

IL-17A 促进肝部分切除后 IL-6 表达和肝脏再生

梁 希¹ 张秀红² 李 静²

摘要 目的 研究白细胞介素 17A(IL-17A)对小鼠肝部分切除后肝脏再生的调控作用。方法 对小鼠进行肝切除手术,在手术后的不同时间点取肝脏组织匀浆检测肝脏中 IL-17A 的表达水平。给予小鼠 anti-IL-17A 中和抗体后进行肝切除手术,检测手术后小鼠肝脏重量和肝重体重比,分离血清检测并比较在有无 anti-IL-17A 中和抗体的条件下白细胞介素 6(IL-6)的水平,分离肝实质细胞检测并比较在有无 anti-IL-17A 中和抗体的条件下肝实质细胞中信号传导与转录激活因子 3(STAT3)的磷酸化水平和细胞周期蛋白 D1(cyclinD1)的表达水平。结果 小鼠肝切除后肝脏中的 IL-17A 水平显著升高($P < 0.01$)。给予 anti-IL-17A 中和抗体可以显著抑制肝脏再生、减少 IL-6 水平和阻止肝细胞增殖信号活化。结论 肝切除后肝脏中升高的 IL-17A 促进 IL-6 表达和肝脏再生,该研究对肝切除后肝脏再生的治疗具有重要意义。

关键词 IL-17A; IL-6; 肝脏再生

中图分类号 R 967

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1764-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.010

肝脏有超强的再生功能,小鼠经 2/3 肝切除后 7~10 d 的时间即可恢复至原有肝重^[1]。肝脏经部分肝切除后,肝脏微环境中的信号会刺激肝实质细胞增殖至正常的肝重体重比,最终恢复肝脏的生理功能。肝脏再生过程可分为启动、增殖和终止 3 个阶段,此过程受到肝实质细胞内外多种信号的精确调控,但目前尚未完全明了。肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 和白细胞介素 6(interleukin 6, IL-6) 激活 G0 期肝细胞启动肝脏再生,肝细胞生长因子和转化生长因子 α 激活细胞周期蛋白依赖激酶促进肝细胞增殖,而转化生长因子 β 则

负责终止肝脏再生,其中 IL-6 是肝脏再生的关键调控信号^[2]。IL-6 激活肝实质细胞中的 STAT3 启动肝脏再生,IL-6 缺失小鼠其肝脏再生受到显著抑制^[3]。IL-17A 在自身免疫性疾病、感染性疾病和肿瘤中发挥重要作用^[4],但在肝脏再生中的作用及机制尚未阐明。该研究探讨 IL-17A 在肝脏再生中的作用及机制对肝脏相关疾病的治疗具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小鼠 SPF 级、8 周龄、雄性 C57BL/6 小鼠,20~22 g,由上海斯莱克斯公司提供。小鼠的饲养环境为室温 18~23 °C、湿度 40%~60%、12 h 白天/12 h 黑夜的 SPF 级动物房,每笼 5 只,自由摄食饮水。

1.1.2 试剂 Anti-IL-17A 中和抗体及其对照抗体(美国 eBioscience 公司);细胞周期蛋白 D1(cyclinD1)抗体、信号传导与转录激活因子 3(STAT3)抗体、磷酸化 STAT3(pSTAT3)抗体、 β -actin 抗体(美国 CST 公司);BSA(上海生工公司);IL-17A 和 IL-6 ELISA 检测试剂盒(北京达科为公公司);RIPA 裂解液(上海碧云天公司);其他试剂均为国药集团市售分析纯。

1.2 方法

1.2.1 实验模型建立 将 20 只 C57BL/6 小鼠用于肝切除手术组,小鼠在超净台中麻醉后对腹部皮肤消毒,打开小鼠腹腔游离肝叶,用无菌手术线结扎门脉区的静脉后切除肝叶(切除整个肝脏的 2/3),缝合腹腔并给予抗生素处理,待小鼠苏醒后放回饲养笼内,观察小鼠状态并继续后续实验,不同的时间点检测 IL-17A 的含量变化。将 70 只 C57BL/6 小鼠分为 anti-IL-17A 中和组和同型对照组,每组 35 只,按照 100 μ g/只的剂量给予小鼠 anti-IL-17A 的中和抗体或对照抗体 24 h 后进行肝切除手术,手术完成后进行后续检测实验。

1.2.2 肝重检测 在肝切除后的不同时间点称量小鼠的体重,收集小鼠的肝脏并称量肝重,计算对应小鼠的肝重体重比,并同对照组比较。

1.2.3 ELISA 法检测 按照 ELISA 检测试剂盒说

2016-08-02 接收

基金项目:国家自然科学基金青年基金(编号:31501838);安徽医科大学博士科研资助基金(编号:0119012101)

作者单位:¹安徽医科大学儿科临床学院(安徽省儿童医院),合肥 230051

²安徽医科大学生物学系教研室,合肥 230032

作者简介:梁 希,女,本科,医师;

李 静,女,博士,讲师,责任作者,E-mail:lijing1812@ahmu.edu.cn

说明书进行操作。将组织匀浆或小鼠血清和标准品分别加入反应孔中, 37 °C 孵育 2 h 后洗板; 加入一抗, 37 °C 孵育 1 h 后洗板; 再加入二抗, 37 °C 孵育 1 h 后洗板; 加入反应底物, 根据颜色变化适时终止显色, 通过酶标仪检测吸光度值。

1.2.4 Western blot 法检测 在肝切除 0、1、3 h 的时间点通过二步灌流法分离小鼠的肝实质细胞, 用 RIPA 冰上裂解后 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液检测蛋白质浓度。加入样品缓冲液沸水浴 8 min, 12 000 r/min 离心 5 min 后取上清液, 上样电泳再进行转膜, 转膜结束后加 5% BSA 室温封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, 洗膜去非特异性结合, 二抗 4 °C 室温孵育 2 h, 洗膜后加底物显色并拍照。以 β -actin 作为内参, 用 Image J 图形分析软件进行相对定量分析以判断蛋白量的差异。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间差异采用 *t* 检验法进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝切除后肝脏中 IL-17A 水平 在肝切除后 0、1、3、24 h 4 个时间点取肝组织制备肝组织匀浆液 ($n = 5$) 测量匀浆液中的总蛋白, 再用 ELISA 试剂盒检测肝组织匀浆液中的 IL-17A 水平, 最后用每毫克总蛋白中 IL-17A 的含量来表示 IL-17A 的浓度。检测结果表明, 肝切除手术后 0 h 的肝脏中检测不到 IL-17A, 但肝切除手术后 1 h 肝脏中 IL-17A 浓度升高, 3 h 开始下降, 手术后 24 h 肝脏中 IL-17A 的浓度明显降低但仍处于较高水平, 见图 1。此结果说明肝切除后 IL-17A 水平迅速升高, 提示 IL-17A 在肝脏再生的早期启动阶段就可能发挥作用。

2.2 IL-17A 对肝切除后的肝脏再生的影响 为判断 IL-17A 对肝脏再生的具体作用, 本研究用 anti-IL-17A 中和抗体经尾静脉注射到小鼠体内阻断体内 IL-17A 的作用, 同型抗体作为对照。中和抗体处理 24 h 后进行肝切除手术, 手术后 24、48、72、96 h 称量小鼠体重和肝重, 计算肝重/体重比。检测结果显示, 在各个时间点 IL-17A 中和组小鼠的肝重/体重比低于对照组小鼠, 在 96 h 的时间点差距最为显著 ($n = 5$, $t = 9.072$, $P = 0.0008$), 见图 2A。同时在肝切除后 96 h 的时间点, IL-17A 中和组小鼠的肝重明显小于对照小鼠 ($n = 5$, $t = 6.777$, $P = 0.0010$), 见图 2B。此结果说明 IL-17A 可以有效地促进肝脏的再生。

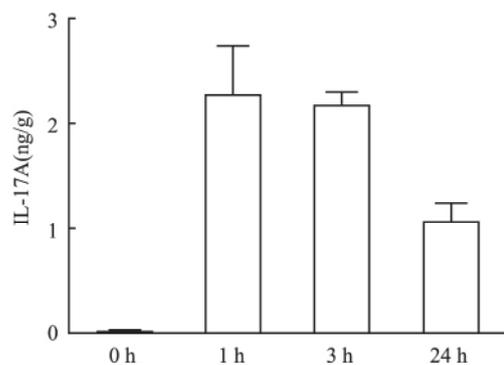


图1 肝切除后不同时间点小鼠肝脏中的 IL-17A 浓度变化

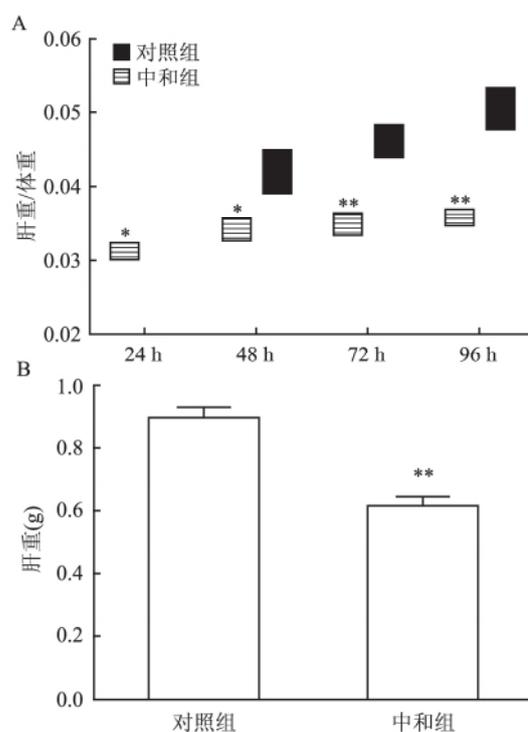


图2 IL-17A 中和组和对照组小鼠

不同时间点的肝重/体重比和肝重比较

A: 肝重/体重比; B: 肝重; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 IL-17A 对肝脏再生中 IL-6 表达的影响 为探究 IL-17A 促进肝脏再生的机制, 本研究首先探索了 IL-17A 对 IL-6 表达的影响。用 anti-IL-17A 中和抗体处理小鼠 24 h 后进行肝切除手术, 同型抗体作为对照。手术 3 h 后分离小鼠血清, 用 ELISA 法检测小鼠血清中 IL-6 的浓度。结果显示, 中和 IL-17A 会显著减少小鼠血清中 IL-6 的水平 ($n = 5$, $t = 4.330$, $P = 0.0025$), 见图 3。此结果说明 IL-17 可以诱导 IL-6 的产生从而促进肝脏的再生, 中和 IL-17A 会减少 IL-6 且抑制肝脏再生。

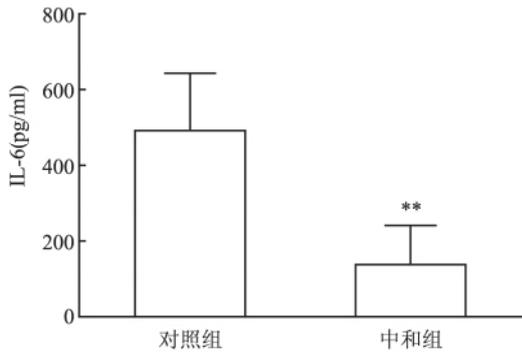


图3 IL-17A 中和组和对照组小鼠血清中 IL-6 的浓度与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.4 IL-17A 对肝实质细胞中 pSTAT3 和 cyclinD1 的水平调控 为进一步研究 IL-17A 对肝脏再生的调控作用,用 anti-IL-17A 中和抗体处理小鼠 24 h 后进行肝切除手术,同型抗体作为对照。手术 0、1、3 h 后分离小鼠肝实质细胞,采用 Western blot 法检测肝实质细胞中细胞周期调控因子 cyclinD1 的表达和 IL-6 信号调控蛋白 STAT3 的活化。肝切除后 3 h anti-IL-17A 中和抗体会明显抑制 cyclinD1 的上调,差异有统计学意义 ($n = 5, t = 6.290, P = 0.0034$);同时 anti-IL-17A 中和抗体会抑制 STAT3 的磷酸化,差异有统计学意义 ($n = 5, t = 8.050, P = 0.0013$);但是 anti-IL-17A 中和抗体对总 STAT3 的表达无影响。此结果说明,IL-17A 可上调肝实质细胞中 cyclinD1 的表达并活化 STAT3。见图 4。

3 讨论

肝脏有强大的再生功能,其再生过程受到肝脏中多种细胞和分子的协同调控,确保肝脏恢复至原有水平。本研究结果显示 IL-17A 在肝脏再生中发挥重要的促进作用。经肝切除手术后,肝脏中的 $\gamma\delta T$ 细胞分泌 IL-17A。IL-17A 诱导 IL-6 产生,活化肝实质细胞中的 STAT3 启动肝脏再生。

肝脏再生显著发生于肝脏切除手术和肝脏损伤后的修复阶段,剩余肝细胞快速增殖或肝脏中的干细胞分化成肝细胞都可以实现肝脏再生^[5]。在小鼠 2/3 肝切除手术中,剩余肝细胞增殖是肝脏再生的主要途径。肝实质细胞占肝脏的 80%,非实质细胞占肝脏的 20%,非实质细胞又包括肝窦内皮细胞、肝星状细胞及免疫细胞^[6]。因此,肝脏再生包括肝实质细胞的再生也包括非实质细胞的再生,从肝脏再生的启动阶段开始,肝实质细胞和非实质细

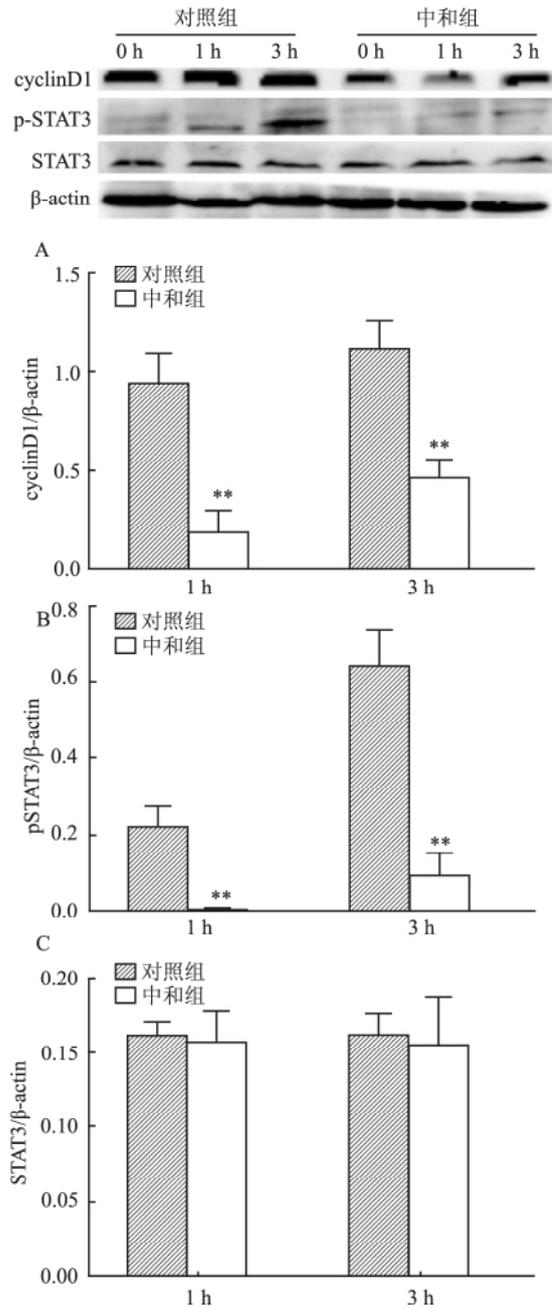


图4 Western blot 法检测 IL-17A 中和组和对照组小鼠肝实质细胞中 cyclinD1、pSTAT3 和 STAT3 的水平

A: cyclinD1; B: pSTAT3; C: STAT3; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

胞之间就存在着相互作用,最终实现肝脏的生理性重构^[7]。

肝脏再生的启动是肝脏再生的关键阶段。目前对启动肝脏再生机制的研究处于探索阶段,门静脉压力和肝窦内压力上升会诱导肝窦内皮细胞产生 IL-6 等,同时肝切除导致的炎症反应也会促进肝脏非实质细胞产生 TNF- α 和 IL-6 等^[8]。IL-6 已被证实是肝脏再生最重要的启动因子。IL-6 与肝实质细胞上的受体结合活化 JAK1,活化的 JAK1 继而磷酸

化 STAT3 pSTAT3 进入核内激活多种基因表达,促进细胞增殖^[9]。TNF- α 对肝脏再生的启动也非常重要, TNF- α 受体缺陷小鼠肝脏再生受损, 补充 IL-6 可以恢复其肝脏再生功能, 因此 TNF- α 借助 IL-6 发挥启动肝脏再生作用^[10]。本研究结果表明, 肝切除后肝脏中的 IL-17A 水平迅速升高后逐渐下降, 因此, 可以推测 IL-17A 在肝脏再生的启动阶段发挥作用。中和小鼠体内的 IL-17A 会显著抑制肝脏再生, 同时明显降低小鼠血清中 IL-6 的水平。因此, 推测 IL-17A 也是通过诱导 IL-6 来启动肝脏再生。中和 IL-17A 显著抑制肝实质细胞中 STAT3 磷酸化, 证实了以上的推断。另外, IL-17A 已被证明通过 IL-6-STAT3 通路促进肝癌细胞的增殖^[11]。同时, 不排除 IL-17A 直接对肝实质细胞发挥作用的可能, 这需要检测肝实质细胞是否表达 IL-17A 的受体以及通过 IL-17A 体外刺激实验证实两者的直接关系。

IL-17A 与其受体结合活化激活 NF- κ B、MAPK、C/EBPs 等信号通路^[12]。研究^[4]证实 IL-17A 在自身免疫性疾病及癌症的发生发展方面起到推动作用, 同时 IL-17A 参与机体防御病原体感染。研究^[13]显示 IL-17A 与 FGF2 协同诱导肠道上皮层中相关基因的表达从而修复受损的肠道。本研究揭示了 IL-17A 在肝脏修复再生过程中的重要作用。虽然 CD4⁺T 细胞是 IL-17A 的主要来源, 但是其他免疫细胞也逐渐被发现可以产生 IL-17A^[14]。因此, 在肝脏再生过程中分泌 IL-17A 的细胞还需要深入研究。

本研究证实了 IL-17A 通过诱导 IL-6 在肝脏再生的启动过程中发挥重要作用, 为调控肝脏再生基础研究提供新的机制, 同时为肝脏疾病治疗和修复再生提供新靶点和新方案。

参考文献

[1] Yokoyama H O, Wilson M E, Tsuboi K K, et al. Regeneration of

- mouse liver after partial hepatectomy[J]. *Cancer Res*, 1953, 13(1): 80-5.
- [2] Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(10): 836-47.
- [3] Debonera F, Aldeguer X, Shen X, et al. Activation of interleukin-6/STAT3 and liver regeneration following transplantation[J]. *J Surg Res* 2001, 96(2): 289-95.
- [4] Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, et al. Functional specialization of interleukin-17 family members[J]. *Immunity*, 2011, 34(2): 149-62.
- [5] Sadri A R, Jeschke M G, Amini-Nik S. Advances in liver regeneration: revisiting hepatic stem/progenitor cells and their origin[J]. *Stem Cells Int* 2016, 2016: 7920897.
- [6] Crispe I N. The liver as a lymphoid organ[J]. *Annu Rev Immunol* 2009, 27: 147-63.
- [7] Fujiyoshi M, Ozaki M. Molecular mechanisms of liver regeneration and protection for treatment of liver dysfunction and diseases[J]. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 2011, 18(1): 13-22.
- [8] Sato Y, Tsukada K, Hatakeyama K. Role of shear stress and immune responses in liver regeneration after a partial hepatectomy[J]. *Surg Today*, 1999, 29(1): 1-9.
- [9] Schmidt-Arras D, Rose-John S. IL-6 pathway in the liver: from physiopathology to therapy[J]. *J Hepatol*, 2016, 64(6): 1403-15.
- [10] Yamada Y, Kirillova I, Peschon J J, et al. Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997, 94(4): 1441-6.
- [11] Gu F M, Li Q L, Gao Q, et al. IL-17 induces AKT-dependent IL-6/JAK2/STAT3 activation and tumor progression in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10: 150.
- [12] Gaffen S L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(8): 556-67.
- [13] Song X, Dai D, He X, et al. Growth factor FGF2 cooperates with interleukin-17 to repair intestinal epithelial damage[J]. *Immunity* 2015, 43(3): 488-501.
- [14] Cua D J, Tato C M. Innate IL-17-producing cells: the sentinels of the immune system[J]. *Nat Rev Immunol*, 2010, 10(7): 479-89.

IL-17A induces IL-6 and promotes liver regeneration after partial hepatectomy

Liang Xi¹, Zhang Xiuhong², Li Jing²

(¹Clinical Institute of Pediatric, Anhui Medical University, Anhui Provincial Children's Hospital, Hefei 230051;

²Faculty of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effect of interleukin 17A (IL-17A) on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. **Methods** The levels of IL-17A in the liver at indicated time points after partial hepatectomy were

CyPA 及 p-ERK1/2 在动脉粥样硬化大鼠血管内皮中的表达

李敏^{1,2} 黎红华^{1,2} 骆文静¹ 易娟¹ 吴晓飞¹

摘要 目的 观察动脉粥样硬化(AS)大鼠血管内皮功能以及亲环素 A (CyPA) 和磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 (p-ERK1/2) 的表达变化。方法 将 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组(每组 10 只): 对照组、AS 12 周组、AS 16 周组。对照组给予基础饲料喂养 + 腹腔注射等量生理盐水; AS 组给予高脂饲料喂养 + 维生素 D3 注射液 60 万 IU/kg 一次性腹腔注射。对应不同造模时间处死大鼠, 分离腹主动脉, 观测离体腹主动脉环对乙酰胆碱的舒张反应; HE 染色、免疫组化法检测动脉血管壁 CyPA 及 p-ERK1/2 的表达。结果 与对照组比较, AS 12 周、AS 16 周组血管内皮功能下降, 3 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HE 染色显示对照组大鼠血管壁呈正常结构, AS 12 周组大鼠内皮细胞破坏、平滑肌细胞增生, AS 16 周组粥样钙化斑块形成; 免疫组化分析显示 3 组大鼠血管壁内 CyPA 及 p-ERK1/2 表达逐渐升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 随着 AS 程度加重, 大鼠血管内皮依赖性舒张功能明显下降, 动脉粥样钙化斑块严重, CyPA 及 p-ERK1/2 表达显著增加。CyPA、p-ERK1/2 信号机制参与加重血管动脉粥样硬化进展, 可能是促进 AS 进展的途径之一。

关键词 动脉粥样硬化; 亲环素 A; 磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2; 内皮依赖性舒张功能

中图分类号 R 543.1+2

2016-07-15 接收

基金项目: 湖北省自然科学基金(编号: 2013CFB428)

作者单位: ¹ 广州军区武汉总医院神经内科, 武汉 430070

² 南方医科大学附属武汉临床学院神经内科, 武汉 430070

作者简介: 李敏, 女, 硕士研究生;

黎红华, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lihonghua567@aliyun.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1768-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.011

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS) 是以内皮细胞功能障碍为起始事件, 慢性炎症反应相互作用的病理过程, 是导致血管性疾病的主要致病因素^[1]。在长期高脂高糖作用下产生大量活性氧自由基, 诱导机体处于氧化应激状态, 促进血管内皮炎性反应, 损伤内皮完整性^[2]。亲环素 A (cyclophilin A, CyPA) 作为一种重要的氧化应激诱导因子与 AS 病变的关系成为近年研究热点^[3], 磷酸化细胞外信号调节激酶 1/2 (phosphorylated extracellular signal regulated kinase, p-ERK1/2) 是细胞信号转导机制中重要的信号调节酶, 将信号从细胞膜表面受体转导至细胞核, 诱导炎症细胞增殖、迁移, 促炎症反应^[4]。但是 CyPA 是否参与 AS 进展, 与 AS 严重程度关系尚未见报道。该实验通过高脂喂养诱导大鼠血管动脉粥样硬化, 观察血管内皮功能变化以及血管内皮细胞 CyPA、p-ERK1/2 的表达, 探讨动脉硬化发生发展的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 Wistar 大鼠 30 只, 180~200 g, 购自湖北省实验动物研究中心。饲养于 12 h 明暗交替的 SPF 环境中, 提供充足饮水、饲料, 维持室内温度 (22 ± 1) °C, 湿度 (60 ± 10) %。

1.1.2 主要实验药剂 维生素 D3 注射液(上海通

measured by ELISA. Mice were divided into two groups including anti-IL-17A neutralization antibody-treated mice and isotype control antibody-treated mice. After partial hepatectomy, the liver weight was measured and the liver weight/body weight ratio was calculated. The interleukin 6 (IL-6) levels in the sera were measured by ELISA. The levels of phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and cyclinD1 in the hepatocytes were measured by Western blot. **Results** The levels of IL-17A in the liver significantly increased after partial hepatectomy ($P < 0.01$). Neutralization of IL-17A not only reduced the live weight and the liver weight/body weight ratio, but also decreased the IL-6 levels in the sera and the levels of phosphorylated STAT3 and cyclinD1 in the hepatocytes. **Conclusion** The increasing IL-17A induces IL-6 production and promotes hepatocyte proliferation, which plays an important role in the liver regeneration after partial hepatectomy.

Key words IL-17A; IL-6; liver regeneration