文章编号:1000-5404(2012)12-1247-03

短篇论著

移植肝冷保存-再灌注过程中线粒体Ⅴ复合体蛋白表达与肝细胞凋亡的关系

张 莹[1],范 伟[1],张 玉[2],舒 芸[3] (550002 贵阳,贵州省人民医院:肝胆外科[1],信息科[2],医保科[3])

[摘要] **目的** 探讨大鼠肝移植冷保存-再灌注过程中肝细胞线粒体Ⅴ复合体(F_0F_1-ATPase)蛋白表达改变对肝细胞凋亡的影响。**方法** 150只Wistar大鼠,将其中144只随机等分为3组,采用改良"二袖套法"按冷保存30 min(A组)、6 h(B组)、12 h(C组)制作大鼠肝移植模型,剩余6只为对照组(D组)。分别于制模后12、24 h、3、5 d采集标本。检测肝细胞线粒体F_0F_1-ATPase蛋白表达、肝组织ATP含量、肝细胞凋亡计数及线粒体超微结构改变。**结果** 制模后12 h,C组F_0F_1-ATPase表达量明显低于A、B组($P<0.05$),并且线粒体超微结构损伤较重,肝细胞凋亡计数较A、B组明显增多($P<0.05$)。24 h后A、B、C组F_0F_1-ATPase表达量增加,但C组仍低于A、B组($P<0.05$)。3 d各组肝细胞凋亡计数无统计学差异($P>0.05$)。**结论** 冷保存再灌注早期F_0F_1-ATPase蛋白表达异常,是导致肝细胞凋亡的主要原因。

[关键词] 肝移植;冷保存;线粒体Ⅴ复合体;凋亡
[中图法分类号] R322.47;R329.28;R617 [文献标志码] A

肝移植再灌注损伤是一个重要的临床课题,严重的冷保存-再灌注损伤可导致移植肝功能衰竭,能量代谢障碍和细胞凋亡可能是其主要因素[1-2]。线粒体Ⅴ复合体(F_0F_1-ATPase)是调控ATP合成的重要细胞器[3],本实验通过研究肝细胞线粒体F_0F_1-ATPase蛋白表达改变对凋亡的影响,探讨移植肝早期功能受损的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与制模

清洁级Wistar大鼠150只,体质量200~250 g,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。供体术前自由饮食,受体术前12 h禁食,自由饮水。将其中144只随机等分为3组,采用改良"二袖套法"[4]按冷保存30 min(A组)、6 h(B组)、12 h(C组)制作大鼠肝移植模型。分别于制模后于12 h、24 h、3 d、5 d采集标本。其余6只作为假手术对照组(D组)。

1.2 试剂

F_1-ATPase抗体(羊抗鼠)购于Santa Cruz公司。标准ATP购于Sigma公司。TUNEL试剂盒(POD-Roche Molecular Biochemical,德国)。

1.3 肝组织标本采集

乙醚麻醉实验大鼠,快速取部分新鲜肝组织分别放入2.5%戊二醛溶液及4%多聚甲醛溶液,用于电镜观察和石蜡切片。其余肝组织置于液氮保存。

1.4 F_0F_1-ATPase蛋白表达

Western blot检测F_0F_1-ATPase蛋白表达。按试剂盒说明提取肝组织总蛋白。按20 μg/样本吸取蛋白提取液。蛋白样品电泳完毕转至硝酸纤维素膜,加一抗,抗体浓度为1∶200,1×TBST稀释,室温孵育2 h。1×TBST洗膜3次,每次10 min。加二抗,浓度为1∶750,1×TBST稀释,室温孵育2 h。1×TBST洗3次,每次10 min。自然晾干转染膜。化学显影剂A液1 000 μl,B液25 μl混匀涂抹在膜上5 min。吸干显影液后将转印膜包裹于保鲜膜中置片盒内。暗室显影及定影。用Quantity One 4.4生物图像分析软件分析杂交条带的灰度×面积值,统计分析蛋白表达量的变化。

1.5 肝组织ATP含量测定

从液氮中取出肝组织样品,精确称取细小组织块200 mg左右,立即加入$HClO_4$液试管中,机械匀浆6 000 r/min离心30 s;4 ℃,3 000 r/min离心10 min;另取试管,取上清1 ml,按说明书操作。

1.6 透射电镜检查

戊二醛固定标本,经1%四氧化锇固定,梯度乙醇脱水,EPON812环氧树脂浸透包埋,超薄切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重染色后行透射电镜观察肝细胞超微结构变化。

1.7 细胞凋亡检测

TUNEL法按试剂盒说明操作。计数:显微镜下随机取5个高倍视野(×400),计数凋亡肝细胞数,再求出平均每个视野的凋亡细胞数,以凋亡指数(apoptosis index,AI)表示。设置阴性对照(PBS代替反应液)。

1.8 统计学分析

各组数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件行t检验和单因素方差分析。

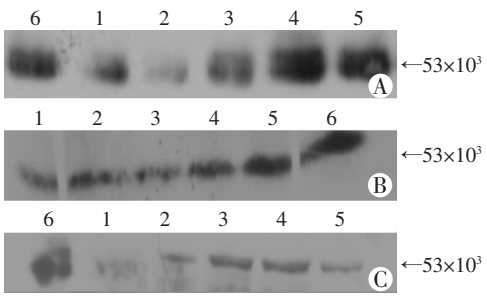
2 结果

2.1 肝组织F_0F_1-ATPase蛋白的表达量变化

F_0F_1-ATPase蛋白表达量在制模后12 h明显降低,C组较A、B组降低有统计学差异($P<0.05$)。24 h以后逐渐升高,5 d时C组与A组比较仍具有统计学差异($P<0.05$)。A、B组在制模后24 h、3 d升高明显($P<0.05$)。C组则在制模后3、5 d

[基金项目] 贵州省优秀青年科技人才培养对象专项资金(2011-29);贵州省科技厅专项基金(J 2008-2302)
[通信作者] 张 莹,E-mail:zhangyingdoc@163.com

升高明显($P<0.05$)。见图1,表1。



A:A组;B:B组;C:C组;1-5:制模后12 h、24 h、3 d、5 d、7 d;6:对照组(D组)

图1 各组大鼠 F_0F_1-ATPase 蛋白的表达

表1 术后不同时间各组肝细胞 F_0F_1-ATPase 蛋白表达($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	12 h	24 h	3 d	5 d
A	0.85±0.15	1.10±0.18[a]	1.38±0.11[a]	1.35±0.15
B	0.62±0.06	0.81±0.10[a]	1.24±0.09[a]	1.31±0.10
C	0.50±0.05[bc]	0.51±0.07[bc]	0.91±0.11[abc]	1.11±0.13[abc]
D			1.43±0.20	

a: $P<0.05$,与前一时间点比较;b: $P<0.05$,与A组比较;c: $P<0.05$,与B组比较

2.2 肝组织 ATP 变化

制模后12 h各组肝组织ATP降低,冷保存时间越长,ATP水平降低显著,A组分别与B、C组比较有统计学差异($P<0.05$)。A、B组术后24 h、3 d、5 d升高明显($P<0.05$),C组3、5 d升高明显($P<0.05$)。见表2。

表2 术后不同时间各组大鼠术后肝组织 ATP 水平(IU/L, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	12 h	24 h	3 d	5 d
A	0.69±0.10	1.22±0.19[a]	1.64±0.27[a]	1.95±0.21[a]
B	0.57±0.09[b]	0.68±0.11[ab]	1.35±0.20[ab]	1.66±0.15[ab]
C	0.43±0.04[b]	0.52±0.09[b]	1.27±0.17[ab]	1.46±0.17[ab]
D			2.27±0.19	

a: $P<0.05$,与前一时间点比较;b: $P<0.05$,与A组比较

2.3 透射电镜结果

A、B组制模后12、24 h可见肝细胞线粒体肿胀,基质密度减低,嵴部分断裂;3 d可见肝细胞线粒体肿胀不明显,基质密度基本正常,嵴形态完整;C组制模后12、24 h肝细胞线粒体高度肿胀呈大泡状改变,嵴断裂、减少甚至消失,基质密度减低呈斑点状。3 d可见肝细胞线粒体肿胀,空泡状改变明显减少,基质密度减低,可见少量嵴断裂,内质网轻度扩张;5 d可见肝细胞线粒体肿胀较前减轻,基质密度稍低,嵴形态基本完整。D组肝细胞线粒体结构完整,基质均匀,未见明显异常。

2.4 不同冷保存时间肝脏细胞凋亡的改变

制模后12 h各组均见凋亡细胞,与A、B组相比,C组凋亡最为显著($P<0.05$),24 h C组仍有明显细胞凋亡,与A组比较存在统计学差异($P<0.05$)。3 d后各组凋亡细胞均减少,组间比较无统计学差异($P>0.05$,表3)。对照组未见凋亡细胞。

表3 术后不同时间各组肝细胞凋亡水平(%, AI, $n=6$, $\bar{x}\pm s$)

组别	12 h	24 h	3 d	5 d
A	1.53±0.40	1.40±0.25	1.19±0.30	1.10±0.28
B	2.31±0.49[b]	1.62±0.37[a]	1.48±0.18	1.38±0.39
C	4.47±0.60[bc]	3.61±0.39[b]	2.11±0.58[a]	1.37±0.26

a: $P<0.05$,与前一时间点比较;b: $P<0.05$,与A组比较;c: $P<0.05$,与B组比较

3 讨论

肝脏移植会经历长时间缺血和随后的再灌注过程,进而引起移植物损伤,大约10%的供肝在早期出现功能衰竭[5-6]。移植肝缺血再灌注损伤成为困扰肝移植发展的重要问题之一。有研究认为能量代谢障碍和细胞凋亡可能是其主要因素之一[7-8]。

本实验中供肝低温保存再灌注期后,组织内有明显的肝实质细胞损伤和凋亡存在,表现为电镜下观察到线粒体肿胀明显,膜模糊不清,线粒体嵴明显疏松溶解,空泡形成,光镜下见肝细胞大量凋亡。结果表明,移植肝在氧应激条件下,线粒体超微结构改变,线粒体基质及嵴结构损伤,线粒体的呼吸链功能蛋白 F_0F_1-ATPase 表达降低, ATP 含量明显减少,导致肝脏能量缺乏,引起肝细胞凋亡等一系列病理变化,并且供肝冷保存在6 h以内,这种病理改变可较快修复,但冷保存12 h时,则修复较慢。

F_0F_1-ATPase 位于线粒体内膜的基质侧,主要由疏水部分 F_0 和亲水部分 F_1 组成,是线粒体呼吸链上最重要的酶类之一,直接参与 ATP 的合成。在呼吸链电子传递过程中线粒体内膜两侧产生电化学梯度,形成线粒体膜电位,内膜外的质子通过 F_0F_1-ATPase 复合体 F_0 亚基上的质子通道流回到基质内,质子回流所释放的势能传递给 ADP 磷酸化形成 ATP[9]。当 F_0F_1-ATPase 复合体因损伤发生结构和(或)功能改变,势必影响质子回流。本研究发现移植肝再灌注早期(12 h)线粒体 F_0F_1-ATPase 功能即已发生改变。A、B、C 3组均有所下降,并以C组表达降低最为显著,ATP 含量也相应降低,说明缺血再灌注可引起 F_0F_1-ATPase 功能的损伤,表现为氧化磷酸化偶联能力降低,利用氧的能力下降,能量合成受阻。

细胞凋亡是一个复杂的网络构造,线粒体在细胞凋亡过程中起着十分重要的作用[10]。当线粒体损伤后,可释放细胞色素C等使细胞凋亡,但移植肝再灌注损伤中线粒体 F_0F_1-ATPase 蛋白表达对细胞凋亡的影响少见报道。本实验结果表明,大鼠移植肝冷保存再灌注早期,A、B、C 组 F_0F_1-ATPase 蛋白表达降低,肝细胞凋亡数量增多,并且以C组最为明显,提示长时

间的冷保存(供肝冷保存12 h)使F_0F_1-ATPase蛋白合成明显下降,肝细胞氧化磷酸化受损,ATP生产减少,细胞凋亡增多,这说明F_0F_1-ATPase在能量代谢方面参与肝细胞凋亡。再灌注24 h后F_0F_1-ATPase表达明显升高,ATP合成也相应增多,肝细胞凋亡也随之减少,这也从一个方面反应F_0F_1-ATPase蛋白表达对肝细胞能量合成及肝细胞凋亡起着至关重要的作用。C组在再灌注24 h内F_0F_1-ATPase蛋白表达明显受抑,可能与长时间冷保存导致增殖的自由基攻击线粒体F_0F_1-ATPase复合体,使蛋白表达降低,功能异常,致使线粒体内膜两侧电化学梯度异常,线粒体膜电位发生改变有关,这种改变可能激活线粒体介导的凋亡通路致细胞色素C释放而致肝细胞凋亡。

综上所述,F_0F_1-ATPase的蛋白表达与ATP合成及肝细胞凋亡变化密切相关,提示F_0F_1-ATPase蛋白表达异常是导致移植肝早期细胞凋亡的主要原因。

参考文献:

[1] Bhogal R H, Curbishley S M, Weston C J, *et al*. Reactive oxygen species mediate human hepatocyte injury during hypoxia/reoxygenation [J]. Liver Transpl, 2010, 16(11): 1303-1313.
[2] Suen D F, Norris K L, Youle R J. Mitochondrial dynamics and apoptosis[J]. Genes Dev, 2008, 22(12): 1577-1590.
[3] 张莹, 别平, 石承先, 等. mtTFA、NRF-1对冷保存-再灌注肝移植大鼠线粒体DNA ATPase6基因表达的调节[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(21): 2337-2342.
[4] 张莹, 别平, 石承先, 等. "二袖套法"制备大鼠原位肝移植模型的方法改进[J]. 消化外科, 2005, 4(6): 444-446.
[5] Montalvo-Jave E E, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado J A, *et al*. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury[J]. J Surg Res, 2008, 147(1): 153-159.
[6] Zhang W X, Yin W, Zhang L, *et al*. Preconditioning and postconditioning reduce hepatic ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2009, 8(6): 586-590.
[7] Kamo N, Shen X D, Ke B, *et al*. Sotrastaurin, a protein kinase C inhibitor, ameliorates ischemia and reperfusion injury in rat orthotopic liver transplantation[J]. Am J Transplant, 2011, 11(11): 2499-2507.
[8] Zeng Z, Huang H F, Chen M Q, *et al*. Contributions of heme oxygenase-1 in postconditioning-protected ischemia-reperfusion injury in rat liver transplantation[J]. Transplant Proc, 2011, 43(7): 2517-2523.
[9] Aksimentiev A, Balabin I A, Fillingame R H, *et al*. Insights into the molecular mechanism of rotation in the F_0 sector of ATP synthase[J]. Biophys J, 2004, 86(3): 1332-1344.
[10] Lin F S, Shen S Q, Chen Z B, *et al*. 17β-estradiol attenuates reduced-size hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibition apoptosis *via* mitochondrial pathway in rats[J]. Shock, 2012, 37(2): 183-190.

(**收稿**:2012-01-08;**修回**:2012-03-18)
(编辑 邓强庭)

文章编号:1000-5404(2012)12-1249-03

短篇论著

PTEN甲基化及其异常表达与膀胱移行细胞癌的关系

延敏博,孙华宾,刘 燕,徐白生 (519000 广东 珠海,中山大学附属第五医院泌尿外科)

[**摘要**] **目的** 探讨PTEN基因启动子甲基化及其mRNA异常表达与膀胱移行细胞癌临床及病理特征的关系。**方法** 应用甲基化特异性PCR(MSP)法检测膀胱移行细胞癌组织(48例)和正常膀胱组织(15例)PTEN基因启动子甲基化状态,应用RT-PCR技术检测其mRNA的表达水平。**结果** 膀胱癌组织中PTEN启动子甲基化率为47.9%(23/48),而在15例正常膀胱组织中其启动子未发生甲基化,两组间差异具有统计学意义($P<0.01$);PTEN基因mRNA在膀胱癌组织和正常膀胱组织中的阳性表达率分别是56.2%(27/48)和100.0%(15/15),两组间差异有统计学意义($P<0.01$);PTEN基因启动子甲基化率与其mRNA表达水平在不同病理分级、临床分期间差异有统计学意义($P<0.05$),且PTEN启动子甲基化与其mRNA表达存在明显关联性($\chi^2=21.372$, $r=0.555$, $P<0.01$)。**结论** PTEN基因启动子甲基化可导致其mRNA表达的缺失,对膀胱移行细胞癌的发生及转移有着极其重要的影响。

[**关键词**] 膀胱移行细胞癌;PTEN;甲基化
[**中图法分类号**] R394.2;R730.23;R737.14 [**文献标志码**] A

第10号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源物基因(PTEN)是最早被发现的具有双特异性磷酸酶活性的抑癌基因,它可以通过多种细胞因子途径抑制肿瘤的发生、发展。研究表明,PTEN基因在多种恶性肿瘤中存在表达缺失或低表达,其中大部分与该基因启动子甲基化有关[1],而在膀胱移行细胞癌中相关研究较少。本研究采用甲基特异性聚合酶链反应(methyl-

[**基金项目**] 广东省医学科研基金(B2011368);广东省科技计划项目(2010B06090042)
[**通信作者**] 孙华宾,E-mail: sunhuabin66@163.com