

## IL-6 在对乙酰氨基酚肝损伤后再生中的作用

郁福乾,宋莎莎,路燕,章礼久

**摘要 目的** 通过体外实验探讨白细胞介素(IL)-6在对乙酰氨基酚(APAP)所致急性肝损伤(ALI)后肝再生过程中的作用。**方法** 体外实验,培养 AML12 小鼠正常肝细胞,CCK-8 法检测不同浓度 APAP 药物和 IL-6 中和抗体(IL-6 Ab)作用于 AML12 细胞后细胞的活力,筛选出最适药物作用浓度;ELISA 测量 IL-6 浓度;Western blot 法检测 PCNA、CyclinD1、HGF 等肝脏再生相关蛋白水平;qRT-PCR 法检测 IL-6、PCNA、CyclinD1 mRNA 水平。GraphPad Prism 8.0 软件处理数据。**结果** 通过 CCK-8 数据,筛选 5 mmol/L 最适药物浓度造模以及 0.01  $\mu\text{g/ml}$  IL-6 Ab 作用细胞。ELISA 试剂盒测量 IL-6 浓度,0、4、12、24、48 h IL-6 浓度分别为 0、1.794、2.264、1.658、1.086  $\text{pg/ml}$ 。Western blot 结果,与 APAP 处理 AML12 细胞其他时间点相比,4 h APAP 组 CyclinD1 蛋白水平最高,12 h APAP 组 PCNA、HGF 蛋白水平最高( $P < 0.05$ )。与 4 h APAP 组相比,4 h APAP + IL-6 Ab 组 CyclinD1、p-STAT3 蛋白表达降低( $P < 0.05$ );与 12 h APAP 组相比,12 h APAP + IL-6 Ab 组 PCNA、HGF 表达减低( $P < 0.05$ )。qRT-PCR 结果,与 APAP 处理 AML12 细胞其他时间点相比,4 h APAP 组 IL-6、PCNA、CyclinD1 mRNA 水平达高

峰( $P < 0.05$ );与 4 h APAP 组相比,4 h APAP + IL-6 Ab 组 PCNA、CyclinD1 mRNA 水平降低( $P < 0.05$ )。**结论** IL-6 Ab 通过中和 IL-6 抑制 STAT3 磷酸化进而抑制肝细胞再生,推测 IL-6 在 APAP 诱导的肝损伤后肝再生过程中可能起到促进作用。

**关键词** 对乙酰氨基酚;急性肝损伤;白细胞介素-6;IL-6 中和抗体;肝再生

**中图分类号** R 329.4;R 333.4;R 575;R 977.9

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2022)06-0866-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.06.005

药物性肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)是指由药物和(或)其代谢产物引起的肝脏损伤,其发病率近年来呈上升趋势,目前已是非感染性肝病的第 2 大病种<sup>[1]</sup>。其中以对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)过量诱导的急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)最为常见<sup>[2-3]</sup>。在肝脏损伤及修复再生过程中,炎症反应起至关重要的作用。炎症诱导的再生主要由炎症细胞释放的各种细胞因子和生长因子调控,目前研究较多的促炎细胞因子是白细胞介素(interleukin, IL)-6 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ <sup>[4]</sup>。体内研究表明 IL-6 和 TNF- $\alpha$  在炎症反应早期介导肝损伤,但在后期能够促进肝脏再生<sup>[5-6]</sup>。该研究旨在通过体外实验探讨 IL-6 在 APAP 所致急性肝损伤(acute liver injury, ALI)后肝再生过程中的作用。

2022-03-02 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81800524)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院消化科,合肥 230601

作者简介:郁福乾,男,硕士研究生;

章礼久,男,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail:

zhanglijiu6336@163.com;

路燕,女,主治医师,硕士生导师,责任作者,E-mail:luy-

ancathrine@163.com

triglyceride (TG) in serum and hepatic tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-6, IL-8, IL-1 $\beta$  mRNAs were measured. The pathological changes of liver and intestine were observed by HE staining. Illumina high-throughput sequencing was used to detect  $\alpha$  diversity,  $\beta$  diversity and species composition at phylum and genus levels. **Results** Compared with the Ctrl group, alcohol exposure significantly increased serum ALT and AST in mice ( $P < 0.01$ ), and obviously increased liver IL-6, IL-8 and IL-1 $\beta$  mRNA ( $P < 0.01$ ). HE staining showed that there were scattered cell necrosis and inflammatory infiltration in the liver of mice in EtOH group. The intestinal structure was not clear, the gland was atrophy, and there was obvious inflammatory infiltration. The structure of intestinal flora in EtOH group changed, *Firmicutes* abundance increased at phylum level( $P < 0.05$ ), *Parasutterella* abundance decreased at genus level( $P < 0.05$ ), and *Clostridiaceae* and *Clostridium-sensu-stricto* were the key genera. **Conclusion** The composition of intestinal microflora in mice with alcoholic liver injury changes, which may be related to the occurrence of liver disease.

**Key words** alcohol; gut microbiota; liver injury

## 1 材料与方 法

**1.1 细胞株与主要试剂** 小鼠正常肝细胞 AML12 细胞系由安徽医科大学毒理学实验室赠予; APAP 购自美国 MedChemExpress 公司; CCK-8 试剂盒购自武汉 Elabscience 公司; IL-6 中和抗体、地塞米松购自美国 Thermo 公司; 磷酸化信号传导子及转录激活子 3 (p-STAT3) 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 信号传导与转录激活因子 3 (STAT3)、细胞周期蛋白 D1 (CyclinD1)、增殖细胞核抗原 (PCNA)、肝细胞生长因子 (HGF) 抗体均购自美国 CST 公司; IL-6 ELISA 试剂盒购自武汉华美生物工程有限公司; 特异性引物购自上海生工生物公司; PCR 相关试剂购自上海新贝生物有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 将小鼠正常肝细胞 AML12 培养在 DMEM/F-12 培养基 [含 10% 胎牛血清、1% 胰岛素 - 转铁蛋白 - 硒 (insulin-transferrin-selenium, ITS)、0.5% 地塞米松及 1% 青 - 链霉素] 中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中进行孵育, 培养 1 ~ 2 d 细胞融合达 85% 左右时传代。

**1.2.2 CCK-8 实验** 取对数生长期 AML12 细胞, 细胞重悬后调整细胞密度为  $7.5 \times 10^4$  个/ml, 96 孔板每孔加入 100  $\mu$ l 细胞悬液, 细胞贴壁后 PBS 漂洗 2 次, 96 孔板倒置滤纸上吸净水分, 分别加入不同终浓度 APAP (0、1、2.5、5、10、20 mmol/L) 作用 4、12、24 及 48 h, 观察 APAP 对 AML12 细胞活力的影响, 筛选出最适构模药物浓度。

操作同前, 分别加入不同终浓度 (0、0.01、0.1、1、10  $\mu$ g/ml) IL-6 中和抗体作用 48 h, 观察其对 AML12 细胞活力的影响。空白对照孔均加入 100  $\mu$ l 培养基, 每组设置 5 个复孔, 加入 CCK-8 试剂 10  $\mu$ l 孵育 90 min, 酶标仪 450 nm 波长测定各孔吸光度值, 重复 3 次实验。细胞活力的计算公式: 细胞活力 (%) = (实验组 OD 值 - 空白对照组 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白对照组 OD 值)  $\times$  100%。

**1.2.3 Western blot 实验** 取对数生长期 AML12 细胞, 细胞重悬后均匀接种于 6 孔板中, 每孔加 100  $\mu$ l RIPA 裂解液 (含 1% 蛋白酶抑制剂 + 1% 磷酸酶抑制剂) 冰上裂解蛋白, 4 °C、13 200 r/min、25 min。BCA 法测定蛋白浓度, 加入 SDS 上样缓冲液, 100 °C 煮沸 10 min, -20 °C 冻存。等量蛋白在 10% SDS-PAGE 凝胶上恒压电泳, 恒流转膜, 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, TBST 洗膜。一抗 ( $\beta$ -actin: 1 : 10 000; PC-

NA: 1 : 500; p-STAT3、STAT3、CyclinD1、HGF 均为 1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜, 二抗 (山羊抗小鼠 IgG 1 : 10 000、山羊抗兔 IgG 1 : 10 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜, 超敏 ECL 发光显影剂显影, Tanon 化学发光显影仪曝光条带并拍摄图片, Image J 软件定量分析目的条带吸光度值。

**1.2.4 qRT-PCR 实验** 6 孔板每孔加 TRIzol 试剂 1 ml, 提取细胞 RNA 用分光光度计测定 RNA 浓度。根据说明书操作, RNA 定量 2  $\mu$ g 逆转录, 加入  $\times$  8 gDNA remover 2  $\mu$ l, DEPC 水补足体积至 16  $\mu$ l, 混匀 42 °C 水浴加热 2 min, 随后加入  $\times$  5 RT SuperMix 4  $\mu$ l。取逆转录产物 cDNA 1  $\mu$ l, 预混引物 0.8  $\mu$ l, DEPC 水 8.2  $\mu$ l 以及  $\times$  2 S6 Universal SYBR qPCR Mix 10  $\mu$ l 配成总体积 20  $\mu$ l。扩增用 LightCycle-480 PCR 仪 (Roche, version 1.5.0), 95 °C 预变性 2 min, 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 循环 40 次, 95 °C、5 s, 65 °C、5 s, 通过熔解曲线分析来检测 PCR 扩增产物质量, 按  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算增殖相关基因相对比值。特异性引物序列见表 1。

**1.3 统计学处理** 数据处理选用 GraphPad Prism 8.0 软件, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 APAP 对 AML12 细胞活力的影响** 采用 CCK-8 法测定 APAP 对 AML12 细胞活力的影响。与 0、1、2.5 mmol/L 组比较, 5、10、20 mmol/L 组在 4 h 细胞活力均出现了不同程度的降低 ( $P < 0.05$ )。与 4 h APAP 组比较, 12 h APAP 组细胞活力升高, 而 24 h 和 48 h 细胞活力持续下降, 细胞活力在 12 h 达到峰值。在 48 h, 相较于 10、20 mmol/L 组, 5 mmol/L 组细胞活力较高, 且细胞活力超过 50%。因此, 选择 5 mmol/L 药物浓度构建体外 APAP 诱导的 ALI 模型。见图 1。

表 1 目的基因引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
$\beta$ -actin	F: TGCTGTCCCTGTATGCCCTCTGG R: ACCGCTCGTTGCCAATAGTGATG
CyclinD1	F: TGACTGCCGAGAAGTTGTGC R: CTCATCCGCTCTGGCATT
PCNA	F: TGAAGAAGGTGCTGGAGGCTCTC R: AGCTGTACCAAGGAGACGTGAGAC
IL-6	F: CTGCAAGAGACTTCCATCCAG R: AGTGGTATAGACAGTCTGTTGG

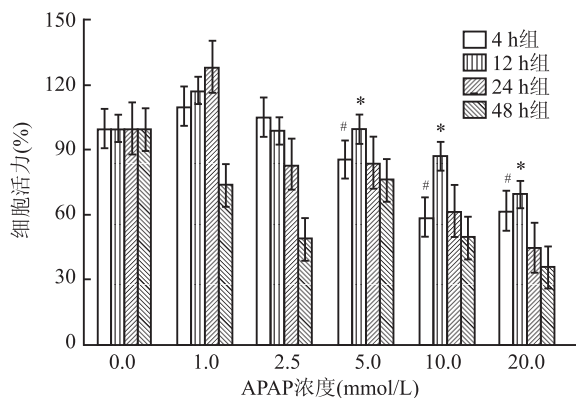


图1 CCK-8 检测 APAP 对 AML12 细胞活力的影响

同浓度、不同时间组内比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 0.0 mmol/L 组比较: #  $P < 0.05$

### 2.2 APAP 对 AML12 细胞中 IL-6 浓度的影响

在预实验中,使用了 ELISA 试剂盒测量 IL-6 浓度, 0、4、12、24、48 h IL-6 浓度分别为 0、1.794、2.264、1.658、1.086 pg/ml ( $F = 560.6$ )。见图 2。

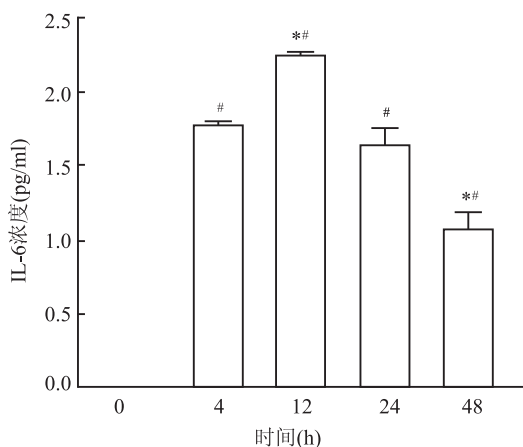


图2 APAP 对 AML12 细胞中 IL-6 浓度的影响

与 0 h 组比较: #  $P < 0.05$ ; 各时间组两两比较: \*  $P < 0.05$

### 2.3 IL-6Ab 对 AML12 细胞活力的影响

根据说明书介绍,抑制重组小鼠 IL-6 (0.25 ng/ml) 诱导的细胞增殖需要的中和抗体浓度,50% 中和作用浓度通常为 0.005 ~ 0.025  $\mu\text{g/ml}$ ,为筛选合适的 IL-6 中和抗体浓度,设计 5 个不同浓度梯度 0、0.01、0.1、1、10  $\mu\text{g/ml}$ ,作用细胞 48 h,观察细胞活力。与 0  $\mu\text{g/ml}$  组比较,0.01  $\mu\text{g/ml}$  组细胞活力 ( $96.93 \pm 3.33$ )%,差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),对细胞增殖无明显抑制作用;0.1、1、10  $\mu\text{g/ml}$  组细胞活力分别为 ( $94.33 \pm 2.69$ )%、( $94.52 \pm 6.94$ )%、( $94.59 \pm 6.65$ )%,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),此 3 组间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),故选取 0.01  $\mu\text{g/ml}$

ml 浓度进行后期实验。见图 3。

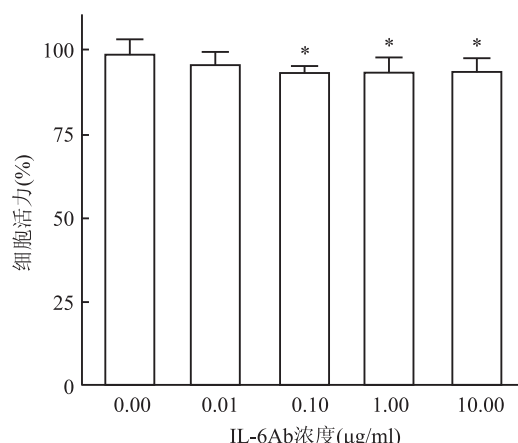


图3 CCK-8 法检测 IL-6Ab 对 AML12 细胞活力的影响

与 0  $\mu\text{g/ml}$  组比较: \*  $P < 0.05$

### 2.4 APAP、IL-6Ab 对 AML12 细胞 CyclinD1、PCNA、HGF 等蛋白表达的影响

选取 0、4、12、24、48 h 时间点,了解 PCNA、CyclinD1、HGF 等蛋白的表达情况。与 APAP 处理细胞其他时间点比较,4 h APAP 组 CyclinD1 蛋白水平最高,12 h APAP 组 PCNA、HGF 蛋白水平最高,差异均有统计学意义 ( $F = 700.80、2016.00、14.48$ ) (图 4A、F、G、H)。

为探索 IL-6 在 ALI 后过程中的作用,在预定的时间点观察 IL-6Ab 在肝损伤后不同阶段对肝细胞增殖过程的调控作用。根据前期实验结果,在 4 h 检测 CyclinD1、STAT3、p-STAT3 蛋白水平,12 h 检测 PCNA、HGF 再生相关指标的蛋白水平。与 NC 组比较,IL-6 Ab 组 p-STAT3、CyclinD1、PCNA、HGF 蛋白表达差异均无统计学意义,4 h APAP 组 p-STAT3 蛋白水平表达升高 (图 4B),4 h APAP 组 CyclinD1 蛋白水平表达减低 (图 4C),与 4 h APAP 组比较,4 h APAP + IL-6 Ab 组 p-STAT3、CyclinD1 蛋白表达均降低,差异有统计学意义 ( $F = 248.7、1805.0$ ) (图 4I、J)。与 NC 组比较,12 h APAP 组 PCNA 蛋白水平表达升高 (图 4D),HGF 蛋白水平表达升高 (图 4E),与 12 h APAP 组比较,12 h APAP + IL-6 Ab 组 PCNA、HGF 蛋白表达均降低,差异有统计学意义 ( $F = 110.30、37.84$ ) (见图 4K、L)。

### 2.5 APAP、IL-6Ab 对 AML12 细胞中 IL-6、CyclinD1、PCNA mRNA 的影响

为探索 IL-6 在 ALI 后过程中的作用,选取 0、4、12、24、48 h 时间点,了解 IL-6 及 PCNA 等 mRNA 水平。与 APAP 处理 AML12 细胞其他时间点比较,4 h APAP 组 IL-6、

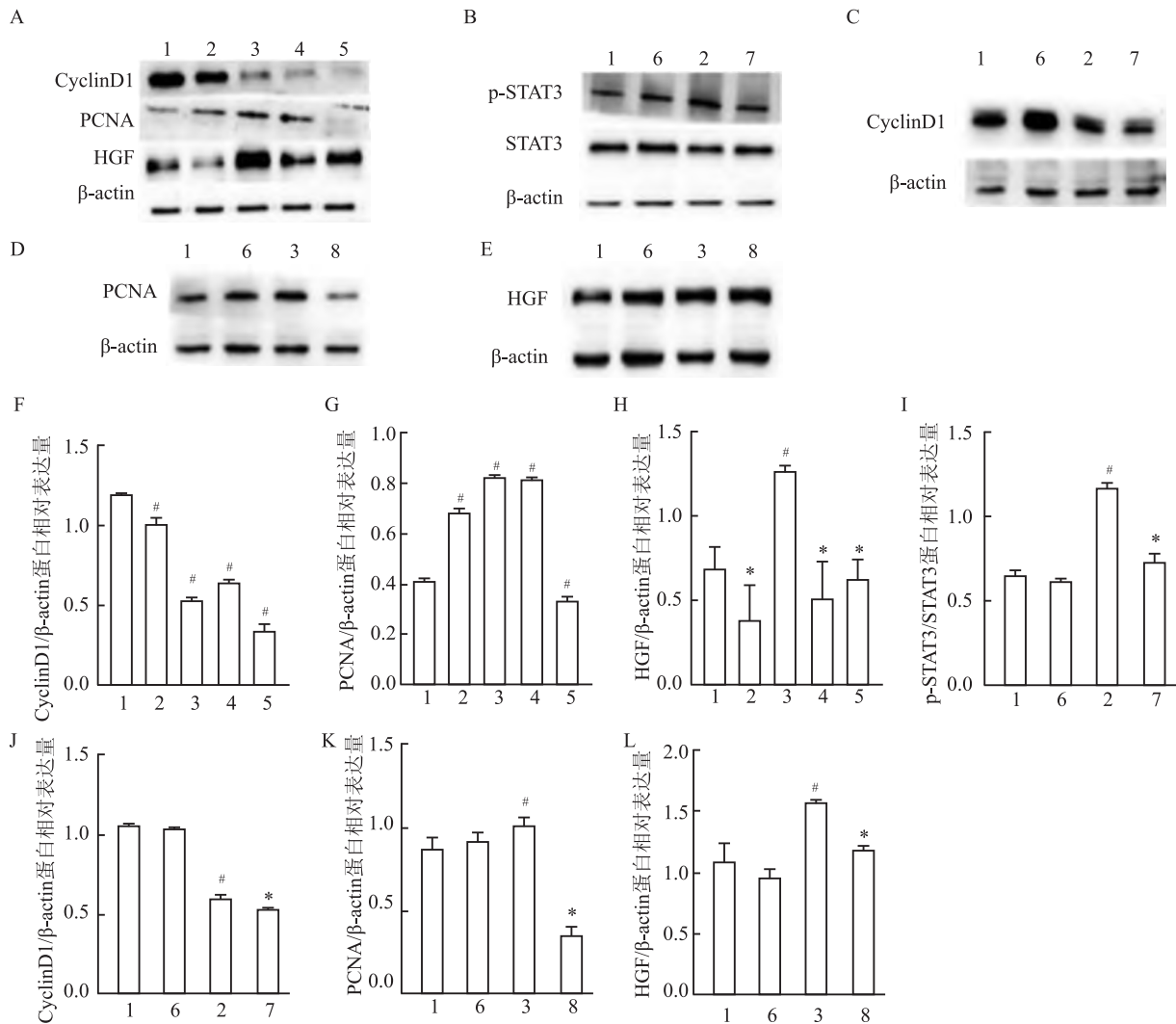


图4 APAP、IL-6Ab对AML12细胞CyclinD1、PCNA、HGF等蛋白表达的影响

A: APAP处理后不同时间点再生相关蛋白表达情况;B: APAP和(或)IL-6Ab处理4h,各处理组STAT3、p-STAT3蛋白表达情况;C: APAP和(或)IL-6Ab处理4h,各处理组CyclinD1蛋白表达情况;D: APAP和(或)IL-6Ab处理12h,各处理组PCNA蛋白表达情况;E: APAP和(或)IL-6Ab处理12h,各处理组HGF蛋白表达情况;1:NC组;2:4h APAP组;3:12h APAP组;4:24h APAP组;5:48h APAP组;6:IL-6Ab组;7:4h IL-6Ab + APAP组;8:12h IL-6Ab + APAP组;与NC组比较:# $P < 0.05$ ;其他各处理组间比较:\* $P < 0.05$

PCNA、CyclinD1 mRNA水平达高峰,差异均有统计学意义( $F = 15.07、413.40、66.29, P < 0.05$ ) (图5A、B、C)。与4h APAP组比较,4h APAP + IL-6Ab组PCNA、CyclinD1 mRNA水平降低,差异均有统计学意义( $F = 88.120、5.671, P < 0.05$ ) (图5D、E)。

### 3 讨论

IL-6是一种多功能性细胞因子,通过调节适应性免疫,对炎症、肝再生、抗感染等具有多种作用<sup>[5]</sup>。炎症在肝脏疾病的触发、进展及预后中扮演了重要作用。有研究<sup>[4]</sup>报道药物诱导的肝细胞损伤会引发炎症级联反应或免疫反应。体内研究显

示,APAP过量时肝小叶发生中心性坏死,坏死细胞释放促炎物质引起急性炎症反应从而导致二次损伤。细胞水平研究显示,APAP起初诱导肝细胞死亡,后激活固有免疫触发炎症反应从而促进受损肝脏再生。DILI动物模型研究表明炎症在早期阶段诱导肝损伤,而后期阶段则促进肝脏再生<sup>[7]</sup>。IL-6介导的信号通路对早期肝损伤以及再生过程的进展和维持至关重要。目前关于DILI后细胞水平上肝再生过程研究尚少,体外实验<sup>[8]</sup>表明,IL-6对细胞炎症反应无明显调控作用。

炎症细胞因子通过激活一系列转录因子调控细胞周期,从而促进细胞增殖<sup>[9]</sup>。细胞周期包括G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>、M和G<sub>0</sub>期。IL-6促进肝细胞从G<sub>0</sub>过渡到

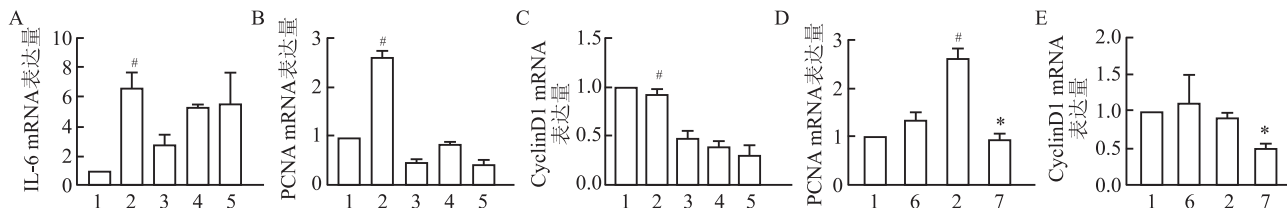


图5 APAP、IL-6Ab对AML12细胞中IL-6、CyclinD1、PCNA mRNA的影响

A、B、C: APAP处理AML12细胞加药后IL-6、PCNA、CyclinD1 mRNA水平; D、E: APAP和(或)IL-6Ab处理4 h,各处理组PCNA、CyclinD1 mRNA水平;与NC组比较;#P<0.05;与APAP组比较;\*P<0.05

G<sub>1</sub>和S期,其对肝细胞的直接作用导致STAT3二聚化和核移位。在细胞核中,IL-6激活与有丝分裂相关的早期基因,其靶向作用于CyclinD1和p21分子调节肝细胞增殖,保护细胞免受氧化应激反应、减少细胞死亡。CyclinD1在细胞由G<sub>1</sub>进入S期的过程中发挥重要作用,其表达仅受STAT3调控。在G<sub>1</sub>早期,CyclinD1水平升高,后急剧下降,这与大多数细胞中S期的开始相吻合。PCNA在S期表达升高,其表达与G<sub>1</sub>/S中的增殖峰值紧密相关,并在细胞周期结束时降低<sup>[10]</sup>。PCNA和CyclinD1之间的相互作用可阻止G<sub>1</sub>期DNA的提前合成。在G<sub>1</sub>向S期转变过程中,CyclinD1水平降低引起PCNA从复合物中释放,并导致染色体DNA复制的启动<sup>[11]</sup>。

该研究结果表明,APAP作用4 h后,5、10、20 mmol/L组细胞活力均出现不同程度的降低,提示细胞在4 h内出现损伤,这一结果与Preeti et al<sup>[12]</sup>研究结果相符。APAP给药12 h细胞活力达到峰值,推测细胞在12 h出现了损伤后的再生,而24 h和48 h细胞活力持续下降,这可能与药物持续作用于细胞导致损伤超过细胞再生的能力有关,且培养基中的营养物质逐渐消耗及有害物质积累。0、4、12、24、48 h IL-6浓度均较低,但呈现出浓度差异的变化,推测较低浓度的IL-6即可引起肝细胞后续的再生反应。在CCK-8实验筛选合适的IL-6 Ab作用浓度时,与0 μg/ml组比较,0.01 μg/ml组细胞存活率为(96.93 ± 3.33)%,提示0.01 μg/ml IL-6 Ab对正常细胞无明显影响。

此外,PCNA、HGF蛋白水平在12 h最高,其升高时间与CCK-8细胞活力变化趋势一致。而CyclinD1蛋白水平在4 h最高,其表达时间先于PCNA、HGF,这一结果与细胞周期蛋白的时间差异性程序性表达理论相符。有报道<sup>[13]</sup>指出,在阿霉素药物体外刺激细胞增生模型中,细胞内CyclinD1蛋白水平在4、8 h升高,至12 h恢复到基线水平,这一结

果与该研究结果相似,据此推测细胞再生的时间点可能在12 h。HGF通过激活继发性或延迟性基因应答,刺激DNA复制并诱导肝细胞增殖<sup>[14]</sup>。与NC组比较,4 h APAP组CyclinD1蛋白水平稍减低,与4 h APAP组相比,4 h APAP + IL-6 Ab组表达减低;与NC组比较,12 h APAP组PCNA、HGF蛋白水平升高,与12 h APAP组比较,12 h APAP + IL-6 Ab组表达减低。各组比较,STAT3总蛋白无改变;与NC组比较,4 h APAP组p-STAT3蛋白表达升高,与4 h APAP组比较,4 h APAP + IL-6 Ab组表达减低,表明IL-6 Ab通过中和IL-6从而抑制了STAT3磷酸化。据此推测IL-6 Ab通过中和IL-6不会改变STAT3总蛋白水平,但是能减低p-STAT3水平,从而抑制肝再生相关蛋白的表达。

qRT-PCR实验表明,在4 h APAP组,IL-6、PCNA、CyclinD1 mRNA水平达高峰,提示IL-6可能在此时驱动了细胞周期的进展,促进细胞DNA合成,为细胞分裂活动做准备。与4 h APAP组比较,4 h APAP + IL-6 Ab组PCNA、CyclinD1 mRNA水平降低。以上结果表明,IL-6 Ab通过中和IL-6抑制STAT3磷酸化,进而降低再生相关基因表达水平。

参考文献

[1] 余朋飞,吴桥,段钟平,等. 对乙酰氨基酚致药物性肝损伤的机制研究进展[J]. 临床肝胆病杂志, 2019,35(9):2108-12.  
 [2] Andrea I, Lily D, Neil K, et al. Drug-induced liver injury: cascade of events leading to cell death, apoptosis or necrosis[J]. Int J Mol Sci, 2017,18(5):1018.  
 [3] 刘晓庆,鲁恒兵,刘瑞雪,等. Bruton酪氨酸激酶在对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤中变化及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2020,55(8):1180-4.  
 [4] Mühl H. STAT3, a key parameter of cytokine-driven tissue protection during sterile inflammation -the case of experimental acetaminophen (paracetamol)-induced liver damage[J]. Front Immunol, 2016,7:163.

- [5] Naseem S, Hussain T, Manzoor S. Interleukin-6: a promising cytokine to support liver regeneration and adaptive immunity in liver pathologies[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018, 39:36–45.
- [6] Dirk S, Stefan R. IL-6 pathway in the liver: from physiopathology to therapy[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(6):1403–15.
- [7] Yang R, Tonnesen T I. DAMPs and sterile inflammation in drug hepatotoxicity[J]. *Hepatol Int*, 2019, 13(1):42–50.
- [8] Li L, Duan C, Zhao Y, et al. Preventive effects of interleukin-6 in lipopolysaccharide/d-galactosamine induced acute liver injury via regulating inflammatory response in hepatic macrophages[J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 51:99–106.
- [9] Peng W C, Logan C Y, Fish M, et al. Inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  promotes the long-term expansion of primary hepatocytes in 3D culture[J]. *Cell*, 2018, 175(6):1607–19.
- [10] Thomas Z, Igor A G, Dilyana K, et al. Quantitative cell cycle analysis based on an endogenous all-in-one reporter for cell tracking and classification[J]. *Cell Rep*, 2017, 19(9):1953–66.
- [11] Amaia G, Francisco J B. Human PCNA structure, function, and interactions[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(4):570.
- [12] Preeti V, Yogeshwar S, Priya G, et al. Replicative stress and alterations in cell cycle checkpoint controls following acetaminophen hepatotoxicity restrict liver regeneration[J]. *Cell Prolif*, 2018, 51(3):e12445.
- [13] Xie K, Xu C, Zhang M, et al. Yes-associated protein regulates podocyte cell cycle re-entry and dedifferentiation in adriamycin-induced nephropathy[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12):915.
- [14] Zou Y, Zhang M, Zeng D, et al. *Periplaneta americana* extracts accelerate liver regeneration via a complex network of pathways[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11:1174.

## Research of IL-6 in liver regeneration after APAP-induced acute liver injury

Yu Fuqian, Song Shasha, Lu Yan, Zhang Lijiu

(Dept of Gastroenterology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

**Abstract Objective** To explore the role of interleukin(IL)-6 in the process of liver regeneration after acetaminophen(APAP)-induced acute liver injury (ALI) through *in vitro* experiments. **Methods** *In vitro* experiments, AML12 cell lines which originated from normal mice hepatocytes were cultured and treated with different concentrations of APAP drugs and IL-6 neutralizing antibody (IL-6 Ab). CCK-8 method was used to detect cell viability and screen out the appropriate drug effects concentration. The IL-6 concentration was measured by ELISA. Western blot was used to detect the expression levels of liver regeneration-related proteins such as PCNA, CyclinD1, and HGF. The mRNA levels of IL-6, PCNA and CyclinD1 were measured by qRT-PCR. Datas were analyzed by GraphPad Prism 8.0 software. **Results** Based on the CCK-8 data, the optimal drug concentration of 5 mmol/L APAP was selected for modeling and 0.01  $\mu\text{g/ml}$  IL-6 Ab acting cells. The IL-6 concentration was 0, 1.794, 2.264, 1.658, 1.086  $\text{pg/ml}$  at 0, 4, 12, 24, 48 h, respectively, measured by ELISA kit. Western blot results showed that compared with other time points after APAP administration on AML12 cells, the protein levels of CyclinD1 was the highest at 4 h, PCNA and HGF were the highest at 12 h ( $P < 0.05$ ). Compared with the 4 h APAP group, the expression of CyclinD1 and p-STAT3 protein in the APAP + IL-6 Ab group decreased ( $P < 0.05$ ); compared with the 12 h APAP group, the expression of PCNA and HGF in the APAP + IL-6 Ab group decreased ( $P < 0.05$ ). The results of qRT-PCR showed that the mRNA levels of IL-6, PCNA, and CyclinD1 in the 4 h APAP group reached the peak ( $P < 0.05$ ); compared with the 4 h APAP group, the PCNA and CyclinD1 levels in the APAP + IL-6 Ab group were reduced ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** IL-6 Ab inhibits STAT3 phosphorylation by neutralizing IL-6 and subsequently inhibits liver regeneration. It is speculated that IL-6 may play a role in promoting liver regeneration after APAP-induced liver injury.

**Key words** acetaminophen; acute liver injury; interleukin-6; IL-6 neutralizing antibody; liver regeneration