

## 粒细胞集落刺激因子对小鼠急性肝衰竭的保护作用

徐旭雯, 谭德明\*, 鲁猛厚

(中南大学湘雅医院传染病研究所, 长沙 410008)

**[摘要]** 目的: 观察重组人粒细胞集落刺激因子(recombinant human granulocyte colony stimulating factor; rhG-CSF)对D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-GalN)加脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)联合诱导的小鼠急性肝衰竭的保护作用,并探讨其机制。方法:D-GalN/LPS腹腔联合注射制造小鼠急性肝衰竭模型,治疗组小鼠于造模前4 h,2 h及造模同时予以G-CSF 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 腹腔注射,观察小鼠24 h存活率。造模后6 h每组随机选择5只小鼠处死,观察肝组织损伤情况,用半定量逆转录-聚合酶链反应和Tanon Cis 3.73软件分析各组小鼠肝组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、白介素-6(IL-6)和白介素-10(IL-10)的表达情况。结果:治疗组小鼠24 h存活率明显高于对照组( $P < 0.01$ ),造模后6 h治疗组小鼠肝组织损伤明显减轻( $P < 0.05$ ),肝组织中TNF- $\alpha$ 和IFN- $\gamma$ 的mRNA表达水平明显低于对照组( $P < 0.01$ ),IL-6和IL-10的mRNA表达水平明显高于对照组( $P < 0.01$ )。结论:G-CSF对D-GalN/LPS所致的小鼠急性肝衰竭具有保护作用。

**[关键词]** 急性肝衰竭; 粒细胞集落刺激因子; 脂多糖; 细胞因子

**[中图分类号]** R575.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2006)04-0543-05

## Protective effects of granulocyte colony-stimulating factor on acute hepatic failure induced by D-galactosamine/ lipopolysaccharide in mice

XU Xu-wen, TAN De-ming\*, LU Meng-hou

(Institute of Infectious Diseases, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

**Abstract:** **Objective** To evaluate the protective effect of recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) on acute hepatic failure induced by galactosamine (D-GalN) and lipopolysaccharide (LPS) in mice, and to explore its mechanism. **Methods** The mice were intraperitoneally administered D-GalN (800 mg/kg) and LPS (10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), and then were intraperitoneally injected either saline (the control group) or rhG-CSF at 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  body weight (the therapy group) at 4 h, 2 h and 0 h before the D-GalN/LPS injection. The survival rate of the mice was estimated at 24 h after the D-GalN/LPS injection. The degree of hepatic injury was evaluated at 6 h after the D-GalN/LPS injection, and the levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-10 mRNA were simultaneously measured by semiquantitative RT-PCR. **Results** The survival rate of the therapy group was significantly higher than that of the control group (68.4% vs 20%,  $P < 0.01$ ). As compared with the control group, the degree of liver injury in the therapy group significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  mRNA in the hepatic tissue also reduced remarkably ( $P < 0.01$ , respectively), while the levels of IL-6 and IL-10 mRNA increased ( $P < 0.01$ , respectively) at 6 h after the D-GalN/LPS injection. **Conclusion** G-CSF can protect the mice from acute hepatic failure induced by D-GalN/LPS.

**Key words:** acute hepatic failure; granulocyte colony-stimulating factor; lipopolysaccharide; cytokine

[J Cent South Univ (Med Sci), 2006,31(4):0543-05]

粒细胞集落刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)是一类生物效应广泛的造血源性生长因子。研究发现,G-CSF除了促进中性粒细胞系造血细胞的增殖、分化和活化外,还具有免疫调节的作用。G-CSF可直接作用于单核细胞,并导致其释放多种细胞因子谱的改变,主要表现为由释放促炎性细胞因子向释放抑炎性细胞因子的转变,而这种免疫状态的改变可能对各种原因所致的肝损伤具有保护作用。为了探讨新的治疗措施,为临床治疗急性肝衰竭开阔新的思路,本研究旨在建立小鼠氨基半乳糖(*D*-galactosamine, *D*-GalN)联合脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)所致的急性肝衰竭模型,以观察G-CSF的保护作用并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 主要试剂和材料

基因重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF)由厦门特宝公司惠赠,*D*-GalN购自重庆医科大学化学教研室,实验前用生理盐水配置成的100 g/L的溶液,再用用1 mol/L NaOH溶液调整pH值至7.1~7.2。LPS购自美国sigma公司,Trizol购自美国Invitrogen公司,逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购自大连宝生物公司。GAPDH引物上游为5'-ACCACAGTCCATGC-CATCAC-3',下游为5'-TCCACCACCCTGTGCTGTA-3',扩增片断长度为452 bp;肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor, TNF- $\alpha$ )引物上游为5'-GGT-GCCTATGTCTCAGCCTCTT-3',下游为5'-GCTCCTC-CACTTGGTGTTT-3',扩增片断长度为225 bp;干扰素- $\gamma$ (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )引物上游为5'-TG-CATCTTGCTTTGCAGCTCTTCTCATGGC-3',下游为5'-TGGACCTGTGGTTGACCTCAAACCTTGGC-3',扩增片断长度为365 bp;白介素-6(interleukin-6, IL-6)引物上游为5'-ATGAAGTTCCTCTCTGCAAGAGACT-3',下游为5'-CACTAGTTTTGCCGAGTAGATCTC-3',扩增片断长度为628 bp。白介素-10(interleukin-10, IL-10)引物上游为5'-ACTTCCCAGTCGGC-CAGAG-3',下游为5'-AAATCGATGACAGCGCCTCA-3',扩增片断长度为292 bp。各引物均由大连宝生物公司合成。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 小鼠急性肝衰竭模型的制备

6~8周龄雄性昆明小鼠,清结级,体质量( $20 \pm 2$ ) g,购自本校试验动物中心。根据预实验结果,以*D*-GalN

(800 mg/kg)加LPS(10  $\mu$ g/kg)腹腔注射制造小鼠急性肝衰竭模型,小鼠在用药后8 h开始死亡,10 h达高峰。对照组小鼠24 h死亡率70%~80%,其肝脏病理变化接近于重型肝炎肝组织病理特征。

#### 1.2.2 动物分组与用药治疗

将100只小鼠随机分为对照组、G-CSF 50  $\mu$ g/kg治疗组、G-CSF 150  $\mu$ g/kg治疗组、G-CSF 300  $\mu$ g/kg治疗组和G-CSF 600  $\mu$ g/kg治疗组,每组20只。各治疗组于造模前4 h,2 h和造模同时分别给予rhG-CSF 0.2 mL腹腔注射,对照组于同一时间点予生理盐水0.2 mL腹腔注射。观察不同剂量的G-CSF对小鼠存活率的影响,以选择最佳治疗剂量。

根据以上不同剂量的G-CSF对小鼠存活率的影响的实验结果,选择rhG-CSF 300  $\mu$ g/kg为治疗剂量。将75只小鼠随机分为正常组、对照组和G-CSF治疗组,每组25只。治疗组于造模前4 h,2 h和造模同时分别给予rhG-CSF 0.2 mL腹腔注射,对照组于同一时间点予生理盐水0.2 mL腹腔注射。正常组在所有相应的时间点均予生理盐水0.2 mL腹腔注射。GalN/LPS腹腔注射后6 h,每组随机选取5只小鼠,以2%戊巴比妥腹腔注射麻醉,断颈处死,无菌取肝组织约100 mg,用于提取总RNA,另取小块肝脏标本,福尔马林固定,石蜡包埋5  $\mu$ m切片,HE染色。剩余20只小鼠用于24 h存活率的观察。

#### 1.2.3 RT-PCR法检测肝组织中TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-6和IL-10的表达情况

肝组织匀浆,按Trizol说明书抽提总RNA,取RNA 1  $\mu$ g,加鸟类成髓细胞性白血病病毒反转录酶(Avian myeloblastosis virus reverse transcriptase, AMV)42  $^{\circ}$ C逆转录,将逆转录产物用于PCR反应。反应条件:94  $^{\circ}$ C 5 min, 94  $^{\circ}$ C 30 s,52  $^{\circ}$ C 30 s(IL-6, IL-10和IFN- $\gamma$ 的退火温度分别为52  $^{\circ}$ C,58  $^{\circ}$ C和54  $^{\circ}$ C),72  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 10 min。28个循环。取反应产物10  $\mu$ L进行2%琼脂糖凝胶电泳,鉴定产物,应用Tanon Gis 3.73软件进行半定量分析。以GAPDH与各目的片断的光密度比值确定其表达水平。

#### 1.3 统计学处理

计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组存活率的比较用 $\chi^2$ 检验,多组之间比较采用方差分析,两两比较采用 $q$ 检验,分级资料的比较采用秩和检验,以上统计处理由SPSS 11.0软件完成。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 G-CSF 剂量对 24 h 存活率的影响 由表 1 可见,对照组小鼠的 24 h 存活率仅为 20%,当 G-CSF 的治疗剂量为 150  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时,可将小鼠的 24 h 存活率提高至 53%,当 G-CSF 的治疗剂量为 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  时,可将小鼠的 24 h 存活率提高至 68%,与对照组相比差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。因此,在下一步实验中,选择 CSF 300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  为治疗剂量。

表 1 不同剂量的 G-CSF 对小鼠存活率的影响

组别	小鼠数	存活数	死亡数	存活率(100%)
对照组	20	4	16	20%
G-CSF 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	18	6	12	33%
G-CSF 150 $\mu\text{g}/\text{kg}$	19	10	9	53%
G-CSF 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$	19	13	6	68% **
G-CSF 600 $\mu\text{g}/\text{kg}$	19	14	5	74% **

与对照组相比, \*\*  $P < 0.01$

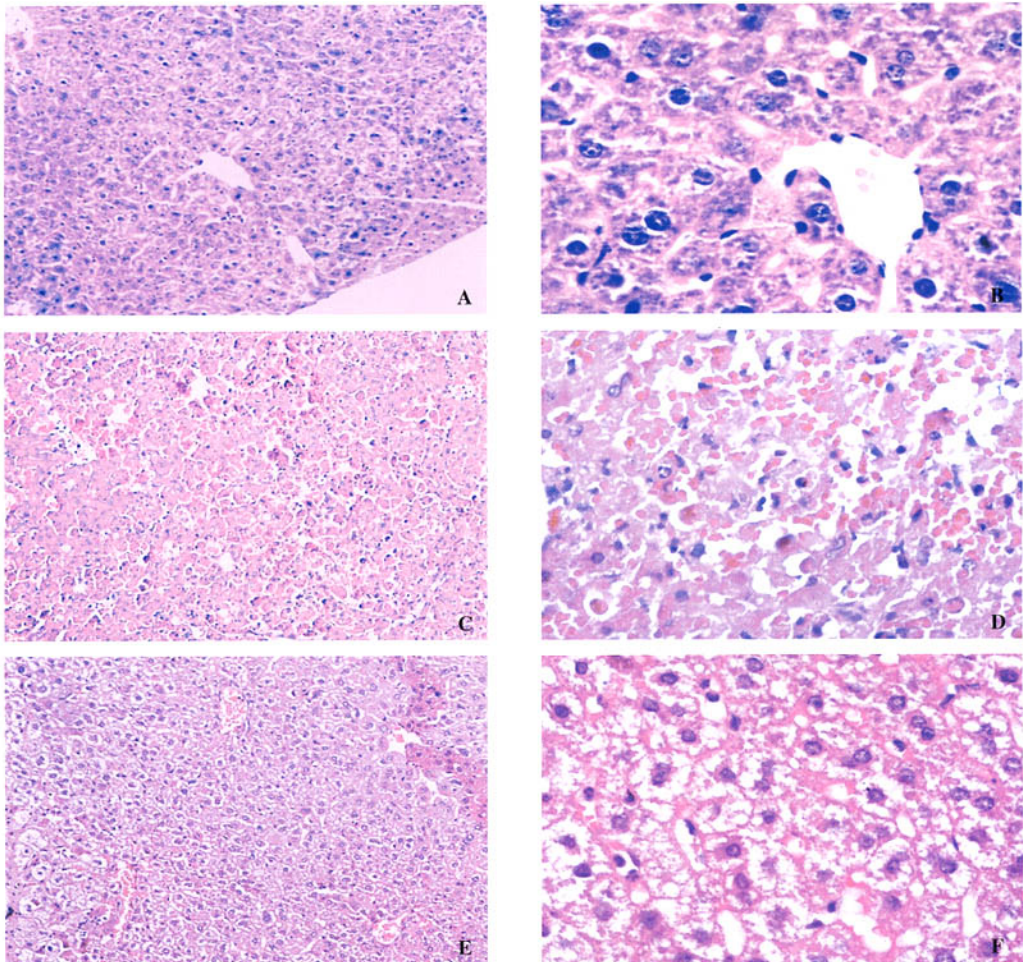


图 1 各组小鼠肝组织病理改变 A:正常组(HE  $\times 100$ ); B:正常组(HE  $\times 400$ ); C:对照组(HE  $\times 100$ ); D:对照组(HE  $\times 400$ ); E:治疗组(HE  $\times 100$ ); F:治疗组(HE  $\times 400$ )

Fig. 1 Liver histopathology of mice in different groups A: Normal group (HE  $\times 100$ ); B: Normal group (HE  $\times 400$ ); C: Control group (HE  $\times 100$ ); D: Control group (HE  $\times 400$ ); E: Therapy group (HE  $\times 100$ ); F: Therapy group (HE  $\times 400$ )

2.2 G-CSF 对 D-GalN/LPS 小鼠肝组织病理变化的影响 小鼠肝组织损伤程度参照 Kobayashi 等<sup>[1]</sup>的肝损伤 4 级分法:0 级,无坏死;1 级,坏死面积小于 2.5%;2 级,坏死面积介于 2.5% ~ 5.0%

之间;3 级,坏死面积超过 5%。由图 1A 和图 1B 可见,正常小鼠的肝组织网架完好,未见明显的肝细胞变性、坏死,无出血。D-GalN/LPS 造模后 6 h,对照组小鼠肝脏可见失去正常肝小叶结构,肝

索解离,大面积肝组织溶解,出血,可见大量嗜酸性坏死和嗜酸性小体形成,炎性细胞浸润(图1C,1D);而G-CSF治疗组小鼠肝组织以广泛的肝细胞变性为主,坏死较少,变性以胞浆疏松化和气球样变为主,肝细胞索排列紊乱、拥挤,可见嗜酸性变,较对照组轻微,肝组织网架保持完好(图1E,1F)。统计对照组和治疗组小鼠肝组织损伤程度表明,治疗组小鼠肝组织损伤程度明显低于对照组( $P < 0.05$ )。

2.3 细胞因子的表达水平 正常小鼠肝组织中  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ,  $IL-6$  和  $IL-10$  的表达极低,造模后上述几种细胞因子的表达水平明显升高,而予

以G-CSF干预后,可明显抑制  $TNF-\alpha$  和  $IFN-\gamma$  的表达, $IL-6$  和  $IL-10$  的表达则增加(表2)。用凝胶分析软件检测各条带的光密度值,计算细胞因子mRNA的相对含量,表明治疗组  $TNF-\alpha$  和  $IFN-\gamma$  的mRNA相对含量明显低于对照组, $IL-6$  和  $IL-10$  相对含量则明显高于对照组( $P < 0.01$ )。

表2 G-CSF对小鼠肝损伤程度的影响

组别	个数	肝损伤分级			
		0	1	2	3
对照组	5	0	1	1	3
治疗组*	5	2	2	1	0

与对照组比较,\*  $P < 0.05$

表3 各组小鼠肝组织中细胞因子mRNA的相对含量的比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	细胞因子mRNA的相对含量			
	$TNF-\alpha$ mRNA	$IFN-\gamma$ mRNA	$IL-6$ mRNA	$IL-10$ mRNA
正常组	0.702 ± 0.039	0.532 ± 0.055	0.590 ± 0.105	0.503 ± 0.046
对照组	1.035 ± 0.024	1.046 ± 0.062	0.912 ± 0.056	0.811 ± 0.136
治疗组	0.870 ± 0.063**	0.796 ± 0.034**	1.059 ± 0.066**	0.996 ± 0.061**

与对照组相比,\*\*  $P < 0.01$

### 3 讨 论

急性肝衰竭是由病毒、药物、自身免疫等多种原因所致的临床常见的危重综合征。发生急性肝衰竭的病毒性肝炎称为重型肝炎。由于缺乏有效的治疗措施,目前重型肝炎的病死率高达50%~80%。尽管重型肝炎的发生机制尚未完全阐明,但肠源性内毒素血症在重型肝炎发生发展中的重要作用已得到了广泛认同<sup>[2,3]</sup>。内毒素激活枯否细胞释放多种细胞因子和炎性介质(包括  $TNF-\alpha$ , 血小板活化因子,一氧化氮和白三烯等)加重肝脏损伤。并且,大量研究证实这种由内毒素和枯否细胞相互作用所致的继发性损伤在重型肝炎发展中往往起着决定性的作用<sup>[2]</sup>。

G-CSF作为一种造血源性生长因子,其促进中性粒细胞系造血细胞的增殖和分化的作用已被熟知并广泛应用于临床。然而,研究结果表明G-CSF的生物学效应并不仅限于此。G-CSF可以诱导多潜能造血干细胞的增殖,并动员它们由骨髓进入外周血循环<sup>[4,5]</sup>,还可以影响血小板的功能和巨噬细胞的生成。近年来发现,G-CSF对免疫系统具有调节作用,这种调节作用表现在G-CSF能够导致机体释放促炎性和抑炎性细胞因子的平衡发生改变。Hartung等<sup>[6]</sup>通过一项双盲随机对照研究发现健康志愿者经G-CSF皮下注射后,其全血细胞在体外条件下经LPS刺激后,释放  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ , GM-CSF 和  $IL-12$  减少,故认为G-CSF对免疫炎症

反应具有抑制作用。Saito等<sup>[7]</sup>的研究证明单核细胞表面可表达G-CSF受体,G-CSF可直接作用于人单核细胞,从而影响其释放多种细胞因子。体外培养的单核细胞经G-CSF预处理后,再以LPS刺激,其释放促炎性细胞因子(如  $TNF-\alpha$  和  $IL-12$ )明显减少,同时抑炎性细胞因子  $IL-10$  明显增加。Christine等<sup>[8]</sup>将小鼠预先腹腔注射G-CSF,再观察经LPS刺激后各种细胞因子的释放情况,也得出了类似的结论。

上述实验结果的基础上,笔者将G-CSF用于治疗D-GalN/LPS所致的小鼠肝衰竭模型,证实其对小鼠肝衰竭具有保护作用,G-CSF治疗组小鼠的24h存活率明显提高,且肝组织损伤程度明显减轻。肝组织各种细胞因子的mRNA的检测也证实,治疗组的小鼠肝组织中促炎性细胞因子  $TNF-\alpha$  和  $IFN-\gamma$  的表达水平明显低于对照组,而抑炎性细胞因子  $IL-10$  和  $IL-6$  的表达水平明显高于对照组。D-GalN和LPS联合诱导的急性肝衰竭模型在病理、生化和代谢等方面的改变均类似于人急性肝衰竭,尤其是内毒素血症和多种细胞因子在其发生发展中起了重要作用,而G-CSF正是针对内毒素和枯否细胞相互作用的结果,即大量细胞因子和炎性介质的释放这一环节,缓解了继发性损伤造成的肝细胞大量坏死,有效地阻断了肝衰竭的进一步发展。

参考文献:

[1] Kabayashi S, Nishihira J, Watanabe S, et al. Prevention of lethal acute hepatic failure by antimacrophage migration inhibitory factor antibody in mice treated with bacilli Calmette-Guerin and lipopolysaccharide[J]. *Hepatology*, 1999,29(6):1752-1759.

[2] 顾长海,王宇明. 肝功能衰竭[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002. 118-135.

[3] Han DW. Intestinal endotoxemia as a pathogenetic mechanism in liver failure[J]. *World J Gastroenterol*, 2002,8(6):961-965.

[4] Yamada T, Kaneko H, Iizuka K, et al. Elevation of lymphocyte- and hematopoietic stem cell numbers in mice transgenic for human granulocyte CSF[J]. *Lab Invest*, 1996,74(2):384-394.

[5] Bacigalupo A, Piaggio G, Podesta M, et al. Collection of peripheral blood hematopoietic progenitors (PBHP) from patients with severe aplastic anemia (SAA) after prolonged administration of granulocyte colony-stimulating factor[J]. *Blood*, 1993,82(5):1410-1414.

[6] Hartung T, Docke WD, Gantner F, et al. Effect of granulocyte colony-stimulating factor treatment on ex vivo blood cytokine response in human volunteers[J]. *Blood*, 1995,85(9):2482-2489.

[7] Saito M, Kiyokawa N, Taguchi T, et al. Granulocyte colony-stimulating factor directly affects human monocytes and modulates cytokine secretion[J]. *Exp Hematol*, 2002,30(10):1115-1123.

[8] Shaklee CL, Guo J, Faggioni R, et al. Pretreatment with granulocyte-colony stimulating factor decreases lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production in mice in association with the production of interleukin-18[J]. *Cytokine*, 2004,25(3):119-126.

(本文编辑 傅希文)

\*\*\*\*\*

## 欢迎订阅 2007 年《中国神经再生研究(英文版)》杂志

《中国神经再生(英文版)》Nerve Regeneration Research CN11-5422/R,ISSN 1673-5374,国内外公开发行,月刊,2007年邮发代号 8-585。

本刊已被世界著名出版商荷兰 Elsevier Science 出版集团的 Science Direct On Site(SDOS)数据库全文收录,并被中国核心期刊遴选数据库、中国学术期刊全文数据库、中文科技期刊数据库、《中国学术期刊文摘(英文版)》收录。

本刊关注国际神经再生研究方面的热点和重大应用性课题,跟踪国际神经再生研究方面高科技的前沿成果。

稿件特色为及时报道神经再生研究领域具有前瞻性、创造性和较高学术水平的基础研究、应用基础研究以及相关临床研究,力求每一篇文章都清楚阐述与他人、他篇的不同之处。从投稿至接到录用通知 30 天。一般稿件作者修回到发表为 90 天,欢迎投稿。

本刊订阅:沈阳 1234 邮政信箱 邮编:110004

投稿电邮: sjzs101@163.com; sjzs102@163.com, 咨询电邮: sjzs100@163.com 电话: +86 24 23381085, 传真: +86 24 23394178。更多信息详见 www.sjzsyj.com

《中国神经再生研究(英文版)》编辑部

2006年8月14日