

内质网应激标志蛋白 Caspase-12 在四氯化碳诱导大鼠肝纤维化逆转恢复模型中的作用研究

黄艳^{1,2}, 李晓慧^{1,2}, 吴正升³, 王欢^{1,2}, 汪应红^{1,2}, 李海迪¹, 孙仕伟¹, 李俊^{1,2}

摘要 目的 探讨内质网应激(ERS)标志蛋白天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12(Caspase-12)在大鼠肝纤维化形成与逆转恢复病程中的作用。方法 建立四氯化碳(CCl₄)诱导大鼠肝纤维化模型,苏木精-伊红染色和 Masson 胶原纤维染色观察肝脏病理组织学改变;免疫组化法检测肝组织肝纤维化标志蛋白 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)以及钙激活蛋白酶(Calpain)的表达;Western blot 检测不同时期肝脏组织中 Calpain、Cleaved-Caspase-12 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达变化。结果 肝脏病理组织学检测提示肝纤维化逆转恢复模型成功。免疫组化结果显示,与正常组比较,模型组大鼠肝脏组织中 α -SMA 和 Calpain 抗原阳性细胞明显增多、着色明显加深,且多分布在肝实质肝细胞区域。逆转恢复期 α -SMA 抗原表达阳性细胞与模型组比较逐渐下降。Calpain 抗原表达阳性细胞主要分布在肝脏的小叶中央静脉、汇管区、肝窦间隙等部位。Western blot 结果显示,模型组肝脏 Calpain、Cleaved-Caspase-12 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白的表达与正常组相比显著升高。与模型组相比,逆转恢复 2、4 和 8 周组肝组织 Calpain、Cleaved-Caspase-12 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白的表达降低,但仍高于正常组。结论 ERS 标志蛋白 Caspase-12 诱导的细胞凋亡存在于大鼠肝纤维化病程中,可能与肝纤维化的发生、发展和恢复逆转密切相关。

关键词 肝纤维化;内质网应激;凋亡;Calpain;Caspase-12

中图分类号 R 575.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0140-04

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是继死亡受体活化和线粒体损伤之后第 3 条介导细胞凋亡的信号转导通路。ERS 诱导的 3 条主要凋亡通路为 CHOP/GADD153 基因的激活通路、

氨基末端蛋白激酶(c-jun NH₂-terminal protein kinase-c-jun, JNK)激活通路和内质网特有的 Caspase-12 激活通路。目前研究^[1-2]表明多种肝脏疾病的发生与 Caspase-12 介导的细胞凋亡有关。但 Caspase-12 介导的细胞凋亡是否存在于肝纤维化的进展、逆转恢复期中,其作用如何尚未有文献报道。该实验建立在四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)诱导的大鼠肝纤维化逆转恢复模型基础上,观察 ERS 标志蛋白 Caspase-12 在 CCl₄ 诱导肝纤维化、逆转恢复期中的变化及其可能作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 50 只雄性 SD 大鼠,SPF 级,180~220 g,由安徽医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂 CCl₄ 购自汕头西陇化工厂;细胞组织裂解液 RIPA 和蛋白酶抑制剂 PMSF 购自上海碧云天公司;毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)、衣霉素(tunicamycin, TN)、丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺购自美国 Sigma 公司;Cleaved-Caspase-3 抗体购自美国 Cell signaling 公司;Cleaved-Caspase-12 抗体购自美国 Biovision 公司;Calpain 和 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;辣根酶(horseradish peroxidase, HRP)标记抗兔和抗鼠免疫球蛋白(IgG)购自北京中杉金桥公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组与模型建立 大鼠随机分为正常组、模型组、逆转恢复 2 周组、逆转恢复 4 周组和逆转恢复 8 周组,每组 10 只。除正常组外,每组大鼠按 1 ml/kg 皮下注射 CCl₄ 溶液(按体积比 CCl₄:花生油=1:1),一周 2 次,共 12 周。正常组以相同方法注射等量花生油作对照。模型组、逆转恢复 2 周组、逆转恢复 4 周组、逆转恢复 8 周组分别于造模结束后第 0、2、4、8 周分批处死大鼠,取肝组织样本迅速冷冻保存。

1.3.2 病理学检查 肝组织用 10% 的甲醛溶液固定,石蜡包埋,做常规组织切片,苏木精-伊红(HE)染色和 Masson 胶原纤维染色,镜下观察并比较不同

2014-12-12 接收

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81102493、30873081);

国家教育部博士点新教师基金资助项目(编号:

20103420120001);安徽医科大学国家级大学生创新创业

训练计划项目(编号:201310366030)

作者单位:安徽医科大学¹药学院基础与临床药理教研室、²肝病研究所,合肥 230032

³安徽医科大学第一附属医院病理科,合肥 230022

作者简介:黄艳,女,博士,副教授,硕士生导师;

李俊,男,博士,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: li-

jun@ahmu.edu.cn

时期组织的病理变化。

1.3.3 免疫组化检测肝组织 α -SMA 和 Calpain 蛋白表达 大鼠肝组织用 10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片。采用 SP 法染色,切片常规脱蜡,加 50 μ l 过氧化酶阻断溶液,室温孵育 15 min; PBS 冲洗后加 0.1% 的胰蛋白酶消化 20 min,加 50 μ l 非免疫性动物血清,室温下孵育 10 min; 加 50 μ l 的一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 冲洗后加 50 μ l 生物素标记的二抗,室温下孵育 30 min; 再加 50 μ l 链霉菌抗生素蛋白-过氧化物酶溶液,室温下孵育 30 min; DBA 显色、苏木精复染、封片观察。

1.3.4 Western blot 法检测肝组织 Calpain、Cleaved-Caspase-12、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达 取经处理后的肝组织,加 500 μ l RIPA 细胞裂解液,5 μ l PMSF 于冰上裂解 30 min 后 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 30 min。取上清液,用 BCA 法进行蛋白定量。聚丙烯酰胺凝胶电泳后,电转移法将蛋白转移至 PVDF 滤膜上。用 5% 的脱脂牛奶封闭 3 h 后,与 1:500 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。再与 1:5 000 的 HRP 标记的 IgG 室温孵育 1 h, ECL 显色,Quantity One 软件测定分析结果。采用 β -actin 作为内参照,分别以相应蛋白与 β -actin 光密度比值表示该蛋白相对表达水平。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 13.0 软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析检验。

2 结果

2.1 肝组织病理变化 HE 染色及 Masson 胶原纤维染色结果显示正常组大鼠肝脏组织结构完整、清晰,肝小叶结构正常,肝细胞排列成肝索状;模型组

可见大量胶原纤维沉积于小叶中央静脉、汇管区、肝窦间隙等部位形成纤维间隔及假小叶,并伴有大量脂肪空泡。停止注射 CCl_4 经 2、4、8 周,可见大鼠肝脏组织结构中脂肪空泡逐渐减少,纤维间隔逐渐变窄,纤维沉积程度逐渐减轻,提示 CCl_4 诱导大鼠肝纤维化以及逆转恢复模型成功。见图 1。

2.2 肝纤维化不同时期肝组织中 α -SMA 和 Calpain 蛋白表达 免疫组化法检测 α -SMA 和 Calpain 蛋白在肝纤维化大鼠不同时期肝组织中的表达,阳性染色细胞质呈棕黄色颗粒。结果显示正常组大鼠肝脏组织中 α -SMA 和 Calpain 抗原阳性表达较少,模型组大鼠肝脏组织中 α -SMA 和 Calpain 抗原阳性细胞明显增多、着色明显加深,且多分布在肝实质区域。逆转恢复 2、4、8 周组中, α -SMA、Calpain 抗原表达阳性细胞与模型组比较,随着逆转恢复期时间延长,阳性表达细胞数量及程度逐渐下降,Calpain 抗原表达阳性细胞主要分布在肝脏的小叶中央静脉、汇管区、肝窦间隙等部位,与肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs) 大致位置相同。提示肝纤维化逆转恢复期表达 α -SMA 的活化的 HSCs 逐渐减少,肝细胞凋亡减少。见图 2。

2.3 Western blot 法检测不同时期肝组织中 Calpain、Cleaved-Caspase-12 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达 与正常组大鼠肝脏组织相比,模型组大鼠肝脏组织中 Calpain、Cleaved-Caspase-12 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达明显增多;而与模型组相比,肝纤维化逆转恢复 2、4、8 周组中,Calpain、Cleaved-Caspase-12 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$ $P < 0.01$) ,见图 3。

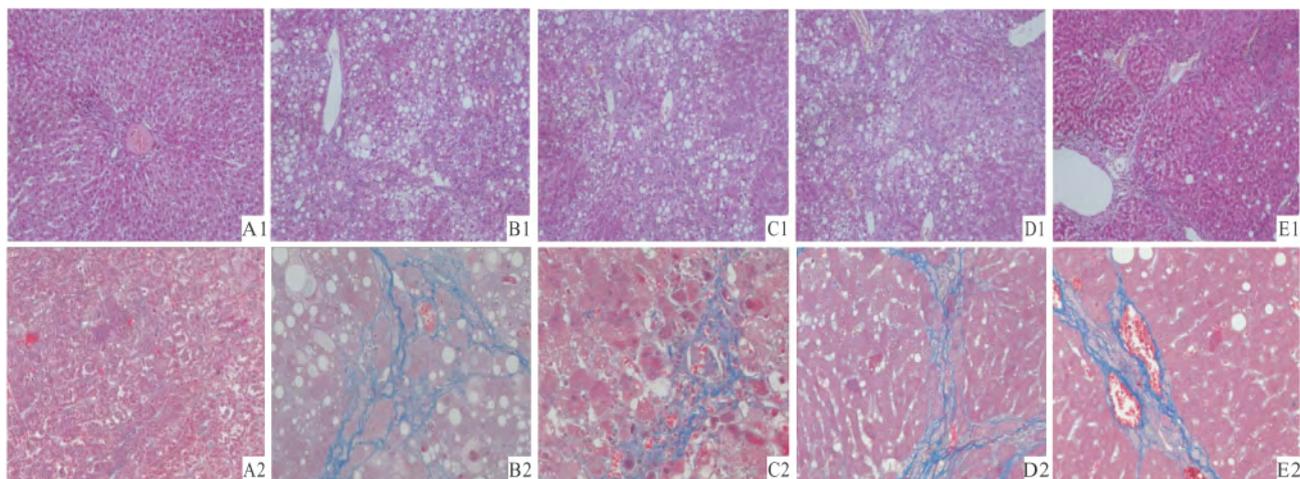


图 1 大鼠肝纤维化逆转恢复期模型

A: 正常组; B: 模型组; C: 逆转恢复 2 周组; D: 逆转恢复 4 周组; E: 逆转恢复 8 周组; 1: HE $\times 200$; 2: Masson $\times 400$

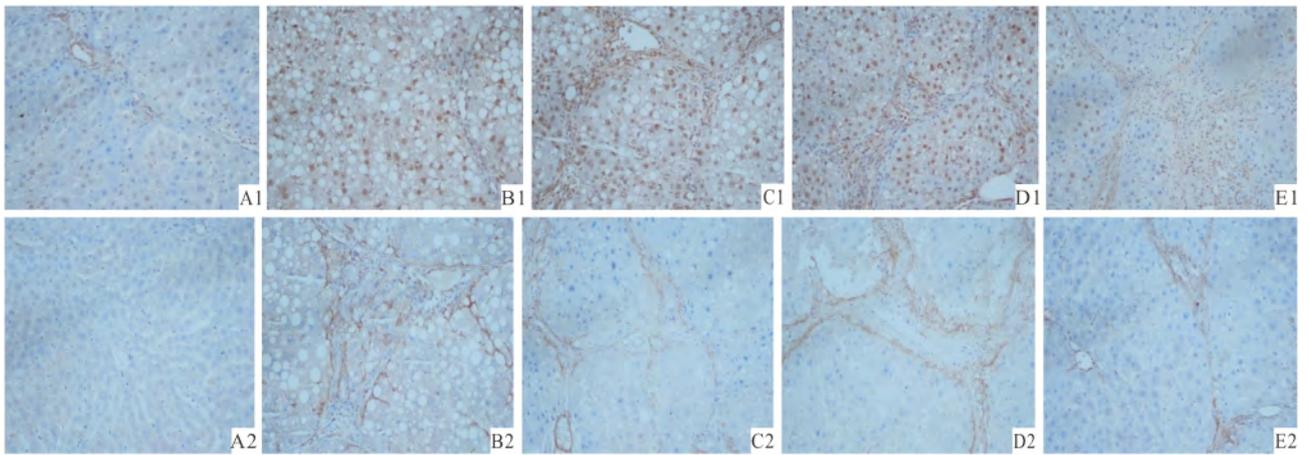


图2 免疫组化检测 α -SMA、Calpain 蛋白表达 SP \times 400

A: 正常组; B: 模型组; C: 逆转恢复 2 周组; D: 逆转恢复 4 周组; E: 逆转恢复 8 周组; 1: α -SMA; 2: Calpain

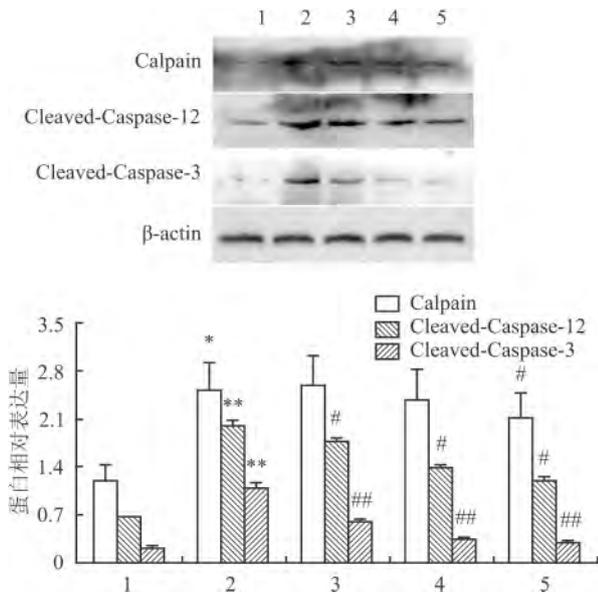


图3 Western blot 法检测 Calpain、Cleaved-Caspase-12、Cleaved-Caspase-3 蛋白表达

1: 正常组; 2: 模型组; 3: 逆转恢复 2 周组; 4: 逆转恢复 4 周组; 5: 逆转恢复 8 周组; 与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

肝纤维化是多种慢性肝病发展的共同病理基础,其发病机制与肝细胞大量凋亡和静止的 HSCs 活化增殖,合成大量胶原为主的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度沉积引起^[3]。因此,抑制肝细胞坏死凋亡和促进活化的 HSCs 凋亡,有助于肝纤维化的逆转恢复^[4]。

研究^[5-7]表明 ERS 在肝纤维化的进展期抑制 HSCs 活化,在肝纤维化逆转恢复期促进活化的

HSCs 凋亡。研究^[8]显示 HSCs 与 ERS 诱导剂 TG 或 TN 体外共培养,CHOP、JNK 和 Caspase-12 的表达明显变化,其可能与逆转恢复期 ERS 诱导活化 HSCs 凋亡增加密切相关。

有研究^[9-10]表明,当 ERS 激活时,内质网将储存的 Ca^{2+} 释放到细胞胞质中与钙离子结合位点结合,从而激活 Calpain。细胞质钙活化蛋白导致的钙外流的刺激,裂解并且激活 Caspase-12,启动下游的凋亡路径 Caspase-3,发生凋亡蛋白酶级联反应^[11-12]。本实验建立 CCl_4 诱导大鼠肝纤维化逆转恢复模型,采用 HE 染色、Masson 胶原纤维染色验证模型成功。免疫组化法检测 α -SMA 和 Calpain 蛋白在大鼠肝组织中的表达。结果表明,随着恢复期时间延长,大鼠肝组织中 α -SMA 和 Calpain 阳性表达细胞数量及程度逐渐下降提示 HSCs 活化降低;而 Calpain 抗原表达阳性细胞主要分布在肝脏的小叶中央静脉、汇管区、肝窦间隙等部位,与 HSCs 细胞的大致位置相同,提示 Ca^{2+} 依赖性 Calpain 活化可能参与 Caspase-12 诱导的大鼠 HSCs 凋亡。Western blot 法结果进一步表明,模型组大鼠肝脏组织中 Calpain、Cleaved-Caspase-12 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达较正常组明显增多;而肝纤维化恢复期 2、4、8 周组中 Calpain、Cleaved-Caspase-12 和 Cleaved-Caspase-3 蛋白表达明显降低,与模型组相比差异有统计学意义。结合实验室前期研究结果:模型组 Cleaved-Caspase-12 表达显著上升,提示 Caspase-12 诱导的肝细胞凋亡参与肝纤维进展期;在肝纤维化逆转恢复期,Cleaved-Caspase-12 在活化 HSCs 中表达增强,诱导活化 HSCs 凋亡增加,但其整体表达水平

逐渐下降,提示其诱导的肝细胞凋亡显著降低。本实验结果表明,ERS 存在于大鼠肝纤维化病程中,其可能参与肝细胞和 HSCs 增殖活化、凋亡的调控,与肝纤维化的发生、发展和逆转恢复密切相关。

参考文献

- [1] De Minicis S, Candelaresi C, Agostinelli L, et al. Endoplasmic Reticulum stress induces hepatic stellate cell apoptosis and contributes to fibrosis resolution [J]. *Liver Int* ,2012 ,32(10) : 1574 -84.
- [2] Liu Y, Wang J, Qi S Y, et al. Reduced endoplasmic reticulum stress might alter the course of heart failure *via* caspase-12 and JNK pathways [J]. *Can J Cardiol* ,2014 ,30(3) : 368 -75.
- [3] Lin J, Wu J F, Zhang Q, et al. Virus-related liver cirrhosis: molecular basis and therapeutic options [J]. *World J Gastroenterol* ,2014 ,20(21) : 6457 -69.
- [4] Liu H, Li J, Huang Y, et al. Inhibition of transient receptor potential melastain 7 channel increases HSCs apoptosis induced by TRAIL [J]. *Life Sci* ,2012 ,90(15 -16) : 612 -8.
- [5] 李晓慧,李俊,黄艳,等. TRAIL 通过内质网应激对肝星状细胞凋亡的调控及部分机制的研究 [J]. *安徽医科大学学报* ,2014 ,49(7) : 863 -7.
- [6] 谢加力. ERS 与 TRAIL 在大鼠肝星状细胞凋亡中的相互关系探讨 [D]. 合肥: 安徽医科大学, 2012.
- [7] 谢加力,李俊,黄艳,等. 大鼠肝纤维化进程中内质网应激相关蛋白的动态变化研究 [J]. *安徽医科大学学报* ,2012 ,47(9) : 1028 -32.
- [8] Huang Y, Li X, Wang Y, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced hepatic stellate cell apoptosis through calcium-mediated JNK/P38 MAPK and Calpain/Caspase-12 pathways [J]. *Mol Cell Biochem* ,2014 ,394(1 -2) : 1 -12.
- [9] Kim do Y, Chung S I, Ro S W, et al. Combined effects of an antioxidant and caspase inhibitor on the reversal of hepatic fibrosis in rats [J]. *Apoptosis* ,2013 ,18(12) : 1481 -91.
- [10] Zhu Y, Men R, Wen M, et al. Blockage of TRPM7 channel induces hepatic stellate cell death through endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis [J]. *Life Sci* ,2014 ,94(1) : 37 -44.
- [11] Mu Y, Liu P, Du G, et al. Action mechanism of Yi Guan Jian Decoction on CCl₄ induced cirrhosis in rats [J]. *J Ethnopharmacol* ,2009 ,121(1) : 35 -42.
- [12] Mazumdar B, Meyer K, Ray R. N-terminal region of gelsolin induces apoptosis of activated hepatic stellate cells by a caspase-dependent mechanism [J]. *PLoS One* ,2012 ,7(8) : e44461.

Effect of endoplasmic reticulum stress protein caspase-12 in carbon tetrachloride-induced reversible liver fibrosis in rats

Huang Yan^{1,2}, Li Xiaohui^{1,2}, Wu Zhengsheng³, et al

(¹ School of Pharmacy, ² Institute for Liver Diseases, ³ Dept of Pathology Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To detect the effect of endoplasmic reticulum stress (ERS)-related protein Caspase-12 in rat liver fibrosis and spontaneous reversal process. **Methods** Liver fibrosis model was induced by CCl₄ in rats, the protein expressions of Calpain and α -SMA were detected by immunohistochemical staining. The protein expressions of Calpain, Cleaved-Caspase-12 and Cleaved-Caspase-3 in liver tissue were measured by Western blot. **Results** Immunohistochemistry results showed that compared with the normal group, α -SMA and calpain antigen-positive cells of rat liver tissue in model group were significantly increased, distributing in liver parenchymal area. Compared with model group, in recovery model α -SMA antigen-positive cells decreased. Calpain antigen-positive cells were mainly distributed in the liver lobule central vein, portal area, sinusoidal gap and other parts. Western blot results showed that compared with the control group, expressions of Calpain, Cleaved-Caspase-12 and Cleaved-Caspase-3 were significantly enhanced in the model group. Compared with the model group, expressions of Calpain, Cleaved-Caspase-12 and Cleaved-Caspase-3 were decreased in spontaneous recovery after 2, 4 and 8 weeks. **Conclusion** ERS-related protein Caspase-12 might be related to the progression and regression of liver fibrosis. **Key words** liver fibrosis; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; Calpain; Caspase-12