

文章编号:1005-6947(2008)01-0085-03

· 文献综述 ·

Bcl-2/Fas 蛋白在肝脏缺血再灌注损伤实验领域中的研究进展

金成 综述 张培建 审校

(扬州大学第二临床医学院 普通外科研究室, 江苏 扬州 225001)

摘要: Bcl-2/Fas 蛋白是目前在细胞凋亡过程中作用最为明确的两种检测指标, 近几年来被广泛应用于肝脏缺血再灌注损伤(IRI) 的实验研究中。笔者仅就 Bcl-2/Fas 蛋白的结构和功能及其与 IRI 关系的新近研究作一综述。
[中国普通外科杂志, 2008, 17(1): 85 - 87]

关键词: 缺血再灌注损伤; 肝/血液供给; Bcl-2; Fas; 综述文献

中图分类号: R 657. 3 **文献标识码:** A

以往认为肝脏的缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI) 引起的肝脏损伤主要表现为肝细胞坏死。近年的研究表明: 在肝 IRI 时除了肝细胞坏死形式外, 还存在着肝细胞的凋亡。肝脏遭受 IRI 之后, 肝组织受损不仅来自 IRI 的直接作用, 而且由于凋亡机制的启动与放大造成的肝细胞死亡也参与了肝组织的损伤。因此, 如何减轻肝脏 IRI 后发生的肝细胞凋亡也有重要意义。Fas 蛋白是介导凋亡的细胞表面分子, 其表达可促进肝细胞凋亡的发生。Bcl-2 蛋白是由 Bcl-2 抑制基因表达的控制线粒体中致凋亡因子释放的主要调节因子, 定位于线粒体膜, 通过调节线粒体的功能而抑制肝细胞凋亡的发生。Fas 和 Bcl-2 在细胞凋亡的研究领域中占有极其重要的地位^[1]。笔者就近几年来 Bcl-2/Fas 蛋白在肝脏 IRI 领域中的研究进展作一综述。

基金项目: 江苏省卫生厅科研课题项目(H200770); 江苏省科技厅社会发展科技项目(BS2005038)。

收稿日期: 2007-11-23;

修订日期: 2007-01-09。

作者简介: 金成, 男, 扬州大学第二临床医学院硕士研究生, 主要从事肝脏移植方面的研究。

通讯作者: 张培建 E-mail: yzu.edu.pjz@163.com

1 有关 Bcl-2/Fas 蛋白

1.1 Fas 蛋白的结构功能及其分布

1989年, 日、美两个科研小组分别从小鼠中分离出对多种人体细胞系有溶解作用的抗体, 并把这种抗体识别的细胞表面蛋白分别称为 Apo-1 和 Fas。后来经分子克隆出的 cDNA 证明 Apo-1 和 Fas 实为一种成分。1993年第五届人类白细胞分化抗原分类国际会议将其命名为 CD95, 亦即 Fas 蛋白, 又称为 Apo-1, 它的分子质量为 45 kDa, 属于 I 型跨膜蛋白。

Fas 基因定位于人 10 号染色体 q24.1 区和小鼠的第 19 号染色体, 由其编码产生的 Fas 蛋白包含 325 aa, 是 TNFR 家族成员, 其 N 端有一个信号序列, 穿膜区位于分子中部, 其胞浆区一段为 60 ~ 70 个氨基酸序列, 该序列含有 3 个周期性排列的完全半胱氨酸残基亚区, 又被称为功能区或死亡区^[2]。Fas 蛋白是一种细胞表面抗原, 主要以膜受体形式存在, 它还可以通过转录水平不同拼接或脱落产生可溶性的 Fas 分子。Fas 蛋白与其配体(FasL) 以及它们的可溶性形式共同构成了介导细胞凋亡的 Fas 系统。

Fas 蛋白介导细胞凋亡的途径是由 FasL-Fas 结合所介导的一系列激活事件组成的。目前研究认为, 由各

种各样的内外刺激因子首先作用于膜上的 Fas 系统, 使 FasL 形成同源三聚体与 3 个 Fas 分子相交联, 两者结合后使胞内的鞘磷脂酶活化, 水解各种鞘磷脂酶产生神经酰胺, 神经酰胺再作为第二信使传递凋亡信号, 通过活化 caspaseFasL-8 继而活化 caspase-3 而引发级联反应, 最终引起 DNA 降解而诱导细胞凋亡。

机体许多组织和细胞都可组成或经激活诱导表达 Fas, 组织细胞的类型不同, 表达程度也可能有差异。以免疫系统的表达最为丰富, 如外周的 T、B 淋巴细胞、自然杀伤(NK) 细胞、单核细胞。Fas 在胸腺、肝、心、肺、肾、卵巢、子宫、皮肤等也有较高水平的表达, 特别是成纤维细胞、内皮细胞和上皮细胞。

1.2 Bcl-2 蛋白的结构和功能

Bcl-2 基因属于一类新的癌基因家族, 主要由两大结构域构成, 即位于羧基端的跨膜结构域和数量不等的(1 ~ 4 个) Bcl-2 同源结构域。Bcl-2 基因按照功能可分为促凋亡基因和抑凋亡基因两大类, 其中抑凋亡基因包括: Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-w, A-1, Mcl-1, Bfl-1 及 Bhfl 等; 促凋亡基因包括 Bcl-xs, Bax, bad, Bak, Bim 及 Bnip-3 等。

根据 Bcl-2 家族所具有的 BH 结构域以及在细胞凋亡中发挥的生物

学效应的不同大致可分为抗凋亡类蛋白、促凋亡类蛋白和只具有 BH3 结构域的凋亡蛋白等 3 大类,分别以 Bcl-2, Bax, Bid 为代表。Bcl-2 蛋白则是由 Bcl-2 抑制基因表达的控制线粒体中致凋亡因子释放的抗凋亡类蛋白, Bcl-2 抑制基因主要分布于线粒体外膜、内质网膜和核膜等。Bcl-2 蛋白由 BH1, BH2, BH3, BH4 4 个结构域构成,其中 BH1 和 BH2 是抗凋亡蛋白必备的结构域,两者同时同源或者异源性二聚体和离子通道的形成中发挥重要作用;而 BH3 和 BH4 位于 N 端,形成一个螺旋型结构,该结构是 Bcl-2 蛋白发挥抗凋亡作用的重要结构域。同时,也正是由于 Bcl-2 蛋白可以形成同源或者异源性二聚体,故其在细胞凋亡的过程中可以单独或以二聚体的形式存在而发挥作用;如果它与促凋亡成员如 Bax 等结合形成异源二聚体,则将会影响 Bcl-2 蛋白发挥其抑制细胞凋亡的作用。有报道认为,抗凋亡蛋白与促凋亡蛋白的比例在相当程度上决定了细胞是否发生凋亡^[3-4]。

大量实验发现, Bcl-2 蛋白主要通过 4 个途径^[5-7]抑制细胞凋亡: (1)抑制谷胱甘肽的外泄、降低线粒体巯基的氧化还原状态以改变其膜电位,最终抑制细胞凋亡(2)将凋亡蛋白前体 Apaf-1 等定位于线粒体来抑制细胞凋亡;(3)影响 PT 通道的开放以阻止细胞色素 c 等小分子物质自由通过线粒体膜,保护细胞免于凋亡;(4)调节内质网腔中游离钙离子的浓度,使胞质中的钙离子处于中等浓度水平,使其无法作用于线粒体而抑制细胞凋亡。

2 Bcl-2/Fas 蛋白在肝脏 IRI 实验中的研究模型

肝 IRI 是一种常见的病理生理过程,在处理严重的肝外伤及施行广泛肝叶切除时阻断入肝血流、肝移植以及出血性休克时均涉及这一过程。因此多年来肝脏 IRI 一直是研究热点。目前,国内外已有不少学者对发

生在肝 IRI 后的细胞凋亡曾进行实验研究。尽管他们所采用的实验模型各不相同,但绝大多数研究都通过对模型中 Bcl-2/Fas 蛋白的检测进行实验分析。

在众多的研究模型中, Chien 等^[8]的方法被应用得最为广泛和成熟。他们建立了大鼠肝脏原位 IRI 模型,即在分离肝十二指肠韧带后,用无损伤血管夹夹闭通往肝中、肝左叶的血管和胆管,致 70% 肝脏缺血,然后于不同缺血时间去夹恢复血流即为再灌注。同时,也有很多学者尝试建立其他的肝 IRI 模型用以研究细胞凋亡。如夏宗江等^[9-11]近年来曾通过大鼠原位肝移植手术成功地建立了移植中的 IRI 模型,然后更进一步研究发生在移植中的细胞凋亡。赖东明等^[12]成功制备了成年雄性小鼠(23~28 g)约 70% 的肝 IRI 模型。

3 Bcl-2/Fas 蛋白在肝脏 IRI 中的作用

3.1 Bcl-2/Fas 蛋白的表达

Bcl-2/Fas 蛋白是目前在细胞凋亡过程中作用较为明确、检测较为方便的两种实验指标^[1]。因此,它们被广泛地应用于肝脏的 IRI 的研究领域中。赖东明等^[12]通过研究小鼠肝缺血再灌注模型发现阻止 Fas 蛋白的表达可以抑制肝细胞凋亡,从而对肝脏 IRI 发挥保护作用;孙凯等^[13]发现在肝脏缺血再灌注时, Bcl-2 蛋白的表达水平异常下调,其抑制细胞凋亡的效能减弱,促使肝实质细胞凋亡增加,加重了肝脏 IRI。还有很多学者也曾对这一过程进行实验研究。他们得出一个统一的结论: IRI 会上调 Fas 蛋白表达,下调 Bcl-2 蛋白表达,最终诱导肝细胞发生凋亡。

3.2 预适应预处理对 Bcl-2/Fas 蛋白表达的影响

夏宗江等^[9-11]发现利用银杏叶提取物预处理大鼠原位肝移植的供肝可有效地减轻肝脏 IRI 和细胞凋亡,这一过程正是通过降低 Fas 蛋白的表达、上调 Bcl-2 蛋白的表达实现的。李建一等^[14]发现外源性的褪黑

素(melatonin)可以增强 Bcl-2 蛋白的表达,通过提高 Bcl-2/Bax 值抑制肝脏 IRI 后细胞凋亡的发生。张伯等^[15]利用自配的川芎嗪乳酸钠林格液作为原位肝移植供体大鼠肝脏的灌注液和保存液,发现川芎嗪可能通过促进 Bcl-2 蛋白的表达来抑制冷保存再灌注导致的肝细胞凋亡。Plock 等^[16]在肝脏发生缺血再灌注损伤前预先夹闭小鼠的肝动脉以建立低氧环境,通过激活低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)的表达上调一系列下游基因;这种预先的低氧处理可以减少 Fas 蛋白的表达从而抑制细胞凋亡。庄永敬等^[17]发现 IRI 可以上调肝细胞 Fas 蛋白表达,而缺血预处理(Ischemic preconditioning, IP)可明显减轻 IRI 导致的肝细胞凋亡。这可能与 IP 下调 IRI 时 Fas 的表达有关。史卫海等^[18]利用二氮嗪预处理模拟 IP,发现 IP 可能通过诱导肝细胞 Bcl-2 蛋白上调而发挥抗凋亡作用。徐文晖等^[19]也对肝脏进行了缺血预处理,与庄氏不同的是他们对肝内胆管上皮细胞进行了细胞凋亡检测,发现 IRI 诱导 Fas 蛋白的表达促进肝内胆管上皮细胞发生凋亡,缺血预适应可以通过上调调控基因 Bcl-2 蛋白的表达抑制胆管上皮细胞的凋亡,与 Fas 蛋白表达关系并不明显。

4 Bcl-2/Fas 蛋白在肝脏 IRI 研究领域中的前景

各种脏器组织在发生 IRI 时都会出现细胞凋亡,且在局部发生 IRI 时除了局部脏器细胞发生凋亡外,还可以引起远隔器官细胞凋亡。早在 20 世纪末, Keda 等^[20]研究发现,在肢体发生 IRI 期间,肠上皮细胞也会发生异常凋亡;他们进一步研究发现,肢体 IRI 期间,肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平升高,上调 Fas 蛋白的表达,通过 Fas/Fas-L 活化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(caspase-3)和/或通过下游 Bcl-2 蛋白的表达而降低其抑制 caspase-3 激活效应,最终

导致肠上皮细胞发生异常凋亡。门秀丽^[21]和李彬等^[22]研究发现,大鼠在发生肢体 IRI 时局部肢体不仅有坏死而且有凋亡出现,远隔器官如肺脏的 Fas 蛋白表达明显增多,肺脏也发生了异常的凋亡,进一步造成机体更大范围的损伤。

在 IRI 导致肝细胞凋亡的同时,邻近的肠道组织、胰腺组织乃至脾脏等组织均可能发生异常的细胞凋亡,故在今后的实验研究中也可对这一环节进行相关检测,以利于更好地减轻由肝脏 IRI 带给机体的一系列凋亡损伤。

综上所述,Bcl-2/Fas 蛋白作为目前在细胞凋亡实验中应用广泛的两种指标,将会在肝脏 IRI 领域尽现出更为广阔的研究前景。

参考文献:

- [1] Wang X, Su XZ. The expression of Fas and Bcl-2 in hamster buccal [J]. *Carcinogen*, 2005, 14 (2): 155 - 158.
- [2] Shigekazu N, Pierre G. The Fas death factor [J]. *Science*, 1995, 265 (10): 79 - 85.
- [3] De Falco M, De Luca L, Acanfora F, et al. Alteration of the Bcl-2/Bax ratio in the placenta as pregnancy proceeds [J]. *Histochem J*, 2001, 33 (7): 421 - 425.
- [4] Raisova M, Hossini A M, Eberle J, et al. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas-mediated apoptosis [J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 117 (2): 333 - 340.
- [5] Shen JG, Zhou DY. Efficiency of Ginkgo biloba extract (EGb761) in antioxidant protection against myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, 35 (1): 125 - 134.
- [6] Selzner M, Rudiger HA, Selzner N. Transgenic mice over expression human Bcl-2 are resistant to hepatic ischemia and reperfusion [J]. *J Hepatol*, 2002, 36 (2): 218 - 225.
- [7] Kienle K, Rentsch M, Muller T, et al. Expression of Bcl-2 in liver grafts after adenoviral transfer improves survival following prolonged ischemia and reperfusion in rat liver transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2005, 37 (1): 439 - 441.
- [8] Chien CT, Hsu SM, Chen CF, et al. Hypoxic preconditioning reduces ischemia/reperfusion-induced apoptosis cell death in rat kidney [J]. *Transplant Proc*, 2000, 32 (7): 1653 - 1654.
- [9] 夏宗江,叶启发,明英姿,等. 银杏叶提取物预处理对大鼠肝移植细胞凋亡及 caspase-3 mRNA 和 FasmRNA 表达的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16 (17): 2589 - 2593
- [10] 夏宗江,叶启发,明英姿,等. 银杏叶提取物预处理对大鼠移植肝的保护作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15 (1): 26 - 31.
- [11] 夏宗江,叶启发,等. 银杏叶提取物预处理对大鼠肝移植细胞凋亡及 bcl_2 和 fasmRNA 表达的影响 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2006, 41 (1): 111 - 114.
- [12] 赖东明,刘璐,李文滨,等. Fas-siRNA 对小鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2004, 25 (4): 322 - 325.
- [13] 孙凯,刘志苏,孙权. 大鼠肝脏缺血再灌注时肝细胞凋亡与 Bcl-2 蛋白表达的关系 [J]. *肝脏*, 2003, 8 (3): 12 - 15.
- [14] 李建一,周勇,张云海, Melatonin 通过影响 Bcl-2/Bax 比率抑制再灌注后大鼠肝细胞凋亡 [J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16 (19): 2910 - 2916.
- [15] 张伯,钱海鑫,秦磊. 川芎嗪对大鼠供肝冷保存再灌注损伤中肝细胞凋亡及调控基因表达的影响 [J]. *苏州大学学报(医学版)*, 2006, 26 (3): 396 - 399.
- [16] Jan Plock, Steffen Frese, Adrian Keogh. Activation of non-ischemic, hypoxia-inducible signalling pathways up-regulate cytoprotective genes in the murine liver [J]. *Journal of Hepatology*, 2007, 47 (4): 538 - 545.
- [17] 庄永敬,徐小平. 大鼠肝缺血再灌注后 Fas 及 FasL 蛋白表达变化及缺血预处理的保护机制 [J]. *南方医科大学学报*, 2006, 26 (10): 1518 - 1520.
- [18] 史卫海,李文美. 二氮嗪预处理抑制大鼠肝缺血再灌注所致细胞凋亡的延迟保护作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16 (3): 248 - 252.
- [19] 徐文晖,夏穗生. 缺血预处理对胆管上皮细胞凋亡及 Bcl-2/Fas 蛋白表达的影响 [J]. *肝胆胰外科杂志*, 2006, 18 (3): 154 - 155.
- [20] Keda H, Suzuki Y, Suzuki M, et al. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischemia and ischemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium [J]. *Gut*, 1998, 42 (3): 530 - 537.
- [21] 门秀丽,张连元,董淑云,等. 牛磺酸对大鼠肢体缺血再灌注肺损伤时细胞凋亡的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2004, 20 (3): 421 - 424.
- [22] 李彬,温笠,杨新东. 大鼠肢体缺血再灌注损伤后细胞凋亡与 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的关系 [J]. *温州医学院学报*, 2003, 23 (10): 301 - 303.