

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00800

西罗莫司抑制胆管缺血后代偿性增生的初步研究

吴田田, 杨广顺, 赵军*, 杨宁, 张海斌, 钟鑫平, 邵卓

第二军医大学东方肝胆外科医院胆道二科, 上海 200438

[摘要] 目的:探讨雷帕霉素对大鼠肝内胆管缺血后代偿性增生的影响。方法:雄性SD大鼠随机分配到对照组(假手术组, $n=28$),假手术+雷帕霉素组($n=28$),缺血组($n=32$),缺血+雷帕霉素组($n=32$),缺血组完全离断肝脏动脉血供,雷帕霉素处理组每日予雷帕霉素 2.0 mg/kg 灌胃,术后 1、3、7、14 d 处死动物,取肝组织行 H-E、Ki-67 染色,高倍镜视野下计数汇管区内小叶间胆管,汇管区周围小胆管, Ki-67 阳性及阴性胆管细胞,计算平均小叶间胆管及汇管区周围胆管数目(总计数胆管数目/总汇管区数目), Ki-67(+)胆管细胞/ Ki-67(-)胆管细胞比值。结果:与对照组比较,缺血组术后平均小叶间胆管数量明显增加,给予雷帕霉素后,胆管缺血大鼠术后 7、14 d 平均小叶间胆管数目减少;术后 3 d,缺血组 Ki-67 阳性与阴性胆管细胞比值达到高峰 1.59 ± 0.17 ,明显高于对照组,给予雷帕霉素后,峰值水平降低。结论:雷帕霉素影响缺血胆管上皮细胞 Ki-67 抗原表达,抑制肝内胆管代偿性增生。

[关键词] 西罗莫司;胆管;缺血;增生;Ki-67 抗原

[中图分类号] R 657.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)07-0800-04

Rapamycin inhibits compensatory bile duct growth after ischemic injury

WU Tian-tian, YANG Guang-shun, ZHAO Jun*, YANG Ning, ZHANG Hai-bin, ZHONG Xin-ping, SHAO Zhuo

Second Department of Biliary Surgery, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the impact of rapamycin on compensatory bile duct growth in response to ischemic injury. **Methods:** Male SD rats were randomly assigned to 4 groups: sham ($n=28$), sham + rapamycin (rapa, $n=28$), ischemia ($n=32$), ischemia + rapa group ($n=32$). Complete hepatic arterial deprivation was performed in the latter 2 groups; gastric lavage with rapamycin (2 mg/kg/day) was given to rats in rapa groups. Fresh liver tissues were obtained on day 1, 3, 7, and 14 postoperatively and were subjected to immunohistochemical staining (H-E, Ki-67). Interlobular bile duct within portal tract and periportal bile ductuli were counted in H-E stained sections. Ki-67 positive and negative bile duct epithelial cells were counted in Ki-67 immunolabelled sections. Average interlobular ducts, periportal duculi and ratio of Ki-67 positive epithelial cells/negative epithelial cells were calculated. **Results:** Ischemia group had obviously increased number of interlobular ducts compared to sham group. Rapamycin lavage inhibited interlobular duct increase on day 7 and day 14 postoperatively compared with ischemia group. In ischemia group Ki-67(+)/(−) ratio reached its peak level (1.59 ± 0.17) 3 days after operation, being significantly higher than that of sham group. Rapamycin decreased the peak value of Ki-67(+)/(−) ratio. **Conclusion:** Rapamycin can reduce expression of Ki-67 antigen and inhibit compensatory bile duct proliferation in response to ischemic injury.

[KEY WORDS] sirolimus; bile ducts; ischemia; hyperplasia; Ki-67 antigen

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(7):800-803]

肝脏外科领域中、手术损伤、肝脏移植、脏器保存、栓塞介入治疗都可能破坏肝脏动脉系统,影响胆管血供,导致胆管损伤。胆管增生是胆管损伤后的重要代偿性反应,利于恢复胆汁引流,改善肝内胆汁淤积^[1]。mTOR 特异性抑制剂西罗莫司的抗增殖活性是否会影响肝内胆管代偿性增生,目前未见报道。本研究通过完全离断大鼠肝脏动脉血供,建立

大鼠胆管缺血模型,观察大鼠胆管增生情况及西罗莫司对胆管增生的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雄性SD大鼠(体质量 300~400 g)购自第二军医大学动物实验中心,于第二军医大学 SPF 动物饲养中心饲养,昼夜节律,自由进食、水。所

[收稿日期] 2007-11-28 **[接受日期]** 2008-03-13

[作者简介] 吴田田, 博士生. E-mail: wuttian@yahoo.com.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-25070769, E-mail: dfgdzj@sina.com

有实验动物随机分为4组:(1)缺血组($n=32$);(2)缺血+西罗莫司组($n=32$);(3)假手术组(对照组, $n=28$);(4)假手术+西罗莫司处理组($n=28$)。

1.2 胆管缺血模型的建立 自制面罩予实验动物持续吸入乙醚,监测呼吸深度及频率,及时调整乙醚吸入量;麻醉满意后,常规安尔碘消毒上腹部,正中切口进腹(切口长约4 cm);显露肝脏,完全游离肝周围结缔组织;向头侧轻轻牵拉肝脏,显露肝门,分离肝动脉,靠近肝动脉分叉处离断结扎肝动脉;游离并横断胆总管,置入内支撑管,结扎固定;观察肝门部胆管无增粗,无胆漏,去除乙醚面罩,关腹。假手术组大鼠持续乙醚吸入麻醉,行开关腹手术。西罗莫司处理组自手术日始每日予西罗莫司2.0 mg/kg灌胃,其他组予生理盐水2 ml/kg灌胃。

1.3 组织标本的获取 各实验组于术后第1、3、7日分别处死6只实验动物,术后14 d处死全部动物(此时缺血组 $n=7$,缺血+西罗莫司组 $n=6$,对照组 $n=8$,假手术+西罗莫司组 $n=7$)。乙醚吸入麻醉,显露肝脏,切取肝脏组织,置10%中性甲醛中固定。

1.4 免疫组化检测 10%中性甲醛固定标本送第二军医大学长海医院实验病理科予石蜡包埋,切片,行H-E染色及Ki-67染色(EnVision方法,抗鼠

Ki-67一抗购自DAKO公司,按1:100稀释)。高倍镜视野下,每只实验动物H-E切片观察15~20个汇管区,分别计数汇管区内小叶间胆管、汇管区周围小胆管,计算平均小叶间胆管及汇管区周围胆管数目(总计数胆管数目/总汇管区数目)。Ki-67染色切片分别计数Ki-67阳性及阴性胆管细胞,计算阳性-阴性胆管细胞比值,即Ki-67(+)胆管细胞数/Ki-67(-)胆管细胞数。

1.5 统计学处理 采用SPSS 10.0统计学软件,结果以 $\bar{x} \pm s_x$ 表示,多个独立样本比较采用Kruskal-Wallis H 检验,两独立样本间的比较采用秩转换处理后行ONE WAY ANOVA检验, $P < 0.05$ 时认为存在统计学差异。

2 实验结果

2.1 H-E及Ki-67染色分析 术后对照组及假手术+西罗莫司组未见明显胆管增生反应,Ki-67阳性染色未见增强,而缺血组胆管增生反应明显,包括小叶间胆管的增生,汇管周围胆管增生,同时可见汇管区内小动脉的增生,汇管区出现大量Ki-67阳性胆管细胞,肝细胞Ki-67染色未见增强。缺血+西罗莫司组术后也可见胆管增生和Ki-67阳性增强(图1)。

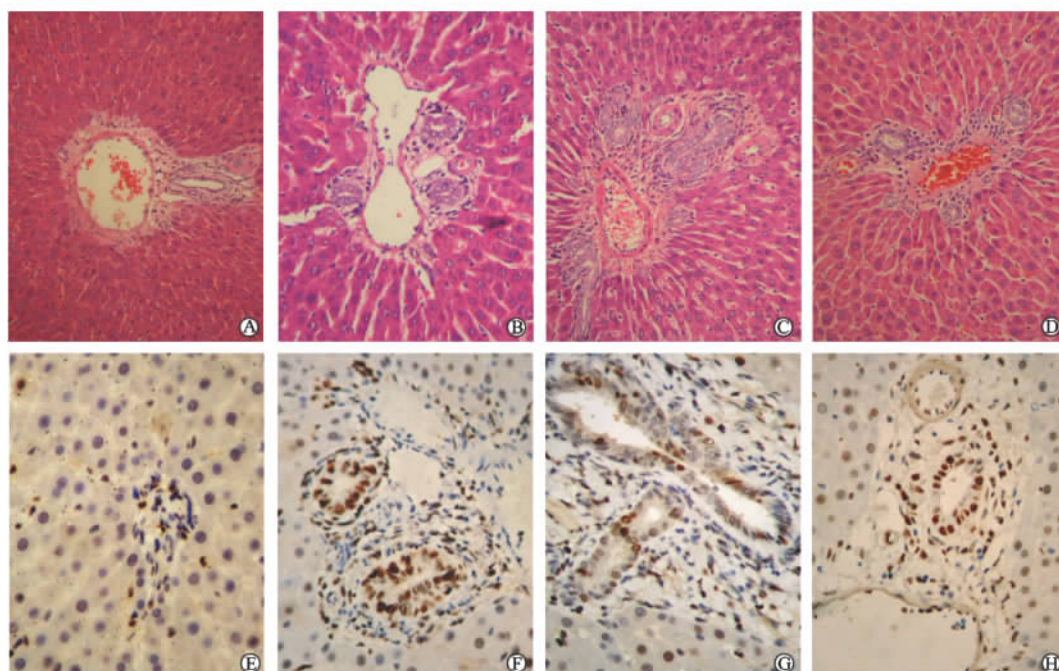


图1 术后H-E染色(A~D)及Ki-67染色(E~H)照片

Fig 1 H-E and Ki-67 immunohisto-staining results

Ischemia group exhibited obvious bile duct on day1, 3 and 7 postoperatively, including interlobular bile duct within portal area and ductuli at periphery of portal area(A-C). Proliferation in ischemia+rapamycin group was slighter than that in ischemia group(D). No obvious bile duct epithelial cells were positively stained by Ki-67 antibody in sham group(E). In ischemia group, a large amount of bile duct epithelial cells were positively stained on day 3(F) and day 7(G)postoperatively. Bile duct epithelial cells were stained positively in ischemia+rapamycin group on day 3 postoperatively, but in a relatively milder manner(H). Original magnification: $\times 200$ (A-D); $\times 400$ (E-H)

2.2 胆管计数分析

2.2.1 小叶间胆管计数 术后各时间点对照组小叶间胆管数目无明显变化($P=0.894$,图 2A)。假手术+西罗莫司组与对照组间胆管数目无明显差异(各时间点 $P>0.05$)。缺血组小叶间胆管数量术后明显增加,术后 7 d 平均小叶间胆管数量达到(4.60 ± 0.65),显著高于对照组(0.88 ± 0.06 , $P<0.001$),术后 14 d 小叶间胆管数量达到(4.94 ± 0.33),仍显著高于对照组(0.93 ± 0.04 , $P<0.001$)。术后 7d,缺血+西罗莫司组平均小叶间胆管数为(2.53 ± 0.44),明显低于缺血组($P=0.034$);术后 14 d,缺血+西罗莫司组平均小叶间胆管数仍低于缺血组($P=0.026$)。

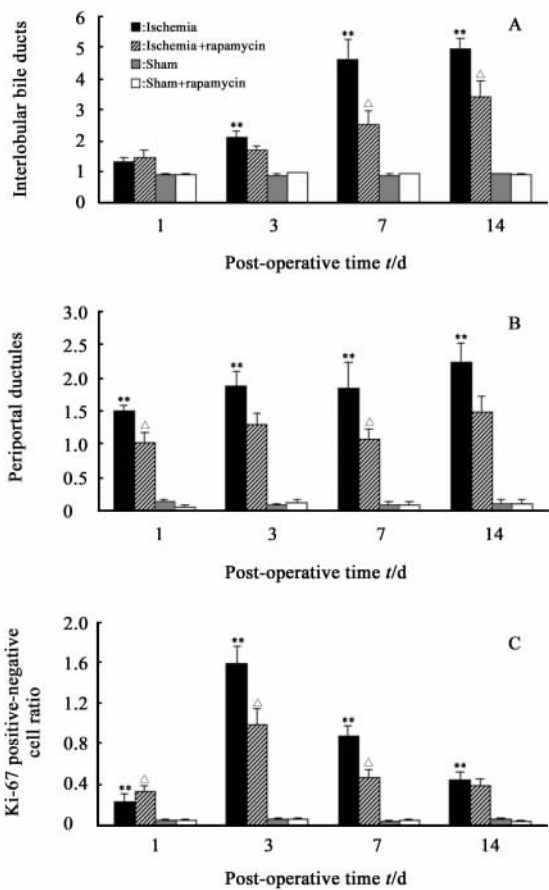


图 2 小叶间胆管计数(A)、汇管周围胆管计数(B)和 Ki-67 阳性-阴性细胞比值(C)

Fig 2 Interlobular bile duct counting(A), bile duct counting at periportal bile ductuli(B) and Ki-67 positive cell to negative cell ratio

** $P<0.001$ vs sham group; $\Delta P<0.05$ vs ischemia group. 1,3,7 d, $n=32$ for ishchemia group, $n=32$ for ischemia+rapamycin group, $n=28$ for sham group, $n=28$ for sham+rapamycin group; 14 d: $n=7, 6, 8$ and 7 , respectively; $\bar{x}\pm s$

2.2.2 汇管区周围胆管计数 术后对照组、假手

术+西罗莫司组汇管区周围胆管增生不明显(图 2B)。与对照组比较,缺血组术后 1、3、7、14 d 平均汇管区周围胆管数量均明显增加(P 值均 <0.001)。缺血+西罗莫司组平均汇管区周围胆管数量也有增加,各时间点平均值均低于缺血组,但仅于术后第 1、7 d 形成统计学显著差异[术后 1 d:缺血+西罗莫司组 (1.02 ± 0.15) vs 缺血组 (1.50 ± 0.08), $P=0.042$;术后 7 d:缺血+西罗莫司组 (1.07 ± 0.15) vs 缺血组 (1.84 ± 0.38), $P=0.009$]。

2.3 Ki-67 阳性-阴性胆管细胞比值 对照组术后该比值无明显变化,各时间点比较无统计学差异($P=0.253$,图 2C),缺血组术后 Ki-67 阳性-阴性胆管细胞比值明显升高,术后 3d 达到峰值(1.59 ± 0.17),明显高于对照组(0.05 ± 0.01 , $P<0.001$);缺血+西罗莫司组 Ki-67 阳性-阴性胆管细胞比值也于术后 3 d 达到峰值,但其峰值水平(0.99 ± 0.16)明显低于缺血组($P=0.002$)。

3 讨论

西罗莫司是 mTOR 的特异性抑制剂,它主要与细胞内受体 FKBP12 结合,形成 FKBP-西罗莫司复合物,该复合物与 mTOR 分子上 FRB 结构域结合,抑制 mTOR 激酶活性^[2-3],进而影响细胞增殖分化,使细胞周期停留在 G₁期,发挥抗增殖活性。作为抗排异用药,西罗莫司已经在器官移植领域得到广泛应用。最近研究发现,西罗莫司还具有抗肿瘤^[4-5]、抗肝纤维化^[6]、延缓多囊性肾病进展^[7-8]、防治冠状动脉成型术后再狭窄^[9]等药效。然而,越来越多的文献提示,西罗莫司可能导致严重的不良反应,如肺毒性^[10-11]、血管性水肿^[12],抑制边缘供肾内皮细胞的自身修复^[13]、影响受损肾小管上皮细胞的增生修复^[14]等。这表明,西罗莫司抗增殖活性既带来广阔临床应用前景,也可能导致严重的不良反应。

本实验中,H-E 染色结果显示,对照组术后未见明确胆管增生,而缺血组胆管增生明显,既包括小叶间胆管增生,也包括汇管区周围小胆管的增生,这与 Beaussier 等^[1]报道的结果一致。在增生胆管周围,还可见小动脉增生。小叶间胆管计数发现,与对照组相比缺血组术后汇管区小叶间胆管数目明显增多,术后 2 周内与时间变化呈现正相关趋势。西罗莫司处理胆管缺血大鼠后,小叶间胆管数目增加幅度下降,术后 7 d、14 d 与缺血组间表现出显著差异(P 值分别为 0.034 及 0.026),这提示:西罗莫司对胆管缺血大鼠肝内小叶间胆管的代偿性增生有抑制作用。

汇管周围胆管计数结果显示,与对照组比较,缺血组术后汇管周围小胆管数目增加,提示汇管周围小胆管也参与代偿性增生反应,促进肝内胆管系统功能的恢复。给予西罗莫司后,胆管缺血大鼠汇管周围胆管数目下降,并于术后 1、7 d 具有统计学差异。我们认为,汇管周围小胆管参与代偿性增生反应,西罗莫司对于该反应可能存在抑制作用。

Ki-67 抗原是细胞 G₁、S、G₂ 及 M 期出现的一种耐酸核抗原,半衰期约 60~90 min,在 DNA 合成过程中发挥重要作用,是调节细胞周期必不可少的组成部分,它与细胞增殖密切相关,其含量反映细胞增殖活性。细胞脱离增生期后,Ki-67 被迅速降解,故采用 Ki-67 抗原作为检测细胞增殖指标时,结果的可靠性高于半衰期长的增生细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)。本实验 Ki-67 染色结果显示,对照组术后汇管区内 Ki-67 阳性染色未见增强,缺血组术后汇管区内 Ki-67 阳性胆管细胞明显增多,同时肝细胞染色无明显增强。完全阻断肝脏动脉血供后,肝细胞仍可以获得门静脉滋养,无明显缺血表现,而胆管系统因其血供的单一性,缺血明显,代偿性增生显著,胆管上皮细胞增殖活性增强。术后 3 d 缺血组汇管区 Ki-67(+)胆管数目-胆管 Ki-67(-)胆管数目比值达到高峰,西罗莫司处理后峰值水平下降(1.59±0.17 vs 0.99±0.16, P=0.002)。这提示,西罗莫司抑制缺血后肝内胆管 Ki-67 抗原表达,影响胆管增生。

假手术+西罗莫司处理组与对照组之间胆管形态,数量及 Ki-67 抗原表达均无明显差异,提示西罗莫司仅抑制胆管的代偿性增生反应,对于正常静止期胆管上皮无明确影响。

肝内胆管血供主要来自肝动脉系统,通过胆管周围动脉丛供给^[15-16]。肝脏移植等肝脏外科手术以及介入栓塞,介入化疗等操作都可能损伤肝脏动脉系统^[17],造成肝内胆道系统的缺血,缺氧,导致胆管损伤。胆管损伤后上皮细胞出现代偿性增生反应,对于代偿肝内胆管系统功能不全,促进胆汁引流有着重要的意义^[1]。此时应用西罗莫司,一定程度上抑制了胆管上皮细胞 Ki-67 抗原表达,影响肝内胆管代偿性增生反应,不利于胆道系统功能的恢复,还可能加重肝内胆汁淤积。

[参考文献]

[1] Beaussier M, Wendum D, Fouassier L, Rey C, Barbu V, Lasnier E, et al. Adaptive bile duct proliferative response in experimental bile duct ischemia[J]. *J Hepatol*, 2005, 42: 257-265.
[2] Sabatini D M, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder

S H. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs [J]. *Cell*, 1994, 78: 35-43.
[3] Sabers C J, Martin M M, Brunn G J, Williams J M, Dumont F J, Wiederrecht G, et al. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 815-822.
[4] Kahan B D, Yakupoglu Y K, Schoenberg L, Knight R J, Katz S M, Lai D, et al. Low incidence of malignancy among sirolimus/cyclosporine-treated renal transplant recipients [J]. *Transplantation*, 2005, 80: 749-758.
[5] Kauffman H M, Cherikh W S, Cheng Y, Hanto D W, Kahan B D. Maintenance immunosuppression with target-of-rapamycin inhibitors is associated with a reduced incidence of de novo malignancies [J]. *Transplantation*, 2005, 80: 883-889.
[6] Neef M, Ledermann M, Saegesser H, Schneider V, Reichen J. Low-dose oral rapamycin treatment reduces fibrogenesis, improves liver function, and prolongs survival in rats with established liver cirrhosis [J]. *J Hepatol*, 2006, 45: 786-796.
[7] Tao Y, Kim J, Schrier R W, Edelstein C L. Rapamycin markedly slows disease progression in a rat model of polycystic kidney disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 46-51.
[8] Wahl P R, Serra A L, Le Hir M, Molle K D, Hall M N, Wuthrich R P. Inhibition of mTOR with sirolimus slows disease progression in han:Sprd rats with autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD) [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2006, 21: 598-604.
[9] Woods T C, Marks A R. Drug-eluting stents [J]. *Annu Rev Med*, 2004, 55: 169-178.
[10] Rehm B, Keller F, Mayer J, Stracke S. Resolution of sirolimus-induced pneumonitis after conversion to everolimus [J]. *Transplant Proc*, 2006, 38: 711-713.
[11] Vlahakis N E, Rickman O B, Morgenthaler T. Sirolimus-associated diffuse alveolar hemorrhage [J]. *Mayo Clin Proc*, 2004, 79: 541-545.
[12] Wadei H, Gruber S A, El-Amm J M, Garnick J, West M S, Granger D K, et al. Sirolimus-induced angioedema [J]. *Am J Transplant*, 2004, 4: 1002-1005.
[13] Pellé G, Xu Y, Khoury N, Mougnot B, Rondeau E. Thrombotic microangiopathy in marginal kidneys after sirolimus use [J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, 46: 1124-1128.
[14] Smith K D, Wrenshall L E, Nicosia R F, Pichler R, Marsh C L, Alpers C E, et al. Delayed graft function and cast nephropathy associated with tacrolimus plus rapamycin use [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 1037-1045.
[15] Gaudio E, Onori P, Pannarale L, Alvaro D. Hepatic microcirculation and peribiliary plexus in experimental biliary cirrhosis: A morphological study [J]. *Gastroenterology*, 1996, 111: 1118-1124.
[16] Saxena R, Theise N D, Crawford J M. Microanatomy of the human liver-exploring the hidden interfaces [J]. *Hepatology*, 1999, 30: 1339-1346.
[17] Batts K P. Ischemic cholangitis [J]. *Mayo Clin Proc* 1998, 73: 380-385.