

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.02.002
文章编号: 1005-8982 (2018) 02-0008-06

Neuritin 与 HSP60 在大鼠肝损伤组织中的表达及其意义*

吴江文, 朱美意, 欧阳军, 周涛, 曹东

(石河子大学医学院第一附属医院 急诊外科, 新疆 石河子 832008)

摘要: 目的 研究大鼠肝损伤后不同时间 Neuritin 和热休克蛋白 60 (HSP60) 的表达, 探讨 Neuritin 和 HSP60 在大鼠肝损伤修复过程中的作用。**方法** 将 126 只 SD 大鼠随机分为肝损伤组、骨折组和正常组, 分别检测各组术后 6 h、12 h、1 d、3 d、5 d、7 d 和 14 d 7 个时间点的血清谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 浓度, 并取肝组织行苏木精-伊红和免疫组织化学法染色, 观察肝脏病理学改变及 Neuritin、HSP60 的表达。**结果** 肝损伤组大鼠血清 ALT、AST 浓度在 6 h、12 h、1 d 时高于骨折组、正常组 ($P < 0.05$)。免疫组织化学法结果表明, 肝损伤组大鼠 Neuritin 和 HSP60 的表达水平在各个时间点 (6 h 除外) 高于骨折组、正常组 ($P < 0.05$), 且两者的表达水平均呈先升高后降低的趋势, 骨折组大鼠 HSP60 的表达水平在 12 h、1 d 时高于正常组 ($P < 0.05$), 骨折组大鼠 Neuritin 的表达水平与正常组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** Neuritin 与 HSP60 相互作用, 可能是促进肝损伤修复的重要因素。

关键词: 肝损伤; 骨折; Neuritin; 热休克蛋白 60

中图分类号: R575.3

文献标识码: A

Expressions of neuritin and HSP60 in traumatically-injured liver tissue of rats*

Jiang-wen Wu, Mei-yi Zhu, Jun Ouyang, Tao Zhou, Dong Cao

(Department of Emergency Surgery, the First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832008, China)

Abstract: Objective To detect the expressions of neuritin and HSP60 in traumatic liver tissues of rats at different time, and discuss the effect of neuritin and HSP60 on the repair of injured hepatic tissue. **Methods** One hundred and twenty-six SD rats were randomly divided into liver injury group (group A), fracture group (group B) and normal group (group C). In each group, the serum concentrations of ALT and AST were respectively measured at seven time points (6 and 12 h, 1, 3, 5, 7 and 14 d), HE staining and immunohistochemical method were used to detect the expressions of neuritin and HSP60 in the liver tissue of the rats. **Results** At the time of 6 h, 12 h and 1 d, serum concentrations of ALT and AST in the group A were higher than those in the group B and the group C ($P < 0.05$). The immunohistochemical staining results indicated the expressions of neuritin and HSP60 in the group A at the time points from 12 h to 14 d were significantly higher than those in the group B and the group C ($P < 0.05$). The expression of HSP60 in the group B was higher than that in the group C at 12 h and in 1 d ($P < 0.05$). And the expressions of neuritin and HSP60 increased at first and then decreased. **Conclusions** The interaction between neuritin and HSP60 may play an important role in hepatic self-repair after traumatic liver injury.

Keywords: liver injury; fracture; neuritin; heat shock protein 60

收稿日期: 2016-11-16

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81560312)

[通信作者] 欧阳军, E-mail: wenf010@163.com

肝损伤在腹部损伤中十分常见,然而肝损伤修复分子机制仍未明确^[1-2]。Neuritin是NEDIVI等^[3]从大鼠海马cDNA文库中筛选鉴定出与可塑性相关的候选基因,其在神经发育及损伤修复中发挥重要作用。目前Neuritin与肝损伤修复的研究较少,课题组应用基因信息学技术及酵母双杂交技术^[4],在胎脑中发现多条与Neuritin有相互作用的蛋白质和基因,其中包含热休克蛋白60(heat shock protein 60, HSP60)。因此本实验复制大鼠肝损伤模型,探讨Neuritin和HSP60在大鼠肝损伤修复过程中的表达,以及可能的作用机制和意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6周龄SD大鼠购自新疆医科大学实验动物中心。动物合格证号:SCXK(新)2011-0003,饲养设施合格证号:SYXK(新)2011-0001。

1.2 主要试剂及仪器

Neuritin多克隆抗体(型号AF283)(美国R&D公司),HSP60单克隆抗体(型号ab59457)(英国Abcam公司),相应二抗购自北京中杉金桥公司。免疫组织化学法石蜡包埋机及石蜡切片机构自德国Leica公司。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组及模型的复制 126只SD大鼠按随机数字表法随机分为肝损伤组、骨折组和正常组,每组42只。各组再按随机数字表法随机分为6h、12h、1d、3d、5d、7d、14d7个时间点(各6只)。肝损伤组参照第三军医大学大鼠肝脏损伤动物模型^[5],骨折组采用股骨截肢模型,大鼠麻醉后,取右下肢股外侧切口暴露股骨干,用电动摆锯将股骨中段锯断,克氏针逆行插入经股骨大转子穿出,将克氏针逆行插入骨折远端复位骨折,将大转子根部针尾部克氏针折弯后剪除多余部分,逐层闭合切口。正常组做空白处理。

1.3.2 血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)浓度的监测 麻醉后打开大鼠腹腔,用采血管自下腔静脉采血5ml,立即4000 r/min离心8min,取上清液送往石河子大学第一附属医院检验科,由固定的专业人

员利用全自动生化仪监测血清ALT、AST浓度。

1.3.3 肝脏组织切片苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)及病理学观察 肝损伤组取损伤处肝组织,骨折组和正常组均取左侧肝叶组织,切取的肝组织经甲醛固定后制作石蜡切片,行HE染色,常规显微镜下观察并记录。

1.3.4 免疫组织化学法 免疫组织化学法检测Neuritin与HSP60的表达。采用Envision两步法:取制作好的肝组织切片,烘干后脱蜡至水,加热修复抗原,3%双氧水H₂O₂ 10min封闭;添加相应一抗4℃孵育过夜;震洗后滴加相应第二抗体,37℃孵育30min;震洗,显色后进行苏木精核复染,经脱水、透明后封片保存。光镜下观察Neuritin、HSP60的表达,以胞浆呈棕褐色为阳性细胞。结果评分采用AB值法。A:按切片中细胞有无显色及深浅评分,细胞无着色计0分;显色为浅黄色计1分;深黄色计2分;棕褐色计3分。B:按切片中显色细胞比例评分,显色细胞<1/3切片中细胞总数计1分;1/3~2/3细胞显色计2分;>2/3细胞显色计3分。每例样本积分=A×B。每张切片在200倍光镜下随机选取5个无重叠视野,评分后取算术平均值进行下一步统计学处理。

1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 17.0统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析,两两比较用LSD-*t*检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清ALT、AST浓度比较

肝损伤组大鼠血清ALT、AST浓度在6h、12h、1d时高于骨折组和正常组($P < 0.05$),其余时间点3组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。骨折组AST浓度在6h、12h、1d时升高,且与肝损伤组及正常组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表1、2。

2.2 肝脏病理学变化

光镜下观察各组大鼠肝脏组织。肝损伤组大鼠6h~1d可见肝小叶结构破坏,周边见红色出血带,肝窦内可见大量红细胞,部分肝细胞水肿;肝损伤后3和5d,肝细胞索结构紊乱,仍可见出血,肝小叶周边细胞普遍增大,胞浆水肿,局部点状坏死,偶见核分裂象,肝血窦周围可见炎症细胞浸润;肝损伤后7和14d,出血明显减少,仍见淋巴细胞及中性粒细胞

浸润, 内皮细胞明显增多, 可见新生毛细血管形成。骨折组大鼠肝脏肝小叶结构稍紊乱, 局部细胞质疏松, 可见少量炎症细胞。见图 1。

2.3 肝脏组织 Neuritin、HSP60 的表达

2.3.1 Neuritin 光镜下观察 Neuritin、HSP60 均表达于细胞浆, 着色肝细胞围绕汇管区分散排列。肝损伤组在各时间点 (6 h 除外) Neuritin 评分高于骨折组和正常组 ($P < 0.05$); 各时间点的表达水平比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且随时间推移, 表达呈先升高后下降的趋势。随时间推移, 骨折组与正常组

的表达水平比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 且各时间点比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2 和表 3。

2.3.2 HSP60 肝损伤组 HSP60 的表达水平也呈先升高后下降的趋势, 且在 12 h、1 d、3 d、5 d、7 d、14 d 时的评分高于骨折组和正常组 ($P < 0.05$)。骨折组 HSP60 的表达随着时间变化, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且在 12 h、1 d 时表达水平较正常组高 ($P < 0.05$), 其余时间点比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4 和图 3。

表 1 各组不同时间点 ALT 浓度比较 ($n=6$, u/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d
肝损伤组	104.17 ± 4.07 [†]	424.50 ± 10.84 [†]	64.00 ± 7.15 [†]	40.33 ± 7.56	44.83 ± 11.70	36.33 ± 9.95	43.17 ± 6.18
骨折组	44.00 ± 5.02	43.00 ± 4.56	42.33 ± 5.46	38.17 ± 6.24	39.67 ± 8.98	42.00 ± 5.41	43.17 ± 10.30
正常组	38.83 ± 6.61	40.00 ± 6.19	42.17 ± 9.95	39.50 ± 5.89	47.00 ± 7.04	41.50 ± 6.65	43.50 ± 8.45
F 值	277.617	4981.180	15.767	0.184	0.956	0.960	0.0030.000.003
P 值	0.000	0.000	0.000	0.834	0.407	0.405	0.997

注: † 与正常组、骨折组比较, $P < 0.05$

表 2 各组不同时间点 AST 浓度 BJ ($n=6$, u/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d
肝损伤组	271.00 ± 15.83 ¹⁾²⁾	787.67 ± 32.68 ¹⁾²⁾	210.17 ± 18.69 ¹⁾²⁾	93.50 ± 12.80	76.50 ± 7.14	69.83 ± 9.13	63.33 ± 9.13
骨折组	127.50 ± 7.01 ¹⁾	185.17 ± 10.74 ¹⁾	143.00 ± 19.60 ¹⁾	83.17 ± 9.63	69.83 ± 12.60	65.00 ± 7.62	67.33 ± 8.61
正常组	65.50 ± 8.55 ²⁾	68.83 ± 12.77 ²⁾	77.33 ± 14.28 ²⁾	77.00 ± 9.19	71.83 ± 10.15	67.50 ± 9.40	71.33 ± 6.56
F 值	536.192	1990.628	90.890	3.688	0.673	0.458	1.088
P 值	0.000	0.000	0.000	0.050	0.525	0.641	0.362

注: 1) 与正常组比较, $P < 0.05$; 2) 与骨折组比较, $P < 0.05$

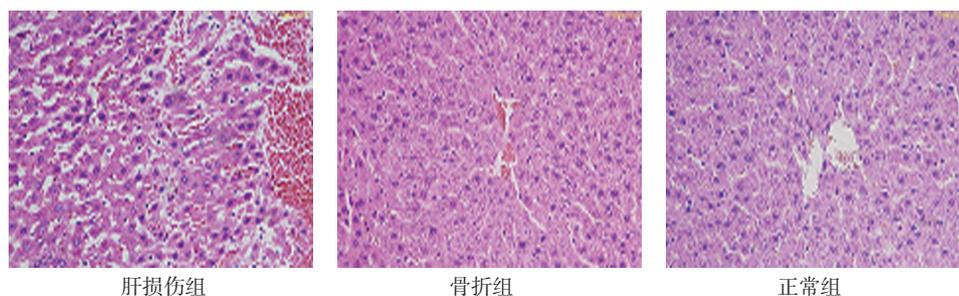
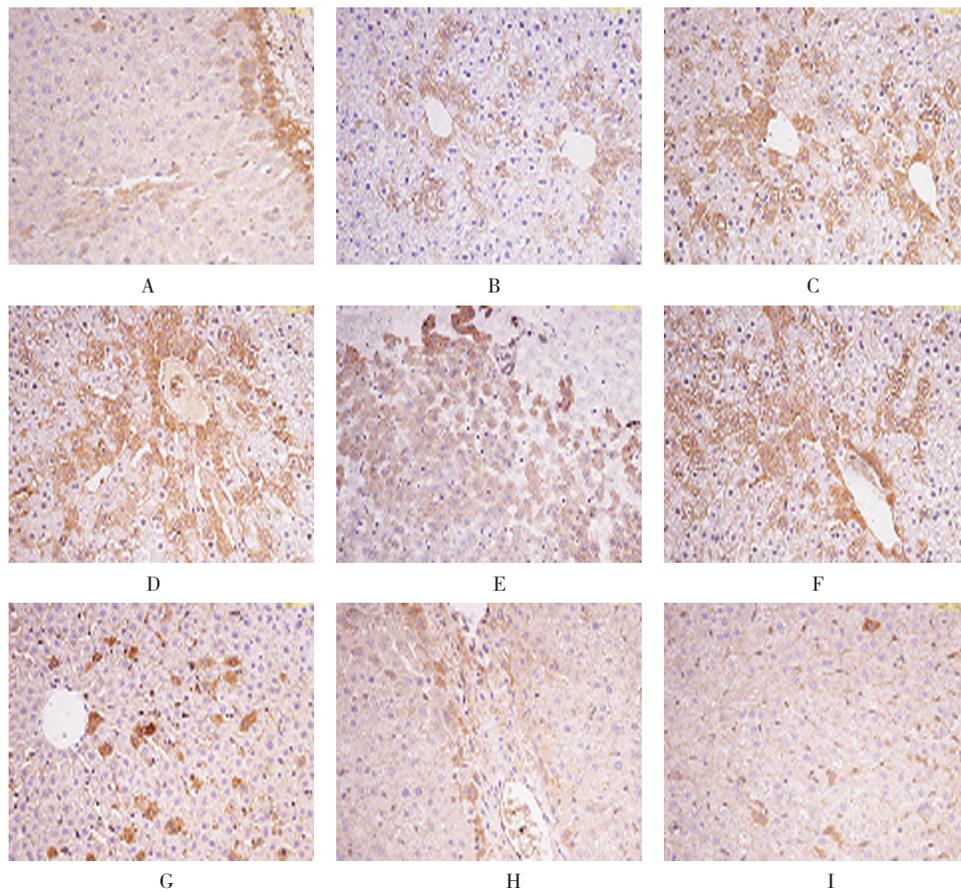


图 1 肝脏病理学变化 (HE 染色 × 200)



A: 肝损伤组 6 h; B: 肝损伤组 12 h; C: 肝损伤组 1 d; D: 肝损伤组 3 d; E: 肝损伤组 5 d; F: 肝损伤组 7 d; G: 肝损伤组 14 d; H: 骨折组 6 h; I: 正常组 6 h

图 2 Neurtin 在肝组织中的表达 (免疫组织化学法染色 × 200)

表 3 各组不同时间点 Neurtin 评分比较 (n=6, 分, $\bar{x} \pm s$)

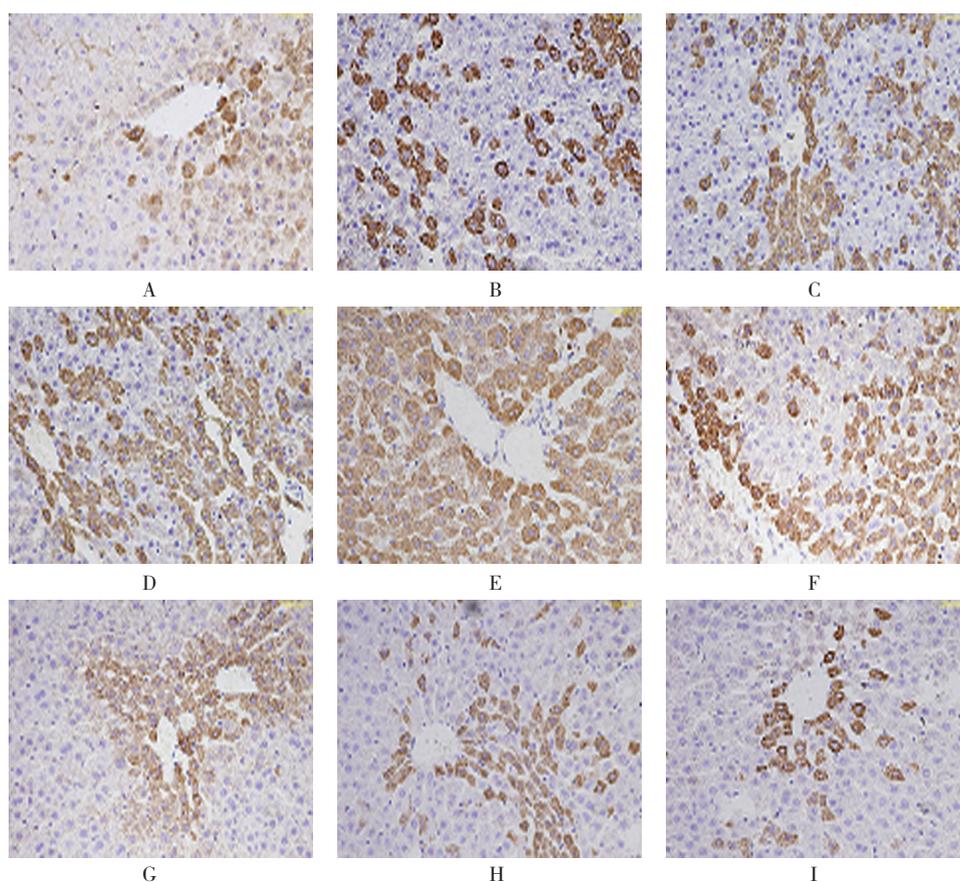
组别	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d	14 d
肝损伤组	0.73 ± 0.16	1.57 ± 0.23 [†]	2.23 ± 0.29 [†]	3.47 ± 0.33 [†]	4.07 ± 0.30 [†]	2.90 ± 0.27 [†]	1.97 ± 0.23 [†]
骨折组	0.43 ± 0.19	0.27 ± 0.20	0.47 ± 0.24	0.60 ± 0.18	0.57 ± 0.29	0.37 ± 0.23	0.43 ± 0.15
正常组	0.30 ± 0.11	0.47 ± 0.16	0.43 ± 0.15	0.44 ± 0.16	0.31 ± 0.10	0.27 ± 0.16	0.40 ± 0.17
F 值	1.194	71.129	113.611	324.421	420.035	254.788	131.890
P 值	0.330	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: † 与正常组、骨折组比较, P < 0.05

表 4 各组不同时间点 HSP60 评分比较 (n=6, 分, $\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	1 d	3 d	5 d	7 d	14d
肝损伤组	1.90 ± 0.27	3.10 ± 0.21 ¹⁾²⁾	3.40 ± 0.28 ¹⁾²⁾	4.57 ± 0.29 ¹⁾²⁾	6.10 ± 0.28 ¹⁾²⁾	4.03 ± 0.29 ¹⁾²⁾	2.87 ± 0.32 ¹⁾²⁾
骨折组	1.57 ± 0.29	2.53 ± 0.27 ¹⁾	2.90 ± 0.21 ¹⁾	1.56 ± 0.30	1.50 ± 0.21	1.47 ± 0.21	1.67 ± 0.21
正常组	1.70 ± 0.21	1.27 ± 0.16 ²⁾	1.50 ± 0.21 ²⁾	1.53 ± 0.24	1.60 ± 0.28	1.37 ± 0.23	1.57 ± 0.32
F 值	2.452	109.128	103.929	235.374	621.300	223.514	37.381
P 值	0.120	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与正常组比较, P < 0.05; 2) 与骨折组比较, P < 0.05



A: 肝损伤组 6 h; B: 肝损伤组 12 h; C: 肝损伤组 1 d; D: 肝损伤组 3 d; E: 肝损伤组 5 d; F: 肝损伤组 7 d; G: 肝损伤组 14 d; H: 骨折组 6 h; I: 正常组 6 h

图 3 HSP60 在肝组织中的表达 (免疫组织化学法染色 × 200)

3 讨论

Neuritin 最初被认为是一条高度限制在神经系统表达的基因, ZITO 等^[6]研究发现, *Neuritin* 基因的过表达增强神经元细胞对神经生长因子 (nerve growth fact, NGF) 的应答, 从而刺激神经元突起的生长及神经元细胞的迁移。在胎鼠脑发育时期, *Neuritin* 过表达可以阻断 Caspase-3 的活性, 而抑制皮层细胞的凋亡。*Neuritin* 可以作为 NGF 共同发挥作用的下游因子, 与神经组织可塑性密切相关^[7]。然而随着研究深入, *Neuritin* 在机体其他组织中也有表达, 并介导神经系统外组织的再生, *Neuritin* 促进真皮微血管内皮细胞聚集和增殖, 在血管领航和网络形成中发挥导向作用^[8]。*Neuritin* 与肝损伤修复的研究鲜见报道, 日本学者在切除 70% 小鼠肝脏后, *Neuritin* 在肝脏的表达呈上升趋势, 随着肝脏再生, *Neuritin* 基因表达也上升^[9]。本研究结果也证实, *Neuritin* 在肝脏组织中表达, 并且在肝脏损伤后 *Neuritin* 表达水平从 12 h 开始呈先升高后下降的变化趋势, 贯穿于肝脏损伤后的修复进程,

而且其表达水平高于骨折组和正常组, 因此笔者推定 *Neuritin* 参与肝组织的损伤、修复过程, 可能对肝细胞的发育或再生起重要作用, 具有潜在的临床价值。

HSP60 是线粒体内最主要的分子伴侣蛋白之一, 生理状况下其主要参与蛋白质的转运、折叠等。在机体受到损伤时, HSP60 作为一种应激蛋白抵御各种损害因素的影响。研究发现, 应激状态下 HSP60 发挥分子伴侣作用, 调节靶蛋白的活性和功能, 从而保护细胞生存^[10]。HSP60 可以与抗凋亡因子 Bcl-XL 蛋白相互作用, 当激活线粒体凋亡通路时, HSP60 过表达可增加 *Bcl-XL* 基因的表达, 降低促凋亡因子 Bax 的表达量, 从而稳定线粒体膜电位, 抑制 Caspase-3 通路激活, 减少细胞凋亡^[11-12]。HSP60 也可能参与肝脏的再生, SHI 等^[13] 研究报道, HSP60 在切除 2/3 小鼠肝脏组织后, 修复早期表达升高, 从而激活库普弗细胞表面的 Toll 样受体, 分泌白细胞介素 6、肿瘤坏死因子等细胞因子, 在肝脏损伤修复中具有重要作用。本研究发现, 骨折组 12 h、1 d 时 HSP60 在肝脏表达

量较正常组升高,AST 浓度在 6 h、12 h、1 d 时也升高, HSP60 在骨折创伤后表达升高可能是作为应激蛋白,抵御骨折创伤带给肝细胞的危害。而在肝损伤组, HSP60 的表达与 Neuritin 的表达变化趋势一致,从 12 h 开始升高,且高于骨折组和正常组,因此笔者认为 HSP60 可能不仅仅作为一种应激蛋白起防御保护作用, HSP60 可能也参与了肝脏的创伤修复过程。

ALT、AST 是反映各种功能的经典指标, ALT、AST 升高及肝组织切片明确大鼠肝脏损伤,肝脏损伤后肝细胞通过强大的再生能力使自身结构和功能恢复,其修复过程有多种细胞及因子参与。本研究首次证实, Neuritin 和 HSP60 在受损肝组织的时相性表达,都呈先升高后下降的变化趋势,而且笔者注意到 HSP60 与 Neuritin 在机体组织具有共同的作用。两者都在蛋白质的跨膜转运起重要作用,都参与细胞周期及凋亡进程,应激状态是都可以过表达或异位表达。

综上所述,推测 HSP60 和 Neuritin 都可能参与肝脏的创伤修复过程,两者作用机制可能是 HSP60 和 Neuritin 的过表达及相互作用,调节细胞周期抑制受损肝细胞凋亡,辅助相关蛋白的跨膜转运,促进细胞增殖发育,维持组织可塑性。本研究将为进一步研究 Neuritin 和 HSP60 在肝损伤修复过程中的具体作用,以及机制奠定理论基础,为肝细胞受损后再生修复提供新思路。

参 考 文 献:

- [1] IERARDI A M, DUKA E, LUCCHINA N, et al. The role of interventional radiology in abdomino-pelvic trauma[J]. *British Journal of Radiology*, 2015, 89(1061): DOI: 10.1259/bjr.20150866.
- [2] 杨安力,郭志勇,何晓顺. 肝再生过程中信号转导研究现状与展望[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(10): 2022-2025.
- [3] NEDIVI E, HEVRONI D, NAOT D, et al. Numerous candidate plasticity-related genes revealed by differential cDNA cloning[J]. *Nature*, 1993, 363(6431): 718-722.
- [4] 罗星,张峪涵,于娜,等. 神经突起因子酵母双杂交诱饵质粒的构建和转化[J]. *中国公共卫生*, 2006, 22(4): 444-445.
- [5] 陆明,汤礼军,田伏洲,等. 大鼠肝脏撞击伤动物模型的制备及评价[J]. *创伤外科杂志*, 2010, 12(1): 60-63.
- [6] ZITO A, CARTELLI D, CAPPELLETTI G, et al. Neuritin 1 promotes neuronal migration[J]. *Brain Structure and Function*, 2014, 219(1): 105-118.
- [7] ZHANG Y, ZHANG S, XIAN L, et al. Expression and purification of recombinant human neuritin from *Pichia pastoris* and a partial analysis of its neurobiological activity in vitro[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(19): 8035-8043.
- [8] CARTLEDGE J C, ROLLAND C, LEMERLE S, et al. Novel cellular genes essential for transformation of endothelial cells by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus[J]. *Cancer Research*, 2005, 65(12): 5084-5095.
- [9] KOJIMA N, SHIOJIRI N, SAKAI Y, et al. Expression of neuritin during liver maturation and regeneration[J]. *FEBS Letters*, 2005, 579(21): 4562-4566.
- [10] CAPPELLO F, MARINO G A, PALUMBO P A, et al. Hsp60 chaperonopathies and chaperonotherapy: targets and agents[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2013, 18(2): 185-208.
- [11] SONG E, TANG S, XU J, et al. Lenti-siRNA Hsp60 promote bax in mitochondria and induces apoptosis during heat stress[J]. *Biochemical Biophysical Research Communications*, 2016, 481(1/2): 125-131.
- [12] GUPTA S, KNOWLTON A A. HSP60, Bax, apoptosis and the heart[J]. *Journal of Cellular Molecular Medicine*, 2005, 9(1): 51-58.
- [13] SHI Q, DONG Z, WEI H. The involvement of heat shock proteins in murine liver regeneration[J]. *Cellular Molecular Immunology*, 2007, 4(1): 53-57.

(童颖丹 编辑)