

## 白介素-11 在小鼠肝脏缺血再灌注中的作用

冯之文, 于建军, 谭龙威, 孔连宝\*

(南京医科大学第一附属医院肝移植中心, 江苏 南京 210029)

**[摘要]** **目的:**探讨白介素-11(interleukin-11, IL-11)在小鼠肝脏缺血再灌注中的作用。**方法:**将 20 只健康雄性 C57BL/6 小鼠随机分成正常对照组、假手术组、缺血再灌注组和 IL-11 处理组, 各组 5 只。采用 70% 肝脏缺血再灌注模型(缺血 1 h, 再灌注 6 h)。缺血再灌注组及 IL-11 处理组分别于术前 2 h 给予 PBS 及 IL-11 尾静脉注射。通过酶联免疫吸附试验(ELISA 法)分别测定血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、白介素-6(IL-6)、白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )水平。通过光镜观察组织学苏木精-伊红(HE)染色改变。应用反转录酶-聚合酶链反应(RT-PCR)检测肝组织 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平。**结果:**缺血再灌注组及 IL-11 处理组肝酶水平明显高于正常对照组及假手术组( $P < 0.05$ )。同时 IL-11 处理组又明显低于缺血再灌注组( $P < 0.01$ )。缺血再灌注组镜下可见大面积肝细胞水肿及少量嗜酸性变, 而 IL-11 处理组肝细胞水肿明显少于缺血再灌注组。IL-11 处理组血清及肝组织中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  表达水平明显低于缺血再灌注组( $P < 0.05$ )。**结论:**IL-11 预处理可以抑制 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的表达来减轻小鼠肝脏的缺血再灌注损伤。

**[关键词]** 肝脏; 缺血再灌注; IL-11; IL-6; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$

**[中图分类号]** R364.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)07-802-04

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160708

## Effects of interleukin-11 (IL-11) on mouse liver warm ischemia/reperfusion (WI/Rp) injury

Feng Zhiwen, Yu Jianjun, Tan Longwei, Kong Lianbao\*

(Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of IL-11 on mouse liver warm ischemia/reperfusion (WI/Rp) injury. **Methods:** A total of 20 healthy male C57BL/6 mice, weighing (22  $\pm$  3) g, were randomly divided into four main experimental groups ( $n=5$  each), including normal group, sham group, ischemia/reperfusion(I/R) group, and IL-11 pretreatment group. We chose a nonfatal model of 70% liver WI/Rp (treated with 1 h ischemia, and then 6 h reperfusion). The mice of I/R group were injected with PBS, and IL-11 pretreatment group with IL-11, at 2 h before operation. The levels of alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase (AST), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in serum were detected by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The mRNA expression of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  were examined by reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR). Histological haema (HE) stained sections were histopathologically examined using light microscopy. **Results:** The liver enzyme levels were significantly increased in the I/R and IL-11 pretreatment group, compared to those in the normal and sham group ( $P < 0.05$ ). Meanwhile, the transaminase levels in the IL-11 pretreatment group were significantly reduced compared to those in the I/R group (ALT:  $P=0.003$ , and AST:  $P < 0.001$ , respectively). Liver cell hydropic and acidophilic degeneration were increased in the I/R and IL-11 pretreatment group, compared to those in the normal and sham group. Besides, the cell hydropic and acidophilic degeneration in the IL-11 pretreatment group was significantly reduced, compared to that in the I/R group. The expressions of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of blood serum and liver tissue were reduced in the IL-11 pretreatment group, compared to those in the I/R group ( $P=0.0025$ ,  $P=0.0159$ ,  $P=0.0175$ ,  $P=0.0076$ ,  $P=0.0005$ , and  $P=0.0004$ , respectively). **Conclusions:** Pretreatment with IL-11 protects mouse livers from WI/Rp injury by suppressing the expressions of IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ .

**[Key words]** liver; ischemia/reperfusion (I/R); IL-11; IL-6; IL-1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(07):802-805]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81100318, 81270483)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: lbkong@njmu.edu.cn

肝脏缺血再灌注损伤多见于各种休克(尤其是失血性休克)及各种需要阻断肝脏血流的手术。它与肝叶切除、肝移植术后的肝功能恢复密切相关。近年来,随着肝血管瘤、肝内胆管结石、肝硬化、肝癌等疾病日益增多,行肝叶切除、肝移植等根治性手术治疗的患者也明显增加。所以,对于肝脏缺血再灌注损伤的研究有极其现实的临床意义。绝大多数肝病到肝硬化阶段都伴有明显的血小板减少。近年,白介素-11(IL-11)已被用于治疗血小板减少症<sup>[1-2]</sup>,但近期使用 IL-11 对肝脏手术的预后是否有影响并未得到证实。本实验旨在通过检测肝酶及相关炎症因子水平来探讨 IL-11 预处理对肝脏缺血再灌注的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

20 只健康雄性 C57BL/6 小鼠,体重(22 ± 3)g,由南京医科大学动物实验中心提供。

IL-11 (上海研瑾生物有限公司);反转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本);TRIzol 及白介素-6(IL-6)、白介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子α(TNF-α)、actin 引物(Invitrogen 公司,英国);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、IL-6、IL-1β、TNF-α ELISA 试剂盒(南京达科为科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组与处理

将上述小鼠随机分成正常对照组、假手术组、缺血再灌注手术组和 IL-11 处理组:①正常对照组:仅行腹腔麻醉。②假手术组:在腹腔麻醉的基础上行开腹手术。③缺血再灌注组:开腹前 2 h 尾静脉注射 PBS,在假手术组的基础上行肝脏缺血再灌注手术处理<sup>[3]</sup>,具体步骤为:术前禁食 10 h,饮水不限。水合氯醛腹腔注射麻醉。取腹部正中切口,暴露肝脏,用生理盐水棉签明确分离肝左、中叶后,使用无损伤钛夹夹闭肝左、中叶脉管主干,以实现 70%肝组织缺血,此时可见肝脏色泽明显改变。确认肝脏血供阻断成功后,临时合拢腹壁,并予生理盐水纱布覆盖,待预定缺血 1 h 后打开钛夹,随后关腹。④IL-11 处理组:手术同缺血再灌注组,术前 2 h 尾静脉注射 PBS 溶解的 IL-11。待小鼠肝脏再灌注 6 h 时,处死各组小鼠,取血及肝脏组织。部分肝脏用 4%的中性甲醛固定,苏木素-伊红(HE)染色,其余肝组织生理盐水冲洗后液氮保存。

#### 1.2.2 血清 ALT、AST、IL-6、IL-1β、TNF-α 水平测定

血液标本离心 15 min(3 000 r/min)后取血清,使用 ELISA 法测定 ALT、AST、IL-6、IL-1β、TNF-α 水平。具体方法参考试剂盒说明进行,每组实验重复 3 遍。

#### 1.2.3 组织学检测

取甲醛固定后的肝脏组织,经梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后切片。脱蜡水化后进行 HE 染色,酒精脱水后树脂封片,并且在光镜下行组织学观察拍照。

#### 1.2.4 肝组织 IL-6、IL-1β、TNF-α mRNA 表达的测定

取液氮冻存的肝组织,严格按照 TRIzol 试剂盒操作步骤提取肝组织总 RNA,测定 RNA 浓度后进行反转录。总 RNA 按照反转录体系:5×premix 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 6 μL, RNA 2 μL 配成 10 μL 体系。反应条件为 37℃ 15 min, 85℃ 5 s, 4℃ 保持。反应所得的 cDNA 可直接用于 RT-PCR。RT-PCR 反应体系为:2×SYBR 5 μL, 上下游引物各 0.2 μL, ROX 0.2 μL, cDNA primerF 0.2 μL, primerR 2 μL, ddH<sub>2</sub>O 2.4 μL。反应条件为:95℃预变性 30 s;95℃变性 5 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 45 s, 30 个循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 反应结束后,使用 ABI Prism 7000 SDS 系统进行分析,最终结果用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 来表示。每组实验重复 3 遍。

### 1.3 统计学方法

分别运用 SPSS15.0 和 Graphpad prism 5.0 软件对数据进行分析 and 储存。计量资料用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用方差分析比较组间均数差异。两两比较采用  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组血清 ALT、AST 变化

正常对照组及假手术组肝酶水平无明显差异;与前 2 组相比,缺血再灌注组、IL-11 处理组肝酶水平高,差异显著;与缺血再灌注组相比,IL-11 处理组 ALT、AST 水平明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 1)。

### 2.2 各组肝脏组织学改变

正常对照组及假手术组肝细胞排列正常,无明显水肿表现;缺血再灌注组可见大面积肝细胞水样变性(缺血、缺氧表现),另可见少量嗜酸性变;而 IL-11 处理组肝细胞水样变性较缺血再灌注组明显减少(图 2)。

### 2.3 缺血再灌注组、IL-11 处理组的血清和肝组织中 IL-6、IL-1β、TNF-α 表达量的变化

因正常对照组和假手术组血清中上述细胞因子含量极低,超出试剂盒检测范围,故本文仅比较

缺血再灌注组和 IL-11 处理组的检测结果。IL-11 处理组血清及肝组织中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的蛋白及 mRNA 表达均明显低于缺血再灌注组,差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ,图 3)。

### 3 讨论

近年来,随着肝血管瘤、肝内胆管结石、肝硬化、肝癌等疾病日益增多,行肝叶切除、肝移植等根

治性手术治疗的患者也明显增加。而肝脏缺血再灌注损伤是肝脏外科手术中无法避免的病理生理过程,对患者术后恢复和预后有着极其重要的影响。因此,减轻肝脏缺血再灌注损伤的相关实验性研究始终是有着极其重要的临床治疗指导价值。先前大量的文献表明涉及肝脏缺血再灌注损伤的机制主要包括以下几个方面:①氧自由基的损伤作用;②钙超载的损伤作用;③Kupffer 细胞激活及中性粒细胞聚集造

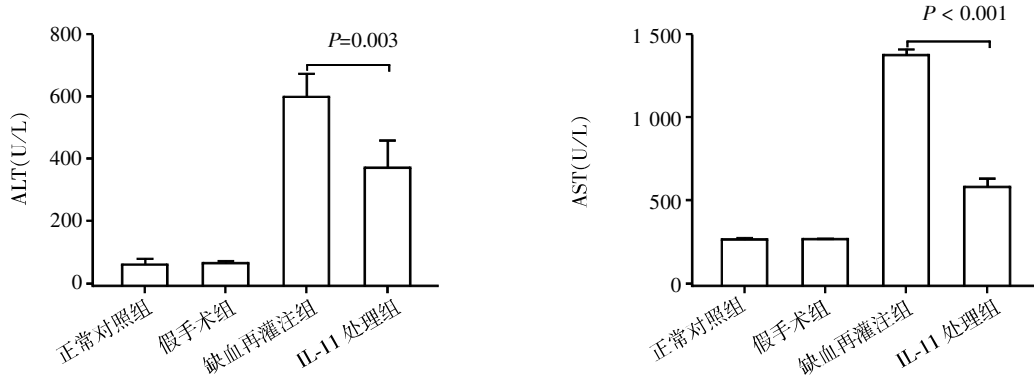
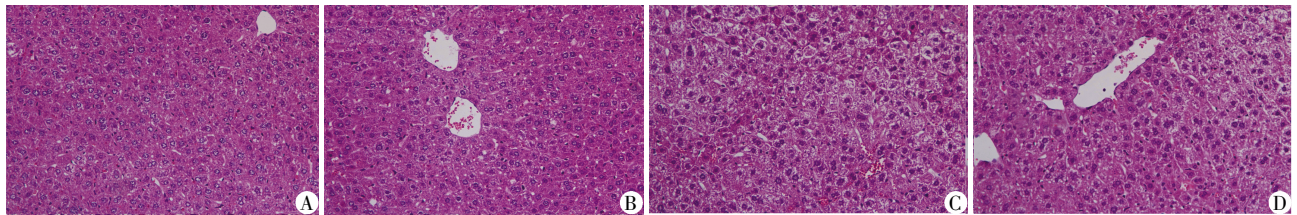


图 1 IL-11 对小鼠血清 ALT/AST 的影响

Figure 1 Effects of interleukin-11 on ALT/AST in serum of mice with liver ischemia/reperfusion injury



A:空白组;B:假手术组;C:缺血再灌注组;D:IL-11 处理组。

图 2 白介素 11 对缺血灌注操作小鼠肝脏组织病理学改变的影响(HE,  $\times 200$ )

Figure 2 Effects of interleukin-11 on histopathological changes in liver tissues of mice with liver ischemia/reperfusion injury (HE,  $\times 200$ )

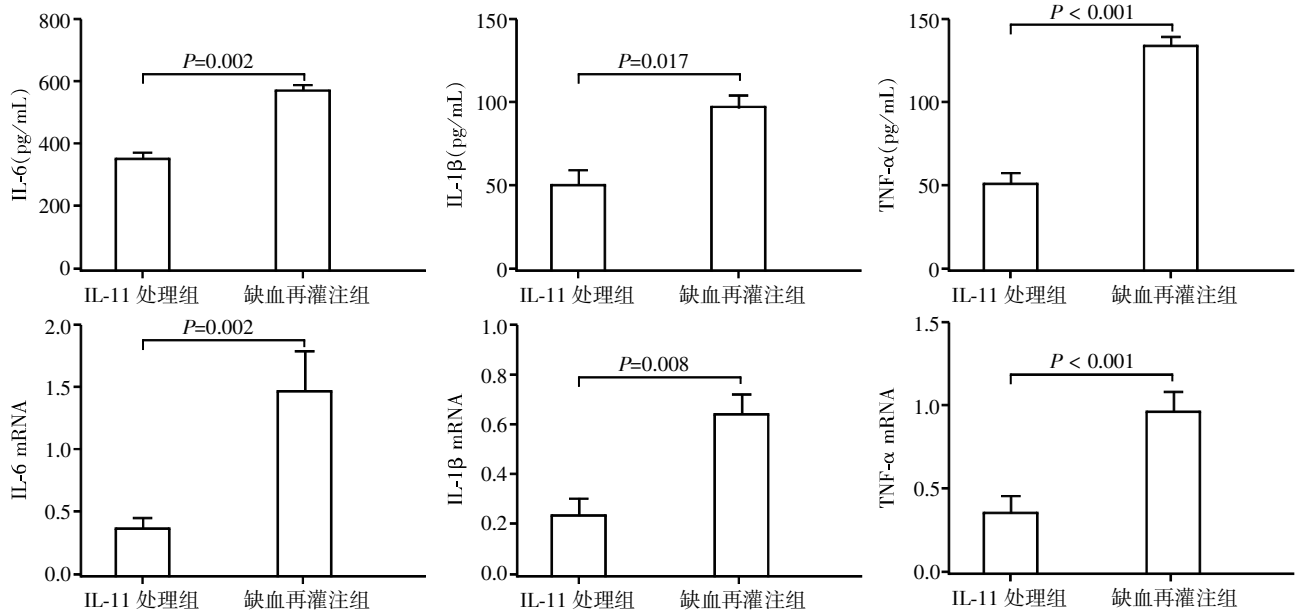


图 3 IL-11 对缺血再灌注小鼠血清及肝组织中 IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  水平的影响

Figure 3 Effects of interleukin-11 on IL-6, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in serum and liver tissues of mice with liver ischemia/reperfusion injury

成的损伤;④IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等细胞炎症因子的损伤作用<sup>[4-5]</sup>;⑤核因子 $\kappa$ B的损伤作用<sup>[6-7]</sup>;⑥游离铁离子的损伤作用;⑦Bcl2、P53、缺氧诱导因子-1(HIF-1)等基因的相关作用<sup>[8-10]</sup>。而目前人们公认缺血再灌注是许多不同机制相互作用的结果,因此其防治也就有不同的方法。众所周知,其中IL-6、IL-1 $\beta$ 以及TNF- $\alpha$ 等在肝脏I/R损伤的病理生理过程中发挥了极其重要的作用。实验表明,上述促炎因子的释放可明显增加I/R后肝细胞的损伤<sup>[4-5]</sup>。

IL-11是IL-6家族的多功能细胞因子,有潜在的抗炎作用。IL-11可以减少肠坏死、放射性损伤、缺血再灌注损伤等<sup>[11-13]</sup>。尽管目前IL-11抗炎机制并不十分清楚,但可能涉及以下几个方面:①合成热休克蛋白(HSP25)<sup>[14]</sup>;②抑制包括IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等促炎因子<sup>[15-16]</sup>;③通过调节Th1/Th2的平衡减轻炎症反应<sup>[17]</sup>。

本研究利用小鼠肝脏缺血再灌注模型,通过对小鼠进行IL-11预处理发现,IL-11可显著降低血清ALT、AST水平,减少肝细胞水样变性和嗜酸性变,说明IL-11有明确的肝脏保护作用。我们推测,IL-11既为IL-6家族的细胞因子,是否可以认为其可通过负反馈调节来抑制促炎因子IL-6的分泌。通过我们的ELISA及PCR结果证实,IL-6的表达确实有所降低,且有统计学意义。据此,结合上述IL-11可能的抗炎机制,我们推测IL-1 $\beta$ 及TNF- $\alpha$ 的表达水平可能会有类似的下降趋势。同样,本研究结果也证实了这一点。基于上述实验结果我们可以认为IL-11可以通过抑制IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 的表达水平来减轻小鼠肝脏的缺血再灌注损伤。但IL-11抑制IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 等促炎因子表达的可能通路我们并未做进一步研究,这一点我们将会在下步实验中进一步探索。

#### [参考文献]

[1] Paul SR, Bennett F, Calvetti JA, et al. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(19): 7512-7516

[2] Jiang W, Kong L, Ni Q, et al. miR-146a ameliorates liver ischemia/reperfusion injury by suppressing IRAK1 and TRAF6 [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101530

[3] Gordon MS, Mccaskill-Stevens WJ, Battiatto LA, et al. A phase I trial of recombinant human interleukin-11 (neumega rhIL-11 growth factor) in women with breast cancer receiving chemotherapy [J]. Blood, 1996, 87(9): 3615-3624

[4] Shuh M, Bohorquez H, Loss GE, et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$ : Life and death of hepatocytes during liver is-

chemia/reperfusion injury [J]. Ochsner J, 2013, 13(1): 119-130

[5] Menger MD, Richter S, Yamauchi J, et al. Role of micro-circulation in hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. Hepatogastroenterology, 1999, 46(Suppl 2): 1452-1457

[6] Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression [J]. Nature, 2006, 441(792): 431-436

[7] Yoshidome H, Kato A, Edwards MJ, et al. Interleukin-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: implications of a central role for nuclear factor kappaB [J]. Hepatology, 1999, 30(1): 203-208

[8] Kienle K, Rentsch M, Müller T, et al. Expression of BCL-k2 in liver grafts after adenoviral transfer improves survival following prolonged ischemia and reperfusion in rat liver transplantation [J]. Transplant Proc, 2005, 37(1): 439-441

[9] Thompson JD, Kornbrust DJ, Foy JW, et al. Toxicological and pharmacokinetic properties of chemically modified siRNAs targeting p53 RNA following intravenous administration [J]. Nucleic Acid Ther, 2012, 22(4): 255-264

[10] Cho H, Lee HY, Ahn DR, et al. Baicalein induces functional hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and angiogenesis [J]. Mol Pharmacol, 2008, 74(1): 70-81

[11] Orazi A, Du X, Yang Z, et al. Interleukin-11 prevents apoptosis and accelerates recovery of small intestinal mucosa in mice treated with combined chemotherapy and radiation [J]. Lab Invest, 1996, 75(1): 33-42

[12] Kuenzler KA, Pearson PY, Schwartz MZ. Interleukin-11 enhances intestinal absorptive function after ischemia-reperfusion injury [J]. J Pediatr Surg, 2002, 37(3): 457-459

[13] Du X, Liu Q, Yang Z, et al. Protective effects of interleukin-11 in a murine model of ischemic bowel necrosis [J]. Am J Physiol, 1997, 272(3 Pt 1): G545-G552

[14] Ropeleski MJ, Tang J, Walsh-Reitz MM, et al. Interleukin-11-induced heat shock protein 25 confers intestinal epithelial-specific cytoprotection from oxidant stress [J]. Gastroenterology, 2003, 124(5): 1358-1368

[15] Trepicchio WL, Bozza M, Pedneault G, et al. Recombinant human IL-11 attenuates the inflammatory response through down-regulation of proinflammatory cytokine release and nitric oxide production [J]. J Immunol, 1996, 157(8): 3627-3634

[16] Maeshima K, Takahashi T, Nakahira K, et al. A protective role of interleukin 11 on hepatic injury in acute endotoxemia [J]. Shock, 2004, 21(2): 134-138

[17] Bozza M, Bliss JL, Dorner AJ, et al. Interleukin-11 modulates Th1/Th2 cytokine production from activated CD4(+) T cells [J]. J Interferon Cytokine Res, 2001, 21(1): 21-30