

核因子- κ B及其下游因子TNF- α 、Bcl-2在急性肝损伤中的作用及机制

王春妍, 范玉强, 迟宝荣, 曹武奎, 李海

■背景资料

核因子- κ B是一种广泛存在于体内多种细胞的核转录因子。除能介导多种炎症介质转录表达外, 他也参与细胞凋亡的调控, 主要通过调控凋亡相关的重要基因表达。研究表明NF- κ B及其调控产物的过度表达在肝脏慢性炎症、肝纤维化的发生及发展中起重要作用。但NF- κ B在急性肝损伤中作用及机制研究较少。

王春妍, 范玉强, 曹武奎, 李海, 天津市传染病医院 天津市300192

迟宝荣, 吉林大学第一医院 吉林省长春市 130021

王春妍, 博士, 主治医师, 主要从事急性肝衰竭的基础研究。

作者贡献分布: 实验试剂和研究工具由范玉强与王春妍提供; 研究过程由王春妍、范玉强、迟宝荣、曹武奎及李海共同完成; 数据分析由王春妍与李海完成; 论文写作由迟宝荣与王春妍完成。

通讯作者: 迟宝荣, 130021, 吉林省长春市新民大街71号, 吉林大学第一医院。chibaorong@sohu.com

电话: 0431-85612437

收稿日期: 2008-06-29 修回日期: 2008-07-27

接受日期: 2008-07-29 在线出版日期: 2008-09-08

Roles of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor- α and Bcl-2 in acute hepatic injury and their mechanisms

Chun-Yan Wang, Yu-Qiang Fan, Bao-Rong Chi, Wu-Kui Cao, Hai Li

Chun-Yan Wang, Yu-Qiang Fan, Wu-Kui Cao, Hai Li, Tianjin Infectious Disease Hospital, Tianjin 300192, China
Bao-Rong Chi, the First Hospital of Jilin University, Changchun 130021, Jilin Province, China

Correspondence to: Bao-Rong Chi, the Hospital of Jilin University, 71 Xinmin Street, Changchun 130021, Jilin Province, China. chibaorong@sohu.com

Received: 2008-06-29 Revised: 2008-07-27

Accepted: 2008-07-29 Published online: 2008-09-08

Abstract

AIM: To explore the roles of nuclear factor-kappa B and its downstream factors such as tumor necrosis factor- α (TNF- α) and Bcl-2 in acute hepatic injury and their mechanisms.

METHODS: A total of 90 male Wistar rats were randomly and averagely divided into normal group, TAA (thioacetamide) model group and PDTC (pyrrolidine dithiocarbamate) pretreated group. The rats in each group were killed 6, 24 and 48 h after induction of the model, 10 rats for each time point. Chromogenic substrate limulus amebocyte lysate method was used to examine the level of plasma endotoxin, and radioimmunoassay was performed to detect the level of plasma TNF- α . Liver tissues were collected for pathological examination by immunohistochem-

istry, and the apoptotic index of hepatic cells was also measured.

RESULTS: As compared with those in the normal group, the levels of plasma endotoxin (EU/mL) and TNF- α (μ g/L) were significantly increased (endotoxin: 0.64 ± 0.08 vs 0.23 ± 0.02 , $P < 0.01$; 0.96 ± 0.14 vs 0.25 ± 0.02 , $P < 0.01$; 1.15 ± 0.17 vs 0.25 ± 0.03 , $P < 0.01$; TNF- α : 5.97 ± 1.07 vs 1.44 ± 0.52 , $P < 0.01$; 12.52 ± 2.09 vs 1.57 ± 0.62 , $P < 0.01$; 10.76 ± 1.95 vs 1.49 ± 0.57 , $P < 0.01$), and the activities of NF- κ B and Bcl-2 in liver tissues were enhanced (NF- κ B: $87.11\% \pm 8.23\%$ vs $4.64\% \pm 1.82\%$, $78.55\% \pm 6.82\%$ vs $4.58\% \pm 1.91\%$, $74.27\% \pm 6.26\%$ vs $4.73\% \pm 1.89\%$, all $P < 0.01$; Bcl-2: $51.11\% \pm 4.23\%$ vs $6.74\% \pm 3.93\%$, $71.59\% \pm 6.82\%$ vs $6.68\% \pm 3.88\%$, $82.19\% \pm 8.54\%$ vs $6.81\% \pm 4.14\%$, all $P < 0.01$) in the TAA group. With prolonging of TAA treatment, the apoptotic index of hepatic cells were increasing, and the pathological changes becoming notable. After the activity of NF- κ B was inhibited by PDTC, the pathological injury was alleviated.

CONCLUSION: TNF- α is activated in TAA-induced acute liver injury, and NF- κ B aggravates hepatic injury by regulating its downstream gene expression.

Key Words: Acute liver injury; Nuclear factor-kappa B; Tumor necrosis factor- α ; Bcl-2; Immunohistochemistry; Radioimmunoassay

Wang CY, Fan YQ, Chi BR, Cao WK, Li H. Roles of nuclear factor-kappa B, tumor necrosis factor- α and Bcl-2 in acute hepatic injury and their mechanisms. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(25): 2804-2808

摘要

目的: 探讨核因子- κ B(nuclear factor-kappa B, NF- κ B)及其下游因子TNF- α 、Bcl-2在急性肝损伤中的作用及机制。

方法: δ Wistar大鼠90只随机分为正常组, 硫代乙酰胺(TAA)造模组及脯氨酸二硫代氨基

■同行评议者

谭德明, 教授, 中南大学湘雅医院感染病科

甲酸酯(PDTC)预处理组($n = 30$). 三组大鼠分别于造模完成后6、24、48 h 3个时间点处死, 每个时间点各取10只大鼠. 萤试剂显色基质法测定大鼠血浆内毒素, 放免法测定血浆TNF- α 水平, 取肝脏行病理学及免疫组化检测, 制备肝脏单细胞悬液检测肝细胞凋亡指数.

结果: 与正常组相比, TAA组在6、24、48 h时间点均可见血浆内毒素(EU/mL)及TNF- α (μ g/L)水平明显升高(内毒素: 0.64 ± 0.08 vs 0.23 ± 0.02 , $P < 0.01$; 0.96 ± 0.14 vs 0.25 ± 0.02 , $P < 0.01$; 1.15 ± 0.17 vs 0.25 ± 0.03 , $P < 0.01$; TNF- α : 5.97 ± 1.07 vs 1.44 ± 0.52 , $P < 0.01$; 12.52 ± 2.09 vs 1.57 ± 0.62 , $P < 0.01$; 10.76 ± 1.95 vs 1.49 ± 0.57 , $P < 0.01$), 肝组织NF- κ B及Bcl-2明显活化(NF- κ B: $87.11\% \pm 8.23\%$ vs $4.64\% \pm 1.82\%$, $78.55\% \pm 6.82\%$ vs $4.58\% \pm 1.91\%$, $74.27\% \pm 6.26\%$ vs $4.73\% \pm 1.89\%$, 均 $P < 0.01$; Bcl-2: $51.11\% \pm 4.23\%$ vs $6.74\% \pm 3.93\%$, $71.59\% \pm 6.82\%$ vs $6.68\% \pm 3.88\%$, $82.19\% \pm 8.54\%$ vs $6.81\% \pm 4.14\%$, 均 $P < 0.01$). 随着时间延长, 肝细胞凋亡指数增加, TAA组肝脏病理变化明显, 抑制NF- κ B活性后, 可见肝脏病理变化减轻.

结论: TAA所致急性肝损伤中, TNF- α 水平明显升高, 发挥了促炎及诱导凋亡作用. 其促凋亡作用相对拮抗Bcl-2抗凋亡作用. NF- κ B通过调控其下游基因加重肝脏损伤.

关键词: 急性肝损伤; 核因子- κ B; 肿瘤坏死因子- α ; Bcl-2; 免疫组化; 放免法

王春妍, 范玉强, 迟宝荣, 曹武奎, 李海. 核因子- κ B及其下游因子TNF- α 、Bcl-2在急性肝损伤中的作用及机制. 世界华人消化杂志 2008; 16(25): 2804-2808

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2804.asp>

0 引言

核因子- κ B(nuclear factor-kappaB, NF- κ B)是一种广泛存在于体内多种细胞的核转录因子, 参与多种疾病的病理生理过程, 在机体的免疫和炎症反应及凋亡调控等方面发挥着重要作用^[1]. NF- κ B除了能介导多种炎症介质转录表达外, 他也参与了细胞凋亡的调控, 主要是通过调控凋亡相关的重要基因表达. 其对细胞凋亡的调控具有两种截然不同的作用: 抗凋亡或促凋亡. 细胞类型和刺激的类型、凋亡诱导因素不同导致NF- κ B发挥不同的作用. TNF- α , Bcl-2为NF- κ B下游2个重要的与凋亡相关基因. 目前NF- κ B及其下游因子TNF- κ , Bcl-2在急性肝损伤中的作用

及机制的相关研究较少, 故本实验采用硫代乙酰胺造模方法就此问题进行探讨.

1 材料和方法

1.1 材料 硫代乙酰胺(TAA)购自天津市大茂化学仪器供应站. 脯氨酸二硫代氨基甲酸酯(PDTC)购于Sigma公司. 内毒素试剂盒购于湛江海洋生物制品厂. TNF- α 放免试剂盒购于北京尚柏生物医学技术有限公司. DAB试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司. NF- κ B P65 mAb购自北京中山生物技术有限公司. Bcl-2 mAb购自武汉博士德生物工程有限公司. 其余化学试剂均为市售分析纯.

1.2 方法

1.2.1 分组及造模: δ Wistar大鼠90只随机分为正常组(30只), TAA造模组(30只)及PDTC预处理组(30只). TAA造模组大鼠予硫代乙酰胺(TAA)300 mg/kg sc, 24 h后以相同剂量重复皮注1次, 48 h造模完成; PDTC预处理组于建立急性肝损伤模型前1 h ip PDTC 100 mg/kg; 正常组予同等剂量生理盐水皮注. 三组大鼠分别于造模完成后6、24、48 h 3个时间点处死, 每时间点各取10只大鼠.

1.2.2 检测指标: 血浆内毒素测定: 采用萤试剂显色基质法; 血浆TNF- α 检测采用放免法测定; 肝脏病理学检测: 将经处理的肝脏组织制成常规石蜡切片, HE染色后进行组织学检查. SP法(链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶)免疫组化检测肝脏组织中NF- κ B及Bcl-2活性. 结果判定: NF- κ B细胞染色呈黄色或棕黄色为阳性, 定位于细胞核和(或)细胞质. Bcl-2细胞染色呈黄色或棕黄色为阳性, 定位于细胞质. 每张切片取5个高倍镜视野(每个视野>500个细胞), 分别计算阳性率, 阳性率 = 阳性细胞数/总细胞数 $\times 100\%$. 肝细胞凋亡指数检测: 将肝脏组织制备成单细胞悬液, 按1:3体积加入冷乙醛内固定, 4 $^{\circ}$ C, 过夜. 次日首先600转离心5 min, 洗去乙醛, 弃上清, 用PBS反复洗3次, 弃上清, 调整细胞数为 1×10^9 /L, 过350目纱网. 加入RNASE 100 mL混匀, 37 $^{\circ}$ C水浴30 min, 然后加入碘化丙锭(PI)400 mL, 室温下避光染色30 min. 送流式细胞仪待测.

统计学处理 采用SPSS12.0软件处理数据. 实验数据以mean \pm SD表示, 组间比较用 t 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 各组肝组织NF- κ B和Bcl-2免疫组化结果

■ 研发前沿

目前, NF- κ B及其下游基因TNF- α , Bcl-2在硫代乙酰胺所致急性肝损伤中作用及机制的研究尚未见报道.

■相关报道

研究表明,一种转录调节因子可以在不同类型的细胞中表现出多种各异的生物学效应,通过这一机制,使纷繁复杂的基因表达控制趋于最经济,又不失其特异性。

表 1 各组肝组织NF-κB及Bcl-2免疫组化结果 (mean ± SD, %)

分组	NF-κB			Bcl-2		
	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
对照组	4.64 ± 1.82	4.58 ± 1.91	4.73 ± 1.89	6.74 ± 3.93	6.68 ± 3.88	6.81 ± 4.14
TAA组	87.11 ± 8.23 ^b	78.55 ± 6.82 ^b	74.27 ± 6.26 ^b	51.11 ± 4.23 ^b	71.59 ± 6.82 ^b	82.19 ± 8.54 ^b
PDTC预处理组	31.88 ± 4.14 ^{bd}	27.58 ± 3.44 ^{bd}	26.67 ± 3.88 ^{bd}	27.45 ± 3.37 ^{bd}	32.58 ± 3.91 ^{bd}	35.94 ± 4.67 ^{bd}

^b*P*<0.01 vs 正常对照组; ^d*P*<0.01 vs TAA组。

表 2 各组血浆内毒素含量检测结果 (mean ± SD)

分组	内毒素(EU/mL)			TNF-α(μg/L)		
	6 h	24 h	48 h	6 h	24 h	48 h
对照组	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.25 ± 0.03	1.44 ± 0.52	1.57 ± 0.62	1.49 ± 0.57
TAA组	0.64 ± 0.08 ^b	0.96 ± 0.14 ^b	1.15 ± 0.17 ^b	5.97 ± 1.07 ^b	12.52 ± 2.09 ^b	10.76 ± 1.95 ^b
PDTC预处理组	0.42 ± 0.05 ^{bd}	0.54 ± 0.07 ^{bd}	0.65 ± 0.07 ^{bd}	3.52 ± 0.90 ^{bd}	5.47 ± 0.99 ^{bd}	4.36 ± 0.95 ^{bd}

^b*P*<0.01 vs 正常对照组; ^d*P*<0.01 vs TAA组。

表 3 各组肝细胞凋亡指数结果比较 (mean ± SD, %)

分组	6 h	24 h	48 h
对照组	3.11 ± 0.42	3.67 ± 0.51	3.40 ± 0.49
TAA组	19.26 ± 1.83 ^b	43.25 ± 3.91 ^b	67.43 ± 7.04 ^b
PDTC预处理组	18.54 ± 1.79 ^b	29.21 ± 2.81 ^{bd}	41.73 ± 3.94 ^{bd}

^b*P*<0.01 vs 正常对照组; ^d*P*<0.01 vs TAA组。

TAA造模组各时间点均可见NF-κB明显活化,于造模后6 h升高即达到峰值,至24-48 h NF-κB活性仍保持在较高水平。PDTC组各时间点NF-κB活化抑制。TAA造模组各时间点Bcl-2表达显著升高,随着时间的延长,Bcl-2表达也随之升高。PDTC组各时间点Bcl-2表达明显降低(表1)。

2.2 各组血浆内毒素及TNF-α含量检测分析 TAA造模组各时间点血浆内毒素含量明显升高,随着时间的延长,TAA组内毒素的含量也随之升高。PDTC组各时间点血浆内毒素含量降低。TAA组各时间点TNF-α水平显著升高,于造模后6 h开始升高,24 h达到最高峰;PDTC组各时间点TNF-α水平明显降低(表2)。

2.3 各组肝细胞凋亡指数结果 TAA组各时间点肝细胞凋亡指数明显增加。随着时间的延长,肝细胞凋亡指数也随之增加。PDTC组各时间点肝细胞凋亡指数降低(表3)。

2.4 各组肝组织病理结果 正常组大鼠肝组织,肝小叶结构正常,清晰。肝窦清晰无扩张,无明显

炎性细胞浸润。TAA 6 h组大鼠肝组织,灶状坏死,肝细胞肿胀,肝细胞质疏松,偶见细胞空泡样变性,炎性细胞浸润,肝小叶尚清晰。TAA 24 h组大鼠肝组织,片状坏死,肝细胞高度肿胀,体积变大,部分细胞空泡变性,可见肝细胞核碎裂,炎性细胞明显浸润,肝小叶尚清晰,肝索排列不整齐。TAA 48 h组大鼠肝组织,大片状坏死,出血,肝小叶不清,结构紊乱,肝索排列紊乱。可见少数尚存肝细胞,肝细胞核碎裂或消失,大量炎性细胞浸润。PDTC各组肝组织病理改变较TAA组同时间点明显减轻(图1)。

3 讨论

越来越多的证据表明,一种转录调节因子可以在不同类型的细胞中表现出多种各异的生物学效应,通过这一机制,使纷繁复杂的基因表达控制趋于最经济,又不失其特异性;细胞核因子NF-κB正是这样一种具有多向性调节作用的蛋白质因子。NF-κB除了能介导多种炎性介质转录

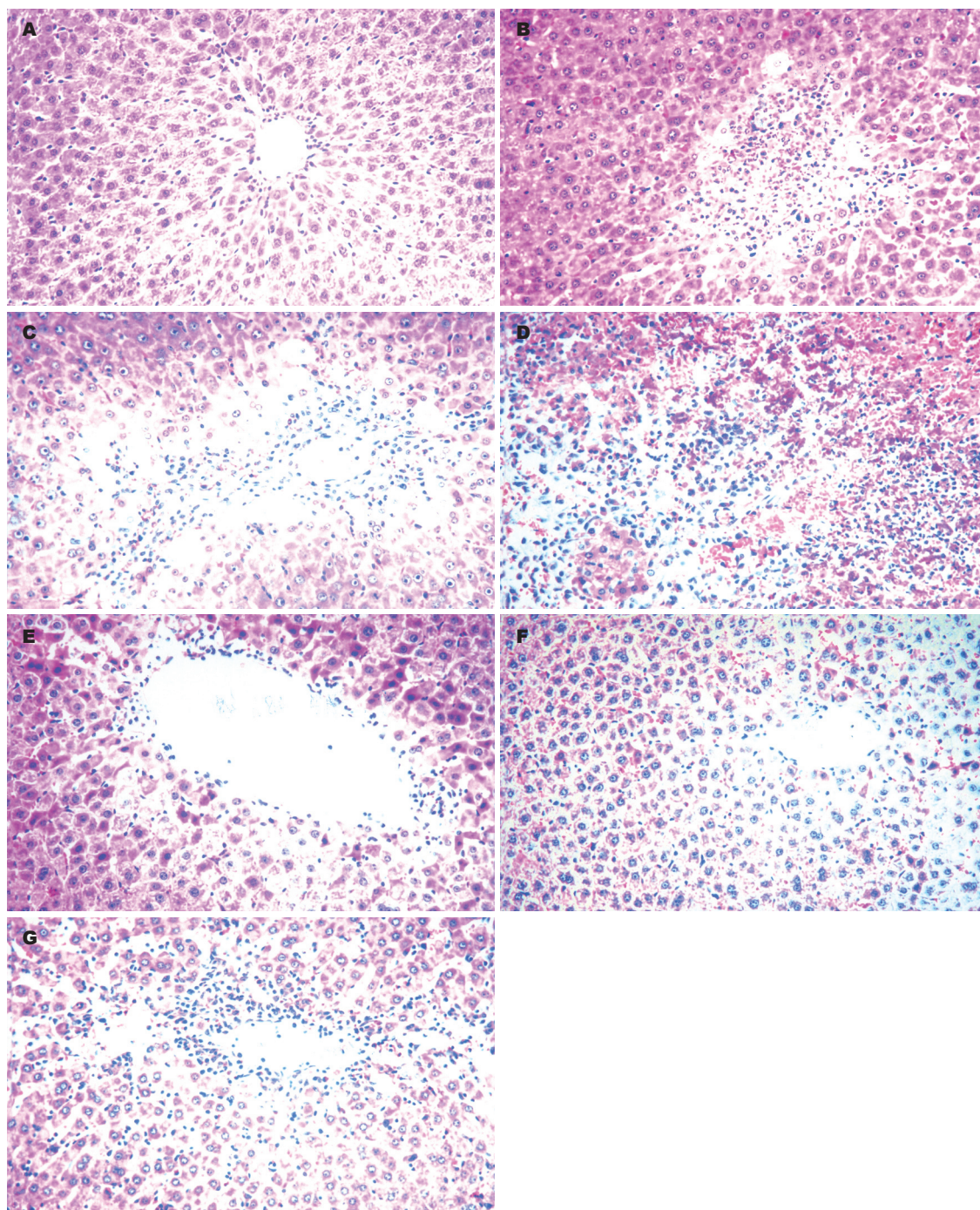


图1 肝组织病理结果. A: 正常肝脏组织($\times 200$); B: TAA 6 h组; C: TAA 24 h组; D: TAA 48 h组; E: PDTC 6 h组; F: PDTC 24 h组; G: PDTC 48 h组.

■应用要点

本文通过动态观测NF- κ B及其下游因子TNF- α 、Bcl-2表达变化,探讨其在急性肝损伤中作用及机制,为今后临床肝衰竭的治疗提供一定的理论基础.

表达外,也参与了细胞凋亡的调控.主要是通过调控凋亡相关的重要基因表达.其对细胞凋亡的调控具有2种截然不同的作用:抗凋亡或促凋亡. TNF- α 、Bcl-2为NF- κ B的下游基因,在两者的启动子上存在着NF- κ B的结合位点^[2-3]. PDTC是一种抗氧化剂,对NF- κ B的活化有明显的抑制作用.本实验通过PDTC抑制NF- κ B活性,动态研究下游基因TNF- α 及Bcl-2的变化来探讨NF- κ B的作用及机制.

TAA所致的急性损伤同时伴有内毒素血症形成^[4].血浆内毒素水平升高,刺激细胞内的NF- κ B,使之活化. NF- κ B激活后可促进多种炎症介质如细胞因子、黏附分子、趋化因子等基因的转录,在炎症反应中起重要作用^[5]. NF- κ B活化在炎症反应时复杂的细胞因子网络中可能是中心环节,生成大量炎症介质^[6],从而产生炎症级联放大作用.在这个过程中, TNF- α 是最关键的促炎介质,在内毒素性急性肝损伤和其他炎性细

■同行评价

本研究设计合理,数据可信,具有一定的创新性和科学意义。

胞因子的产生中起重要作用^[7]。同时, TNF- α 也发挥着促凋亡效应, 主要由TNF-R1介导。TNF-R1的激活导致了多种凋亡途径的激活, 包括促凋亡的Bcl-2家族蛋白、活性氧、c-Jun NH2-末端激酶、组织蛋白酶B、酸性鞘磷脂酶及中性鞘磷脂酶。这些途径密切相关并主要作用于线粒体, 线粒体释放致凋亡因子及其他物质, 导致细胞凋亡^[8]。NF- κ B通过调控TNF- α 发挥着促炎及促凋亡作用。

同时, 活化的NF- κ B激活其下游基因Bcl-2, Bcl-2过度表达后可与NF- κ B在细胞质内形成Bcl-2-NF- κ B复合物。一方面, 该复合物限制NF- κ Bp65-P50进入细胞核, 另一方面他可与NF- κ Bp65-P50在细胞核内竞争结合位点。Bcl-2蛋白是最重要的抗凋亡物质, 其抗凋亡机制是: (1)抑制凋亡蛋白酶Caspase的激活, 阻止凋亡事件的发生; (2)直接的抗氧化作用; (3)抑制线粒体释放促凋亡的蛋白质, 如细胞色素C; (4)抑制促凋亡蛋白Bax、Bak的细胞毒作用^[9]。NF- κ B通过调控Bcl-2发挥抗凋亡作用。

分析本试验结果: (1)TAA造模组各时间点血浆内毒素含量明显升高, 随着时间的延长, TAA组内毒素的含量也随之升高。说明急性肝损伤出现内毒素血症, 且随着造模时间的延长而逐渐加重。 (2)TAA造模组各时间点均可见NF- κ B明显活化, 于造模后6 h升高即达到峰值, 至24-48 h NF- κ B活性仍保持在较高水平。血浆TNF- α 于造模后6 h开始显著升高, 24 h达到最高峰, 高峰时间滞后于NF- κ B。分析急性肝损伤伴发内毒素血症, 血浆内毒素升高, 刺激细胞内的转录因子NF- κ B, 使之活化。活化后的NF- κ B可增强TNF- α 、IL-6等炎症因子的转录, 促进TNF- α 、IL-6等细胞因子生成和释放增多, 进而持续激活NF- κ B, 保持NF- κ B在较高活化水平。 (3)TAA造模组各时间点Bcl-2表达显著升高。随着时间的延长, Bcl-2表达也随之升高。分析活化后的NF- κ B一直维持于较高活化水平, 其促进了Bcl-2表达。 (4)TAA所致急性肝损伤早期, NF- κ B及下游基因TNF- α 、Bcl-2表达即明显增加, 提示肝脏受到损伤信号刺激时, NF- κ B活化并启动下游促凋亡和抗凋亡基因的表达, 同时也启动了损伤和修复程序。随着时间的延长, 肝细胞凋

亡指数增加, 提示在急性肝损伤过程中, 诱导凋亡机制占优势。 (5)造模组肝脏病理变化提示NF- κ B加重肝脏损伤。 (6)用PDTC抑制NF- κ B的活性后, TNF- α 水平明显下降, Bcl-2表达降低, 肝细胞凋亡指数降低, 肝脏病理改变减轻。

总之, NF- κ B加重肝脏损伤的机制可能为: 细胞中的NF- κ B在未受到适当刺激时与I κ B抑制蛋白结合在一起, 处于未活化状态。内毒素刺激细胞内转录因子NF- κ B活化, 激活枯否氏细胞和肝内单核细胞释放TNF- α 。NF- κ B表达增强, 激活下游基因Bcl-2, 通过调控Bcl-2发挥其抗凋亡作用。TNF- α 作为炎症细胞因子, 不仅可激活细胞因子级联反应, 而且可促进氧自由基、NO、细胞色素C等物质生成, 诱导肝细胞凋亡, 其促凋亡作用相对抑制Bcl-2的抗凋亡作用, 最终诱导肝细胞大量凋亡。故NF- κ B通过调控其下游基因发挥着促凋亡作用, 同时促进炎症因子的大量释放, 发挥促炎作用, 使肝脏的损伤越来越严重, 终致肝功能衰竭。

4 参考文献

- 1 Elsharkawy AM, Mann DA. Nuclear factor-kappaB and the hepatic inflammation-fibrosis-cancer axis. *Hepatology* 2007; 46: 590-597
- 2 杨文军, 张启瑜, 余正平. 核因子- κ B在肝细胞增殖与凋亡中的研究进展. *肝胆胰外科杂志* 2005; 17: 252-254
- 3 Chen C, Edelstein LC, Gélinas C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol* 2000; 20: 2687-2695
- 4 王春妍, 杨世忠, 江海艳. 急性肝损伤大鼠肠源性内毒素血症形成机理及其作用的实验研究. *临床肝胆病杂志* 2007; 23: 109-111
- 5 Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5: 749-759
- 6 Christman JW, Lancaster LH, Blackwell TS. Nuclear factor kappa B: a pivotal role in the systemic inflammatory response syndrome and new target for therapy. *Intensive Care Med* 1998; 24: 1131-1138
- 7 Nowak M, Gaines GC, Rosenberg J, Minter R, Bahjat FR, Rectenwald J, MacKay SL, Edwards CK 3rd, Moldawer LL. LPS-induced liver injury in D-galactosamine-sensitized mice requires secreted TNF-alpha and the TNF-p55 receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2000; 278: R1202-R1209
- 8 李晶媛, 李树臣, 杨维良. TNF- α 诱导肝细胞凋亡机制的回顾与展望. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 606-611
- 9 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-1326

编辑 李军亮 电编 何基才