

國科會研究成果報告

題目：肝細胞生長因子對部份切除併缺血傷害之肝臟再生之影響

執行單位：台大醫學院外科

計畫主持人：胡瑞恆

執行期限：88/08/01—89/07/31

計畫編號：NSC-89-2314-B-002-213

聯絡人：胡瑞恆

台大醫院外科

中山南路 7 號

Tel: 02-23123456 ext 5106

Fax: 02-23568810

E-mail: rhhu@ha.mc.ntu.edu.tw

摘要

肝臟是一個再生能力很強的器官。當做部分肝臟切除之後，肝臟一般都可以再增生至原來的大小。肝臟移植是目前治療末期肝衰竭唯一之方法。在兒童，膽道閉鎖造成之肝衰竭是大多數兒童時期肝臟移植之適應症。在台灣，肝臟的來源非常有限。若單只等候屍體捐肝者，很多兒童會因為等不到肝臟而死亡。親屬捐贈肝臟移植是解決此一問題之新方法。但是，一位親屬捐肝者其所能捐出之肝臟極其有限。再加上肝臟切下後需經過保存液之低溫保存，縫合血管前之缺血傷害，以及血管接通後之再灌注損傷和移植成功後可能發生之排斥作用，原本即有限之肝臟受這些傷害後是否仍足夠維持全身之代謝即成為一個嚴肅的課題。以一個肝臟移植之醫師來說，如果一部份之肝臟在經過這些傷害後仍能保有相當之再生能力，理論上就可以使親屬肝臟移植之成功率提高，甚至將之擴展到成人間之肝臟移植。

肝細胞生長因子(hepatocyte growth factor, HGF)是目前已知最強之肝細胞生長促進激素。在動物實驗中它有許多促進肝臟再生及保護肝臟減少各種傷害之特殊功能。而這種功能正是我們再肝臟移植時夢寐以求的。因此，我們設計一動物實驗以驗證肝細胞生長因子在此種類似肝臟移植之情況下仍保有促進肝臟再生及保護肝臟減少各種傷害之效果。如果有的話，肝細胞生長因子或許有臨床應用之可能性。

我們利用常用之鼠 70%肝臟切除，再加上不同長度時間之缺血傷害，在對照組手術後不給予肝細胞生長因子；實驗組則連續三天給予肝細胞生長因子。於三天後觀察各組動物之存活率，並將其餘存活之鼠犧牲，將肝臟秤重，並利用特殊染色之方法(BrdU)測量肝細胞之分裂係數。同時，將所有之血液抽出後離心收集血漿，測量其中各種肝功能指數(GOT)，作為比較肝臟受缺血損傷程度之依據。

在此實驗我們希望證明肝細胞生長因子具有保護肝臟減輕受到缺血及再灌注時之損傷，同時在此種狀況下仍保有促進肝臟再生之能力。若假真如此，則肝細胞生長因子將在活體肝臟移植上佔有重要之角色。

計劃

肝臟移植是目前治療末期肝衰竭唯一有效之方法[1]，然而由於肝臟之來源有限，許多肝衰竭病人因為等不到合適之肝臟而死亡，這種情形在幼兒之肝衰竭尤為嚴重。因為大小合適之肝臟來源更為不易，所幸的是最近幾年發展出親屬肝臟移植之技術[2]：即是自成人親屬取出一部份之肝臟移植給肝衰竭之小孩，由於小孩之體重較輕，所需要之肝臟亦較少，故許多小孩因為此種技術而受惠，此種技術之所以尚未能使用於成人是因為成人體重較重，維持全身代謝所需之肝臟亦較多，到底甚麼是最少肝臟之底限則至今尚無定論[2]，另外，雖然肝臟有再生之能力，但是這種能力在肝臟受到肝切除保存時之缺血性傷害、血液再灌注時之傷害以及移植後可能受到之排斥作用後這種再生能力是否仍然

存在則未曾有人研究過。

肝胞生長因子 (hepatocyte growth factor) 是現今發現最強之肝細胞分裂促進激素。它不但對於培養中之肝細胞有效，對於生體中之肝臟也有促進生長的作用。更另人興奮的是最近之研究發現：肝細胞生長因子可以保護肝臟使之在受到化學傷害時損傷減少，甚至在以經硬化之肝臟使之病變減輕，並且增加肝臟增生之能力[3-10]。因此，肝細胞生長因子似乎具有了在肝臟移植時所需要之種種優點：即減少肝臟受各式損傷時肝細胞數目之減少以及恢復再生能力以增加肝臟重量。如果肝細胞生長因子真的具有這些優點，利用肝細胞生長因子之這些作用，則我們或許可以將使原本可能不太足夠之肝臟在移植後可以增生到足夠之份量，因而將親屬肝臟移植擴展至成人間之肝臟移植，以使肝臟來源更為充足以挽救更多肝衰竭病人之生命。

因此本計畫設計一動物實驗以確定肝細胞生長因子是否具有這些作用以及這種作用在肝臟受到合併傷害時是否仍然有效，以評估其是否有臨床使用之可能性。

方法與步驟

一、研究動物

利用雄性 Wista rat，重量 200-250 公克，飼養於台大醫學院動物中心，每日日照及黑暗各十二小時。

二、動物實驗

1. 70%肝切除：利用 Higgins 及 Anderson 發表之手術方式[11]，切除鼠肝之左葉及前葉
2. 肝臟缺血及再灌注傷害：將鼠之肝門靜脈及肝動脈以血管夾夾住造成肝臟之血流中斷，然後自肝門靜脈中 Fr27 之針頭注射約 5.0ml UW solution，並再下腔靜脈插一細針頭以利血液及多餘之保存液流出，然後分別於三十分、六十分、以及九十分鐘後以同樣方式注入 Lactate Ringer solution 沖洗掉 UW solution，最後放開血管夾使血液重新灌注肝臟。

三、實驗分組

1. 對照組：三十隻鼠接受 70%肝切除後分為三組，每組各十隻，分別接受 30,60, 及 90 分鐘之肝臟缺血保存後縫合傷口。置於籠中飼養，並給予自由攝取食物及水份。各組於三天內記錄動物存活率。並於第三天犧牲仍然存活之動物。將所有血液抽出離心後收集，肝臟則摘取稱重後分成小塊冰凍於-80℃之冰櫃收藏。
2. 實驗組：與對照組相同，三十隻鼠接受 70%肝切除後每十隻為一組分別接受 30,60,及 90 分鐘之肝臟缺血保存後縫合傷口。置於籠中飼養，並給予自由攝取食物及水份。自手術開始每十二小時給予 20ug/kg 之肝細胞生長因子之靜脈注射（自陰莖靜脈），並於三日內紀錄動物之存活率。於三日之後犧牲所有之動物，與對照組相同之收集血液及肝臟之標本，以作為比較之用。

四、比較項目：

1. 肝臟缺血再灌注傷害之評估：所收集之血液測量其中 GOT 之濃度。比較使用肝細胞生長因子與否是否會減輕缺血再灌注所引致之肝臟毒害。
2. 肝臟再生程度之評估：以三天後之肝臟重量 (gmliver/100gm BW)、肝細胞分裂係數 (proliferation index)。
3. 肝細胞分裂係數 (proliferation index)：

肝細胞分裂係數 (proliferation index) 可以用三種不同之方法來測量，即 BrdU 之特殊染色[12]、PCNA 之特殊染色[13]、以及鼠之 Ki-67 特殊染色[14]。計算每一百個肝細胞中呈特殊染色陽性細胞之比例。

結果：

一、存活率

當鼠接受三十分鐘之缺血傷害後再接受七十%肝臟切除之後，百分之七十 (7/10) 的鼠會在兩日之內死亡，無法繼續作有意義之觀察。因此將缺血時間縮短為十五分鐘，如此可以將死亡率降低到百分之十 (1/10)。故以下的實驗均採缺血時間十五分鐘為準。而未採用更長時間之缺血傷害。

二、每百公克體重之肝臟重量

在對照組 (未使用 HGF) 之鼠，其接受百分之七十肝臟切除後第零、一、二、三日每百公克體重之肝臟濕重分別為 1.67 $\pm$ 0.31 公克、2.17 $\pm$ 0.42 公克、3.13 $\pm$ 0.36 公克及 3.25 $\pm$ 0.38 公克。乾重則分別為 0.77 $\pm$ 0.24 公克、1.35 $\pm$ 0.30 公克、1.49 $\pm$ 0.32 公克及 1.94 $\pm$ 0.28 公克。在實驗組 (連續三日使用 HGF)，肝臟切除後第零、一、二、三日之肝臟濕重分別為 1.67 $\pm$ 0.31 公克、2.42 $\pm$ 0.36 公克、3.53 $\pm$ 0.41 公克及 3.74 $\pm$ 0.42 公克。乾重則分別為 0.77 $\pm$ 0.24 公克、1.48 $\pm$ 0.28 公克、1.63 $\pm$ 0.33 公克及 2.22 $\pm$ 0.31 公克。雖然實驗組之肝臟重量在相對之時間均比對照組稍重，但是可能因為各組之病例數不足以致在統計上顯不出顯著的差異。

三、術後肝功能之評估

在對照組 (未使用 HGF) 之鼠，其接受百分之七十肝臟切除後第一、二、三日之血液中 GOT 之濃度分別為 684 $\pm$ 210，487 $\pm$ 268，278 $\pm$ 168 IU/L。而在在實驗組 (連續三日使用 HGF) 則分別為 588 $\pm$ 184，326 $\pm$ 192，176 $\pm$ 117 IU/L。在實驗組其 GOT 濃度較對照組為低，但未達統計學上有意義之差別。

四、肝細胞分裂相之分析

在對照組 (未使用 HGF) 之鼠，其接受百分之七十肝臟切除後第零、一、二、三日組織切片中 anti-BrDU 染色陽性之細胞數分別為 0-3，53-114，25-48，及 3-6/HPF。在實驗組則為 0-2，68-154，66-121，及 23-34/HPF。平均分裂細胞數目有名顯增加。但由於本實驗並未延長至一星期，故未知

其最終之結果如何。

討論

雖然本實驗初步之結果顯示在肝臟缺血合併肝切除後使用 HGF 可以略為增加肝臟再生之比例以及減低缺血對肝臟所造成之損傷。但是可能是因為實驗室之變異較大及病例數目太少(每組十隻)，以致在統計上未能達到有意義之程度。日後可以再增加病例數應該可以顯出有意義之差別。另外，本實驗只進行到手術後三天，並未到達肝切除後肝再生之極限(一般為一星期)，因此未知這樣的差別在手術後一星期是否仍然存在？這一點值得繼續探究。

參考資料

2. Howard TH: The case in favor of local allocation of liver allografts. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 1998;3:153-155
3. Tanaka K, Fujimoto Y, and Inomata Y: Management and evaluation of living-related donor for liver transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* 1998;3:163-167
4. Yoshikawa A, Kaido T, Seto S, et al: Hepatocyte growth factor promotes liver regeneration with prompt improvement of hyperbilirubinemia in hepatectomized cholestatic rats. *J Surg Res* 1998;78:54-9
5. Kay MA and Fausto N: Liver regeneration: prospects for therapy based on new technologies. *Molecular Medicine Today* 1997;3:108-15
6. Abulla S: Hepatocyte growth factor, tissue repair and cancer. *Molecular Medicine Today* 1997;3:233
7. Annen K, Nojima T, Hata Y, et al: Analysis of the hepatocyte growth factor receptor in regeneration and oncogenesis of the liver. *General & Diagnostic Pathology* 1996;141:179-86
8. Kaibori M, Kwon AH, Nakagawa M, et al: Stimulation of liver regeneration after partial hepatectomy in cirrhotic rats by continuous infusion of recombinant human hepatocyte growth factor.
9. Kaido T, Seto S, Yamaoka S, et al: Perioperative continuous hepatocyte growth factor supply prevents postoperative liver failure in rats with liver cirrhosis. *Journal of Surgical Research* 1998;74:173-8
10. Matsumoto K, and Nakamura T: Hepatocyte growth factor: molecular structure, roles in liver regeneration and other biological functions. *Crit Review Oncogene* 1992;3:27
11. Fujiwara K, Nagoshi S, Ohno A, et al: Stimulation of liver growth by exogenous human hepatocyte growth factor in normal and partially hepatectomized rats. *Hepatology* 1993;18:1443

12. Higgins GM and Anderson RM: Experimental pathology of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Archives of Pathology* 1931;12:186-202
13. Lanier TL, Berer EK and Eacho PI: Comparison of 5-bromo-2-deoxyuridine and [³H]thymidine for studies of hepatocellular proliferation in rodents. *Carcinogenesis* 1989;10:1341-1343
14. Galand P and Degraef C: Cyclin/PCNA immunostaining as an alternative to tritiated thymidine pulse labelling for marking S phase cells in paraffin sections from animal and human tissues. *Cell Tissue Kinet* 1989;22:383-392
15. 14.Gerlach C, Sakkab DY, Scholzen T, et al: Ki-67 expression during rat liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 1997;26:573-8