

肝衰竭患者 MARS 人工肝治疗前后不同疗效组外周血 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达

阿永俊¹⁾, 刘 锋¹⁾, 李春满¹⁾, 陈 鹏¹⁾, 邹智荣²⁾

(1) 昆明医科大学第二附属医院肝胆外科, 云南 昆明 650101; 2) 昆明医科大学人体解剖学与组织胚胎学系 云南 昆明 650500)

[摘要] **目的** 研究肝衰竭患者 MARS 人工肝治疗前后好转组和恶化组外周血 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达. **方法** 对 33 例肝衰竭患者进行 MARS 人工肝治疗, 采用 RT-PCR 检测外周血好转组和恶化组 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 的表达. **结果** 好转组和恶化组所有患者在 MARS 人工肝治疗前外周血 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 均为强阳性表达, 治疗后好转组 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 强阳性表达率较恶化组降低, 2 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$). **结论** 外周血 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 有可能作为肝衰竭患者接受 MARS 人工肝治疗后判断预后的指标.

[关键词] 肝衰竭; 分子吸附再循环系统; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-6

[中图分类号] R575.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2015) 10-0090-04

mRNA Expression of TNF- α and IL-6 in the Peripheral Blood from Liver Failure Patients before and after MARS Treatment

A Yong-jun¹⁾, LIU Feng¹⁾, LI Chun-man¹⁾, CHEN Peng¹⁾, ZOU Zhi-rong²⁾

(Dept. of Hepatobiliary Surgery, The 2nd Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) Dept. of Human Anatomy Histology and Embryology, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] **Objective** To study the mRNA expression of TNF- α and IL-6 in the peripheral blood from liver failure patients before and after MARS treatment in the improving and worsening groups. **Methods** Thirty-three patients with liver failure were treated with MARS treatment, and the expression of TNF- α mRNA and IL-6 mRNA in the peripheral blood of patients were detected using RT-PCR method. **Results** Strong positive expression could be observed in all liver failure patients before MARS treatment, while the strong positive expression rates of TNF- α mRNA and IL-6 mRNA of patients in improving group were lower than those in worsening group after MARS treatment. **Conclusion** TNF- α mRNA and IL-6 mRNA in the peripheral blood can be taken as an indicator for the prognosis of liver failure patients.

[Key words] Liver failure; MARS; TNF- α ; IL-6

伴随着科学技术的迅速发展, 人工器官已成为现代医学中发展最快的学科之一. 分子吸附再循环系统 (molecular adsorbents recirculating system, MARS) 是一种体外辅助肝脏支持系统, 是专为各种原因引起的急性肝衰竭病人提供成功解决方案的最新人工肝支持系统^[1]. MARS 人工肝治疗的根本目的就是为急性肝衰竭患者赢得肝再生所需要

的机体内环境和时间, 研究 MARS 人工肝治疗后不同疗效组肝再生相关分子指标的差异, 探索反映 MARS 人工肝治疗预后的肝再生相关分子指标具有重要意义. TNF- α 和 IL-6 与肝再生有重要关系^[2-3], 本研究纳入昆明医科大学第二附属医院接受 MARS 人工肝治疗的肝衰竭患者 33 例, 观察在不同疗效组治疗前后外周血中 TNF- α mRNA 和

[基金项目] 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2014Z065)

[作者简介] 阿永俊 (1969~), 男, 云南洱源县人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事肝胆胰外科临床研究工作.

[通讯作者] 陈鹏. E-mail: 398031131@qq.com; 邹智荣. E-mail: zouzhirong2005@126.com

IL-6 mRNA 的表达.

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 临床资料 纳入 2001 年 6 月至 2012 年 3 月昆明医科大学第二附属医院共收治的 33 例急性肝衰竭患者, 诊断按照 2000 年第 9 次全国传染病与寄生虫病学术会议关于重症肝炎和肝衰竭的诊断标准^[4]. 其中肝移植术前急性肝衰竭 5 例, 肝移植术后急性肝衰竭 5 例, 胰十二指肠切除术后急性肝衰竭 2 例, 其余 21 例为重型乙肝急性肝衰竭. 其中男 29 例, 女 4 例; 平均年龄 43.8 岁 (25 ~ 69 岁). 治疗前伴有肝性脑病 13 例, 肾功能不全 8 例, 原发性腹膜炎 2 例.

1.1.2 临床分组 根据临床疗效和近期预后将患者分成好转组和恶化组. (1) 好转组: 经过 MARS 人工肝治疗, 患者病情明显好转, 不必行肝脏移植, 好转或治愈出院; (2) 恶化组: 经过 MARS 人工肝治疗, 患者病情无明显好转, 肝衰竭加重后死亡或需行肝脏移植方能存活.

1.1.3 标本采集 每次 MARS 治疗前后均取血样 3 mL, 置于 -70℃ 用试管保存, 检测 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA. 取健康人群 20 例血样 3 mL 作正常对照.

1.1.4 主要仪器和试剂 紫外分光光度计 (日立 U-1800)、凝胶扫描成像分析仪 (SYNGENE 公司 GeneGenius 系统)、PCR 扩增仪 (BIO-RAD PTC-200)、RNAsimple 总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN 公司)、PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver.2 (宝生物工程有限公司)、其余试剂为国产分析纯.

PCR 引物: 所用的 TNF- α 、IL-6 和内参 β -actin 引物由大连宝生物工程有限公司合成引物序列如下: TNF- α (363 bp): 上游引物 5'CGA-GTGACAAGCCTGTAGC3', 下游引物 5'CCTTCTCC-AGCTGGAGAGC3'; IL-6 (354 bp): 上游引物 5'T-CGGTCCAGTTGCCTTCT3', 下游引物 5'TGGAGGT-TACTCTAGGTATAC3'; β -actin (236 bp): 上游引物 5'TTCCTGGGCATGGAGTCCT3', 下游引物 5'ATCCACACGGAGTACTTGC3'.

1.2 方法

1.2.1 MARS 治疗方法 患者放置于恒温治疗室内, 使用 MARS 人工肝 (Teraklin, 德国). 主机和导管与血透机相连, 生理盐水预冲后用 20% 白蛋白 600 mL 循环 1 h. 无菌条件下行股静脉插管, 成功后用低分子肝素抗凝, 一次治疗共使用低分子

肝素 2 100 ~ 8 400 U. 血液通路流速 150 ~ 250 mL/min, 白蛋白透析液通路流速和血液通路流速保持一致, 标准透析液通路流速 500 mL/min. 整个治疗时间 6 ~ 8 h. 总共有 37 例患者接受 MARS 治疗, 其中 4 例经 1 次 MARS 治疗后因经济等其他原因放弃治疗, 其余 33 例均按治疗设计方案完成 2 次以上的 MARS 治疗.

1.2.2 检测方法 血液总 RNA 的提取: 将 0.3 mL 新鲜血液标本用总 RNA 提取试剂盒 (TIANGEN 公司) 抽提血液总 RNA, 方法按说明书操作. 所提取的总 RNA 用紫外分光光度计检测纯度, A260/A280 \geq 1.9, 此外所提取的总 RNA 经琼脂糖凝胶电泳, 可见 28S 和 18S 两条带.

一步法进行目的基因的 RT-PCR: 按一步法试剂盒 (大连宝生物工程有限公司) 说明书操作, 25 μ L 体系中含 1 Step Enzyme Mix 1 μ L, 2 \times 1 Step Buffer 12.5 μ L, TNF- α 、IL-6 和内参 β -actin 的上下游引物各 0.5 μ L (0.4 μ M), 总 RNA 1 μ g, 以水补致 25 μ L. 逆转录参数为 50℃ 逆转录 30 min, 94℃ 灭活逆转录酶 2 min. PCR 循环参数为: 94℃ 变性 30 sec, 51℃ 退火 30 s (TNF- α 为 53℃), 72℃ 延伸 1 min, 循环 35 次, 72℃ 延伸 10 min. 取各管扩增产物 4 μ L, 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统中进行扫描.

1.3 统计学处理

采用 χ^2 检验, 检验水准: $\alpha = 0.05$.

2 结果

2.1 TNF- α mRNA 在好转组和恶化组中的表达

33 例患者经过 172 次 MARS 人工肝治疗后, 21 例重型乙肝肝衰竭患者存活 13 例, 死亡 8 例; 5 例肝脏移植术后急性肝衰竭患者存活 2 例, 死亡 3 例; 2 例胰十二指肠切除术后急性肝衰竭患者存活 1 例, 死亡 1 例. 好转组共 16 例, 存活率 48.5% (16/33), 好转组 16 例患者共行 90 次 MARS 人工肝治疗. 好转组中, TNF- α mRNA 在 MARS 人工肝治疗前均呈强阳性表达, 治疗后呈弱阳性表达为 58 次, 占 64.4% (58/90); 治疗后仍呈强阳性表达为 32 次, 占 35.6% (32/90). TNF- α mRNA 在好转组中 MARS 人工肝治疗前后的表达见图 1A. 正常对照组 TNF- α mRNA 均呈阴性表达. 恶化组共 17 例, 恶化率 51.5% (17/33), 恶化组 17 例患者共行 82 次 MARS 人工肝治疗. 恶化组中 TNF- α mRNA 在 MARS 人工肝治疗前均呈强阳性表达, 治疗后仍呈强阳性表达为 65 次, 占 79.3% (65/82); 治疗后呈弱阳性表达为 17 次,

占 20.7% (17/82) . TNF- α mRNA 在恶化组中 MARS 人工肝治疗前后的表达见图 1B.

MARS 人工肝治疗后的 TNF- α mRNA 表达强阳性率在好转组和恶化组之间比较, 见表 1. 结果表明, 2 组之间 TNF- α mRNA 表达强阳性率有显著性差异 ($\chi^2 = 33.34, P < 0.01$), 即 MARS 人工肝治疗后好转组患者的 TNF- α mRNA 表达强阳性率低于恶化组.

2.2 IL-6mRNA 在好转组和恶化组中的表达

16 例好转组患者共行 90 次 MARS 人工肝治疗, 治疗前 IL-6 mRNA 均呈强阳性表达, 治疗后弱阳性表达为 63 次, 占 70.0% (63/90); 治疗后仍呈强阳性表达为 27 次, 占 30.0% (27/90) . IL-6 mRNA 在好转组中的 MARS 人工肝治疗前后的表达见图 2A. 正常对照组 IL-6 mRNA 均呈阴性表达. 17 例恶化组患者共行 82 次 MARS 人工肝治疗, 治疗前 IL-6 mRNA 均呈强阳性表达, 治疗后仍呈强阳性表达为 68 次, 占 82.9% (68/82); 治疗后呈弱阳性表达为 14 次, 占 17.1% (14/82). IL-6 mRNA 在恶化组中 MARS 人工肝治疗前后的表达见图 2B.

MARS 人工肝治疗后的 TNF- α mRNA 表达强阳

性率在好转组和恶化组之间比较, 见表 2. 结果表明 2 组之间 IL-6 mRNA 表达强阳性率有显著性差异 ($\chi^2 = 48.61, P < 0.01$), 即 MARS 人工肝治疗后好转组患者的 IL-6 mRNA 表达强阳性率低于恶化组.

3 讨论

MARS 人工肝治疗的根本目的就是为急性肝衰竭患者赢得肝再生所需要的机体内环境和时间, 随着对肝再生认识的不断深入, 人工肝治疗目的发生了观念性的变化. 对于肝细胞能够迅速再生的可逆性肝衰竭, 通过人工肝支持患者可以存活; 对于不可逆性肝衰竭, 人工肝支持则是通向肝移植的桥梁. 然而怎样判断是否有肝再生; 也就是说肝衰竭是可逆的, 还是不可逆的, 是目前临床工作的一个难点. TNF- α 和 IL-6 在肝再生中的作用已越来越受关注, TNF- α 是一个多效应的细胞因子, 在肝再生的启动过程中它发挥着重要作用, 但同时 TNF- α 也可通过多种途径诱导炎症介质活化和细胞浸润, 造成肝细胞损伤、坏死与凋亡^[3]. TNF- α 可以和其肝细胞膜上受体 TNFR1 结合诱发

表 1 TNF- α mRNA 表达阳性率在好转组和恶化组之间的比较 (次)

Tab. 1 Comparison of TNF- α mRNA expression positive rate between two groups (sequence)

组 别	强阳性次数	弱阳性次数	合计	强阳性率 (%)
好转组	32	58	90	35.6
恶化组	65	17	82	79.3**

与好转组比较, ** $P < 0.01$.

表 2 IL-6mRNA 表达阳性率在好转组和恶化组之间的比较 (次)

Tab. 2 Comparison of IL-6 mRNA expression positive rate between two groups (sequence)

组 别	强阳性次数	弱阳性次数	合计	强阳性率 (%)
好转组	27	63	90	30.0
恶化组	68	14	82	82.9**

与好转组比较, ** $P < 0.01$.

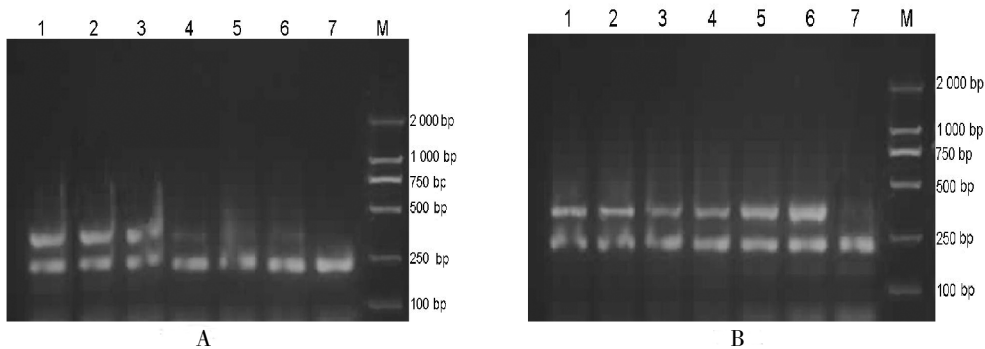


图 1 TNF- α mRNA 在好转组和恶化组中的表达

Fig. 1 TNF- α mRNA expression in the two groups

1、2、3 为治疗前血标本; 4、5、6 为治疗后血标本; 7 为正常对照; M: Marker.

A: 好转组; B: 恶化组

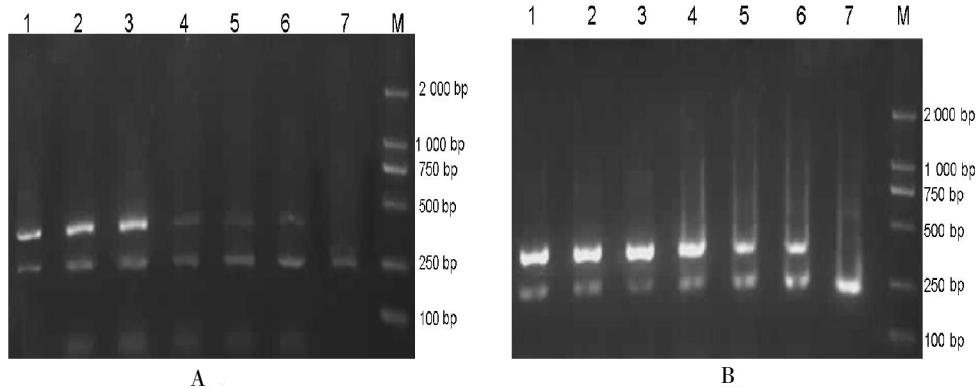


图 2 IL-6mRNA 在好转组和恶化组中的表达

Fig. 2 IL-6 mRNA expression in the two groups

1、2、3 为治疗前血标本; 4、5、6 为治疗后血标本; 7 为正常对照; M: Marker.

A: 好转组; B: 恶化组

肝细胞凋亡^[5], 还可以直接结合细胞内凋亡受体结合, 活化受体相关死亡区域, 导致细胞凋亡^[6]. 在肝再生过程中 IL-6 被认为受到 TNF- α 调控, TNF- α 与受体结合可以介导 NF- κ B 信号途径激活 IL-6 分泌^[7]. Streetz 等^[8]研究结果证明, TNF- α 和 IL-6 在不同的病理生理条件下可以发挥不同的作用, 低浓度的 TNF- α 和 IL-6 在肝再生过程中发挥重要的作用, 而高浓度的 TNF- α 和 IL-6 是肝损伤重要的炎症介质, 在介导肝组织内炎症反应及肝细胞损伤机制中发挥重要作用.

笔者前期研究^[9,10]发现, MARS 人工肝治疗后 TNF- α 和 IL-6 均较前明显降低, 但人工肝治疗中外周血 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 表达水平的研究目前尚无相关报道. 本研究发现 33 例肝衰竭患者 MARS 人工肝治疗前 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 均成强阳性表达, MARS 人工肝治疗后肝细胞能够迅速再生的好转组 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 表达强阳性率低于肝细胞再生能力较差的恶化组, 这可能和好转组治疗后低水平表达的 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 在肝再生过程中发挥重要作用, 而恶化组患者体内高水平表达的 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 诱导肝细胞凋亡和损伤的机制有关. 因此笔者的研究提示外周血 TNF- α mRNA 和 IL-6 mRNA 检测有可能作为肝衰竭患者接受 MARS 人工肝治疗后判断预后的指标.

【参考文献】

[1] KAPOOR D, WILLIAMS R, JALAN R. MARS: a new treatment for hepatorenal failure. Molecular adsorbent and recirculating system [J]. *Gastroenterology*, 2000, 119 (6): 1799 - 1800.

[2] ZHONG Z, SCHWABE R F, KAI Y, et al. Liver regeneration is suppressed in small-for-size liver grafts after transplantation: involvement of c-Jun N-terminal kinase, cyclin D1, and defective energy supply [J]. *Transplantation*, 2006, 82(2):241 - 250.

[3] SCHWABE R F, BRENNER D A. Mechanisms of Liver Injury I TNF- α induced liver injury: role of IKK, JNK, and ROS pathways [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006, 290(4):583 - 589.

[4] 中华医学会传染病与寄生虫病学分会肝病学分会. 病毒性肝炎防治方案 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8 (6): 324.

[5] 宋晨朝, 刘旭华, 陈煜, 等. 急性肝衰竭大鼠 TL4mRNA 表达、血清肿瘤坏死因子- α 、白介素-10 及肝细胞凋亡的动态变化 [J]. *首都医科大学学报*, 2008, 5 (29):580 - 584.

[6] CANDE C, COHEN I, DAUGAS E, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria [J]. *Biochimie*, 2002, 84 (223):215.

[7] LEU J L, GRISSEY M A, LEU J P, et al. Interleukin-6-induced STAT3 and AP-1 amplify hepatocyte nuclear factor 1 mediated transcriptional activation of hepatic genes, an adaptive response liver in injury [J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(2):414 - 424.

[8] STREETZ L, WUSTEFELD T, KLEIN C, et al. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver [J]. *Cell Mol Biol*, 2001, 47(4):661 - 669.

[9] 阿永俊, 李立, 李晓延, 等. 人工肝支持系统在肝衰竭和肝脏移植中的临床应用研究 [J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2005, 12(5):496 - 498.

[10] 阿永俊, 李立, 李晓延, 等. MARS 人工肝在急性肝衰竭治疗中的临床应用研究 [J]. *昆明医学院学报*, 2005, 26(2):70 - 73.

(2015-07-07 收稿)