

β -arrestin2 在内毒素诱导的肝脏损伤中的作用

蒋梦萍 榻婕滢 徐春 罗千江 尉秀清

【摘要】 目的 探讨 β -arrestin2 在内毒素诱导的肝脏损伤中的作用机制。**方法** 建立内毒素诱导的肝脏损伤模型, 将 β -arrestin2 基因敲除型 (KO) 小鼠 20 只及同窝 β -arrestin2 野生型 (WT) 小鼠 20 只分别随机分成实验组及对照组 ($n=10$), 实验组腹腔内注射脂多糖 (5 mg/kg), 而对照组注射等量生理盐水, 6 h 后留小鼠血清和肝脏组织标本。实时定量 PCR 检测小鼠体内 β -arrestin2 表达量, ELISA 检测各组小鼠血清中 ALT、AST 及 TNF- α 水平, 蛋白免疫印迹法检测各组 β -arrestin2、p-p65 及 p-I κ B α 蛋白的表达。**结果** β -arrestin2 WT 实验组肝脏组织中 β -arrestin2 mRNA 为 0.18 ± 0.06 , 明显低于正常对照组的 1.00 ± 0.29 ($t = -4.669$, $P < 0.001$), β -arrestin2 蛋白表达也明显低于 WT 对照组; β -arrestin2 KO 实验组血清 ALT 为 (204.33 ± 22.33) U/L、AST 为 (403.40 ± 53.45) U/L, 明显高于 β -arrestin2 WT 实验组 ALT 的 (129.33 ± 9.69) U/L 和 AST (256.20 ± 40.47) U/L ($t = 7.55$ 、 6.94 , P 均 < 0.001)。 β -arrestin2 KO 实验组血清 TNF- α 为 (155.89 ± 14.89) pg/L, 明显高于 WT 实验组的 (101.36 ± 10.65) pg/L ($t = 9.25$, $P < 0.001$)。 β -arrestin2 KO 实验组肝脏组织中 p-I κ B α 及 p-p65 的蛋白表达量明显高于 β -arrestin2 WT 实验组。**结论** β -arrestin2 可能通过抑制 NF- κ B 活化、减少 TNF- α 释放从而减轻内毒素诱导的炎症反应, 在内毒素诱导的肝脏损伤中起保护作用。

【关键词】 内毒素诱导的肝脏损伤; β -arrestin2; TLR4/NF- κ B/TNF- α 信号通路

Effect of β -arrestin2 in endotoxin-induced liver injury Jiang Mengping, Xuan Jieying, Xu Chun, Luo Qianjiang, Wei Xiuqing. Department of Gastroenterology, the Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China

Corresponding author, Wei Xiuqing, E-mail: wei-xiuqing@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the mechanism of the function of β -arrestin2 in the endotoxin-induced liver injury. **Methods** Endotoxin-induced liver injury mouse models were established. Twenty β -arrestin2 knockout (KO) mice and twenty β -arrestin2 wild-type (WT) littermates were randomly divided into the experimental and control groups ($n=10$). In the experimental group, liver injury was induced by intraperitoneal injection of 5 mg/kg of lipopolysaccharide, and the control mice were administered with an equivalent quantity of normal saline. Six hours later, serum sampling and liver tissue were collected. The expression of β -arrestin2 in the mouse liver was measured by quantitative real-time PCR. The serum levels of ALT, AST and TNF- α were detected by ELISA. The expression of β -arrestin2, p-p65 and p-I κ B α proteins was determined by Western blot. **Results** The expression level of β -arrestin2 mRNA in the β -arrestin2 WT group was 0.18 ± 0.06 , significantly lower than 1.00 ± 0.29 in the control group ($t = -4.669$, $P < 0.001$). The expression of β -arrestin2 protein was also obviously down-regulated. In the β -arrestin2 KO group, the values of ALT and AST were (204.33 ± 22.33) U/L and (403.40 ± 53.45) U/L, significantly higher compared with (129.33 ± 9.69) U/L and (256.20 ± 40.47) in the β -arrestin2 WT group ($t = 7.55$, $P < 0.001$; $t = 6.94$, $P < 0.001$). The serum level of TNF- α in the β -arrestin2 KO group was (155.89 ± 14.89) pg/L, significantly higher than (101.36 ± 10.65) pg/L in the β -arrestin2 WT group ($t = 9.25$, $P < 0.001$). In the β -arrestin2 KO group, the expression of p-I κ B α and p-p65 proteins within the mouse liver was significantly higher compared with that in the β -arrestin2 WT group. **Conclusion** β -arrestin2 alleviates endotoxin-induced inflammatory response probably inhibiting the activation of NF- κ B and reducing the production of TNF- α , which plays a

protective role in endotoxin-induced liver injury.

【Key words】 Endotoxin-induced liver injury; β -arrestin2; TLR4/NF- κ B/TNF- α signaling pathway

内毒素本质是革兰阴性细菌细胞壁上的脂多糖,当细菌裂解或其黏附在其他细胞上时脂多糖可释放出来。脂多糖是机体内诱发炎症反应的主要致病成分。肝脏既是清除内毒素的场所,也是内毒素血症过程中最易受损的器官之一。内毒素诱导的肝脏损伤是多种肝病的主要病理基础^[1-2]。现有的大量研究表明,肝脏枯否细胞内激活多种信号通路诱发的炎症反应是内毒素诱导的肝脏损伤的关键机制^[3]。 β -arrestin2 是 Arrestins 家族中成员之一,广泛表达于哺乳动物的各种组织细胞中,尤其是免疫系统; β -arrestin2 可作为负调控因子介导受体脱敏和内吞^[4]。除此之外, β -arrestin2 可作为“鹰架”蛋白,参与多种信号通路^[5-6]。本研究旨在观察 β -arrestin2 在内毒素诱导的肝脏损伤中的生物学作用,并探讨其可能的作用机制。

材料与方法

一、实验动物

C57BL/6J 背景的 β -arrestin2^{+/-} 雌雄配对小鼠由美国杜克大学医学中心 Robert J. Lefkowitz 教授馈赠,在中山大学附属第三医院疫苗研究所动物中心按 SPF 级培育,该动物实验获得该院医学伦理委员会批准。

二、实验试剂和仪器

1. 主要实验试剂及抗体

脂多糖 (Sigma, US), ALT 试剂盒 (Cusabio, 武汉), AST 试剂盒 (Cusabio, 武汉), TNF- α ELISA 试剂盒 (Cusabio, 武汉), 蛋白质定量试剂盒 (Genstar, 北京), 组织 RNA 提取试剂盒 (Magen, 北京), qPCR 逆转录试剂盒 (TOYOBO, 上海), 30% 丙烯酰胺 (BIO-RAD, US), 过硫酸钠 (BIO-RAD, US), TEMED (BIO-RAD, US), β -arrestin2 抗体 (美国杜克大学医学中心 Robert J. Lefkowitz 教授馈赠), p-p65 抗体 (Cell Signaling Technology, US), p65 (Santa Cruz, US), p-I κ B α (Santa Cruz, US), I κ B α (Santa Cruz, US), GAPDH (Santa Cruz, US) 等。

2. 主要仪器

低温高速冷冻离心机 (Eppendorf 公司, Germany), SDS-PAGE 电泳槽 (BIO-RAD, US), 转膜仪 (BIO-RAD, US), PCR 仪 (Labnet, US),

Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计 (Thermo Scientific, US) 等。

三、实验方法

1. 内毒素诱导的肝脏损伤模型建立

选取 6~8 周龄 (22~25 g) 的雄性 β -arrestin2 基因敲除型 (KO) 小鼠 20 只及同窝来源的 β -arrestin2 野生型 (WT) 雄性小鼠 20 只,分别将它们随机分成实验组和对照组,每组 10 只。实验组小鼠腹腔注射 5 mg/kg 脂多糖,对照组小鼠注射等量的生理盐水。

2. 标本采集与处理

6 h 后,10% 水合氯醛麻醉后行开腹手术,腹腔下静脉取血,迅速取肝脏组织,将部分肝脏组织放入 10% 中性福尔马林中固定制作石蜡标本,剩余部分保存于液氮中,待提取蛋白质或 RNA;血浆在室温静置 1 h 后离心留血清保存于 -80℃。

3. ELISA 检测 ALT、AST 及 TNF- α 水平

根据各试剂盒说明书,检测各组血清中 ALT、AST 及 TNF- α 水平。

4. 肝脏组织 RNA 提取及逆转录

取适量肝脏组织,按组织 RNA 提取试剂盒说明书进行提取 RNA,并用 Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计测定 RNA 浓度及纯度,再根据 qPCR 逆转录试剂盒合成 cDNA。

5. 肝脏组织蛋白提取及蛋白质电泳

取适量肝脏组织,按蛋白质提取裂解液说明书提取组织总蛋白,并用 BCA 法检测蛋白浓度。分装蛋白并进行 SDS-聚丙烯酰胺 (SDS-PAGE) 凝胶电泳,转膜 (PVDF 膜)、封闭后,用相应目的蛋白的抗体孵育,4℃ 冰箱摇床过夜,其中对总蛋白分别用抗 β -arrestin2、p-p65、p65、p-I κ B α 、I κ B α 的一抗孵育。次日复温 30 min 后,HRP 标记的二抗孵育 2 h,暗房曝光。

四、统计学处理

应用 SPSS 20.0 软件进行相关数据统计学分析。所有计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 2 组独立样本 t 检验进行假设检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、 β -arrestin2 WT 小鼠在腹腔注射脂多糖后

实验组与对照组肝脏组织中 β -arrestin2 水平比较

腹腔注射脂多糖 6 h 后观察, 实验组小鼠均活动减弱, 体毛寒立, 蜷曲姿势, 眼睛可见脓性分泌物, 解剖时见肝脏肿胀较对照组略大。通过提取肝脏组织 RNA, 再检测 β -arrestin2 的表达量, 实验发现 β -arrestin2 WT 小鼠腹腔注射脂多糖后肝脏组

织中 β -arrestin2 mRNA 表达量 0.18 ± 0.06 , 对照组 1.00 ± 0.29 , 实验组比对照组低, 此差异有统计学意义 ($t = -4.669$, $P < 0.001$, 图 1A)。进一步提取肝脏组织蛋白, 通过蛋白免疫印迹法检测, 发现小鼠在腹腔注射脂多糖后肝脏组织中 β -arrestin2 蛋白水平也明显下降 (图 1B)。

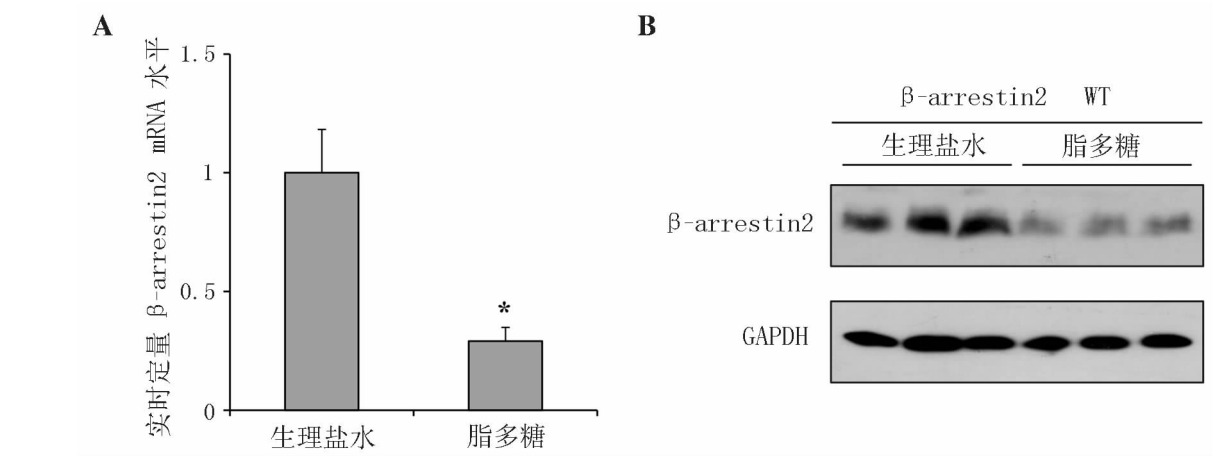


图 1 β -arrestin2 WT 小鼠注射脂多糖 6 h 后肝脏组织中 β -arrestin2 水平变化

A: β -arrestin2 WT 实验组与对照组肝脏 β -arrestin2 mRNA 水平比较, * $P < 0.05$; B: 蛋白免疫印迹电泳图 β -arrestin2 KO 小鼠注射脂多糖后肝脏损伤加重

β -arrestin2 KO 实验组的 ALT、AST 高于 β -arrestin2 WT 实验组, 差异均有统计学意义 ($t = 7.55$, $P < 0.001$; $t = 6.94$, $P < 0.001$)。 β -arrestin2 KO 实验组血清 TNF- α 为 (155.89 ± 14.89)

pg/L, 而其 β -arrestin2 WT 实验组血清中 TNF- α 为 (101.36 ± 10.65) pg/L, 前者分泌更多 TNF- α ($t = 9.25$, $P < 0.001$), 见表 1。

表 1		各组小鼠肝脏损伤情况比较				
组 别	<i>n</i>	时间(h)	ALT(U/L)	AST(U/L)	TNF- α (pg/L)	
β -arrestin2 KO 实验组	10	6	204.33 ± 22.33^{ab}	403.40 ± 53.45^{ab}	155.89 ± 14.89^{ab}	
β -arrestin2 KO 对照组	10	6	47.83 ± 6.31	38.91 ± 12.59	41.02 ± 5.80	
β -arrestin2 WT 实验组	10	6	129.33 ± 9.69^c	256.20 ± 40.47^c	101.36 ± 10.65^c	
β -arrestin2 WT 对照组	10	6	50.00 ± 4.76	37.11 ± 9.71	39.88 ± 5.84	

注: 与 β -arrestin2 KO 对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与 β -arrestin2 WT 实验组比较, ^b $P < 0.01$; 与 β -arrestin2 WT 对照组比较, ^c $P < 0.01$

二、 β -arrestin2 WT 组和 KO 组注射脂多糖 6 h 后肝脏损伤指标比较

比较 β -arrestin2 WT 实验组与 β -arrestin2 KO 实验组的肝脏组织中 p-I κ B α 及 p-p65 蛋白的表达量, 我们发现 β -arrestin2 KO 实验组高于 β -arrestin2 WT 实验组 (图 2)。

讨 论

有关肝脏损伤的研究仍是生物学领域的研究热点之一, 而其中内毒素诱导的肝脏损伤是许多其他肝脏疾病的主要病理基础。大量研究表明, 肝脏枯否细胞是肝脏内产生炎症递质的主要来源, 它是机

体防御内源性、外源性感染的重要效应细胞。脂多糖的受体是 Toll 样受体 4 (TLR4), 它在枯否细胞的细胞膜上大量表达, 当脂多糖与其受体 TLR4 结合后可引发枯否细胞内一系列的信号通路激活从而诱导炎症反应^[7]。激活后的枯否细胞可释放多种炎症介质, 间接作用于肝细胞而引起肝细胞的坏死、凋亡和损伤^[8]。其中, TLR4/NF- κ B 信号通路激活是内毒素诱导的肝脏损伤的重要机制之一, TNF- α 一方面诱导中性粒细胞在肝内聚集, 另一方面又可诱导激活肝内凝血系统, 进一步加重肝脏损伤。

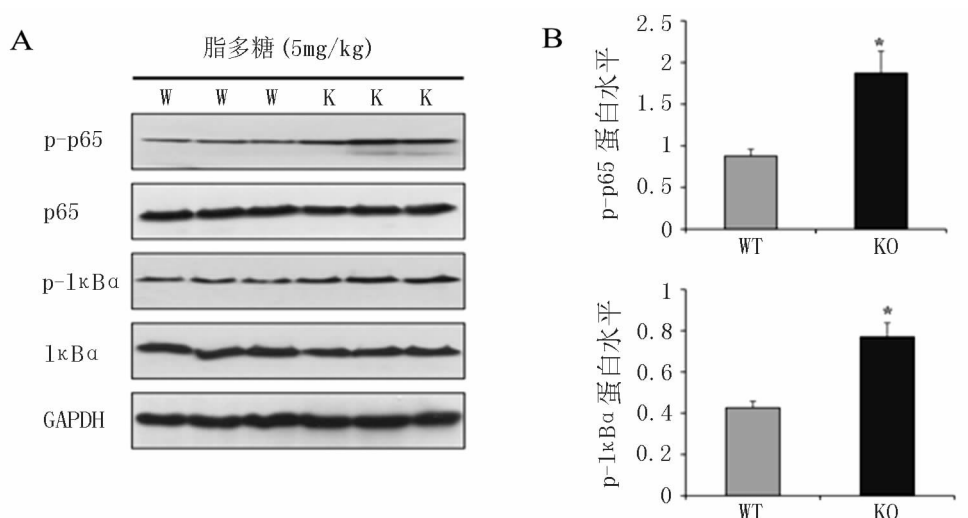


图2 β -arrestin2 WT 实验组与 β -arrestin2 KO 实验组肝脏组织中 p-I κ B α 及 p-p65 蛋白表达水平比较
A: 蛋白免疫印迹电泳图; B: p-I κ B α 、p-p65 灰度值分析, 与 β -arrestin2 WT 实验组比较, * $P < 0.05$

β -arrestin2 最早被发现是作为 G 蛋白偶联受体信号通路的重要负性调节因子, 可介导细胞膜表面多种受体的脱敏和内吞作用。实际上, β -arrestin2 是一种多功能“鹰架”蛋白。有研究发现 β -arrestin2 可以与 I κ B α 结合进一步干扰 I κ B α 的磷酸化、降解和抑制 NF- κ B 活化。另外有研究指出, 在脂多糖或 IL-1 β 刺激下, β -arrestins 能直接结合肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6) 而阻止后者的寡聚化和泛素化。TRAF6 和 I κ B α 都是 TLR4/NF- κ B 信号通路中重要的信号分子; 我们以此推测 β -arrestin2 可以负性调控 TLR4/NF- κ B 信号通路。在本实验中, 我们的结果显示 β -arrestin2 WT 小鼠在腹腔内注射脂多糖 (5 mg/kg) 6 h 后, 肝脏组织 β -arrestin 2 mRNA 和蛋白表达均明显下降; 接着我们发现 β -arrestin2 KO 实验组的炎症因子表达量高于 β -arrestin2 WT 实验组, 而且前者的血清 ALT、AST 和 TNF- α 含量都高于后者, 这说明了 β -arrestin2 KO 实验组的肝脏损伤情况比 β -arrestin2 WT 实验组的严重。 β -arrestin2 在内毒素诱导的肝脏损伤中起保护作用, 在肝脏损伤过程, β -arrestin2 表达受到抑制, 进而内毒素引起的炎症反应更加强烈。同时, 我们的结果分析提示了 β -arrestin2 起保护作用的机制可能与抑制 NF- κ B 磷酸化和核内移、减少 TNF- α 释放有关。

综上所述, β -arrestin2 在内毒素诱导的肝脏损伤中起保护作用, 其机制可能是抑制了 NF- κ B 活化, 减少促炎因子 TNF- α 释放, 进而抑制内毒素诱导的炎症反应放大, 但具体的分子机制尚需进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] Enomoto N, Ikejima K, Bradford BU, Rivera CA, Kono H, Goto M, Yamashina S, Schemmer P, Kitamura T, Oide H, Takei Y, Hirose M, Shimizu H, Miyazaki A, Brenner DA, Sato N, Thurman RG. Role of Kupffer cells and gut-derived endotoxins in alcoholic liver injury. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 15 (Suppl): D20-D25.
- [2] Kudo H, Takahara T, Yata Y, Kawai K, Zhang W, Sugiyama T. Lipopolysaccharide triggered TNF- α -induced hepatocyte apoptosis in a murine non-alcoholic steatohepatitis model. *J Hepatol*, 2009, 51 (1): 168-175.
- [3] Li JD, Peng Y, Li Q, Xiao JW, Gong JP, Liu ZJ. Potential protective effect of nuclear factor-kappaB decoy oligodeoxynucleotides on endotoxin-induced liver injury. *Transplant Proc*, 2011, 43 (10): 3613-3617.
- [4] Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 2005, 308 (5721): 512-517.
- [5] Gao H, Sun Y, Wu Y, Luan B, Wang Y, Qu B, Pei G. Identification of beta-arrestin2 as a G protein-coupled receptor-stimulated regulator of NF-kappaB pathways. *Mol Cell*, 2004, 14 (3): 303-317.
- [6] DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*, 2007, 69: 483-510.
- [7] 何卉欣, 蒋梦萍, 刘慧玲, 江洁, 尉秀清. 阻断 TLR4 信号通路对结肠癌细胞 CT26 裸鼠种植瘤生长和凋亡的影响. *新医学*, 2015, 46 (4): 216-220.
- [8] Hoque R, Farooq A, Ghani A, Gorelick F, Mehal WZ. Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor-and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity. *Gastroenterology*, 2014, 146 (7): 1763-1774.

(收稿日期: 2015-11-06)

(本文编辑: 杨江瑜)