

pifithrin- α 抑制大鼠肝缺血再灌注早期PUMA蛋白的表达**

彭松林, 邢飞, 王凯, 赵阳, 戴朝六

pifithrin-alpha reduces the expression of PUMA protein in the early stage of liver ischemia-reperfusion in rats

Peng Song-lin, Xing Fei, Wang Kai, Zhao Yang, Dai Chao-liu

Abstract

BACKGROUND: pifithrin- α is a reversible inhibitor of p53, the effect of pifithrin- α inhibited p53 pathway on hepatic ischemia-reperfusion injury is unclear.

OBJECTIVE: To explore the effect of nuclear transcription factor p53 inhibitor on the expression of PUMA protein after liver ischemia-reperfusion in rats.

METHODS: Ninety-six male Wistar rats were divided into four groups randomly: control group, ischemia-reperfusion group, ischemia-reperfusion+solvent dimethyl sulfoxide (DMSO) group (DMSO group) and ischemia-reperfusion+pifithrin- α group (pifithrin- α group). The 70% liver ischemia model was established. The rats in PFT group were injected with pifithrin- α after 60 minutes, the DMSO group was injected with dimethyl sulfoxide solution and the control group and ischemia-reperfusion group were injected with normal saline in the same dose.

RESULTS AND CONCLUSION: At 1, 3 and 6 hours after ischemia-reperfusion in rat liver, the expression of PUMA protein in liver tissue was obviously, the expression of PUMA protein in pifithrin- α group was inhibited significantly. However, at 24 hours after ischemia-reperfusion, the expression of PUMA protein in pifithrin- α group was higher than that in the other three groups. pifithrin- α can protect liver from ischemia-reperfusion injury through suppressing p53 in the order to decrease the expression of PUMA protein, but pifithrin- α can reduce the expression of PUMA protein only in the early stage after ischemia-reperfusion.

Peng SL, Xing F, Wang K, Zhao Y, Dai CL. pifithrin-alpha reduces the expression of PUMA protein in the early stage of liver ischemia-reperfusion in rats. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(5): 875-878.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: pifithrin- α 是一种可逆性 p53 抑制剂, 应用 pifithrin- α 抑制 p53 通路对肝脏缺血再灌注损伤的影响尚不清楚。

目的: 探讨核转录因子 p53 抑制剂对大鼠肝缺血再灌注后 PUMA 蛋白表达的影响。

方法: 96 只雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组, 缺血再灌注组, 缺血再灌注+二甲亚砜溶媒对照组(二甲亚砜组), 缺血再灌注+p53 抑制剂 pifithrin 组(PFT 组)。建立 70% 肝缺血模型, PFT 组于 60 min 的肝血流阻断结束时立即给予 pifithrin- α , 二甲亚砜组给予等量二甲亚砜溶液, 对照组和缺血再灌注组给予等量生理盐水。

结果与结论: 大鼠肝缺血再灌注后 1, 3, 6 h 肝组织 PUMA 蛋白表达明显, PFT 组可以明显抑制 PUMA 蛋白的表达, 但缺血再灌注 24 h PFT 组 PUMA 蛋白的表达高于其他 3 组。结果可见 pifithrin- α 对肝脏缺血再灌注损伤有一定保护作用, 其通过抑制 p53 从而诱导 PUMA 蛋白表达下调主要是在缺血再灌注早期。

关键词: 缺血再灌注损伤; 肝脏; p53; PUMA; 大鼠

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.05.028

彭松林, 邢飞, 王凯, 赵阳, 戴朝六. pifithrin- α 抑制大鼠肝缺血再灌注早期 PUMA 蛋白的表达[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 875-878. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

肝脏缺血再灌注损伤可导致肝切除后残肝的功能损伤和代偿不足, 也可导致肝移植后供肝早期损害、功能延迟甚至功能丧失; 其机制包括氧自由基损伤、钙离子超载、炎症反应及细胞凋亡等, 其中细胞凋亡是缺血再灌注损伤早期事件。PUMA 是近年发现的促凋亡蛋白 Bcl-2 家族 BH-3 亚家族成员之一^[1], P53 作用于 PUMA 启动子上游的结合位点, 进而激活 PUMA^[2-3], 引起细胞色素 C 从线粒体漏出到胞质中, 从而启动 Caspase 凋亡级联反应。一些研究表明小肠、脑、胰腺缺血再灌注后出现 p53

或 PUMA 的激活, 而抑制 p53 或 PUMA 的水平可以减轻细胞凋亡^[4-6]。本实验探讨抑制 p53 对大鼠肝缺血再灌注后 PUMA 表达的影响。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于 2009-10/2010-11 在中国医科大学附属盛京医院动物实验中心和中心实验室完成。

材料:

实验动物: 96 只雄性 Wistar 大鼠, 体质量 200~250 g, 鼠龄 6~8 周, 由中国医科大学附属盛京医院动物实验中心提供。

Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Peng Song-lin*, Master, Associate professor, Associate chief physician, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
psl514@126.com

Correspondence to: Dai Chao-liu, Doctor, Professor, Chief physician, Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China
daicl@sj-hospital.org

Supported by: Fund of the Affiliated Shengjing Hospital of China Medical University, No. M835*

Received: 2011-08-29
Accepted: 2011-12-06

中国医科大学附属盛京医院肝胆脾外科, 辽宁省沈阳市 110004

彭松林★, 男, 1973年生, 湖北省阳新县人, 汉族, 2005年中国医科大学毕业, 硕士, 副教授, 副主任医师, 主要从事肝胆外科临床和研究工作。
psl514@126.com

通讯作者: 戴朝六, 博士, 教授, 主任医师, 中国医科大学附属盛京医院肝胆外科, 辽宁省沈阳市 110004
daicl@sj-hospital.org

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 1673-8225 (2012)05-00875-04

收稿日期: 2011-08-29
修回日期: 2011-12-06
(20110829026/M·C)

主要试剂:

主要试剂	来源
Pifithrin(批号 P4236)	Invitrogen 公司
细胞凋亡检测试剂盒 (编号 ZK-8005)、二抗(山羊抗兔抗体, 稀释比例是 1 : 3 000)	北京中杉金桥公司
一抗(兔来源抗体): bcl-2 binding components 3, BBC3, 编号 BA1802, 稀释比例 1 : 500	武汉博士德公司

方法:

动物分组与给药: 96只雄性Wistar大鼠, 随机分为对照组(SO组, $n=24$), 缺血再灌注组(IR组, $n=24$), 缺血再灌注+二甲亚砜溶媒对照组(DMSO组, $n=24$), 缺血再灌注+p53抑制剂pifithrin组(PFT组, $n=24$)。实验前常规自由喂养1周, 给水。PFT组于60 min的肝血流阻断结束时立即给pifithrin- α (4 mg/kg, 网膜注射; 注射前用10%二甲亚砜溶液溶解)。DMSO组给予等量二甲亚砜溶液, IR组和SO组给予等量生理盐水。

动物模型制备及取材: 术前12 h禁食, 自由饮水。体积分数10%水合氯醛3 mL/kg腹腔注射麻醉后, 剔除腹部体毛, 局部消毒, 取腹正中切口开腹, 开腹后离断肝周韧带, 包括镰状韧带、肝胃韧带、冠状韧带, 消除肝脏侧支循环。无创血管夹夹闭门静脉和肝动脉左中分支, 建立70%肝缺血模型, 缺血60 min后松开血管夹恢复肝脏灌注。再灌注1, 3, 6, 24 h后再次开腹, 于缺血侧取1 cm \times 1 cm肝组织放入体积分数为10%甲醛固定, 备组织学检查; 另于缺血侧取肝组织1 cm \times 1 cm两块, 缓冲液冲洗后液氮冷冻保存, 供细胞凋亡和PUMA蛋白检测。

肝组织学检查: 苏木精-伊红染色, 普通光学显微镜观察。

TUNEL法测定肝组织中细胞凋亡情况: 采用细胞凋亡检测试剂盒标记凋亡细胞, 严格按照试剂说明书进行操作, DAB 显色。阴性对照组不加末端脱氧核糖核酸转移酶。每张切片随机取5个高倍视野, 统计阳性细胞数, 并计算每张切片阳性细胞数的比率。

肝组织中PUMA蛋白表达: 称取冰冻肝组织, 小剪刀剪碎样品 (冰上操作), 按1 : 5比例加入蛋白裂解液, 超声粉碎, 4 $^{\circ}$ C裂解过夜, 4 $^{\circ}$ C 12 000 g低温离心30 min, 取上清液, 考马斯亮蓝法进行蛋白定量。取60 μ g各组蛋白表达, 以actin为内参照、western blot法按说明书操作

检测PUMA蛋白表达。用BIO-RAD凝胶电泳图像分析仪进行采图。

统计学分析: 实验结果均采用SPSS统计软件包进行统计分析。各组阳性细胞的比率采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用t 检验; $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 参加预实验和后续正式实验的大鼠共96只, 实验过程中再次麻醉过量及手术操作导致出血死亡15只, 最后进入结果分析的大鼠81只。

2.2 肝组织学检查结果 SO组肝组织无明显的充血、细胞肿胀, 而IR组、DMSO组缺血再灌注1, 3, 6, 24 h出现不同程度肝窦及微循环瘀血、肝细胞肿胀, 甚至肝细胞索消失、桥状坏死、片状坏死等。PFT组肝窦内瘀血和肝细胞坏死减轻, 见图1。

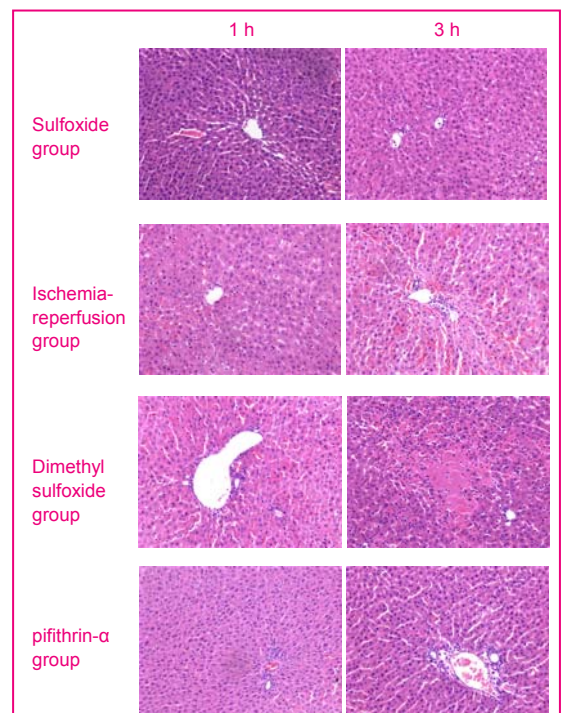
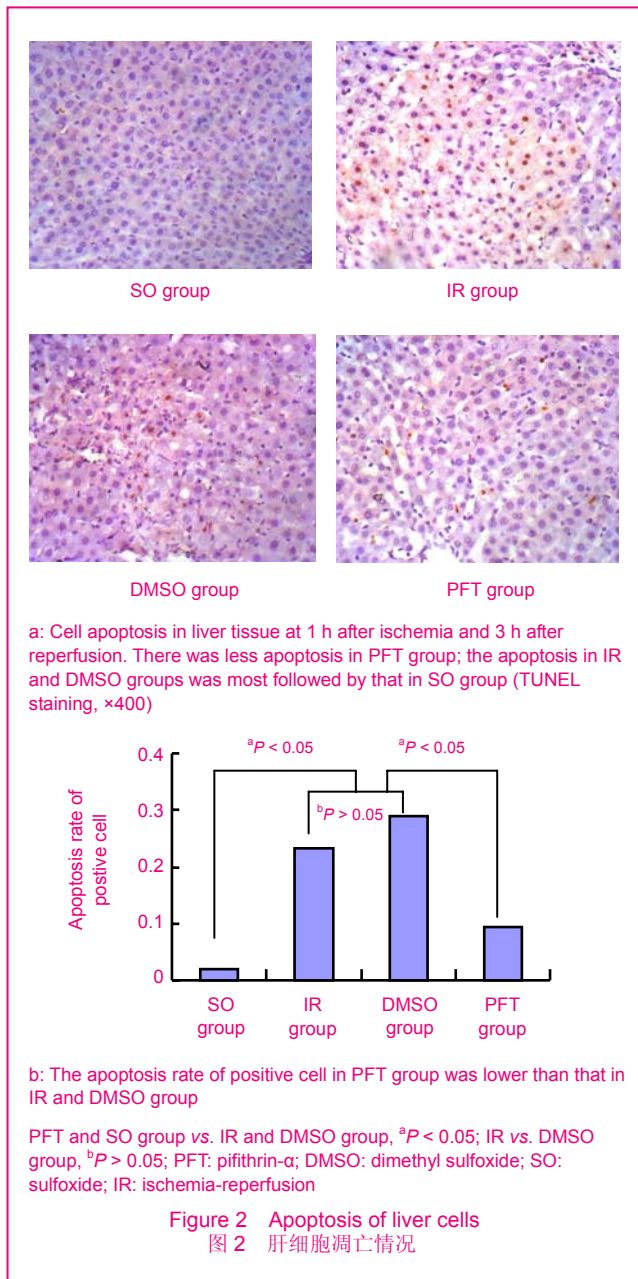


Figure 1 Liver histopathological observation showed that there were haemostasis in hepatic sinusoid and microcirculation, cellular swelling, even hepatic cell wall falling and bridging necrosis and so on at 1 and 3 h after ischemia-reperfusion, pifithrin- α could decrease the liver ischemia-reperfusion injury (Hematoxylin-eosin staining, $\times 200$)

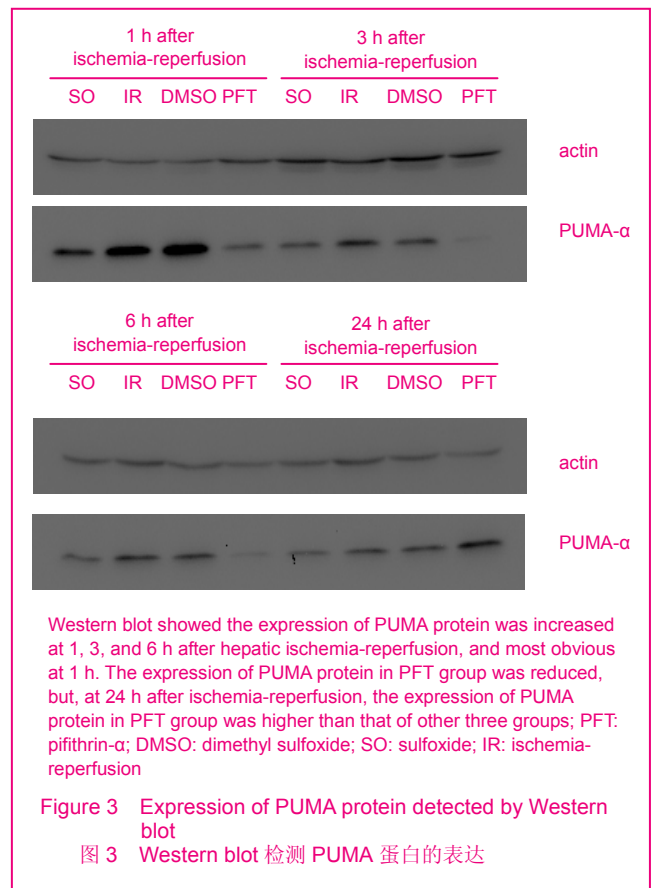
图1 肝组织病理学显示缺血再灌注1, 3 h肝窦及微循环瘀血、肝细胞肿胀, 甚至肝细胞索消失、桥状坏死等, PFT可减轻肝脏的缺血再灌注损伤(苏木精-伊红染色, $\times 200$)

2.3 肝细胞凋亡情况 TUNEL阳性细胞为细

胞核棕褐色。SO组有少量散在的细胞凋亡，IR组和DMSO组细胞凋亡最多，PFT组次之；各组阳性细胞的比率分别为(2.1±0.9)%、(23.3±11.3)%、(29.1±10.2)%、(9.3±3.3)% (PFT vs. IR, DMSO, SO vs. IR, DMSO, $P < 0.05$; IR vs. DMSO, $P > 0.05$)，见图2。



2.4 Western blot检测PUMA蛋白的表达 大鼠肝缺血再灌注后1, 3, 6 h PUMA蛋白表达上调、以再灌注1 h最明显；PFT组PUMA蛋白的表达较IR组和DMSO组低，甚至低于SO组，但缺血再灌注24 h PFT组PUMA蛋白的表达较IR组和SO组、DMSO组高，见图3。说明pifithrin通过抑制p53从而下调PUMA表达的作用主要是在缺血再灌注早期，或缺血再灌注晚期可能存在其他因素促进PUMA蛋白的表达。



3 讨论

P53蛋白是一种由p53基因编码的与细胞分裂周期相关的核磷酸蛋白，在DNA损伤修复、细胞分裂、细胞凋亡等机制中有着重要的调节作用。在各种应激状态下，p53转位到线粒体外膜，导致抗凋亡蛋白Bcl-xL和Bcl-2与线粒体渗透转位孔复合物的分解和促凋亡蛋白Bak的释放，导致细胞色素C的释放诱导细胞凋亡^[7]。在缺血再灌注损伤中p53还可以通过介导靶基因PERP和siva表达诱导细胞凋亡^[8-9]。PUMA是2001年发现的一个p53靶基因，可以被p53快速诱导并具有强大促凋亡作用。首先p53反式激活PUMA基因，诱导的PUMA与Bcl-xL结合形成PUMA/Bcl-xL复合物，释放p53，p53再激活Bax诱导细胞凋亡^[10]。PUMA最早发现于结直肠癌细胞中^[1]，近些年来多个研究表明不同脏器在缺血再灌注后，通过p53的激活，诱导PUMA的表达上调，诱导细胞经线粒体途径的凋亡^[4-6,11]；抑制p53转位到线粒体外膜或抑制其转录活性均可以减轻脏器或移植物的缺血再灌注损伤^[5,12-13]。敲除或沉默PUMA基因同样可以减轻再灌注或缺氧应激诱导的细胞凋亡^[14-15]。这些研究说明p53/PUMA通路在缺血再灌注损伤中的重要作用，可能成为缺血再灌注损伤防治的一个靶点。

文献报道pifithrin- α 是一个p53特异性抑制剂，与pifithrin- μ 抑制p53与Bcl-xL和Bcl-2在线粒体外膜的结合

不同^[13], pifithrin- α 主要抑制p53转位到细胞核后的转录调节作用^[16]。虽然一些研究证实pifithrin- α 在缺血再灌注损伤中的保护作用, 可以减轻组织的细胞凋亡, 但是也有研究认为pifithrin- α 促进p53介导的细胞凋亡^[17]。在本实验中, pifithrin- α 预处理后, 肝缺血再灌注后组织损伤减轻, 细胞凋亡减少, 提示缺血再灌注激活了经p53诱导的细胞凋亡通路, 与以往的一些文献报告基本一致^[6]。本实验的western blotting发现, 肝缺血再灌注后, PUMA蛋白表达上升, 以1, 3 h较明显, pifithrin- α 明显抑制肝缺血再灌注后1, 3, 6 h PUMA蛋白的表达, 但是在缺血再灌注24 h, PUMA蛋白的表达又出现明显上调, 这些结果证实了p53抑制剂pifithrin- α 对肝脏缺血再灌注后p53诱导PUMA蛋白表达的抑制作用, 但这种抑制作用主要表现在肝缺血再灌注早期。PUMA除了被转录因子p53调节外, 还可以通过非p53依赖方式如糖皮质激素、内质网应激等因素诱导表达^[18-19]。Wu等^[20]研究发现用氧化物歧化酶和一氧化氮合成酶抑制剂可以抑制小肠缺血再灌注后PUMA表达上调, 提示氧自由基、一氧化氮等因子对缺血再灌注后PUMA表达有一定调节作用。因此肝缺血再灌注后PUMA的表达被pifithrin- α 抑制后又上调可能与非p53依赖途径有关; 另外, pifithrin- α 是一个可逆性的抑制剂, PUMA表达的反跳现象也可能是再灌注24 h后pifithrin- α 失去对p53抑制作用的结果。

4 参考文献

- [1] Yu J, Zhang L, Hwang PM, et al. PUMA induces the rapid apoptosis of colorectal cancer cells. *Mol Cell*. 2001;7(3):673-682.
- [2] Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell*. 2001;7(3):683-694.
- [3] Han J, Flemington C, Houghton AB, et al. Expression of bbc3, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(20):11318-11323.
- [4] Wu YN, Zhang KJ, Cui HN, et al. Hainan Yixueyuan Xuebao. 2009; 15(5): 303-305.
吴娜娜, 张克君, 崔海宁, 等. PUMA在大鼠胰腺移植缺血再灌注损伤中的意义[J]. 海南医学院学报, 2009, 15(5): 303-305.
- [5] Yan JH, Yang XM, Chen CH, et al. Pifithrin-alpha reduces cerebral vasospasm by attenuating apoptosis of endothelial cells in a subarachnoid haemorrhage model of rat. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121(5):414-419.
- [6] Xiang HJ, Zhao ZQ, Li JP, et al. Disi Junyi Daxue Xuebao. 2003; 24(17):1554-1556.
项红军, 赵佐庆, 李纪鹏, 等. 大鼠小肠缺血再灌注后肝Bax, Bcl-2, p53的表达和超微结构改变[J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(17):1554-1556.
- [7] Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1787(5):414-420.
- [8] Singaravelu K, Devalaraja-Narashimha K, Lastovica B, et al. PERP, a p53 proapoptotic target, mediates apoptotic cell death in renal ischemia. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296(4):F847-858.
- [9] Singaravelu K, Padanilam BJ. p53 target Siva regulates apoptosis in ischemic kidneys. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;300(5):F1130-1141.
- [10] Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, et al. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science*. 2005;309(5741):1732-1735.
- [11] Niizuma K, Endo H, Nito C, et al. Potential role of PUMA in delayed death of hippocampal CA1 neurons after transient global cerebral ischemia. *Stroke*. 2009;40(2):618-625.
- [12] El-Gibaly AM, Scheuer C, Menger MD, et al. Improvement of rat liver graft quality by pifithrin-alpha-mediated inhibition of hepatocyte necroptosis. *Hepatology*. 2004;39(6):1553-1562.
- [13] Nijboer CH, Heijnen CJ, van der Kooij MA, et al. Targeting the p53 pathway to protect the neonatal ischemic brain. *Ann Neurol*. 2011; 70(2):255-264.
- [14] Fu JJ, Luo DY, Wan FS. Zhongguo Shengwu Huaxue yu Fenzi Shengwu Xuebao. 2011;27(7): 671-678.
付晶晶, 罗达亚, 万福生. 靶向PUMA的siRNA对缺氧/复氧诱导大鼠心肌细胞凋亡的保护作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(7): 671-678.
- [15] Toth A, Jeffers JR, Nickson P, et al. Targeted deletion of Puma attenuates cardiomyocyte death and improves cardiac function during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291(1):H52-60.
- [16] Murphy PJ, Galigniana MD, Morishima Y, et al. Pifithrin-alpha inhibits p53 signaling after interaction of the tumor suppressor protein with hsp90 and its nuclear translocation. *J Biol Chem*. 2004;279(29):30195-30201.
- [17] Kaji A, Zhang Y, Nomura M, et al. Pifithrin-alpha promotes p53-mediated apoptosis in JB6 cells. *Mol Carcinog*. 2003;37(3):138-148.
- [18] Reimertz C, Kogel D, Rami A, et al. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *Cell Biol*. 2003; 162:587-597.
- [19] Nickson P, Toth A, Erhardt P. PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Cardiovasc Res*. 2007; 73(1): 48-56.
- [20] Wu B, Qiu W, Wang P, et al. P53 independent induction of PUMA mediates ischaemia-reperfusion intestinal apoptosis in response to ischemia-reperfusion. *Gut*. 2007; 56:645-654.

来自本文课题的更多信息--

基金声明: 中国医科大学附属盛京医院院内基金 (M835)。

作者贡献: 实验设计为彭松林、邢飞, 实验实施和资料收集为邢飞、王凯, 实验评估为彭松林、赵阳。彭松林成文, 戴朝六、彭松林对文章负责。

利益冲突: 课题不涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助, 所有作者均无利益冲突。

伦理批准: 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

本文创新性: 缺血再灌注损伤的机制及预防一直是肝脏外科的研究热点, 而细胞凋亡是肝细胞死亡的重要方式之一和缺血再灌注损伤的重要机制。puma 是 2001 年在结肠癌研究中发现的一个诱导凋亡的基因, 目前关于 puma 在缺血再灌注损伤中作用研究国内外文献报道很少。本实验通过研究 PUMA 蛋白表达对肝脏缺血再灌注过程中凋亡的影响及 pifithrin 对 PUMA 诱导凋亡的抑制作用, 结果显示与脑、胰腺等缺血再灌注损伤研究并不尽相同, 肝脏缺血再灌注后 PUMA 蛋白表达上调, pifithrin 在再灌注早期抑制 puma 诱导的凋亡。