鼠的全肝移植在冷缺血再灌注损伤后的恢复途径大鼠肝切除后的机制相似,通过 IL-6 诱导肝脏再生,修复组织损伤^[2,3]。部分肝脏移植冷缺血损伤后肝脏再生的机理尚未完全清楚。本实验应用大鼠原位部分肝移植模型,研究不同冷缺血损伤条件下,部分肝脏移植物的功能存活和肝脏再生,探讨 TNF- α 和 IL-6 等细胞因子的表达参与损伤后肝脏再生的规律。

1 材料和方法

1.1 动物

供受体均采用健康、雄性、清洁级 Lewis 近交系大鼠,供、受体大鼠各 60 只,体质量 250 ~ 320 g。饲养条件符合无特定病原动物标准。

1.2 手术方法

1.2.1 供体手术 异氟醚持续吸入麻醉,在单人双目 GZ6E 型手术显微镜(Leica 公司,德国)下进行。腹部横切口进腹,游离肝脏。靠近肝门处切开胆总管,置入胆道支架管(PE 50, I.D. 0.023", O.D. 0.038", BD Biosciences, 美国)。游离门静脉及肝固有动脉,近门静脉处结扎幽门静脉。分离肝下下腔静脉,结扎切断右肾上腺静脉和右肾静脉。在肝总动脉分支处游离肝总动脉。灌注前,经肝下下腔静脉注入肝素钠 0.4 mL(400 U)。5 mL 的 4 °C 器官保存液(UW 液)经门静脉灌注肝脏呈土黄色。灌注前开放肝下下腔静脉排出灌注液。肝下下腔静脉和门静脉分别用聚乙烯套管固定。供肝置入 4 °C UW 液中保存。

1.2.2 受体手术 受体手术时,麻醉方法、体位、切口均同供体手术。游离肝周韧带和肾上血管。游离肝固有动脉,在靠近肝门分支处切断。胆总管靠近肝门分支处切断。阻断肝上、肝下下腔静脉和门静脉后切除受体肝脏,保存足够的血管长度以

利于血管重建。原位肝移植采用二袖套法,肝上下腔静脉端端缝合。肝下下腔静脉和门静脉分别用套管法重建,胆管重建采用内支架管端端连接的方法。套叠缝合法重建肝动脉^[4]。移植肝恢复血流前,用 3-0 丝线结扎大鼠左侧中央叶、左外叶、尾状叶,保留右侧的肝叶,即可建立大鼠 50% 的部分肝移植模型。5-0 丝线连续双层缝合腹壁。

1.3 实验分组

实验分 3 组,各 20 只:①冷缺血 1 h 组,供肝置入 4 °C UW 液中保存 1 h;②冷缺血 8 h 组,供肝置入 4 °C UW 液中保存 8 h;③冷缺血 16 h 组,供肝置入 4 °C UW 液中保存 16 h。每组分别在供肝血流恢复后 90 min、1、2、4 和 7 d 处死 2 只大鼠收集标本进行检测。每组 10 只大鼠观察至术后第 7 天。

1.4 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 IL-6 和 TNF- α

在预定的时间点处死大鼠后,切取 2 g 肝组织提取,纯化 RNA。500 ng 的 RNA 经过逆转录、扩增后用琼脂糖凝胶电泳分离后进行半定量分析。 β -肌动蛋白(β -actin)作为对照。扩增 IL-6 所用的引物是 IL-6-5'-GGAGACTTCACAGAGGATACC; IL-6-3'-GCTCTGAATGACTCTGGC。

1.5 免疫组化检测肝细胞复制

移植肝复流后 24 h 进行肝细胞 DNA 复制检测。取标本前 2 h 经腹腔注入溴脱氧尿核苷(BrdU, 50 mg/kg)。试剂有抗 BrdU 抗体(Boehringer Mannheim 公司,美国)等。免疫组化染色方法按说明书进行。本实验采用 DAB 显色,采用棕色,苏木素复染的方法将增殖细胞的细胞核染成棕色,而静止期的细胞核不染色。阳性细胞数通过计数低倍镜下($\times 10$) 3 个视野染色阳性的细胞,然后计算其平均阳性数。常规进行 HE 染色,观察细胞形态。

1.6 统计学处理

所有数据结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。各实验组间 IL-6 和 TNF- α 的等因子的表达水平比

较采用方差分析。冷缺血 1 h 组和冷缺血 8 h 组术后 24 h 摄取溴脱氧尿核苷的肝细胞数量属于连续型计量资料,符合正态分布,两者比较采用 *t* 检验。检验水准,设 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 动物的存活情况

冷缺血 1 h、8 h、16 h 组的部分肝脏移植手术成功率均为 100%。冷缺血 1 h、8 h 组的动物存活率均为 100% (>7 d)。两组 50% 部分肝脏移植术在术后第 7 d 已达到原受体肝体积的 90% 以上。冷缺血 16 h 组的动物麻醉后清醒和活动恢复较慢,但无其它的并发症发生。7 d 后冷缺血 16 h 组的部分肝脏移植物的存活率降至 20%。本实验证实动脉重建的大鼠 50% 部分肝移植术不能耐受 16 h 的冷缺血损伤。

2.2 TNF- α 和 IL-6 等细胞因子的表达

RT-PCR 检测肝内 IL-6 和 TNF- α 的表达(图 1)。50% 部分肝脏移植后 90 min,在冷缺血 1 h 组,IL-6 和 TNF- α 的表达保持在较低水平。在冷缺血 8 h 组和冷缺血 16 h 组,IL-6 和 TNF- α 的表达明显增加,与冷缺血 1 h 组的 IL-6 和 TNF- α 的表达水平相比,差异有显著性($F=367.38, F=77.84, P < 0.05$)。但冷缺血 8 h 组和冷缺血 16 h 组的 TNF- α 的表达差异无显著性($t=0.72, P > 0.05$;图 2)。

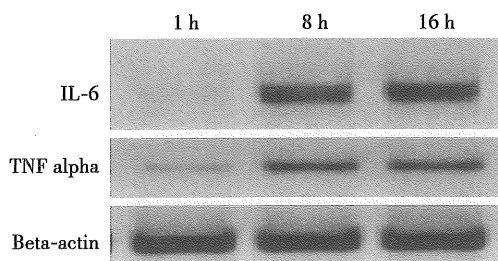


图 1 大鼠 50% 移植肝冷缺血 1 h、8 h、16 h 组 TNF- α 、IL-6 的变化

Fig.1 50% rat liver TNF- α , IL-6 RNA levels in 1 h, 8 h, and 16 h cold ischemia groups

50% liver grafts were harvested at 90 min after reperfusion and processed for total RNA. TNF- α and IL-6 expression were elevated when the partial liver grafts were preserved for 8 h and 16 h.

2.3 肝细胞 DNA 合成的检测

免疫组化检测肝细胞摄取溴脱氧尿核苷观察 50% 肝移植物的细胞复制情况。DNA 合成期增殖

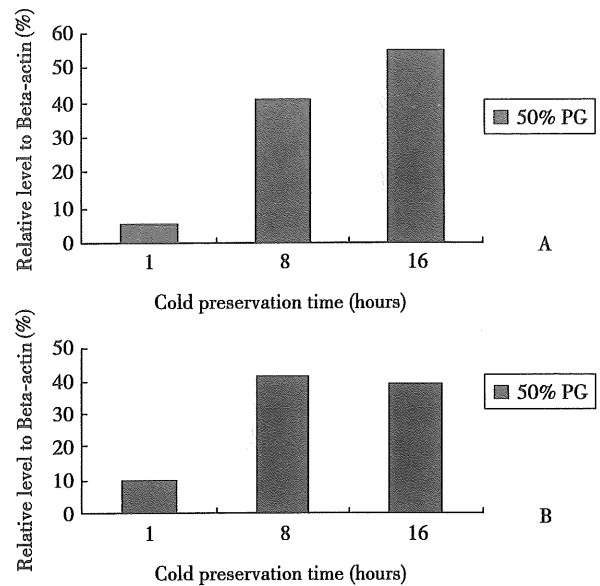


图 2 50% 移植肝冷缺血 1 h、8 h、16 h 组 IL-6 和 TNF- α 的定量分析

Fig.2 Quantitative analysis of IL-6 and TNF- α levels in 50% liver grafts preserved for 1 h, 8 h, and 16 h

A: IL-6; B: TNF- α . 50% liver grafts (at 90 min after reperfusion) preserved for 1 h demonstrate lower levels of IL-6 that significantly increase when the grafts preserved for 8 h and 16 h.

的细胞被染成棕色。全肝的移植术,术后 48 h 是肝细胞分裂期的高峰。为了观察 50% 移植肝的细胞复制情况,我们在移植术后连续测定肝细胞摄取溴脱氧尿核苷情况。冷缺血 1 h 组,肝细胞摄取溴脱氧尿核苷的数量保持在稳定较低的水平。8 h 冷缺血组在术后 24 h 肝细胞摄取溴脱氧尿核苷达到最高,然后下降(图 3)。与冷缺血 1 h 组的摄取溴脱氧尿核苷水平相比,差异有显著性 ($t=$

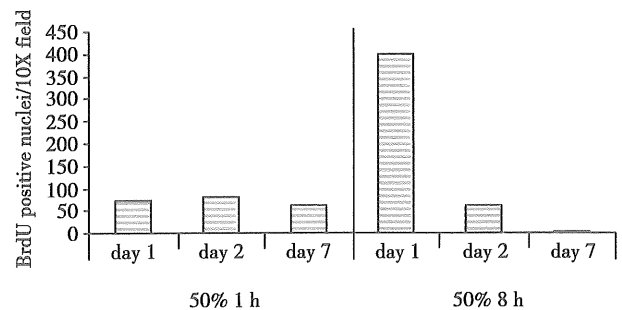


图 3 冷缺血时间对 50% 肝移植术再生能力的影响
Fig.3 Effects of cold ischemia on regeneration of 50% partial liver graft

Steady DNA synthesis in 50% liver grafts on day 1 post-LT. Increased mitosis in liver grafts preserved for 8 h on day 1 after transplantation. $n=6$ for each group, Student's *t*-test. $t=24.81, P < 0.05$ between the two groups

24.81, $P < 0.05$)。与冷缺血 1 h 组和冷缺血 8 h 组相比,冷缺血 16 h 组的肝细胞摄取溴脱氧尿核苷没有明显的增加,这些移植物术后存活时间较短。

2.3 移植肝组织学的检测

组织学检查发现移植术后 24 h 轻度(冷缺血 1 h)和中度(冷缺血 8 h)的冷缺血损伤后移植肝组织结构正常,没有明显的组织坏死等改变。仅有轻度的窦状隙扩张和轻度的炎症(图 4A)。随着冷缺血时间延长到 16 h,组织学检查有凋亡的早期改变,伴有窦状隙的炎症和坏死等改变(图 4B)。

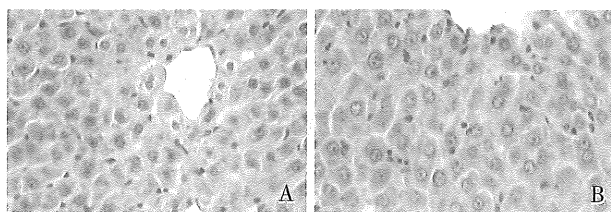


图 4 冷缺血 8、16 h 移植肝术后 24 h 组织学检查

Fig.4 Histology in partial liver grafts with 8 h (A) and 16 h (B) cold ischemia at 24 h after transplantation

50% liver grafts preserved for 8 h at 24 h after transplantation show normal structure, with mild sinusoidal dilatation and inflammation. Grafts preserved for 16 h demonstrate early apoptotic features, with sinusoidal inflammation and necrosis; $\times 100$

3 讨论

肝脏移植是治疗终末期肝病的最有效方法,但供体短缺限制了肝脏移植的广泛应用。临床上为解决这一矛盾,劈裂式和活体肝脏移植新技术应运而生^[5,6]。无论全肝或者部分肝脏的移植物,均要经历一定程度的冷缺血损伤。活体肝移植的冷缺血时间比较短,但劈裂式肝脏移植的冷缺血时间明显延长。肝切除后参与肝脏再生的重要的细胞因子是 TNF- α 和 IL-6^[7,8]。大鼠全肝移植在冷缺血再灌注损伤后亦通过 TNF- α 和 IL-6 等因子调节肝脏再生^[2]。肝脏部分移植物经受冷缺血损伤后的再生机理尚不完全清楚。我们应用 50% 肝脏移植模型,观察了不同冷缺血损伤对移植物肝脏再生的影响和移植后 TNF- α 和 IL-6 的变化规律。结果发现,无论冷缺血损伤时间长短,移植后早期肝脏再生的信号始终存在。但在重度的冷

缺血损伤下,移植物不能完成肝脏再生过程,因此不能存活。

TNF- α 1 型受体和 IL-6 缺陷小鼠肝切除后肝脏再生障碍,而外源性 IL-6 可以逆转异常的肝脏再生,表明 IL-6 在肝脏再生启动过程中发挥关键作用^[7,8]。Selzner 等^[9]在研究肝移植后肝脏再生时发现,缺血损伤导致移植肝组织中的 TNF- α 和 IL-6 表达水平明显降低,肝脏再生能力显著下降。而 IL-6 可明显改善肝脏再生,减轻缺血再灌注损伤。与冷缺血 1 h 相比,冷缺血 8 h 和冷缺血 16 h 组诱导大鼠部分肝移植物的 IL-6 和 TNF- α 等因子表达增加。但本实验证实,在肝脏遭受切除和冷缺血损伤后, TNF- α 和 IL-6 等细胞因子的表达亦明显增加。冷缺血损伤 8 h 组的部分肝脏移植在移植术后 24 h 摄取溴脱氧尿核苷明显增多,说明已启动并完成细胞复制和肝脏再生。冷缺血 1 h 组因为损伤较轻,肝脏细胞复制保持在稳定水平。但冷缺血 16 h 组的移植肝在移植术后 24 h 仅有少数溴脱氧尿核苷染色阳性的肝细胞存在,比冷缺血 1 h 组的肝脏细胞复制水平还低,说明重度的冷缺血损伤后部分肝脏物的肝脏再生过程没有完成。这一点与全肝移植经历冷缺血 16 h 后肝脏再生的结果完全不同。全肝移植虽然遭受 16 h 冷缺血损伤,但由于启动了肝脏再生这一保护机制,能够保持功能存活。如果冷缺血损伤超过机体的承受能力,机体虽能产生 TNF- α 和 IL-6,但是不能对启动的信号起作用。肝再生的细胞复制阶段不能完成,移植物不能存活。临床上可以观察到活体肝移植的效果优于劈裂式肝移植,可能就是冷缺血损伤影响了肝脏再生的能力和移植物的功能存活。

肝脏再生是非常复杂和精细调节的过程。机体通过激活系统促进肝脏再生外,还存在抑制因子拮抗系统负反馈机制精确调节肝脏再生^[10]。IL-6 可促进肝脏再生,但过高 IL-6 也可阻止和延迟肝脏再生,揭示 IL-6 在肝脏再生过程中表现出的双重性^[11]。与全肝移植诱导肝脏再生的机理类似,部分肝脏移植物经受冷缺血损伤后,仍然需要 TNF- α 和 IL-6 等活化因子启动并完成肝脏再生的过程,移植物才能存活。进一步明确部分肝脏移植后的再生机理,促进部分肝脏移植物移植后的功能存活将是今后的研究方向。

(下转第 71 页 to page 71)