

大鼠肝再生早期线粒体介导的 caspase-3 激活的机制

时 多¹,袁 斌¹,袁 星¹,蒋恒义¹,孙学军²,缪明永^{1*},焦炳华^{1*}

(1. 第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室,上海 200433;2. 第二军医大学海军医学系潜水医学教研室)

[摘要] **目的:**从线粒体介导的内源性途径分析大鼠肝再生早期肝细胞凋亡执行酶 caspase-3 激活的机制。**方法:**雄性 SD 大鼠 35 只,分成模型组 15 只(70%肝切除制作肝再生模型)、假手术组 15 只和正常对照组 5 只。模型组和假手术组根据时间分为术后 3、6 和 24 h 三个亚组,每个亚组 5 只。取各组大鼠肝组织,制备肝匀浆液。荧光法测肝组织凋亡酶 caspase-3 和 caspase-9 的活性;酶联免疫分析法测谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性;硝酸还原法测 NO 含量。**结果:**与假手术组相比,模型组凋亡酶 caspase-3 和 caspase-9 的活性在肝再生早期(术后 3、6 h 组)显著增高($P < 0.01$);GSH-Px 水平显著降低,NO 分泌量显著增高($P < 0.01$)。**结论:**肝再生早期,肝组织处于氧化应激状态,线粒体介导的内源性途径参与凋亡执行酶的激活。

[关键词] 肝再生;细胞凋亡;线粒体;caspase-3;caspase-9;氧化性应激

[中图分类号] R 657.3;R 349.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)10-1079-03

Mechanism of mitochondria-mediated activation of apoptotic enzyme caspase-3 during early phase of liver regeneration in rats

SHI Duo¹, YUAN Bin¹, YUAN Xing¹, JIANG Heng-yi¹, SUN Xue-jun², MIAO Ming-yong^{1*}, JIAO Bing-hua^{1*} (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. Department of Diving Medicine Faculty of Naval Medicine, Second Military Medical University)

[ABSTRACT] **Objective:** To analyze the activation mechanism of hepatic apoptosis-related enzyme caspase-3 during the early phase of liver regeneration in rats from the perspective of mitochondria-mediated endogenous signal pathway. **Methods:** Thirty-five male SD rats were randomly divided into 3 groups: model group [70% partial hepatectomy (PH), $n = 15$], sham-operated group ($n = 15$), and control group ($n = 5$). The former 2 groups were further divided into 3 subgroups according to time after operation (3 h, 6 h, and 24 h after operation, 5 animals in each group). The animals in all groups were sacrificed and the liver homogenates were prepared. Using the fluorescence method, we determined the activities of hepatic caspase-3 and caspase-9 at 3 different time points after operation. The activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) and the content of NO were examined by enzyme immunoassay and nitrate reductase assay, respectively. **Results:** The activities of hepatic caspase-3 and 9 both increased significantly compared with those of sham-operated group ($P < 0.01$) at 3 h and 6 h after operation; the level of GSH-Px was significantly decreased and the content of NO was significantly increased compared with those of the sham-operated group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Hepatic tissue is under oxidative stress during the early phase of liver regeneration, and the mitochondria-mediated endogenous signal pathway is involved in the activation of caspase-3.

[KEY WORDS] liver regeneration; apoptosis; mitochondria; caspase-3; caspase-9; oxidative stress

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(10):1079-1081]

大鼠肝部分切除后,很快会进入复杂的再生过程。研究发现,凋亡执行酶 caspase-3 的活性在肝再生早期显著增高^[1],但其激活机制仍不清楚。对肿瘤等病理生理过程的研究发现,由线粒体参与的内源性途径参与凋亡执行酶的激活。其中,线粒体通透性转换(mitochondrial permeability transition, mPT)是中心环节^[2],而活性氧(ROS)可诱导或加剧线粒体通透性增高。当受到凋亡信号刺激后,线粒体通透性增高,导致线粒体跨膜电位消失和细胞色素 C 等凋亡因子释放,后者与细胞凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)结合成复合物后,依次激活 caspase-9 和 caspase-3。而研究发现大鼠肝部分切除后早期

线粒体膜通透性增高,进一步提示线粒体参与的内源性途径与凋亡酶的激活存在着相关性^[3]。

为了阐明大鼠肝再生早期凋亡酶激活的机制并明确线粒体途径在其中的作用,本实验利用大鼠肝再生模型,用高灵敏度的发光底物法对肝再生早期肝组织 caspase-3 和 caspase-9 的活性变化进行检测,同时对组织自由基含量和抗氧化能力进行检测,

[基金项目] 国家自然科学基金(30570837)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30570837)。

[作者简介] 时 多,博士生。E-mail:shiduo_20021037@163.com

* Corresponding authors. E-mail:jiaobh@uninet.com.cn;

miaomy1980@hotmail.com

明确由线粒体和 caspase-9 介导的内源性途径及组织氧化应激状态下对 caspase-3 激活的影响。

1 材料和方法

1.1 主要仪器与试剂 CR21 高速冷冻离心机(日立公司);Flex station II 台式荧光检测仪;caspase-3 和 caspase-9 荧光检测试剂盒(Biovision 公司);Bradford 蛋白定量试剂盒和蛋白酶抑制剂(申能博彩);谷胱甘肽过氧化物酶测试盒(GSH-Px)和 NO 含量测试盒(南京建成生物);其他试剂为国产分析纯。

1.2 实验动物分组 SD 雄性大鼠 35 只,体质量 200~250 g,购于中国科学院上海实验动物中心,正常饮食,室温(24±2)℃,平均日光照 12 h。分成模型组 15 只、假手术组 15 只和对照组 5 只,模型组和假手术组又分别根据手术后时间分为 3、6 和 24 h 3 个亚组,每亚组 5 只。模型组大鼠用 3% 戊巴比妥麻醉后,按经典方法切除全肝的 70 % (肝左叶和中叶);假手术组只麻醉和开腹,不切肝;对照组不做任何处理。

1.3 蛋白样品的制备 将动物麻醉,取肝组织,于液氮中迅速冻结后,-80℃ 冻存。称取约 150 mg 肝组织,加入 1 ml PBS(10 mmol/L, pH 7.4),同时加入 10 μl 蛋白酶抑制剂,冰上匀浆;4℃ 离心 1 500×g 10 min,取上清,10 000×g 离心 10 min,取上清;按 Bradford 蛋白定量试剂盒说明书,进行蛋白浓度测定,并将样品蛋白浓度统一调整为 3 mg/ml。

1.4 Caspase-3 和 caspase-9 活性检测 根据酶促反应动力学原理,通过测定单位时间内产物生成量,检测酶的活性。按试剂盒说明书,直接在预冷的标准 opaque 板上加样,蛋白溶液 50 μl、反应缓冲液 50 μl (含 10 mmol/L DTT)和底物 5 μl,轻轻吹打混匀。同时,以 PBS 替代蛋白溶液,设空白对照。在荧光检测仪上,设定反应温度为 37℃,激发波长和发射波长分别为 400 nm 和 505 nm。每 5 min 读数 1 次,反应总时间 60 min。反应结束后,所得直线的斜率即为各样本中酶活性的相对值。

1.5 肝组织 GSH-Px 活性和 NO 含量检测 按试剂盒说明书进行操作,反应结束后,蒸馏水调零,分别测 505 nm(GSH-Px)和 412 nm(NO)处光密度值。将光密度值代入公式分别计算酶的活力(活力单位)和 NO 含量。

1.6 统计学处理 组间比较用 t 检验。

2 结果

2.1 Caspase-3 和 9 的活性 如图 1 所示,与假手

术组相比,模型组 caspase-3 和 9 的活性在术后 3 h 和 6 h 均显著增高(P<0.01)。其中,3 h 组的活性高于 6 h 组(P<0.01)。

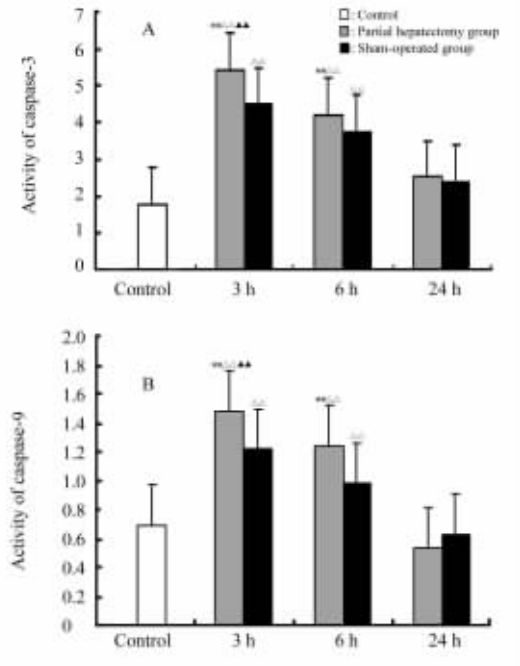


图 1 肝再生早期肝细胞 caspase-3(A)和 caspase-9(B)的活性变化

Fig 1 Activity changes of caspase-3(A) and caspase-9(B) during early phase of liver regeneration in rats

n=5, $\bar{x} \pm s$; * P<0.01 vs sham-operated group; $\Delta\Delta$ P<0.01 vs control group; \blacktriangle P<0.01 vs 6 h group

2.2 GSH-Px 活力 如图 2 所示,与假手术组相比,模型组 GSH-Px 的活力在手术后 3 h、6 h 和 24 h 显著下降(P<0.01)。

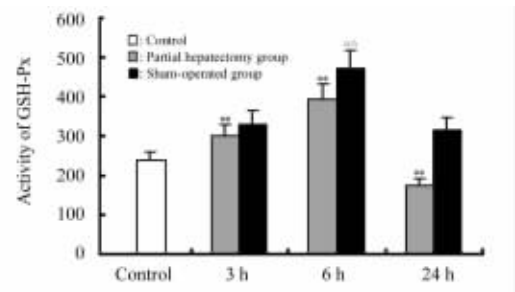


图 2 肝再生早期肝细胞 GSH-Px 活力改变
Fig 2 Activity changes of GSH-Px during early phase of liver regeneration in rats

n=5, $\bar{x} \pm s$; * P<0.01 vs sham-operated group; $\Delta\Delta$ P<0.01 vs control group

2.3 NO 含量 如图 3 所示,与假手术组相比,模型组组织 NO 含量在手术后 3 h 和 6 h 显著增高

($P < 0.01$)。24 h 时却低于假手术组($P < 0.01$)。

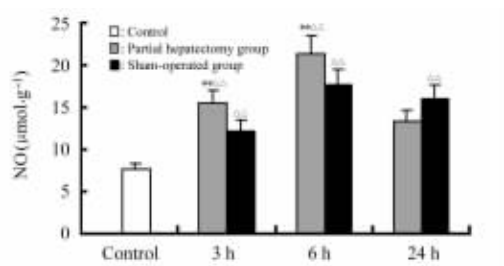


图 3 肝再生早期肝细胞 NO 含量变化

Fig 3 Changes of hepatic NO content during early phase of liver regeneration in rats

$n=5, \bar{x} \pm s; * P < 0.01$ vs sham-operated group; $\Delta \Delta P < 0.01$ vs control group

3 讨论

在引起线粒体膜通透性增高的诸多因素中,氧化应激是最常见的原因。ROS 的增加可直接或间接损伤线粒体膜,造成膜电位下降^[4]。膜电位的下降直接导致膜通透性增高,线粒体膜间腔的 CytC 释放入胞质^[5-6]。当机体在内、外源性因素刺激下产生的自由基超出抗氧化系统的清除能力时,就发生氧化应激。NO 是自由基的一种,谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是细胞内重要的抗氧化剂。通过检测 NO 的含量及 GSH-Px 的活性,可以检测机体是否处于氧化应激状态。

凋亡的激活对肝切除后的肝再生过程具有重要意义,机体通过适当激活凋亡可以抑制肝细胞过度增生,使肝脏在体积和组织结构恢复到正常时即停止增生。对肝再生调控分子机制的研究表明,肝细胞内凋亡执行酶 caspase-3 的活性在肝切除术后早期即有明显升高^[1],可能对肝再生的启动具有调控功能,但其在肝再生过程中激活的机制和途径等问题仍不清楚。

近年来的研究^[3,7-8]发现,线粒体膜通透性转换对肝再生过程中凋亡酶的激活十分重要。大鼠肝部分切除后 1 d 内,线粒体膜通透性增高,同时在细胞液中检测到由线粒体释放的蛋白质分子。有文献报道在肝再生早期,肝线粒体氧化磷酸化下降,自由基水平则显著升高^[9],而自由基的产生与术后应激和线粒体膜的通透性增高又存在一定关系。这些结果提示,线粒体的膜通透性增高后,通过释放凋亡相关因子,最终激活 caspase-9 和 caspase-3。氧化应激可能也参与并促进了这一过程。

我们的实验发现,在肝再生早期(即术后 3 h 和 6

h),caspase-3 和 caspase-9 的活性与对照组相比均显著增高,二者的变化趋势较为一致。同时,caspase-3 的变化幅度远大于 caspase-9,符合酶促级联反应放大的特性。此时细胞凋亡活性的增高可能与手术引起的应激反应有关。结合我们以前的研究结果^[10],即 caspase-8 在肝再生早期并未被激活,从而推测线粒体介导的内源性途径是凋亡酶 caspase-3 激活的主要原因。同时,对细胞氧化应激状态的检测发现,在肝再生早期,细胞抗氧化酶 GSH-Px 活性下降,而 NO 含量显著增高,说明细胞抗氧化能力降低,氧自由基含量增高,肝组织处于氧化应激状态。

根据目前的研究结果和文献资料,我们推测在肝再生早期,氧化应激和线粒体通透性增高两方面的因素共同促进了凋亡酶的激活。而对于凋亡酶的激活与肝再生启动等问题的关系,还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Hayami S, Yaita M, Ogiri Y, et al. Change in caspase-3-like protease in the liver and plasma during liver regeneration following partial hepatectomy[J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60: 1883-1886.
- [2] Zoratti M, Szabo I, De Marchi U. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1706(1-2): 40-52.
- [3] 缪明永,朱克军,汪振诚,等.大鼠肝再生时线粒体通透性转换的变化[J]. *第二军医大学学报*, 2004, 25: 292-294.
- [4] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte death *in vivo*[J]. *J Exp Med*, 1995, 181: 1661-1672.
- [5] Kulms D, Schwarz T. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64(5-6): 837-841.
- [6] Kulms D, Schwarz T. Molecular mechanisms involved in UV induced apoptotic cell death[J]. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2002, 15: 342-347.
- [7] Guerrieri F, Pellicchia G, Ioprire B, et al. Changes in ultrastructure and the occurrence of permeability transition in mitochondria during rat liver regeneration[J]. *Eur J Biochem*, 2002, 269: 3304-3312.
- [8] Morales-Gonzalez J A, Gutiérrez-Salinas J, Piña E. Release of mitochondrial rather than cytosolic enzymes during liver regeneration in ethanol-intoxicated rats[J]. *Arch Med Res*, 2004, 35: 263-270.
- [9] Carnovale C E, Scapini C, Alvarez M L, et al. Nitric oxide release and enhancement of lipid peroxidation in regeneration rat liver[J]. *J Hepatol*, 2000, 32: 798-804.
- [10] 周运恒,缪明永,李洋,等.大鼠肝再生过程中肝细胞 caspase-3 和 caspase-8 活性的变化[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27: 500-502.

[收稿日期] 2007-04-17

[修回日期] 2007-07-17

[本文编辑] 尹 茶