论著

文章编号:1000-5404(2011)19-2034-03

IL-18和caspase-1在大鼠急性肝衰竭模型中表达及其意义

张示渊 (832000 新疆维吾尔族自治区 石河子,新疆石河子人民医院检验科)

[摘要] **目的** 了解IL-18与caspase1在大鼠急性肝功能衰竭的可能作用和机制。**方法** 模型组($n=50$)D-氨基半乳糖(D-GalN)/脂多糖(LPS)诱导大鼠急性肝衰竭模型。对照组($n=10$)以生理盐水代替药物。于不同时间点对大鼠血清和肝脏组织进行HE和TUNEL染色观察,并对血清ALT、AST和TBIL,IL-18 mRNA和caspase-1蛋白进行检测。**结果** HE结果提示模型成功。经D-GalN/LPS处理后,模型组大鼠血清ALT、AST和TBIL水平较正常对照组明显升高($P<0.01$),且随着时间的延长浓度有升高趋势($P<0.05$)。与对照组相比,模型组大鼠肝细胞凋亡指数较正常对照组明显升高,且与时间相关。IL-18 mRNA表达与caspase-1趋势相同,即模型组含量显著高于对照组($P<0.05$),且其表达呈时间依赖趋势。**结论** IL-18与其活化酶caspase-1在大鼠急性肝功能衰竭中表达升高,且呈相似趋势,提示二者在肝衰竭的发病过程中可能有重要作用。IL-18可望成为急性肝衰竭的预测因子和未来的治疗靶点。

[关键词] 急性肝衰竭;IL-18;caspase-1;TUNEL
[中图法分类号] R575.302; R392.11; R392.32 [文献标志码] A

Expression of IL-18 and caspase-1 in a rat model of acute liver failure and its significance

Zhang Shiyuan (Department of Clinical Laboratory, Xinjiang Shihezi People's Hospital, Shihezi, Xinjiang, Uygur Autonomous kegion, 832000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the potential role and mechanism of IL-18 and caspase-1 in rats with acute liver failure. **Methods** D-GalN/LPS were applied to inducing the rat model of acute liver failure. Fifty male Wistar rats were randomly divided into 5 groups including 4 model groups and a control group. Rats in the model groups were sacrificed at different time points after the model were set up (10 h, 18 h, 24 h and 36 h respectively, $n=10$), while rats in the control group were treated with normal saline ($n=10$). The HE and TUNEL staining for liver tissues were performed, and serum ALT, AST, TBIL, IL-18 mRNA and caspase-1 protein were also examined. **Results** HE staining suggested that the rat model of acute liver failure was successfully established. The serum ALT, AST and TBIL levels increased significantly in the model groups than in the control group ($P<0.01$), and the increase presented in a time-dependent manner ($P<0.05$). The apoptosis index in the model groups was significantly higher than that in the control group, and the increase was also time-dependent ($P<0.05$). IL-18 mRNA and caspase-1 expression both increased in the model groups as compared with the control group, and the increase was time-dependent ($P<0.05$). **Conclusion** The increased expression of IL-18 and caspase-1 in acute liver failure suggests their possible roles in the pathogenesis of liver failure. IL-18 may be used as a potential predictor and a therapeutic target of acute liver failure in the future.

[**Key words**] acute liver failure, IL-18, caspase-1, TUNEL

Corresponding author: Zhang Shiyuan, E-mail: zhangsy1996@163.com

急性肝衰竭由嗜肝病毒感染或药物等物质的毒性作用引起,病死率较高,除肝移植外,目前尚无有效的治疗方法。病理研究显示急性肝衰竭中大量肝细胞凋亡是其主要的病理特点[1],但其详细的发病机制尚未明确。

IL-18在多种感染性疾病、免疫行疾病及炎症中有重要作用[2],研究显示,IL-18及其诱导产生的细胞因子与肝损害密切相关[3]。本研究利用经典的D-氨基半模型乳糖(D-Gal)/脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)诱导的大鼠急性肝衰竭模型,通过相关技术检测IL-18及caspase-1蛋白的表达变化,探讨两者关系及其在急性肝衰竭发生中的意义。

[通信作者] 张示渊,电话:(0993)2051186,E-mail:zhangsy1996@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

Wistar 大鼠,SPF 级,50 只,雄性,体质量(150.6 ± 4.8) g,所有动物均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号:SCXK(京)2007-0001 号。实验前 1 周领取动物,分笼饲养,自由进食和饮水。饲养温度 23 ℃左右,相对湿度(60.0 ± 10.0)%,每隔 12 小时开灯照明。实验前禁食 16 h,但给予自由饮水。

1.2 主要试剂

D-GalN 购自加拿大 BBI 公司;LPS 购自美国 Sigma 公司;ALT、AST 和总胆红素(钒酸盐法)试剂盒购自中生北控生物科技股份有限公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒为德国 Roche Applied Science 公司产品;caspase-1 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

1.3 仪器

本研究中使用的主要仪器包括:石蜡包埋机 EG1150 HC(LEICA 公司,德国),石蜡切片机 RM2128(LEICA 公司,德国),垂直电泳槽(Bio-Rad 公司,美国),Western 电转槽(Bio-Rad 公司,美国),Odyssey 双色红外激光成像系统(LI-COR 公司,美国),PCR 扩增仪(ABI 公司,美国),日立 7080 型全自动生化分析仪(HITACHI 公司,日本)

1.4 模型的建立和标本的制备

将上述 50 只大鼠随机分成 5 组:正常对照组和模型组(10、18、24、36 h 组),每组 10 只。造模方法参考文献[4-5],模型组动物给予腹腔注射 500 mg/kg D-GalN 和 20 μg/kg LPS 生理盐水溶液,对照组动物给予等体积的生理盐水注射。造模后分别于 10、18、24、36 h 通过股动脉放血处死不同小组大鼠,留取血清和肝组织待检。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 病理学检查 取大鼠肝组织,10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,切片,常规 HE 染色,光镜下进行组织病理学观察。

1.5.2 血生化指标的测定 按照试剂盒说明书操作,使用日立 7080 型全自动生化分析仪上测定各组 ALT、AST 和 TBIL 水平的变化。

1.5.3 原位末端标记(TUNEL)法检测肝细胞凋亡 将肝组织固定后进行石蜡包埋、切片,常规脱蜡、水化,按 TUNEL 检测试剂盒说明书操作。DAB 显色,苏木精复染。镜下选 5 个高倍视野,每个视野计数 100 个肝细胞核,计算凋亡细胞百分比的均数即凋亡指数(apoptotic index,AI)。

1.5.4 Western 蛋白印迹法 称取不同时间点的肝组织约 100 mg,用冰冷的 PBS 液冲洗 2 遍,加入预冷的细胞裂解液,冰磨匀浆 3 ~ 5 min,至不见组织碎块,继续冰上孵育 10 min,以 15 000 r/min 离心 5 min,并通过蛋白定量试剂盒检测上清液浓度,再用上样缓冲液和裂解液调整蛋白浓度,保证上样液中蛋白浓度一致。然后进行加热变性(96 ℃加热 5 min),用 10% 聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳,待嗅酚蓝接近底线时终止电泳;将分离后的蛋白质从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳转至硝酸纤维素滤膜上,丽春红进行染色观察后,封闭液室温封闭 1 h,以封闭硝酸纤维素滤膜的免疫球蛋白结合位点;用 0.05% TBS-Tween 洗硝酸纤维素滤膜 2 × 20 min;加入一抗(山羊抗 caspase-1,浓度 1∶250,4 ℃过夜);次日,TBS 洗膜后,置于二抗中孵育,最后由 Odyssey 双色红外激光成像系统检测。

1.5.5 RT-PCR RNA 提取和 cDNA 合成按常规用 TRIzol 试剂盒提取各组肝脏组织,用随机引物和逆转录酶 SuperScript II 合成 cDNA,以 cDNA 2 μl 为模板,用 SYBR PremixEx*Taq* 试剂盒和 LightCycler 实时定量 PCR 仪做 PCR 扩增。所有样品拷贝数,用 LightCycler 统计软件计算。IL-18 引物为:正义链:5′-agaagaaggctcttgtgtcaactt-3′,反义链:5′-tacaggagagggtagacatccttc-3′。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较用方差分析检验。

2 结果

2.1 病理结果

正常对照组大鼠肝小叶结构清晰,未见炎细胞浸润,肝窦无扩张及淤血;模型组大鼠肝细胞呈大片状坏死,细胞结构不清晰,可见肝细胞液化性坏死同时伴有较多凝固性坏死的肝细胞以及散在分布的凋亡小体,凋亡细胞呈圆形,细胞核固缩深染(图 1A),染色质呈团块状,胞质浓缩,肝小叶结构消失,周围可见少量正常肝细胞(图 1B),HE 结果显示从病理角度看,模型制作成功。

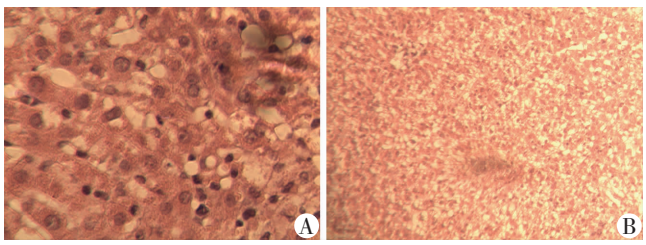


图 1 大鼠急性肝衰竭组肝组织 400 倍(A)与 100 倍(B)病理学变化 (HE)

2.2 血清 ALT、AST 和 TBIL 水平的变化

从表 1 可见,经 D-GalN/LPS 处理后,模型组大鼠血清 ALT、AST 和 TBIL 水平较正常对照组明显升高($P < 0.01$),且 ALT、AST 和 TBIL 随着时间的延长浓度有升高趋势($P < 0.05$),该变化从病理生理学角度证实了模型制作成功。

表 1 ALT,AST 和 TBIL 在各组大鼠之间的表达

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μmol/L)
正常对照组	42 ± 7	212 ± 16	0 ± 0
模型组(10 h)	2 012 ± 985[a]	3 757 ± 1 346[a]	5.12 ± 2.68[a]
模型组(18 h)	2 344 ± 873[a]	4 213 ± 1 243[a]	5.84 ± 1.89[a]
模型组(24 h)	2 670 ± 1 215[a]	4 536 ± 1 658[a]	6.34 ± 2.13[a]
模型组(36 h)	2 919 ± 1 392[a]	4 879 ± 1 732[a]	6.72 ± 2.31[a]

a:$P < 0.01$,与正常对照组比较

2.3 TUNEL 法检测肝细胞凋亡

与对照组相比,模型组大鼠肝细胞凋亡指数较正常对照组明显升高,且与时间相关,即随着时间的延续,凋亡指数逐渐升高(图 2)。模型组的凋亡指数在 10、18、24、36 h 分别为(20.3 ± 6.8)、(25.1 ± 7.0)、(30.1 ± 8.1)、(35.6 ± 9.7),与对照组(0.34 ± 0.12)相比,均有统计学差异($P < 0.05$)。

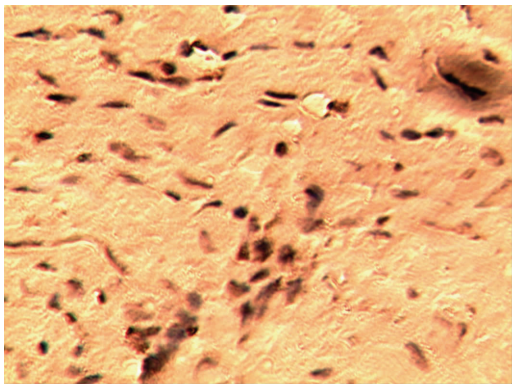


图2 大鼠急性肝衰竭模型组肝细胞凋亡的变化 （TUNEL ×400）

2.4 Real time-PCR 结果

IL-18 mRNA 表达与 caspase-1 趋势相同，模型组 IL-18 mRNA 相对含量显著高于对照组。模型组的 IL-18 mRNA 相对含量在10、18、24、36 h 分别为(4.3±1.2)、(5.1±2.0)、(7.2±2.7)、(9.6±3.1)，与对照组(0.56±0.32)相比，均有统计学差异($P<0.05$)。

2.5 Western blot 结果

Western blot 结果显示 46×10^3 处出现明显的条带，与 caspase-1 的大小相一致。模型组蛋白水平显著高于对照组，且其表达呈时间依赖趋势，而内参表达趋势一致。

3 讨论

急性肝衰竭是由于大量肝细胞坏死而导致的肝功能严重受损的临床综合征，其发生率约占肝炎的0.2%～0.5%，病死率极高。其治疗一直是临床上棘手的问题。急性肝衰竭的发生涉及众多炎症因子和细胞因子，其发病机制与肝细胞凋亡密切相关[6]。

本研究采用了经典的 D-氨基半乳糖模型(D-Gal)/脂多糖(LPS)诱导的大鼠急性肝衰竭模型，模型建立后，HE 结果提示模型成功。此外，模型组大鼠血清 ALT、AST 和 TBIL 水平和凋亡指数较正常对照组明显升高($P<0.01$)，且有时间依赖性。这些结果有力地支持了建模成功。然后，我们通过 RT-PCR 和 Western blot 检测了 IL-18 和 caspase-1 表达的情况，发现二者的表达趋势相似，随着凋亡的加重，其表达逐渐增高，说明两者在肝细胞凋亡中可能发挥一定作用。

IL-18 具有多种生物学活性，如刺激 T 细胞增殖，诱导 T 细胞和 NK 细胞产生 IFN-γ，使 T 细胞分泌 IL-2、粒-巨噬细胞集落刺激因子和肿瘤坏死因子(TNF-α)，同时可增强 Fas 配体(FasL)介导的细胞毒性作用，通过与 FasR 结合，在活化的淋巴细胞中诱导凋亡[7]。研究已经证实，IL-18 在肝的缺血再灌注后 IL-18 具有正性调节作用[8]。

IL-18 是由巨噬细胞产生无生理活性的前体，经过适当的刺激后才被处理成活化型 IL-18 分泌至细胞外，其激活酶为 Caspase-1。通过对小鼠的 Caspase-1 基因敲除后也发现，Caspase-1-/-小鼠缺乏成熟的 IL-18[9]，提示 Caspase-1 为发育成熟的 IL-18 所必须，是 IL-18 活化所必需的蛋白酶。尽管 Caspase-1 主要与炎症的发生有关，但有实验证明其与细胞凋亡有关：例如 Caspase-1 能剪切多聚“ADP”-核糖聚合酶，这是一种稳定和修复 DNA 的酶。这些证据提示了其在促进细胞凋亡中的作用。caspase1 还可通过 FasL 刺激机制及其他 IL-18 前体切断酶来增加 IL-18 的产生。

我们的研究结果显示 IL-18 和 Caspase-1 在大鼠肝衰竭模型中表达呈时间依赖性增高，而且二者的表达趋势基本一致。由于 Caspase-1 是 IL-18 的活化酶，二者的同时增高提示 IL-18 在急性肝衰竭时可以被 Caspase-1 激活进而发挥其细胞凋亡的诱导作用。此外 Caspase-1 本身与细胞凋亡的发生也有关系，因此可能进一步放大了细胞凋亡，促进了肝衰竭的发生。本研究提示，IL-18 可望成为急性肝衰竭的预测因子和未来的治疗靶点。

参考文献：

[1] Liu D, Li C, Chen Y, *et al*. Nuclear import of proinflammatory transcription factors is required for massive liver apoptosis induced by bacterial lipopolysaccharide[J]. J Biol Chem, 2004, 279(46): 48434－48442.

[2] Tschoeke S K, Oberholzer A, Moldawer L L. Interleukin-18: a novel prognostic cytokine in bacteria-induced sepsis[J]. Crit Care Med, 2006, 34(4): 1225－1233.

[3] 佟春玲，陆涛峰，余露露，等. IL-18 在临床疾病中的作用[J]. 生物技术通报，2009(增刊)：101－103，117.

[4] 祝晨，黄小民. 红花注射液对内毒素性急性肝损伤大鼠肝细胞凋亡的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志，2009，16(2)：85－87.

[5] 吴刚，闫歌，巫国谊，等. N-乙酰半胱氨酸抑制人肝细胞凋亡的实验研究[J]. 重庆医学，2005，34(1)：80－82.

[6] Agarwal K, Czaja A J, Donaldson P T. A functional Fas promoter polymorphism is associated with a severe phenotype in type 1 autoimmune hepatitis characterized by early development of cirrhosis[J]. Tissue Antigens, 2007, 69(3): 227－235.

[7] Wereszczynska-Siemiatkowska U, Kosel J, Siemiatkowski A. Biological properties of interleukin 18[J]. Pol Merkur Lekarski, 2004, 16(93): 279－281.

[8] Takeuchi D, Yoshidome H, Kato A, *et al*. Interleukin 18 causes hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing anti-inflammatory cytokine expression in mice[J]. Hepatology, 2004, 39(3): 699－710.

[9] Fantuzzi G, Puren A J, Harding M W, *et al*. Interleukin-18 regulation of interferon gamma production and cell proliferation as shown in interleukin-1beta-converting enzyme (caspase-1)-deficient mice[J]. Blood, 1998, 91(6): 2118－2125.

[10] 筒井ひろ子他，霍丽丽. 白细胞介素-18 的特征性产生和分泌的调控机制[J]. 日本医学介绍，2001，22(6)：270－271.

（**收稿**：2011-04-15；**修回**：2011-07-10）

（编辑 邓强庭）