论著

文章编号:1000-5404(2009)22-2220-05

线粒体转录因子A对梗阻性黄疸大鼠肝功能的保护作用

林 恒,唐 春,吴 乔,冯春林,张玉君,别 平 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 初步探讨线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A,TFAM)在重组人肝再生增强因子(rhALR)对梗阻性黄疸大鼠肝功能保护过程中的作用。**方法** 首先体外合成靶向TFAM的有效慢病毒载体,然后建立梗阻性黄疸大鼠动物模型,并通过门静脉将慢病毒注入大鼠肝组织进行靶向TFAM活体RNA干扰实验。然后通过RT-PCR和Western blot检测目的基因表达量的改变并观察大鼠肝脏病理改变、肝脏功能改变及rhALR保护作用的变化情况。**结果** 体外靶向TFAM慢病毒载体构建成功。通过门静脉注入后能特异、有效的感染肝组织细胞。RT-PCR和Western blot检测结果显示进行活体RNAi的大鼠肝组织中TFAM的表达明显减弱;且这一组大鼠肝脏病理改变最为明显,肝功能损害最严重,rhALR的肝功能保护作用也随着消失。**结论** 阻断目的基因TFAM的表达使得rhALR对梗阻性黄疸大鼠肝功能的保护作用消失;TFAM在rhALR保护梗阻性黄疸大鼠肝功能过程中具有重要作用。

关键词: 线粒体转录因子A;体内,RNA干扰;重组人肝再生增强因子;梗阻性黄疸;慢病毒载体

中图法分类号: R-332;R363;R575 **文献标识码:** A

Protective effects of mitochondrial transcription factor A on hepatic function in rats with obstructive jaundice

LIN Heng, TANG Chun, WU Qiao, FENG Chun-lin, ZHANG Yu-jun, BIE Ping (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the role of mitochondrial transcription factor A (TFAM) in protecting the hepatic function of rats with obstructive jaundice by recombinant human augmenter of liver regeneration (rhALR). **Methods** The effective lentivirus-siRNA vector system targeting TFAM was successfully constructed *in vitro*. Then we established obstructive jaundice rat model and the lentivirus-siRNA vector was infused into the liver through portal vein for RNAi *in vivo*. RT-PCR and Western blot analysis were used to detect the change of TFAM expression. Liver pathology, hepatic function and the effect of rhALR were studied. **Results** Liver cells were specially and effectively transfected by lentivirus-siRNA vector. The results of RT-PCR and Western blotting showed that TFAM expression was obviously suppressed. The knockdown of target gene led to obviously changed hepatic pathology and severely damaged hepatic function. The protective effect of rhALR also disappeared. **Conclusion** The protective effect of rhALR on hepatic function disappeared after the suppression of TFAM. TFAM gene is very important for rhALR to exert its protective effect on hepatic function in rats with obstructive jaundice.

Key words: mitochondrial transcription factor A; *in vivo* RNA interference; recombinant human augmenter of liver regeneration; obstructive jaundice; lentivirus vector

1994年,Hagiya等[1]从刚断乳的大鼠肝组织中发现了一种新型的促肝细胞增殖因子,称之为肝再生增强因子(augmenter of liver regeneration,ALR)。ALR是一种特殊的促肝细胞分裂因子,对肝源性细胞具有特异性增殖刺激活性,能有效刺激部分肝切除后的肝再生,在肝损伤修复过程中发挥着重要作用。我们通过前期研究发现给予重组人肝再生增强因子(rhALR)可以有效保护和改善梗阻性黄疸大鼠的肝功能[2]。胆道梗阻后,大鼠肝细胞线粒体转录因子A(mitochondrial transcription factor A,TFAM) mRNA的含量出现下降,并随着梗阻时间的延长,其下降程度逐步增加,给

基金项目: 国家自然科学基金(30571806,30872494)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30571806,30872494)

作者简介: 林 恒,男,江西省九江市人,博士研究生,医师,主要从事肝再生方面的研究。电话:(023)68754168,E-mail:linhen2003@163.com

通信作者: 别 平,E-mail: bieping@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2009-08-05;**修回日期:** 2009-09-16

予 rhALR 后,大鼠肝细胞 TFAM mRNA 含量的下降程度明显减弱;当胆道梗阻解除后,TFAM mRNA 含量开始逐步恢复,且给予 rhALR 后其恢复速度更快。由此我们推测 rhALR 可能通过诱导梗阻性黄疸大鼠肝细胞 TFAM 的表达而发挥保护作用。基于此假设,我们设计了本实验。拟在梗阻性黄疸大鼠模型的基础上,利用慢病毒载体系统进行靶向 TFAM 的活体 RNAi,观察其对 rhALR 肝功能保护作用的影响,初步探讨 rhALR 对梗阻性黄疸肝细胞功能的保护作用机制,为 ALR 的临床应用提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　动物来源及分组

健康 Wistar 大鼠共 180 只(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),雌雄不限,体质量 180 ~ 250 g。随机分为 5 组,每组 36 只。第 1 组:假手术组,不进行胆总管阻断,仅开腹、游离胆总管,然后关腹;第 2 组:治疗组,梗阻性黄疸(2 周)、胆道再通(2 周)及给予 rhALR 治疗;第 3 组:干扰组,梗阻性黄疸、胆道再通、给予 rhALR 治疗,同时给予阳性慢病毒载体进行活体 RNA 干扰;第 4 组:梗阻性黄疸、胆道再通、给予 rhALR 治疗,同时注射阴性对照病毒组;第 5 组:生理盐水对照组,梗阻性黄疸、胆道再通、给予 rhALR 治疗,同时门静脉注射生理盐水。

1.2　实验材料

慢病毒包装细胞 293T 细胞株及大鼠肝星状细胞株(HSC-T6)均由上海吉凯基因技术有限公司提供,慢病毒载体系统由 pGC-LV 载体、pHelper1.0 载体和 pHelper2.0 载体三质粒组成。大量质粒 DNA 抽提试剂盒购自美国 QIAGEN 公司, M-MLV 逆转录酶、dNTP、RNA 酶抑制剂均购自美国 Promega 公司,PCR 用试剂、引物购自上海吉凯基因技术有限公司,胰酶购自上海化学试剂公司,胎牛血清、DMEM、RPMI1640 及 Opti-MEM 均购自美国 GIBCO 公司,脂质体 Lipofectamine2000、总 RNA 提取试剂 Trizol 均购自美国 Invitrogen 公司,山羊抗 TFAM、小鼠抗 GAPDH、抗山羊 IgG、抗小鼠 IgG 均购自美国 Santacruz 公司,BCA Protein Assay Kit 购自美国 HyClone-Pierce 公司,ECL-PLUS/Kit 购自美国 Amersham 公司。

1.3　方法

1.3.1　靶向 TFAM 慢病毒载体合成　　根据前期实验结果[3],合成有效的 siRNA 寡核苷酸序列:5′-CCTCGGTCAGCATATAACA-3′,GC 含量为 47.36%,然后构建慢病毒 - shRNA 载体;将合成好的重组慢病毒质粒及辅助包装载体质粒进行高纯度无内毒素抽提,按照 Lipofectamine2000 使用说明共转染 293T 细胞。转染 8 h 后更换为完全培养基,48 h 后收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液进行浓缩和收获,将病毒浓缩液移出,分装后保存在病毒管中, -80 ℃长期保存。取其中 1 支进行孔稀释法病毒生物学滴度测定。具体病毒浓缩收获及滴度测定实验步骤参考文献[4]。

1.3.2　靶向 TFAM 梗阻性黄疸大鼠活体 RNAi 模型的建立

首先建立梗阻性黄疸大鼠模型,然后在此基础上将合成好的靶向 TFAM 的慢病毒通过门静脉注入大鼠肝脏,进行活体 RNAi 实验。为了延长慢病毒在大鼠肝组织中的停留时间并保证其感染效率,在注射慢病毒时进行全肝血流阻断,阻断时间为 20 min。具体手术操作方法如下。

1.3.2.1　第 1 组　　清洁手术区域,腹部用 8% Na_2S 溶液脱毛,术野用碘伏消毒,整个手术过程在双人双目显微镜下操作。大鼠上腹部正中切口开腹后,暴露肝门,游离胆总管后关腹;14 d 后再次上腹部正中切口开腹,分离腹腔粘连、暴露肝门后关腹。

1.3.2.2　第 2 组　　胆道梗阻手术:乙醚吸入麻醉,大鼠仰卧位。取上腹部正中切口,长约 2 cm,开腹后用止血钳将剑突向头侧牵拉,两侧置拉钩各一,将肝脏推向头侧,湿无菌纱布覆盖肠管并将十二指肠向内下方牵拉即可显露肝十二指肠韧带。胆总管清晰可见,一般直径在 0.3 ~ 0.5 mm。在胆总管中上 1/3 行胆总管双重结扎并切断制成胆道梗阻模型;同时于胆总管结扎术后腹腔注射 rhALR 40 μg/kg,每 12 小时 1 次,至动物处死;2 周后行胆道再通。胆道再通手术:在胆总管结扎 2 周后,取原上腹部正中切口入腹,术中可见结扎点上段胆总管呈囊状扩张,管壁菲薄。用 8-0 无损伤缝合针线分别在胆总管和十二指肠上缝一荷包;准备一直径 1.5 ~ 2.0 mm、长度为 1.5 ~ 2.0 cm 的硅胶管;分别在两荷包中心戳孔,以硅胶管架桥行胆总管 - 十二指肠内引流,收紧结扎两荷包线,完成手术。

1.3.2.3　第 3 ~ 5 组　　第 3 组:在第 2 组的基础上通过门静脉注射靶向 TFAM RNAi 慢病毒载体。具体步骤参考文献[5]的方法:先结扎右肾上腺静脉,然后依次阻断肝后上下腔静脉、肝后下下腔静脉、肝动脉和门静脉的血流,全肝血流阻断后立即通过门静脉注射 RNA 干扰慢病毒载体(5×10^7 TU/只),阻断 20 min,然后恢复血流。第 4 组:基本步骤同第 3 组,不同的是门静脉注射的是作为对照的阴性慢病毒载体。第 5 组:基本步骤同第 3 组,不同的是门静脉注射的是作为对照的生理盐水。

所有大鼠术前禁食 12 h,采用乙醚吸入麻醉,术后自由进食水。各组观察时相点为胆道梗阻术后 4、7、14、18、21、28 d,保证每时相点存活大鼠 6 只。

1.3.3　目的基因 TFAM 活体 RNAi 效果检测

1.3.3.1　肝组织细胞感染慢病毒　　术后各时相点取大鼠肝脏组织,制成 1.0 cm × 1.0 cm × 1.0 cm 大小的组织块,用 OCT 包埋剂包埋后反复于液氮中冻存(每次冻存时间为 3 ~ 5 s),直至组织标本和包埋剂一起冻存成形,置于 -80 ℃保存备用;将包埋好的标本切片,厚度为 7 μm,置 -20 ℃保存;切片取出后风干 30 min,然后置于 -20 ℃预冷的丙酮中 4 ℃固定 8 min;PBS 洗 3 次,5 min/次;甩去多余的水分,DAPI(1∶100)染核,水溶性封片剂封片,荧光显微镜下观察肝组织细胞感染情况。

1.3.3.2　肝组织中 TFAM mRNA 水平的表达　　取各组液氮保存的肝组织标本,玻璃匀浆器制成匀浆后用 Trizol 法抽提组织总 RNA,将 RNA 反转录成 cDNA。取 1 μl 作为模板进行 RT-PCR 反应。TFAM 上游引物:5′-TACCCTCGCCTGTCAGCCTTATCT-3′,下游引物:5′-CACTTCGCCCAACTTCAGCCATTT-3′,扩增产物 597 bp;内参照 β-actin 上游引物:5′-ATCATGTTTGAGACCTTCAACA-3′,下游引物:5′-CATCTCTTGCTCGAAGTCCA-3′,扩增产物约 318 bp。PCR 反应条件:预变性 95 ℃,15 s;之后每一步变性 95 ℃,5 s;退火延伸 60 ℃,30 s;共进行 45 个

循环,每次在延伸阶段读取吸光值。制作熔解曲线:PCR 结束后,95 ℃变性 1 min,然后冷却至 55 ℃,使 DNA 双链充分结合。从 55 ~ 95 ℃,每一步增加 0.5 ℃,保持 30 s, 同时读取吸光度值。Real-time PCR 数值分析采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析法。

1.3.3.3 Western blot 检测肝组织中 TFAM 蛋白水平的表达

取 100 mg 液氮保存的肝组织,加入 1 ml RIPA 和 10 μl PMSF(不能预先加入到 RIPA 中,否则 PMSF 失去效能)冰上研磨组织块,研磨时避免起泡沫和发热;将样品转移 1.5 ml 离心管,4 ℃ 2 000 r/min 高速离心 30 min;将上清小心转移到干净无菌离心管中,取部分测定蛋白浓度,其余 -20 ℃ 保存备用。各组取相同量总蛋白,采用 SDS-PAGE 电泳法电泳,湿转至 PVDF 膜,用含 5% 脱脂牛奶的 TBST 溶液封闭 PVDF 膜,山羊抗 Tfam 抗体(1∶200)、小鼠抗 GAPDH 抗体(1∶5 000)与封闭好的 PVDF 膜室温孵育 2 h,TBST 洗膜,相应二抗(1∶5 000)室温孵育 PVDF 膜 2 h,TBST 洗膜,最后采用 ECL 法进行显色。利用图像处理软件 Quantity one4.62 对蛋白电泳图进行分析,分别测定目的蛋白条带和内参照的光密度值,并以两者的比值作为目的蛋白的相对定量结果。

1.3.4 术后各组大鼠肝脏病理变化 术后各时相点取所有组大鼠肝脏组织,观察其体积、颜色及质地等方面的改变;然后取部分组织浸于 10% 甲醛溶液中固定,常规脱水、透明、石蜡包埋、切片及 HE 染色,光镜观察。

1.3.5 术后各组大鼠肝功能的变化情况 所有到时相点的大鼠麻醉后,开腹暴露腹腔,肝后下腔静脉抽血 3 ~ 5 ml,室温下 2 000 r/min 离心 20 min,取上清于 1.5 ml EP 管 -70 ℃保存。统一收集后常规方法检测 ALT、AST、白蛋白及总胆红素的水平。

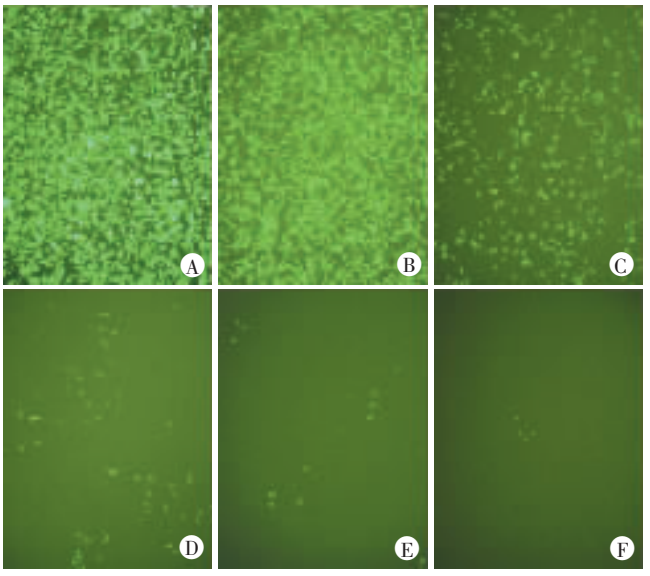
1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 慢病毒合成

利用孔稀释法测定慢病毒滴度(图 1),结果为 9×10^7 TU/ml,病毒包装成功且滴度符合下一步实验需要。

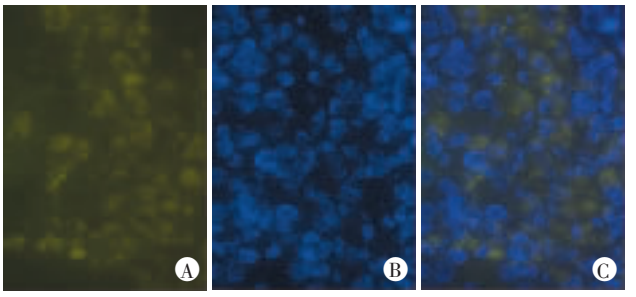


A ~ F:加入的病毒量依次为 10、1、10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4} μl

图 1 HSC-T6 细胞感染慢病毒后荧光显微镜观察 (×100)

2.2 目的基因 TFAM 活体 RNAi 效果

2.2.1 肝组织感染病毒情况 肝组织冰冻切片观察示,胆道梗阻术后 4 d 开始,通过门静脉注射了慢病毒载体的第 3 组大鼠肝组织中已经可以见到感染了慢病毒(带绿色荧光)的肝组织细胞(细胞核为蓝色)(图 2);一直到胆道再通术后 14 d,第 3 组大鼠肝组织中都可以见到感染了慢病毒的肝组织细胞。对心、脾、肺和肾等其他组织器官的观察可以发现这些组织细胞并没有感染慢病毒。



A:慢病毒载体所带的绿色荧光;B:DAPI 染色肝组织细胞核后发出的蓝色荧光;C:A、B 图融合而成

图 2 胆道梗阻术后 4 d 第 3 组肝组织感染慢病毒后荧光显微镜观察 (×200)

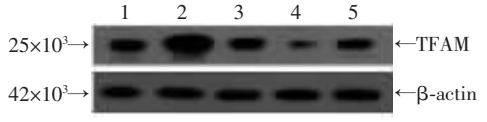
2.2.2 肝组织中目的基因 TFAM mRNA 水平的变化 我们利用 Real-time PCR 的方法对各组大鼠术后各时相点肝组织中目的基因 TFAM mRNA 的表达情况进行了检测。由于假手术组大鼠术后基因 TFAM mRNA 的含量没有明显变化,因此我们利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 PCR 数据,即以第 2 ~ 5 组大鼠相对第 1 组大鼠目的基因的相对表达水平进行定量分析。结果显示,胆道梗阻术后,第 2 ~ 5 组大鼠 TFAM mRNA 的含量都出现了明显下降(与第 1 组比较,$P < 0.05$),且随着梗阻时间的延长,其下降程度逐步增加;其中第 3 组大鼠 TFAM mRNA 含量下降的程度最为明显(与第 2、4、5 组比较,$P < 0.05$)。而第 2、4、5 组大鼠之间没有明显差异。胆道再通后,第 2 ~ 5 组大鼠肝组织 TFAM mRNA 的含量开始增加,且随着再通时间的延长而逐步恢复。组间比较时发现,第 3 组大鼠 TFAM mRNA 的含量仍然明显低于其他几组大鼠(与第 1、2、4、5 组大鼠比较,$P < 0.05$),其恢复程度也要慢于第 2、4、5 组大鼠($P < 0.05$)。胆道再通后 7 d,第 2、4、5 组大鼠目的基因 mRNA 含量仍然没有恢复到正常水平(与第 1 组比较,$P < 0.05$),但至再通后 14 d,第 2、4、5 组大鼠 TFAM mRNA 的含量与第 1 组大鼠相比已无明显差异。各组大鼠术后目的基因 TFAM mRNA 含量的相对定量及其变化情况见表 1。

表 1 各组大鼠胆道梗阻和再通后肝组织 TFAM mRNA 含量的变化情况 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$ 值, $\bar{x} \pm s$)

时相点	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组
术后 4 d	0.995 ± 0.024	0.682 ± 0.036[a]	0.469 ± 0.079[ab]	0.647 ± 0.130[a]	0.673 ± 0.043[a]
术后 7 d	0.995 ± 0.048	0.514 ± 0.042[a]	0.379 ± 0.045[ab]	0.463 ± 0.037[a]	0.506 ± 0.051[a]
术后 14 d	1.000 ± 0.064	0.316 ± 0.047[a]	0.191 ± 0.025[ab]	0.282 ± 0.047[a]	0.306 ± 0.058[a]
术后 18 d	1.009 ± 0.055	0.512 ± 0.040[a]	0.314 ± 0.029[ab]	0.472 ± 0.046[a]	0.502 ± 0.050[a]
术后 21 d	1.001 ± 0.047	0.687 ± 0.040[a]	0.451 ± 0.052[ab]	0.642 ± 0.049[a]	0.677 ± 0.047[a]
术后 28 d	1.004 ± 0.035	0.992 ± 0.029	0.600 ± 0.027[ab]	0.956 ± 0.027	0.983 ± 0.043

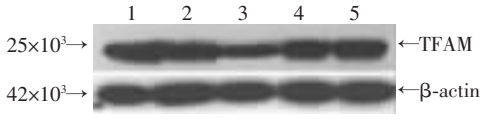
a:$P < 0.05$,与第 1 组比较;b:$P < 0.05$,与第 2、4、5 组比较

2.2.3　肝组织中目的基因 TFAM 蛋白水平的变化　Western blot 结果显示胆道梗阻术后,第 2 ~ 5 组大鼠蛋白表达水平与第 1 组相比均出现了下降,且随着梗阻时间的延长,下降的程度逐渐增加(图 3)。其中第 3 组大鼠 TFAM 蛋白表达下降最为明显($P<0.05$);胆道再通后,第 2 ~ 5 组大鼠目的蛋白表达水平开始逐步恢复,但恢复速度有所不同,其中第 2、4、5 组大鼠肝组织 TFAM 蛋白表达水平升高的速度明显快于第 3 组大鼠($P<0.05$)。至胆道再通术后 14 d,第 2、4、5 组大鼠肝组织 TFAM 蛋白表达水平已基本达到第 1 组大鼠的水平,但第 3 组大鼠目的蛋白的表达水平仍然明显低于其他组($P<0.05$,图 4)。TFAM 蛋白表达的变化趋势与其 mRNA 含量的变化趋势是一致的。



1 ~ 5:依次为第 2 组、第 1 组、第 4 组、第 3 组和第 5 组大鼠

图 3　胆道梗阻术后 14 d 各组大鼠肝组织中目的蛋白的 Western blot 鉴定

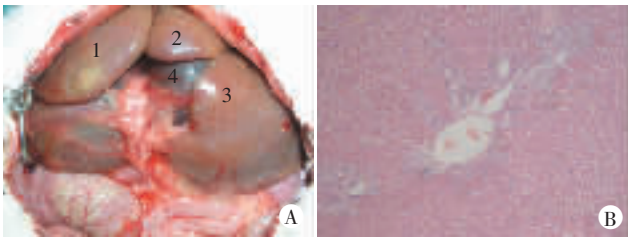


1 ~ 5:依次为第 1 ~ 5 组大鼠

图 4　胆道再通后 14 d 各组大鼠肝组织中目的蛋白的 Western blot 鉴定

2.3　术后各组大鼠肝脏病理变化

胆道梗阻和再通后各时相点,第 1 组大鼠肝脏外形、质地、颜色与正常大鼠相比无明显异常,光镜下肝细胞无明显变性、坏死,小胆管无明显增生。胆道梗阻术后,第 2 ~ 5 组大鼠肝脏均出现不同程度肿胀、黄染及胆总管囊状扩张,肝脏呈淤胆样改变(图 5A);光镜下表现为不同程度的肝脏组织结构紊乱,肝索断裂,肝细胞间隙增宽,肝细胞可见肿胀、变性并伴有散在的片状坏死,小胆管增生,炎性细胞浸润。随着梗阻时间的不断延长,肿胀、黄染及镜下改变的程度不断加深,尤以第 3 组最为明显(图 5B)。胆道再通后,第 2 ~ 5 组大鼠肝脏上述病理改变开始减轻,并随着再通时间的延长而不断减退。其中第 3 组大鼠的恢复速度最慢。



A:大体观察　1:右肝中叶;2:左肝中叶;3:左肝外叶;4:扩张胆总管;B:光镜观察(HE ×100)

图 5　第 3 组大鼠胆道梗阻术后 2 周肝脏病理观察

2.4　各组大鼠术后肝功能的变化情况

第 1 组大鼠术后肝功能各项指标无明显变化,而第 2 ~ 5 组大鼠在接受胆道梗阻手术后,肝功能各项指标均出现了明显改变。表现为天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶及总胆红素水平增高,白蛋白水平降低;并且随着梗阻时间的延长,肝功能损害逐渐加重。胆道再通后,第 2 ~ 5 组大鼠肝脏功能开始恢复,随着再通时间的延长而不断好转。组间比较可以发现第 3 组大鼠胆道梗阻术后肝功能的损害最严重($P<0.05$);而且胆道再通后,其肝功能的恢复也是最慢的($P<0.05$)。第 2 ~ 4 组大鼠胆道梗阻及再通术后肝功能的变化趋势没有明显的差异。术后各组大鼠肝功能指标的具体数据见表 2 ~ 5。

表 2　各组大鼠胆道梗阻和再通后血清 AST 水平的变化情况
($\bar{x}\pm s$,U/L)

时相点	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组
术后 4 d	131.2 ± 18.9[a]	363.2 ± 31.1	414.5 ± 27.3[b]	355.0 ± 40.8	316.1 ± 45.0
术后 7 d	124.4 ± 14.5[a]	433.2 ± 59.5	591.2 ± 34.4[b]	437.6 ± 43.2	447.0 ± 62.3
术后 14 d	115.9 ± 22.0[a]	510.1 ± 25.8	798.8 ± 32.0[b]	542.0 ± 41.1	519.5 ± 37.6
术后 18 d	146.7 ± 28.9[a]	334.7 ± 38.2	500.8 ± 49.4[b]	368.0 ± 64.4	341.6 ± 68.2
术后 21 d	152.7 ± 30.4[a]	227.0 ± 40.0	425.0 ± 53.3[b]	281.9 ± 55.2	256.0 ± 44.2
术后 28 d	144.7 ± 27.5[a]	190.5 ± 32.6	321.1 ± 30.9[b]	219.9 ± 29.0	213.2 ± 24.2

a:$P<0.05$,与第 2 ~ 5 组比较;b:$P<0.05$,与第 2、4、5 组比较

表 3　各组大鼠胆道梗阻和再通后血清 ALT 水平的变化情况
($\bar{x}\pm s$,U/L)

时相点	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组
术后 4 d	38.4 ± 4.1[a]	141.2 ± 59.9[b]	327.0 ± 88.3	149.2 ± 59.9[b]	150.1 ± 68.5[b]
术后 7 d	40.9 ± 4.6[a]	153.9 ± 37.2[b]	407.8 ± 89.1	169.8 ± 40.8[b]	165.5 ± 44.1[b]
术后 14 d	43.4 ± 3.9[a]	263.5 ± 122.2[b]	631.5 ± 87.9	285.2 ± 132.7[b]	250.6 ± 142.1[b]
术后 18 d	45.7 ± 9.1[a]	156.8 ± 39.5[b]	419.0 ± 80.1	178.9 ± 79.0[b]	156.0 ± 47.1[b]
术后 21 d	40.9 ± 6.8[a]	116.5 ± 38.5[b]	237.5 ± 59.6	119.7 ± 49.8[b]	122.0 ± 50.2[b]
术后 28 d	37.0 ± 11.8[a]	68.3 ± 20.5	98.6 ± 35.1	79.9 ± 31.1	76.5 ± 27.8

a:$P<0.05$,与第 2 ~ 5 组比较;b:$P<0.05$,与第 3 组比较

表 4　各组大鼠胆道梗阻和再通后血清白蛋白水平的变化情况
($\bar{x}\pm s$,g/L)

时相点	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组
术后 4 d	34.7 ± 3.9	26.9 ± 4.8[a]	23.3 ± 4.4[a]	27.8 ± 3.7[a]	28.5 ± 3.3[ab]
术后 7 d	34.7 ± 4.4	25.7 ± 4.3[ab]	18.8 ± 5.5[a]	24.9 ± 3.2[ab]	25.8 ± 2.8[ab]
术后 14 d	34.3 ± 5.1	22.9 ± 5.0[ab]	16.3 ± 2.2[a]	23.1 ± 5.3[ab]	23.9 ± 5.8[ab]
术后 18 d	35.7 ± 3.0	26.4 ± 6.0[a]	20.5 ± 3.8[a]	28.4 ± 4.6[ab]	26.9 ± 2.8[ab]
术后 21 d	36.2 ± 3.3	28.5 ± 7.6[ab]	20.8 ± 3.7[a]	31.4 ± 3.3[ab]	28.3 ± 4.8[ab]
术后 28 d	35.6 ± 4.2	32.4 ± 5.0[b]	23.6 ± 3.5[a]	33.7 ± 4.8[b]	31.6 ± 4.5[b]

a:$P<0.05$,与第 1 组比较;b:$P<0.05$,与第 3 组比较

表 5　各组大鼠胆道梗阻和再通后血清总胆红素水平的变化情况
($\bar{x}\pm s$,μmol/L)

时相点	第 1 组	第 2 组	第 3 组	第 4 组	第 5 组
术后 4 d	2.2 ± 0.8[a]	72.4 ± 10.9[b]	103.0 ± 17.8	88.6 ± 16.0	79.1 ± 7.2[b]
术后 7 d	1.5 ± 0.5[a]	102.4 ± 13.0[b]	179.3 ± 16.8	123.6 ± 22.6[b]	108.9 ± 18.4[b]
术后 14 d	1.7 ± 0.4[a]	205.5 ± 25.5[b]	357.1 ± 29.5	235.9 ± 30.3[b]	209.6 ± 28.2[b]
术后 18 d	1.5 ± 0.6[a]	104.6 ± 10.9[b]	257.8 ± 29.1	122.2 ± 25.1[b]	108.3 ± 13.5[b]
术后 21 d	1.6 ± 0.5[a]	38.5 ± 7.1[b]	174.1 ± 12.6	51.7 ± 12.8[b]	42.8 ± 8.3[b]
术后 28 d	1.3 ± 0.5[a]	7.1 ± 2.2[b]	44.8 ± 7.1	10.2 ± 2.6[b]	8.5 ± 3.4[b]

a:$P<0.05$,与第 2 ~ 5 组比较;b:$P<0.05$,与第 3 组比较

3　讨论

ALR 是一种多肽调节因子,由 125 个氨基酸构成,相对分子质量为 15×10^3,具有热稳定性、免疫原性、耐神经氨酸酶等作用。该因子无器官特异性和种

属特异性。ALR 的生物活性主要表现为对肝源性细胞具有特异性增殖刺激活性,能够促进鼠原代肝细胞增殖,抗肝脏急慢性损伤,对糖尿病有较好的辅助治疗作用,同时可能在精子生成中发挥作用。肝细胞产生ALR,并存在肝细胞内,其影响肝细胞增殖的具体途径目前仍不是很清楚。有学者认为在部分肝切除后,ALR 主要以一种活性状态从细胞内分泌到细胞外,再对肝细胞起作用[6]。目前认为,ALR 可能与 Rubartelli 等[7]提出的 IL-1β 和硫氧还原蛋白分泌途径类似,不是依赖经典的内质网-高尔基体细胞转运机制,而是通过一条新途径分泌到细胞外,刺激肝细胞增殖。ALR 可能通过刺激 DNA 的合成,抑制 NK 细胞的活性及 γ-干扰素的调节作用,诱导肝线粒体基因的表达及影响线粒体的功能等途径来影响肝再生。

我们通过前期研究也发现 rhALR 对梗阻性黄疸大鼠肝功能和线粒体功能的损害具有良好的保护和改善作用,而且这一过程可能与 TFAM 密切相关。为了验证这一推测,设计了本实验。在进行靶向 TFAM 活体 RNAi 实验时,首先遇到的问题就是如何将 siRNA 序列快速有效的传输到体内的特定靶器官。目前已有较多的方法包括直接局部注射[8],利用脂质体、多肽或蛋白复合物[9]及病毒载体系统[10]等。为了提高感染效率及满足长期稳定表达的要求(4 周),本研究选用了慢病毒系统作为传输载体,在全肝血流阻断的基础上通过门静脉将其注入大鼠肝组织。结果显示胆道梗阻术后第 4 天,第 3 组大鼠肝组织中即出现了感染慢病毒的肝组织细胞(带有绿色荧光),并一直持续到胆道再通后 2 周。而对其他脏器如心、肾等组织冰冻切片观察并没有发现表达绿色荧光的组织细胞。说明慢病毒载体进入大鼠体内后并没有出现非特异性的 RNA 干扰现象。这也验证了在全肝血流阻断的情况下,通过门静脉注射慢病毒能够特异性的靶向感染肝组织细胞。对各组大鼠术后肝组织 TFAM 表达量的检测(RT-PCR、Western blot)结果显示,除第 1 组大鼠外,其余各组大鼠肝组织 TFAM 的含量均出现了不同程度的下降,且随着胆道梗阻时间的延长,下降程度逐步增加;胆道再通术后,其含量开始逐步恢复,这与我们的前期研究结果一致。尤其是进行 RNAi 的第 3 组大鼠肝组织中靶基因表达量的下降尤为明显,与未进行 RNAi 的第 2 组和另外两个对照组(第 4、5 组)大鼠相比均有明显差异。综合上述结果可以说明靶向 TFAM 梗阻性黄疸大鼠活体 RNAi 模型构建成功,具有良好的特异性和有效性。

功能学指标的检测结果显示,在大鼠胆道梗阻后,接受 RNAi 的第 3 组大鼠肝功能受损最为严重,不仅与正常对照组相比有明显差异,而且也要重于同样接受了胆道梗阻手术的其他 3 组大鼠。具体表现为转氨酶、总胆红素的明显升高,白蛋白含量、磷氧比、RCR 和 ATP 含量的明显下降。在进行活体 RNAi 实验时,为了避免肝脏血流将门静脉注入的病毒随即冲走并延长病毒在肝脏组织的停留时间,我们进行了全肝血流的阻断;而第 4、5 组大鼠胆道梗阻后肝功能和线粒体功能的检测结果显示这 2 组之间并无统计学上的差异,与未接受全肝血流阻断的第 2 组大鼠比较也没有明显的差别,说明全肝血流阻断在本研究中对大鼠肝脏功能的影响并无明显的组间差异,全肝血流阻断并不是引起第 3 组大鼠肝功能出现明显损害的主要原因。

综上所述,阻断目的基因 TFAM 的表达不仅使胆道梗阻术后大鼠肝功能的损害更为严重,而且胆道再通后,大鼠肝功能的恢复也更为缓慢;同时,rhALR 的肝功能保护作用也随之消失。因此我们认为 TFAM 在 rhALR 发挥对梗阻性黄疸大鼠肝功能的保护作用的过程中是非常重要的,其具体的作用机制还有待于进一步的研究。

参考文献:

[1] Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, *et al*. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994, 91(17): 8142-8146.

[2] 唐 春, 别 平, 李 昆, 等. 重组人肝再生增强因子对梗阻性黄疸大鼠肝细胞线粒体功能的保护作用[J]. 中华消化外科杂志, 2006, 5(5): 345-349.

[3] 林 恒, 唐 春, 别 平, 等. 靶向线粒体转录因子 A 大鼠活体 RNA 干扰实验动物模型的建立[J]. 中国现代普通外科进展, 2009, 12(9): 743-748.

[4] 梁 英, 吴伟忠, 李薇薇, 等. 靶向 Arnt 的 RNAi 慢病毒载体的构建及其在 HCCLM6 中对 Arnt 基因表达的影响[J]. 中国临床医学, 2008, 15(6): 879-882.

[5] Ren B, O'Brien B A, Swan M A, *et al*. Long-term correction of diabetes in rats after lentiviral hepatic insulin gene therapy[J]. Diabetologia, 2007, 50(9): 1910-1920.

[6] Wang G, Yang X, Zhang Y, *et al*. Identification and characterization of receptor for mammalian hepatopoietin that is homologous to yeast ERV1[J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11469-11472.

[7] Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, *et al*. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway[J]. J Biol Chem, 1992, 267(34): 24161-24164.

[8] De-Fougerolles A, Vornlocher H P, Maraganore J, *et al*. Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics[J]. Nat Rev Drug Discov, 2007, 6(6): 443-453.

[9] Meade B R, Dowdy S F. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides[J]. Adv Drug Deliv Rev, 2007, 59(2-3): 134-140.

[10] Schambach A, Baum C. Clinical application of lentiviral vectors-concepts and practice[J]. Curr Gene Ther, 2008, 8(6): 474-482.

(编辑 王 红)