

他克莫司对大鼠减体积肝移植后肝再生的影响

秦建伟, 杨广顺, 杨 宁, 李齐根

(第二军医大学东方肝胆外科医院肝外一科, 上海 200438)

[摘要] **目的:**观察他克莫司对大鼠减体积肝移植后肝再生的影响。**方法:**建立大鼠部分肝(65%)移植模型,并随机分为对照组、他克莫司大剂量组($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和他克莫司小剂量组($0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),每组各24只。受体于术前3d起肌注给药,每天1次,直至术后。观察术后第1、2、3、5天肝细胞有丝分裂指数(MI)、增殖细胞核抗原标记指数(PCNA LI),速率法检测血清胆红素(TB)、谷丙转氨酶(ALT)等指标。**结果:**肝移植术后的肝细胞有丝分裂的高峰期出现在术后48h,他克莫司显著提高了大鼠减体积肝移植术后48h MI及PCNA LI($P < 0.05$, $P < 0.01$);大剂量实验组术后48h PCNA LI高于小剂量组($P < 0.05$);两种剂量组的TB、ALT没有明显改变。**结论:**他克莫司对大鼠减体积肝移植后肝再生有促进作用,且该作用有剂量依赖性,同时肝脏毒性较小。

[关键词] 他克莫司;减体积肝移植;肝再生

[中图分类号] R 657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)08-0855-03

Effects of tacrolimus on liver regeneration after reduced-size liver transplantation in rats

QIN Jian-Wei, YANG Guang-Shun, YANG Ning, LI Qi-Gen (No. 1 Hepatic Surgery Department, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the effects of tacrolimus on liver regeneration after an isogeneic orthotopic reduced-size hepatic transplantation in rats. **Methods:** Wistar rats, weighing 300-350 g, were subjected to 65% partial hepatic transplantation. Group A had no further treatment; group B and group C received tacrolimus (0.1 and $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ respectively) through intramuscular injection from 3 d before the operation until the animals were killed 24, 48, 72, and 120 h after surgery. Blood samples were taken for measurements of plasma ALT and TB. Liver biopsies were analyzed for determination of mitotic index. **Results:** Tacrolimus significantly augmented proliferating cell nuclear antigen (PCNA) labeling index and mitotic index of hepatocytes after transplantation ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and reached their peak 48 h after transplantation. The increase of PCNA labeling index in group B was greater than that in group C 48 h after operation ($P < 0.05$). No significant differences of serum ALT and TB levels were observed between group B and group C. **Conclusion:** Tacrolimus can dose-dependently augment liver regeneration after reduced-size hepatic transplantation in rats with low hepatotoxicity.

[KEY WORDS] tacrolimus; reduced-size liver transplantation; hepatic regeneration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 855-857]

肝移植过程中,由于供肝受到不同程度的损伤,在移植术后会发生肝再生作用。在肝部分移植术后,这种再生作用具有重要意义。他克莫司是常规应用于临床肝移植的强有力免疫抑制剂。研究^[1]证实他克莫司对肝部分切除术后大鼠的肝再生具有刺激作用,但其对于肝移植后肝再生的作用尚缺乏研究。本研究的目的是观察他克莫司对大鼠减体积肝移植术后肝再生的影响,以及这种作用与剂量之间的关系,为临床肝移植术后他克莫司的应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂 雄性近交系 Wistar 大鼠,质量 300 g~350 g,由中科院上海动物中心提供。正常条件下饲养,自由进食水。药物他克莫司针剂由日本藤泽公司香港分公司提供。

1.2 动物模型的制备 在经典 Kamada 二袖套法大鼠原位肝移植^[2]基础上,切除供肝左外叶及尾状叶,建立大鼠部分肝(65%)移植模型。所有操作均在 13:00~17:00 之间进行,以避免昼夜节律对肝再生造成的影响。受体术前 24 h 开始禁食,不禁水,术后 3 d 内喂 10% 葡萄糖水,自由进食。

1.3 实验分组和处理 所有大鼠随机分为对照组、他克莫司大剂量组($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)和他克莫司小剂量组($0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。受体于术前 3 d 起肌注给药,每天 1 次,直至术后并分别于术后 1、2、3、5 d 在乙醚麻醉下处死。

1.5 标本采集与指标检测

1.5.1 残肝重/减体积前全肝质量 取得供肝后,

[作者简介] 秦建伟(1970-),男(汉族),硕士。

减体积前全肝称质量,记为G,切除左外叶及尾状叶肝脏,减体积后植入受体。取标本时,完整切除大鼠肝脏,称重为残肝质量,记为Gr。记录Gr/G的比值(该比值能粗略反映供肝再生情况)。

1.5.2 血清谷氨酸氨基转移酶(ALT)、总胆红素(TB)水平 由下腔静脉采血2ml,离心,取血清。使用7170A型全自动生化分析仪(日本日立公司),采用速率法(IFCC推荐法)测定血清ALT及TB。

1.5.3 病理学检查以及有丝分裂指数(MI)的计算 锐利刀片切取中肝叶相同部位肝组织(10 mm×5 mm×2 mm)以10%甲醛溶液固定(4~24 h),石蜡包埋切片,H-E染色后光镜下观察。光镜下计数1 000个细胞,其中双核或核分裂相细胞所占比例即为MI。它反映肝细胞有丝分裂情况。

1.5.4 增殖细胞核抗原及标记指数(PCNA LI)的检测 应用免疫组化技术(免疫组化方法采用DAKO EnVision显色系统),光镜下计数1 000个

细胞,其中PCNA阳性细胞(细胞核棕黄色染色为阳性)所占比例,即为PCNA LI。

1.6 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,各样本均数之间的两两比较采用Newman-Keuls检验。

2 结果

2.1 残肝质量/减体积前全肝质量 各组比值术后呈现逐渐上升趋势,但在各时点3组之间比值无明显差别(表1)。

2.2 ALT和TB的检测结果 血清ALT、TB反映大鼠肝移植后肝功能状况,能反映他克莫司对肝功能是否有负面影响。ALT及TB在术后第1天最高,之后呈现下降趋势,各时点上各组ALT没有显著差异(表1)。这说明大剂量组和小剂量组的他克莫司实验剂量对肝功能没有明显影响,未表现出明显肝脏毒性作用。

表1 他克莫司对大鼠减体积肝移植后各项指标的影响

Tab 1 Influence of tacrolimus on indices after reduced-size liver transplantation in rats

(n=24, $\bar{x} \pm s$)

Index	Postoperation time			
	1 d	2 d	3 d	5 d
Gr/G				
Control	0.683 7±0.039 9	0.713 1±0.035 2	0.736 9±0.039 7	0.832 9±0.038 3
0.1 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ tacrolimus	0.679 3±0.022 9	0.751 6±0.037 0	0.775 2±0.052 1	0.876 3±0.054 1
0.05 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ tacrolimus	0.703 4±0.027 8	0.714 0±0.025 4	0.738 2±0.036 4	0.870 2±0.058 1
ALT($x_B/U \cdot L^{-1}$)				
Control	414.2±59.5	187.4±56.9	124.7±37.4	46.4±11.9
0.1 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ tacrolimus	331.0±50.2	187.7±34.1	110.6±29.1	47.1±9.6
0.05 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ tacrolimus	366.7±74.5	163.5±38.8	137.3±30.1	54.8±7.1
TB($c_B/\mu mol \cdot L^{-1}$)				
Control	6.93±1.31	3.47±0.71	2.83±0.31	2.06±0.47
0.1 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ tacrolimus	6.17±1.55	3.27±0.81	2.76±0.32	1.90±0.45
0.05 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ tacrolimus	7.70±1.23	4.01±1.04	2.87±0.40	1.77±0.41
MI(%)				
Control	4.33±1.52	12.00±3.00	6.67±2.08	1.67±1.15
0.1 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ tacrolimus	6.66±2.08	21.00±4.00*	7.67±2.08	2.67±1.15
0.05 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ tacrolimus	5.33±1.52	19.67±3.50*	7.00±1.73	1.67±1.52
PCNA LI(%)				
Control	159.3±31.1	179.3±31.1	139.7±22.1	59.7±22.4
0.1 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ tacrolimus	187.3±35.6	319.3±35.2**	150.7±30.6	61.0±17.5
0.05 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹ tacrolimus	167.3±29.5	250.3±34.7*▲	149.0±23.9	74.3±18.6

*P<0.05, **P<0.01 vs control group; ▲P<0.05 vs 0.1 mg·kg⁻¹·d⁻¹ tacrolimus group

2.3 肝细胞MI结果 3组MI均于术后第2天达到高峰,之后迅速下降。高峰时大剂量组、小剂量组MI值均明显高于对照组(P<0.05);而大剂量组和小剂量组之间无显著差异。其余各时点3组MI无

显著差异。见表1。大剂量组术后第2天肝组织病理切片可见肝细胞核增大,核/质比增大,有明显的核分裂相(图1A);小剂量组术后第2天与大剂量组有相似的表现(图1B)。

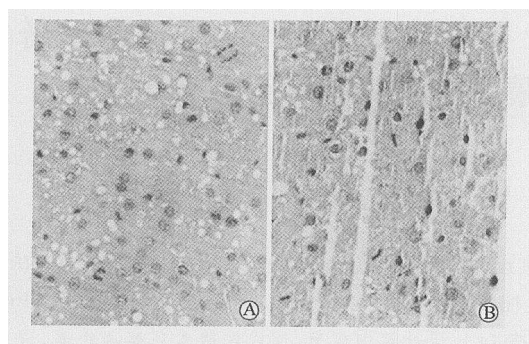


图1 术后2 d肝组织病理观察

Fig 1 Pathologic observation of liver tissue

2 d after operation(H-E, ×400)

A: $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ tacrolimus; B: $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ tacrolimus. Enlarged nucleolus and nuclear-cytoplasm ratio, and obvious karyokinesis were observed in both groups.

2.4 PCNA LI 结果 PCNA LI 的变化与 MI 相似,3 组 PCNA LI 均于术后第 2 天达到高峰,之后快速下降。高峰时期,大剂量组 PCNA LI 值最高,明显高于其余两组($P < 0.05$);小剂量组 PCNA LI 值也明显高于对照组($P < 0.05$)。其他各时点 3 组 PCNA LI 无显著差异。见表 1。

3 讨论

研究人员很早就发现免疫抑制剂与肝再生之间存在联系^[3]。近年来的研究发现 CyA 能显著增强大鼠肝部分切除及肝移植后肝细胞的有丝分裂^[3,4],他克莫司也能明显提高大鼠肝部分切除术后肝细胞 MI^[1],但他克莫司对肝移植术后肝脏再生的影响尚未见报道。本实验表明,他克莫司对大鼠减体积肝移植后肝再生也同样具有明显的促进作用,能显著促进术后肝细胞有丝分裂。这与大鼠肝部分切除术后的结果^[4,5]相类似。本组实验没有观察到他克莫司对供肝质量的直接促进作用,可能的原因是观察的时间不够长,或者由于在称质量时,供肝包含的水分、血液等因素造成的系统误差引起的。国外学者采用“小供肝、大受体”大鼠肝移植模型观察,发现供肝重量在术后第 4 天起出现显著性增加^[6]。

国外有关大鼠肝切除术后肝再生的动物实验发现他克莫司的促肝再生作用存在剂量依赖性,Oka-mura 等^[7]在研究中采用 $0.025 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 及 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 等不同剂量,结果发现随着他克莫司剂量的增大,肝再生的程度也逐渐变强。他克莫司剂量在 $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 时,促肝再生作用最明显^[8],而动物实验中这样的剂量已经能完全表现出免疫抑制作

用。本实验 PCNA LI 的结果显示,他克莫司的促肝再生作用具有剂量依赖性,大剂量组的促肝再生作用强于小剂量组。说明他克莫司在免疫抑制的剂量下同时也能表现出明显的促进肝再生作用。这也许对于临床肝移植,尤其是对于肝部分移植术有着重要的意义。

他克莫司促进肝再生的机制尚不明确。目前存在两种解释^[9,10]:一种理论认为他克莫司是通过抑制 T 细胞和 NK 细胞来影响肝再生的;另一种理论认为他克莫司是通过非免疫途径来促进肝再生,这是因为有人用裸鼠(T 细胞缺乏)模型来研究他克莫司对肝再生的影响,发现结果与正常大鼠相同。总之,他克莫司的促肝再生机制尚待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Bendahan J, Tyler M, Lotz Z. The effect of administration of FK506 on delayed regeneration in flushed partially hepatectomized livers[J]. *Transplantation*, 1994, 57(5): 655-658.
- [2] Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat[J]. *Surgery*, 1983, 93(1 Pt 1): 64-69.
- [3] Thomford NR, Zachman JO, Patti RW. Effect of azathioprine on hepatic regeneration in rats[J]. *Am Surg*, 1971, 37(6): 366-368.
- [4] Kikuchi N, Yamaguchi Y, Mori K, et al. Liver regeneration after orthotopic reduced-size hepatic transplantation in the rat[J]. *Hepatogastroenterology*, 1994, 41(2): 170-173.
- [5] Polak W, Szyber P, Patrzalek D. Roznice w stopniu odrostu watroby w zalezności od stosowanego leku immunosupresyjnego u szczurow po czesciowej hepatektomii. [The differences in liver regenerative rate after partial hepatectomy in rats treated with selected immunosuppressants] [J]. *Pol Merkurisuz Lek*, 1999, 6(32): 70-72.
- [6] Francavilla A, Zeng Q, Polimeno L, et al. Small-for-size liver transplanted into larger recipient: a model of hepatic regeneration[J]. *Hepatology*, 1994, 19(1): 210-216.
- [7] Okamura N, Tsukada K, Sakaguchi T, et al. Enhanced liver regeneration by FK506 can be blocked by interleukin-1 alpha and interleukin-2[J]. *Transplant Proc*, 1992, 24(1): 413-415.
- [8] Tanaka N, Yamamoto H, Tatemoto A, et al. Regulation of liver regeneration by interleukin-2 and its inhibitors: cyclosporine A and FK506[J]. *Int J Immunopharmacol*, 1993, 15(2): 211-218.
- [9] Francavilla A, Starzl TE, Barone M, et al. Studies on mechanisms of augmentation of liver regeneration by cyclosporine and FK506[J]. *Hepatology*, 1991, 14(1): 140-143.
- [10] Fausto N. Live regeneration [J]. *J Hepatol*, 2000, 32(1 Suppl): 19-31.

[收稿日期] 2003-12-15

[修回日期] 2004-06-02

[本文编辑] 曹 静