

免疫与感染

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.000101

Calpain2 及其抑制剂在肝纤维化细胞凋亡中的机制

谢汝佳, 韩冰, 杨婷, 邹河, 杨勤

(贵阳医学院病理生理教研室, 贵阳 550004)

【摘要】目的:探讨钙中性蛋白酶 2(calpain2)及其抑制剂 calpastatin 在肝纤维化过程中的表达变化及他们在肝细胞凋亡中的作用。**方法:**雄性 Wistar 大鼠 40 只,随机分为正常组 4、8 周组和肝纤维化 4、8 周组,每组各 10 只。肝纤维化组按 0.3 ml/100 g 体质量皮下注射 40% CCl₄ 植物油溶液,每隔 3 d 注射 1 次,造模时间分别为 4 周和 8 周;正常组大鼠皮下注射等量植物油溶液。采用原位末端转移酶标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)法检测肝组织中肝细胞凋亡的情况;免疫组织化学法及 Western blot 检测肝组织中 calpain2、calpastatin 及活性 caspase3 的表达情况;real-time PCR 检测肝组织中 calpain2 及 calpastatin mRNA 的表达变化。**结果:**免疫组化及 Western blot 检测显示肝纤维化 4 周组大鼠肝组织中 calpain2 及 calpastatin 蛋白的表达与正常 4 周组比较差异无统计学意义($P>0.05$);随着肝纤维化程度的加重,肝纤维化 8 周时大鼠肝组织中 calpain2 的表达明显增加,而 calpastatin 的表达明显减少;real-time PCR 检测发现肝纤维化 4、8 周组大鼠肝组织中 calpain2 mRNA 表达较相应的正常对照组明显增加($P<0.01$),而 calpastatin mRNA 的表达在肝纤维化 8 周组明显减少($P<0.01$);此外,通过免疫组化及 Western blot 发现肝组织中活性 caspase3 的表达在肝纤维化 4 周时已明显增加,肝纤维化 8 周时达高峰;同时 TUNEL 法检测发现肝纤维化大鼠肝组织中肝细胞凋亡的数目较正常组大鼠显著增加($P<0.01$)。**结论:**calpain2 与 calpastatin 在蛋白及基因水平的表达变化,提示他们可能参与了肝纤维化的发生发展过程,其致肝纤维化的机制可能与促进肝细胞的凋亡有关。

【关键词】肝纤维化;钙中性蛋白酶 2;calpastatin**【中图分类号】**R363**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2013-01-18

Mechanism of calpain 2 and its inhibitor calpastatin in the apoptosis of hepatic cells during liver fibrosis

Xie Rujia, Han Bing, Yang Ting, Zou He, Yang Qin

(Department of Pathophysiology, Guiyang Medical College)

【Abstract】Objective: To observe the changes in expressions of calpain2 and its inhibitor calpastatin during liver fibrosis and to explore their effects on apoptosis of hepatic cells. **Methods:** Forty male Wistar rats were randomly divided into four groups (4 weeks normal control group, 8 weeks normal control group, 4 weeks liver fibrosis group and 8 weeks liver fibrosis group), each group included 10 rats. Groups were induced by hypodermic injection of 40% CCl₄ every 3 d for 4 weeks and 8 weeks respectively, the dosage of CCl₄ is 0.3 ml/100 g body weight. Apoptosis of hepatic cells was detected by TUNEL. Additionally, protein expressions of calpain 2, calpastatin and activated caspase 3 were determined by immunohistochemistry and Western blot and mRNA expressions of calpain2 and calpastatin were determined by real-time PCR. **Results:** Results of immunohistochemistry and Western blot revealed that there was no difference in expressions of calpain 2 and calpastatin protein between 4 weeks fibrosis group and normal control group ($P>0.05$). In 8 weeks fibrosis group, expressions of calpain2 were increased obviously and expressions of calpastatin were decreased with the increase of liver fibrosis degree. Additionally, real-time PCR results revealed that expressions of calpain2 mRNA in 4 weeks and 8 weeks fibrosis groups were elevated compared with those in normal control group ($P<0.01$), while expressions of calpastatin mRNA were decreased in 8 weeks fibrosis group ($P<0.01$). Expressions of activated caspase3 protein in 4 weeks and 8 weeks fibrosis groups were increased compared with those in normal control group and the number of apoptotic cells were also elevated in fibrosis groups than in normal control group ($P<0.01$). **Conclusion:** Calpain2 and calpastatin may play important roles in the process of liver fibrosis. Their effects on fibrosis might be exerted through promoting the apoptosis of hepatic cells.

【Key words】liver fibrosis; calpain2; calpastatin

作者介绍: 谢汝佳, Email: Xierujia790319@163.com,

研究方向: 肝纤维化发病机制研究。

通信作者: 杨勤, Email: qinyang@gmc.edu.cn。

基金项目: 贵州省科技厅国际科技合作资助项目(编号: 黔科合外 G

字[2010]7016 号)。

优先出版: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13406/j.cnki.cyx.000101.html>

钙中性蛋白酶(calpain)属于半胱氨酸蛋白水解酶超家族成员之一,广泛分布于绝大多数哺乳动物组织中。Calpain 家族成员在细胞内发挥多种生理作用,涉及到细胞骨架的重塑、信号转导、细胞周期调控和凋亡等^[1]。Calpastatin 是细胞内专一抑制 calpain 活性的蛋白质,它可以识别 calpain 与钙结合后引起的构象变化并与其特异性结合,从而对活化的 calpain 产生抑制作用^[2]。目前国内外对 calpain 与肝脏疾病关系的研究主要集中在肝脏的缺血-再灌注损伤和化学药物所致的急性肝损伤方面,关于 calpain 与肝纤维化的关系及相关机制研究目前国内外尚无报道。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

清洁级雄性 Wistar 大鼠 40 只,体质量(160±20)g,购自贵阳医学院实验动物中心(许可证号:SCXK-(黔)2002-0001);calpain2 多克隆抗体购自美国 cell signaling technology 公司;calpastatin 多克隆抗体购自美国 santa cruz 公司;活性 caspase3 多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司;原位末端标记法(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, TUNEL)检测试剂盒由武汉博士德公司提供;免疫组化 Envision 二抗检测试剂盒购自上海基因科技有限公司;丙烯酰胺、过硫酸铵、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠及 Bradford 蛋白定量试剂盒均购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜及增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)化学发光试剂盒购自美国 Millipore 公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司;SYBR Green 购自大连宝生物工程有限公司;calpastatin, calpain2 及内参照引物 β -actin 委托上海捷瑞生物工程有限公司设计合成。引物序列如下: β -actin:上游 5'-GAGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3';下游 5'-CATCTGCTG-GAAGGTGGACA-3';calpain2:上游 5'-GGAAGAA GATGAA-GATGATGAG-3';下游 5'-TTGCTGA-GGTGGATGTTG-3';calpastatin:上游 5'-ACTCTCCTAACCTATGGG-3';下游 5'-CTTCTTTTGCTTTTGCCTC-3'。

1.2 动物分组与模型制备

实验动物适应性喂养 1 周后,随机分成 4 组,分别为正常组 4、8 周组和肝纤维化 4、8 周组,每组各 10 只。肝纤维化组按 0.3 ml/100 g 体质量的剂量皮下注射 40% CCl₄ 植物油溶液,每隔 3 d 注射 1 次,造模时间分别为 4 周和 8 周;正常组大鼠皮下注射等量植物油溶液。分别于相应时间点处死各组大鼠,留取血液及全部肝脏,每只大鼠取相同部位肝脏用 4%中性甲醛固定,剩余肝组织-80℃低温冰箱保存;血液 1 500 r/min 离心 10 min 后将血清置于-80℃低温冰箱保存。

1.3 各种实验指标的检测方法

1.3.1 肝组织病理学检查 4%中性聚甲醛固定后的肝组织石蜡包埋,常规组织切片,HE 染色后观察肝组织的病理变化。

1.3.2 TUNEL 法检测肝组织中肝细胞凋亡情况 严格按照

试剂盒说明书操作。在荧光显微镜下观察凋亡的细胞,以胞核发绿色荧光的细胞作为凋亡细胞,并计算凋亡指数。凋亡指数=(凋亡细胞数/细胞总数)×100%。

1.3.3 免疫组织化学技术检测肝组织中 calpain2, 活性 caspase3 蛋白表达 切片常规脱蜡水化,3% H₂O₂ 处理,加封闭液后,分别滴加兔抗大鼠 calpain2, caspase3 多克隆抗体(工作浓度为 1:100),4℃过夜。次日滴加羊抗兔 IgG,在 37℃孵育 30 min,二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)显色,苏木精复染。阴性对照以磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)缓冲液代替一抗。每个样本随机抽取 5 个高倍镜下视野,以细胞质黄染的细胞作为阳性表达的细胞,计算出阳性表达细胞占细胞总数的百分比。阳性细胞百分率=(阳性细胞数/细胞总数)×100%。

1.3.4 Western blot 检测肝组织中 calpain2, calpastatin, 活性 caspase3 表达情况 提取肝组织总蛋白并进行蛋白定量,十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE)电泳分离蛋白质后,采用全湿电转移装置将蛋白质分子转移到 PVDF 膜上,电转移结束后 PVDF 膜用 Tris-HCl 缓冲盐溶液(Tris-HCl buffer solution, TBS)洗涤 1 次(5 min/次),封闭缓冲液(5%脱脂奶粉)在室温下封闭 1 h。封闭完成后 Tris-HCl 缓冲盐溶液+吐温 20(Tris-HCl buffer solution+Tween 20, TBST)洗膜 3 次(5 min/次),然后将 PVDF 膜与一抗稀释液(calpain2 稀释浓度为 1:1 000, calpastatin 及 caspase3 的稀释浓度为 1:200)4℃封闭过夜。次日早上用 TBST 洗膜 3 次(5 min/次)后, PVDF 膜与二抗稀释液(1:4 000)在室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次(5 min/次),加入 ECL 化学发光试剂 A、B 液各 0.5 ml, 混匀,润透 PVDF 膜后室温作用 1 min。暗室中将 PVDF 膜迅速封入保鲜膜中, Kodak X 线 film 压片,放射自显影 1 min。X 线 film 置于显影液中 2~3 min, 定影液中 1.5 min, 清水冲洗晾干。

1.3.5 Real-time PCR 检测肝组织中 calpain2, calpastatin mRNA 表达 提取肝组织总 RNA 并进行定量,逆转录合成 cDNA,反应体系 20 μ l: 总 RNA 1 μ g, 5×PCR 缓冲液 4 μ l, 10 mmol/L dNTP 2 μ l, 10 μ mol/L Oligod(T) 1 μ l, RNase Inhibitor 1 μ l, MMLV 反转录酶 1 μ l, DEPC H₂O 补足体积。反应条件:25℃10 min, 48℃60 min, 95℃5 min。Real-time PCR 反应体系为 25 μ l: 反转录产物 2 μ l, 10 μ mol/L 上、下游引物各 1.0 μ l, 2×SYBR Green I 12.5 μ l, DEPC H₂O 补足体积。反应条件为 50℃2 min, 95℃10 min, 95℃15 s, 60℃1 min, 最后 2 步重复 40 个循环。以每例标本组织的目的片段与带内参片段的循环值(Ct 值)的比值作为该标本的基因表达的相对数值。

1.4 统计学处理

计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 统计软件(13.0 版)进行组间方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 肝组织病理学变化

各组大鼠肝组织经 HE 染色,光镜下可见正常 4 周、8 周组大鼠肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列,无胶原纤维

增生;肝纤维化 4 周组大鼠肝细胞脂肪样变明显,可见部分空泡样变,汇管区可见少量纤维结缔组织增生;肝纤维化 8 周组大鼠肝细胞脂肪样变严重,肝组织内有大量纤维结缔组织增生,肝小叶结构破坏,可见假小叶形成。各组大鼠肝脏病理学改变见图 1。

2.2 TUNEL 法检测肝组织中肝细胞凋亡情况

TUNEL 法检测肝细胞凋亡结果显示,正常 4 周、8 周组大鼠肝组织中仅有少量肝细胞发生凋亡;而肝纤维化 4 周、8 周组大鼠肝组织中肝细胞凋亡的数目明显增加,与正常对照组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。各组大鼠肝细胞凋亡情况见表 1、图 2。

表 1 免疫组化及 TUNEL 法检测大鼠肝组织中 calpain2、活性 caspase3 蛋白和肝细胞凋亡情况 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab.1 Expressions of calpain2, activated caspase3 protein and apoptosis of hepatic cells in liver tissues detected by immunohistochemistry and TUNEL ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	calpain2 (%)	caspase3 (%)	凋亡指数 (%)
正常 4 周组	8.28 ± 0.53	8.50 ± 1.75	2.22 ± 0.18
正常 8 周组	9.88 ± 1.59	8.18 ± 1.68	2.64 ± 0.32
肝纤维化 4 周组	11.16 ± 1.45	18.76 ± 3.54 ^a	11.24 ± 0.86 ^a
肝纤维化 8 周组	23.10 ± 3.77 ^{ab}	25.46 ± 4.77 ^{ab}	10.84 ± 0.36 ^a
F 值	47.94	34.31	494.84
P 值	0.000	0.000	0.000

注:a,与相应的正常组相比, $P<0.01$;b,与肝纤维化 4 周组相比, $P<0.01$

2.3 免疫组织化学技术检测肝组织中 calpain2、活性 caspase3 蛋白表达情况

免疫组织化学染色显示,正常 4 周、8 周组大鼠肝组织中 calpain2、活性 caspase3 蛋白表达量较少,仅在汇管区有少量表达;肝纤维化 4 周时,大鼠肝组织中 calpain2 表达有所增加,但与正常 4 周组比较差异无统计学意义($P>0.05$),而肝

组织中活性 caspase3 的表达则较正常 4 周组明显增加($P<0.01$);肝纤维化 8 周时,肝组织中 calpain2、活性 caspase3 的表达均较相应的正常组明显增多($P<0.01$)。大鼠肝组织中 calpain2 及活性 caspase3 阳性表达主要位于肝细胞细胞质内。各组大鼠肝组织中 calpain2、活性 caspase3 蛋白表达情况见表 1。

2.4 Western blot 检测肝组织中 calpain2、calpastatin 及活性 caspase3 蛋白表达情况

Western blot 结果显示,正常肝组织内有 calpain2 和活性 caspase3 的表达,但量较少,同时发现正常肝组织内也有一定的 calpastatin 表达;肝纤维化 4 周时,大鼠肝组织中 calpain2 与 calpastatin 的表达与正常 4 周组比较差异无统计学意义($P>0.05$),而活性 caspase3 的表达则明显增加($P<0.01$);到肝纤维化 8 周时,肝组织中 calpain2 和活性 caspase3 的表达均较正常 8 周组明显增多($P<0.01$),而 calpastatin 的表达则明显减少($P<0.05$)。各组大鼠肝组织中 calpain2、calpastatin 及活性 caspase3 蛋白表达情况见表 2、图 3。

表 2 Western blot 检测大鼠肝组织中 calpain2、calpastatin 及活性 caspase3 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab.2 Expressions of calpain2, calpastatin and activated caspase3 in liver tissues detected by Western blot ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	calpain2/ β-actin	calpastatin/ β-actin	caspase3/ β-actin
正常 4 周组	0.50 ± 0.18	0.50 ± 0.16	0.16 ± 0.02
正常 8 周组	0.59 ± 0.21	0.53 ± 0.23	0.22 ± 0.02
肝纤维化 4 周组	0.57 ± 0.19	0.52 ± 0.21	0.38 ± 0.03 ^a
肝纤维化 8 周组	1.26 ± 0.20 ^{ab}	0.17 ± 0.07 ^{cd}	0.43 ± 0.03 ^a
F 值	9.74	2.79	78.15
P 值	0.005	0.041	0.000

注:a,与相应的正常组相比, $P<0.01$;b,与肝纤维化 4 周组相比, $P<0.01$;c,与相应的正常组相比, $P<0.05$;d,与肝纤维化 4 周组相比, $P<0.05$

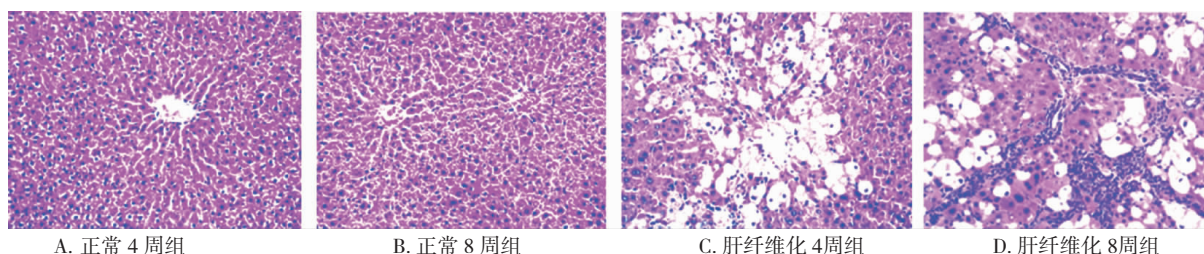
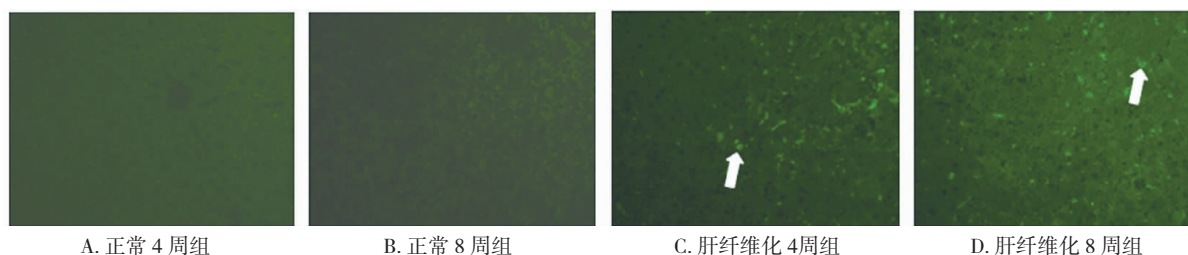


图 1 HE 染色显示各组大鼠肝组织病理学改变 (400 ×)

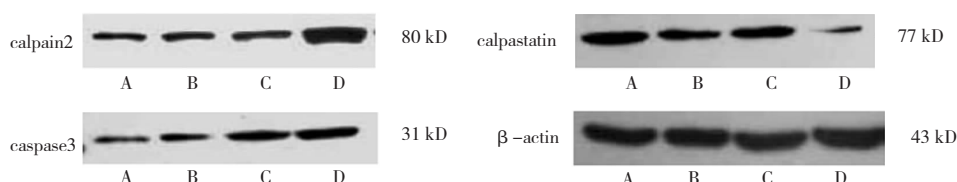
Fig.1 Pathological changes of rat liver tissues in all groups detected by HE staining (400 ×)



箭头所指凋亡细胞的细胞核

图 2 TUNEL 法显示各组大鼠肝细胞凋亡情况 (400 ×)

Fig.2 Apoptosis of rat hepatic cells in all groups detected by TUNEL (400 ×)



A. 正常 4 周组; B. 正常 8 周组; C. 肝纤维化 4 周组; D. 肝纤维化 8 周组

图 3 Western blot 显示各组大鼠肝组织 calpain2、calpastatin 及活性 caspase3 的表达

Fig.3 Expressions of calpain2, calpastatin and activated caspase3 in liver tissues detected by Western blot

2.5 Real-time PCR 检测肝组织中 calpain2、calpastatin mRNA 表达情况

Real-time PCR 结果显示,肝纤维化 4 周、8 周组大鼠肝组织中 calpain2 mRNA 的表达较相应的正常对照组明显增高,差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);与相应的正常对照组比较,肝纤维化 4 周组大鼠肝组织中 calpastatin mRNA 的表达无明显减少 ($P > 0.05$),而肝纤维化 8 周时,大鼠肝组织中 calpastatin mRNA 的表达则显著下降 ($P < 0.01$)。各组大鼠肝组织中 calpain2、calpastatin mRNA 表达情况见表 3。

表 3 Real-time PCR 检测大鼠肝组织中 calpain2、calpastatin mRNA 表达情况 ($\bar{x} \pm s, n=4$)Tab.3 Expressions of calpain2 and calpastatin mRNA in liver tissues detected by real-time PCR ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	calpain2	calpastatin
正常 4 周组	93.97 $\pm$ 34.73	111.87 $\pm$ 37.62
正常 8 周组	82.94 $\pm$ 26.58	106.96 $\pm$ 18.44
肝纤维化 4 周组	173.63 $\pm$ 28.60 ^a	87.36 $\pm$ 10.46
肝纤维化 8 周组	167.93 $\pm$ 50.39 ^a	42.80 $\pm$ 10.22 ^{ab}
F 值	6.93	8.04
P 值	0.006	0.003

注:a,与相应的正常组相比, $P < 0.01$;b,与肝纤维化 4 周组相比, $P < 0.01$

3 讨论

Calpain 属于半胱氨酸蛋白水解酶超家族成员之一,迄今为止,已经在哺乳动物细胞内先后发现了 14 种 calpain 家族蛋白酶^[3]。目前,研究最多的是 calpain1 和 calpain2,这 2 个同工酶的作用底物基本相同,但两者表现出最高活性所需的 Ca^{2+} 浓度不同,前者只需微摩尔浓度 Ca^{2+} 就可激活,而后者需要毫摩尔浓度 Ca^{2+} 才能激活^[4]。由于细胞内 Ca^{2+} 浓度波动在微摩尔水平以下,所以 calpain2 可能在病理情况下才能激活。Calpain 的作用受到其内源性特异性抑制剂 calpastatin 的调节。研究发现 calpastatin 可通过其 C 末端的 1、4 结构域结合 calpain,从而抑制其活性;同时它还可通过其特定的氨基酸序列调节 Ca^{2+} 通道的启闭来调控 calpain 的活性^[2]。目前的研究表明,calpain-calpastatin 蛋白酶系统的异常与细胞凋亡之间有着密切的关系^[5]。在小鼠 HL-1 心肌细胞系中研究 TNF- α 诱导的细胞凋亡时发现,calpain 可激活特异性定位于内质网的 caspase12^[6],活化的 cas-

pase12 可进一步激活下游的效应 caspase3,从而引起细胞凋亡的发生。calpain 激活 caspase3 后,活性 caspase3 水解 calpain 的特异性抑制物 calpastatin,反过来增加 calpain 活性,从而促进细胞凋亡的发生^[6]。因此,细胞内 calpain-calpastatin 蛋白酶系统与 caspase 家族之间的这种交互作用,在一定病理因素的作用下,形成恶性循环,从而加速细胞凋亡的过程。

本研究发现,肝纤维化 4 周时,calpain2 及 calpastatin 的表达与正常 4 周组比较无显著变化;但随着肝纤维化的进展,到肝纤维化 8 周时,calpain2 在蛋白及基因水平的表达均明显增高,而 calpastatin 在蛋白及基因水平的表达则显著减少。此外,本研究还发现肝组织中活性 caspase3 蛋白的表达在肝纤维化 4、8 周组均较正常组明显增加,同时肝纤维化大鼠肝组织中肝细胞凋亡的数目也是显著增加的。上述研究结果提示,calpain2 的表达变化可能参与了肝纤维化过程中肝细胞凋亡的发生,其机制可能与 calpain2 激活特异定位于内质网上的 caspase12,并进一步激活其下游的 caspase3,从而引起肝细胞的凋亡有关。由于肝纤维化过程中,尤其是肝纤维化 8 周时 calpastatin 的表达显著减少,使得它对 calpain2 活性的抑制作用减弱,因此可进一步加速肝细胞凋亡的过程。

参 考 文 献

- [1] 吴金兰,万福生.钙蛋白酶与心血管疾病的关系[J].生命的化学,2011,31(1):102-106.
- [2] 邹荣琪,李国平.钙蛋白酶及其抑制蛋白研究进展[J].中国运动医学杂志,2007,26(6):767-769.
- [3] 李明辉,陈瑞珍.Calpain 与心肌细胞凋亡[J].中国病理生理杂志,2009,25(7):1438-1440.
- [4] Zhao WJ, Shi ZF, Yuan F. μ - and m-calpain expression and activity changes following diethylstilbestrol injection in the rat anterior pituitary [J]. Neural Regen Res, 2011, 6(1):60-65.
- [5] 程刚,徐耕,单江,等.钙依赖中性蛋白酶和半胱天冬酶-3 在辛伐他汀诱导大鼠血管平滑肌细胞凋亡中的作用[J].中国病理生理杂志,2003,19(9):1189-1192.
- [6] Bajaj G, Sharma RK. TNF- α -mediated cardiomyocyte apoptosis involves caspase-12 and calpain [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 345(4):1558-1564.

(责任编辑:关蕴良)