

文章编号:1005-6947(2007)03-0245-03

· 基础研究 ·

肝脏缺血预处理所致 PKC 活性改变及细胞内信号转导机制的实验研究

潘明新, 张翌, 李爱辉, 高毅

(南方医科大学附属珠江医院 普通外科, 广东 广州 510282)

摘要:目的 研究大鼠肝脏缺血预处理保护效应中蛋白激酶 C (PKC) 的活性改变及细胞内信号可能的转导机制。方法 通过建立大鼠肝脏缺血预处理模型, 应用 PKC 抑制剂、激动剂, 检测 PKC 和 P44/42 MAPKs 磷酸化水平的变化, 同时观察光镜下细胞形态学损害。结果 与缺血再灌注 (IR) 组比较, 预处理 (IP) 组和 PKC 激动剂组的 PKC 磷酸化水平显著提高 ($P < 0.01$), P44/42 MAPKs 磷酸化水平、HSP70 表达量明显增加, 肝细胞结构改变较小。与 IP 组相比, PKC 抑制剂组相应指标呈相反变化, PKC 磷酸化水平显著降低 ($P < 0.01$), 肝组织细胞结构出现较明显的改变。结论 体内缺血预处理保护作用中, PKC 的激活对 P44/42 MAPKs 通路激活起重要作用, PKC 对 P44/42 MAPKs 起正性调控作用, HSP70 表达受 P44/42 MAPKs 的调控。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(3):245-247]

关键词: 肝缺血; 缺血预处理; 蛋白激酶 C; 信号转导; 鼠科

中图分类号: R333.4

文献标识码: A

Study on the PKC in signal transduction pathway in hepatocyte ischemic preconditioning

PAN Ming-xin, ZHANG Yi, LI Ai-hui, GAO Yi

(Department of General Surgery, Zhujiang Hospital, The Southern Medical University, Guangzhou 510282 China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of alternation of PKC activity in liver ischemia preconditioning (IP). **Methods** After establishment of rat liver IP model, PKC inhibitor and activator were utilized to analyze the phosphorylation of PKC and P44/42 MAPKs and HSP expression, and cellular structure was also observed. All of the data were statistically analyzed. **Results** Compared with the control group without IP, the phosphorylation of PKC was significantly increased in IP treated models and PKC activated group ($P < 0.01$), and P44/42 MAPKs and expression of HSP 70 were also obviously increased, but with little change of hepatic cellular structure. In contrast, opposite changes were found in PKC inhibited groups, the phosphorylation PKC was decreased in PKC inhibited group ($P < 0.01$) and marked changes in hepatic cellular structure. **Conclusions** The IP model has shown that PKC activation plays a pivotal role in the activation of P44/42 MAPKs pathway that participates in the preservation of liver cells. At the same time, HSP expression is regulated by signals in P44/42 MAPKs pathway.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(3):245-247]

Key words: Liver Ischemia; Ischemic Preconditioning; Protein Kinase C; Signal transduction; Muridae

CLC number: R333.4

Document code: A

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(001086)。

收稿日期:2006-05-29; **修订日期:**2006-12-07。

作者简介:潘明新,男,江西省星子人,南方医科大学附属珠江医院副教授,主要从事肝胆外科及肝移植、血管外科方面的研究。

通讯作者:潘明新 E-mail:Kong2005@126.com。

组织、器官经受一次或数次短暂的缺血再灌注后,能提高对随后较长时间缺血再灌注损伤的耐受能力,这种现象称为缺血预处理(ischemiaPreconditioning, IP)。IP对肝脏缺血性损伤的保护作用已得到证实^[1-2]。对于保护效应的细胞内信号转导机制的研究主要局限在心肌细胞方面^[3-4]。而对肝脏IP保护效应的细胞内信号转导机制目前尚报道较少,本实验旨在初步探讨大鼠肝脏IP保护效应的细胞内信号转导机制。

1 材料与方法

1.1 动物和材料

清洁级雄性SD大鼠,9~12周龄,体重220~230g,购自南方医科大学(原第一军医大学)动物所;豆蔻酸佛波酯乙脂(PMA),PKC激动剂,购自GIBCO BRL公司;白屈菜季铵碱(chelerythrinechloride, CHE),PKC抑制剂,购自Calbiochem公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物分组 30只大鼠随机分成5组(每组6只)。(1)假手术组;(2)缺血再灌注组(ischemic reperfusion, IR组);(3)缺血预处理组(ischemic precondition, IP组);(4)IR+PMA组;(5)IP+CHE组。

1.2.2 模型制备 均采用乙醚开放吸入麻醉,建立静脉通道,上腹横切口进腹,分离肝十二指肠韧带,充分暴露肝门部,假手术组仅分离肝十二指肠韧带,不阻断肝门,不行其他干预处理。IR组在第一肝门用小血管夹阻断尾状叶及左肝叶血流40min松开血管夹肝脏再灌注3h,再灌注开始后关腹。IP组先行3个循环的IP,阻断第一肝门10min,开放再灌注10min为1个循环,随后操作同IR组。IR+PMA组按4 μ g/kg共5mLPMA溶液,于肝门阻断前,经静脉通道缓慢推注,推注10min,推注后等待10min,余处理同IR组。IP+CHE组于肝门阻断前按5mg/Kg共5mLCHE溶液,用10min经静脉通道缓慢推注,推注后等待10min,其余处理同IP组。

1.2.3 检测指标 (1)检测血清谷草转氨酶(AST)和血清谷丙转氨酶(ALT)活性:各组于肝脏再灌注结束后3h后再次进腹,于肝下下腔静脉采血检测血清AST和ALT活性。(2)检测肝组织PKC活力:按以上方法分组处理后,按PKC活性

测定试剂盒操作步骤检测。(3)Western blot免疫印迹法检测肝组织磷酸P44/42 MAPKs:按以上方法分组处理后,按P44/42 MAPKs活性测定试剂盒操作步骤检测。(4)细胞形态学检查:按以上各组描述方法分组处理后,各实验组动物于肝脏再灌注3h后再次进腹,按光镜要求取材、制片进行细胞形态学观察。

1.3 统计学处理

各组数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计使用SAS 6112统计软件包进行方差检验。 $P < 0.05$ 表示统计学存在差异。

2 结果

2.1 ALT及AST的活性变化

与假手术组比较,IR组血清ALT,AST显著增高($P < 0.01$);与IR组比较,IP组和IR+PMA组的ALT,AST减低,有显著性差异($P < 0.01$);IR组和IP+CHE组之间无明显差异($P > 0.05$)(表1)。

表1 ALT及AST的活性变化的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	AST(U/L)	ALT(U/L)
假手术组	99.3 \pm 13.2	61.9 \pm 12.1
IR	820.9 \pm 111.3 ¹⁾	762.8 \pm 130.5 ¹⁾
IP+CHE	678.6 \pm 136.5 ¹⁾	645.61 \pm 90.4 ¹⁾
IP	407.7 \pm 73.7 ²⁾	281 \pm 35.6 ²⁾
IR+PMA	553.2 \pm 58.67 ²⁾	354.37 \pm 53 ²⁾

注:1)与假手术组比较 $P < 0.01$;2)与IR组比较 $P < 0.01$ 。

2.2 肝组织PKC磷酸化活性的变化

IR组、IP+CHE组与假手术组PKC活性比较,差异无显著性($P > 0.05$)。与IR组比较,IP组和IR+PMA组PKC活性明显升高($P < 0.01$)。

表2 肝组织PKC磷酸化活性的变化的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	PKC磷酸化活性[fmol/(mg·min)]
假手术组	36.28 \pm 3.8
IR	42.78 \pm 2.22
IP+CHE	34.07 \pm 2.77
IP	112.61 \pm 4.86
IR+PMA	165.47 \pm 27.25

注:与IR组比较, $P < 0.01$;

2.3 肝组织P44/42 MAPKs的活性变化

在分子质量为60 kD附近仅可观察到假手术

组少量 P44/42 MAPKs。与假手术组比较,其在 IR 组的表达量轻度升高;IP 组较 IR 组升高显著;IP + CHE 组较 IP 组明显降低;IR + PMA 组表达量较 IR 组明显升高(图 1)。

2.4 肝组织、细胞结构的改变

假手术组肝脏无明显变性、坏死,库普弗细胞无明显增生,汇管区基本正常(图 2A)。IR 组可见肝小叶细胞明显浊肿,偶见气球样改变,较之对照组库普弗细胞增多、肥大,易见点状、灶状坏死区,汇管区明显扩大、水肿,存在炎症单个核细胞浸润(图 2B)。IP 组和 IR + PMA 组均可见细胞轻

度浊肿,无坏死,库普弗细胞少量增生,汇管区基本正常(图 2C-D)。IP + CHE 组可见肝细胞浊肿,库普弗细胞增生活跃,见点状、灶状坏死区,汇管区扩大,病理改变基本类似 IR 组(图 2E)。

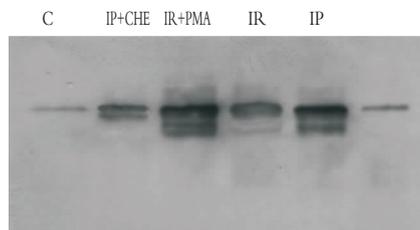


图 1 P44/42 MAPKs Western 免疫印迹法表达量变化

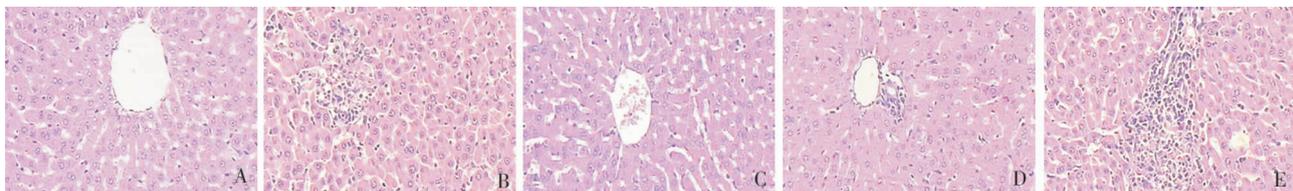


图 2 肝细胞结构的改变(HE ×200) A:假手术组; B:IR 组; C:IP 组; D:IR + PMA 组; E:IP + CHE 组

3 讨论

众所周知,IP 对机体器官对抗缺血性损伤具有保护作用。近年的研究普遍认为,IP 的细胞保护机制为多种因素综合作用的结果^[5-6],主要与 PKC 的激活及蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 有关^[7-9],本实验通过建立大鼠体内肝脏缺血预处理模型,使用 PKC 抑制剂、激动剂以观察其对预处理的影响及机制。

本实验发现,缺血预处理可以明显减轻缺血再灌注引起的肝脏损伤,运用 PKC 激动剂也可以减轻未经 IP 处理的大鼠肝组织损伤,还发现 MAPK 家族中的 P44/42 MAPKs 表达量明显上升;而用 PKC 抑制剂则消除了 IP 的保护作用,PKC 的活性明显降低,P44/42 MAPKs 表达量也明显下降,从而证明了 PKC 在 IP 中的作用。

PKC 的活化是缺血预处理保护机制的中间环节,PKC 的活化,引起其下游众多的信号通路的激活,使得细胞外刺激信号向核内传递,产生内源性保护效应。因此笔者认为,PKC 信号通路的激活在 I/R 中对细胞的保护发挥了至关重要的作用,P44/42 MAPKs 信号通路的激活是细胞保护效应的一个重要环节;在该保护过程中,P44/42 MAPKs 随着 PKC 活性增加而升高,故认为 P44/42 MAPKs 处在 PKC 下游参与 IP 的保护作用。

参考文献:

- [1] 赵佐庆,陈洪茂. 肝癌组织和正常肝组织的缺血再灌注损伤的比较研究[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(7): 497-500.
- [2] 李文美,陈坚,路遂阳,等. 缺血预处理对肝硬化大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(1): 23-25.
- [3] Ping P, Zhang J, Cao X, *et al*. PKC-dependent activation of p44/p42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(5): H1468-1481.
- [4] Carini R, De Cesaris MG, Splendore R, *et al*. Signal pathway involved in the development of hypoxic preconditioning in rat hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2001, 33(1): 131-139.
- [5] Roberto Bolli. The Late Phase of Preconditioning [J]. *Circ Res*, 2000, 87(11): 972-983.
- [6] Park KM, Kramers C, Vayssier Taussat M, *et al*. Prevention of kidney ischemia/reperfusion-induced functional injury, MAPK and MAPK kinase activation, and inflammation by remote transient ureteral obstruction [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(3): 2040-2049.
- [7] Schulz JE, Hsu AK, Barbieri JT, *et al*. Pertussis toxin abolishes the cardioprotective effect of ischemic preconditioning in intact rat heart [J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(2 Pt 2): H495-500.
- [8] Ping P, Zhang J, Cao X. PKC-dependent activation of p44/42 MAPKs during myocardial ischemia-reperfusion in conscious rabbits [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276(5 Pt 2): H1468-481.
- [9] Carroll R, Yellon DM. Myocardial adaptation to ischaemia-the preconditioning phenomenon [J]. *Int J Cardiol*, 1999, 10(Suppl 1): S93-101.