

· 论 著 ·

Fas/FasL 信号传导通路对 NAFLD 大鼠肝细胞凋亡的影响*

康 敏¹, 钟德君^{1△}, 李 鹏², 李 郁³

(1. 泸州医学院附属医院消化内科, 四川泸州 646000; 2. 四川省绵阳市中心医院消化内科 621000;

3. 四川省绵阳市中心医院心内科 621000)

摘要:目的 通过研究肝细胞凋亡及死亡受体信号转导通路在大鼠非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)形成中的作用,探讨 NAFLD 的发病机制。方法 将 30 只雄性 SD 大鼠随机分为对照组和高脂饲料(4、8、12 周)组;HE 染色观察肝组织光镜下的病理改变;电镜观察肝细胞超微结构变化;流式细胞仪检测肝细胞凋亡百分数;免疫组化法检测 Fas、FasL 在肝组织中的蛋白表达;实时荧光定量 PCR 法检测半胱天冬酶-8(Caspase-8)mRNA 表达。结果 HE 染色结果显示,对照组大鼠肝脏无异常发现,高脂组大鼠肝脏 4 周出现脂肪变,8 周出现轻度脂肪肝,12 周出现中、重度脂肪肝;电镜下观察高脂组大鼠肝细胞线粒体肿胀,嵴变短、减少甚至消失,粗面内质网减少,核型欠规则;流式细胞仪检测显示,与对照组比较,高脂组大鼠肝细胞凋亡百分数增加,随造模时间延长凋亡率增加更明显;免疫组化染色显示随着肝脏脂肪变加重,Fas、FasL 蛋白染色加深,阳性细胞数增加;实时荧光定量 PCR 法显示 Caspase-8 mRNA 表达量在高脂组中显著高于对照组,且随肝脏脂肪变及炎症加重呈进行性上升。结论 NAFLD 大鼠模型中,肝细胞凋亡促进 NAFLD 大鼠病情进展;肝细胞凋亡以及 Fas、FasL、Caspase-8 mRNA 相关调控蛋白的活化是引起 NAFLD 脂肪变性、炎症及纤维化的重要因素。

关键词:脂肪肝;细胞凋亡;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶;Fas;Fas 配体蛋白质;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.07.004

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)07-0633-03

Effects of death receptor-mediated pathways on hepatocyte apoptosis in nonalcoholic fatty liver disease rats*

Kang Min¹, Zhou Dejun^{1△}, Li Peng², Li Yu³

(1. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital, Luzhou Medical College, Luzhou,

Sichuan 646000, China; 2. Department of Gastroenterology; 3. Department of Cardiology,

Mianyang Municipal Central Hospital, Mianyang, Sichuan 621000, China)

Abstract: Objective To investigate the roles of death receptor-mediated pathways in hepatocyte apoptosis on nonalcoholic fatty liver disease(NAFLD) rats and to probe into the pathogenesis of NAFLD. **Methods** Hepatocyte apoptosis index(AI) was detected by flow cytometry(FCM). The expressions of Fas and FasL were detected by immunohistochemistry method. Meanwhile, the expressions of Caspase-8 was detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction. **Results** HE staining revealed that fatty degeneration at 4 week, mild fatty liver at 8 w, moderate to severe fatty liver at 12 week in high-fat diet group, and electron microscopy showed ultrastructural changes in hepatocytes high-fat diet group (12 week), including swelling of hepatic mitochondria, shortened or even disappearance of crests, decrease of rough surfaced endoplasmic reticulum, and nuclear shape was irregular. AI of nonalcoholic steatosis rat model of 4-12 weeks was significantly higher than that of normal. The percentage of hepatocyte apoptosis increased significantly as the time going. Immunohistochemical staining showed that Fas and FasL expression in high-fat diet group, the degree of fatty changes and inflammatory staining depended and expanded, the number of positive cells increased, showed a diffuse positive. Real-time quantitative PCR assay showed that the relative expression quantity of Caspase-8 mRNA in model group was significant higher than the control group at the same time. There was also a significant difference in model group of different time point. **Conclusion** In rat model of NAFLD, the degree of hepatocyte apoptosis is closely related to the degree of liver injury. Pathological hepatocyte apoptosis promotes the progress of NAFLD. The severity of hepatocyte apoptosis is consistent with the Fas, FasL protein expression, the increase degree of Caspase-8 mRNA expression in the development of NAFLD.

Key words: fatty liver; apoptosis; caspase; Fas; Fas ligand protein; rats

随着生活水平的提高、饮食结构的改变,非酒精性脂肪性肝病(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率呈上升趋势。近年研究发现,肝细胞凋亡在 NAFLD 的发生、进展中扮演了至关重要的角色^[1-2];肝细胞凋亡途径和相关调控机制包括死亡受体信号传导通路等^[3]。本研究通过观察 NAFLD 大鼠形成中肝细胞凋亡百分率、形态和功能的变化,以及 Fas、FasL、半胱天冬酶-8(Caspase-8)激活在肝细胞凋亡中的作用,从而探讨肝细胞凋亡与 NAFLD 的关系,以及死亡

受体信号传导通路在肝细胞凋亡中的意义。

1 材料与方法

1.1 材料 Annexin-V/PI 购自 Beckman 公司, Fas、FasL 抗体购自 Santa Cruz 公司,链霉菌抗生素蛋白-抗氧化酶(SP)免疫组化染色试剂盒购自博士德公司,荧光定量 PCR 试剂盒购自 MBI 公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立和分组 将健康成年雄性 SD 大鼠 30

* 基金项目:泸州医学院基金资助项目(07087)。△ 通讯作者, Tel:13320788745; E-mail:kyj_75@163.com。

只(体质量 180~220 g)随机分为两组,对照组 15 只,高脂饮食组 15 只(予以基础饲料 88%,猪油 10%,胆固醇 2%)。实验动物自由饮水进食,将对照组和高脂饮食组大鼠各 5 只分别于 4、8、12 周后处死,迅速取出肝组织,制备单细胞悬液,部分固定备电镜、光镜观察或于 -70°C 低温冰箱保存。

1.2.2 肝组织病理学变化的光镜观察 将取出的新鲜肝组织用 4% 多聚甲醛固定、石蜡包埋、HE 染色,光镜下观察肝脏形态学变化。

1.2.3 肝组织病理学变化的电镜观察 取 $1\text{ mm}\times 1\text{ mm}\times 1\text{ mm}$ 的肝组织块用戊二醛、锇酸固定,丙酮脱水,包埋液加环氧丙烷包埋,固化,切片,枸橼酸铅双染色后放入电镜内观察照相。

1.2.4 流式细胞仪(FCM)检测肝细胞凋亡 取实验大鼠新鲜肝脏组织约 1 g,于预冷的 PBS 中立即剪碎,多次 PBS 悬浮、洗涤,400 目滤网过滤,得到悬浮肝细胞,加入红细胞裂解液冰上裂解 10 min, PBS 重悬肝细胞;每 100 μL 细胞悬液加入 4.5 μL Annexin-FITC 冰上放置避光 10 min,再加入 2.5 μL PI 避光反应 5 min,用 FCM 检测。

1.2.5 免疫组化检测 Fas、FasL 蛋白的表达 按照 SP 免疫组化染色试剂盒及 DAB 显色试剂盒说明书进行免疫组化检测。Fas、FasL 为跨膜蛋白,细胞膜或细胞质呈明显棕色反应者为阳性细胞。用 Image-pro plus 软件进行扫描,作积分光密度(IOD)值半定量分析。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 检测 Caspase-8 mRNA 表达 按 TRIZOL 试剂说明书提取肝组织中的总 RNA,测定 RNA 的浓度及纯度。取总 RNA 2 μL ,按一步法 PCR 试剂盒说明书进行逆转录及 PCR 扩增。Caspase-8 基因上游引物序列为:5'-GAT GAG GCA GAC TTT CTG CT-3',下游引物序列为:5'-CAT AGT TCA CGC CAG TCA GGA T-3'。内参 GAPDH 上游引物序列为:5'-TGA CAT CAA GAA GGT GGT GA-3',下游引物序列为:5'-TCA TAC CAG GAA ATG AGC TT-3'。Caspase-8 阳性结果为 163 bp,反应条件为:30 μL 体系 37°C 逆转录 1 h, 94°C 预变性 2 min, 94°C 变性 20 s, 55.4°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s,共 35 个循环;最后 72°C 充分延伸 5 min。

1.3 统计学处理 应用 SPSS13.0 统计软件对计量数据进行方差分析,所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组大鼠肝脏光镜观察 对照组大鼠肝组织切片 4、8、12 周 HE 染色形态正常。高脂组 4 周时,大鼠肝组织显示广泛肝细胞疏松、水肿、气球样变性,散在肝细胞脂肪变,内见小泡形脂肪滴,但肝小叶形态完整;8 周时,大鼠肝细胞脂肪变明显,多为大泡性脂肪变,肝小叶结构紊乱;12 周时,大鼠肝细胞弥漫性脂肪变,小叶内炎症细胞浸润,呈点状和小灶性分布,部分融合成片,汇管区炎症较重,符合中、重度脂肪肝标准,见插图 1。

2.2 各组大鼠肝脏透射电镜观察 高脂组大鼠肝细胞胞质疏松、水肿,大量类圆形脂滴沉积,糖原少见,核型欠规则,溶酶体增多;线粒体膜模糊、结构不清晰,嵴变短、变少,粗面内质网减少,且随着造模时间延长,肝细胞超微结构改变越明显。对照组肝细胞无明显改变,见图 2。

2.3 高脂饮食对大鼠肝细胞凋亡百分数的影响 高脂组 4、8、12 周大鼠与对照组相同时相点比较肝细胞凋亡百分数明显增加($P<0.05$);高脂组 8 周与 4 周、高脂组 12 周与 8 周相比

肝细胞凋亡百分数显著增加($P<0.05$);而对照组各时间点之间差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

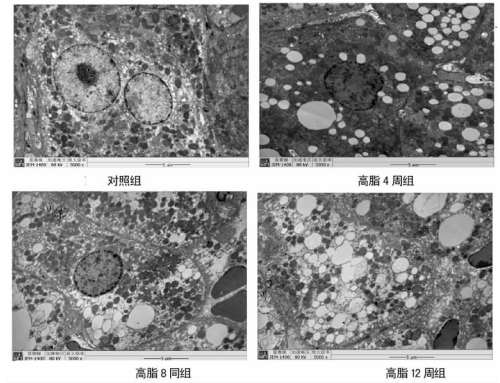


图 2 各组大鼠肝脏透射电镜($\times 5000$)

表 1 各组大鼠肝细胞凋亡百分数($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	4 周	8 周	12 周
对照组	5	4.2 \pm 0.2	4.1 \pm 0.3	4.4 \pm 0.4
高脂组	5	9.2 \pm 0.4*	11.6 \pm 1.1*#	15.4 \pm 1.8*★

*: $P<0.05$,与对照组比较;#: $P<0.05$,与高脂组 4 周比较;★: $P<0.05$,与高脂组 8 周比较。

2.4 两组大鼠肝组织 Fas、FasL 蛋白表达 对照组各时相点之间比较差异无统计学意义,各高脂组与对照组相同时相点比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。随造模时间延长,高脂组肝组织 Fas 及 FasL 含量逐步升高,高脂组 8 周与 4 周比较阳性细胞数增多、染色加深;高脂组 12 周时,脂肪变肝细胞弥漫阳性染色,见插图 2、3、4。

表 2 Fas、FasL 蛋白在各组大鼠肝组织中的表达($\bar{x}\pm s$, IOD 值)

组别	<i>n</i>	Fas	FasL
对照组 4 周	5	4.68 \pm 1.24	6.15 \pm 0.48
高脂组 4 周	5	11.90 \pm 5.49*	17.08 \pm 1.34*
对照组 8 周	5	6.70 \pm 1.82	8.25 \pm 1.59
高脂组 8 周	5	14.42 \pm 6.31*#	30.13 \pm 7.31*#
对照组 12 周	5	4.51 \pm 2.26	9.43 \pm 1.75
高脂组 12 周	5	18.43 \pm 5.47*★	39.57 \pm 6.43*★

*: $P<0.05$,与对照组比较;#: $P<0.05$,与高脂组 4 周比较;★: $P<0.05$,与高脂组 8 周比较。

表 3 Caspase-8 mRNA ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 在各组大鼠肝组织中的表达($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	4 周	8 周	12 周
对照组	5	1.10 \pm 0.36	1.87 \pm 0.56	1.92 \pm 0.65
高脂组	5	5.46 \pm 0.93*	8.15 \pm 1.48*#	17.43 \pm 1.97*★

*: $P<0.05$,与对照组比较;#: $P<0.05$,与高脂组 4 周比较;★: $P<0.05$,与高脂组 8 周比较。

2.5 各组大鼠肝组织 Caspase-8 mRNA 相对表达量 高脂组各时相点 Caspase-8 mRNA 相对表达量均显著高于对照组($P<0.05$),高脂组中 Caspase-8 mRNA 相对表达量随脂肪肝程度的加重呈进行性上升,其中以 8、12 周最为明显,高脂组各

时相点之间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

3 讨 论

NAFLD 是指除外酒精和其他明确的损肝因素所致的以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征。近年 NAFLD 的发病率明显上升,但其发病机制尚未明确。既往研究主要集中在脂质代谢异常、氧应激及脂质过氧化损伤、遗传因素的作用、胰岛素抵抗等方面^[4-6]。

肝细胞的凋亡是多种肝脏疾病的共同机制之一,它在 NAFLD 中的作用以往并未成为主要的研究方向。但近年来研究证实,肝细胞凋亡参与了 NAFLD 的发生^[7]。Ariel 等^[2]检测到肝细胞凋亡的多少与脂肪肝的严重程度密切相关。国内范建高等^[8]的研究也发现在 NAFLD 中,肝脏脂肪变越重、炎症反应越重,肝细胞的凋亡也越多。本实验采用流式细胞仪结合肝细胞超微结构形态改变的观察,结果显示在 NAFLD 动物模型中,随着造模时间的延长,肝细胞凋亡率呈增加趋势,进一步说明肝细胞凋亡在大鼠 NAFLD 发病机制中占有重要地位,且肝脏脂肪变和炎症越重,肝细胞凋亡率越高。

肝细胞凋亡途径和相关调控机制包括死亡受体信号传导通路、线粒体信号通路和内质网途径等^[3]。死亡受体信号传导通路中的 Fas,在细胞凋亡中具有信号传导作用^[9]。FasL 是 Fas 在体内的天然配体,可传递死亡信号给 Fas,从而诱导细胞凋亡^[10]。Caspase-8 为 Fas 与 FasL 下游的效应分子,是死亡受体(Fas,DR4,DR5)介导的细胞凋亡途径中的核心成分,即关键的启动子^[11]。Fas 与配体 FasL 结合后,Fas 相关蛋白(Fas-associated death domain protein, FADD)激活无活性的 Caspase-8 蛋白酶原,通过自我催化生成活性形式的 Caspase-8 蛋白酶,后者再作用于 Caspase-3、6、7 等,使他们发生逐级活化^[12]。有研究表明,Caspase-8 几乎能激活凋亡所有级联反应下游的 Caspase 而诱发凋亡^[13-14]。本实验结果显示,高脂组大鼠 4 周即出现肝组织 Fas、FasL 及 Caspase-8 表达上调,随造模时间延长,Fas、FasL、Caspase-8 的表达均明显增强,肝脏脂肪变、肝细胞损伤呈进行性加重;于造模 8、12 周时形成中、重度脂肪肝、肝细胞灶状坏死、炎性细胞浸润,表明肝脏病变的发生、发展与 Fas、FasL 及 Caspase-8 的表达上调有关。其可能的机制为:高脂饮食致肝细胞脂肪变,沉积的脂质产生过氧化产物,诱发氧化应激反应,产生大量的活性氧(ROS),ROS 的产生可激活 Fas/FasL 系统,进一步导致 Fas 致死区结构蛋白募集下游 Caspase 家族成员,形成蛋白酶促级联反应,导致细胞结构的破坏,引起 DNA 断裂,染色体浓缩,引起细胞凋亡。凋亡的肝细胞可使炎症细胞聚集、库普弗细胞吞噬凋亡小体而活化,释放大量细胞因子,进一步活化肝星状细胞,促进肝纤维化发生^[15]。

综上所述,本实验从肝细胞凋亡信号传导的分子途径深入研究肝细胞凋亡及相关调节因素在 NAFLD 发病机制中的作用,进一步探明 NAFLD 的发病机制,为开发研制抑制肝细胞凋亡药物,从而减轻肝脏炎症与纤维化,阻断 NAFLD 进展提供了理论依据。

参考文献:

[1] Feldstein AE, Canbay A, Angulo P, et al. Hepatocyte ap-

optosis and fas expression are prominent features of human nonalcoholic steatohepatitis [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125(2):437-443.

- [2] Ariel E, Feldstein, Ali Canbay, Maria E, et al. Gores Diet associated hepatic steatosis sensitizes to Fas mediated liver injury in mice [J]. *J Hepatol*, 2003, 39(6):978-983.
- [3] Jaeschke H, Bajt ML. Regulation of apoptotic signaling pathways in hepatocytes in vivo [J]. *Hepatology*, 2003, 37(4):942-945.
- [4] Selzner N, Selzner M, Jochum W. Ischemic preconditioning protects the steatotic mouse liver against reperfusion injury: an ATP dependent mechanism [J]. *J Hepatol*, 2003, 39(1):55-61.
- [5] Solga SF, Diehl AM. Non-alcoholic fatty liver disease: lumen-liver interactions and possible role for probiotics [J]. *J Hepatol*, 2003, 38(5):681-687.
- [6] Sanyal AJ, Campbell-Sargeht C, Mirshahi F, et al. Nonalcoholic steatohepatitis: Association of insulin resistance and mitochondrial abnormalities [J]. *Gastroenterology*, 2001, 120(5):1183-1192.
- [7] Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, et al. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Trends Mol Med*, 2008, 14(2):72-81.
- [8] 范建高, 钟岚, 王国良, 等. 肥胖、高脂血症性脂肪性肝炎细胞凋亡的实验研究 [J]. *中华消化杂志*, 2000, 120(6):421-422.
- [9] Contassot E, Gaide O, French LE. Death receptors and apoptosis [J]. *Dermatol Clin*, 2007, 25(4):487-501.
- [10] Rust C, Gores GJ. Apoptosis and liver disease [J]. *Am J Med*, 2000, 108(7):567-574.
- [11] Harper N, Hughes M, MacFarlane M, et al. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(28):25534-25541.
- [12] Cepero E, King AM, Coffey LM, et al. Caspase-9 and effector caspases have sequential and distinct effects on mitochondria [J]. *Oncogene*, 2005, 24(42):6354-6366.
- [13] Scatena R, Bottoni P, Botta G, et al. The role of mitochondria in pharmacotoxicology: a reevaluation of an old, newly emerging topic [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007(293):C12-C21.
- [14] Hacker G, Paschen SA. Therapeutic targets in the mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2007, 11(4):515-526.
- [15] Marra F, Gastaldelli A, Svegliati Baroni G, et al. Molecular basis and mechanisms of progression of non-alcoholic steatohepatitis [J]. *Trends Mol Med*, 2008, 14(2):72-81.