

# CXC趋化因子受体3和其配体在大鼠肝脏缺血再灌注损伤中的表达

刘臻, 许维雪, 张小薄, 刘宝林, 崔东旭

刘臻, 许维雪, 张小薄, 刘宝林, 崔东旭, 中国医科大学盛京医院普外一科 辽宁省沈阳市 110004

通讯作者: 刘臻, 110004, 辽宁省沈阳市三好街36号, 中国医科大学盛京医院普外一科, liuzhen1973@yahoo.com.cn

电话: 024-81365657

收稿日期: 2007-05-19 修回日期: 2007-09-02

## Expression of the CXC chemokine receptor 3 and its ligands in the livers of ischemia/reperfusion injured rats

Zhen Liu, Wei-Xue Xu, Xiao-Bo Zhang, Bao-Lin Liu, Dong-Xu Cui

Zhen Liu, Wei-Xue Xu, Xiao-Bo Zhang, Bao-Lin Liu, Dong-Xu Cui, the First Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Zhen Liu, the First Department of General Surgery, Shengjing Hospital of China Medical University, 36 Sanhao Street, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. liuzhen1973@yahoo.com.cn

Received: 2007-05-19 Revised: 2007-09-02

## Abstract

**AIM:** To explore the expression of the CXC chemokine receptor 3 (CXCR3) and its ligands (IP-10, Mig) in the livers of ischemia/reperfusion (I/R) injured rats.

**METHODS:** Thirty-two Wistar rats were randomly divided into four groups, with 8 rats in each group: sham operation (SO) and 6-, 12- and 24-hour I/R groups. The level of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in liver tissue was measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of CXCR3 and its ligands (IP-10, Mig) were assessed by semi-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The serum levels of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) were also analyzed.

**RESULTS:** Low expression levels of CXCR3, IP-10 and Mig mRNAs were observed in the

SO group. The expression levels of CXCR3 and IP-10 mRNAs in the ischemic tissues of I/R animals were significantly higher than those in SO animals (CXCR3:  $0.925 \pm 0.109$ ,  $0.786 \pm 0.074$ ,  $0.606 \pm 0.082$  vs  $0.125 \pm 0.028$ , all  $P < 0.01$ ; IP-10:  $0.863 \pm 0.091$ ,  $0.680 \pm 0.075$ ,  $0.543 \pm 0.284$  vs  $0.128 \pm 0.027$ , all  $P < 0.01$ ). The expression levels of CXCR3 and IP-10 mRNAs in the ischemia tissues of 6-hour I/R animals were higher than those in the ischemic tissues of 12-hour I/R animals ( $P < 0.01$ ). There was no difference in the level of Mig mRNA between the I/R group and the SO group. Compared with the SO group, the level of TNF- $\alpha$  was significantly increased in the I/R groups ( $154.88 \pm 14.35$  ng/L,  $258.88 \pm 13.73$  ng/L,  $182.87 \pm 10.95$  ng/L vs  $23.63 \pm 4.00$  ng/L, all  $P < 0.01$ ), reaching a peak at 12 hours after reperfusion.

**CONCLUSION:** The expression levels of mRNAs for CXCR3 and its ligand IP-10 are rapidly up-regulated in liver ischemia/reperfusion tissue, suggesting that CXCR3 plays an important role in liver injury induced by I/R.

**Key Words:** Liver transplantation; Reperfusion; Chemokine receptor

Liu Z, Xu WX, Zhang XB, Liu BL, Cui DX. Expression of the CXC chemokine receptor 3 and its ligands in the livers of ischemia/reperfusion injured rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(26): 2835-2838

## 摘要

**目的:** 探讨CXC趋化因子受体3(CXCR3)及其配体IP-10和Mig在大鼠肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤中的表达及作用。

**方法:** 32只Wistar大鼠随机分成4组, 每组8只。即假手术组, 部分肝脏缺血再灌注6, 12和24 h组。应用酶联免疫吸附实验(ELISA)法检测肝组织肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 水平。应用半定量聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定肝组织CXCR3及其配体IP-10, Mig mRNA的表达。同时检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)及天冬氨酸

## ■背景资料

肝缺血再灌注损伤是肝切除术、肝移植和低血容量休克中影响肝脏功能的一个主要因素, 这一损伤主要是急性炎症性应答的结果。趋化因子是一类控制免疫细胞定向迁移的细胞因子, 其中CXC趋化因子受体3(CXCR3)及其配体是介导炎症反应的主要趋化因子, 因此可能在肝脏I/R损伤中起调节作用。

## ■研究前沿

肝缺血再灌注损伤与细胞因子的关系是目前研究的热点之一,但相关研究报道较少。

转氨酶(AST)的含量。

**结果:**假手术组肝组织中CXCR3, IP-10, Mig mRNA低表达。缺血再灌注各组肝组织中CXCR3和IP-10 mRNA表达水平均明显高于假手术组(CXCR3:  $0.925 \pm 0.109$ ,  $0.786 \pm 0.074$ ,  $0.606 \pm 0.082$  vs  $0.125 \pm 0.028$ , 均  $P < 0.01$ ; IP-10:  $0.863 \pm 0.091$ ,  $0.680 \pm 0.075$ ,  $0.543 \pm 0.284$  vs  $0.128 \pm 0.027$ , 均  $P < 0.01$ ), 6 h组高于12 h组( $P < 0.01$ ), 12h组与24h组无明显差别( $P > 0.05$ )。Mig mRNA水平较假手术组相比, 无显著差异( $P > 0.05$ )。缺血再灌注各组TNF- $\alpha$ 水平较假手术组明显升高( $154.88 \pm 14.35$  ng/L,  $258.88 \pm 13.73$  ng/L,  $182.87 \pm 10.95$  ng/L vs  $23.63 \pm 4.00$  ng/L, 均  $P < 0.01$ ), 再灌注12 h达高峰。

**结论:**CXCR3及其配体IP-10在肝脏缺血再灌注早期表达上调,在缺血再灌注损伤中起重要的作用。

**关键词:**肝移植;再灌注;趋化因子受体

刘臻, 许维雪, 张小薄, 刘宝林, 崔东旭。CXC趋化因子受体3和其配体在大鼠肝脏缺血再灌注损伤中的表达。世界华人消化杂志 2007;15(26):2835-2838

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2835.asp>

## 0 引言

肝缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是肝切除术、肝移植和低血容量休克中影响肝脏功能的一个主要因素,他导致局部和广泛的细胞损伤和器官功能下降。这一损伤主要是急性炎症性应答的结果。炎症性应答由炎性介质的级联反应诱导,引起白细胞聚集于缺血后组织,导致间质细胞损伤。内源性调节机制试图控制这种炎症应答。炎症性反应在缺血再灌注损伤中起重要作用<sup>[1]</sup>。趋化因子是一类控制免疫细胞定向迁移的细胞因子,对白细胞的发育、分化、定位具有重要的调节作用<sup>[2-3]</sup>。我们研究CXC趋化因子受体3(CXCR3)及其配体IP-10、Mig在肝脏I/R损伤时的表达,了解他们在I/R损伤中是否起调节作用。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** TRIzol试剂、IP-10、Mig、CXCR3和 $\beta$ -actin引物购自大连宝生物工程公司。TNF- $\alpha$ 检测用ELISA试剂盒购自北京邦定泰克生物技术有限公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 模型建立**  $\delta$  Wistar大鼠32只,体质量200-250 g,每组8只,即假手术组(Sham operation, SO)及I/R 6 h, 12 h, 24 h组。并将I/R各组未行I/R的肝脏作为自身对照。术前禁食12 h,不禁水。乙醚吸入麻醉,由阴茎背静脉注入肝素200 U/kg,腹部正中切口入腹,将供应肝中叶、左叶的肝动脉、门静脉、胆管用微血管夹阻断,而不阻断供应肝右叶、右外侧叶及尾状叶的动、静脉及胆管<sup>[4]</sup>。待肝叶缺血达90 min,再次开腹移去血管夹后关腹,并给予乳酸林格液20 mL/kg,以补充液体的丢失。SO组术前肝素化,未结扎血管,余操作相同。在灌注6, 12, 24 h分别处死动物取静脉血及肝组织标本。

**1.2.2 CXCR3及其配体mRNA水平检测**<sup>[5]</sup> 采用逆转录-多聚酶链反应(RT-PCR)半定量法检测。采用异硫氰酸胍一步法提取RNA。取1.5  $\mu$ g RNA逆转录合成cDNA。引物序列: IP10: 5'-ccgcgcctatcgccaatgagctgcgc-3', 5'-cttggggacaccttttagcatcttttg-3'; Mig: 5'-gaactcagctctgccatgaa-3', 5'-ttgccgagtcggtatctagg-3'; CXCR3: 5'-tcactcttctgtcagccagc-3', 5'-caccaccaccaccaccacta-3';  $\beta$ -actin: 5'-gcgacgagccagagcaagagaggc-3', 5'-gctaggagccaggcagtaattcc-3'。扩增条件: 首先95 $^{\circ}$ C 2 min, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 之后95 $^{\circ}$ C 30 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 33次循环。扩增产物上样于10 g/L琼脂糖凝胶电泳,EB染色20 min,凝胶成像分析系统测定DNA光密度。 $\beta$ -actin作为内参照。以各实验组各电泳条带密度与相对的内参照密度之比表示相对表达量。

**1.2.3 肝组织TNF- $\alpha$ 水平和血清ALT, AST测定检测** 肝组织应用超声粉碎仪粉碎后,离心,留取上清,应用ELISA试剂盒,酶标仪测定450 nm吸光度检测。血清ALT, AST测定采用日立全自动生化仪检测。

**统计学处理** 所有数据均通过SPSS13.0软件处理。以mean $\pm$ SD表示,采用One-Way ANOVA方法检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组肝功能变化** SO组及6, 12, 24 h I/R组ALT值分别为 $97.38 \pm 8.83$  U/L,  $1486.88 \pm 196.45$  U/L,  $2272.63 \pm 208.50$  U/L和 $3517.13 \pm 235.04$  U/L。SO组及6,12, 24 h I/R组AST值分别为 $86.75 \pm 8.60$  U/L,  $1221.63 \pm 105.93$  U/L,  $1984.38 \pm 104.27$  U/L和 $2942.88 \pm 202.93$  U/L。I/R组,随着再灌注时间的延长,ALT、AST逐渐升高,于24 h达最高,各

时段间比较, 差异显著( $P<0.01$ ). 同假手术组比较, 缺血再灌注组各时段ALT、AST均显著升高( $P<0.01$ , 表1).

2.2 TNF- $\alpha$ 水平 SO组、6 h, 12 h, 24 h I/R组TNF- $\alpha$ 分别为 $23.63\pm 4.00$  ng/L,  $154.88\pm 14.35$  ng/L,  $258.88\pm 13.73$  ng/L,  $182.87\pm 10.95$  ng/L, 再灌注后肝组织TNF- $\alpha$ 水平升高, 12 h达高峰, 同6 h相比, 差异显著( $P<0.01$ ), 至24 h下降, 但仍明显高于假手术组( $P<0.01$ ). SO组、6 h、12 h、24 h I/R组未缺血肝组织TNF- $\alpha$ 水平为 $21.13\pm 4.05$  ng/L,  $25.63\pm 4.60$  ng/L,  $23.63\pm 4.57$  ng/L,  $24.63\pm 4.98$  ng/L, 各组之间比较无明显差别(表2).

2.3 CXCR3及其配体mRNA水平 实验组再灌注后, 肝组织CXCR3和IP-10 mRNA表达水平明显升高, 再灌注6 h达高峰, 6 h, 12 h, 24 h同SO组比较, 差异显著( $P<0.01$ ). 实验组再灌注12 h同6 h相比, CXCR3和IP-10 mRNA表达水平明显下降( $P<0.01$ ), 而同24 h相比, 无统计学差异( $P>0.05$ ). Mig mRNA在再灌注后有所升高, 但同对照组比较, 无明显差别( $P>0.05$ )(表2).

### 3 讨论

肝缺血再灌注损伤是复杂的肝切除、肝外伤和肝移植等手术中不可避免病理过程<sup>[6]</sup>. 由缺血再灌注引起的肝损伤的确切生化机制非常复杂, 至今仍未完全清楚. 研究显示MCP-1、MIP-1、2在缺血再灌注损伤中表达明显升高<sup>[7-8]</sup>, 他们主要作用于中性粒细胞. 近年研究表明, 急性炎症性应答在这一过程中起重要的作用. 免疫抑制剂引起的全身性免疫抑制可以减轻缺血再灌注损伤, 而且无胸腺小鼠的肝脏缺血再灌注损伤下降, 这些都提示T淋巴细胞在其中可能起重要的作用<sup>[9-10]</sup>. 多种途径参与淋巴细胞的活化, 趋化

表 1 肝脏缺血再灌注损伤后血清ALT、AST含量变化(U/L, mean  $\pm$  SD)

分组	ALT	AST
SO组	97.38 $\pm$ 8.83	86.75 $\pm$ 8.60
I/R 6 h组	1486.88 $\pm$ 196.45 <sup>b</sup>	1221.63 $\pm$ 105.93 <sup>b</sup>
I/R 12 h组	2272.63 $\pm$ 208.50 <sup>bd</sup>	1984.38 $\pm$ 104.27 <sup>bd</sup>
I/R 24 h组	3517.13 $\pm$ 235.04 <sup>be</sup>	2942.88 $\pm$ 202.93 <sup>be</sup>

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs SO组; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 6 h组; <sup>e</sup> $P<0.01$  vs 12 h组.

因子受体途径是其中的重要途径. 最近研究结果也显示淋巴细胞在缺血再灌注损伤中起重要的作用<sup>[11]</sup>. 实验发现淋巴细胞在再灌注早期在肝脏窦周聚集, 从而损伤组织.

趋化因子是一类控制免疫细胞定向迁移的细胞因子, 对白细胞的发育、分化、定位具有调节作用. 其属于小分子的分泌蛋白超家族, 根据N端半胱氨酸残基的数目和排列方式, 将趋化因子分为CXC、CC、C、CX3C 4个亚家族. 其中CXC趋化因子受体3(CXC chemokine receptor 3, CXCR3)及其配体IP-10、Mig与T细胞应答密切相关<sup>[12]</sup>. 我们实验结果显示缺血再灌注后随着再灌注时间延长, 血清ALT、AST不断升高, 显示出肝细胞损害加重. 同时, 我们检测了缺血再灌注时CXCR3及其配体IP-10、Mig mRNA在肝脏中的表达, 发现缺血区肝组织再灌注后CXCR3、IP-10 mRNA表达增加, 于再灌注后6 h达最高峰, 之后表达水平逐渐下降, 6 h和12 h比较, 差异显著( $P<0.01$ ), 而12 h和24 h之间无明显差别. 未缺血肝组织CXCR3、IP-10 mRNA水平无明显升高. 这表明CXCR3、IP-10在再灌注的早期即参与了肝脏损伤. Mig mRNA的表达水平在缺血肝组织虽有升高, 但与未缺血肝组织比较, 无显著差异( $P>0.05$ ), 表明Mig在缺血再灌注

### ■应用要点

CXCR3趋化因子受体及其配体若在肝缺血再灌注损伤中起促进作用, 此趋化因子受体途径可作为阻断靶位和减轻缺血再灌注损伤的新途径.

表 2 肝组织中CXCR3、IP-10、Mig mRNA及TNF- $\alpha$ 比较(mean  $\pm$  SD,  $n=8$ )

组织	SO	I/R 6 h	I/R 12 h	I/R 24 h
CXCR3 mRNA	缺血组织	0.125 $\pm$ 0.028	0.925 $\pm$ 0.109 <sup>be</sup>	0.786 $\pm$ 0.074 <sup>bde</sup>
	非缺血组织	0.133 $\pm$ 0.041	0.159 $\pm$ 0.046	0.161 $\pm$ 0.043
IP-10 mRNA	缺血组织	0.128 $\pm$ 0.027	0.863 $\pm$ 0.091 <sup>be</sup>	0.680 $\pm$ 0.075 <sup>bde</sup>
	非缺血组织	0.128 $\pm$ 0.041	0.140 $\pm$ 0.040	0.136 $\pm$ 0.037
Mig mRNA	缺血组织	0.105 $\pm$ 0.024	0.104 $\pm$ 0.023	0.123 $\pm$ 0.020
	非缺血组织	0.104 $\pm$ 0.033	0.111 $\pm$ 0.032	0.124 $\pm$ 0.034
TNF- $\alpha$ (ng/L)	缺血组织	23.63 $\pm$ 4.00	154.88 $\pm$ 14.35 <sup>b</sup>	258.88 $\pm$ 13.73 <sup>bd</sup>
	非缺血组织	21.13 $\pm$ 4.05	25.63 $\pm$ 4.60	23.63 $\pm$ 4.57

<sup>b</sup> $P<0.01$  vs SO; <sup>d</sup> $P<0.01$  vs 6 h组; <sup>e</sup> $P<0.01$  vs 非缺血组.

## ■同行评价

本文研究得出 CXCR3 及其配体 IP-10 在 I/R 早期表达上调, 方法成熟, 设计合理, 数据可信, 对临床研究有一定的参考价值。

损伤中无明显作用。在实验中, 我们应用 ELISA 监测各时段肝脏 TNF- $\alpha$  水平。结果显示, 缺血再灌注后 TNF- $\alpha$  水平升高, 再灌注 12 h 达最高峰, 之后逐渐下降, 各时段比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。本实验显示 CXCR3、IP-10 mRNA 表达高峰早于 TNF- $\alpha$ , 表明在缺血再灌注损伤早期 T 细胞即起了一定的作用。这与 Khandoga *et al*<sup>[11]</sup> 提出的淋巴细胞在再灌注早期即在肝脏窦周聚集, 从而损伤肝组织的研究结果一致。本研究发现趋化因子受体途径参与了肝脏缺血再灌注早期 T 细胞活化, 继之引起 TNF- $\alpha$  等细胞因子的释放, 导致肝组织进一步受损伤, 但确切作用机制还需进一步探讨。

由此可见, 趋化因子 IP-10 及其受体 CXCR3 促进了淋巴细胞在缺血再灌注损伤中的作用, 若阻断此作用途径, 可能减轻早期肝脏缺血再灌注损伤。

## 4 参考文献

- 1 Husted TL, Lentsch AB. The role of cytokines in pharmacological modulation of hepatic ischemia/reperfusion injury. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 2867-2873
- 2 Luther SA, Cyster JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol* 2001; 2: 102-107
- 3 Van Lint P, Libert C. Chemokine and cytokine processing by matrix metalloproteinases and its effect on leukocyte migration and inflammation. *J Leukoc Biol* 2007
- 4 Khandoga A, Biberthaler P, Enders G, Teupser D, Axmann S, Luchting B, Hutter J, Messmer K, Krombach F. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo. *Shock* 2002; 18: 529-535
- 5 McColl SR, Mahalingam S, Staykova M, Tylaska LA, Fisher KE, Strick CA, Gladue RP, Neote KS, Willenborg DO. Expression of rat I-TAC/CXCL11/SCYA11 during central nervous system inflammation: comparison with other CXCR3 ligands. *Lab Invest* 2004; 84: 1418-1429
- 6 姚宇锋, 项建斌, 蔡端. 肝脏缺血再灌注损伤发生机制研究进展. *肝胆胰外科杂志* 2005; 17: 249-251
- 7 Hogaboam CM, Bone-Larson CL, Steinhäuser ML, Matsukawa A, Gosling J, Boring L, Charo IF, Simpson KJ, Lukacs NW, Kunkel SL. Exaggerated hepatic injury due to acetaminophen challenge in mice lacking C-C chemokine receptor 2. *Am J Pathol* 2000; 156: 1245-1252
- 8 Yamaguchi Y, Matsumura F, Takeya M, Ichiguchi O, Kuratsu JI, Horiuchi T, Akizuki E, Matsuda T, Okabe K, Ohshiro H, Liang J, Mori K, Yamada S, Takahashi K, Ogawa M. Monocyte chemoattractant protein-1 enhances expression of intercellular adhesion molecule-1 following ischemia-reperfusion of the liver in rats. *Hepatology* 1998; 27: 727-734
- 9 Shen XD, Ke B, Zhai Y, Amersi F, Gao F, Anselmo DM, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. CD154-CD40 T-cell costimulation pathway is required in the mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury, and its blockade facilitates and depends on heme oxygenase-1 mediated cytoprotection. *Transplantation* 2002; 74: 315-319
- 10 Zwacka RM, Zhang Y, Halldorson J, Schlossberg H, Dudus L, Engelhardt JF. CD4(+) T-lymphocytes mediate ischemia/reperfusion-induced inflammatory responses in mouse liver. *J Clin Invest* 1997; 100: 279-289
- 11 Khandoga A, Hanschen M, O'Kessler JS, Krombach F. CD4+ T cells contribute to postischemic liver injury in mice by interacting with sinusoidal endothelium and platelets. *Hepatology* 2006; 43: 306-315
- 12 Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 593-620

编辑 程剑侠 电编 郭海丽

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

## • 消息 •

## 世界华人消化杂志在线办公系统

本刊讯 自2005-12-15起, 世界华人消化杂志正式开通了在线办公系统(<http://www.wjgnet.com/wcjd/ch/index.aspx>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者、编者之间的信息反馈交流。凡在在线办公系统注册的用户, 将可获得世界华人消化杂志最新出版消息。