

急性肝衰竭大鼠肝星状细胞内质网 应激调节 HGF 表达实验研究

蓝远强 吴发胜 黄丽珍 梁敏

【摘要】 目的 研究内质网应激(ERS)调节急性肝衰竭(ALF)大鼠肝星状细胞肝细胞生长因子(HGF)表达的作用机制。**方法** 60只清洁级SD大鼠作为实验动物,采用随机数字表法将60只大鼠分为A、B、C三组,每组20只。三组大鼠均利用D-氨基半乳糖(D-GaIN)与脂多糖(LPS)构建ALF大鼠模型。A、C两组大鼠在建模术后1h给予0.6 mL/kg衣霉素干预,C组大鼠在完成上述操作后再腹腔注射4-苯基丁酸钠(4-PBA)500 mg/kg。B组大鼠为阴性对照组,未行特殊干预。在ALF建模术后0 h(T_1)、2 h(T_2)、8 h(T_3)及12 h(T_4)时,每组分别处死5只大鼠,留取血清和肝组织标本,检测大鼠血清HGF水平,采用荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)检测三组大鼠肝组织HGF mRNA的相对表达量。**结果** A组 T_2 、 T_3 及 T_4 时血清HGF分别为(63.9±7.0)ng/mL、(54.8±9.5)ng/mL及(42.0±6.7)ng/mL,显著低于B组[(82.3±10.6)ng/mL、(78.6±8.3)ng/mL及(76.2±9.0)ng/mL, $P<0.05$]和C组[(74.7±8.3)ng/mL、(70.4±10.2)ng/mL及(67.8±7.7)ng/mL, $P<0.05$]。B组和C组 T_2 、 T_3 及 T_4 时血清HGF水平差异有统计学意义($P<0.05$)。A组 T_2 、 T_3 及 T_4 时肝组织HGF mRNA相对表达量为2.9±0.5、2.5±0.8及1.7±0.4,显著低于B组(4.6±0.7、4.7±0.9及4.4±0.7, $P<0.05$)和C组(3.8±0.6、3.5±0.7及3.1±0.8, $P<0.05$)。B组和C组 T_2 、 T_3 及 T_4 时肝组织HGF mRNA相对表达量差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** ERS对ALF大鼠肝星状细胞HGF表达具有调节作用,进而参与ALF病理进程。

【关键词】 内质网应激;急性肝衰竭;肝星状细胞;HGF

The HGF expression regulated by endoplasmic reticulum stress of hepatic stellate cells in the rats with acute liver failure

LAN Yuan-qiang, WU Fa-sheng, HUANG Li-zhen, LIANG Min. Department of Internal Medicine, Wuxiang Hospital of Nanning Second People's Hospital, 530000; Department of Cancer radiotherapy, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of traditional Chinese Medicine, 530000

Corresponding author: WU Fa-sheng, Email: 840766676@qq.com

【Abstract】 Objective To study the mechanism of endoplasmic reticulum stress (ERS) regulating the expression of hepatocyte growth factor (HGF) in hepatic stellate cells of rats with acute liver failure (ALF). **Methods** 60 clean SD rats were used as experimental animals. The 60 rats were divided into A, B and C groups by random number table, with 20 rats in each group. The three groups of rats were treated with D-galactosamine (D-GaIN) and lipopolysaccharide (LPS) to build ALF model. The rats in group A and C were treated with 0.6 mL · kg⁻¹ of tunicamycin one hour after modeling operation. The rats of group C were immediately intraperitoneally injected with 4-phenyl butyric acid (4-PBA) 500 mg · kg⁻¹ after completing the above operation. The rats in group B were negative control group without special intervention. There were 5 rats in each group, which were killed at 0 hour (T_1), 2 hours (T_2), 8 hours (T_3) and 12 hours after ALF modeling (T_4), the serum and liver tissue samples were collected, the serum HGF level in rats were measured. The expression of HGF in liver tissue of three groups of rats were detected by real-time-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** The serum HGF of T_2 , T_3 and T_4 were (63.9±7.0) ng/mL, (54.8±9.5) ng/mL and (42.0±6.7) ng/mL, respectively, which were significantly lower than group B [(82.3±10.6) ng/mL, (78.6±8.3) ng/mL and (76.2±9.0), $P<0.05$] and group C [(74.7±8.3) ng/mL, (70.4±10.2) ng/mL and (67.8±7.7) ng/mL, $P<0.05$]. There were significant difference in serum HGF level between group B and group C at T_2 , T_3 and T_4 ($P<0.05$). The relative expression of HGF mRNA in T_2 ,

基金项目:广西自然科学基金项目(2013GXNSFBA019171)

作者单位:530000 广西南宁 南宁市第二人民医院五象医院内一科(蓝远强,黄丽珍,梁敏);广西中医药大学附属瑞康医院肿瘤放疗科(吴发胜)
通信作者:吴发胜,Email:840766676@qq.com

T_3 and T_4 of group A were (2.9 ± 0.5) , (2.5 ± 0.8) and (1.7 ± 0.4) , which were significantly lower than those of group B [(4.6 ± 0.7) , (4.7 ± 0.9) and (4.4 ± 0.7) , $P < 0.05$] and group C [(3.8 ± 0.6) , (3.5 ± 0.7) and (3.1 ± 0.8) , $P < 0.05$]. There were significant difference of HGF mRNA expression between group B and group C at T_2 , T_3 and T_4 ($P < 0.05$).

Conclusion The endoplasmic reticulum stress (ERS) can regulate the expression of HGF in hepatic stellate cells of ALF rat and participate in the pathological process of ALF.

【Key words】 Endoplasmic reticulum stress; Acute liver failure; Hepatic stellate cells; HGF

肝细胞内存在大量内质网,内质网应激(ERS)参与急性肝衰竭(ALF)的发生发展^[1-3]。肝细胞生长因子(HGF)对 ALF 发生后肝脏组织细胞的修复再生具有重要意义^[4]。有研究认为 ERS 可能通过影响 HGF 延缓 ALF,但尚缺乏足够证据^[5],目前临床有关 ALF 患者 ERS 与肝星状细胞 HGF 关系的报道也较为罕见。本研究通过大鼠模型基础实验,探讨 ERS 与 HGF 的关系及其相互作用的具体机制。

资料与方法

一、实验试剂

SD 大鼠鼠龄 3~4 w,体质量为 180~240 g。脂多糖(LPS,货号 Sigma L2880)和衣霉素(货号 MS0013-1MG)均由上海懋康生物科技有限公司提供。D-氨基半乳糖(D-GalN)由湖北赛博医药化学有限公司提供,4-苯基丁酸钠(4-PBA)由美国 Sigma 公司提供。

二、ALF 建模

常规喂养 SD 大鼠 1 w。完成后将 60 只大鼠随机分为 A、B、C 三组,每组 20 只。先通过腹腔注射给予 D-氨基半乳糖 400 mg/kg、脂多糖 20 μ g/kg。在注射完成 1 h 后给予 A、C 组大鼠 0.6 mL/kg 衣霉素,C 组在完成上述操作后再注射 4-PBA 500 mg/kg。在注射脂多糖后 0 h(T_1)、2 h(T_2)、8 h(T_3)和 12 h(T_4)时,各组分别处死 5 只动物,留取尾静脉血,离心取上清,备用。

三、检测方法

采用 ELISA 法检测血清 HGF,试剂盒由南京卡米洛生物工程有限公司提供;检测肝组织 HGF mRNA(武汉优博生物技术有限公司)。引物设计见表 1。

表 1 引物序列

HGF 上游引物	5'-CTCAGTGTTCAGAAGTTGAATGCAT-3'
HGF 下游引物	5'-CGGTGTGGTGTCTGCTGATC-3'

四、RNA 慢性病毒载体构建

设计并合成 eIF2 α -shRNA,另以 NC-shRNA 为阴性对照,序列分别为 5'-GTACAAGAGACCTG-GATAT-3' 和 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGT-3'。两组分别记为 eIF2 α 敲除组和阴性对照组。采用 GV248 载体,依次进行连接、转化、鉴定及共转染处理,完成后 8 h 替换为完全培养基,常规条件下继续培养 2 d,收集上清液,进行浓缩处理后,再行滴度检验。在病毒感染 3 d 后收集细胞,提取蛋白,行荧光定量聚合酶链式反应检查,收集结果。

五、统计学分析

应用 IBM SPSS Statistics 24.0 软件行统计学分析,对偏态分布的计量资料以 $[M(P25, P75)]$ 表示,采用 Mann-Whitney U 检验;对正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,采用独立 t 检验。计数资料的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组 HGF 表达

在 T_1 时,三组 HGF 表达比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);在 T_2 、 T_3 和 T_4 时,A 组血清 HGF 水平显著低于 B 组和 C 组,而 C 组显著低于 B 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。见表 2。

二、三组 HGF mRNA 相对表达量比较

在 T_1 时,三组 SD 大鼠 HGF mRNA 相对表达量差异无统计学意义($P > 0.05$);在 T_2 、 T_3 及 T_4 时,三组 HGF mRNA 相对表达量水平差异有统计学意义($P < 0.05$)。在 T_2 、 T_3 及 T_4 时,A 组 SD 大鼠 HGF mRNA 显著低于 B、C 两组,C 组显著低于 B 组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

三、eIF2 α 敲除组和阴性对照组 HGF mRNA 相对表达量比较

ERS 时,eIF2 α 敲除组为 0.4 ± 0.2 ,显著低于对照组(1.6 ± 0.3 , $t = 7.442$, $P = 0.000$)。

表 2 各组 HGF 表达(ng/mL)

组别	例数	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
A 组	5	78.3 ± 10.2	63.9 ± 7.0	54.8 ± 9.5	42.0 ± 6.7
B 组	5	80.4 ± 9.6	82.3 ± 10.6 ^①	78.6 ± 8.3 ^①	76.2 ± 9.0 ^①
C 组	5	81.1 ± 11.9	74.7 ± 8.3 ^{①②}	70.4 ± 10.2 ^{①②}	67.8 ± 7.7 ^{①②}
F 值		0.094	5.570	8.331	25.730
P 值		0.911	0.019	0.005	0.000

与 A 组比, ^①P<0.05; 与 B 组比, ^②P<0.05

表 3 HGF mRNA 相对表达量

组别	例数	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
A 组	5	4.5 ± 0.7	2.9 ± 0.5	2.5 ± 0.8	1.7 ± 0.4
B 组	5	4.9 ± 0.8	4.6 ± 0.7 ^①	4.7 ± 0.9 ^①	4.4 ± 0.7 ^①
C 组	5	5.1 ± 0.7	3.8 ± 0.6 ^{①②}	3.5 ± 0.7 ^{①②}	3.1 ± 0.8 ^{①②}
F 值		0.864	9.864	9.381	21.202
P 值		0.446	0.003	0.004	0.000

与 A 组比较, ^①P<0.05; 与 B 组比较, ^②P<0.05

讨 论

HGF 作为肝组织再生调节因子,能加快组织增殖,促进血管生成,已被临床认可^[6]。Hardesty 等^[7]认为 HGF 可刺激肝 DNA 合成。Liu 等^[8]基础实验也证实转染 HGF 基因后的肝硬化小鼠肝功能获得改善,ALF 发生率显著降低。Holman 等^[9]研究还显示外源性 HGF 补充疗法可减轻 ALF 局部炎症,抑制肝病进展。而与外源性补充 HGF 相比,通过转染增强 HGF 自分泌能力对促进肝细胞再生可能效果更好。尤其对于 ALF 患者,可能更有助于保护肝功能,降低病死率,改善预后。

既往报道证实 c-Met 受体可通过与 HGF β 链内丝氨酸蛋白酶样结构结合,进而激活蛋白酪氨酸激酶,最终将信号传至细胞核内,从而促进细胞增殖作用^[10]。内质网是具有膜蛋白合成、加工、折叠作用的膜结合细胞器。而 ERS 多发生于氧化应激、病毒感染等刺激后^[11]。阿依西布·萨吾提等^[12]报道发现 ERS 发生后对 c-Met 受体具有抑制作用。而 4-PAB 是目前临床广泛使用的 ERS 抑制剂^[13]。因而,本研究采用 ALF 大鼠模型,给予 A、C 两组衣霉素干预,诱导 ERS 发生,并给予 C 组 ERS 抑制剂 4-PAB 作为对照观察,结果显示 A、C 两组 T₂、T₃ 及 T₄ 时 HGF 低于 B 组,而 A 组血清 HGF 和 HGF mRNA 相对表达量低于 C 组,提示 ERS 抑制剂干预有助于抑制 HGF 的下降趋势。因而,ERS 对肝星状细胞 HGF 具有调控

作用,进而参与病理进程。

eIF2α 是由端结构域、螺旋结构域及 α-β 结构域组成的翻译起始因子,在蛋白激酶样内质网激酶通路发挥生物学作用中起关键作用^[14]。研究还发现 eIF2α 磷酸化过程可激活转录因子 4 和未折叠蛋白反应相关基因转录,降低内质网内未折叠蛋白堆积,进而改善细胞内环境^[15]。因此,eIF2α 也被认为是 ERS 的标记。本研究也显示三组 eIF2α 蛋白相对表达量在 T₂、T₃ 及 T₄ 各时点表达水平存在显著差异,说明 eIF2α 可能与 ERS 调控 HGF 过程有关。为此,本研究采用对照实验方法,通过重组慢病毒转染细胞,构建敲除 eIF2α mRNA 后的肝星状细胞,通过 RT-PCR 检查结果显示两组 HGF mRNA 水平差异显著,说明 ERS 可能通过影响 eIF2α 表达调控 HGF 水平,这可为今后 ALF 治疗提供新的靶向研究方向。

综上,ERS 可通过影响 HGF 表达,参与 ALF 病理进程。

参 考 文 献

[1] Buchanan BW, Mehrdash AB, Broshar CL, et al. Endoplasmic reticulum stress differentially inhibits endoplasmic reticulum and inner nuclear membrane protein quality control degradation pathways. J Biol Chem, 2019, 294:19814-19830.

[2] Torres S, Baulies A, Insausti-Urkia N, et al. Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Upregulation of STARD1 Promotes Acetaminophen-Induced Acute Liver Failure. Gastroenterology, 2019, 157:552-568.

- [3] 王慧娟,徐玲,田原,等. 内质网应激在乙型重型肝炎(肝衰竭)中的作用研究. 中华肝脏病杂志, 2019, 27: 244-249.
- [4] 薛改,韩华,陈泽纱,等. 体外诱导人脐带间充质干细胞定向分化为肝细胞的研究. 肝脏, 2016, 21: 733-737.
- [5] 张谢,宋毓飞,张学松,等. FGF1 通过抑制内质网应激和自噬途径保护对乙酰氨基酚诱导的小鼠肝损伤. 浙江医学, 2019, 41: 1840-1844.
- [6] 申东方,顾小晖,漆道金,等. 大鼠肝部分切除术后肝细胞生长因子、转化生长因子- β 1 水平变化及脾动脉结扎对大鼠肝再生的影响. 中华实验外科杂志, 2019, 36: 455-457.
- [7] Hardesty JE, Wahlang B, Falkner KC, et al. Proteomic analysis reveals novel mechanisms by which polychlorinated biphenyls compromise the liver promoting diet-induced steatohepatitis. *J Proteome Res*, 2019, 18: 1582-1594.
- [8] Liu Y, Pan X, Li S, et al. Endoplasmic reticulum stress restrains hepatocyte growth factor expression in hepatic stellate cells and rat acute liver failure model. *Chem-Biol Interact*, 2017, 277: 43-54.
- [9] Holman NS, Church RJ, Manisha N, et al. Hepatocyte-derived exosomes promote liver immune tolerance: possible implications for idiosyncratic drug-induced liver injury. *Toxicol Sci*, 2019, 170: 499-508.
- [10] Wright JW, Harding JW. The Brain hepatocyte growth factor/c-Met receptor system: A new target for the treatment of alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 2015, 45: 985-1000.
- [11] 张向颖,任锋. 内质网应激在肝衰竭发病机制中的作用. 临床肝胆病杂志, 2019, 35: 1920-1923.
- [12] 阿依西布·萨吾提,库热西·玉努斯,热孜亚·艾买提,等. 应激性高血压大鼠血管组织内质网应激与血管紧张素 II 受体 1 型的关系及其意义. 新疆医科大学学报, 2020, 43: 537-541.
- [13] 邓怡林,于合国,施敏,等. Orionin 对急性肝衰竭小鼠的保护作用及其对肝组织细胞因子水平的影响. 实用肝脏病杂志, 2017, 20: 294-297.
- [14] 陈永华,杨文明,江海林,等. Salubrinal 对铜负荷诱导的 PERK/eIF2 α 内质网应激信号通路介导肝细胞凋亡的干预作用. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34: 90-96.
- [15] Rozpedek W, Pytel D, Mucha B, et al. The Role of the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP Signaling Pathway in Tumor Progression During Endoplasmic Reticulum Stress. *Curr Mol Med*, 2016, 16: 533-544.

(收稿日期:2020-12-14)

(本文编辑:翟玉清)

(上接第 533 页)

- [2] 陈文军,王俊娟,祁建妮,等. 慢性乙型肝炎病毒感染患者发生肝细胞肝癌风险预测的研究进展. 国际肿瘤学杂志, 2019, 46: 558-561.
- [3] 焦扬. 乙肝病病毒阳性与阴性原发性肝癌患者的临床特征. 中华肝胆外科杂志, 2017, 23: 217-221.
- [4] 中华医学会肝病学会,中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015 更新版). 肝脏, 2015, 20: 915-932.
- [5] 中国抗癌协会肝癌专业委员会,中华医学会肝病学会肝癌学组,中国抗癌协会病理专业委员会,等. 原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015 年版). 中华肝胆外科杂志, 2015, 21: 145-151.
- [6] Braillon A. Laennec's cirrhosis. *Lancet*, 2019, 393: 131-132.
- [7] Zhang EL, Liang BY, Chen XP, et al. Severity of liver cirrhosis: a key role in the selection of surgical modality for Child-Pugh A hepatocellular carcinoma. *World J Surg Oncol*, 2015, 13: 1-7.
- [8] 黎莉,杨卫文,魏涛,等. 乙型肝炎肝硬化并发原发性肝癌的危险因素 Logistic 分析. 中国老年学杂志, 2016, 36: 1653-1654.
- [9] Nilsson E, Anderson H, Sargenti K, et al. Risk and outcome of hepatocellular carcinoma in liver cirrhosis in Southern Sweden: a population-based study. *Scand J Gastroenterol*, 2019, 54: 1027-1032.
- [10] 朱海涛,孙诚宜. 肝硬化对乙肝相关性肝癌根治术预后的影响. 中国现代医学杂志, 2018, 28: 57-60.
- [11] 古川,宋美怡,孙文静,等. 2016 年肝硬化领域基础与临床研究进展. 中华肝脏病杂志, 2017, 25: 5-8.
- [12] Kozaka K, Kobayashi S, Yoneda N, et al. Doughnut-like hyperintense nodules on hepatobiliary phase without arterial-phase hyperenhancement in cirrhotic liver: imaging and clinicopathological features. *Eur Radiol*, 2019, 29: 6489-6498.
- [13] 韩志钧,马金彤,韩柠泽. 门静脉充血指数和血流量与肝储备功能的相关性分析. 中国超声医学杂志, 2019, 35: 511-513.
- [14] Groarke JD. Cardiovascular vulnerability of childhood cancer survivors: time to progress from risk observation to risk modification. *Eur Heart J*, 2018, 39: 1563-1566.
- [15] 张振,王孟龙,张海涛,等. 肝硬化门静脉高压患者脾切除断流术后早期门静脉血栓形成的因素及预防性活血、抗凝、祛聚治疗的效果. 肝脏, 2019, 24: 24-27, 89.
- [16] 任莎莎,简文,刘自明. 系统免疫炎症指数和骨骼肌质量指数与肝硬化合并肝癌患者术后预后的关系. 现代肿瘤医学, 2020, 29: 85-89.

(收稿日期:2021-01-01)

(本文编辑:翟玉清)