

文章编号:1005-6947(2004)02-0104-03

· 实验研究 ·

# 趋化因子 MIP-2 在大鼠肝缺血/再灌注损伤后的表达

梁法生<sup>1</sup>, 宋继昌<sup>2</sup>, 高英堂<sup>2</sup>, 张志尧<sup>2</sup>, 张文<sup>2</sup>, 刘丽川<sup>2</sup>

(1. 青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院 肝胆外科, 山东 烟台 264000; 2. 卫生部人工细胞工程技术研究中心, 天津 300170)

**摘要:**目的 研究趋化因子巨噬细胞炎性蛋白-2(MIP-2)在肝缺血/再灌注损伤中(I/R)的作用。方法 32只大鼠随机分为4组,每组8只。即假手术(对照组),部分肝脏缺血90min再灌注3,9,24h组。用RT-PCR法检测肝组织中MIP-2的mRNA表达,ELISA法测定血浆中MIP-2蛋白表达,荼酚AS-D氯醋酸盐酯酶特染技术检测肝组织内中性粒细胞浸润,并测定丙氨酸转氨酶(ALT)。结果 缺血再灌注肝组织中MIP-2 mRNA表达高于非缺血肝组织( $P < 0.01$ ),9h组高于3h组( $P < 0.01$ ),24h组高于9h组( $P < 0.01$ );MIP-2血浆蛋白表达、肝内中性粒细胞浸润、ALT也与MIP-2 mRNA呈一致性的变化。MIP-2 mRNA表达、血浆MIP-2蛋白水平与肝组织中中性粒细胞浸润呈正相关,( $r = 0.88$ 和 $0.83$ ,  $P < 0.01$ )。结论 MIP-2在大鼠肝缺血/再灌注损伤中作为中性粒细胞的趋化因子之一起着重要的上调作用。

**关键词:**肝/血液供给;再灌注损伤;趋化因子;巨噬细胞

**中图分类号:**R392.12;R619.9

**文献标识码:**A

## Expression of macrophage inflammatory protein-2 in liver injury induced by ischemia and reperfusion in rat

LIANG Fa-sheng<sup>1</sup>, SONG Ji-chang<sup>2</sup>, GAO Ying-tang<sup>2</sup>, ZHANG Zhi-yao<sup>2</sup>, ZHANG Wen<sup>2</sup>, LIU Li-chuan<sup>2</sup>

(1. Department of Hspatobiliary Surgery, Yantai Yuhuangding Hospital, Qingdao Medical University, Yantai, Shandong 264000, China; 2. Artificial Cell Engineering & Technology Research Center of Health Ministry, Tianjin 300170, China)

**Abstract:** **Objective** To study the expression and effect of macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) in liver injury induced by ischemia/reperfusion (I/R). **Methods** Thirty-two rats were randomly divided into 4 groups (8 rats in each group): false operation (control) group and 3, 9, 24 hours reperfusion group. The expression of MIP-2 mRNA in hepatic tissue, MIP-2 protein in plasma, the neutrophil infiltration in liver tissue and serum ALT were measured. **Results** The expression of MIP-2 mRNA in the ischemic tissue was significantly higher than that in nonischemic tissue ( $P < 0.01$ ), and was significantly higher in 9 hours reperfusion group than that in 3 hours reperfusion group ( $P < 0.01$ ); significantly higher in 24 hours reperfusion group than that in 9 hours reperfusion group ( $P < 0.01$ ). The level of plasma MIP-2 protein, the neutrophil infiltration in liver, the degree of liver injury had the similar changes of MIP-2 mRNA. The expression of MIP-2 mRNA in liver ischemia tissue and the level of plasma MIP-2 protein had positive correlation with neutrophil infiltration in liver tissue ( $P < 0.01$ ). **Conclusions** The results suggeste that MIP-2, one of the neutrophil chemotactic factors, plays an important role in the liver injury induced by I/R in rats.

**Key words:** LIVER/blood supply; REPERFUSION INJURY; CHEMDTACTIC FACTORS, MACROPHAGE

**CLC number:** R392.12; R619.9

**Document code:** A

收稿日期:2003-04-14; 修订日期:2003-10-13。

作者简介:梁法生(1959-),男,河北阳原人,青岛大学医学院附属烟台毓璜顶医院副主任医师,主要从事肝胆方面的研究。

中性粒细胞在肝缺血/再灌注(I/R)损伤中起重要作用。以往认为肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )是中性粒细胞的趋化因子,但近年的研究证实它不能直接作用于中性粒细胞,而是通过趋化因子起作用。趋化因子巨噬细胞炎性蛋白-2(macrophage inflammatory protein-2, MIP-2)对中性粒细胞具有趋化作用<sup>[1]</sup>,本实验研究 MIP-2 在肝 I/R 后的表达,旨在了解 MIP-2 在肝 I/R 损伤中是否起调节作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物与分组

Wistar 大鼠 32 只,雄性,体重 200~380g,随机分为 4 组,每组 8 只,即假手术对照组及缺血再灌注 3,9,24 h 组,并将 I/R 各组未行 I/R 的肝脏作为自身对照。

### 1.2 模型建立

动物用混合麻醉,即肌注氯胺酮 100mg/kg,吸入少量乙醚维持,由阴茎背静脉注入肝素 200U/kg,切开腹部,将供应肝中叶、左叶、左外侧叶的肝动脉、门静脉、胆管用微血管夹阻断,而不阻断供应肝右叶、右外侧叶及尾状叶的动、静脉及胆管。待肝叶缺血达 90 min 后再次开腹移去血管夹后关腹,并给予乳酸林格液 20ml/kg,以补充液体的丢失,假手术组术前肝素化,未结扎血管,余操作相同;于再灌注 3,9,24 h 分别处死动物取血及肝组织标本。

### 1.3 观察指标和方法

1.3.1 血浆 MIP-2 蛋白表达 用酶联免疫吸附试验(ELISA)法(试剂盒采用 Biosource International Immunoassay Kit Rat MIP-2)

1.3.2 肝组织中 MIP-2 mRNA 表达 用逆转录-多聚酶联反应(RT-PCR)半定量法。MIP-2 和  $\beta$ -actin 引物由北京赛百盛生物工程公司合成,PAGE 纯化。采用异硫氰酸胍一步法提取 RNA;引物序列:

MIP-2: M<sup>1</sup> 下游引物 5'-GGCACATCAGG-TACGATCCAG-3'; M<sup>2</sup> 上游引物 5'-ACCCTGCAAGGGTTGACTTC-3';扩增片段大小为 287bp。 $\beta$ -actin: M<sup>1</sup> 下游引物 5'-CTCATAGATGGGCACAGTGTG-3'; M<sup>2</sup> 上游引物 5'-AACCGGTCCGCCATGTGCAAG-3';扩增片段大小为 471bp。

逆转录完成后用 PCR 扩增,条件为 94℃ 1 min,

72℃ 1 min,55℃ 1 min,29 个循环最后延伸 5 min,将 PCR 产物行 2% 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后照相,将照相底片在 Image Master VDS(一次成像摄录系统)行密度测定,MIP-2 的值用其扫描密度值与  $\beta$ -actin 扫描密度值之比来表示。

1.3.3 肝组织的中性粒细胞浸润 采用萘酚 AS-D 氯醋酸酯酶技术(试剂盒采用 Sigma 公司,表示方法为 PMN's/50HPF)。

1.3.4 血清丙氨酸转氨酶测定 采用日立全自动生化仪检测。

### 1.4 统计学处理

所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,自身对照用 *t* 检验;多组比较用方差分析 *F* 检验,并行直线相关分析。统计软件为 SPSS。

## 2 结 果

### 2.1 血浆 MIP-2 蛋白表达

缺血再灌注 3 h 后 MIP-2 开始明显升高,9 h 组是 3 h 组的 1.47 倍,24 h 组是 3 h 组的 2.69 倍(附表)。

### 2.2 肝组织中 MIP-2 mRNA 表达

缺血再灌注 3 h 缺血组 MIP-2 mRNA 开始升高,9 h 和 24 h 组继续升高;缺血组明显高于非缺血组(附表)。

### 2.3 肝组织的中性粒细胞浸润

缺血再灌注 3 h 缺血组中性粒细胞是非缺血组的 2.4 倍,9 h 和 24 h 组继续升高,24 h 缺血组是 3 h 缺血组的 3.8 倍(附表)。

### 2.4 ALT 测定

假手术组及 3,9,24 h 组 ALT 值分别为(136.13  $\pm$  14.62), (2616.37  $\pm$  262.38), (3567.37  $\pm$  278.52)和(4632.13  $\pm$  94.55)U/L。3h 组高于对照组( $P < 0.01$ ),9 h 组高于 3 h 组( $P < 0.01$ ),24 h 组高于 3,9 h 组( $P < 0.01$ )。

### 2.5 缺血肝组织中 MIP-2 mRNA 表达与血浆 MIP 蛋白表达的相关性

缺血肝组织中 MIP-2 mRNA 表达与血浆 MIP 蛋白表达呈正相关( $r = 0.83$ ,  $P < 0.01$ );且二者分别与中性粒细胞浸润呈正相关(分别为  $r = 0.88$ ,  $0.83$ ,  $P < 0.01$ )。

附表 肝组织中 MIP-2 mRNA、中性粒细胞及血浆 MIP-2 蛋白比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	大鼠数	MIP-2 mRNA		中性粒细胞(数/50HPF)		血浆 MIP-2 (pg/ml)
		缺血组织	非缺血组织	缺血组织	非缺血组织	
假手术	8	0.192 ± 0.025	0.191 ± 0.024	14.875 ± 7.568	14.875 ± 7.567	0.329 ± 0.082
I/R 3 h	8	0.591 ± 0.075 <sup>1)4)</sup>	0.217 ± 0.031	70.500 ± 35.753 <sup>1)4)</sup>	29.625 ± 18.408 <sup>1)</sup>	78.986 ± 0.445 <sup>1)</sup>
I/R 9 h	8	0.836 ± 0.047 <sup>1)2)4)</sup>	0.286 ± 0.080 <sup>1)</sup>	109.375 ± 17.792 <sup>1)2)4)</sup>	36.125 ± 13.809 <sup>1)</sup>	115.937 ± 6.679 <sup>1)2)</sup>
I/R 24 h	8	1.275 ± 0.229 <sup>1)2)3)4)</sup>	0.294 ± 0.091 <sup>1)</sup>	269.875 ± 18.696 <sup>1)2)3)4)</sup>	47.875 ± 13.851 <sup>1)2)</sup>	212.919 ± 55.474 <sup>1)2)3)</sup>

注:1)与假手术组比较  $P < 0.01$ ;2)与3 h组比较  $P < 0.01$ ;3)与9 h组比较  $P < 0.01$ ;4)与非缺血组比较  $P < 0.01$

### 3 讨论

肝的 I/R 损伤分为两个阶段,再灌注 1~3 h 时为第一阶段,再灌注 4~24 h 为后一阶段。早期阶段主要是 Kupffer 细胞激活后释放氧自由基等介质,后期则与肝内中性粒细胞浸润密切相关<sup>[2,3]</sup>。现认为 TNF- $\alpha$  是通过趋化因子诱导中性粒细胞的趋化。趋化因子分为  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚家族,除少数成员外, $\alpha$  亚家族的成员是中性粒细胞的趋化因子,MIP-2 是其中一个成员,它主要由巨噬细胞、免疫细胞及非免疫细胞产生<sup>[4]</sup>。

本研究结果显示,在大鼠缺血肝组织中 MIP-2 mRNA 呈高的表达,高于非缺血组织。在 I/R 各组中 MIP-2 mRNA 均呈高表达,且随再灌注时间的延长而增高(均  $P < 0.01$ )。血浆 MIP-2 的蛋白表达也呈相似变化。肝组织中的中性粒细胞浸润在再灌注损伤后期明显高于初期,且与 MIP-2 的变化呈正相关( $P < 0.01$ );血清 ALT 在再灌注损伤后期亦明显高于初期,说明 MIP-2 在 I/R 损伤中起重要的上调作用。在 Lentsch<sup>[1]</sup>的研究中,小鼠肝 I/R 损伤肝组织中的 MIP-2 mRNA 表达升高,用 MIP-2 抗体预先处理后,显著地减轻了肝组织的损伤。Colletti 等<sup>[4]</sup>证实了同类趋化因子 ENA-78 在大鼠 I/R 损伤中对中性粒细胞的趋化作用。本文的结果与上述结果相符。关于 MIP-2 使中性粒细胞趋化的机制,有研究<sup>[5]</sup>认为 MIP-2 可以增加黏合素在中性粒细胞上的表达,因而增加了微血管内皮细胞和中性粒细胞的相互作用。关于中性粒细胞对肝组织损伤的机制可能有:(1)激活的中性粒细胞可以释放氧自由基和蛋白酶以破坏组织;(2)激活的中性粒细胞释放许多炎性介质,如细胞因子、花生四烯酸

等代谢产物和氧化反应物,上述介质直接嵌塞在微血管;(3)正常的中性粒细胞必须变形才能通过组织中的毛细血管,包括肝窦状隙,而激活后的中性粒细胞减少了其变形的能力,增加了在毛细血管中的堵塞;(4)激活的中性粒细胞增加了细胞表面黏附分子的表达,因而增加了中性粒细胞-内皮细胞间的黏附<sup>[6]</sup>。

本研究显示,MIP-2 在大鼠 I/R 后的高表达,在 I/R 损伤中起重要的上调作用。本研究可能为防治肝 I/R 损伤提供新的思路和方法。

#### 参考文献:

- [1] Lentsch AB, Yoshidome H, Cheadle WG, *et al.* Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: Roles for macrophage inflammatory protein-2 and kupffer cells [J]. *Hepatology*, 1998, 27(2):507-512.
- [2] Colletti LM, Green ME, Burdick MD, *et al.* The ratio of ELR+ to ELR- CXC chemokines affects the lung and liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat [J]. *Hepatology*, 2000, 31(2):435-445.
- [3] Calkins CM, Bensard DD, Shames BD, *et al.* IL-1 regulates in vivo C-X-C chemokine induction and neutrophil sequestration following endotoxemia [J]. *J Endotoxin Res*, 2002, 8(1):59-67.
- [4] Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, *et al.* The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat [J]. *Hepatology* 1996, 23(3):506-514.
- [5] 梁法生, 宋继昌, 高英堂, 等. 巨噬细胞炎性蛋白-2 在大鼠原位肝移植后的表达 [J]. *中华器官移植杂志*, 2001, 22(2):91-93.
- [6] 梁法生, 张鸿飞. 巨噬细胞炎性蛋白-2 在肝脏缺血再灌注损伤中的作用 [J]. *国外医学生理病理科学与临床分册*, 2002, 22(1):98-99.