

大鼠肝再生过程中肝细胞 caspase-3 和 caspase-8 活性的变化

周运恒, 缪明永*, 李洋, 时多, 黄鹤, 王学敏, 焦炳华

(第二军医大学基础医学部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] **目的:** 研究大鼠肝再生过程中肝细胞 caspase-3 和 caspase-8 活性的变化规律。**方法:** 雄性 SD 大鼠 70% 肝切除 (PH), 制作肝再生模型, 制备肝匀浆液, 经离心后用酶标仪分别测定肝再生过程中不同时期 (共 8 个时间点), 肝细胞的凋亡酶活性。**结果:** Caspase-3 活性, 与对照组相比, 在 PH 后 3、6、72、120 和 168 h 时显著性增高 ($P < 0.001$); 而整个过程中 Caspase-8 的活性除了在 PH 后 168 h 时高于对照组外 ($P < 0.05$), 其余时间点没有明显增高。**结论:** 肝再生过程中肝细胞凋亡酶 Caspase-3 活性的升高可能主要是由内源性线粒体途径引起的。

[关键词] 肝再生; 肝细胞; caspase-3; caspase-8**[中图分类号]** R 657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)05-0500-03

Changes of hepatic caspase-3 and caspase-8 activities during liver regeneration in rats

ZHOU Yun-heng, MIAO Ming-yong*, LI Yang, SHI Duo, HUANG He, WANG Xue-min, JIAO Bing-hua (Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the changes of hepatic caspase-3 and caspase-8 activities during liver regeneration in rats. **Methods:** Liver regeneration model was produced by 70% partial hepatectomy (PH) in male SD rats. Then the rats were sacrificed and the liver homogenate were prepared. Hepatic caspase-3 and caspase-8 activities were determined at 8 different time points during the liver regeneration at the absorbance of 405 nm. **Results:** Hepatic caspase-3 activity increased significantly 3 h, 6, 72 h, 120 h and 168 h after PH compared with that of control group ($P < 0.001$); Hepatic caspase-8 activity increased 168 h after PH ($P < 0.05$) and had no obvious change at any other time points. **Conclusion:** Our result suggests that the increase of caspase-3 activity during the liver regeneration may be mainly induced by the mitochondrial pathway.

[KEY WORDS] liver regeneration; hepatocytes; caspase-3; caspase-8

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(5): 500-502]

大鼠经 70% 肝切除后 (partial hepatectomy, PH), 其残余肝组织再生过程非常显著, 大约经过 7~10 d 就可以恢复到原来的体积和体质量。肝再生反应是一个极其复杂、多因素参与调控的过程, 尽管对肝再生进行了大量的分子生物学研究, 包括激素、生长因子和细胞因子, 以及相关基因参与了 this 复杂过程, 但是对肝再生的分子机制, 尤其是肝再生的启动和终止的机制仍不清楚^[1]。线粒体作为细胞生命活动的一个非常重要的细胞器, 它不仅为细胞生命活动提供所需的能量, 而且直接参与细胞内许多信号转导过程, 如细胞凋亡信号级联过程中起的关键作用。目前对于肝再生过程中细胞凋亡活性的变化研究的比较多, 但大多都集中在基因表达水平, 如促细胞凋亡因子 FAS-L 和 FAS、Bad 和 Bak 在早期的表达降低和后期的升高, 抗细胞凋亡因子 Bcl-2 早期的表达增强和 5 d 后的下降^[2,3]。而在蛋白质水平的研究不多, 如 Hayami 等^[4]关于肝再生早期细胞凋亡酶 caspase-3 活性在 PH 后 18 h 升高等相关的报道, 并没有对肝再生整个过程的细胞凋亡活

性进行系统的研究。近年来关于肝再生与线粒体的关系研究的比较多, 我们在 2004 年研究发现在肝再生的早期和后期线粒体的通透性均增高^[5], 而线粒体的通透性改变是否与细胞凋亡活性的变化有一定的关系值得进一步的研究。

在细胞凋亡过程中, caspase-3 处于该级联反应的下游, 是细胞凋亡级联反应过程中的关键调节点, 它通过降解细胞内相应底物使细胞死亡^[6]。而 caspase-3 的活化和由其启动的凋亡级联反应主要通过外源性和内源性两种途径完成, 即主要指由 caspase-8 和 caspase-9 介导的激活途径^[7]。本实验利用大鼠 PH 模型, 研究肝再生过程中肝细胞凋亡活性 caspase-3 和 caspase-8 的变化规律, 探讨其激活的可能途径。

[基金项目] 国家自然科学基金 (30070346)。Supported by National Natural Science Foundation of China (30070346)。

[作者简介] 周运恒, 硕士生。

* Corresponding author. E-mail: miaomy1980@hotmail.com

1 材料和方法

1.1 实验动物分组 SD 雄性大鼠,8 周龄左右,体重 200~250 g,购于第二军医大学实验动物中心,正常饮食,室温(24±2)℃,每天光照 12 h。85 只大鼠随机分成 8 个肝再生组(PH)和相应 8 个对照组(sham-operated, SH)和 1 个正常组,分别是 PH 或 SH 后 3、6、12、24、48、72、120、168 h,每组 5 只动物。

1.2 主要仪器与试剂 CR21 高速冷冻离心机(日立公司),Multiskan Ascent V1.23 酶标仪。Caspase-3 检测试剂和 caspase-8 检测试剂为 Biovision 公司产品,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 动物模型制备 大鼠用乙醚麻醉后,实验组按照经典的肝再生模型切除肝左叶和中叶(约为全肝的 70%)^[8];对照组动物同样施行麻醉和开腹,但不切肝。正常组不做任何处理,直接断头取肝。

1.4 10% 肝匀浆和上清液的制备 动物断头取肝,称肝质量,加入 9 体积 PBS(10 mmol/L, pH 7.4),用 Teflon 芯的玻璃匀浆器匀浆,每个时间点重复 5 只大鼠;离心,1 500 g×10 min,取上清,再高速离心,10 000 g×10 min,取上清,整个过程严格在冰浴中进行。

1.5 蛋白定量 用 Bradford 蛋白定量试剂检测。先做标准曲线,再蛋白定量,最后将所有样品管都稀释为统一的蛋白浓度(2.5 mg/ml)。

1.6 Caspase-3 和 caspase-8 活性的检测 取最终上清液 50 μl,各加入 50 μl 反应缓冲液(含有 10 mmol/L DTT),再加 5 μl 底物(caspase-3 的底物为 DEVD-pNA, caspase-8 的底物为 IETD-pNA),混匀,37℃ 孵育 1.5 h,在酶标仪上测定在波长 405 nm 处的 D_{405} 值,以蒸馏水调零,每个样品都以样品空白作对照,求得各组样品光密度值,再将各组光密度值除以正常组光密度,得最终光密度相对比值。

1.7 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验组与对照组间的比较用 t 检验。

2 结果

2.1 Caspase-3 的变化 如图 1A 显示,大鼠 PH 后 3~24 h 阶段 caspase-3 的 D 相对比值逐渐下降,但都高于正常组,其中在 PH 后 3 h 和 PH 后 6 h 时,分别是正常组的 9 倍和 5 倍,与 SH 组相比显著性增高($P < 0.001$);而 SH 组在 3 h 和 6 h 时 caspase-3 的 D 相对比值分别是正常组的 3 倍和 2.3 倍,与组内其他时间点相比显著增高($P < 0.01$)。在 PH 后 24~168 h 阶段 caspase-3 的 D 相对比值逐渐升高,尤其是

在 PH 后 72 h、120 h 和 168 h 时,与 SH 组相比分别高达 5 倍、13 倍和 18 倍($P < 0.001$),而 PH 后 168 h 的 D 相对比值也是 PH 后 3 h 的 2.5 倍。

2.2 Caspase-8 的变化 如图 1B 显示,在 PH 后 3 h 时和 SH 后 3 h 时, caspase-8 的 D 相对比值与其他时间点相比均增高,但二者之间无显著性差异($P > 0.05$),在 PH 后 168 h 时 caspase-8 的 D 相对比值与 SH 组相比增高,有显著性差异($P < 0.05$),而实验组内其余各时间点与对照组相比均无显著性差异($P > 0.05$)。

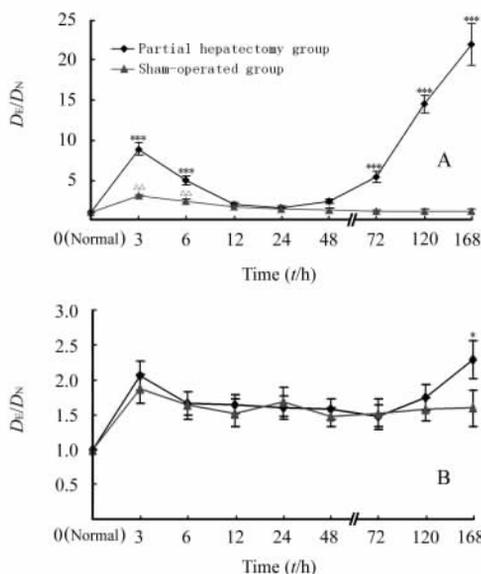


图 1 肝再生过程中肝细胞 caspase-3(A) 和 caspase-8(B) 的活性变化

Fig 1 Activity changes of hepatic caspase-3 and caspase-8 during rat liver regeneration

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs sham-operated group; $\triangle\triangle$ $P < 0.01$ vs 0 h after SH; E: Experimental groups; N: Normal control group; $n = 5$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

目前的研究表明细胞凋亡的发生主要有两条凋亡信号转导途径,分别为外源性死亡受体途径和内源性线粒体途径。在外源性凋亡途径中,死亡信号的传导依赖于死亡配体与受体的结合,而导致 caspase-8 激活,激活的 caspase-8 不仅可以激活下游效应 caspase-3,还可以裂解 Bid 为 tBid,导致细胞色素 C(Cyt C)的释放,起到凋亡放大作用^[9]。在内源性线粒体途径中,细胞内的死亡信号,如 DNA 损伤、毒素和 ATP 耗竭等均可诱发线粒体释放 Cyt C。Cyt C、AIF、Apaf-1(细胞凋亡蛋白酶活化因子 1)、dATP 和 caspase-9 酶原结合形成凋亡复合体, caspase-9 被释放并激活,接着下游的 caspase-3 等被激活,降解底物使细胞发生凋亡^[10]。另外,细胞

内 Ca²⁺ 和自由基含量的升高等其他因素也可引起线粒体的通透性转换孔 (permeability transition pore, PTP) 高水平的开放, 从而引起细胞色素 C 等凋亡诱导因子的释放, 也会导致细胞凋亡的发生^[11~13]。

本实验中, 在肝再生的早期, PH 和 SH 后 3 h 和 6 h 时 caspase-3 的酶活性与正常组相比都增高, 同时 caspase-8 的酶活性在 PH 和 SH 后 3 h 时都比其他时间点高, 暗示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。有文献报道在肝再生的早期, 肝线粒体氧化磷酸化下降, 而自由基则显著升高, 而自由基的产生与手术应激反应和线粒体内膜的通透性增高有一定关系^[14]。但此时 PH 组的肝细胞凋亡活性要显著高于 SH 组, 表明此时细胞凋亡活性增高除了应激以外还有其他影响因素。近年来对肝再生与线粒体的关系研究表明, 肝再生作用的发生与线粒体的通透性有很大关系, 尤其是在肝再生的早期阶段 (PH 后 0~24 h), 很多变化都与线粒体的通透性转换孔有关^[15]。

而在肝再生后期, PH 后 72、120 和 168 h 时 caspase-3 的活性与 SH 组相比显著性升高, 尤其是在 PH 后 168 h 达到最高峰, 其峰值要显著高于 PH 后 3 h 时的峰值。而在整个肝再生过程中 caspase-8 的酶活性与对照组相比只是在 PH 后 168 h 时增高, 而其余时间点均无明显增高, 表明在本实验肝再生模型中 caspase-3 的活性升高除了外源性死亡受体途径外, 可能主要是由内源性线粒体途径引起的。Helvering 等^[16]通过组织形态学研究发现在 PH 后肝再生早期参与细胞凋亡的肝细胞数量明显减少, 而在肝再生后期细胞凋亡活性明显增强, 而肝再生后期细胞凋亡活性的增高可能与肝的重塑和肝再生的终止机制有关。2004 年我们研究发现: 大鼠肝再生早期和后期都表现为肝线粒体的通透性升高^[5], 这与细胞凋亡活性升高的时相基本一致, 所以肝再生过程中细胞凋亡活性的明显升高可能主要与线粒体途径引起的通透性改变有密切关系。

通过对大鼠肝再生过程 (PH 后 3~168 h) 中肝细胞凋亡酶 caspase-3 和 caspase-8 的研究, 我们发现肝再生的早期, PH 后 3 h 和 6 h 时肝细胞的凋亡酶活性短暂性升高, 可能是因自由基引起的线粒体通透性改变和手术应激反应所致, 但是对于肝再生早期这种升高与肝再生的启动之间的关系还待进一步探讨。而后期细胞凋亡的明显增高, 可能与肝再生的终止与后期肝的重塑有一定的关系。因此今后我们可以通过研究肝再生过程中线粒体超微结构和

相关功能的改变, 以及用影响线粒体通透性的药物如环孢菌素 A (线粒体通透性抑制剂) 和其他通透性相关蛋白等来抑制和干预线粒体通透性, 研究肝再生过程引发细胞凋亡的可能机制和线粒体通透性改变的调节机制, 来进一步验证肝再生过程中细胞凋亡活性的变化与线粒体通透性改变之间的关系。

[参考文献]

[1] Koniaris LG, McKillop IA, Schwartz SI, et al. Approaching liver tumors and the phenomenon of liver regeneration[J]. J Amer Coll Surg, 2003, 197:634-659.

[2] Taira K, Hiroyasu S, Shiraishi M, et al. Role of the Fas system in liver regeneration after a partial hepatectomy in rats[J]. Eur Surg Res, 2001, 33:334-341.

[3] Bernardi P, Petronilli V, Di Lisa F, et al. Mitochondrial perspective on cell death[J]. Trends Biochem Sci, 2001, 26:112-117.

[4] Hayami S, Yaita M, Ogiri Y, et al. Change in caspase-3-like protease in the liver and plasma during rat liver regeneration following partial hepatectomy [J]. Biochemi Pharmacol, 2000, 60: 1883-1886.

[5] 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.

[6] Poter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. Cell Death Differ, 1999, 6:99-104.

[7] Cho SG, Choi EJ. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases [J]. J Biochem Mol Biol, 2002, 35:24-27.

[8] Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal [J]. Arch Pathol, 1931, 12: 186-202.

[9] Muzio M. Signalling by proteolysis: death receptors induce apoptosis [J]. Int J Clin Lab Res, 1998, 28:141-147.

[10] Mishra NC, Kumar S. Apoptosis: a mitochondrial perspective on cell death [J]. Indian J Exp Biol, 2005, 43:25-34.

[11] 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.

[12] Waterhouse NJ, Ricci JE, Green DR. And all of a sudden it's over: mitochondrial outer-membrane permeabilization in apoptosis [J]. Biochimie, 2002, 84(2-3):113-121.

[13] Chen Q, Chai YC, Mazumder S, et al. The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation, and mitochondrial dysfunction [J]. Cell Death Differ, 2003, 10:323-334.

[14] Carnovale CE, Scapini C, Alvarez ML, et al. Nitric oxide release and enhancement of lipid peroxidation in regeneration rat liver [J]. J Hepatol, 2000, 32: 798-804.

[15] Guerrieri F, Pellicchia G, Lopriore 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.

[16] Helvering LM, Richardson KK, Horn DM, et al. Expression of TRPM-2 during involution and regeneration of the rat liver [J]. Cancer Lett, 1993, 71: 133-142.

[收稿日期] 2006-01-11

[修回日期] 2006-04-05

[本文编辑] 尹 茶