

文章编号:1005-6947(2005)07-0501-04

· 实验研究 ·

# 大鼠肝脏缺血再灌注损伤早期载脂蛋白 M 的表达

许贤林<sup>1,2</sup>, 叶启发<sup>1</sup>, 何小舟<sup>2</sup>, 张晓膺<sup>2</sup>, 罗光华<sup>2</sup>, 朱江<sup>2</sup>, Ning Xu<sup>3</sup>, 巢志复<sup>2</sup>, 张懋祖<sup>4</sup>, 张毅<sup>1</sup>

(1. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 器官移植研究所, 湖北 武汉 430030; 2. 苏州大学医学院第三附属医院, 江苏 常州 213003; 3. 瑞典荣德大学医院 临床化学研究所, 瑞典 荣德 S-221 85; 4. 中南大学湘雅三医院 移植医学研究院, 湖南 长沙 410013)

**摘要:**目的 探讨大鼠肝缺血再灌注损伤早期肝内载脂蛋白 M mRNA (apoM mRNA) 及血浆 apoM 的表达。方法 建立大鼠肝缺血再灌注损伤模型。健康雄性 SD 大鼠 40 只随机分成 5 组, 每组 8 只: 假手术组 (对照组); IR<sub>1</sub> 组 (灌注 0.5 h); IR<sub>2</sub> 组 (灌注 1.0 h); IR<sub>3</sub> 组 (灌注 2.0 h); IR<sub>4</sub> 组 (灌注 3.0 h)。缺血再灌注组的缺血时间统一为 1.0 h。检测血浆谷丙转氨酶水平 (ALT)、肝组织病理变化、血浆 apoM 蛋白及肝组织 apoM mRNA。结果 血浆 ALT 的水平随着灌注时间的延长而升高, 肝组织损伤随着灌注时间的延长而逐渐加重。肝组织 apoM mRNA 的表达则先有一过性下降 (灌注 0.5 h 组), 此后随着灌注时间的延长其表达明显增强。血浆 apoM 蛋白有相同的变化趋势, 但其表达在灌注 2.0 h 才有上升。结论 在肝缺血再灌注损伤过程中, 肝脏 apoM mRNA 的表达和血浆蛋白水平有迅速、明显的变化, 提示 apoM 可能具有急性时相反应蛋白的特性。

**关键词:** 肝疾病; 再灌注损伤; 疾病模型, 动物; 载脂蛋白 M

**中图分类号:** R575; R619.9

**文献标识码:** A

## Early apolipoprotein M expression in ischemia-reperfusion injury of rats

XU Xian-lin<sup>1,2</sup>, YE Qi-fa<sup>1</sup>, HE Xiao-zhou<sup>2</sup>, ZHANG Xiao-ying<sup>2</sup>, LUO Guang-hua<sup>2</sup>, ZHU Jiang<sup>2</sup>, Ning Xu<sup>3</sup>, CAO Zhi-fu<sup>2</sup>, ZHANG Mao-zu<sup>4</sup>, ZHANG Yi<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Organ Transplantation, The Affiliated Tongji Hospital of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China; 2. The Third Affiliated Hospital, Suzhou University, Changzhou, Jiangsu 213003, China; 3. Department of Clinical Chemistry, University Hospital of Lund, Lunds University, S-221 85 Lund, Sweden; 4. The Third Xiangya Hospital Transplantation Medical Institute of Central South University, Changsha 410013, China)

**Abstract: Objective** To investigate the expression of hepatic apolipoprotein M (apoM) mRNA and serum apoM during early stage of hepatic ischemia reperfusion injury in rats. **Methods** Rat models of hepatic ischemia-reperfusion injury (IRI) were established. Forty healthy male SD rats were randomly divided into five groups (each group containing eight rats): Sham-operation group (control); IRI groups, animals experienced 1 hr ischemia and then followed by various reperfusion intervals (0.5, 1.0, 2.0 and 3.0 hrs, respectively). **Results** Serum alanine-aminotransferase (ALT) levels and the liver injury degree histologically were increased with the prolongation of hepatic reperfusion time. The apoM mRNA level in liver was markedly decreased in the group that had reperfusion for 0.5 hr compared to the sham group. However, it increased gradually in groups that had reperfusion for 1 hr to 3 hrs. Serum apoM protein level showed a similar tendency with apoMnRNA, but it increased after reperfusion for 2 hrs. **Conclusions** It is concluded that apoM expression pattern shows rapid and significant changes during hepatic ischemia-reperfusion injury, which suggests that apoM might have the characteristic of acute phase reactive protein.

收稿日期:2004-03-28; 修订日期:2005-04-15。

**作者简介:**许贤林(1972-),男,浙江嵊州人,华中科技大学同济医学院附属同济医院博士研究生,主要从事器官移植的临床与实验方面的研究。

**通讯作者:**许贤林 电话:0519-6086606; E-mail:xianlinxu@126.com。

**Key words:** Liver Diseases; Reperfusion Injury; Disease Models, Animal; Apolipoprotein M

**CLC number:** R575; R619.9

**Document code:** A

人类载脂蛋白 M (apoM) 由 Xu 和 Dahlback<sup>[1]</sup> 于 1999 年从富甘油三酯脂蛋白 (TGRLP) 中分离出来。组织学检测发现 apoM 主要在肝脏和肾脏中表达, 这表明 apoM 有高度的器官特异性, 同时也强烈地提示其生理功能肯定与肝肾相关<sup>[2,3]</sup>。Xu<sup>[4]</sup> 报道转化生长因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 和肝细胞生长因子 (HGF) 明显抑制 HepG2 细胞中 apoM 的表达, 同时血小板活化因子 (PAF) 可以刺激细胞 apoM mRNA 的转录和 apoM 蛋白的表达。近来发现 leptin 和 leptin 受体是 apoM 合成的基础<sup>[5]</sup>。不过, 迄今为止 apoM 在体内的生理功能并不清楚。本研究通过大鼠肝缺血再灌注模型, 观察了缺血再灌注对 apoM 表达的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物模型

雄性 SD 大鼠 (购自上海中科院实验动物中心) 200 ~ 250 g, 术前禁食 14 h, 不禁水。参照以前的文献<sup>[6]</sup> 建立肝脏缺血再灌注模型: 钝性游离进入肝左叶、尾状叶的门静脉、肝动脉和胆管, 以无损伤小血管夹夹闭 60 min 后松开, 再灌注 0.5 ~ 3.0 h。

### 1.2 实验设计

40 只 SD 大鼠随机分成 5 组, 每组 8 只: (1) 对照组, 进腹后仅分离肝十二指肠韧带, 不阻断血流; (2) IR<sub>1</sub> 组, 肝脏缺血 60 min, 随后再灌注 30 min; (3) IR<sub>2</sub> 组, 肝脏缺血 60 min, 再灌注 60 min; (4) IR<sub>3</sub> 组, 肝脏缺血 60 min, 再灌注 120 min; (5) IR<sub>4</sub> 组, 肝脏缺血 60 min, 再灌注 180 min。各组在相应的灌注时间结束后立即活杀大鼠, 自肝下下腔静脉采血 4 mL, 送检血谷丙转氨酶 (ALT)、apoM 蛋白, 同时在肝左叶同一部位取下 0.5 cm × 0.5 cm 大小肝组织作病理切片和 PCR 检测。

### 1.3 检测项目及方法

1.3.1 ALT 的检测 采用全自动生化分析仪按标准步骤检测。

1.3.2 组织学检查 4% 福尔马林固定肝组织, 石蜡包埋后切成 4 mm 厚的切片, 按标准步骤行苏木素-伊红染色。

1.3.3 血浆 apoM 蛋白的测定<sup>[5]</sup> 采用 Dot-blotting 法: 室温融化冰冻血浆, 取 3 mL 点样于 hybond-c 膜 (Amsham Lifescience 公司), 室温下干燥, 以含 BSA 及 Tween 的 TBS (TBS: BSA: Tween20 = 100: 3: 4) 4℃ 封闭膜过夜, 加入兔抗人 apoM 多克隆抗体 (瑞典隆德大学临床化学部, TBS: 一抗 = 500: 1), 室温 2 h 后, TBS 洗膜 4 次, 每次 10 min, 加入碱性磷酸酶标记的羊抗兔的二抗 (DAKO 公司, TBS: 二抗 = 2000: 1) 室温 2 h 后, 依次以 TBS, TBS + 2% Tween20, TBS + 2% Tween20, TBS 洗膜, 每次 10 min, 加入显色剂 NCBT/BCIP 显色, 以凝胶成像仪及 Protein quantity I 软件分析 (BIO-RAD 公司)。

1.3.4 实时 (Realtime) RT-PCR apoM mRNA 的检测参照笔者以前的方法<sup>[4]</sup>, 探针和引物见表 1 (上海晶美生物技术有限公司)。 $\beta$ -actin 作内参照, PCR 操作分两步: 第一步是逆转录, 在一个 40- $\mu$ L 的反应体系里完成, 其中包括 1 mg 寡核苷酸, 18.2  $\mu$ g RNA, 4  $\mu$ L 10 mM dNTP 以及 400 U 逆转录酶 RevertAid M-MuLV (瑞典荣德大学临床化学部实验室提供); 第二步是实时 PCR 扩增, 在一个 20  $\mu$ L 的反应体系里完成, 内含 2  $\mu$ L cDNA, 22.5 pmol 前引物和后引物, 5 pmol 探针, 2  $\mu$ L 10 mM dNTP 和 1 U Tag DNA 聚合酶。循环温度条件如下: 95℃ 1 min 激活 Taq 聚合酶, 随后是 45 个循环的 PCR (95℃ 5 s, 60℃ 10 s, 72℃ 10 s), 扩增样本均复管, 所有 PCR 均在 LightCycler 仪 (Roche 公司生产) 上进行。

表 1 Realtime RT-PCR 的引物和探针

	apoM	$\beta$ -actin
前引物	5' > ACAAAGAGACCCAGAGCC < 3'	5' > ACGGCCAGGTCATCACTATTG < 3'
后引物	5' > TCCATGGTGGGAGCC < 3'	5' > CAAGAAGGAAGGCTGAAAAGA < 3'
探针	5' > ACCTGGCCTGTGCTACTTTATTGCTGG < 3' (MODIFY: 5'-FAM, 3'-TAMRA)	5' > CAACGAGCGGTTCCGATGCCCT < 3' (MODIFY: 5'-FAM, 3'-TAMRA)
长度 (bp)	66	66

## 1.4 统计方法

采用 SPSS 10.0 医学统计软件,ALT 用非参数检验(wilcoxon 检验),其余指标采用 One-way ANOVA 检验和 Newman-Keuls 多重比较检验, $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 SALT 水平的变化

表 2 肝脏缺血再灌注损伤中 ALT 的变化

指标	对照组	IR <sub>1</sub> 组	IR <sub>2</sub> 组	IR <sub>3</sub> 组	IR <sub>4</sub> 组
灌注时间(h)	0	0.5	1.0	2.0	3.0
ALT(U/L)	69.6	251.2 <sup>1)</sup>	377.0 <sup>1)</sup>	491.8 <sup>1),2),3)</sup>	698.7 <sup>1),2),3)</sup>

注:1)与对照组相比  $P < 0.05$ ; 2)与对照组相比  $P < 0.01$ ; 3)与 IR<sub>1</sub> 组和 IR<sub>2</sub> 组相比  $P < 0.05$ 。

### 2.2 组织学检查

肝脏病理切片提示缺血再灌注后,光镜下可见肝血窦和中央静脉瘀血,内皮细胞及肝细胞水肿变性,这些变化随着灌注时间的延长而逐渐加重,至灌注 3h 后可见弥漫性肝细胞水肿变性及明显的肝细胞坏死。而对照组未见有上述病理变化。

### 2.3 血浆 apoM 蛋白水平

血浆 apoM 蛋白水平在灌注初期轻度下降,至灌

结果显示,灌注时间越长,ALT 水平越高(表 2)。统计分析发现各组数据方差不齐,故采用 wilcoxon 检验,各组的值用中位数表示。结果 IR<sub>1</sub> 组和 IR<sub>2</sub> 组 ALT 水平明显高于对照组( $P < 0.05$ ),而 IR<sub>3</sub> 组和 IR<sub>4</sub> 组明显高于 IR<sub>1</sub>, IR<sub>2</sub> 组( $P < 0.05$ )及对照组( $P < 0.01$ )。

注 1h 时与对照组相比下降明显( $P < 0.01$ ),灌注 2h 后开始上升,到灌注 3h 时其水平已明显高于对照组( $P < 0.05$ )(表 3)。因此,apoM 蛋白在肝缺血再灌注损伤早期的变化是先降后升,而肝脏病理切片提示肝损伤随着灌注时间的延长而逐步加重,表明 apoM 蛋白的变化与肝损伤的程度并不呈正相关。

表 3 肝缺血再灌注损伤时各组血浆 apoM 蛋白水平

指标	对照组	IR <sub>1</sub> 组	IR <sub>2</sub> 组	IR <sub>3</sub> 组	IR <sub>4</sub> 组
灌注时间(h)	0	0.5	1.0	2.0	3.0
apoM 蛋白	2.122 ± 0.185	1.576 ± 0.428	1.421 ± 0.121 <sup>1)</sup>	1.835 ± 0.377	2.604 ± 0.149 <sup>2)</sup>

注:与对照组相比 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$

### 2.4 肝组织 apoM mRNA 的表达

肝组织 apoM mRNA 的表达与血浆 apoM 蛋白水平的变化略有不同,在灌注 0.5h 时,其水平较对照组有所下降,但它在灌注 1.0h 时即已开始上升,在

灌注 3h 时已明显高于 IR<sub>1</sub> ( $P < 0.01$ ) 和 IR<sub>2</sub> 组( $P < 0.05$ ),但与对照组相比尚无明显差异( $P > 0.05$ )(表 4)。

表 4 肝缺血再灌注损伤时各组肝组织 apoM mRNA 的表达

组别 指标	对照组	IR <sub>1</sub> 组	IR <sub>2</sub> 组	IR <sub>3</sub> 组	IR <sub>4</sub> 组
灌注时间(h)	0	0.5	1.0	2.0	3.0
apoM mRNA	0.995 ± 0.138	0.824 ± 0.124	0.872 ± 0.125	1.403 ± 0.122	1.645 ± 0.611 <sup>1),2),3)</sup>

注:1)与 IR<sub>1</sub> 组相比  $P < 0.05$ ; 2)与 IR<sub>2</sub> 组相比  $P < 0.01$ ; 3)与对照组比较,  $P > 0.05$

### 3 讨论

在急性炎症和损伤过程中,血浆中许多蛋白的浓度会发生改变,如C反应蛋白、脂蛋白( $\alpha$ )和 $\alpha 1$ -酸化糖蛋白等,称之为急性时相反应蛋白(acute phase reactive protein, APP)<sup>[7]</sup>。目前对这些蛋白生理功能的了解并不十分明确。肝脏缺血再灌注损伤可以引起全身性的炎症反应,也可以在损伤部位出现局部的炎症应答,通常过度的炎症应答被认为是再灌注损伤的关键<sup>[8,9]</sup>,因此,有多种APP参与该过程。

apoM是一种新型的人体脂蛋白,它主要在肝脏和肾脏中表达,而且以往的研究表明一些细胞因子如PAF, TGF, EGF和HGF能调节其在肝脏中的表达。因此,肝脏缺血再灌注损伤可能会影响apoM在肝脏中的表达,并导致其血浆浓度的改变。

本研究发现随着再灌注时间的延长,ALT水平越来越高,病理切片也提示肝损伤越来越重。但是,血浆apoM蛋白的表达与肝损伤的趋势并不一致,apoM蛋白在灌注0.5h和1h时呈下降趋势,此后开始逐渐上升,在灌注3h时超过对照组。apoM蛋白这种先降后升的变化趋势显然有别于C反应蛋白和脂蛋白( $\alpha$ ),后两者为典型的阳性APP,在炎症和损伤的急性期呈持续上升趋势<sup>[10]</sup>。笔者推测灌注早期血浆apoM蛋白的下降有两种可能:(1)该蛋白的半衰期较短,缺血再灌注损伤过程中肝脏的合成功能下降,同时血浆中的apoM蛋白大量降解,但目前尚无资料提到apoM蛋白的半衰期;(2)血流开放以后,apoM蛋白大量沉积至肝脏,导致血浆中的含量减少。这种减少的确切机制还有待于进一步研究。随后apoM蛋白的增加则是apoM mRNA表达的上调,促进机体合成更多的apoM蛋白所致。显然,在缺血再灌注损伤早期,apoM有迅速而明显的变化,据此,笔者认为apoM具有急性时相反应蛋白的特征。

APP在肝内的合成和释放由炎症介质来调节,这些炎症介质包括IL-6和IL-1型细胞因子,以及糖皮质激素和生长因子,其中细胞因子主要刺激APP基因的表达,它与肝细胞表面特异性受体结合后,通过信号转导在转录水平上调节APP基因的表达<sup>[11~13]</sup>。本研究表明肝脏apoM mRNA的表达模式也是先降后升,但其上升的时间要早于apoM蛋白,显然蛋白的合成相对滞后于mRNA的上调。肝缺血再灌注损伤后,可以产生大量的炎症介质

如TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 和PAF<sup>[14,15]</sup>。研究表明TGF- $\beta$ 和PAF可以影响HepG2细胞apoM mRNA的转录和apoM蛋白的表达,且与浓度相关。但在本研究中,类似作用尚不明确。

综上所述,肝缺血再灌注损伤过程早期,apoM有明显的变化,表明其具有急性时相反应蛋白的特征。导致apoM mRNA上调的机制、apoM蛋白在整个缺血再灌注损伤过程中的变化趋势以及相应的生理学意义有待于进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Xu N, Dahlback B. A novel human apolipoprotein (apoM) [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(44): 31286 - 31290.
- [2] Zhang XY, Dong X, Zheng L, *et al.* Specific tissue expression and cellular localization of human apolipoprotein M as determined by in situ hybridization [J]. *Acta Histochem*, 2003, 105(1): 67 - 72.
- [3] Zhang XY, Jiao GQ, Hurtig M, *et al.* Expression pattern of apolipoprotein M during mouse and human embryogenesis [J]. *Acta Histochem*, 2004, 106(2): 123 - 128.
- [4] Xu N, Hurtig M, Zhange XY, *et al.* Transforming growth factor-beta down-regulates apolipoprotein M in HepG2 cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1683(1-3): 33 - 37.
- [5] Xu N, Nilsson-Ehle P, Hurtig M, *et al.* Both leptin and leptin-receptor are essential for apolipoprotein M expression in vivo [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 321(4): 916 - 921.
- [6] Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, *et al.* Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat [J]. *Surg Gynecol Obstet*, 1990, 171(2): 120 - 125.
- [7] Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systematic responses to inflammation [J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(6): 448 - 454.
- [8] Jaeschke H. Mechanisms of reperfusion injury after warm ischemia of the liver [J]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*, 1998, 5(4): 402 - 408.
- [9] Jaeschke H, Smith CW, Clemens MG, *et al.* Mechanisms of inflammatory liver injury: adhesion molecules and cytotoxicity of neutrophils [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996, 139(2): 213 - 226.
- [10] Fabrizio C, Alessia G, Valentina S. The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins [J]. *Protein and Peptide Letters*, 2002, 9(3): 211 - 223.
- [11] Baumann H, Gaudie J. The acute phase response [J]. *Immunol Today*, 1994, 15(2): 74 - 80.
- [12] 褚延魁, 马庆久, 刘维, 等. 肝缺血再灌注对血及胃黏膜中TNF和IL-8及其mRNA表达的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(6): 423 - 423.
- [13] 梁法生, 宋继昌, 高英堂, 等. 趋化因子MIP-2在大鼠肝缺血/再灌注损伤后的表达 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(2): 104 - 106.
- [14] Araya J, Tsuruma T, Hirata K, *et al.* The regulation of HGF and TGF-beta by an angiotensin II type 1 receptor antagonist in hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. *Transplant Proc*, 2003, 35(1): 107 - 110.
- [15] Ruan Z, Shibamoto T, Shimo T, *et al.* Effects of platelet activating factor and thromboxane A2 on isolated perfused guinea pig liver [J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2004, 73(1-2): 73 - 85.