

## CCN1 对小鼠肝脏缺血再灌注损伤的影响

林燕蝶, 孙 武, 李 皓\*

(南京医科大学病理生理学系, 江苏 南京 211166)

**[摘要]** 目的: 研究细胞外基质蛋白 CCN1(cysteine-rich protein 61, Cyr61) 在小鼠的缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR) 损伤中的表达变化和作用。方法: 建立小鼠 70% 肝脏 IR 模型。肝脏缺血 60 min 后再灌注, 于不同时间点通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 CCN1 的 mRNA 和蛋白表达水平。部分实验中, 在 IR 前给予小鼠尾静脉注射 CCN1 重组蛋白或生理盐水, 通过转氨酶和病理学检测, 比较两组小鼠肝脏 IR 损伤情况; 收集肝脏组织, 用 qRT-PCR 检测炎症因子的表达水平。结果: 与 sham 组相比, 肝缺血 60 min 再灌注 3、6、18 h 后 CCN1 的表达明显升高; 注射 CCN1 蛋白的小鼠肝 IR 6 h 后, 与生理盐水组相比, 血清丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶水平升高, 病理改变更严重。注射 CCN1 小鼠的肝组织中白介素-6、CXCL-10 的表达水平也显著升高。结论: CCN1 在小鼠肝 IR 损伤中表达显著增加, 并可能通过诱导炎症因子的表达对 IR 损伤起促进作用。

**[关键词]** CCN1; 缺血再灌注损伤; 炎症因子; 肝脏

**[中图分类号]** R364.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2016)07-806-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20160709

## Matricellular protein CCN1 aggravates hepatic ischemia-reperfusion injury in mice

Lin Yandie, Sun Wu, Li Hao\*

(Department of Pathophysiology, NJMU, Nanjing 211166, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the expression and function of CCN1 in hepatic ischemia-reperfusion (I/R) injury in mice. **Methods:** Partial warm ischemia was produced in the left and middle hepatic lobes of mice for 60 min, followed by reperfusion. Expression of CCN1 was detected by real-time PCR and Western blot at timed points. In indicated experiments, recombinant CCN1 or saline was injected *via* tail vein 1 h before hepatic ischemia. Levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in blood were examined at 6 h of reperfusion. Pathological analysis was performed with liver sections after hematoxylin and eosin staining. mRNA levels of cytokines were detected by real-time PCR. **Results:** CCN1 expression is up-regulated in hepatic I/R. Serum ALT and AST levels were significantly increased after CCN1 treatment. The pathological alterations were more severe compared with saline group. Gene transcripts for proinflammatory cytokines in liver tissue were elevated significantly in the CCN1 group. **Conclusion:** Induction of CCN1 in liver I/R aggravates hepatic injury, possibly by promoting the expression of inflammatory factors.

**[Key words]** CCN1; ischemia reperfusion (I/R) injury; proinflammatory cytokines; liver

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(07): 806-810]

肝脏的缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤是肝脏手术和肝移植面临的主要问题之一, 对手术或移植后肝脏的存活起到决定性作用。IR 引起组织中酶的释放、蛋白和脂质的氧化修饰、细胞黏附分子的表达、Kupffer 细胞/嗜中性粒细胞的激活和细胞因子的释放, 最终导致肝细胞坏死或凋亡<sup>[1]</sup>。CCN1(又称 Cyr61, cysteine-rich protein 61)是细胞

外基质蛋白 CCN 家族成员之一, 通过与整合素(integrin)受体结合, 调节细胞的黏附、迁移、增殖、分化、生存和凋亡, 在炎症、伤口愈合、损伤修复等过程中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。有文献报道, 心脏、肾和肠 IR 均可显著诱导 CCN1 的表达<sup>[3-6]</sup>。CCN1 的功能与细胞类型密切相关, 研究发现, CCN1 在心脏 IR 损伤中有保护作用<sup>[4]</sup>, 而在肾 IR 损伤中却起促进作用<sup>[6]</sup>。目前对肝脏 CCN1 的功能了解甚少。现有研究提示, CCN1 能促进非酒精性脂肪肝病中巨噬细胞的浸润<sup>[7]</sup>; 通过诱导肝星形细胞衰老, CCN1 有缓解肝纤维化

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81270944)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: haoli@njmu.edu.cn

的作用<sup>[8]</sup>。但是, CCN1 在肝脏 IR 损伤中的作用目前尚无报道。本研究检测了小鼠肝脏 IR 过程中 CCN1 的表达变化, 初步探讨了 CCN1 在肝脏 IR 损伤中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康雄性 C57BL/6 小鼠(南京大学模式动物中心), 6~8 周龄, 体重 20~25 g, 饲养于南京医科大学动物中心, 饲养条件清洁级。

CCN1 重组蛋白、CCN1 抗体(R&D Systems 公司, 美国), GAPDH 抗体(Sigma-Aldrich 公司, 美国), HRP-标记羊抗大鼠 IgG (Santa Cruz Biotechnology 公司, 美国), BCA 蛋白定量试剂盒(北京碧云天生物技术有限公司), TE2000 倒置显微镜(Nikon 公司, 日本), RNAiso Plus、PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR(TaKaRa 公司, 日本), 丙氨酸氨基转移酶(ALT/GPT) 测定试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶(AST/GOT)测定试剂盒(南京建成有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠肝脏 IR 模型

取 6~8 周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠 80 只随机分为 4 组: sham 组、IR 组、生理盐水(NS)组和 CCN1 组。IR 组: 给小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠, 麻醉后备皮, 使小鼠呈仰卧位并固定其四肢。用 1%碘酒消毒小鼠腹部, 取正中切口, 暴露腹腔。分离肝门后, 使用显微镊小心带线穿过门脉系统并结扎(活结), 造成 70%肝脏缺血。临时关闭腹腔, 60 min 后将活结解开恢复肝脏血流, 并用 4-0 缝线关闭腹腔; sham 组: 只分离肝门, 不结扎, 随即合拢腹腔, 60 min 后用 4-0 缝线关闭腹腔。生理盐水组: 先给予小鼠尾静脉注射生理盐水 1 h 后, 肝脏缺血 60 min, 再灌注 6 h; CCN1 组: 先给予小鼠尾静脉注射 CCN1 重组蛋白(10 μg/鼠)1 h 后, 肝脏缺血 60 min, 再灌注 6 h。

#### 1.2.2 小鼠血清 ALT、AST 含量检测

收集新鲜血液, 5 000 r/min, 离心 15 min, 取上清, 按照试剂盒要求检测 ALT 和 AST 含量。

#### 1.2.3 小鼠肝脏组织病理学检测

切取小鼠的肝脏组织块约 0.5 cm × 0.5 cm 大小, 4%中性甲醛固定后常规石蜡包埋切片行 HE 染色, 光镜下观察形态学改变。

#### 1.2.4 qRT-PCR 检测肝脏组织中炎症因子的表达

按照 TaKaRa 试剂操作步骤提取肝脏总 RNA 后, 取 5 μg RNA 逆转录为 cDNA。按 1:10 稀释后取

5 μL cDNA 为模板于 SDS7500 定量 PCR 仪进行 real-time PCR 扩增检测; 数据分析以 GAPDH 为内参, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算。引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 引物序列

Table 1 Real-time PCR primers

目的基因(鼠源性)	引物序列(5'→3')
IL-1β	上游 5'-TTCAGGCAGGCAGTATCACTC 下游 5'-GAAGTCCACGGGAAAGACAC
IL-6	上游 5'-TAGTCCTTCCACCCCAATTTCC 下游 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
CXCL10	上游 5'-CCAAGTGCTGCCGTCAATTTTC 下游 5'-GGCTCGCAGGGATGATTTCAA
CCN1	上游 5'-TAAGTCTGCGCTAAACAACACTC 下游 5'-CAGATCCCTTTCAGAGCGGT
GAPDH	上游 5'-AGGTCGGTGTGAACGGATTTG 下游 5'-GGGGTCGTTGATGGCAACA

#### 1.2.5 Western blot 检测

取肝脏组织约 50 mg, 加入蛋白裂解液 300 μL, BCA 法测定蛋白含量。取 50 μg 蛋白, SDS-PAGE 电泳分离后转膜, 5%脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗(1:200) 4℃孵育过夜, TBS-T 漂洗 3 次后, 用 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h, TBS-T 漂洗 3 次后用 ECL 显影液显影成像。

#### 1.3 统计学方法

数值以平均值 ± 标准误( $\bar{x} \pm s_x$ )表示, 数据分析用 Prism6 统计软件进行处理, 组间比较采用单因素方差分析,  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

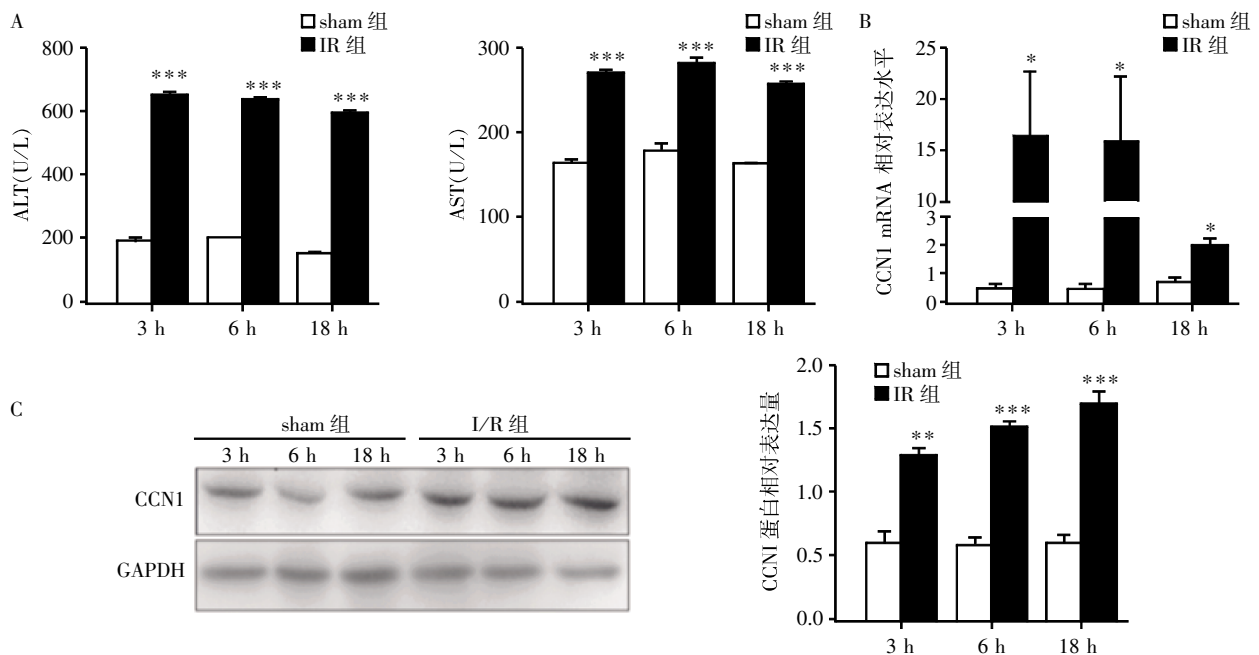
## 2 结果

### 2.1 小鼠肝脏 IR 损伤上调 CCN1 的表达

采用肝左侧叶和中叶缺血, 即经典的 70%IR 模型, 研究 CCN1 的表达变化。在小鼠肝脏缺血 60 min 再灌注, 于 3、6、18 h 分别测定血清 ALT 和 AST, 与 sham 组相比, IR 组小鼠血清中 ALT 和 AST 水平显著升高, 表明肝脏 IR 损伤模型构建成功(图 1A)。用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 IR 后小鼠肝脏 CCN1 的表达水平。和 sham 组相比, 肝脏 IR 后 3、6 和 18 h 时, CCN1 的 mRNA(图 1B)及蛋白表达(图 1C)均明显增加, 且差异有统计学意义( $P < 0.001$ ), 提示肝脏 IR 诱导 CCN1 的表达。

### 2.2 CCN1 加重了小鼠的 IR 损伤

CCN1 是一种分泌蛋白, 重组 CCN1 可以在体外获得并已实现商品化。单独给小鼠尾静脉注射 CCN1 对转氨酶无明显影响(结果未显示)。为研究 CCN1 表达上调在肝 IR 损伤中的作用, 先给予小鼠尾静脉注射 CCN1 重组蛋白或生理盐水, 1 h 后



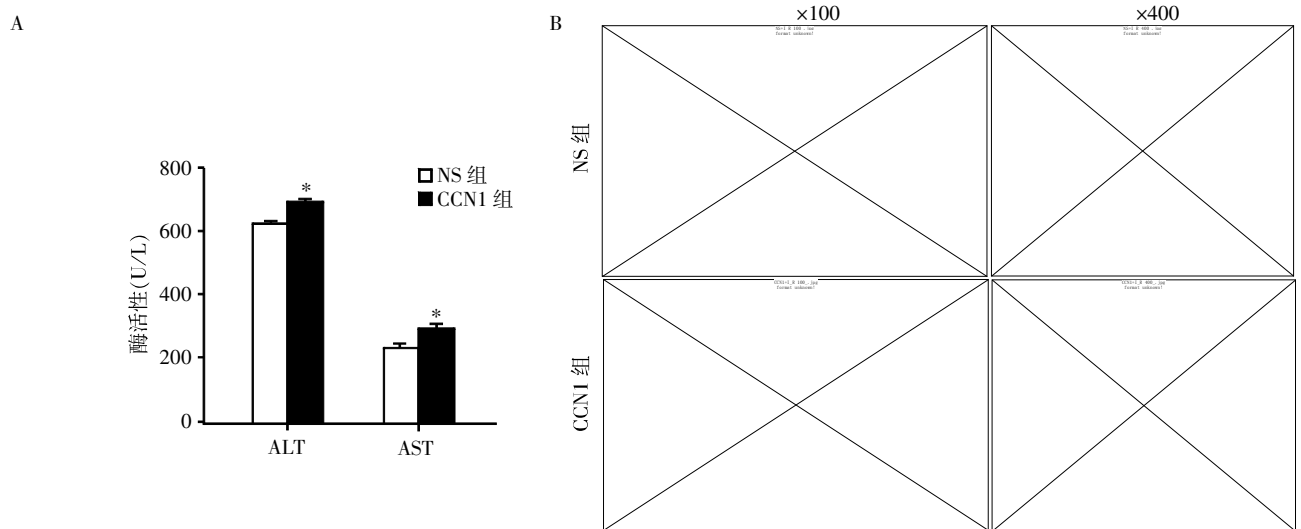
A: IR 后不同时间点血浆 ALT 及 AST 水平; B: qRT-FPCR 肝脏检测 IR 后不同时间点 CCN1 的 mRNA 表达; C: Western blot 检测 IR 后不同时间点肝脏 CCN1 的蛋白表达。与 IR 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ,  $n=5$ 。

图 1 小鼠肝脏缺血再灌注损伤时上调 CCN1 的表达  
Figure 1 CCN1 is up-regulated during liver I/R injury

进行手术使肝脏缺血 60 min, 于再灌注 6 h 检测小鼠的肝损伤情况。发现与生理盐水组相比, CCN1 组小鼠的血浆 ALT 及 AST 水平显著升高(图 2A)。将两组小鼠的肝组织进行切片和 HE 染色, 在显微镜下观察可见 CCN1 组肝脏灶状坏死区面积显著大于生理盐水组, 肝细胞核破裂、脂肪变性、肝窦内红细胞瘀积等变化也较生理盐水组严重(图 2B)。上述结果表明, CCN1 加重了小鼠肝 IR 损伤。

### 2.3 CCN1 促进肝 IR 后的炎症反应

文献报道, CCN1 可以通过激活巨噬细胞中 NF- $\kappa$ B, 上调炎症因子和趋化因子的表达<sup>[9]</sup>。通过 qRT-PCR, 检测了 IR 后 6 h 小鼠肝组织中细胞因子和趋化因子的表达水平, 结果显示, 注射 CCN1 的小鼠肝脏中细胞因子 IL-6, IL-1 $\beta$  及炎症趋化因子 CXCL10 表达明显升高(图 3), 提示 CCN1 加重小鼠肝脏 IR 损伤的作用可能与其促进炎症反应有关。



A: 与 NS 组相比, \* $P < 0.05$ ,  $n=5$ ; B: 将肝组织进行 HE 染色显示, CCN1 组肝脏坏死面积显著高于 NS 组(右侧图是左侧图中黑框区的放大)。

图 2 CCN1 加重了小鼠肝脏的缺血再灌注损伤  
Figure 2 CCN1 aggravated murine liver ischemia-reperfusion injury

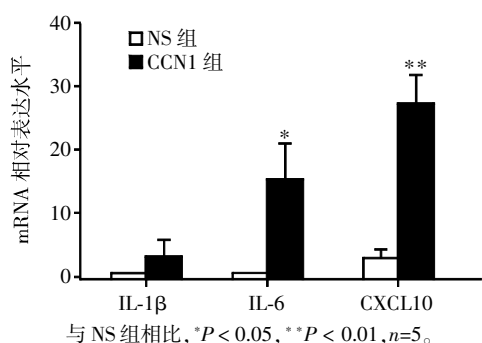


图 3 CCN1 加重了缺血再灌注后小鼠肝脏中的炎症反应  
Figure 3 CCN1 aggravated the inflammation in liver ischemia-reperfusion injury

### 3 讨论

本研究结果表明,小鼠肝脏 IR 损伤可诱导 CCN1 的表达,与已报道的心脏、肾和肠 IR 损伤对 CCN1 表达的影响一致<sup>[3-6]</sup>。由于肝 IR 损伤对 CCN1 mRNA 和蛋白的表达均有上调作用,提示 CCN1 的表达增加可能与其转录增强有关。文献报道,CCN1 的启动子上有转录因子 CREB 的结合序列<sup>[10]</sup>,而 CREB 在炎症因子的信号传递中起关键作用<sup>[11]</sup>。在缺氧诱导的视网膜血管内皮细胞中,缺氧诱导因子(HIF)-1 $\alpha$  通过与 c-Jun/AP-1 的相互作用诱导 CCN1 的表达<sup>[12]</sup>。此外,某些信号通路的激活也有诱导 CCN1 表达的作用,如 MEK/ERK 和 PKC 的激活介导了血管紧张素 II (Ang II) 和苯肾上腺素诱导的心肌细胞 CCN1 表达上调<sup>[13]</sup>。已知缺氧和炎症反应均参与肝 IR 损伤的发生,CREB、HIF-1 $\alpha$ 、MEK/ERK 等是否参与肝脏 IR 时 CCN1 的表达调控尚待进一步研究。

大量研究表明,CCN1 的功能有细胞特异性。在心肌 IR 中,CCN1 的表达上调已被证实有保护作用<sup>[4]</sup>。对肾脏的研究则发现,用抗体阻断 CCN1 则减轻了肾 IR 后的炎症反应和纤维化<sup>[6]</sup>。本研究给小鼠注射 CCN1 后,小鼠肝 IR 引起的血浆转氨酶升高和肝病理改变均加重,提示 CCN1 对肝脏 IR 损伤起促进作用。因此,CCN1 可能是减轻肝 IR 损伤的潜在靶点。在后续实验中,可以通过高效价 CCN1 单克隆抗体阻断 CCN1 的作用加以证实。

CCN1 促进肝 IR 损伤的机制可能与多种信号通路有关。文献报道,CCN1 与整合素  $\alpha\beta 5$ 、 $\alpha 6\beta 1$  及 syndecan-4 结合后,通过 RAC1 依赖性 5-脂氧酶和线粒体通路产生活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)。持续高水平的 ROS 导致 JNK 的激活,从而引起细胞凋亡<sup>[14]</sup>。在应激性心肌损伤中,CCN1 通过促进 ROS 和细胞表面 Fas 的表达增加细胞对 Fas 介

导的细胞凋亡的敏感性从而损伤心肌细胞<sup>[15]</sup>。ROS 是否参与 CCN1 对肝脏 IR 损伤的促进作用值得研究。另一方面,CCN1 还可以通过激活 NF- $\kappa$ B 等因子,促进巨噬细胞、滑膜细胞等释放细胞因子和趋化因子,发挥促炎作用<sup>[16]</sup>。本研究发现,CCN1 增加了肝脏 IR 损伤时炎症因子 IL-6 和 CXCL10 的表达。文献报道,IL-6 能刺激肝细胞释放 C 反应蛋白、 $\alpha$  抗胰蛋白酶以及纤维蛋白原等物质从而损伤肝细胞<sup>[17]</sup>;CXCL10 可以通过诱导促炎因子的表达来增加 IR 损伤并参与固有免疫应答<sup>[18]</sup>。CCN1 通过哪些信号通路促进肝 IR 时炎症介质的释放有待进一步研究。

本研究表明,肝 IR 损伤诱导 CCN1 的表达;CCN1 可能通过增强炎症反应对肝 IR 损伤起促进作用。本研究提示 CCN1 可能成为减轻肝 IR 损伤的潜在靶标。

#### [参考文献]

- [1] Yang HJ, Tang LM, Zhou XJ, et al. Ankaflavin ameliorates steatotic liver ischemia-reperfusion injury in mice [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2015, 14(6):619-625
- [2] Jun JI, Lau LF. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2011, 10(12):945-963
- [3] Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, et al. Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury [J]. *Kidney Int*, 2002, 62(5):1601-1610
- [4] Zhao X, Ding ET, Yu OM, et al. Induction of the matrix-cellular protein CCN1 through RhoA and MRTF-A contributes to ischemic cardioprotection [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 75:152-161
- [5] Shegarfi H, Krohn CD, Gundersen Y, et al. Regulation of CCN1 (Cyr61) in a porcine model of intestinal ischemia/reperfusion [J]. *Innate Immun*, 2015, 21(5):453-462
- [6] Lai CF, Lin SL, Chiang WC, et al. Blockade of cysteine-rich protein 61 attenuates renal inflammation and fibrosis after ischemic kidney injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2014, 307(5):F581-F592
- [7] Bian Z, Peng Y, You Z, et al. CCN1 expression in hepatocytes contributes to macrophage infiltration in nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. *J Lipid Res*, 2013, 54(1):44-54
- [8] Borkham-Kamphorst E, Steffen BT, Van de Leur E, et al. CCN1/CYR61 overexpression in hepatic stellate cells induces ER stress-related apoptosis [J]. *Cell Signal*, 2016, 28(1):34-42

[9] Ji H, Liu Y, Zhang Y, et al. T-cell immunoglobulin and mucin domain 4 (TIM-4) signaling in innate immune-mediated liver ischemia-reperfusion injury [J]. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2052–2064

[10] Meyuhas R, Pikarsky E, Tavor E, et al. A key role for cyclic AMP-responsive element binding protein in hypoxia-mediated activation of the angiogenesis factor CCN1 (CYR61) in tumor cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(9): 1397–1409

[11] Westbom CM, Shukla A, Macpherson MB, et al. CREB-induced inflammation is important for malignant mesothelioma growth [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(10): 2816–2827

[12] You JJ, Yang CM, Chen MB, et al. Regulation of Cyr61/CCN1 expression by hypoxia through cooperation of c-Jun/AP-1 and HIF-1alpha in retinal vascular endothelial cells [J]. *Exp Eye Res*, 2010, 91(6): 825–836

[13] Hilfiker-Kleiner D, Kaminski K, Kaminska A, et al. Regulation of proangiogenic factor CCN1 in cardiac muscle; impact of ischemia, pressure overload, and neurohumoral activation [J]. *Circulation*, 2004, 109(18): 2227–2233

[14] Juric V, Chen CC, Lau LF. TNFalpha-induced apoptosis enabled by CCN1/CYR61: pathways of reactive oxygen species generation and cytochrome c release [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2): e31303

[15] Hsu PL, Su BC, Kaok QY, et al. Extracellular matrix protein CCN1 regulates cardiomyocyte apoptosis in mice with stress-induced cardiac injury [J]. *Cardiovasc Res*, 2013, 98(1): 64–72

[16] Bai T, Chen CC, Lau LF. Matricellular protein CCN1 activates a proinflammatory genetic program in murine macrophages [J]. *J Immunol*, 2010, 184(6): 3223–3232

[17] Lin J, Zhou Z, Huo R, et al. Cyr61 induces IL-6 production by fibroblast-like synoviocytes promoting Th17 differentiation in rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol*, 2012, 188(11): 5776–5784

[18] Zhai Y, Shen XD, Gao F, et al. CXCL10 regulates liver innate immune response against ischemia and reperfusion injury [J]. *Hepatology*, 2008, 47(1): 207–214

[收稿日期] 2016-03-03

(上接第 787 页)

[15] Corrales L, Glickman LH, Mewhirter SM, et al. Direct activation of Sting in the tumor microenvironment leads to potent and systemic tumor regression and immunity [J]. *Cell Rep*, 2015, 11(7): 1018–1030

[16] Xu YZ, Kanagaratham C, Jancik S, et al. Promoter deletion analysis using a dual-luciferase reporter system [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 977: 79–93

[17] Takaoka A, Wang Z, Choi MK, et al. DAI (DLM-1/ZBP1) is a cytosolic DNA sensor and an activator of innate immune response [J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 501–505

[18] Zhang Z, Yuan B, Bao M, et al. The helicase DDX41 senses intracellular DNA mediated by the adaptor Sting in dendritic cells [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(10): 959–965

[19] Unterholzner L, Keating S, Baran M, et al. IFI16 is an innate immune sensor for intracellular DNA [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(11): 997–1004

[20] Ferguson BJ, Mansur DS, Peters NE, et al. DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity [J]. *Elife*, 2012, 12(1): e00047

[21] Li XD, Wu J, Gao D, et al. Pivotal roles of cGAS-cGAMP signaling in antiviral defense and immune adjuvant effects [J]. *Science*, 2013, 341(6152): 1390–1394

[22] Ding Q, Cao X, Lu J, et al. Hepatitis C virus NS4B blocks the interaction of Sting and TBK1 to evade host innate immunity [J]. *J Hepatol*, 2013, 59(1): 52–58

[23] Aguirre S, Maestre AM, Pagni S, et al. DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human Sting [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8(10): e1002934

[24] Moriguchi T, Yamamoto M. A regulatory network governing Gata1 and Gata2 gene transcription orchestrates erythroid lineage differentiation [J]. *Int J Hematol*, 2014, 100(5): 417–424

[25] Gao J, Chen YH, Peterson LC. GATA family transcriptional factors: emerging suspects in hematologic disorders [J]. *Exp Hematol Oncol*, 2015, 10(4): 28

[26] Suske G. The Sp-family of transcription factors [J]. *Gene*, 1999, 238(2): 291–300

[收稿日期] 2016-04-11