文章编号:1000-5404(2006)10-1049-03

论著

线粒体膜通透性转换作用对再灌注损伤后肝细胞凋亡的影响

秦建伟,别 平,朱 瑾 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

提 要: 目的 观察大鼠肝脏常温缺血再灌注后肝细胞线粒体通透性转换(mitochondrial permeability transition, MPT)作用及其与肝细胞凋亡的关系;同时观察线粒体膜通透性转换孔(mitochondrial permeability transition pore, PTP)开放抑制剂环孢素A(CsA)对MPT的抑制作用,以及对肝细胞凋亡的影响和可能的机制。**方法** 将SD大鼠随机分为3组:假手术组、缺血再灌注组(I/R)、CsA组(I/R+CsA)。CsA组术前连续给予CsA 10 mg·kg^{-1}·d^{-1}灌胃4 d,其余组给予等量生理盐水。大鼠热缺血再灌注模型参考Nauta的方法,热缺血时间60 min,分别于再灌注0、1、6、24、72 h等不同时相收取肝组织标本,免疫组化法检测细胞质活性caspase-3;Western blot检测胞浆细胞色素C,TUNEL法检测肝细胞凋亡。**结果** 缺血再灌注引起肝细胞线粒体发生MPT作用,细胞色素C由线粒体释放入细胞质,再灌注后0、1、6、24 h,I/R组及CsA组与假手术组相比,细胞质caspase-3的阳性程度明显增强,肝细胞凋亡明显增多($P<0.01$);CsA组与I/R组相比,再灌注1、6 h细胞色素C释放显著减少,再灌注1、6、24 h,caspase-3阳性程度明显下降($P<0.01$);再灌注后6、24、72 h,细胞凋亡明显减少($P<0.05$)。**结论** 缺血再灌注后肝细胞线粒体发生MPT作用可能是引起肝细胞凋亡的关键环节;CsA可能通过抑制PT孔的开放而抑制MPT作用、减少再灌注后细胞色素C释放、抑制caspase-3活化、缓解再灌注后大鼠肝细胞的凋亡。

关键词: 线粒体通透性转换;缺血再灌注;凋亡
中图法分类号: R322.47;R329.25;R654.1 **文献标识码**: A

Effects of cyclosporine A on apoptosis of hepatocyte after ischemia/reperfusion injury

QIN Jian-wei, BIE Ping, ZHU Jin (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of mitochondrial permeability transition(MPT) after ischemia/reperfusion(I/R), and to find the relationship between MPT and apoptosis of hepatocytes in rats. **Methods** SD rats were divided into three groups: sham operation group, I/R group, and I/R + CsA group. A model of hepatic I/R in rats was made according to the method of Nauta. Active caspase-3 in cytoplasm was examined by immunohistochemistry, and the content of cytochrome C protein was evaluated by Western blotting. The incidence of apoptic hepatocytes was determined by TUNEL method. Cyclosporine A(10 mg·kg^{-1}·d^{-1}) was used as an inhibitor of MPT owing to its inhibitive effect on mitochondrial permeability transition pore(PT pore), and the influences of CsA were analyzed. **Results** Pretreated with CsA ameliorated injury after reperfusion. The number of apoptotic liver cells was decreased. CsA significantly prevented the release of cytochrome C from mitochondria, demonstrating its effect on MPT through preventing PT pore from opening. **Conclusion** MPT may play a key role in the apoptosis of liver cell after I/R. CsA, a powerful inhibitor of PT pore, is capable of abating the effect of MPT, reducing the release of cytochrome C, retarding the activation of caspase-3 and hence ameliorates apoptosis of hepatocytes following I/R procedure.

Key words: mitochondrial permeability transition; ischemia/reperfusion; apoptosis

缺血再灌注损伤一直是肝脏外科亟待解决的难题。凋亡是缺血再灌注损伤后细胞死亡的重要方式。线粒体是影响肝细胞凋亡的核心细胞器,缺血再灌注后线粒体膜通透性转换孔道(mitochondrial permeabili-

作者简介:秦建伟(1969-),男,甘肃省兰州市人,博士研究生,主治医师,主要从事肝移植方面的研究。电话:(023)60660752,E-mail:qinjianwei@163.com
通讯作者:别 平,电话:(023)68754169
收稿日期:2005-09-20;修回日期:2005-10-20

ty transition pore, PTP)开放而引发的线粒体膜通透性转换(mitochondrial permeability transition, MPT)作用可能是细胞凋亡过程中的关键环节[1,2]。目前有关MPT与再灌注损伤后肝细胞凋亡之间关系的研究甚少。本实验旨在研究大鼠肝脏缺血再灌注后肝细胞MPT作用与肝细胞凋亡的关系;初步探讨PTP开放抑制剂环孢素A(CsA)对再灌注损伤后肝细胞凋亡的影响及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物和试剂

SD大鼠66只,体质量250~300 g,雌雄不拘,由第三军医大学实验动物中心提供;CsA(新山地明软胶囊,上海诺华制药公司);兔抗caspase-3多克隆抗体(博士德公司);兔抗细胞色素C多克隆抗体(SANTA CRUZ公司);免疫组化SABC试剂盒(博士德公司);TUNEL试剂盒(罗氏公司);化学发光法检测试剂盒(博士德公司)。

1.2 动物模型及标本采集

将动物分为3组:缺血再灌注组(I/R组,$n=30$),CsA组(I/R+CsA,$n=30$),假手术组($n=6$)。按照10 mg·kg^{-1}·d^{-1}剂量将CsA稀释至5 ml生理盐水,CsA组大鼠术前灌胃,每天1次,连续4 d;I/R组及假手术组给予生理盐水5 ml灌胃。术前12 h禁食,自由饮水,大鼠热缺血再灌注损伤模型参照Nauta等[3]的方法:3%戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔内注射麻醉,正中切口进腹,解剖肝门,以无损伤动脉夹阻断肝门部左、中叶肝动脉及门静脉分支,使缺血范围达70%,开放右叶的分支,以避免门静脉淤血,热缺血时间1 h,之后开放阻断血管。假手术组除了不阻断肝门血管以外,其余操作同实验组及对照组。I/R组和CsA组分别于再灌注0、1、6、24、72 h 5个时相点采集肝左叶相同部位肝脏组织,每组每个时相点6只大鼠;假手术组于开腹后1 h采集组织标本。

1.3 检测指标及方法

组织标本石蜡包埋免疫组化法检测细胞质活性caspase-3,PBS代替一抗作为阴性对照,免疫组化步骤按照试剂盒说明进行,应用Image Pro Plus 4.5图像分析软件分析阳性染色的积分光密度值(IOD),每张切片随机选取5个具有代表性的高倍视野,取IOD平均值;Western blot测定胞浆中细胞色素C含量,方法步骤按照试剂盒说明进行;TUNEL法检测肝细胞凋亡,光镜下随机选择5个高倍视野,计数凋亡细胞及细胞总数目,计算凋亡指数(apoptic index, AI)。

1.4 统计学处理

计量资料用$\bar{x}\pm s$表示,应用SPSS 10.0软件行单因素方差分析。

2 结果

2.1 胞浆活性caspase-3的表达

I/R组及CsA组与假手术组相比,在再灌注0、1、6、24 h等时相点,细胞质活性caspase-3表达明显增强,再灌注后逐渐升高,6 h最明显,至24 h仍保持较高水平,至72 h细胞质内已无明显阳性表达(表1)。CsA组与I/R组相比,细胞质活性caspase-3阳性程度在再灌注前(0 h)无显著差异;再灌注后1、6、24 h显著低于I/R组,提示CsA显著抑制了大鼠肝脏缺血再灌注后caspase-3的活化。

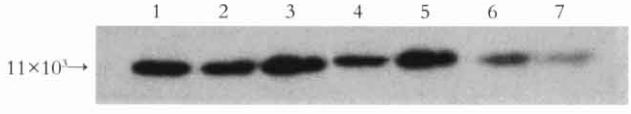
表1 缺血再灌注后不同时相肝细胞质caspase-3阳性染色积分光密度($\bar{x}\pm s$)

组别	再灌注后0 h	再灌注后1 h	再灌注后6 h	再灌注后24 h	再灌注后72 h
I/R组	176 452±51 693[a]	266 940±55 274[a]	618 731±122 758[a]	537 117±134 388[a]	5 215±1 493
CsA组	195 060±39 594[a]	179 391±31 471[ac]	425 722±820 02[ac]	387 553±67 278[ab]	5 774±843
假手术组	4 652±1 102	4 652±1 102	4 652±1 102	4 652±1 102	4 652±1 102

a: $P<0.01$, 与假手术组比较;b: $P<0.05$, c: $P<0.01$, 与I/R组比较

2.2 Western blot分析胞浆细胞色素C含量

I/R组及CsA组在再灌注前,即有细胞色素C释放入细胞质,两组之间无显著差异;再灌注后1、6 h,CsA组细胞色素C的释放显著受到抑制,含量显著低于对照组;假手术组细胞色素C蛋白条带仅有清淡显影(图1)。提示CsA明显抑制了再灌注后细胞色素C的释放,但对再灌注之前细胞质内细胞色素C的含量无影响。



1: I/R(0 h); 2: CsA(0 h); 3: I/R(1 h); 4: CsA(1 h); 5: I/R(6 h); 6: CsA(6 h); 7: 假手术组

图1 Western blot检测胞浆细胞色素C

2.3 肝细胞凋亡的观察

再灌注前和再灌注后1 h,I/R组及CsA组凋亡细胞呈现轻度增多趋势,但与假手术组相比无统计学差异。再灌注后6、24 h凋亡肝细胞显著增加,72 h有所下降,但仍维持较高水平。CsA组在再灌注6、24、72 h,凋亡指数显著低于I/R组(表2)。说明CsA预处理明显缓解了大鼠肝脏再灌注损伤后的肝细胞凋亡。

表2 缺血再灌注后不同时相肝细胞凋亡指数(%, $\bar{x}\pm s$)

组别	再灌注后0 h	再灌注后1 h	再灌注后6 h	再灌注后24 h	再灌注后72 h
I/R组	1.51±0.72	2.38±0.72	20.06±5.43[a]	18.76±5.40[a]	13.92±5.02[a]
CsA组	1.43±0.67	1.68±0.69	13.18±4.08[ab]	11.93±5.29[ab]	8.03±3.34[ab]
假手术组	1.62±0.51	1.62±0.51	1.62±0.51	1.62±0.51	1.62±0.51

a: $P<0.01$, 与假手术组比较; b: $P<0.05$, 与I/R组比较

3 讨论

3.1 肝脏缺血再灌注损伤后的线粒体通透性转换作用

PTP是位于线粒体内膜的具有高电传导性的非特

异性孔道，允许分子量小于 1 500 的溶质，如质子、Ca^{2+}、谷胱甘肽等通过。正常情况下 PTP 间歇性开放，以维持线粒体膜电位和 Ca^{2+} 平衡。Ca^{2+}、无机磷酸盐、pH 值的升高、过氧化物等刺激因素可以促发 PTP 开放，引发 MPT 作用。肝脏缺血再灌注引起线粒体氧自由基增多、Ca^{2+} 超载、线粒体膜电位下降、PTP 开放等[1]。这些因素相互穿插影响，其中 MPT 作用尤为关键。PT 孔持续开放使分子量大于 1 500 的分子非选择性地通过线粒体内膜，直接导致线粒体膜去极化，膜电位下降，氧化磷酸化作用解偶联，ATP 合成障碍，线粒体肿胀，释放细胞色素 C 和凋亡诱导因子（AIF），最终引起细胞死亡[4,5]。再灌注后的 MPT 作用引起细胞色素 C 由线粒体释放入细胞质，本实验观察到缺血再灌注引起细胞色素 C 明显释放。细胞色素 C 是引起细胞凋亡的关键物质[6]，它与凋亡蛋白激活因子（Apaf-1）结合，共同激活凋亡蛋白酶家族成员caspase-3，进而启动凋亡蛋白酶级联反应，细胞发生凋亡。

3.2　PTP 的结构及其开放抑制剂对 MPT 的影响

PTP 的分子组成还不清楚，目前多数学者认为 PTP 跨越线粒体内膜和外膜，是由两层膜上的蛋白和基质共同构成的复合体。内膜上的腺苷酸易位子（adenine nucleotide translocators，ANT）是 PTP 重要成分之一，其他可能成分还包括外膜上的电压依赖性阴离子通道（voltage-dependent anion channel，VDAC），以及来源于线粒体基质的 CsA 受体（cyclophin D）。CsA 通过特异性的与 CsA 受体结合，来抑制 PTP 的开放，是目前发现的 PTP 开放的最强有力的抑制剂[7]。本研究使用 CsA 来抑制 PTP 的开放，观察到 CsA 显著地抑制了大鼠肝脏缺血再灌注后细胞色素 C 的释放，以及随后的 caspase-3 活化和细胞凋亡。

3.3　CsA 对缺血再灌注后肝细胞的保护作用

CsA 是临床和实验中被广泛应用的免疫抑制剂。近年来有少量关于 CsA 的保护作用的报道，证明免疫抑制剂量以下的小剂量 CsA 能减轻一些理化因素及外科手术因素造成的肝细胞损伤，减轻缺血再灌注后线粒体损伤[4]。这种作用可能来源于通过特异性抑制 PTP 的开放来减轻 MPT 作用引起的细胞损伤。一些动物模型及体外细胞培养实验证明，小剂量 CsA 能抑制 Ca^{2+} 依赖性 MPT 作用，维持了线粒体膜电位和细胞质 Ca^{2+} 的平衡，抑制细胞色素 C 及凋亡诱导因子的释放以及随后的细胞凋亡，从而发挥保护性作用。在心、肾、脑、肝等组织都观察到这种作用[2]。CsA 抑制 MPT 不需要钙调神经磷酸酶（CaN）的参与，CsA 的衍生物 Cs29（不具有免疫抑制作用）表现出了与 CsA 相似的抑制 Ca^{2+} 依赖性的 PTP 开放[8]；而另一种能抑制 CaN 的免疫抑制剂 FK506 不具有抑制 MPT 的作用，说明 CsA 的这一过程与其免疫抑制作用无关。此外，炎症反应可能也参与了缺血再灌注损伤，CsA 可能还通过抑制淋巴因子的生成，如 TNF-α、IF-6 等，以及下调黏附分子的表达来减轻再灌注损伤[9]；小剂量 CsA 还能提高具有抗凋亡作用的热休克蛋白 Hsp70 的表达、减少过氧化物的生成、提高 ATP 含量；促进保护性基因 Bcl-2、Bcl-x 的表达，抑制 Fas 基因介导的细胞凋亡等[9]。

总之，抑制 MPT 作用可以缓解缺血再灌注损伤，CsA 可能是通过抑制 PTP 开放来抑制 MPT 作用。有研究证实 CsA 对人的心肌组织片的缺氧再供氧损伤同样具有保护作用[10]。PTP 可能成为缓解再灌注损伤的新治疗靶点。

参考文献：

[1] GUJRAL J S, BUCCI T J, FARHOOD A, *et al*. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? [J]. Hepatology, 2001, 33 (2): 397 - 405.

[2] KIM J S, HE L, LEMASTERS J J, *et al*. Mitochondrial permeability transition: a common pathway to necrosis and apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304(3): 463 - 470.

[3] NAUTA R J, TSIMOYIANNIS E, URIBE M, *et al*. The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion-induced liver injury[J]. Ann Surg, 1991, 213(2): 137 - 142.

[4] KIM J S, HE L, QIAN T, *et al*. Role of the mitochondrial permeability transition in apoptotic and necrotic death after ischemia/reperfusion injury to hepatocytes[J]. Curr Mol Med, 2003, 3(6): 527 - 535.

[5] 冷建军，韩本立，董家鸿. 肝脏缺血再灌注损伤机制和缺血预处理保护作用[J]. 消化外科，2005，4(2)：142 - 148.

[6] JIANG X, WANG X. Cytochrome C-mediated apoptosis[J]. Annu Rev Biochem, 2004, 73: 87 - 106.

[7] CLARKE S J, MCSTAY G P, HALESTRAP A P. Sanglifehrin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A[J]. J Biol Chem, 2002, 277(38): 34793 - 34799.

[8] ARGAUD L, GATEAU-ROESCH O, CHALABREYSSE L, *et al*. Preconditioning delays Ca^{2+}-induced mitochondrial permeability transition [J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(1): 115 - 122.

[9] YANG C W, AHN H J, HAN H J, *et al*. Pharmacological preconditioning with low-dose cyclosporine or FK506 reduces subsequent ischemia/reperfusion injury in rat kidney[J]. Transplantation, 2001, 72 (11): 1753 - 1759.

[10] SCHNEIDER A, AD N, IZHAR U, *et al*. Protection of myocardium by cyclosporin A and insulin: *in vitro* simulated ischemia study in human myocardium[J]. Ann Thorac Surg, 2003, 76(4): 1240 - 1245.

（编辑　周　芳）