

文章编号:1005-6947(2008)07-0645-05

· 肝缺血再灌损伤专题研究 ·

缺血后处理对缺血再灌注大鼠肝细胞即刻早期基因 c-fos 和 c-jun 表达的影响

朱云祥¹, 牛英², 倪庆¹, 李强¹, 叶启发²

(1. 扬州大学医学院附属扬州市第一人民医院 普通外科, 江苏 扬州 225001; 2 中南大学湘雅三医院, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 观察缺血后处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的影响。方法 120 只 Wistar 大鼠随机分为缺血再灌注组 (IRI), 缺血后处理组 (IPO) 和假手术组 (S), 于复灌后 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h 取材, 应用 RT-PCR 法检测各组 c-fos, c-jun mRNA 的表达。结果 (1) 在 IRI 组再灌注后 0.5 ~ 2 h, c-fos 和 c-jun 的表达均增高, 1 h 达高峰; 4 h 后仅 c-jun 有持续较高的表达, c-fos 的表达开始下降; (2) IPO 组各时点 c-fos mRNA 的表达均较 IRI 组低, 但无统计学差异 ($P > 0.05$); (3) 与 IRI 组相比, IPO 组 c-jun mRNA 在 0.5, 1 h 和 2 h 组明显降低 ($P < 0.05$)。结论 缺血后处理能有效地保护肝脏免受缺血再灌注造成的损伤, 这种保护效应的机制可能与影响即早基因的转录有关。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(7): 645-649]

关键词: 缺血再灌注损伤; 缺血后处理; c-fos; c-jun

中图分类号: R 364.2

文献标识码: A

The impact of ischemic postconditioning on the immediate early gene c-fos and c-jun expressions in hepatocytes after ischemia reperfusion injury in rats

ZHU Yunxiang¹, NIU Ying², NI Qing¹, LI Qiang¹, YE Qifa²

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Yangzhou University Medical School, Yangzhou, Jiangsu 225001, China; 2. the Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of the ischemic postconditioning (IPO) on the ischemia reperfusion injury (IRI) in rat livers. **Methods** One hundred and twenty Wistar rats were randomly divided into ischemia reperfusion group (IRI), ischemic postconditioning (IPO) group and sham operation (S) group. Liver tissues were harvested at 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12 h and 24 h after reperfusion in both IPO and IRI groups. The mRNA expressions of the immediate early gene c-fos and c-jun were detected with RT-PCR methods. **Results** (1) The expression of c-fos and c-jun both maintained a high level from 0.5 h to 2 h after reperfusion in IRI group, and the peak time occurred at 1 h after reperfusion. After 4 hours of reperfusion, the c-fos expression began to decrease gradually while the c-jun expression still remained high. (2) At every time point, the c-fos expressions in IPO group were lower than IRI group ($P > 0.05$). (3) Compared with IRI group, the c-jun expression at 0.5, 1 h and 2 h after reperfusion in IPO group was significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusions** IPO can impact the immediate early gene expression at the very early moment after reperfusion, which may be part of the mechanisms of IPO protection effect on ischemia reperfusion injury.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(7): 645-649]

收稿日期: 2008-03-16; 修订日期: 2008-06-24。

作者简介: 朱云祥, 男, 扬州大学医学院附属扬州市第一人民医院副主任医师。主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者: 叶启发 E-mail: zhuyunxiang@medmail.com.cn

Key words: Ischemia Reperfusion Injury; Ischemic Postconditioning; c-fos; c-jun

CLC number: R 364.2

Document code: A

近几年来,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。MAPK是细胞外信号引起核反应的细胞信息传递的共同通路,MAPK的作用之一就是激动转录因子c-jun和c-fos,两者结合组成激活蛋白-1(Activator Protein-1, AP-1)复合物^[1],在细胞内广泛参与多种刺激引起的胞内信号传导过程。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(Immediate Early Genes, IEGs)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^[2],进而发挥包括增殖、修复或凋亡的生理功能^[3]。

缺血后处理(ischemic postconditioning IPO)是近年发现的一种重要内源性保护机制。本课题以大鼠肝脏在体原位I/R损伤模型,研究IPO对MAPK细胞信号传导途径中c-fos和c-jun蛋白产物表达的影响,旨在探讨IPO对I/R肝脏损伤的保护效果及其可能机制,为I/R防治提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年、雄性Wistar大鼠120只,体重220~250g,由中南大学湘雅医学院动物实验中心提供,动物均通过检疫合格。普通喂养,自由进食,严格的光线控制,给予12h的亮暗间隔。

1.2 主要试剂

鼠c-fos, c-jun多克隆抗体, SABC(鼠)试剂盒, DAB显色试剂盒等购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.3 大鼠动物模型的建立

(1) I/R模型(48只):参照Nauta法^[4]进行,大鼠气管内乙醚吸入麻醉,经阴茎背静脉注入肝素钠200U/kg,使实验鼠肝素化。正中剖腹,分离肝十二指肠韧带,暴露第一肝门部,游离出支配肝中叶、左叶的肝蒂,包括门静脉,肝动脉及胆管,用无创小血管夹阻断中叶、左肝叶血流,造成70%肝脏缺血,但不阻断右肝叶血流。热缺血时间控制在30min。(2) IPO模型(48只):于肝脏30min热缺血后,长时间灌注开始前,首先开放支配肝中叶、左叶的门静脉、肝动脉及胆管30s,再

夹闭30s,(30sR~30sI)重复3次(共3min),然后完全放开恢复肝脏血流。(3)假手术组(S组)模型(24只):进腹后仅分离肝十二指肠韧带,不行其它操作。IRI组与IPO组分别于复流0,0.5,1,2,4,8,12,24h时各处死6只取材。

1.4 标本收集及处理

取大鼠的肝中叶组织,立即于冰PBS中清洗剔除血块,用DEPC水浸泡过的无菌冻存管封装后立即置于液氮罐中保存备用。取肝左叶组织,用10%中性福尔马林固定,石蜡包埋,切片后行免疫组化检测。

1.5 RT-PCR检测肝组织c-fos和c-jun mRNA

Trizol法提取肝组织总RNA,逆转录合成cDNA(RT)。大鼠c-fos, c-jun和 β -actin基因序列分别来自NCBI基因库。c-fos, c-jun及 β -actin的PCR引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

c-fos引物序列为:

C-fos-RT-F 5'-CGGGGACAGCCTTTCCTACT-3'

C-fos-RT-R 5'-CCTTCGGATTCTCCGTTTCT-3'

c-fos扩增产物长度为364bp。

c-jun引物序列为:

JUN-RT-F 5'-CGCCAACCTCAGCAACTTCA-3'

JUN-RT-R 5'-AGCTGTGCCACCTGTTCCCT-3'

c-jun扩增产物长度为423bp。

内参照 β -肌动蛋白(-actin):

5'-GCGCGGCTACAGCTTCA-3'(正义链)

5'-CTTAATGTCACGCACGATTTC-3'(反义链)

β -actin扩增产物长度为68bp。目的基因和

β -actin的PCR扩增反应均在Mastercycler gradient PCR仪(德国Eppendorf公司)上进行逆转录和扩增,每份标本重复检测3次,取平均值。

扩增条件94℃3min,94℃30s,60℃30s,72℃30s,36个循环,72℃保温10min。扩增产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳,拍照。

mRNA电泳采用凝胶电泳,电泳电压4V/cm,电泳时间2h,将凝胶放置于凝胶成像扫描系统进行分析,以DL-2000DNAMarker为DNA markers,以出现496bp,367bp和277bp分别表示为c-fos, c-jun和 β -actin mRNA阳性结果,紫外线灯下观察结果并拍照。

1.6 半定量分析

用 Syngene 凝胶成像系统测量各产物的光密度,以曲线下峰面积作为 PCR 产物含量,用 c-fos, c-jun 和 β -actin mRNA 积分值之比,表示该基因 mRNA 相对表达水平。得出相对值,进行统计学处理。

1.7 统计学处理

实验数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,用 SPSS13.0 统计软件分析处理,采用二元方差分析与 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示统计学有显著性差异。

2 结果

2.1 I/R 组和 IPO 组肝细胞 c-fos mRNA 的表达

S 组 c-fos mRNA 表达为 0.41 ± 0.11 。I/R 组和 IPO 组两组于再灌注后 0.5 ~ 2 h 其 c-fos 的表达均增高,1 h 达高峰;4 h 后 c-fos 的表达开始下降,两组变化相似(表 1)(图 1)。虽 IPO 组 c-fos 表达比 I/R 组低,但各时点均无统计学差异。

表 1 I/R 组和 IPO 组不同时间点肝细胞 c-fos mRNA 的表达变化($\bar{x} \pm s$)

时点	S 组	I/R 组	IPO 组
0 h	0.41 ± 0.11	0.42 ± 0.15	0.40 ± 0.06
0.5 h	-	0.76 ± 0.09	0.71 ± 0.04
1 h	-	0.97 ± 0.12	0.82 ± 0.05
2 h	-	0.68 ± 0.10	0.63 ± 0.11
4 h	-	0.45 ± 0.11	0.51 ± 0.08
8 h	-	0.34 ± 0.13	0.32 ± 0.07
12 h	-	0.21 ± 0.07	0.19 ± 0.02
24 h	-	0.14 ± 0.05	0.23 ± 0.04

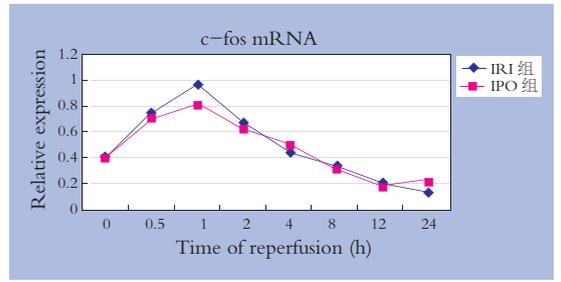


图 1 I/R 组和 IPO 组不同时间点肝细胞 c-fos mRNA 的表达折线分析图($\bar{x} \pm s$)

2.2 I/R 组和 IPO 组肝细胞 c-jun mRNA 的表达

S 组 c-jun mRNA 的表达为 0.60 ± 0.13 。I/R 组和 IPO 组再灌注后 0.5 ~ 2 h c-jun mRNA 的表达均增高,1 h 达高峰;4 h 后 c-jun 有持续较高的表达,IPO 组在 0.5, 1, 2 h 时点较 I/R 组明显降低,两组间比较有统计学差异 ($P < 0.05$) (表 2) (图 2)。

表 2 I/R 组和 IPO 组不同时间点肝细胞 c-jun mRNA 的表达变化($\bar{x} \pm s$)

时点	S 组	I/R 组	IPO 组
0 h	0.60 ± 0.13	0.64 ± 0.11	0.61 ± 0.09
0.5 h	-	1.55 ± 0.16	$1.03 \pm 0.07^{1)}$
1 h	-	1.81 ± 0.14	$1.22 \pm 0.16^{1)}$
2 h	-	1.47 ± 0.13	$1.10 \pm 0.12^{1)}$
4 h	-	1.22 ± 0.08	0.90 ± 0.10
8 h	-	1.13 ± 0.12	1.03 ± 0.14
12 h	-	0.86 ± 0.10	0.84 ± 0.05
24 h	-	0.98 ± 0.17	0.87 ± 0.13

注:1)与 I/R 组比较, $P < 0.05$

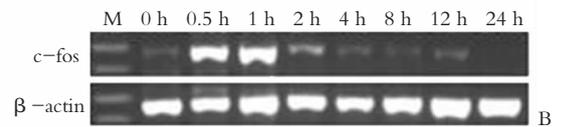
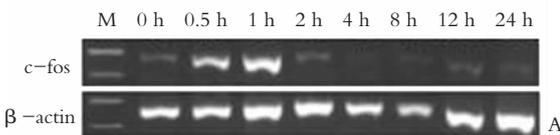


图 2 IPO 组和 I/R 组 c-fos mRNA 蛋白电泳结果 A: IPO 组; B: I/R 组

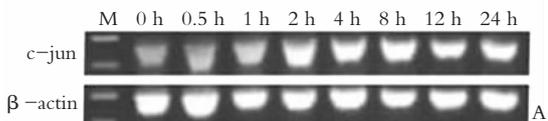


图 3 IPO 组和 I/R 组 c-jun mRNA 蛋白电泳结果 A: IPO 组; B: I/R 组

3 讨论

肝脏移植和肝脏手术中, I/R 损伤是一个不可避免的一个过程, 其机制十分复杂。近几年来, 有关 I/R 损伤过程中的细胞内外信号传导机制成为研究热点, IEGs 因其活化后可参与调节细胞、组织对损伤刺激的信号传导及应答而越来越受到重视^[5]。

ERK1/2 途径是经典的 MAPK 途径, 能被生长因子、血清、缺血再灌注等强烈激活, 活化的 ERK1/2 包含一个 Thr 和 Tyr 磷酸化的 Thr-Glu-Tyr 基序, 可以将 c-fos, c-jun 等磷酸化。激活的 fos 和 jun 基因族所表达的蛋白产物是组成转录激活蛋白 AP-1 的必须元素, AP-1 是 ERK1/2 下游重要的转录因子之一。与 ERK1/2 相同的是, AP-1 也是 JNK 通路中重要的转录因子, 但是在该通路中, JNK 主要活化 AP-1 中的 c-Jun 和活化转录因子 (activating transcription factor-2, ATF-2) 两种组成成分。JNK 信号传导通路在多种疾病状态下可被激活, 如癌症、休克、炎症等^[6]。

在正常未受刺激的细胞内 IEGs 的表达水平相对较低^[7], 而当细胞受到胞外信号刺激, 如加入生长因子、热应激、缺血再灌注损伤等, 则其转录在很短时间之内 (通常为几分钟) 被激活^[8]。c-fos 基因产物既控制增殖也控制分化, 而且直接参与细胞周期的调控。其活化产物对细胞修复和凋亡进行双重调控, c-fos 和 c-jun 不同的表达比率可能影响 AP-1 同源型和异源型二聚体的比例^[9]。

c-fos 和 c-jun 作为核转录因子, 是调控器官和组织对刺激应答合成效应蛋白的重要开关之一, 肝脏遭受 I/R 损伤时, 组织受损不仅来自 I/R 的直接作用, 同时凋亡机制的启动与放大后造成的组织坏死同样也参与了肝组织的损伤过程^[10]。在大多数的细胞中, c-fos 原癌基因转录活性一般在刺激后 5 min 内出现, 持续 15 ~ 20 min, 此时 mRNA 积累达峰值, 刺激过后约 30 ~ 45 min 表达降低, 半衰期为 2h, 此过程不需要蛋白合成^[11]。本实验观察到, 在 I/R 组和 IPO 组早期 (4h 内), c-fos 和 c-jun 蛋白均呈高表达状态, 且 IPO 组各时点均比 I/R 组表达低; 中期 (4 ~ 12 h) 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 (12 h 以上) c-fos 表达极少, 而 c-jun 蛋白则仍有一定水平的表达。本研究结果提示 c-fos 和 c-jun 共表达的发生可能与缺血再

灌注后肝脏早期重塑介导的组织修复过程有关, 而 c-jun 的持续高表达与随后细胞凋亡的发生有关。IPO 组 c-fos 和 c-jun 基因表达下降, 表明 IPO 可以保护肝组织的再灌注损伤。c-fos 和 c-jun 在不同时间点的表达差异性, 可能与基因自身特点及其功能有关。

IPO 是一种重要的对 I/R 损伤的内源性保护机制, 它可能与抑制氧自由基堆积、中性粒细胞黏附、心肌细胞凋亡和细胞内钙超载等有关。Dean 等^[12]利用 c-fos 和 c-jun DNA 进入细胞核后与 c-fos 和 c-jun mRNA 翻译起始部分特异结合, 形成 RNA 和 DNA 复合物, 通过空间抑制效应使 c-fos 和 c-jun mRNA 翻译受阻。在缺血再灌注后, c-fos 基因转录及 Fos 蛋白又可使多种晚期基因激活, 进而发挥包括增殖、修复或凋亡的生理功能^[3]。在本实验中, IPO 组 c-fos、c-jun mRNA 转录的特征与 I/R 组一样。虽然 IPO 组各时间点 c-fos 表达与 I/R 组比较无统计学差异; 但 IPO 组 c-jun 的表达在 0.5, 1, 2 h 组较 I/R 组明显降低 ($P < 0.05$), 说明 IPO 在再灌注损伤的早期 (4h 内) 可以保护肝组织的再灌注损伤。其机制可能为: IPO 干预可能激活 MAPK 信号传导通路, 从而启动了内源性保护机制。本研究结果与牛英等^[13]报道的 IPC 具有相似的作用。说明 IPO 与 IPC 在组织细胞保护及信号转导机制具有同样的作用。

本实验的结果说明, IPO 在大鼠肝缺血再灌注中的保护作用可能与 IEGs 有关, 但其确切的作用机制还有待于进一步证实。随着对 I/R 引起的细胞损伤分子机制研究的不断深入, 从 MAPK 细胞信号转导通路的角度探索有效方法, 必将为肝 I/R 引起细胞损伤的防治提供新的思路。

参考文献:

- [1] Cowley S, Paterson H, Kemp P, *et al.* Activation of MAPK kinases is necessary and sufficient for PC21 differentiation and for transformation of NIH/3T3 cells [J]. *Cell*, 1994, 77 (6): 841 - 852.
- [2] 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.
- [3] Li Y, Wang TC, Gong WQ, *et al.* Effects of tetramethylpyrazine on Fos protein expression of myocardial ischemia reperfusion in rats [J]. *Disi Junvi Daxue Xuebao*, 1999, 20 (6): 515 - 518.
- [4] Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, *et al.* Oxygen-derived

- free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat [J]. Surg Gynecol Obstet, 1990, 171 (2): 120 - 125.
- [5] Ishii S, Abe T, Saito T, *et al.* Effects of preconditioning on ischemia/reperfusion injury of hepatocytes determined by immediate early gene transcription. [J] Hepatobiliary Pancreat Surg, 2001, 8 (5): 461 - 468.
- [6] Hommes DW, Peppelenbosch MP, Van Deventer S J. Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets [J]. Gut, 2003, 52 (1): 1447 - 1451.
- [7] 韩济生. 神经科学纲要[M]. 北京:北京医科大学, 中国协和医科大学联合出版社, 1993. 535 - 552.
- [8] Wieland E, Oellerich M, Braun F, *et al.* C-fos and c-jun mRNA expression in a pig liver model of ischemia/reperfusion: effect of extended cold storage and the antioxidant idebenone [J]. Clin-Biochem, 2000, 33 (4): 285 - 290.
- [9] Taguchi T, Shima Y, Nakao M, *et al.* Activation of immediate early genes in relation to proliferation and apoptosis of enterocytes after ischemia-reperfusion injury of small intestine [J]. Transplantation Proc, 2002, 34 (3): 983.
- [10] 马毅, 何晓顺, 陈规划. 肝脏缺血再灌注损伤与细胞凋亡[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19 (7): 1005 - 1008.
- [11] 王晓明, 韩济生. 原癌基因与核内第三信使. 神经科学纲要[M]. 北京:北京医科大学联合出版社, 1993. 273.
- [12] Dean N, Mckwary R, Miraglia L, *et al.* Inhibition of growth of human tumor cell lines in nude mice by an antisense of oligonucleotide inhibitor of protein kinase C-alpha expression [J]. Cancer Res, 1996, 56: 3499 - 3507.
- [13] 牛英, 叶启发, 肖建生, 等. 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[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 5 (14): 388 - 390.

本刊启用远程稿件处理系统

为了提高办公效率,《中国普通外科杂志》编辑部将于 2008 年 1 月 1 日起正式启用“网络编辑管理系统”。请作者登陆网站 <http://www.zpwz.net> 按照以下步骤进行在线投稿。

投稿步骤

1. 选择“作者投稿”一栏,进入“作者投稿”界面。

如果是第一次投稿,需要先注册本系统:点“注册”进入注册流程,按照系统提示进行注册,请注意,“*”选项为用户必填项!

2. 点“作者投稿”,选择左边的“我要投稿”一栏,按照投稿向导的提示进行。

(1) 输入稿件中文文题和英文文题。

(2) 输入作者。若所投稿件为多人撰写,在作者信息下添加该文的合作作者,合作作者可以只添加姓名即可。此处需注意,如该文为 n 位作者撰写,需在填写完 n 位作者后,再点一下“继续添加作者”后方可点“下一步”,否则最后一个作者本系统将不会显示。

(3) 第三步“学科类型”、“专业类型”、“创作类型”、“投稿栏目”、“文章分类号/PACS 码”可以不选。

如果该文有基金支持,请在“基金类型”下的长条框中输入(包括基金号);如果有多个,请用分号分开。输完以后点“下一步”。

(4) 输入关键词。请注意各词之间一定要用分号隔开。然后点击“添加”。再点“下一步”。

(5) 输入中英文摘要后再单击“下一步”

(6) 根据系统提示在相应的栏目中输入你要回避或推荐的专家,也可以不写。单击“下一步”,检查稿件的基本信息,如有需要修改的地方,点击“修改”;再确认无误后,单击“下一步”进入稿件上传步骤。

(7) 在“稿件上传操作区”点“浏览”,选中要上传的稿件后,点击右边的“上传稿件”。待弹出“稿件上传完毕,请继续下一步”的对话框时,点“确定”,再点“下一步”继续投稿。请注意,这一步可能因您的网速和稿件的大小,所需时间略有不同,请耐心等待,如果长时间仍没有弹出“稿件上传完毕,请继续下一步”的对话框,可重新尝试,确保稿件上传方可进行下一步。

(8) 核对完所投稿件的信息后请点“下一步”。如果您对编辑部有什么特别的要求或说明,请在“给编辑部留言”框中留下您的意见,点“立即提交”,系统会提示“*** 同志:非常感谢您对本刊物的支持!您的来稿《***》我们已经收到,请等待编辑部通知。查询请登录编辑部网站 <http://www.zpwz.net> 或咨询编辑部邮箱:pw4327400@126.com”。

友情提示

网上投稿后,请邮寄 1 份纸质稿(题名页与正文页均需用 A4 纸 4 号字隔行打印)、单位介绍信(注明材料真实可靠,无一稿多投和无科研机密资料泄密)及 60 元稿件处理费至本编辑部。

为防作者上传稿件不成功,请作者 E-mail 致本编辑部,信中请注明投稿时间、文题、作者姓名,并将稿件以附件形式发过来。

编辑部地址:湖南省长沙市湘雅路 87 号中国普通外科杂志编辑部

E-mail: pw4327400@126.com; jcgxxych@126.com。联系电话 0731 - 4327400。