

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00577

腹腔注射重组人肝再生增强因子促进梗阻性黄疸大鼠肝细胞线粒体转录因子 A 及核呼吸因子 1 的表达

Intraperitoneal injection of recombinant human augments of liver regeneration promotes expression of hepatocyte TFAM and NRF-1 in obstructive jaundice rats

唐春, 谢斌, 刘宏鸣, 别平*, 李昆, 张玉君, 马正伟

第三军医大学大坪医院野战外科研究所肝胆外科, 重庆 400042

[摘要] **目的:**观察重组人肝再生增强因子(recombinant human augments of liver regeneration, rhALR)对梗阻性黄疸大鼠肝细胞线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)及核呼吸因子 1(nuclear respiratory factor-1, NRF-1)表达的影响。**方法:**健康 Wistar 大鼠随机分为假手术(Sham)组、胆道梗阻再通(BDO-RBF)组、胆道梗阻再通及 rhALR 治疗(BDO-RBF-rhALR)组($n=48$),利用荧光定量 PCR 方法检测各组大鼠肝细胞 TFAM、NRF-1 mRNA 的表达。**结果:**当胆道梗阻后,大鼠肝细胞 TFAM、NRF-1 mRNA 表达均下降($P<0.05$),且随着梗阻时间的延长其下降程度逐步增加;解除梗阻后,其拷贝数逐步恢复。BDO-RBF-rhALR 组大鼠 TFAM、NRF-1 mRNA 表达明显高于同一时间点 BDO-RBF 组($P<0.05$)。**结论:**腹腔注射 rhALR 可能通过促进梗阻性黄疸大鼠肝细胞 TFAM、NRF-1 mRNA 表达发挥保护肝功能的作用。

[关键词] 重组人肝再生增强因子;梗阻性黄疸;TFAM;NRF-1

[中图分类号] R 657.43 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0577-03

梗阻性黄疸常伴严重的肝功能损伤,给梗阻性黄疸的围手术期处理带来了较大的困难。我们的前期研究^[1-2]发现,重组人肝再生增强因子(recombinant human augments of liver regeneration, rhALR)可通过修复损伤的肝细胞线粒体 DNA(mtDNA)发挥保护梗阻性黄疸大鼠肝功能、促进胆道再通后肝功能恢复的作用,但其具体保护机制仍不清楚。肝细胞线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A, TFAM)及核呼吸因子 1(nuclear respiratory factor-1, NRF-1)是肝细胞 mtDNA 的重要核调控因子,与 mtDNA 的功能发挥紧密相关^[3-4]。因此,本研究在前期实验的基础上进一步观察腹腔注射 rhALR 对梗阻性黄疸大鼠肝细胞 TFAM 及 NRF-1 表达的影响,探讨其可能的保护机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理 健康 Wistar 大鼠(由第三军医大学及大坪医院实验动物中心提供),雌雄不限,随机分为 3 组:假手术(Sham)组、胆道梗阻再通(BDO-RBF)组、胆道梗阻再通并给予 rhALR 治疗(BDO-RBF-rhALR)组。

Sham 组:开腹后暴露肝门,游离胆总管后关腹,部分动物于 14 d 后再次开腹,分离腹腔粘连、暴露肝门后关腹。BDO-RBF 组: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;大鼠胆道梗阻后,多于 10~14 d 后肝脏发生不可逆损害,因此部分动物 14 d 后于近端扩张胆总管与十二指肠第

2 肠段间架桥插入 1 根直径约 2 mm 的硅胶管并固定行胆道再通^[3]。BDO-RBF-rhALR 组:手术方法同 BDO-RBF 组,胆总管结扎术后腹腔注射 rhALR(由空军广州医院全军传染病中心孔祥平教授惠赠)40 $\mu\text{g}/\text{kg}$,每 12 h 注射 1 次,至动物处死;Sham 组及 BDO-RBF 组大鼠腹腔内注射等量生理盐水。

各组观察时间点为第 1 次术后第 1、4、7、14、15、18、21、28 天,大鼠处死后取肝组织置液氮中保存备用。若在观察期间出现动物死亡,则另取大鼠补做模型,死亡大鼠不纳入观察范围,保证每组每时间点存活大鼠 6 只,共观察大鼠 144 只,体质量 175~330 g,平均(214.94 \pm 32.33) g。

1.2 荧光定量 PCR 检测肝细胞 TFAM、NRF-1 mRNA 的表达

1.2.1 肝细胞总 RNA 的抽提 采用异硫氰酸胍法提取肝细胞总 RNA,低温保存备用。在 D_{260}/D_{280} 条件下进行 RNA 纯度鉴定和定量,并用甲醛变性琼脂糖凝胶电泳进一步确认 RNA 质量。取总 RNA 5.0 μg 反转录合成 cDNA,以备后续实验使用。

1.2.2 PCR 引物设计与合成 根据各反应产物 cDNA 序列,设计并合成引物。TFAM 引物(gi: 38304014):上游(193~216 nt)为 5'-TAC CCT CGC CTG TCA GCC TTA TCT-3',下游(766~789 nt)为 5'-CAC TTC GCC CAA CTT CAG CCA TTT-3';扩增片段长度 597 bp。NRF-1 引物(gi: 1009022):上游(130~150 nt)为 5'-CCA CAT TAC AGG GCG GTG AA-3',下游(232~251 nt)为 5'-AGT GGC TCC

[收稿日期] 2008-12-04 **[接受日期]** 2009-03-17

[基金项目] 国家自然科学基金(30571806)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30571806)。

[作者简介] 唐春,博士,主治医师。E-mail: tangchun73@hotmail.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 023-68754169, E-mail: bieping@mail.tmmu.com.cn

CTG TTG CAT CT-3';扩增片段长度 122 bp。β-actin 引物 (gi:15426604):上游(436~457 nt)为 5'-ATC ATG TTT GAG ACC TTC AAC A-3',下游(734~753 nt)为 5'-CAT CTC TTG CTC GAA GTC CA-3';扩增片段长度 318 bp。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2.3 PCR 反应体系 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 10 μl, cDNA 模板 2 μl(约 100 ng),上下游引物各 0.4 μl(终浓度 0.2 μmol/L)或 0.8 μl(β-actin),H₂O 7.2 μl 或 7.84 μl(β-actin),总反应体积 20 μl。采用 Roche Lightcycler 荧光定量 PCR 仪,具体反应条件见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 反应条件

反应产物	PCR 反应条件								
	第一步:预变性(1 Cycle)			第二步:PCR 反应(45 Cycles)			第三步:熔解分析曲线		
	TTp θ/°C	TTm t/s	TTR (°C/s)	TTp θ/°C	TTm t/s	TTR (°C/s)	TTp θ/°C	TTm t/s	TTR (°C/s)
TFAM	95	10	20	95	10	20	95	0	20
				55	30	20	65	15	20
				72	60	20	95	0	0.1
NRF-1	95	30	20	95	5	20	95	0	20
				55	30	20	65	15	20
				72	10	20	95	0	0.1
β-actin	95	30	20	95	10	20	95	0	20
				55	30	20	65	15	20
				72	45	20	95	0	0.1

TTp:目标温度(target temperature);TTm:孵育时间(incubation time);TTR:温度移变速率(temperature transition rate)

1.2.4 标准曲线的绘制及定量计算 分别取正常大鼠总 RNA 经反转录反应后的 cDNA,分别制作 TFAM、NRF-1 及 β-actin 的标准曲线。各反应模板按 10⁵、10⁴、10³、10²、10¹、10⁰ 倍比稀释。根据标准曲线计算出各模板的底物浓度,然后以 β-actin 作为内参,对 TFAM mRNA 及 NRF-1 mRNA 进行相对定量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

荧光定量 PCR 检测结果(表 2)表明:Sham 组肝细胞 TFAM mRNA 及 NRF-1 mRNA 拷贝数无明显变化;当胆道梗阻后,二者拷贝数均下降($P < 0.05$),并且随着梗阻时间的延长其下降程度逐步增加;解除梗阻后,其拷贝数逐步恢复。BDO-RBF-rhALR 组大鼠 TFAM mRNA 及 NRF-1 mRNA 拷贝数下降程度明显低于同一时间点 BDO-RBF 组($P < 0.05$)。在梗阻后第 1 天,BDO-RBF-rhALR 组大鼠 TFAM mRNA 及 NRF-1 mRNA 拷贝数与 Sham 组差异无统计学意义;直到梗阻后第 4 天才出现明显差异($P < 0.05$);BDO-RBF 组大鼠在梗阻第 1 天,其 TFAM mRNA 及 NRF-1 mRNA 拷贝数即较 Sham 组明显下降($P < 0.05$)。

BDO-RBF 组 TFAM mRNA 及 NRF-1 mRNA 拷贝数均低于同时时间点的 BDO-RBF-rhALR 组;梗阻后第 7 天,二者的 TFAM mRNA 有统计学差异($P < 0.05$);梗阻后第 14 天,NRF-1 mRNA 出现统计学差异($P < 0.05$)。当胆道再通后,BDO-RBF-rhALR 组的 TFAM mRNA 及 NRF-1 mRNA 拷贝数恢复程度明显快于同一时间点 BDO-RBF 组($P < 0.05$),并且在再通后第 14 天恢复至正常水平,与 Sham 组相比无统计学差异;同时期的 BDO-RBF 组二者拷贝数仍低于 Sham 组($P < 0.05$)。

表 2 大鼠梗阻性黄疸及再通后肝细胞 TFAM mRNA 及 NRF-1 mRNA 表达的变化

组别	术后时间点 t/d	TFAM mRNA 及 NRF-1 mRNA 表达的变化	
		TFAM mRNA	NRF-1 mRNA (×10 ⁻³)
(n=6, $\bar{x} \pm s$)			
Sham	1	11.35 ± 2.28	7.58 ± 1.29
	4	12.10 ± 2.50	7.70 ± 1.35
	7	11.94 ± 2.05	7.48 ± 1.46
	14	12.04 ± 2.66	8.15 ± 1.38
	15	11.98 ± 1.87	7.82 ± 1.37
	18	11.38 ± 1.69	8.10 ± 1.44
	21	11.48 ± 2.27	7.93 ± 1.57
	28	10.90 ± 1.85	7.93 ± 1.69
BDO-RBF	1	8.77 ± 0.86*	5.64 ± 0.73*
	4	7.41 ± 1.32*	4.62 ± 1.01*
	7	4.62 ± 0.41*	3.13 ± 0.86*
	14	1.78 ± 0.53*	1.48 ± 0.36*
	15	2.21 ± 0.60*	1.77 ± 0.48*
	18	4.07 ± 0.72*	2.60 ± 0.51*
	21	6.08 ± 0.91*	4.11 ± 0.68*
	28	8.77 ± 0.99*	5.97 ± 1.06*
BDO-RBF-rhALR	1	9.56 ± 0.64	6.81 ± 1.07
	4	8.28 ± 0.95*	5.60 ± 0.54*
	7	6.33 ± 0.99*△	4.17 ± 1.27*
	14	3.92 ± 0.99*△	2.97 ± 1.02*△
	15	4.67 ± 0.81*△	3.57 ± 1.08*△
	18	5.89 ± 0.89*△	4.57 ± 0.83*△
	21	7.94 ± 0.91*△	6.08 ± 0.84*△
	28	11.52 ± 1.84△	8.22 ± 1.04△

* $P < 0.05$ 与同一时间点 Sham 组相比;△ $P < 0.05$ 与同一时间点 BDO-RBF 组相比

3 讨论

Hagiya等^[5]于1994年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,称之为肝细胞再生增强因子(ALR),其主要表现为对肝源性细胞具有特异性增殖刺激性且无种属特异性。这也正是本研究采用重组人肝再生增强因子作用于大鼠的原因。我们前期的研究^[6-9]发现梗阻性黄疸大鼠肝细胞存在线粒体结构的损伤,导致肝细胞线粒体功能受损,最终损害肝功能;进一步研究^[1-2]发现,给予rhALR治疗可保护梗阻性黄疸大鼠肝功能、促进胆道再通后肝功能恢复的作用,但具体保护机制仍不清楚。

ALR可诱导肝细胞TFAM基因的表达,而TFAM是影响细胞mtDNA功能的重要因素之一,是mtDNA维持稳定和转录所必需的因子^[10],可以促进mtDNA的转录及表达^[11-13];提高mtDNA的拷贝数量^[14];修复受损的mtDNA,恢复mtDNA的完整性^[15]。本研究也发现,给予rhALR的大鼠细胞内TFAM mRNA的拷贝数明显高于未给予rhALR的大鼠($P < 0.05$)。

NRF-1是影响mtDNA的另一重要因素,它控制着线粒体电子传递链的一些蛋白质的合成;能够恢复mtDNA拷贝数及氧化磷酸化基因的表达^[4];而且NRF-1结合位点的甲基化,可抑制TFAM启动子的活性^[16],从而影响TFAM的表达,并进一步影响mtDNA的功能。本研究也发现rhALR可诱导梗阻性黄疸大鼠肝细胞NRF-1基因的表达,给予rhALR治疗的大鼠,NRF-1 mRNA拷贝数明显高于未给予rhALR的大鼠($P < 0.05$)。

综上所述,腹腔注射rhALR能有效保护及改善梗阻性黄疸大鼠的肝功能,促进胆道再通后肝功能的恢复,其作用机制可能是通过诱导梗阻性黄疸肝细胞TFAM、NRF-1基因的表达,保护及修复损伤的mtDNA,提高mtDNA的拷贝数,从而保护及改善梗阻性黄疸肝细胞线粒体功能及肝功能。

[参考文献]

[1] 唐春,谢斌,别平,李昆,张玉君,马正伟.重组人肝再生增强因子对梗阻性黄疸大鼠肝细胞线粒体DNA的保护作用[J].现代生物医学进展,2008,8:201-204.

[2] 唐春,别平,李昆,张玉君,马正伟.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].消化外科,2006,5:345-349.

[3] Hernández-Muñoz R, Sánchez-Sevilla L, Martínez-Gómez A, Dent M A. Changes in mitochondrial adenine nucleotides and in permeability transition in two models of rat liver regeneration[J]. Hepatology,2003,37:842-851.

[4] Suliman H B, Carraway M S, Welty-Wolf K E, Whorton A R, Piantadosi C A. Lipopolysaccharide stimulates mitochondrial biogenesis *via* activation of nuclear respiratory factor-1[J]. J Biol

Chem,2003,278:41510-41518.

[5] Hagiya M, Francavilla A, Polimeno L, Ihara I, Sakai H, Seki T, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augments of liver regeneration (ALR) gene: expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1994,91:8142-8146.

[6] 安永,别平,陈莉,王晓丽.梗阻性黄疸大鼠血清内毒素水平与生长激素/生长激素结合蛋白的关系[J].中国现代医学杂志,2001,11:22-25.

[7] 唐春,别平,张玉君,李晓武.梗阻性黄疸大鼠肝细胞线粒体DNA片段缺失的定位研究[J].中华肝胆外科杂志,2007,13:250-253.

[8] 唐春,别平,李昆,张玉君,马正伟.梗阻性黄疸大鼠肝细胞线粒体DNA损伤的定量研究[J].第二军医大学学报,2007,28:48-52.

Tang C, Bie P, Li K, Zhang Y J, Ma Z W. Quantitative study of hepatocyte mtDNA damage in rats with obstructive jaundice[J]. Acad J Sec Mil Med Univ,2007,28:48-52.

[9] 唐春,别平.线粒体DNA的损伤及其对细胞的影响[J].第二军医大学学报,2006,27:211-214.

Tang C, Bie P. Damage of mitochondrial DNA and its influence on cells[J]. Acad J Sec Mil Med Univ,2006,27:211-214.

[10] Larsson N G, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, Lewandoski M, et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice[J]. Nat Genet,1998,18:231-236.

[11] Sheehan T E, Kumar P A, Hood D A. Tissue-specific regulation of cytochrome c oxidase subunit expression by thyroid hormone[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab,2004,286:E968-E974.

[12] Garstka H L, Schmitt W E, Schultz J, Soggl B, Silakowski B, Pérez-Martos A, et al. Import of mitochondrial transcription factor A (TFAM) into rat liver mitochondria stimulates transcription of mitochondrial DNA[J]. Nucleic Acids Res,2003,31:5039-5047.

[13] Ekstrand M I, Falkenberg M, Rantanen A, Park C B, Gaspari M, Hultenby K, et al. Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals[J]. Hum Mol Genet,2004,13:935-944.

[14] Suliman H B, Carraway M S, Piantadosi C A. Postlipopolysaccharide oxidative damage of mitochondrial DNA[J]. Am J Respir Crit Care Med,2003,167:570-579.

[15] Wallace D C. Mitochondrial diseases in man and mouse[J]. Science,1999,283:1482-1488.

[16] Choi Y S, Kim S, Kyu Lee H, Lee K U, Pak Y K. *In vitro* methylation of nuclear respiratory factor-1 binding site suppresses the promoter activity of mitochondrial transcription factor A[J]. Biochem Biophys Res Commun,2004,314:118-122.

[本文编辑] 贾泽军