

· 论 著 ·

肝硬化大鼠肝部分切除后 IL-6/STAT3 信号通路的变化*

袁晟光¹, 农卡特^{2△}, 廖维甲¹, 覃理灵¹, 王 莉¹

(1. 桂林医学院附属医院肝胆外科, 广西桂林 541001; 2. 江苏大学附属医院, 江苏镇江 212001)

摘要:目的 了解白细胞介素-6(IL-6)/信号转导及转录活化因子 3(STAT3)信号通路在肝硬化大鼠肝部分切除后残肝再生障碍中的作用。**方法** 采用皮下注射四氯化碳(CCl₄)法建立肝硬化大鼠模型。正常大鼠为对照组。对照组及肝硬化组均行 70% 肝切除后, 于不同的时间点收集残肝组织及血液标本, 检测血清 IL-6、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平、肝组织增殖细胞核抗原(PCNA)及活性 STAT3 蛋白表达。**结果** 肝切除后 24 h, 肝硬化组大鼠有丝分裂细胞数及 PCNA 阳性细胞数均明显小于对照组。肝切除后的前 12 h, 肝硬化组大鼠 IL-6 表达水平明显低于对照组。术后 2 h, 对照组残肝组织的活性 STAT3 蛋白远远高于肝硬化组。**结论** 肝硬化肝切除术后早期 IL-6 的低表达导致 STAT3 蛋白活化不足是肝硬化大鼠肝部分切除术后残肝再生障碍的重要原因之一。

关键词:肝硬化; 肝再生; 肝切除术; 大鼠, 裸

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.22.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)22-2188-03

Changes in IL-6/STAT3 signal pathway after partial hepatectomy in rats with cirrhosis*

Yuan Chengguang¹, Nong Kate^{2△}, Liao Weijia¹, Qin Liling¹, Wang Li¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi 541001, China;

2. Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang, Jiangsu 212001, China)

Abstract: **Objective** To analyze the changes of IL-6/STAT3 signal pathway after partial hepatectomy in rats with CCl₄-induced cirrhosis. **Methods** Cirrhosis was induced in rats by hypodermic injection of CCl₄. Untreated rats were used as controls. The control rats and the cirrhotic rats were subjected to 70% partial hepatectomy. At different time points after hepatectomy, the residual liver and blood samples were collected, the levels of IL-6 and TNF-α in serum, the expression of PCNA and active STAT3 proteins in the liver tissue were analyzed. **Results** 24 h after hepatectomy, we detected significantly lower mitotic index and PCNA positive cells in the cirrhotic rat as compared to the controls. The cirrhotic rat expressed significantly lower levels of IL-6 as compared to the controls up to 12 h after hepatectomy. Significantly lower levels of active STAT3 proteins were also observed in the cirrhotic rat 2 h after hepatectomy. **Conclusion** The data from our study shows that one of the most important reasons for the impaired liver regeneration in cirrhotic remnants is associated with low expression of IL-6 in the early stage and the following low activation of STAT3 proteins.

Key words: liver cirrhosis; liver regeneration; hepatectomy; rats, nude

肝切除是治疗各种肝脏病变最为重要的手段, 肝切除术后肝功能的恢复依赖于残肝的再生, 硬化肝脏的再生较正常肝脏明显减慢、延迟, 因此提高硬化肝脏的再生能力将会改善肝切除术后患者的预后^[1]。本组通过研究肝硬化大鼠肝部分切除后残肝再生状况以及在细胞及分子水平对白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)/信号转导及转录活化因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路中的相关分子进行检测, 希望初步揭示硬化肝脏再生障碍的可能机制, 并为临床治疗提供新的思路和手段。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 增殖细胞核抗原(proliferation cell nuclear antigen, PCNA)单抗(Santa Cruz, sc-9857); STAT3 单抗(Santa Cruz, sc-8019); 山羊抗兔/小鼠 IgG 多聚体(北京中杉, K86611A); 抗山羊 IgG 多聚体(北京中杉, K96711E); 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(北京中

杉, K86621A); IL-6 ELISA 试剂盒(上海船夫, EIA05847); 肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)ELISA 试剂盒(上海船夫, EIA05896); 四氯化碳(分析纯, 汕头西陇, 0801032); 乙醚(分析纯, 汕头西陇, 0803142); 硫化钠(分析纯, 汕头西陇, 0807182)等。

1.2 仪器与设备 超低温冰箱(美国 ThermoForma, 725); 酶标仪(美国 ThermoForma, LABMK3)等。

1.3 方法 选择无特殊病原体(specific-pathogen free, SPF)级雄性 SD 大鼠, 体质量 200~250 g, 对照组 40 只, 实验组 40 只。背部皮下注射 50% 四氯化碳、10% 乙醇饮水复合方法制作 SD 大鼠肝硬化模型, 持续 9 周, 动物稳定 1 周。切除大鼠肝脏左、中叶诱导肝再生。根据随机化原则, 分别将实验组及对照组分为 8 组, 每组 5 只, 分别于术后 0、1、2、4、13、24、48、72 h 8 个不同时间点处死实验动物。标本收集时间为 8:00~14:00。所有到时间点的动物麻醉后, 术野用碘伏消毒, 开腹

暴露腹腔,心脏抽血 3~5 mL,室温下以离心半径 10 cm,3 000 r/min 离心 5 min,取上清液置于 1.5 mL EP 管-80 °C 保存;切除残肝称质量,取小块肝组织浸入 10% 甲醛溶液中固定保存,其余肝组织置于冻存管中-80 °C 保存备用。用 ELISA 法检测血清 IL-6、TNF- α 水平。常规病理切片光镜观察肝组织病理改变,统计肝细胞有丝分裂指数。免疫组化二步法检测 PCNA、STAT3 表达,统计 PCNA 阳性细胞数及 STAT3 活性细胞数。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 和 Excel 进行统计分析和绘图,数据采用 $\bar{x} \pm s$ 记录,以 *t* 检验统计分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肝切除后血清 IL-6、TNF- α 的变化 肝切除后对照组血清 IL-6 水平在术后 1 h 达高峰,而后缓慢下降;实验组则到术后 12 h 才缓慢到达高峰,之前均低于对照组,72 h 出现第 2 次高峰,在 0、1、2、72 h 时点实验组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见封 2 图 1。肝切除后实验组血清 TNF- α 术后 12 h 高于对照组外,其他时间点均低于对照组,在各时点实验组与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),见封 2 图 2。

2.2 有丝分裂指数 肝切除后对照组有丝分裂细胞数在 24 h 开始迅速升高,于 48 h 达高峰后下降;实验组 24 h 达高峰后迅速下降,其峰值远小于对照组。48 h 时间点实验组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见封 2 图 3。

2.3 PCNA 的表达 肝切除后对照组 PCNA 阳性表达在 12 h 前保持低水平,之后迅速升高,于 48 h 达高峰后逐渐下降;实验组在 12 h 前均高于对照组,呈缓慢上升趋势,于 48 h 达高峰,但远低于对照组。各时间点实验组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见封 2 图 4。

2.4 STAT3 的表达 肝切除后对照组 STAT3 表达于 2 h 达高峰后迅速下降至极低水平;实验组 2 h STAT3 活性细胞数明显低于对照组。0、1、2、4、12、24 h 时间点实验组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 5。

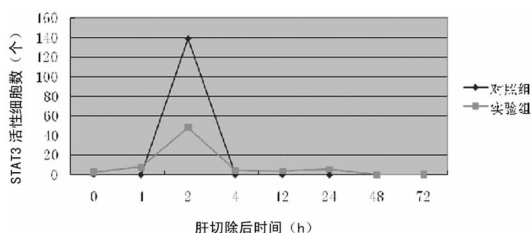


图 5 肝切除后 STAT3 活性细胞数变化趋势图

3 讨 论

大量研究表明,硬化肝脏部分切除后残肝再生过程的启动、进展及停止均较正常肝脏有明显的不同。硬化肝脏部分切除后残肝再生过程的特点有:(1)再生过程慢,所需时间长。正常大鼠肝脏 70% 部分切除后,再生反应迅速启动,肝细胞于术后 24 h 增大一倍,DNA 合成到达高峰,之后迅速分裂、增殖,恢复原肝重量后立即停止,整个过程仅需 7~10 d^[2];而肝硬化大鼠 70% 部分切除后,则需约 1 个月才能恢复到原肝重量;(2)残肝再生不仅慢,而且大多数再生肝细胞不能发育成熟,缺乏正常功能,甚至部分发生变性、坏死^[3]。(3)硬化肝脏部分切

除后残肝再生缓慢是源于再生相关分子调控机制异常为基础的^[4],包括细胞因子、转录因子、生长因子及其受体、细胞周期调节相关蛋白以及细胞凋亡相关基因的表达等^[5-6]。

目前认为 TNF- α 及 IL-6 共同启动肝脏再生^[2]。肝脏大部分切除后数小时内的肝再生启动阶段,TNF- α 通过与 Kupffer 细胞表面特异的受体(TNFR1)结合,激活转录因子核因子- κ B(nuclear factor- κ B,NF- κ B),上调 IL-6 基因表达,刺激其合成及释放。IL-6 通过结合 gp130 受体,激活 STAT3 转录因子,后者进入核内启动多种基因转录活化,启动多种效应,包括细胞增殖反应、急性炎症反应以及抗细胞凋亡等^[7]。继而肝细胞在生长因子如肝细胞生长因子、转化生长因子 α 等作用下不可逆地进入细胞周期^[8-9]。

本研究结果显示,肝切除后实验组血清 TNF- α 术后 12 h 高于对照组外,其他时间点均低于对照组,在各时间点实验组血清 TNF- α 与对照组相比差异均无统计学意义,其原因可能为肝硬化大鼠肝再生障碍与 TNF- α 关系不大;而 IL-6 则是在肝再生启动阶段前 4 h 内起效。肝切除后,对照组血清 IL-6 水平在术后 1 h 达高峰,之后缓慢下降;而实验组则到术后 12 h 才缓慢到达高峰,之前均低于对照组,72 h 出现第 2 次高峰。有研究证实持续且长期低水平的 IL-6 对肝再生有抑制作用^[10],而 Tiberio 等发现在硬化肝部分切除后残肝再生启动阶段短期给予外源性 IL-6 可促进残肝再生^[11]。IL-6 家族成员之一的心肌营养素-1(cardiotrophin-1,CT-1)也能通过结合 gp130 受体而激活 STAT3,在肝脏中起 IL-6 相似的作用^[12]。最近的研究表明,CT-1 能促进细胞分裂及血管生成,对硬化肝脏切除后的残肝再生有明显的促进作用^[13]。因此作者认为肝硬化大鼠 IL-6 峰值异常是导致硬化肝脏再生障碍的重要原因,为此本研究进一步检测了 IL-6 的下游因子 STAT3 的活化情况。

STAT3 是信号转导和转录活化因子家族成员之一^[7,14],哺乳动物已有 9 种 STAT 基因被克隆。转录因子 STAT3 在肝部分切除后被激活,但比 NF- κ B 慢,且激活机制也完全不同,主要由细胞因子 IL-6 激活,使其二聚化后进入核内启动多种基因转录活化,启动多种效应,包括细胞增殖反应、急性炎症反应以及抗细胞凋亡等^[15-16]。70% 部分切除术后,正常大鼠肝脏内的 STAT3 在 30 min 内被激活,术后 3 h 到达高峰,作用持续 46 h^[17]。临床实验证明,酒精性肝硬化以及丙型肝炎肝硬化的肝组织中 STAT3 蛋白量及活性低于健康肝脏^[18]。

本实验结果显示,肝切除后活性 STAT3 蛋白于 2 h 达高峰后迅速下降至极低水平,但肝硬化组 2 h STAT3 活性细胞数明显低于对照组,两组相比差异有统计学意义。结合先前的文献,本组认为 STAT3 活性低下是由于早期 IL-6 峰值水平低下造成的。此外,有研究证实,酒精性肝硬化以及丙型肝炎肝硬化的肝组织 Pias3 蛋白(protein inhibitor of activated STAT3)表达上调^[19],因此 STAT3 蛋白与相应 DNA 结合的能力下降还可能与其抑制物 Pias3 蛋白有关,这需要进一步研究明确。

总之,本实验结果表明硬化肝脏部分切除后 IL-6 的峰值异常导致 STAT3 蛋白活性不足是导致肝硬化大鼠肝部分切除后残肝再生障碍的重要原因;IL-6 的低表达及 STAT3 蛋白活性不足一方面直接影响肝再生启动,另一方面还可能导致

IL-6/STAT3 信号通路下游肝再生相关基因表达异常,最终致使硬化肝脏再生障碍。但什么原因导致 IL-6 表达异常,以及下游肝再生相关基因有何异常变化,仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Atta HM. Gene therapy for liver regeneration: experimental studies and prospects for clinical trials [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(32):4019-4030.
- [2] Fausto N, Campbell JS, Riehle KJ. Liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2006, 43(2 Suppl 1):S45-53.
- [3] 余小舫,戴植本. 实验性肝硬化大鼠肝部分切除后的再生 [J]. *同济医科大学学报*, 1988, 2(2):93-96.
- [4] Yang S, Leow CK, Tan TM. Expression patterns of cytokine, growth factor and cell cycle-related genes after partial hepatectomy in rats with thioacetamide-induced cirrhosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(7):1063-1070.
- [5] Masson S, Scotté M, Garnier S, et al. Differential expression of apoptosis-associated genes post-hepatectomy in cirrhotic vs. normal rats [J]. *Apoptosis*, 2000, 5(2):173-179.
- [6] Nishino M, Imuro Y, Ueki T, et al. Hepatocyte growth factor improves survival after partial hepatectomy in cirrhotic rats suppressing apoptosis of hepatocytes [J]. *Surgery*, 2008, 144(3):374-384.
- [7] Lam SP, Luk JM, Man K, et al. Activation of interleukin-6-induced glycoprotein 130/signal transducer and activator of transcription 3 pathway in mesenchymal stem cells enhances hepatic differentiation, proliferation, and liver regeneration [J]. *Liver Transplant*, 2010, 16(10):1195-1206.
- [8] Michalopoulos GK. Liver regeneration [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 213(2):286-300.
- [9] Rychtrmoe D, Libra A, Buncek M, et al. Studying liver regeneration by means of molecular biology: how far we are in interpreting the findings [J]. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 2009, 52(3):91-99.
- [10] Jin X, Zimmers TA, Perez EA, et al. Paradoxical effects of short-and long-term interleukin-6 exposure on liver injury and repair [J]. *Hepatology*, 2006, 43(3):474-484.
- [11] Tiberio GA, Tiberio L, Benetti A, et al. IL-6 promotes compensatory liver re-generation in cirrhotic rat after partial hepatectomy [J]. *Cytokine*, 2008, 42(3):372-378.
- [12] Marques JM, Belza I, Holtmann B, et al. Cardiotrophin-1 is an essential factor in the natural defense of the liver against apoptosis [J]. *Hepatology*, 2007, 45(3):639-648.
- [13] Yang ZT, Lau CK, Lam SP, et al. Cardiotrophin-1 enhances regeneration of cirrhotic liver remnant after hepatectomy through promotion of angiogenesis and cell proliferation [J]. *Liver Int*, 2008, 28(5):622-631.
- [14] Leu JI, Crissey MA, Leu JP, et al. Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1-mediated transactivation of hepatic genes, an adaptive response liver injury [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(2):414-424.
- [15] Li W, Liang X, Kellendonk C, et al. STAT3 contributes to the mitogenic response of hepatocytes during liver regeneration [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(32):28411-28417.
- [16] Moh A, Iwamoto Y, Chai GX, et al. Role of STAT3 in liver regeneration: survival, DNA synthesis, inflammatory reaction and liver mass recovery [J]. *Lab Invest*, 2007, 87(10):1018-1028.
- [17] Sakuda S, Tamura S, Yamada A, et al. Activation of signal transducer and activator transcription 3 and expression of suppressor of cytokine signal 1 during liver regeneration in rats [J]. *J Hepatol*, 2002, 36(3):378-384.
- [18] Horiguchi N, Ishac EJ, Gao B. Liver regeneration is suppressed in alcoholic cirrhosis: correlation with decreased STAT3 activation [J]. *Alcohol*, 2007, 41(4):271-280.
- [19] Starkel P, De Saeger C, Leclercq I, et al. Deficient Stat3 DNA-binding is associated with high Pias3 expression and a positive anti-apoptotic balance in human end-stage alcoholic and hepatitis C cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(4):687-695.
- (收稿日期:2010-10-11 修回日期:2011-05-22)
- (上接第 2187 页)
- a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons [J]. *Science*, 1993, 260(5111):1130-1132.
- [11] 陈生弟. 帕金森病临床新技术 [M]. 北京:人民军医出版社, 2002:218-219.
- [12] Kholodilov N, Yarygina O, Oo TF, et al. Regulation of the development of mesencephalic dopaminergic systems by the selective expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in their targets [J]. *J Neurosci*, 2004, 24(12):3136-3146.
- [13] Yasuhara T, Shingo T, Date I. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) therapy for Parkinson's disease [J]. *Acta Med Okayama*, 2007, 61(2):51-56.
- [14] Roussa E, Kriegelstein K. GDNF promotes neuronal differentiation and dopaminergic development of mouse mesencephalic neurospheres [J]. *Neurosci Lett*, 2004, 361(1-3):52-55.
- [15] Kobori N, Waymire JC, Haycock JW, et al. Enhancement of tyrosine hydroxylase phosphorylation and activity by glial cell line-derived neurotrophic factor [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(3):2182-2191.
- (收稿日期:2010-10-17 修回日期:2011-06-27)