

李盼盼,符健,陈伟,等. 前列地尔对暴发性肝衰竭大鼠 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路及肝功能的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 55-62.

Li PP, Fu J, Chen W, et al. Effects of alprostadiol on the eIF2 α /ATF4/CHOP pathway and liver function in rats with fulminant hepatic failure [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 55-62.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 008

前列地尔对暴发性肝衰竭大鼠 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路及肝功能的影响

李盼盼^{1*}, 符 健¹, 陈 伟², 陈 丽¹

(1.海南省人民医院(海南医学院附属海南医院)感染科,海口 570100;2.海南医学院第二附属医院药学部,海口 570100)

【摘要】 目的 探究前列地尔(PGE1)对暴发性肝衰竭(FHF)大鼠对肝功能的影响,并探讨其对真核翻译起始因子 2 α (eIF2 α)/激活转录因子 4(ATF4)/C/EBP 同源蛋白(CHOP)通路的调控作用。**方法** SPF 级 SD 雄性大鼠 90 只按随机数表法分为对照组、模型组、阳性对照组、低、中、高剂量 PGE1 组,除对照组外,其它组大鼠均采用腹腔注射 D-氨基半乳糖(D-GalN)-大肠杆菌内毒素脂多糖(LPS)的方法建立 FHF 大鼠模型,对照组腹腔注射等量的生理盐水。造模 6 h 后,阳性对照组及低、中、高剂量 PGE1 组分别尾静脉注射促肝细胞生长素 1.36 mg/kg, PGE1 12.5、25、37.5 μ g/kg,每天 1 次,连续给药 3 d,对照组和模型组尾静脉注射等量的生理盐水。在造模 72 h 后处死大鼠,腹主动脉采血,检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)水平;解剖取肝组织用苏木精-伊红(HE)染色法观察各组大鼠肝组织病理学变化;采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和蛋白免疫印迹(Western blot)法检测肝组织中 eIF2 α /ATF4/CHOP/半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)mRNA 和蛋白、磷酸化-eIF2 α (p-eIF2 α)蛋白水平。**结果** 与对照组相比,模型组肝细胞广泛变性并有局灶性坏死,中央静脉受损,血清 ALT、AST、TBIL,肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组、低、中、高剂量 PGE1 组肝细胞损害有所降低,坏死细胞数量减少,血清 ALT、AST、TBIL 水平,肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平降低($P<0.05$);且随着 PGE1 给药剂量的增加,低、中、高剂量 PGE1 组血清 ALT、AST、TBIL 水平,肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平依次降低($P<0.05$),呈剂量依赖性;与阳性对照组相比,低、中剂量 PGE1 组血清 ALT、AST、TBIL 水平,肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平均升高($P<0.05$),高剂量 PGE1 组血清 ALT、AST、TBIL 水平,肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** PGE1 可能通过抑制 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路表达,减轻大鼠肝细胞凋亡,达到保护肝的作用,可能作为 FHF 潜在的治疗药物。

【关键词】 前列地尔;暴发性肝功能衰竭;大鼠;真核翻译起始因子 2 α ;激活转录因子 4;C/EBP 同源蛋白

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0055-08

Effects of alprostadiol on the eIF2 α /ATF4/CHOP pathway and liver function in rats with fulminant hepatic failure

LI Panpan^{1*}, FU Jian¹, CHEN Wei², CHEN Li¹

(1. Department of Infection, Hainan Provincial People's Hospital (Hainan Hospital Affiliated to Hainan Medical College), Haikou 570100, China. 2. Department of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570100)

【基金项目】 海南省卫生计生行业科研项目(18A200189)。

【作者简介】 李盼盼(1988—), 硕士, 主治医师, 研究方向: 各类肝病的基础和临床研究。E-mail: yangyaowu19621@163.com

[Abstract] Objective To investigate the effects of prostaglandin E1 (PGE1) on liver function in rats with fulminant hepatic failure (FHF), and to explore its regulatory effects on the eukaryotic translation-initiation factor 2 α (eIF2 α)/activating transcription factor 4 (ATF4)/C/EBP homologous protein (CHOP) pathway. **Methods** Overall, 90 specific pathogen-free Sprague-Dawley rats were divided into control, model, positive control, low-, medium-, and high-dose PGE1 groups according to the random number table method. Except for the control group, all rats were intraperitoneally injected with D-galactosamine (D-GalN)-lipopolysaccharide (LPS) to establish the FHF rat model, and the control group received an intraperitoneal injection of the same volume of normal saline. At 6 hours after modeling, the positive control group and low-, medium-, and high-dose PGE1 groups were administered a tail vein injection of 1.36 mg/kg hepatocyte growth promoting factor and 12.5, 25, or 37.5 μ g/kg PGE1, respectively, once a day for 3 consecutive days. The control group and the model group were administered a tail vein injection of the same volume of normal saline. The rats were euthanized at 72 hours after modeling and abdominal aorta blood was collected. The serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), and total bilirubin (TBIL) were measured. Liver tissues were dissected and stained with hematoxylin and eosin (HE) to observe pathological changes. mRNA and protein levels of eIF2 α /ATF4/CHOP/caspase-3 were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) and Western blot was used to measure phosphorylated-eIF2 α (p-eIF2 α) protein levels. **Results** Compared with the control group, hepatocytes in the model group showed extensive degeneration and focal necrosis, and the central venous was damaged. The levels of ALT, AST, and TBIL in serum, mRNA levels of eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3, and protein levels of p-eIF2 α /eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 in liver tissues were higher ($P < 0.05$). Compared with the model group, the damage to hepatocytes and the number of necrotic cells were decreased in the positive control, low-, medium-, and high-dose PGE1 groups. The levels of ALT, AST, and TBIL in serum, mRNA levels of eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 and protein levels of p-eIF2 α /eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 in liver tissues were lower ($P < 0.05$). With an increase in PGE1 dosage, the levels of ALT, AST, and TBIL in serum, mRNA levels of eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 and protein levels of p-eIF2 α /eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 in the liver tissues of low-, medium-, and high-dose PGE1 groups were decreased ($P < 0.05$) dose-dependently. Compared with the positive control group, the levels of ALT, AST, and TBIL in serum, mRNA levels of eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 and protein levels of p-eIF2 α /eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 in the liver tissues of the low- and medium-dose PGE1 groups were higher ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in the levels of ALT, AST, and TBIL in serum, mRNA levels of eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 and protein levels of p-eIF2 α /eIF2 α , ATF4, CHOP, and caspase-3 in liver tissues between the positive control group and the high-dose PGE1 group ($P > 0.05$). **Conclusions** PGE1 may reduce the apoptosis of rat hepatocytes and protect the liver by inhibiting the expression of the eIF2 α /ATF4/CHOP pathway, which may be a potential therapeutic target for FHF.

[Keywords] alprostadil; fulminant hepatic failure; rat; eukaryotic translation-initiation factor 2 α ; activating transcription factor 4; C/EBP homologous protein

暴发性肝功能衰竭 (fulminant hepatic failure, FHF) 是一种以急性严重肝损害为特征的临床综合征, 又称为暴发性肝炎或急性肝衰竭^[1]。FHF 主要表现为肝细胞短时间内出现大面积坏死及凋亡, 肝功能出现严重失代偿, 导致严重并发症^[2]。肝细胞凋亡可由细胞内或细胞外信号通路触发, 如 DNA 损伤、氧化应激和内质网应激 (endoplasmic reticulum stress, ERS) 等。已知 ERS 出现在多种肝病中, 如病毒性肝炎、药物性肝损伤、心脏缺血再灌注损伤等^[3-5]。当内质网的稳态在病理条件下受到干扰时, 未折叠的蛋白质反应 (unfolded protein reaction, UPR) 被激活, UPR 进一步激活 ERS 相关蛋白, ERS

相关蛋白包括真核翻译起始因子 2 α (eukaryotic translation-initiation factor 2 α , eIF2 α)、激活转录因子 4 (activating transcription factor 4, ATF4) 和 C/EBP 同源蛋白 (C/EBP homologous protein, CHOP), eIF2 α /ATF4/CHOP 通路在 ERS 和 UPR 条件下, 可诱导肝细胞凋亡^[6]。研究发现, eIF2 α /ATF4/CHOP 通路在抗肿瘤中具有重要作用, 地兰佐米可通过诱导 ERS 并激活 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路, 促进肝癌细胞的凋亡, 表现出良好的临床抗肿瘤作用^[7]。前列地尔即前列腺素 E1 (Prostaglandin E1, PGE1), 是一种血管活性药物, 具有扩血管、改善微循环障碍的作用^[8]。研究发现, PGE1 有助于缓解肝硬化患

者炎症状态,改善肝功能,提高临床疗效^[9]。Guo 等^[6]研究还指出,PGE1 具有防止 ERS 诱导的肝细胞凋亡的功能。研究发现,促肝细胞生长素可改善急性慢性肝炎患者肝功能指标,缩短治疗时间,用药安全^[10],因此,本研究将其作为阳性对照药物。因此本研究通过制备 FHF 大鼠模型,探究 PGE1 对 FHF 大鼠 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路及肝功能的影响,以期为临床治疗 FHF 筛选新的治疗药物。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 96 只,5 周龄,体重 150~180 g,由广东省医学实验动物中心提供[SCXK(粤)2019-0002],大鼠饲养于海南医学院实验动物中心[SYXK(琼)2020-0007],所有动物均严格按照动物饲养规则喂养,温度为 25℃,湿度为 60%。实验符合 3R 原则,本研究经海南省人民医院伦理委员会批准(202001037)。

1.2 主要试剂与仪器

D-氨基半乳糖(D-galactosamine, D-GalN)大肠杆菌内毒素脂多糖(*E. coli* endotoxin lipopolysaccharide, LPS)(批号分别为:G0500、L4516,美国 Sigma 公司);PGE1(前列地尔注射液,批号:20190912,北京泰德制药股份有限公司);促肝细胞生长素注射液(批号:20191218,威海赛洛金药业有限公司);丙氨酸氨基转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、总胆红素(Total bilirubin, TBIL)检测试剂盒(批号分别为:M30679、M31447、M30175,上海信帆生物科技有限公司);苏木素伊红(HE)染色试剂盒(批号:G1120,德国默克公司);TRIzol 试剂(批号:15596026,美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号分别为:SL-30779、A53225,赛默飞世尔科技中国有限公司);SYBR Premix Ex Taq 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)试剂盒(批号:RR036A,大连 TaKaRa 公司);兔抗鼠磷酸化-eIF2 α (phosphorylation-eIF2 α , p-eIF2 α)、eIF2 α 、ATF4、CHOP、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、GAPDH 一抗(批号分别为:ab169528、ab184909、ab11419、ab133619、ab123977、ab10009,美国 Abcam 公司);羊抗鼠二抗(批号:7074P2,美国 CST 公司)。全自动生化分析仪(型

号:CS-400B,上海寰熙医疗器械有限公司);光学显微镜(型号:CX43,日本奥林巴斯公司);紫外分光光度计(型号:Alpha-1860Plus,上海谱元仪器有限公司);qRT-PCR 仪(型号:7300,美国 ABI 公司);电泳仪(型号:JY-SCZ2+,北京君意生物科技有限公司);凝胶成像仪(型号:Gel Doc EZ,上海艾研生物科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制作

大鼠 96 只适应性观察喂养一周,随机抽取 16 只作为对照,其余 80 只为造模组。手术前 12 h 禁止饮食,饮水自由。称重标记后,俯卧位固定于手术台,用 1 mL 无菌生理盐水溶解 D-GalN(300 mg/kg)-LPS(30 μ g/kg)后腹腔注射^[11],此模型是肝衰竭的经典模型,能准确反应肝细胞功能、代谢及形态学变化,重复性好。造模 4 h 后随机抽取造模组及对照大鼠各 1 只,取肝组织 HE 染色观察肝病理变化,另将所有大鼠经剪尾采血检测肝功能(ALT、AST、TBIL),较对照组明显升高($P<0.05$)视为造模成功。排除死亡、造模不成功的 4 只大鼠,共造模成功 76 只(1 只用于验证是否成功,另外 75 只分成五组),成功率 95%。对照组大鼠注入等量灭菌生理盐水。

1.3.2 动物模型的分组及给药

造模大鼠按随机数表法分成 5 组,包括模型组($n=15$)、阳性对照组($n=15$)、低、中、高剂量 PGE1 组(每组 $n=15$);1.3.1 中剩下的 15 只正常大鼠作为对照组。造模 6 h 后,阳性对照组大鼠尾静脉注射促肝细胞生长素 1.36 mg/kg^[12];低、中、高剂量 PGE1 组大鼠分别尾静脉注射 PGE1 12.5、25、37.5 μ g/kg^[13];每天 1 次,连续给药 3 d,对照组和模型组尾静脉注射等量的生理盐水。

1.3.3 大鼠肝功能水平的检测及 HE 染色观察肝组织病理学变化

造模 72 h 后,采用 1%戊巴比妥钠 4 mL/kg 腹腔内注射麻醉,麻醉生效后,将大鼠采取仰卧位,无菌条件下切口开腹,腹主动脉采血,离心收集血清,测定 ALT、AST、TBIL 水平。获取大鼠肝组织 100 mg,15%福尔马林液固定后,常规石蜡包埋,4 μ m 切片。使用二甲苯脱蜡,再使用从低到高浓度的乙醇进行水化。水化后使用苏木精进行染色,流水稍洗去燃料,再用 0.1%盐酸乙醇进行分化,然后水洗去多余染料。伊红液染色,染色后流水洗去多余染

料。水洗后再用从低到高浓度的乙醇进行醇洗以及脱水处理。最后用二甲苯进行透明,用树脂进行封片,置于光学显微镜下进行观察。

1.3.4 qRT-PCR 法检测大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 表达水平

取大鼠肝组织并剪碎,按照 TRIzol 法提取总 RNA,紫外分光光度计测总 RNA 纯度及浓度,根据逆转录试剂盒说明将 RNA 反转录为 cDNA。参照 SYBR Premix Ex Taq 试剂盒说明书进行 qRT-PCR 反应,反应体系为 20 μL:2×SYBR Mix 10 μL,H₂O 8 μL,正反向引物各 0.5 μL,模板 1 μL。反应条件为:95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 10 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 40 s,40 个循环,72℃ 延伸 10 min。以 GAPDH 基因为内参,采用 2^{-ΔΔCt} 方法计算肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 相对表达量。引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,引物序列见表 1。

1.3.5 蛋白免疫印迹(Western blot)法检测大鼠肝组织中 p-eIF2α、eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白表达水平

取大鼠肝组织并剪碎,添加蛋白裂解液置于冰上 30 min,离心后收集上清液,参照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定肝组织中蛋白总浓度,配制 10%分离胶、5%浓缩胶,取 50 μg 蛋白上样,待蛋白样品刚进入浓缩胶时电压设置为 80 V,进入分离胶后,电压升高至 120V,电泳结束后,将目的条带凝胶切除,目的蛋白凝胶转移到 PVDF 膜上,冰上进行转膜反应,电压为 100 V,反应时间 1 h,结束后用 TBST 溶液清洗,加入 5%脱脂牛奶室温下进行 1 h 封闭,TBST 溶液清洗后,加入一抗(p-eIF2α、eIF2α、ATF4、CHOP、Caspase-3、GAPDH,稀释倍数均为 1:1000),4℃过夜,TBST 清洗后加入羊抗鼠二抗(稀释倍数 1:5000),室温下孵育 2 h,TBST 清洗后,ECL 显色置于凝胶成像仪中观察各组蛋白表达情况。实验采用 Image J 软件对 Western blot 条带进行采集分析,并计算目的条带与相应内参 GAPDH 的比值。

1.4 统计学方法

实验数据均采用 SPSS 22.0 软件进行统计,计量资料以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内有差异进一步两两比较采用 SNK-*q* 法进行检验,当 $P<0.05$ 为差异显著,具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肝功能相关指标的比较

各组大鼠肝功能相关指标比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,模型组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 明显升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组、低、中、高剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 明显降低($P<0.05$);且随着 PGE1 给药剂量的增加,低、中、高剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 依次降低($P<0.05$),呈剂量依赖性;与阳性对照组相比,低、中剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 明显升高($P<0.05$),高剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平无明显差异($P>0.05$)。见表 2。

2.2 PGE1 对大鼠肝组织病理学的影响

对照组大鼠肝细胞排列整齐、致密、形态完整,未出现病理学损害;模型组大鼠肝细胞广泛变性并有局灶性坏死,空泡细胞质,中央静脉受损;阳性对照组大鼠用药后肝细胞损害有所缓解;PGE1 组随药物浓度的升高,肝细胞损害有所降低,细胞变形减轻,坏死细胞数量逐渐减少。见图 1。

2.3 各组大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平的比较

各组大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,模型组大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组及低、中、高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平均降低($P<0.05$);且随着

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	参考序列号 Reference serial number	正向引物(5'-3') Forward primer	反向引物(5'-3') Reverse primer
eIF2a	NM_001109339.1	CACTTCAGAATGCCGGTCT	AACAAGCTGACATAGGCCCC
ATF4	NM_024403.2	TCCTGAACAGCGAAGTGTG	CATCCATAGCCAGCCATTCT
CHOP	NM_001109986.1	AGCAGAGGTCACAAGCACCT	CTCCTTCATGCGCTGTTCC
Caspase-3	XM_010645199.2	GCCTGTAGAGGAACAGAATTAG	GTGGTATTCCGTACTAACAGTG
GAPDH	NM_017008.4	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

PGE1 给药剂量的增加,低、中、高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平依次降低($P<0.05$),呈剂量依赖性;与阳性对照组相比,低、中剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平均升高($P<0.05$),高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平无显著差异($P>0.05$)。见表 3。

2.4 各组大鼠肝组织中 p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白表达水平的比较

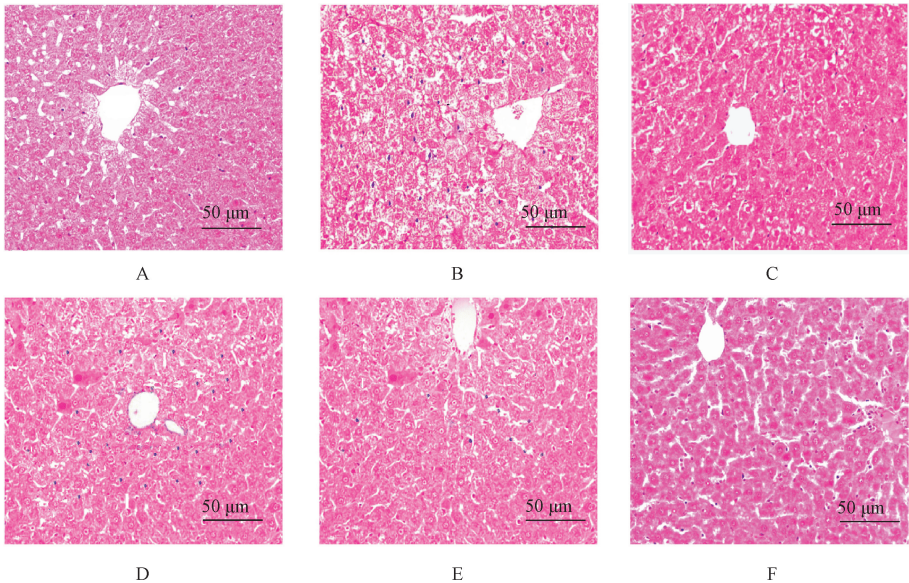
各组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。与对照组相比,模型组大鼠肝组织中

p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平均升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组及低中高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平均降低($P<0.05$);且随着 PGE1 给药剂量的增加,低、中、高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平依次降低($P<0.05$),呈剂量依赖性;与阳性对照组相比,低、中剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平均升高($P<0.05$),高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 p-eIF2 α /eIF2 α 、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白水平无显著差异($P>0.05$)。见表 4、图 2。

表 2 各组大鼠肝功能相关指标的比较($\bar{x}\pm s, n=15$)
Table 2 Comparison of liver function related indexes of rats in each group

组别 Groups	ALT(U/L)	AST(U/L)	TBIL(μ mmol/L)
对照组 Control group	46.32 $\pm$ 7.65	65.85 $\pm$ 9.26	1.48 $\pm$ 0.36
模型组 Model group	215.52 $\pm$ 32.28 ^a	142.51 $\pm$ 20.15 ^a	21.26 $\pm$ 4.65 ^a
阳性对照组 Positive control group	105.24 $\pm$ 10.51 ^{ab}	86.36 $\pm$ 11.52 ^{ab}	3.56 $\pm$ 0.85 ^{ab}
低剂量 PGE1 组 Low dose PGE1 group	181.59 $\pm$ 29.52 ^{abc}	136.53 $\pm$ 24.61 ^{abc}	18.63 $\pm$ 3.21 ^{abc}
中剂量 PGE1 组 Medium dose PGE1 group	156.59 $\pm$ 21.38 ^{abcd}	112.68 $\pm$ 18.36 ^{abcd}	11.42 $\pm$ 1.35 ^{abcd}
高剂量 PGE1 组 High dose PGE1 group	113.43 $\pm$ 12.86 ^{abde}	89.36 $\pm$ 14.86 ^{abde}	4.57 $\pm$ 1.14 ^{abde}
<i>F</i>	315.712	119.463	450.078
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与阳性对照组比较,^c $P<0.05$;与低剂量 PGE1 组比较,^d $P<0.05$;与中剂量 PGE1 组比较,^e $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with positive control group, ^c $P<0.05$. Compared with low dose PGE1 group, ^d $P<0.05$. Compared with medium dose PGE1 group, ^e $P<0.05$.



注:A:对照组;B:模型组;C:阳性对照组;D:低剂量 PGE1 组;E:中剂量 PGE1 组;F:高剂量 PGE1 组。

图 1 PGE1 对大鼠肝组织病理学的影响(HE 染色)

Note. A, Control group. B, Model group. C, Positive control group. D, Low dose PGE1 group. E, Medium dose PGE1 group. F, High dose PGE1 group.

Figure 1 Effect of PGE1 on liver histopathology in rats(HE staining)

表 3 各组大鼠肝组织中 eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 mRNA 水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 3 Comparison of eIF2α, ATF4, CHOP and Caspase-3 mRNA levels in liver tissue of rats in each group

组别 Groups	eIF2α mRNA	ATF4 mRNA	CHOP mRNA	Caspase-3 mRNA
对照组 Control group	1.02±0.13	1.00±0.12	1.03±0.14	1.06±0.12
模型组 Model group	4.38±0.65 ^a	3.81±0.64 ^a	2.85±0.31 ^a	3.62±0.39 ^a
阳性对照组 Positive control group	1.25±0.18 ^{ab}	1.45±0.24 ^{ab}	1.15±0.14 ^{ab}	1.19±0.13 ^{ab}
低剂量 PGE1 组 Low dose PGE1 group	3.25±0.42 ^{abc}	2.85±0.42 ^{abc}	2.14±0.22 ^{abc}	2.82±0.35 ^{abc}
中剂量 PGE1 组 Medium dose PGE1 group	2.41±0.31 ^{abcd}	2.02±0.38 ^{abcd}	1.52±0.16 ^{abcd}	1.89±0.29 ^{abcd}
高剂量 PGE1 组 High dose PGE1 group	1.32±0.25 ^{abde}	1.52±0.31 ^{abde}	1.26±0.15 ^{abde}	1.21±0.14 ^{abde}
F	516.300	283.299	499.264	621.886
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与阳性对照组比较,^c $P<0.05$;与低剂量 PGE1 组比较,^d $P<0.05$;与中剂量 PGE1 组比较,^e $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with positive control group, ^c $P<0.05$. Compared with low dose PGE1 group, ^d $P<0.05$. Compared with medium dose PGE1 group, ^e $P<0.05$.

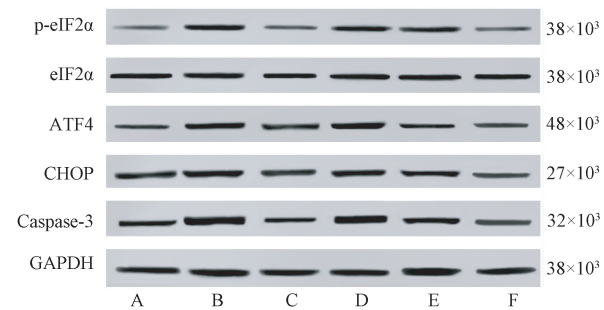
表 4 各组大鼠肝组织中 p-eIF2α/eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白表达水平的比较 ($\bar{x} \pm s, n=15$)

Table 4 Comparison of protein expression levels of p-eIF2α/eIF2α, ATF4, CHOP and Caspase-3 in liver tissue of rats in each group

组别 Groups	p-eIF2α/eIF2α	ATF4/GAPDH	CHOP/GAPDH	Caspase-3/GAPDH
对照组 Control group	0.29±0.05	0.85±0.09	1.05±0.07	1.02±0.12
模型组 Model group	0.95±0.14 ^a	1.45±0.18 ^a	1.68±0.18 ^a	1.78±0.26 ^a
阳性对照组 Positive control group	0.43±0.09 ^{ab}	0.91±0.11 ^{ab}	1.13±0.09 ^{ab}	1.09±0.15 ^{ab}
低剂量 PGE1 组 Low dose PGE1 group	0.75±0.22 ^{abc}	1.31±0.16 ^{abc}	1.52±0.15 ^{abc}	1.62±0.21 ^{abc}
中剂量 PGE1 组 Medium dose PGE1 group	0.61±0.13 ^{abcd}	1.12±0.13 ^{abcd}	1.31±0.13 ^{abcd}	1.34±0.18 ^{abcd}
高剂量 PGE1 组 High dose PGE1 group	0.46±0.12 ^{abde}	0.96±0.12 ^{abde}	1.16±0.11 ^{abde}	1.07±0.13 ^{abde}
F	122.003	121.391	145.970	119.497
P	0.000	0.000	0.000	0.000

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与阳性对照组比较,^c $P<0.05$;与低剂量 PGE1 组比较,^d $P<0.05$;与中剂量 PGE1 组比较,^e $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with positive control group, ^c $P<0.05$. Compared with low dose PGE1 group, ^d $P<0.05$. Compared with medium dose PGE1 group, ^e $P<0.05$.



注:A:对照组;B:模型组;C:阳性对照组;D:低剂量 PGE1 组;E:中剂量 PGE1 组;F:高剂量 PGE1 组。

图 2 各组大鼠肝组织中 p-eIF2α、eIF2α、ATF4、CHOP 及 Caspase-3 蛋白表达水平

Note. A, Control group. B, Model group. C, Positive control group. D, Low dose PGE1 group. E, Medium dose PGE1 group. F, High dose PGE1 group.

Figure 2 Protein expression levels of p-eIF2α, eIF2α, ATF4, CHOP and Caspase-3 in liver tissue of rats in each group

3 讨论

FHF 是一种复杂的临床综合征,由多种病因引

起,如肝炎病毒感染、药物的毒性反应、自身免疫性肝病等,临床表现出大量肝细胞坏死和严重肝功能损伤,且在首发症状出现 8 周内发生肝性脑病^[14]。当前针对 FHF 缺乏有效治疗手段,病死率高,急需治疗 FHF 的有效方法。

PGE1 是一种天然的内源性血管舒张药,在调节细胞功能上具有重要作用,临床上用于多个系统疾病的治疗,如心脑血管疾病、肝肾综合征、呼吸系统疾病等^[15]。研究表明,PGE1 对肝具有显著的保护作用,对于改善肝微循环、扩张肝血管,增加肝血窦流量,促进肝细胞 DNA 合成,加速肝细胞再生等方面具有重要作用^[16]。因此探究 PGE1 对 FHF 的影响,对探明如何防治 FHF 具有重要意义。研究发现,PGE1 可通过改善肝微循环提高重症肝炎患者肝功能指标,且不增加不良反应风险^[17]。本研究发现,与对照组比较,模型组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 升高;与模型组比较,低、中、高剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 依次降低,高剂量 PGE1 组大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平与阳性对照组无明显差

异。提示 PGE1 同阳性对照药物具有相似作用,均可降低 FHF 大鼠肝功能指标 ALT、AST、TBIL 水平,进而改善肝功能,且呈剂量依赖。宋景春等^[18]研究发现,PGE1 联合核苷类抗病毒药物可以明显改善乙型肝炎感染失代偿期肝硬化患者的肝功能,减轻肝纤维化程度、抑制血清炎性因子产生,临床疗效显著。病理学结果也显示,对照组大鼠肝细胞排列整齐、致密、形态完整,未出现病理学损害;模型组大鼠肝细胞广泛变性并有局灶性坏死,空泡细胞质,中央静脉受损;阳性对照组大鼠用药后肝细胞损害有所缓解;PGE1 组随药物浓度的升高,肝细胞损害有所降低,细胞变形减轻,坏死细胞数量逐渐减少。提示 PGE1 可改善大鼠肝损伤状况。

ERS 是一种重要的细胞自我防御机制,由主标记物葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 和三种应激传感器蛋白激酶样内质网激酶 (PERK)、激活转录因子 6 (ATF6) 和肌醇需求激酶 1 α (IRE1 α) 调节,短期轻度的 ERS 会启动促生存途径;但长期重度的内质网应激会导致细胞发生凋亡^[19]。研究认为,轻度的 ERS 可激活 UPR,主要通过磷酸化细胞外信号调节激酶 (phosphorylated extracellular signal regulated kinase, PERK)、肌醇需求酶 1、活性转录因子-6 三种内质网膜蛋白信号通路起到促生存作用^[20]。但重度且持久的 ERS 则导致 ERS 相关蛋白通路激活,启动凋亡途径,对不能挽救的细胞进行清除。在正常生理条件下,PERK 由于与葡萄糖调节蛋白 78 (glucose regulated protein 78, GPR78) 结合而处于非活性状态,一旦发生 ERS, GPR78 与 PERK 的管腔结构域分离,导致 PERK 的寡聚化和反式自磷酸化,PERK 成为一种能够促进 eIF2 α 亚单位磷酸化的活性激酶,促进 eIF2 α 水平升高, eIF2 α 则进一步诱导 ATF4 的优先翻译,在长时间 ERS 条件下,当肝细胞自我适应性调节失败时,PERK 还可能通过激活下游 CHOP 来触发促凋亡信号,从而促进肝细胞凋亡^[21]。细胞凋亡受到多种基因的调控, Caspase-3 为主要的凋亡执行蛋白,被激活后能分解细胞的骨架蛋白、细胞器等结构,参与细胞凋亡的执行过程^[22]。研究发现,ERS 还可以激活 Caspase 蛋白家族的级联反应,通过激活 Caspase-3 触发凋亡途径,导致细胞死亡^[23]。因此本研究将 Caspase-3 纳入检测因素,探究肝细胞凋亡水平。本研究发现,与对照组比较,模型组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α 、

eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平均升高;与模型组比较,低、中、高剂量 PGE1 组大鼠肝组织中 eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 mRNA 及 p-eIF2 α 、eIF2 α 、ATF4、CHOP、Caspase-3 蛋白水平均逐渐降低;且高剂量 PGE1 组与阳性对照组各 mRNA 和蛋白水平比较差异无统计学意义。推测 PGE1 可通过减缓肝细胞 ERS 反应,从而降低 eIF2 α 亚单位磷酸化水平,进而减少 ATF4 的释放和转录作用, CHOP 等促凋亡蛋白及凋亡相关蛋白 Caspase-3 等表达水平降低,最终达到保肝护肝的作用。

综上所述, PGE1 可能通过抑制 ERS, 降低 eIF2 α /ATF4/CHOP 通路表达水平,进而减缓大鼠肝细胞凋亡进程,达到保肝护肝的作用。但本研究也存在不足之处,如:未进行 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况、未在研究中设计通路抑制剂进行验证,后续研究中将完善实验设计。

参考文献:

- [1] Crespo I, Fernández-Palanca P, San-Miguel B, et al. Melatonin modulates mitophagy, innate immunity and circadian clocks in a model of viral-induced fulminant hepatic failure [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(13): 7625-7636.
- [2] 陈月桥, 王挺帅, 石清兰, 等. 解毒化瘀颗粒对急性肝衰竭大鼠肝组织 TLR2、TLR4 和 TNF- α mRNA 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2018, 45(9): 1811-1814.
- [3] Guo X, Liu WL, Yang D, et al. Hepatitis C virus infection induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human fetal liver stem cells [J]. J Pathol, 2019, 248(2): 155-163.
- [4] Ruan Z, Liang M, Deng X, et al. Exogenous hydrogen sulfide protects fatty liver against ischemia-reperfusion injury by regulating endoplasmic reticulum stress-induced autophagy in macrophage through mediating the class A scavenger receptor pathway in rats [J]. Cell Biol Int, 2020, 44(1): 306-316.
- [5] Zeng J, Jin Q, Ruan Y, et al. Inhibition of TGF β -activated protein kinase 1 ameliorates myocardial ischaemia/reperfusion injury via endoplasmic reticulum stress suppression [J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(12): 6846-6859.
- [6] Guo Y, Guo R, Su Y, et al. The PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP pathway plays a role in regulating monocrotaline-induced endoplasmic reticulum stress in rat liver [J]. Res Vet Sci, 2020, 130(1): 237-239.
- [7] Li J, Zhuo JY, Zhou W, et al. Endoplasmic reticulum stress triggers delanzomib-induced apoptosis in HCC cells through the PERK/eIF2 α /ATF4/CHOP pathway [J]. Am J Transl Res, 2020, 12(6): 2875-2889.
- [8] 魏立业, 傅向华. 前列腺素 E1 脂微球制剂预处理对大鼠心肌缺血/再灌注损伤微循环障碍的影响 [J]. 中国循环杂志, 2017, 32: 18-19.

- [9] 刘均政. 前列地尔辅助治疗对乙型肝炎肝硬化抗病毒疗效的影响 [J]. 徐州医科大学学报, 2019, 39(3): 207-211.
- [10] 谢莹, 徐文胜, 高月求, 等. 注射用促肝细胞生长素治疗急性慢性肝炎疗效及用药安全性 [J]. 中国新药杂志, 2019, 28(22): 2729-2734.
- [11] 刘江凯, 刘香丽, 李聪聪, 等. LPS/D-GaLN 诱导大鼠急性肝损伤动物模型的建立 [J]. 中国急救医学, 2019, 39(2): 175-178.
- [12] 孙琳琳, 朱争艳, 杜智, 等. 脐带间充质干细胞旁分泌物质对暴发性肝衰竭大鼠肝功能及肝细胞增殖的影响 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2011, 17(4): 313-317.
- [13] 周卉, 苏旭东. 重组人表皮生长因子联合前列地尔对糖尿病溃疡大鼠 Wnt/ β -连环素信号通路表达的影响 [J]. 中国糖尿病杂志, 2017, 25(3): 259-263.
- [14] Wang Q, Liu L, Zhang S, et al. Long noncoding RNA NEAT1 suppresses hepatocyte proliferation in fulminant hepatic failure through increased recruitment of EZH2 to the LATS2 promoter region and promotion of H3K27me3 methylation [J]. Exp Mol Med, 2020, 52(3): 461-472.
- [15] 马娜, 杨世诚, 付乃宽. 前列腺素 E1 预防老年冠心病患者介入治疗后造影剂肾病的作用 [J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2019, 21(3): 245-249.
- [16] Yang FW, Fu Y, Li Y, et al. Prostaglandin E1 protects hepatocytes against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis via protein kinase A-dependent induction of glucose-regulated protein 78 expression [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(40): 7253-7264.
- [17] 廖红保, 沈明. 替诺福韦酯联用前列地尔对重症乙型肝炎患者的疗效评价 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2019, 24(11): 1331-1334.
- [18] 宋景春, 张海涛, 刘斌, 等. 前列地尔联合核苷类抗病毒药物对 HBV 感染失代偿期肝硬化患者肝功能、肝纤维化指标及血清炎症因子的影响 [J]. 海南医学院学报, 2019, 25(8): 593-597.
- [19] 王慧娟, 徐玲, 田原, 等. 内质网应激在乙型重型肝炎(肝衰竭)中的作用研究 [J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(4): 244-249.
- [20] Ishibashi T, Morita S, Kishimoto S, et al. Nicotinic acetylcholine receptor signaling regulates inositol-requiring enzyme 1 α activation to protect β -cells against terminal unfolded protein response under irremediable endoplasmic reticulum stress [J]. J Diabetes Investig, 2020, 11(4): 801-813.
- [21] Wang Y, Pan T, Li L, et al. Benzo(a)pyrene promotes Hep-G2 cell migration and invasion by upregulating phosphorylated extracellular signal-regulated kinase expression [J]. Oncol Lett, 2018, 15(6): 8325-8332.
- [22] Tsutsui K, Haraguchi S. Neuroprotective actions of cerebellar and pineal allopregnanolone on Purkinje cells [J]. FASEB Bioadv, 2020, 2(3): 149-159.
- [23] Abdullah A, Ravanian P. Kaempferol mitigates Endoplasmic Reticulum Stress Induced Cell Death by targeting caspase 3/7 [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2189.

[收稿日期]2020-09-25