

文章编号:1005-6947(2005)05-0388-03

· 简要论著 ·

缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤后 c-fos 和 c-jun 蛋白表达的影响

牛英¹, 叶启发², 肖建生¹, 张毅¹, 鲁力¹, 周进学¹

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院, 湖北 武汉 430030; 2. 中南大学湘雅三医院、湘雅移植医学研究院, 湖南 长沙 410013)

摘要:为观察缺血预处理(IP)对大鼠肝脏热缺血再灌注(I/R)损伤后 c-fos 和 c-jun 蛋白表达的影响,以探讨 IP 对 I/R 肝损伤的保护作用及其机制。笔者将 96 只 SD 大鼠随机分成 I/R 组及 IP 组,于复灌后 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24h 取材,通过免疫组化技术结合图像分析定量检测再灌注后各时间点 c-fos 和 c-jun 蛋白的表达。结果显示 I/R 损伤早期可使损伤区肝实质细胞核内大量表达 c-fos 和 c-jun 蛋白。与 I/R 组相比,IP 组中损伤早期(0.5, 1, 2h) c-fos 和 c-jun 蛋白表达均低于 I/R 组($P < 0.05$)。提示 IP 可以减轻再灌注对肝脏的损伤,其机制可能与调节即刻早期基因 c-fos 和 c-jun 的表达有关。

关键词:再灌注损伤;肝/血液供给;缺血预处理;肝/病理学;c-fos 蛋白表达;c-jun 蛋白表达

中图分类号:R619.9; R322.47

文献标识码:B

近年来,有关缺血再灌注(ischemia reperfusion, I/R)损伤过程中的细胞内外信号传导机制成为研究热点。有研究表明,包括 c-fos 和 c-jun 基因在内的许多即刻早期基因在 I/R 损伤过程早期被激活,参与调节细胞、组织对损伤刺激的信号传导及应答^[1]。而缺血预处理(ischemia precondition, IP)是常用的保护器官缺血再灌注损伤的方法之一。本研究以大鼠肝脏原位 I/R 损伤模型结合 IP 方法,通过免疫组化及图像分析技术研究 IP 对即刻早期基因 c-fos 和 c-jun 蛋白产物表达的影响,旨在探讨 IP 对 I/R 肝脏损伤的保护效果及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组

纯种雄性 SD 大鼠 96 只,普通喂养,自由进食,体重 200 ~ 250g,由中南大学湘雅医学院实验动物研究中心提供。动物随机分为 16 组:首先划分缺血 1h(I/R)组和缺血预处理(10 ~ 10 min) + 缺血

1h(IP)组,然后从 I/R 组与 IP 组各分 8 小组,每组 $n = 6$,分别于复流 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24h 时定点取材。实验前动物禁食 12h,自由饮水。室内严格光线控制,给予 12h 的亮暗间隔。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠肝脏 I/R 损伤模型的制备 参照 Ohmori^[2]报道的方法制作 70% 的部分肝脏 I/R 模型:乙醚吸入麻醉,取腹壁正中切口入腹,分离肝十二指肠韧带,充分暴露肝门部,仔细游离出支配肝左、中叶的门静脉,肝动脉以及胆管,以无损伤小动脉夹阻断 60min,开放再灌注后于各时间点取肝中叶组织置于液氮保存待检测。IP 组则在 I/R 前先分别阻断 - 开放血流 10min,而后重复 I/R 组的各操作。

1.2.2 肝组织的病理学检查 取大鼠左肝组织,用 10% 中性福尔马林溶液固定,石蜡包埋,行 HE 染色。

1.2.3 c-fos 及 c-jun 免疫组织化学检测 兔抗 c-fos, c-jun 多克隆抗体、c-fos, c-jun 免疫组化试剂盒均购自北京中山生物试剂有限公司。按常规 ABC 法进行染色:肝组织用 10% 中性福尔马林溶液固定,常规切片 3 μ m,脱蜡至水,然后用 PBS 水化 10min;用含 0.5% H₂O₂ 的甲醇溶液室温孵育

收稿日期:2004-12-06; 修订日期:2005-04-28。

作者简介:牛英(1979-),男,河北广宗,华中科技大学同济医学院附属同济医院硕士研究生,主要从事腹部器官移植方面的研究。

通讯作者:牛英 E-mail:niuying1@yahoo.com。

30 min 后, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加正常血清封闭液, 室温孵育 30 min 后, 甩去多余液体, 不洗; 滴加兔抗人 c-fos/c-jun 多克隆抗体 (滴度 1: 50), 4℃ 孵育过夜; PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加生物素标记的羊抗兔 IgG, 于 37℃ 孵育 30 min 后, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加 S-A/HRP 工作液, 于 37℃ 孵育 30 min 后, PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 在 0.05% DAB 溶液中加入 H₂O₂ 至终浓度为 0.03%, 以此作为显色液, 镜下控制显色; 显色满意后, 用梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。

1.2.4 c-fos 及 c-jun 免疫组化阳性产物定量分析
于物镜 20 倍视野下, 每张切片随机选取 5 个视野, 用 HPIAS-1000 型彩色图像分析系统测定指标 c-fos/c-jun 的表达情况, 结果用阳性细胞率来显示。阳性细胞率 (%) = 视野中阳性细胞数 / 视野中总细胞数 × 100%。

1.2.5 统计学方法 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 SAS 统计软件包分析处理, 组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 病理检查

光镜下见 I/R 组于复灌早期 (复灌后 1, 2h) 肝细胞肿胀, 有的呈气球样变性, 尚未见明显坏死。随着再灌注时间的延长, 肝细胞肿胀加剧, 结构紊乱, 排列不整齐, 肝小叶见点状坏死, 可见出血、炎症细胞浸润, 以中心静脉周围为著 (复灌后 4h)。复灌后 12h 肝小叶坏死加剧, 炎症细胞浸润更明显。与 I/R 组相比, IP 组的肝细胞肿胀较轻, 肝细胞坏死范围较小。

2.2 免疫组化染色

I/R 组大鼠 c-fos, c-jun 免疫组化阳性产物 c-fos 蛋白及 c-jun 蛋白均位于靠近中央静脉区的肝实质细胞的胞核内, 呈棕黑色。I/R 组和 IP 组 c-fos, c-jun 免疫组化阳性细胞率见表 1, 2。I/R 组损伤早期 (0.5, 1, 2h) 肝细胞核内 c-fos, c-jun 的表达阳性细胞率明显高于 IP 组的相同时点, 差异均有显著性 ($P < 0.05$)。损伤中、后期 (4h 以上) 两组 c-fos, c-jun 阳性细胞率无显著统计学差异 ($P > 0.05$)。

表 1 IP 组与 I/R 组复灌后肝细胞 c-fos 蛋白的表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	复灌时点 (h)							
		0	0.5	1	2	4	8	12	24
I/R	6	4.5 ± 0.5	5.1 ± 1.0	5.9 ± 1.4	5.0 ± 1.6	6.1 ± 0.8	1.6 ± 0.8	0.9 ± 0.6	0.3 ± 0.1
IP	6	4.7 ± 0.4	1.4 ± 0.5	1.4 ± 0.6	2.6 ± 0.7	5.8 ± 1.5	1.2 ± 0.6	0.9 ± 0.6	0.4 ± 0.2
P 值		>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

表 2 IP 组与 I/R 组复灌后肝细胞 c-jun 蛋白的表达 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	复灌时点 (h)							
		0	0.5	1	2	4	8	12	24
I/R	6	7.6 ± 1.0	9.9 ± 0.6	10.1 ± 1.8	5.9 ± 1.1	6.2 ± 0.8	6.9 ± 0.4	6.1 ± 1.0	3.5 ± 0.7
IP	6	7.3 ± 0.9	6.1 ± 1.5	5.6 ± 1.4	4.2 ± 0.5	6.1 ± 0.9	7.0 ± 0.4	6.8 ± 1.3	3.5 ± 0.8
P 值		>0.05	<0.05	<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

实验表明, 多种实质器官在 I/R 早期均伴有 c-fos 和 c-jun 基因的高表达。本实验观察到, 在 I/R 损伤发生后 24h 的不同时点 c-fos 和 c-jun 蛋白的表达量有差别。I/R 早期 (4h 内) c-fos 和 c-jun 蛋白均呈高表达状态; 中期 (4 ~ 12h) c-fos 蛋

白表达呈逐步衰减趋势, 而 c-jun 蛋白则持续高表达; 晚期 (12h 以上) c-fos 表达极少, 而 c-jun 蛋白则仍有一定水平的表达。造成此种表达差异性的原因可能与基因自身特点及功能有关: (1) c-jun 基因可被 c-jun 蛋白自身激活表达, c-fos 基因表达则可被 c-fos 蛋白抑制。(2) c-fos 蛋白只能与

c-jun 蛋白结合成异二聚体,而 c-jun 蛋白除能与 c-fos 蛋白结合外,还可自身结合为同二聚体,参与更多基因转录^[3,4]。有关 I/R 损伤时 c-fos 和 c-jun 基因被诱导表达的机制复杂,目前仍未完全明了,I/R 损伤时氧自由基,大量炎症因子(如白细胞介素-1,6 及肿瘤坏死因子等)及胞内钙超载均可刺激 c-fos 及 c-jun 基因的表达。c-fos, c-jun 原癌基因均属于核内转录因子类,其表达产物 c-fos 蛋白和 c-jun 蛋白结合形成转录激活蛋白 AP-1 后发挥刺激转录的作用^[5],参与调节细胞内诸多下游基因的转录。研究证明,某些减轻 I/R 损伤的方法,如添加超氧化物歧化酶(SOD)等可下调 c-fos 和 c-jun 基因的表达^[6];而应用微注射 c-fos 蛋白或 c-jun 蛋白中和抗体的方法,可抑制小鼠成纤维细胞对血清中生长因子刺激的细胞增生反应^[7]。因此,c-fos 和 c-jun 的转录增强提示细胞受损较为严重。AP-1 复合物可增强转化生长因子 β 、白细胞介素 2、内源性抗氧化酶等的表达,并可促进血管壁内皮细胞增生,以对抗 I/R 损伤。c-fos 和 c-jun 的高表达既是再灌注损伤的结果,亦可看作是衡量组织损伤水平的标志。

本实验结果发现在 I/R 早期损伤区肝实质细胞可大量表达 c-fos 及 c-jun 蛋白,此变化可被 IP 显著抑制,与 Ishii 及胡国璜等^[8-10]前期研究结论相符合。c-fos 和 c-jun 基因在 IP 组中表达下降证明 IP 可以保护肝组织的再灌注损伤。本实验观察到 IP 对再灌注损伤时 c-fos 和 c-jun 表达的抑制作用主要集中在再灌注损伤的早期(4h 以内),提示 IP 在再灌注早期对损伤有明显抑制作用。此外,研究证明 c-fos, c-jun 基因表达增强亦可上调血管内皮细胞膜表面分子 ICAM-1 的表达^[11],提示早期 c-fos 和 c-jun 表达的下调在后期可减轻中性粒细胞的黏附,这亦可能是 IP 发挥对 I/R 损伤“延迟性”保护作用的机制。

参考文献:

- [1] Itoh H, Yagi M, Fushida S, *et al.* Activation of immediate early gene, c-fos, and c-jun in the rat small intestine after ischemia/reperfusion [J]. *Transplantation*, 2000, 69(4): 598-604.
- [2] Ohmori M, Miyashita F, Uchida H, *et al.* Effect of erythromycin on ischemia-reperfusion injury of liver in rats [J]. *Transplant Proc*, 2000, 32(4): 811-814.
- [3] Wisdom R. AP-1: One switch for many signals [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 253(1): 180-185.
- [4] Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases (Review) [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(28): 16483-16486.
- [5] Macara I. Oncogenes and cellular signal transduction (Review) [J]. *Physiol Rev*, 1989, 69(3): 797-820.
- [6] Huang C, Fujimura M, Chang Y, *et al.* Overexpression of copper-zinc superoxide dismutase attenuates acute activation of activator protein-1 after transient focal cerebral ischemia in mice [J]. *Stroke*, 2001, 32(3): 741-747.
- [7] Kovary K, Bravo R. The fos and jun protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts [J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(9): 4466-4472.
- [8] Ishii S, Abe T, Saito T, Tsuyoshi A, Takuro S, *et al.* Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 2001, 8(5): 461-468.
- [9] 胡国璜,吕新生. 常温下缺血预处理对肝细胞凋亡调节基因表达影响的临床研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10(4): 327-330.
- [10] 胡国璜,吕新生. 常温下缺血预处理对肝细胞凋亡调节基因表达影响的实验研究[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2003, 9(11): 674-677.
- [11] Wang N, Verna L, Hardy S, *et al.* Adenovirus-mediated overexpression of c-Jun and c-Fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 1999, 19(9): 2078-2084.