

慢病毒介导PXR体内转染对CCl₄诱导的大鼠肝损伤的保护作用研究

张韬^{1,2}, 程变巧³, 林伟国³, 朱琪³ (1.福建省医学科学研究院 免疫研究所, 福州 350001; 2.福建省医学测试重点实验室, 福州 350001; 3.厦门大学附属福州第二医院 肝胆内科, 福州 350007)

摘要: 目的 探讨PXR对CCl₄诱导的大鼠肝损伤的保护作用。方法 雄性SD大鼠48只, 随机分为4组, 空白组不做任何处理; 模型组通过CCl₄灌胃诱导肝损伤; 空载体组在建立肝损伤模型前3天静脉注射慢病毒空载体; PXR慢病毒组在建立肝损伤模型前3天静脉注射PXR重组慢病毒。通过血清AST和ALT检测和肝脏HE染色评估肝损伤程度; Western blot及RT-PCR检测大鼠肝组织中PXR、NF-κB、IL-1、IL-2和TNF-α的表达。结果 慢病毒介导PXR体内转染后肝损伤大鼠血清AST和ALT明显降低, 肝损伤及纤维化程度明显减轻, PXR表达水平明显升高, 相反, NF-κB、IL-1、IL-2和TNF-α的表达水平明显降低。结论 PXR可能通过抑制NF-κB的表达, 下调炎症相关因子IL-1、IL-2和TNF-α的表达, 从而对CCl₄诱导的大鼠肝损伤具有一定的保护作用, 可为肝损伤的治疗提供一种新的途径和思路。

关键词: 慢病毒属; 大鼠; 转染

Protective effects of lentivirus-mediated PXR transfection in vivo on CCl₄-induced liver injury in rat

ZHANG Tao^{1,2}, CHENG Bian-qiao³, LIN Wei-guo³, ZHU Qi³ (1. Institute of Immunity, Fujian Academy of Medical Science, Fuzhou 350001, China; 2. Fujian Key Laboratory of Medical Analysis, Fuzhou 350001, China; 3. The Second Hospital of Fuzhou Affiliated to Xiamen University, Hepatobiliary Department of Internal Medicine, Fuzhou 350007, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of PXR in CCl₄-induced liver injury in rat. **Methods** Forty eight Sprague-Dawley male rats were randomly divided into four groups: control group (without treatment); model group, which was treated with CCl₄ to induce liver injury; empty vector group, which was intravenously injected with lentiviral vector three days before liver injury; PXR recombinant lentivirus group was intravenously injected with PXR recombinant lentivirus three days before liver injury. The degree of liver injury was evaluated by HE staining and levels of serum AST and ALT. The expression of PXR, NF-κB, IL-1, IL-2 and TNF-α in liver were assayed by RT-PCR and Western blot. **Results** After intravenous injection with PXR recombinant lentivirus, fibrosis and serum AST and ALT in rat with liver injury reduced significantly. The expression of PXR in liver increased significantly. On the contrary, the expression of NF-κB, IL-1, IL-2 and TNF-α in liver decreased significantly. **Conclusions** PXR plays a protective role in CCl₄-induced liver injury in rat. It may through inhibit the expression of NF-κB, further to down-regulate the expression of IL-1, IL-2 and TNF-α, which provides a new way for treatment of liver injury.

Key words: Lentivirus; Rats; Transfection

肝细胞损伤大致可分为化学性和免疫学损伤, 两者也可相互作用。化学机制主要是通过细胞色素P450及其代谢产物对肝细胞造成损伤, 如破坏细胞膜的完整性、酶活性降低、自由基的产生、脂质过氧

化、线粒体功能紊乱、细胞内离子浓度改变等。免疫机制主要是通过细胞因子、免疫变态反应、细胞凋亡、一氧化氮及补体等对肝脏产生损伤^[1,2]。本课题组前期研究发现, CCl₄诱导大鼠肝损伤后肝脏中孕烷X受体(PXR)表达水平下降。为进一步研究PXR在这一过程中的作用机制, 本研究通过研究大鼠肝损伤

后细胞因子的变化在免疫机制方面进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 慢病毒载体CMV-MCS-EGFP-PGK-Puro及包装体系(Gag/Pol、Rev和VSV-G载体)购自广州辉骏生物;逆转录试剂盒、PCR即用扩增试剂盒、RIPA裂解液、BCA法蛋白定量试剂盒和UltraECL底物化学发光检测试剂盒购自Invitrogen公司;兔抗鼠PXR、NF- κ B、IL-1、IL-2和TNF- α 一抗、羊抗兔HRP标记二抗购自Abcam公司;AST和ALT检测试剂盒购自上海复星长征。

1.2 PXR重组慢病毒的制备 通过Xho I和BamH I限制性内切酶将慢病毒载体pGK-Puro和PXR片段[前期已构建于pcDNA3.1(+)-PXR质粒上]连接成pGK-Puro-PXR载体,转化感受态DH5 α 大肠杆菌,接种至LB-Amp^r平板,37℃恒温箱孵育过夜,挑取单克隆至LB-Amp^r液体培养基中培养至对数期,提取质粒,PCR及测序验证。

1.3 PXR重组慢病毒的包装 将 1×10^6 293T细胞接种于培养瓶内,待细胞长满80%以上瓶壁时即可用于转染。转染前2小时将细胞培养基更换为无血清培养基。取载体混合液(20 μ g pGK-Puro-PXR、15 μ g Gag/Pol、15 μ g Rev和10 μ g VSV-G载体),加入Opti-MEM培养液混合至2.5 ml,室温孵育5分钟。取0.1 ml Lipofectamine 2000与2.4 ml Opti-MEM混合,室温孵育5分钟。将上述DNA和Lipofectamine 2000混合物混匀,室温孵育20分钟,加入到293T细胞中培养24小时,荧光显微镜观察转染情况。更换含10%血清的DEME培养液继续培养48小时,收集上清液,于4℃ 3000 r/min离心10分钟,去除细胞碎片。应用0.45 μ m滤头过滤慢病毒上清液,加入 $5 \times$ pEG-8000 + NaCl,充分混合后,4℃ 4000 r/min离心20分钟,弃上清液,加入适量病毒溶解液溶解慢病毒沉淀,分装成每份50 μ l,置于-80℃保存备用,并进行滴度测定。

1.4 CCl₄诱导大鼠肝损伤模型的建立 SD雄性大鼠(200 \pm 20) g先适应性喂养2天,第3天灌胃CCl₄和花生油的混合物(1:1) 0.4 ml,第4天为修复期,正常喂养。第5天灌胃CCl₄和花生油的混合物

(1:1) 0.8 ml,第6天为修复期,正常喂养。第7天灌胃CCl₄和花生油的混合物(1:1) 1.2 ml。空白组灌胃等量花生油。48小时后处死大鼠,通过检测血清AST和ALT水平、肝脏HE染色来评估CCl₄诱导大鼠肝损伤模型是否建立成功。

1.5 实验动物与分组 健康雄性SD大鼠48只,体重约20 g,由福建医科大学实验动物中心提供[实验动物许可证:SCXK(闽)2012-0001,实验动物合格证编号:0000667]。随机分为4组,每组12只,分别为①空白组:无任何处理;②模型组:CCl₄灌胃诱导肝损伤;③空载体组:建立肝损伤模型前3天静脉注射慢病毒空载体;④PXR慢病毒组:建立肝损伤模型前3天静脉注射PXR重组慢病毒。

1.6 Western blot 取样品处理液进行SDS-PAGE电泳,转膜,用含5%脱脂奶粉的TBST溶液封闭1小时。洗膜后将封闭后的PVDF膜与一抗4℃孵育过夜。洗膜后在室温条件下与二抗孵育1小时,二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体(1:5000)。洗膜后加入免疫印迹化学发光试剂(ECL),显影、洗片、晾干。用凝胶图像分析仪扫描照片,并采用灰度分析计算各蛋白条带的灰度值。

1.7 RT-PCR 提取肝脏总RNA,逆转录获得cDNA。GeneBank中查找各基因序列,Primer5.0设计各引物序列(表1)。PCR反应体系为:10 \times Taq Buffer 5.0 μ l, 10 mM dNTP Mix 4.0 μ l, 10 μ M上下游引物各2 μ l,模板4.0 μ l, 5 U/ μ l Taq 0.5 μ l, ddH₂O 32.5 μ l,共50 μ l。PCR产物在1.3%琼脂糖凝胶中,4 V/cm电泳40分钟后,凝胶成像系统拍照并采用灰度分析计算产物条带灰度值。

表1 RT-PCR实验中各种基因的检测引物序列

基因	引物序列	产物
β -actin	上游: 5' - TTCCAGCCTTCCTTCCTG -3'	102 bp
	下游: 5' - GGCAIAGAGGTCTTTACGG -3'	
PXR	上游: 5' - CTACCAACCTCCCTCCAA -3'	214 bp
	下游: 5' - TTCCGTGTGCAACATCGT -3'	
NF- κ B	上游: 5' - AGCGAGACCTGGAGCAAG -3'	105 bp
	下游: 5' - GGACCGCATTCGAAGTCATAG -3'	
IL-1	上游: 5' - TGTGATGTTCCCATAGAC -3'	131 bp
	下游: 5' - AATACCACTTGTTGGCTTA -3'	
IL-2	上游: 5' - CACTGACGCTTGTCCTCC -3'	188 bp
	下游: 5' - CAATTCTGTGGCTGCTT -3'	
TNF- α	上游: 5' - CCACGCTCTTCTGTCTACTG -3'	145 bp
	下游: 5' - GCTACGGCTTGCTCACTC -3'	

1.8 形态学观察 解剖后取约5 mm × 5 mm × 3 mm 大小的肝组织制作石蜡切片,进行HE染色,观察大鼠肝组织形态结构、坏死程度和炎性细胞等。

1.9 ALT及AST含量检测 处死大鼠前,眼球取血,离心获得血清,应用ALT、AST检测试剂盒及全自动生化分析仪进行检测。

1.10 统计学处理 应用SPSS 13.0软件进行统计学分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计方法采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PXR重组慢病毒的构建及转染效率测定 对pGK-Puro-PXR载体进行PCR检测,结果显示PXR目的条带单一,大小正确(图1a);同时对该载体进行测序验证,测序结果与理论序列一致(图1b),证明pGK-Puro-PXR重组慢病毒载体构建成功。转染HEK-293细胞24小时可观察到90%以上细胞都显示荧光(图1d),证明PXR重组慢病毒转染成功。

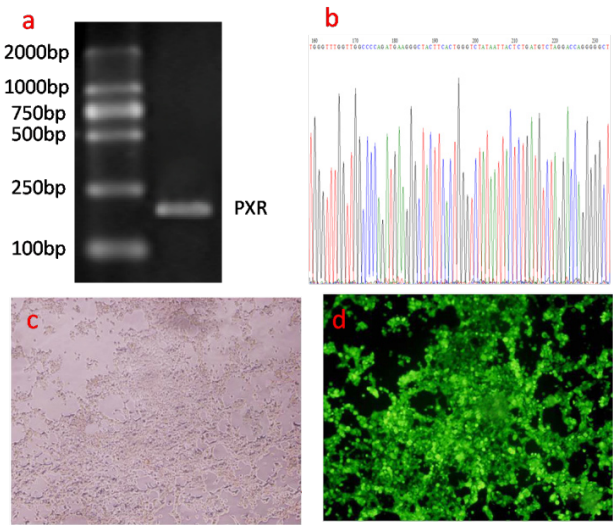


图1 PXR重组慢病毒的构建及转染(200 ×)

注: a: PCR验证PXR重组慢病毒载体; b: 测序验证PXR重组慢病毒载体; c: 相差显微镜观察; d: 荧光显微镜观察

2.2 大鼠肝损伤模型的建立 模型组大鼠血清ALT和AST含量与空白组相比明显升高,分别是空白组的2.62倍和1.73倍(表2),且模型组AST/ALT = 1.94,说明大鼠肝受到较为严重的损伤。HE染色结果显示,空白组大鼠的肝脏形态正常,肝索排列规则,肝小叶内网状纤维支架结构完整。模型组大鼠肝脏小叶结构紊乱、汇管区扩大、胶原纤维延

肝板延伸成纤维隔状,可见少量炎性细胞浸润(图2)。

表2 大鼠血清中AST及ALT含量测定(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	ALT	AST
模型组	145.16 ± 67.37 ^a	282.36 ± 63.68 ^b
空白组	55.45 ± 22.54	163.56 ± 19.36
<i>P</i>	0.010	0.030

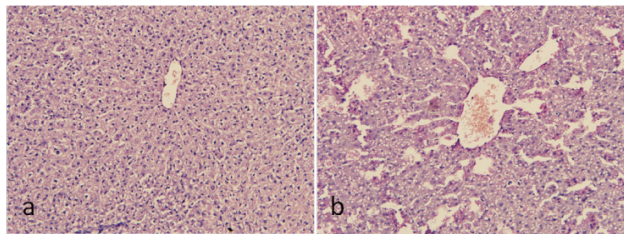


图2 大鼠肝组织HE染色(200 ×)

注: a为空白组, b为模型组

2.3 PXR慢病毒体内转染对大鼠肝组织中NF-κB及炎症因子蛋白水平的影响 模型组和空载体组大鼠肝组织中PXR蛋白表达水平明显低于空白组, PXR慢病毒组PXR蛋白表达水平最高,明显高于其他3组($P < 0.05$)。相反,模型组和空载体组NF-κB、IL-1、IL-2和TNF-α蛋白表达水平明显高于空白组,而PXR慢病毒组NF-κB、IL-1、IL-2和TNF-α蛋白表达水平虽然明显高于空白组,但却明显低于模型组和空载体组($P < 0.05$),见表3。4组Western blot检测大鼠肝组织中PXR蛋白表达水平见图3。

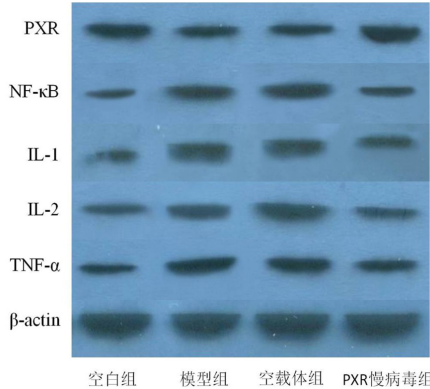


图3 Western blot检测PXR慢病毒体内转染

对大鼠肝组织中NF-κB及炎症因子蛋白表达水平

2.4 PXR慢病毒体内转染对大鼠肝组织中NF-κB及炎症因子mRNA水平的影响 模型组和空载体组大鼠肝组织中PXR的mRNA水平明显低于空白组, PXR

表 3 各组大鼠肝组织中PXR、NF-κB及各炎性因子的蛋白相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	灰度值比值				
	PXR	NF-κB	IL-1	IL-2	TNF-α
模型组 (n = 12)	0.480 ± 0.063 ^a	3.093 ± 0.035 ^a	3.648 ± 0.071 ^a	2.751 ± 0.069 ^a	3.399 ± 0.027 ^a
空载体组 (n = 12)	0.540 ± 0.104 ^a	3.400 ± 0.073 ^a	3.398 ± 0.095 ^a	2.771 ± 0.044 ^a	3.251 ± 0.124 ^a
PXR慢病毒组 (n = 12)	1.630 ± 0.145 ^{ab}	1.601 ± 0.118 ^{ab}	1.599 ± 0.058 ^{ab}	1.754 ± 0.047 ^{ab}	1.601 ± 0.066 ^{ab}
空白组 (n = 12)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

注: ^a与空白组比较, $P < 0.05$; ^b与模型组比较, $P < 0.05$

表 4 各组大鼠肝组织中PXR、NF-κB及各炎性因子的mRNA相对表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	灰度值比值				
	PXR	NF-κB	IL-1	IL-2	TNF-α
模型组 (n = 12)	0.519 ± 0.033 ^a	3.029 ± 0.022 ^a	3.596 ± 0.098 ^a	2.693 ± 0.088 ^a	3.774 ± 0.077 ^a
空载体组 (n = 12)	0.561 ± 0.094 ^a	3.227 ± 0.063 ^a	3.608 ± 0.117 ^a	2.395 ± 0.036 ^a	3.558 ± 0.089 ^a
PXR慢病毒组 (n = 12)	1.558 ± 0.099 ^{ab}	1.689 ± 0.094 ^{ab}	1.619 ± 0.063 ^{ab}	1.743 ± 0.032 ^{ab}	1.970 ± 0.047 ^{ab}
空白组 (n = 12)	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

注: ^a与空白组比较, $P < 0.05$; ^b与模型组比较, $P < 0.05$

慢病毒组PXR的mRNA水平明显最高, 明显高于其他3组 ($P < 0.05$)。相反, 模型组和空载体组NF-κB、IL-1、IL-2和TNF-α的mRNA水平明显高于空白组, 而PXR慢病毒组NF-κB、IL-1、IL-2和TNF-α的mRNA水平虽然明显高于空白组, 但却明显低于模型组和空载体组 ($P < 0.05$), 见表4。4组RT-PCR检测大鼠肝组织中PXR蛋白表达水平见图4。

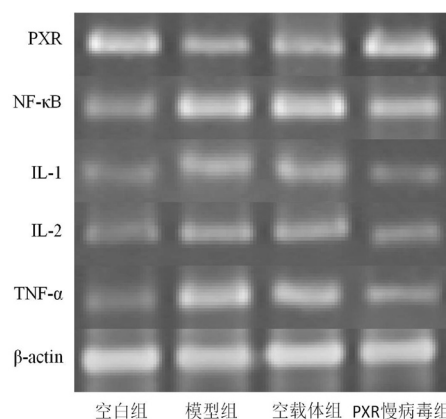


图 4 RT-PCR检测PXR慢病毒体内转染
对大鼠肝组织中NF-κB及炎性因子mRNA表达水平

2.5 PXR慢病毒体内转染对大鼠肝组织病理形态的影响 大鼠肝脏HE染色结果显示, 空白组大鼠的肝脏结构正常, 肝索排列规则, 肝小叶内网状纤维支架结构完整, 总体观察, 肝细胞形态正常 (图5a)。模型组和空载体量组大鼠肝脏小叶结构紊乱、汇管区扩大、胶原纤维延伸肝板延伸成纤维隔状, 可见少量炎性细胞浸润 (图5b、5c)。PXR慢

病毒组接近空白组, 网状纤维支架结构相对完整, 基本无纤维化变性, 汇管区正常无扩大, 与模型组和空载体组相比组织形态有较大改善 (图5d)。

2.6 PXR慢病毒体内转染对大鼠血清ALT及AST含量的影响 模型组和空载体组大鼠血清中ALT和AST含量明显高于空白组 ($P < 0.05$), $AST/ALT = 1.96$ 、 1.97 。PXR重组慢病毒组大鼠血清中ALT和AST含量明显低于模型组和空载体组 ($P < 0.05$), 稍高于空白组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表5。

3 讨论

CCl₄导致的肝损伤属于化学性肝损伤, 其主要机制为CCl₄经细胞色素P450活化后产生三氯甲基自由基, 引起细胞膜的脂质过氧化, 改变膜的通透性和流动性, 使胞质内Ca²⁺浓度升高。同时会使细胞处于氧化应激状态, 可加重炎症反应, 甚至引起细胞死亡^[6-10]。孕烷X受体 (PXR) 是配体依赖性转录因子核受体家族成员之一, 是内源物质和外源物质代谢过程中重要的调节因子^[11]。PXR主要在肝脏中表达, 能够被各种不同结构的配体激活, 其中被人们所熟知的是诱导CYP450基因的表达以参与药物代谢。PXR也能被许多内源性物质所激活, 这些物质包括孕烷、胆汁酸、激素和维生素^[12,13]。本课题组前期研究发现, CCl₄诱导大鼠肝损伤后肝组织中PXR表达水平明显降低。为进一步研究PXR在CCl₄诱导大鼠肝

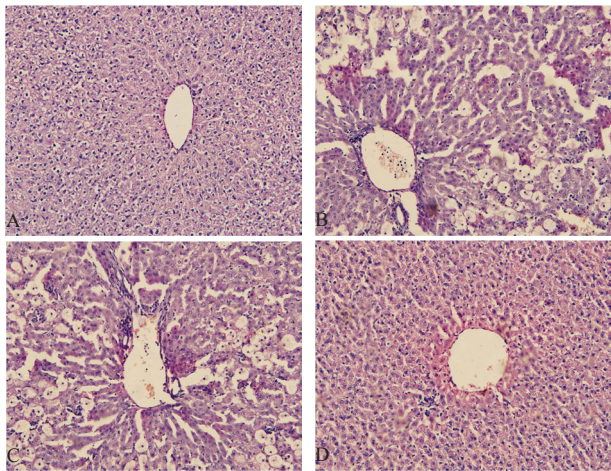


图5 PXR慢病毒体内转染对大鼠肝组织病理形态的影响(HE染色, 200 ×)

注: A为空白组, B为模型组, C为空载体组, D为PXR慢病毒组

表5 PXR慢病毒转染对大鼠ALT和AST含量的影响(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	ALT	AST
模型组	139.44 ± 47.38 ^a	274.34 ± 33.66 ^a
空载体组	143.57 ± 37.87 ^a	282.72 ± 45.05 ^a
PXR慢病毒组	77.43 ± 27.65 ^b	172.34 ± 17.70 ^b
空白组	57.76 ± 16.59	157.37 ± 17.36

注: ^a与空白组比较, $P < 0.05$; ^b与模型组比较, $P < 0.05$

损伤中的作用, 本研究利用慢病毒介导PXR体内基因转染研究PXR对CCl₄诱导大鼠肝损伤的保护作用。

本研究首先成功构建了pGK-Puro-PXR重组慢病毒并转染293T细胞和CCl₄诱导大鼠肝损伤模型。大鼠肝损伤后血清中AST及ALT含量明显升高; 肝组织形态发生破坏、出现纤维化并可见炎性细胞浸润; 肝组织中PXR蛋白水平和mRNA水平都明显降低, 相反, NF- κ B及炎症相关因子IL-1、IL-2和TNF- α 的蛋白水平和mRNA水平都明显升高。将PXR重组慢病毒注入肝损伤大鼠体内后, 大鼠血清中AST及ALT含量明显降低; 肝组织形态得到改善, 纤维化程度降低, 炎性细胞减少; 肝组织中PXR蛋白水平和mRNA水平都明显升高。相反, NF- κ B及炎症相关因子IL-1、IL-2和TNF- α 的蛋白水平和mRNA水平虽然仍明显高于空白组, 但却都明显低于模型组。结果提示PXR与CCl₄诱导的大鼠肝损伤有一定联系。

大量研究表明, IL-1、IL-2和TNF- α 的升高与肝损伤有着密切联系, NF- κ B在多种信号通路中上调

IL-1、IL-2和TNF- α 的表达^[14-16]。因此, 本课题组推测PXR可能通过抑制NF- κ B的表达, 进而下调炎症相关因子IL-1、IL-2和TNF- α 的表达, 从而对CCl₄诱导的大鼠肝损伤起着一定保护作用。这一发现可能为肝损伤的预防和治疗提供一种新的途径和思路。

参考文献

[1] Slotta JE, Justinger C, Kollmar O, et al. Liver injury following blunt abdominal trauma: a new mechanism-driven classification[J]. Surg Today, 2014, 44: 241-246.

[2] 胡勇, 张爱华, 姚茂琳, 等. 蛋白激酶C δ 对燃煤污染型中毒肝损伤的调控机制[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47: 777-782.

[3] Kelava T, Cavar I. Hepatoprotective action of panaxatriol saponins against acetaminophen-induced liver injury: what is the mechanism?[J]. Liver Int, 2014, 34: 644-645.

[4] Ma Y, Niu C, Wang J, et al. Diosbulbin B-induced liver injury in mice and its mechanism[J]. Hum Exp Toxicol, 2013, 33: 729-736.

[5] Ji L, Jiang P, Lu B, et al. Chlorogenic acid, a dietary polyphenol, protects acetaminophen-induced liver injury and its mechanism[J]. J Nutr Biochem, 2013, 24: 1911-1919.

[6] Zahedi K, Barone SL, Xu J, et al. Hepatocyte-specific ablation of spermine/spermidine-N1-acetyltransferase gene reduces the severity of CCl₄-induced acute liver injury[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 303: 556-559.

[7] Kalegari M, Gemin CA, Araujo-Silva G, et al. Chemical composition, antioxidant activity and hepatoprotective potential of Rourea induta Planch. (Connaraceae) against CCl₄-induced liver injury in female rats[J]. Nutrition, 2014, 30: 713-718.

[8] Jalali GB, Ghaffari H, Prakash HS, et al. Antioxidant and hepatoprotective effects of Solanum xanthocarpum leaf extracts against CCl₄-induced liver injury in rats[J]. Pharm Biol, 2014, 52: 1066-1068.

[9] 刘丹卓, 赵新广. 肝损伤病因病理机制及中医药治疗研究近况[J]. 国医论坛, 2006, 21: 53-55.

[10] 于文平, 关静. 药物性肝损伤研究进展与治疗[J]. 北方药学, 2011, 8: 43-44.

[11] Wallace K, Cowie DE, Konstantinou DK, et al. The PXR is a drug target for chronic inflammatory liver disease[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2010, 120: 137-148.

[12] Xie W, Barwick JL, Simon CM, et al. Reciprocal activation of xenobiotic response genes by nuclear receptors SXR/PXR and CAR[J]. Genes, 2000, 14: 3019-3021.

[13] Gerbal-Chaloin S, Pascussi JM, Pichard-Garcia L, et al. Induction of CYP2C genes in human hepatocytes in primary culture[J]. Drug Metab Dispos, 2001, 29: 248-250.

[14] Russmann S, Kullak-Ublick GA, Grattagliano I. Current concepts of mechanisms in drug-induced hepatotoxicity[J]. Curr Med Chem, 2009, 16: 3049-3052.

[15] 李荣萍, 任成山, 李宜辉. 急性肝损伤中肝细胞凋亡与肿瘤坏死因子- α 的关系[J]. 第三军医大学学报, 2008, 28: 2237-2239.

[16] Gu X, Ke S, Liu D, et al. Role of NF- κ B in regulation of PXR-mediated gene expression: a mechanism for the suppression of cytochrome P-450 3A4 by proinflammatory agents[J]. J Biol Chem, 2006, 281: 17887-17889.

收稿日期: 2014-08-27