



## 大鼠肝缺血再灌注后Fas及FasL蛋白表达变化及缺血预处理的保护机制

为观察缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤致凋亡的影响,我们建立缺血再灌注损伤及缺血预处理模型,应用Western blot法检测凋亡通路上游蛋白Fas及FasL表达的变化,以及肝功能血清学指标变化,旨在探讨缺血预处理对缺血再灌注致肝细胞凋亡时细胞保护作用的可能机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

10-12周龄、健康SD大鼠24只,雌雄各半,体质量240-280 g,由南方医科大学动物实验中心提供。Western LumiGlo试剂盒(美国Biolabs公司),BECKMAN自动生化检测仪(美国BECKMAN公司);小鼠抗大鼠Fas及FasL抗体(美国Sigma公司);辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠IgG(美国Santa Cruz公司)。

#### 1.2 模型制作及分组

采用乙醚开放吸入麻醉,随机分3组(每组8只):(1)未进行缺血再灌注组(control, c组):开腹后不分离肝十二指肠韧带,不阻断肝门,不施行缺血再处理和缺血再灌注等处理;(2)缺血再灌注组(IR组):大鼠成功麻醉,从尾静脉推注1 ml的肝素(50 U/ml)盐水。开腹后,确认第一肝门后,用无损伤血管阻断夹阻断左肝以及尾状叶的血管,40 min,再灌注120 min。(3)缺血预处理+缺血再灌注组(IP+IR组):先行3个循环的缺血预处理(阻断第一肝门10 min,再开放10 min为1个循环),随后同IR组。

#### 1.3 Fas及FasL Western bolt 印迹分析

术后6 h进腹,取供肝组织约0.3 g,加入细胞裂解液匀浆并裂解,用Sigma蛋白定量试剂作BSA蛋白定量,稀释各样品使蛋白含量在相同水平。取10  $\mu$ l样品上清液(含蛋白量100  $\mu$ g),进行SDS-PAGE电泳,随后电转移至硝酸素膜,分别与小鼠抗大鼠Fas及FasL抗体和辣根过氧化物酶偶联的山羊抗小鼠IgG反应,按Western LumiGlo显影系统试剂盒手册操作,X线胶片曝光、显像。

#### 1.4 肝组织DNA-Ladder观察

称取100 mg肝组织,冰浴研碎,加消化液2 ml消化10 min,1000 r/min离心5 min;弃上清,用2 ml冰冷PBS重悬,1000 r/min离心5 min,弃上清,重复1次;加等体积消化液重悬,50  $^{\circ}$ C振荡孵育12 min,2 $\times$  PBS重悬,1000 r/min离心5 min,弃上清,加等体积酚/氯仿/异戊醇抽提,12 000 r/min离心15 min,加等体积的乙酸铵及2体积的无水乙醇,10 000 r/min离心5 min;用70%乙醇洗涤,凉干,重悬于TE缓冲液中;加0.4%SDS和1  $\mu$ g/ml Rnase,37  $^{\circ}$ C孵育1 h,重复抽提1次;用浓度为1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下照相。

#### 1.5 生化指标检测和细胞电镜形态学观察

术后6 h进腹,于肝下下腔静脉采血,采用速率法在BECKMAN自动生化检测仪上检测血清ALT、AST活性。取肝组织后切成1 mm<sup>3</sup>小块。2.5%戊二醛前固定,1%锇酸后固定。常规漂洗,脱水,渗透和包埋。超薄切片,醋酸铅和柠檬酸铅双染色。JEM-1200EX透射电镜观察和摄片。

采用SPSS 10.0 统计软件包进行t检验。

## 2 结果

### 2.1 IR组Fas及FasL蛋白 Western blot

印迹检测表达，明显高于IP+IR及正常组(图1、2)。



图1 Fas蛋白 Western blot 印迹检测

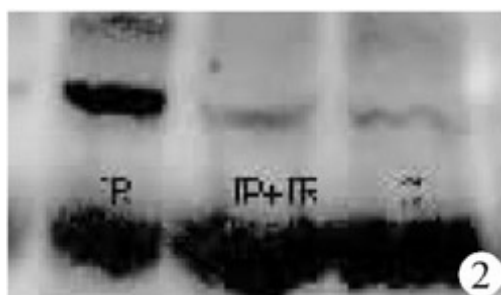


图2 FasL蛋白 Western blot 印迹检测

### 2.2 血清ALT、AST及LDH变化

大鼠肝功能检测结果如表1所示，IR组血清ALT、AST水平与IP+IR组及对照组比较，显著升高， $P < 0.01$ ；而IP+IR组血清ALT、AST水平与对照组比较， $P < 0.05$ 。

表 1 各组血清 ALT、AST 活性比较 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Group	ALT	AST
Control	51.5±12.3	91.3±15.9
IR	628.4±32.9 <sup>#</sup>	712.2±54.8 <sup>#</sup>
IP+IR	207.5±13.8 <sup>*</sup>	244.3±41.5 <sup>*</sup>

<sup>#</sup>示与其它两组比较  $P < 0.01$ ；<sup>\*</sup>示与 control 组比较  $P < 0.05$

### 2.3 肝组织细胞DNA梯度带形成观察

I/R组DNA电泳可见明显的梯度带形成。而NADH+I/R组及对照组则不明显。说明IR损伤后可导致肝组织细胞发生的明显的凋亡，而NADH+I/R及对照组肝组织细胞凋亡现象不明显，NADH可预防由I/R损伤引起的肝组织细胞的凋亡(图3)。

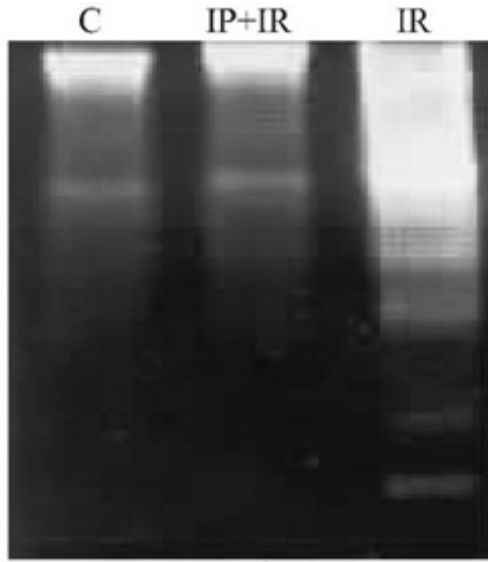


图3 IP对IR损伤大鼠肝细胞后DNA-ladder形成的影响

#### 2.4 大鼠肝细胞透射电镜观察

透射电镜观察结果：IR组，电镜下可见：内质网、线粒体扩张，线粒体嵴紊乱、空泡化、结构不清，内质网囊泡化，胞膜出现破损，微胆管扩张，微绒毛脱落，染色体边聚并可见凋亡小体的形成。c组及IP+IR组的肝细胞线粒体、内质网轻度扩张，细胞核膜结构基本完整。细胞核染色体未出现边聚。凋亡小体形态不明显(图4)。

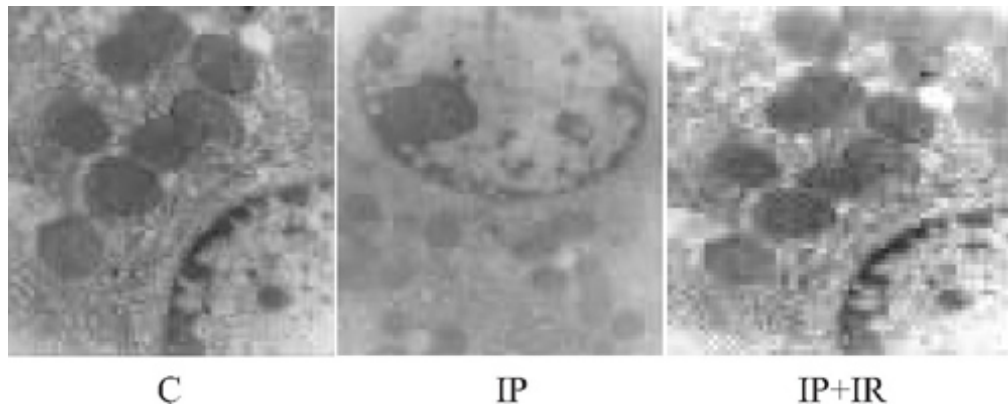


图4 IP对I/R损伤大鼠肝细胞后肝细胞电镜观察(×5500)

### 3 讨论

凋亡是一种受基因调控的细胞主动性自杀过程，是疾病发生发展的一个共同的特征，它与细胞增殖共同维持机体细胞群的稳定。在内外环境多种损伤因素的作用下，细胞内促凋亡基因及抑制凋亡表达的变化，可引起细胞凋亡。缺血再灌注损伤临床上不仅可导致原发性移植肝功能不全或衰竭，而且在肝脏大手术肝门阻断后也可引起肝功能不全或衰竭[1]，[2]。在对肝缺血再灌注损伤机制的研究初步表明，肝细胞凋亡是早期肝缺血再灌注损伤中肝细胞死亡的一种方式[3]，[4]。而缺血预处理可降低缺血再灌注对肝细胞的损伤。其机理可能与抑制促细胞凋亡相关蛋白表达有关。有研究表明缺血预处理可通过上调抗凋亡蛋白Bcl-2的表达而减轻缺血再灌注引起的肝细胞凋亡[5][6][7]。Fas及FasL是介导细胞凋亡的重要通路。Fas及FasL相结合后可相继

激活caspase-8、caspase-3，从而完成指令性凋亡信息的传递。本研究旨在研究缺血预处理对缺血再灌注损伤后凋亡蛋白Fas及FasL的变化，观察Fas通路在缺血预处理抗缺血再灌注损伤细胞凋亡中的作用。

本研究发现，缺血再灌注损伤可上调肝细胞Fas及FasL蛋白表达，这与肝细胞凋亡和血清ALT及AST的变化相一致，电镜结果也表明肝细胞超微结构的破坏程度与Fas及FasL蛋白表达相一致。缺血预处理可明显减轻缺血再灌注损伤导致的肝细胞凋亡，可能与下调缺血再灌注损伤时Fas及FasL的表达有关。

#### 参考文献：

- [1]Straberg SM. Preservation injury and donor selection: it all starts here[J]. Liver Transpl Surg, 1997, 5(suppl): s1-7.
- [2]Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantatton[J]. Liver Transplant Surg, 1995, 1: 124-38.
- [3]Sasaki H, Matsuno T, Tanaka N. Activation of apoptosis during th reperfusion phase after rat liver ischemia[J]. Transplant Proced, 1996, 289: 1908-9.
- [4]Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation[J]. Hepatology, 1998, 27: 1652-60.
- [5]Maulik N, David Engelman RM, Rousou JA. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating antideath gene bcl-2 [J]. circulation, 1999, 13:253-61.
- [6]徐小平, 王 瑜, 李开宗, 等. NADH对L02细胞Bcl-2、 Bax 、p53, CD95 CD95L表达的影响[J]. 细胞与分子生物学杂志, 2002, 18(5): 460-3.