

肝硬化大鼠肝部分切除术后残肝 TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s mRNA 的变化

陈平,李昆,董家鸿,韩本立

陈平,李昆,董家鸿,韩本立,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所 重庆市 400038
陈平,男,1964年生,四川省眉山市人,汉族,1997年第三军医大学肝胆外科博士研究生毕业.博士,副教授,副主任医师,硕士生导师,主要从事肝胆外科、腹腔镜外科临床及肝再生的实验研究。
国家自然科学基金课题, No. 30070746
项目负责人:陈平,400038,重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号,中国人民解放军第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所. chenping@263.net
电话:023-65318301-73083
收稿日期:2002-11-19 接受日期:2002-11-29

Changes of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA after partial hepatectomy in rat liver

Ping Chen, Kun Li, Jia-Hong Dong, Ben-Li Han

Ping Chen, Kun Li, Jia-Hong Dong, Ben-Li Han, Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Medical University, Chongqing 400038, China
Ping Chen, Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Medical University, Chongqing 400038, China
Supported by National Natural Scientific Foundation of China, No. 30070746
Correspondence to: Dr. Ping Chen, Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Medical University, Chongqing 400038, China. chenping@263.net
Received:2002-11-19 Accepted:2002-11-29

Abstract

AIM: To explore expression of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA in hepatocyte and Kuffer cell (KC) and to study the effects of KC on liver regeneration after partial hepatectomy in cirrhotic rats.

METHOD: Using the model of partial hepatectomy in cirrhotic rats, we separated hepatocytes and KCs and employed Northern hybridization.

RESULTS: The expression of HGF mRNA in KC was earlier than that of hepatocyte, and peaked at 6 hr after operation. But the expression contents of TGF- α mRNA in hepatocyte was more than that of KC. The expression contents of IGFBP-1s mRNA in hepatocyte was lower and KC had no expressions. The expression of PCNA mRNA in hepatocyte was markedly depressed at 6h postoperation.

CONCLUSION: The expression of HGF and TGF- α mRNA is correlated with liver regeneration after operation in cirrhotic rats. TGF- α is very important for liver regeneration. The lower expression of IGFBP-1s mRNA shows the metabolic damage in cirrhotic rats postoperatively, but the expression of PCNA mRNA indicates the ability of liver regeneration.

Chen P, Li K, Dong JH, Han BL. Changes of TGF- α , HGF, PCNA and IGFBP-1s mRNA after partial hepatectomy in rat liver. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2003;11(4):434-437

摘要

目的:探讨肝硬化状态下肝部分切除术后肝细胞和 KC TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s 的 mRNA 表达,进一步阐明 KC 在肝细胞再生中的作用。

方法:复制我们建立的大鼠肝硬化肝切除模型,分离肝细胞和 KC,提取 RNA,采用 Northern 杂交。

结果:KC 其 HGF mRNA 表达较肝细胞为早,在术后 6 h 点达到高峰。但肝细胞 TGF- α mRNA 表达含量明显高于 KC 的表达。肝细胞 IGFBP-1s mRNA 的表达含量低,术后 6 h 点相对较高。KC IGFBP-1s mRNA 未见表达。肝细胞 PCNA mRNA 的表达在术后 6 h 其含量达到最低点,明显受抑制。

结论:HGF 和 TGF- α mRNA 表达与肝硬化大鼠的肝细胞再生密切相关,而 TGF- α 是肝细胞再生中最重要的物质。IGFBP-1s mRNA 表达降低反应了肝硬化大鼠术后肝细胞代谢明显受损,而 PCNA mRNA 表达可提示肝细胞增生能力。

陈平,李昆,董家鸿,韩本立. 肝硬化大鼠肝部分切除术后残肝 TGF- α 、HGF、PCNA 和 IGFBP-1s mRNA 的变化. *世界华人消化杂志* 2003;11(4):434-437
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/434.htm>

0 引言

正常状态下肝部分切除术后 TGF- α (转化生长因子)、表皮生长因子(EGF)和 HGF(肝细胞生长因子)等具有强力促进肝细胞再生作用^[1-6]。但在肝硬化状态下肝部分切除术后这些细胞因子 mRNA 表达的情况及在肝再生中的作用仍不清楚。我们研究肝硬化大鼠肝部分切除术后肝细胞和 KC TGF- α , HGF, 增生细胞核抗原(PCNA)和胰岛素样生长因子黏附蛋白(IGFBP-1s)的 mRNA 表达,结果如下。

1 材料和方法

1.1 材料 皮下注射的四氯化碳(CCL₄)油溶液加口服乙醇的方法制作肝硬化模型^[7],在动物稳定 1 wk 后可进行实验。肝部分切除采用乙醚麻醉,腹部正中切口,切除大鼠肝脏的左叶和中叶,切除量占全肝的 70%。观察点为术后 6, 24, 48, 72 h 和术后 1 wk。采用 Ambrus te al^[8]的方法。

1.2 方法 参照 Promega 公司试剂盒的技术操作手册提取

总 RNA. 分别收集 1×10^8 肝细胞和 KC, 采用此法均可获得满意的 RNA. RNA 纯度的评价和定量: 用分光光度计在波长 260 nm 和 280 nm 下分别测定. HGF、TGF- α 、PCNA 和 IGFBP-1 细胞因子的 cDNA 探针的合成与纯化. 大鼠 HGF DNA 探针序列: 参照 Webber 设计的序列^[9]: 5' -GCTGCAGCTGGGAAATGTTTAAGATCTGTTTGCG-3'. TGF- α DNA 探针序列: 参照 Lee 设计的序列^[10]: 5' -CCATGTAAACAATATTG-3'. PCNA DNA 探针序列: 参照 Morishita 设计的序列^[11]: 5' -TTTGAGGCACGCCTGATC-3'. IGFBP-1s DNA 探针序列: 参照 Lee 设计的序列^[12]: 5' -GCATGGATCAGGGAGGAAACAACCTTCAGT-3'. 按以上 DNA 序列在本校生物化学教研室 DNA 合成仪上合成. 合成后按分子克隆实验指南的方法进行纯化. 使探针浓度为 200 mg/L. 用放射性同位素 ³²P 对 HGF, TGF- α , PCNA 和 IGF 细胞因子的 cDNA 探针的标记, 采用 Boehringer 公司提供的 DNA 5' 末端标记试剂盒. 参照 J. 萨姆布鲁克分子克隆实验指南第 2 版科学出版社, 1996:362 进行^[13].

2 结果

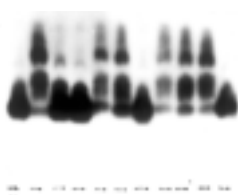
2.1 RNA 纯度的评价和定量 将提取的 RNA 2 ul + 998 ul 双蒸水, 在波长 260 nm 和 280 nm 时用分光光度计(BECKMAN DU-600)测定其吸光度. 结果 260 nm/280 nm A 值 > 1.6 < 2.0, 表明 RNA 提取纯度较高. 根据公式可计算出每个样品 RNA 含量: A 值 \times 40 ug/1 000 ug \times 1 000/2 = mg/L

表 1 11 个样品 RNA 含量 (mg/L)

样品	RNA 含量				
	6 h	24 h	48 h	72 h	1 wk
C-PH 组:					
HC	8.186	7.170	6.884	6.734	4.302
KC	2.074	3.786	4.334	2.889	3.848
SO 组肝细胞	1.612				

2.2 HGF mRNA 的表达 用 rHGF cDNA 探针检测到 6.0 Kb 的 mRNA, 肝硬变大鼠的肝细胞 rHGF 有一定表达. KC 其 HGF mRNA 表达较肝细胞为早, 在术后 6 h 点达到高峰. 而肝细胞 HGF mRNA 表达在术后 6 h 点含量最低, 以后逐渐升高, 在术后 48h 点达到最高峰.(见图 1).

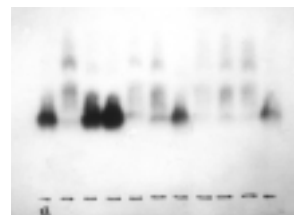
A B C D E F G H I J K



B-F C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的肝细胞.
G-K C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的 KC.
A 肝硬变大鼠肝细胞.
图 1 肝细胞和 KC HGF mRNA 表达.

TGF- α mRNA 的表达: 用 TGF- α cDNA 探针检测到 4.5 Kb 的 mRNA. 肝硬变大鼠的肝细胞有表达. 虽然 KC 其 TGF- α mRNA 表达较肝细胞为早, 在术后 6 h 点达到高峰. 但肝细胞 TGF- α mRNA 表达含量明显高于 KC 的表达, 提示肝细胞 TGF- α mRNA 在肝细胞再生中的作用可能大于 KC. 另一方面, 肝细胞 TGF- α mRNA 高表达持续时间长, 从术后 24 h 至术后 1 wk, 但高峰是术后 24-48 h (见图 2).

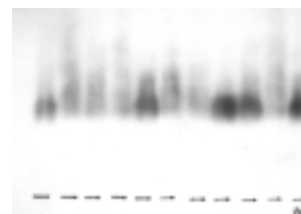
A B C D E F G H I J K



B-F C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的肝细胞.
G-K C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的 KC.
A 肝硬变大鼠肝细胞.
图 2 肝细胞和 KC TGF- α mRNA 表达.

IGFBP-1s mRNA 的表达: 与对照组比较, 肝细胞 IGFBP-1s mRNA 的表达含量低, 从片上来看, 隐约可见, 术后 6 h 点相对较高. KC IGFBP-1s mRNA 未见表达. 说明肝硬变大鼠术后肝细胞 IGFBP-1s mRNA 的表达抑制(见图 3).

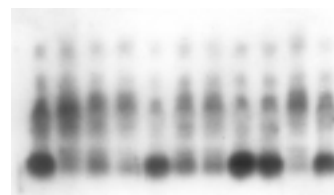
A B C D E F G H I J K



B-F C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的肝细胞.
G-K C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的 KC.
A 肝硬变大鼠肝细胞.
图 3 肝细胞和 KC IGFBP-1s mRNA 表达.

PCNA mRNA 的表达: 与对照组比较, 肝细胞 PCNA mRNA 的表达在术后 6 h 其含量达到最低点, 明显受抑制, 在术后 24-48 h 期间达到高峰. 与肝细胞有所不同, KC 其 PCNA mRNA 的表达轻度增高后, 逐渐下降, 至术后 1 wk 时达到高峰(见图 4).

A B C D E F G H I J K



B-F C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的肝细胞.
G-K C-PH 组术后 6,24,48,72 h 和 1 wk 的 KC.
A 肝硬变大鼠肝细胞.
图 4 肝细胞和 KC PCNA mRNA 表达.

3 讨论

人们最早认识到 HGF 是促进肝细胞再生最重要的物质, Grunnet et al [14-16]对肝损伤和修复时细胞生长因子的 mRNA 表达的研究发现, 大鼠肝部分切除术后与假手术组比较, 大鼠肝、脾和肾的 HGF mRNA 表达无明显增高, 我们的结果可以看出, KC 其 HGF mRNA 表达较肝细胞为早, 在术后 6 h 点达到高峰. 而肝细胞 HGF mRNA 表达在术后 6 h 点含量最低, 以后逐渐升高, 在术后 48 h 点达到最高峰, 但其峰值的表达低于 KC. 单纯 CCl4 诱导组(对照组)肝细胞有一定的 HGF mRNA 表达, 相似于 Tomiya et al [17,18]的结果. 说明 KC 在应激状态下作出的反应快于肝细胞, HGF 主要来源于肝脏非实质肝细胞, 如 KC, 但作用于肝细胞, 说明 HGF 参与了肝细胞再生[19-22].

TGF- 和 HGF 一样, 是刺激肝细胞生长非常重要的细胞因子[25-27]. 在 CCl4 肝损伤时, TGF- mRNA 表达的高峰在实验的 48-72 h, 相当于同期的 DNA 的合成[23,24]. 我们应用 TGF- cDNA 探针采用 Northern 印迹杂交技术来分析肝硬变大鼠术后肝细胞和 KC 的 TGF- mRNA 的表达. 结果显示, 虽然 KC 其 TGF- mRNA 表达较肝细胞为早, 在术后 6 h 点达到高峰. 但肝细胞 TGF- mRNA 表达含量明显高于 KC 的表达, 提示肝细胞 TGF- mRNA 在肝细胞再生中的作用可能大于 KC. 另一方面, 肝细胞 TGF- mRNA 高表达持续时间长, 从术后 24 h-1 wk, 但高峰是术后 24-48 h. 结果表明, TGF- 很可能是肝细胞再生过程中最重要的因子, 因为肝细胞表达其 mRNA 的量且早, 提示 TGF- 很可能参与肝细胞再生启动.

IGFBP-1s 对胰岛素样生长因子有重要的调节作用, 对肝细胞再生有正负两方面的调节作用[28]. Lee et al [12]认为 IGFBP-1s mRNA 的表达与肝细胞蛋白质合成功能相一致, mRNA 表达的峰值在部分肝切除术后 2-3 h, IGFBP-1s 表达的增加对于调节胰岛素样生长因子对肝细胞代谢和生长的影响将起重要作用. 我们的结果显示: 与对照组比较, 肝细胞 IGFBP-1s mRNA 的表达含量低, 从片上来看, 隐约可见, 术后 6 h 点相对较高. KC IGFBP-1s mRNA 未见表达. 说明肝硬变大鼠术后肝细胞 IGFBP-1s mRNA 的表达抑制, 肝细胞代谢功能明显受损.

在细胞增生过程中, PCNA 主要出现在细胞周期的 S 期, 他与 DNA 合成, 胸腺嘧啶激酶活性有密切关系[29-31]. 与对照组比较, 肝细胞 PCNA mRNA 的表达在术后 6 h 其含量达到最低点, 明显受抑制, 在术后 24-48 h 期间达到高峰. 与肝细胞有所不同, KC 其 PCNA mRNA 的表达轻度增高后, 逐渐下降, 至术后 1 wk 达到高峰.

我们认为, HGF 和 TGF- mRNA 表达与肝硬变大鼠的肝细胞再生密切相关, 而 TGF- 是肝细胞再生中最重要的物质. IGFBP-1s mRNA 表达降低反应了肝

硬变大鼠术后肝细胞代谢明显受损, 而 PCNA mRNA 表达可提示肝细胞增生能力. 在肝细胞再生过程中, 细胞因子相互依赖, 相互作用, 共同推动肝细胞再生.

4 参考文献

- 1 Fausto N. Liver regeneration. *J Hepatol* 2000;32(Suppl 1):19-31
- 2 陈平, 韩本立, 李昆, 段恒春. 枯否细胞在肝硬变大鼠肝叶部分切除术后肝细胞再生过程中的双相调节作用. *中华实验外科杂志* 1998; 15:347-349
- 3 Court FG, Wemyss-Holden SA, Dennison AR, Maddern GJ. The mystery of liver regeneration. *Br J Surg* 2002;89:1089-1095
- 4 Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration. *Science* 1997;276:60-66
- 5 Kountouras J, Boura P, Lygidakis NJ. Liver regeneration after hepatectomy. *Hepatogastroenterology* 2001;48:556-562
- 6 Tilg H. Cytokines and liver diseases. *Can J Gastroenterol* 2001; 15:661-668
- 7 陈平, 李昆, 董家鸿. 肝硬变大鼠肝部分切除动物模型的制作及评价. *第三军医大学学报* 2002;24:488-490
- 8 Armbrust T, Nordmann B, Kreissig M, Ramadori G. C1Q synthesis by tissue mononuclear phagocytes from normal and from damaged rat liver: up-regulation by dexamethasone, down-regulation by interferon gamma, and lipopolysaccharide. *Hepatology* 1997;26:98-106
- 9 Webber EM, FitzGerald MJ, Brown PI, Bartlett MH, Fausto N. Transforming growth factor-alpha expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor-alpha and hepatocyte growth factor. *Hepatology* 1993;18:1422-1431
- 10 Lee DC, Rose TM, Webb NR, Todaro GJ. Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor-alpha. *Nature* 1985;313:489-491
- 11 Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Zhang L, Kaneda Y, Ogihara T, Dzau VJ. Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8474-8478
- 12 Lee J, Greenbaum L, Haber BA, Nagle D, Lee V, Miles V, Mohn KL, Bucan M, Taub R. Structure and localization of the IGFBP-1 gene and its expression during liver regeneration. *Hepatology* 1994;19:656-665
- 13 J.萨姆布鲁克, EF.弗里奇, T.曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 第2版. 科学出版社, 1996:362-371
- 14 Grunnet N, Peng X, Tygstrup N. Growth factors and gene expression in cultured rat hepatocytes. *J Hepatol* 1999;31:117-122
- 15 Diehl AM. Liver regeneration. *Front Biosci* 2002;7:301-314
- 16 Kaibori M, Inoue T, Sakakura Y, Oda M, Nagahama T, Kwon AH, Kamiyama Y, Miyazawa K, Okumura T. Impairment of activation of hepatocyte growth factor precursor into its mature form in rats with liver cirrhosis. *J Surg Res* 2002;106:108-114
- 17 Tomiya T, Ogata I, Fujiwara K. Transforming growth factor alpha levels in liver and blood correlate better than hepatocyte growth factor with hepatocyte proliferation during liver regeneration. *Am J Pathol* 1998;153:955-961
- 18 Takeishi T, Hirano K, Kobayashi T, Hasegawa G, Hatakeyama K, Naito M. The role of Kupffer cells in liver regeneration. *Arch Histol Cytol* 1999;62:413-422
- 19 Pediaditakis P, Lopez-Talavera JC, Petersen B, Monga SP, Michalopoulos GK. The processing and utilization of hepatocyte growth factor/scatter factor following partial hepatectomy in the rat. *Hepatology* 2001;34:688-693
- 20 Masson S, Daveau M, Francois A, Bodenat C, Hiron M, Teniere P, Salier JP, Scotte M. Up-regulated expression of HGF in rat liver cells after experimental endotoxemia: a potential pathway for enhancement of liver regeneration. *Growth Factors* 2001;18:237-250
- 21 Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Pediaditakis P, Johnson C, Bell A, Michalopoulos GK, Zarnegar R. A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell* 2002;9: 411-421
- 22 Ogura Y, Hamanoue M, Tanabe G, Mitsue S, Yoshidome S, Nuruki K, Aikou T. Hepatocyte growth factor promotes liver

- regeneration and protein synthesis after hepatectomy in cirrhotic rats. *Hepatogastroenterology* 2001;48:545-549
- 23 Enami Y, Kato H, Murakami M, Fujioka T, Aoki T, Niiya T, Murai N, Ohtsuka K, Kusano M. Anti-transforming growth factor-beta1 antibody transiently enhances DNA synthesis during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2001; 8: 250-258
- 24 Tomiya T, Hayashi S, Yanase M, Umeda N, Tani M, Yamada S, Masaki N, Ogata I, Fujiwara K. Serum transforming growth factor-alpha level can be a parameter for evaluating liver regeneration after partial hepatectomy in patients with liver cancer. *Semin Oncol* 1997;24(Suppl 6):S6-14-S6-17
- 25 Stolz DB, Mars WM, Petersen BE, Kim TH, Michalopoulos GK. Growth factor signal transduction immediately after two-thirds partial hepatectomy in the rat. *Cancer Res* 1999;59:3954-3960
- 26 Hashimoto M, Kothary PC, Eckhauser FE, Raper SE. Treatment of cirrhotic rats with epidermal growth factor and insulin accelerates liver DNA synthesis after partial hepatectomy. *J Gastroenterol Hepatol* 1998;13:1259-1265
- 27 Masson S, Daveau M, Hiron M, Lyoumi S, Lebreton JP, Teniere P, Scotte M. Differential regenerative response and expression of growth factors following hepatectomy of variable extent in rats. *Liver* 1999;19:312-317
- 28 Skrtic S, Wallenius K, Sjogren K, Isaksson OG, Ohlsson C, Jansson JO. Possible roles of insulin-like growth factor in regulation of physiological and pathophysiological liver growth. *Horm Res* 2001;55(Suppl 1):1-6
- 29 Moriuchi A, Hirono S, Ido A, Ochiai T, Nakama T, Uto H, Hori T, Hayashi K, Tsubouchi H. Additive and inhibitory effects of simultaneous treatment with growth factors on DNA synthesis through MAPK pathway and G1 cyclins in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;280:368-373
- 30 Alhonen L, Rasanen TL, Sinervirta R, Parkkinen JJ, Korhonen VP, Pietila M, Janne J. Polyamines are required for the initiation of rat liver regeneration. *Biochem J* 2002;362:149-153
- 31 Takasaki Y, Kogure T, Takeuchi K, Kaneda K, Yano T, Hirokawa K, Hirose S, Shirai T, Hashimoto H. Reactivity of anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) murine monoclonal antibodies and human autoantibodies to the PCNA multiprotein complexes involved in cell proliferation. *J Immunol* 2001;166:4780-4787

世界胃肠病学杂志英文版获得第二届国家期刊奖百种重点期刊

本报讯 为了进一步繁荣期刊出版事业, 2002年9月, 经中共中央宣传部同意, 新闻出版总署决定举办第二届国家期刊奖评选活动. 经过反复审核, 全国共推荐出参评科技期刊522种. 这些参评期刊经过评选办公室的参评资格审查、出版规范审查、广告内容审查后, 由专家组和评选工作委员会进行评选. 2002年12月初产生评选入围期刊, 并将初评结果在《光明日报》、《科技日报》、《中国新闻出版报》和《中国图书商报》公示, 接受全社会的监督, 最终评出国家期刊奖科技类30名, 国家期刊奖提名奖50名, 国家期刊奖百种重点期刊99名. 世界胃肠病学杂志英文版(World Journal of Gastroenterology) 获得第二届国家期刊奖百种重点期刊, 并荣获获奖证书、奖杯和获奖徽标.

国家期刊奖是期刊业中最权威的、也是最具影响的奖项. 我们衷心感谢全体编委及作者、读者对世界胃肠病学杂志英文版的支持, 希望在今后能继续得到大家的关心爱护和大力支持, 争取更大的成绩.