

成纤维细胞生长因子21减轻小鼠肝脏缺血再灌注损伤

曹守纪, 李国强*

南京医科大学第一附属医院肝脏外科, 江苏 南京 210029

[摘要] 目的:探讨成纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor 21, FGF21)对小鼠肝脏缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤的保护作用,并进一步研究其可能机制。方法:30只C57BL/6小鼠,随机分为3组:假手术组(sham组)小鼠仅接受开腹及关腹操作;对照组(IR+NS组)小鼠术前30 min尾静脉注射生理盐水(NS)2 mL/kg体重,制成肝脏IR损伤模型;实验组(IR+FGF21组)小鼠术前30 min尾静脉注射重组小鼠成纤维细胞生长因子21(rmFGF21)2 mL/kg体重,并制成肝脏IR损伤模型。再灌注后12 h处死小鼠,获取静脉血及肝脏组织。检测各组小鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平;苏木素-伊红(HE)染色及TUNEL染色观察肝脏组织损伤情况;检测各组小鼠肝脏内丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量。结果:与IR+NS组相比较,IR+FGF21组肝组织病理损伤情况明显改善,血清ALT及AST值较低($P < 0.01$),肝组织MDA和ROS水平明显下降($P < 0.01$),SOD和GSH含量明显上升($P < 0.01$)。结论:FGF21能减轻小鼠肝脏缺血再灌注损伤,其机制可能与抑制肝缺血再灌注后的氧化应激反应有关。

[关键词] 成纤维细胞生长因子21;肝脏;缺血再灌注损伤;氧化应激

[中图分类号] R333.4

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)08-1049-05

doi:10.7655/NYDXBNS20180807

Fibroblast growth factor 21 alleviates liver ischemia-reperfusion injury

Cao Shouji, Li Guoqiang*

Department of Liver Surgery, the First Affiliated Hospital of NMU, Nanjing 210029, China

[Abstract] **Objective:** To explore the protective effect of fibroblast growth factor 21 (FGF21) on liver ischemia-reperfusion (IR) injury in mice and the possible mechanisms. **Methods:** Thirty C57BL/6 mice were randomly divided into 3 groups: sham-operated group, IR+NS group (mice were injected with 2 mL/kg saline by tail vein just before ischemia induction) and IR+FGF21 group (mice were injected with 2 mL/kg FGF21 before operation). The mouse partial liver model of IR injury was established. Twelve hours after reperfusion, the mice were sacrificed and the serum and liver samples undergoing IR injury were collected. The ALT and AST levels in serum were determined. Liver histological damage was evaluated with hematoxylin-eosin (HE) staining and TUNEL detection. Levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) in liver tissue were also determined. **Results:** Liver tissues in IR+FGF21 group were more slightly damaged than those in IR+NS group ($P < 0.01$). The ALT and AST levels in IR+FGF21 group were significantly lower than those of IR+NS group ($P < 0.01$). The levels of plasma MDA and ROS contents in IR+FGF21 group were significantly lower than those of IR+NS group ($P < 0.01$). The levels of plasma SOD and GSH in IR+FGF21 group were higher than those of IR+NS group ($P < 0.01$). **Conclusion:** FGF21 can alleviate liver IR injury probably by inhibiting oxidant stress in mice.

[Key words] fibroblast growth factor 21; liver; ischemia-reperfusion injury; oxidant stress

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(08):1049-1053]

移植物的缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)

[基金项目] 江苏省自然科学基金(BK20131445);国家卫计委行业基金(2013)

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

损伤是肝移植领域的重要问题,IR损伤能够促进早期及晚期移植植物功能丧失^[1-2]。氧化应激是IR损伤的重要机制之一,因此提高细胞的抗氧化能力、减少细胞内的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)能够

有效减轻IR损伤^[3]。成纤维细胞生长因子21(fibroblast growth factor 21, FGF21)是一种主要由肝细胞分泌的代谢激素,能够调节机体代谢,对糖脂平衡有多种作用^[4]。研究表明,FGF21能够通过上调相关基因的表达提高小鼠肝脏细胞的抗氧化能力,减轻由氧化应激导致的肝损伤^[5-6]。本文拟研究FGF21对小鼠IR损伤的保护作用及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

健康雄性C57BL/6小鼠30只,6~8周龄,体重15~20 g(南京青龙山动物房),无特殊病原体(SPF)环境下饲养,自由进食、饮水。所有动物实验都按照NIH实验动物护理和使用指南实施。

1.2 方法

1.2.1 小鼠肝脏IR损伤模型的建立

参照Asakawa等^[7]的方法进行。术前12 h禁食、不禁饮。5%水合氯醛0.08 mL/10 g体重麻醉小鼠后,取中线开腹,无损伤血管夹夹闭通往肝左叶及肝中叶(约占整个肝脏质量的70%)的肝蒂。包括门静脉、肝动脉和胆道(此时可见肝左叶及肝中叶颜色变为暗灰色)。缺血60 min后,撤离无损伤血管夹恢复血流(可见缺血肝叶颜色由暗灰色变为暗红色),开始再灌注,逐层关腹。再灌注后12 h,再次麻醉小鼠,获取下腔静脉血及肝脏左叶、中叶样本。血液样本于37 °C恒温箱中静置1 h,于4 °C冰箱过夜后以2 000 g离心10 min,分离并收集血清,置于-80 °C冰箱中保存,用于后续检测。取部分肝脏组织,用体积分数10%福尔马林溶液固定后制备石蜡切片;另取部分肝组织迅速置入液氮中,置于-80 °C冰箱中保存,用于后续检测。

1.2.2 动物分组

用随机数字表法将实验小鼠分为3组,每组10只。假手术组(sham组)小鼠仅接受开腹及关腹操作;对照组(IR+NS组)小鼠术前30 min尾静脉注射生理盐水2 mg/kg体重,按上述方法制成肝脏IR损伤模型;实验组(IR+FGF21组)小鼠术前30 min尾静脉注射重组小鼠成纤维细胞生长因子(rmFGF21)2 mg/kg体重,并制成肝脏IR损伤模型。

1.2.3 检测项目

肝脏功能的检测:采用江苏省人民医院的自动化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)含量。

肝组织病理学检测:取部分肝组织,用10%的

福尔马林溶液固定,常规切片,HE染色,光镜下观察肝小叶结构变化、肝细胞坏死及水肿的情况。行TUNEL染色检测细胞凋亡情况。TUNEL染色使用购于武汉赛维尔生物科技有限公司的TUNEL染色试剂盒按说明进行。操作步骤为:①用免疫染色固定液4%多聚甲醛固定细胞30~60 min;②PBS洗涤2次,每次10 min;③加入免疫染色强力通透液室温孵育5 min;④PBS洗涤2次,每次10 min;⑤在样品上加50 μ L TUNEL检测液,37 °C避光孵育60 min;⑥PBS洗涤3次;⑦用抗荧光淬灭封片液封片后荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 肝组织内ROS含量测定

取冷冻保存的肝组织,使用ROS检测试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司)按说明书进行检测,Image-pro plus 6.0(Media Cybernetics公司,美国)软件行定量分析。简要操作过程:①取组织,用PBS或生理盐水冲洗1遍;②按照1:200用无血清培养液稀释二氢溴化乙啶(DHE),24孔板每孔加入约3 mL(以能完全浸没组织为准)。37 °C细胞培养箱内孵育20 min;③用无血清细胞培养液(或PBS)洗涤细胞3次,以充分去除未进入组织内的DCFH-DA;④用荧光显微镜进行观察和拍照。荧光显微镜下,用蓝光或绿光激发,观察和拍摄细胞红色发射图像,ROS阳性细胞在整个核区被染成红色;用紫外光激发时,胞浆中未氧化的二氢乙啶可发出蓝色荧光;⑤软件分析:每组内每张切片随机挑选至少3个200倍视野进行拍照。拍照时尽量让组织充满整个视野,保证每张照片的背景光一致。应用Image-Pro Plus 6.0软件将绿色/红色荧光单色照片转换为黑白图片然后选取相同的黑色作为判断所有照片阳性的统一标准,对每张照片进行分析得出每张照片阳性的累积光密度值(IOD)。

1.2.5 肝脏组织内丙二醛(MDA)、谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)含量的检测

分别使用相应的MDA、GSH、SOD试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司)按说明进行检测。检测方法类似,取冷冻保存的样本按说明制备上清液,在96孔板的空白孔、标准孔、测定孔中分别加入相应试剂或上清液,测定各孔的光密度(OD)值,由说明书中的公式计算出各样本待测指标的浓度。

1.3 统计学方法

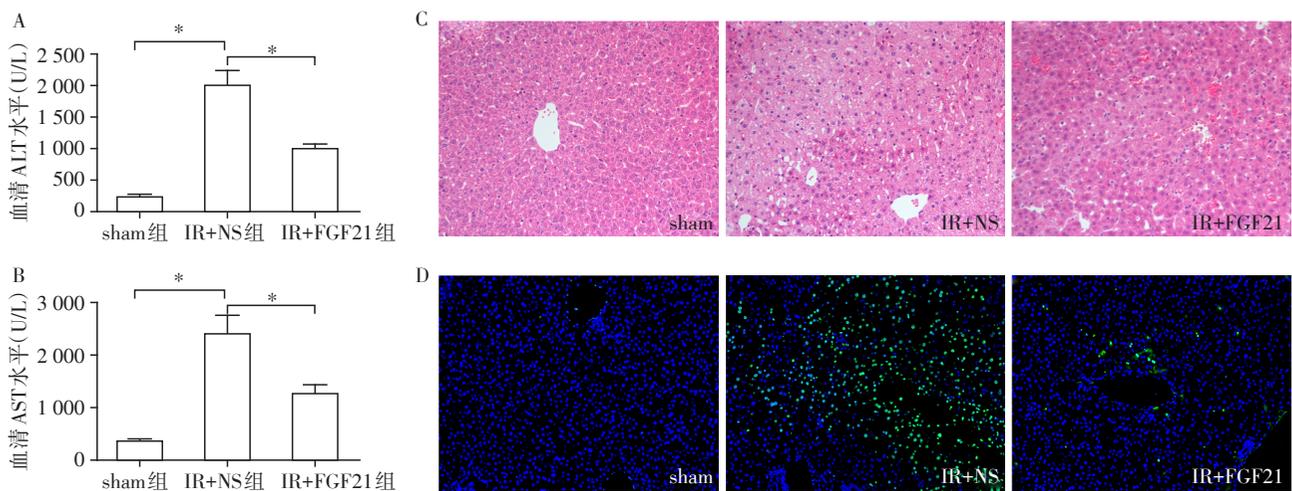
应用SPSS统计软件(20.0版)分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验, $P \leq 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FGF21 预处理减轻小鼠肝脏缺血再灌注损伤

取各组小鼠再灌注 12 h 后的静脉血,测定血清 ALT、AST 水平。与 sham 组相比,IR+NS 组血清 ALT 和 AST 水平明显升高 ($P < 0.01$);与 IR+NS 组相比,IR+FGF21 组血清 ALT 和 AST 水平明显降低 ($P < 0.01$)。再灌注 12 h 后,取肝脏标本行 HE 染色观察,

sham 组肝脏组织结构清晰,无明显异常改变;IR+NS 组可见肝小叶结构紊乱、大面积肝细胞水样变性;IR+FGF21 组病理损伤较 IR+NS 组明显减轻,部分肝细胞水样变性。TUNEL 染色可见 IR+NS 组肝细胞凋亡数量较 sham 组明显增加;IR+FGF21 组肝细胞凋亡数量较 IR+NS 组明显减少(图 1)。以上结果表明小鼠 IR 后肝脏损伤明显,而 FGF21 预处理能显著减轻这一损伤。



A、B:小鼠血清 ALT、AST 水平(两组比较,* $P < 0.01$, $n = 10$);C:再灌注后 12 h 各组肝脏样本的 HE 染色代表性图片($\times 200$);D:再灌注 12 h 后各组肝脏样本 TUNEL 染色代表性图片($\times 200$)。

图 1 FGF21 预处理减轻小鼠肝缺血再灌注损伤

Figure 1 Pretreatment of FGF21 reduces hepatic ischemia reperfusion injury

2.2 FGF21 预处理能提高缺血再灌注小鼠的抗氧化损伤能力

取各组肝脏标本并测定组织内 SOD 和 GSH 的含量,可见与 sham 组相比,IR+NS 组肝脏标本内 SOD 和 GSH 含量明显下降 ($P < 0.01$);与 IR+NS 组相比,IR+FGF21 组肝脏标本内 SOD 和 GSH 含量明显增加 ($P < 0.01$,图 2)。表明 IR 导致小鼠肝脏内抗氧化分子 SOD 和 GSH 含量下降,而 FGF21 预处理能够减少 SOD 和 GSH 下降的程度,提高小鼠的抗氧化损伤能力。

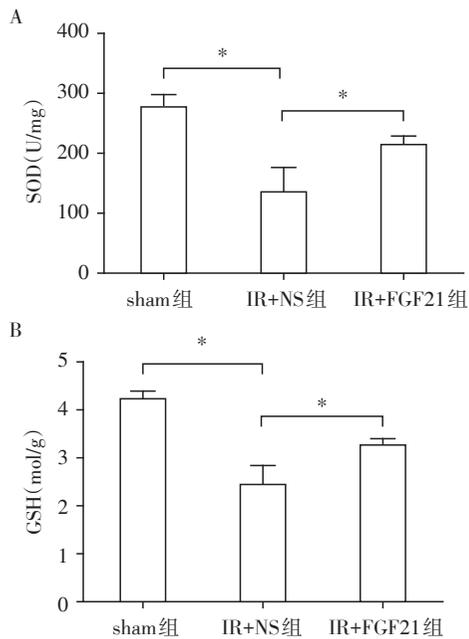
2.3 FGF21 预处理能减少 IR 小鼠肝脏组织内 ROS 的累积,减轻脂质过氧化损伤

取冷冻保存的肝脏标本,用相应的试剂盒检测组织内 ROS、MDA 的含量,与 sham 组相比,IR+NS 组肝脏标本内 ROS、MDA 含量均明显升高 ($P < 0.01$);与 IR+NS 组相比,IR+FGF21 组肝脏标本内 ROS、MDA 含量均明显下降 ($P < 0.01$,图 3)。ROS 含量直接反映了 IR 后组织内活性氧的累积情况,而 MDA 是脂质过氧化的产物,其含量反映了组织的氧化应

激水平和程度。

3 讨论

近年来,随着肝血管瘤、肝内胆管结石、肝硬化、肝癌等疾病日益增多,行肝叶切除、肝移植等根治性手术治疗的患者也明显增加。而肝脏缺血再灌注损伤是肝脏外科手术中无法避免的病理生理过程,也是引起术后肝功能不全或肝功能衰竭的主要原因。因此,减轻肝脏缺血再灌注损伤的相关实验性研究始终有着极其重要的临床治疗指导价值的。先前大量文献表明涉及肝脏缺血再灌注损伤的机制主要包括以下几个方面:①氧自由基的损伤作用;②钙超载的损伤作用;③ Kupffer 细胞激活及中性粒细胞聚集造成的损伤;④细胞炎症因子的损伤作用。其中氧自由基的损伤作用是引起缺血再灌注损伤的重要机制之一。组织缺血再灌注时,黄嘌呤氧化酶增多、中性粒细胞激活、线粒体内氧单电子还原增多等各种原因导致细胞内氧自由基大量产生,大量的自由基会破坏细胞膜、DNA、蛋白质



A: 肝脏标本内SOD水平; B: 肝脏标本内GSH水平。两组比较, $P < 0.01, n=10$ 。

图2 FGF21预处理能提高缺血再灌注小鼠的抗氧化损伤能力

Figure 2 Pretreatment of FGF21 can improve the anti-oxidative damage ability of mice that had experienced ischemic reperfusion injury

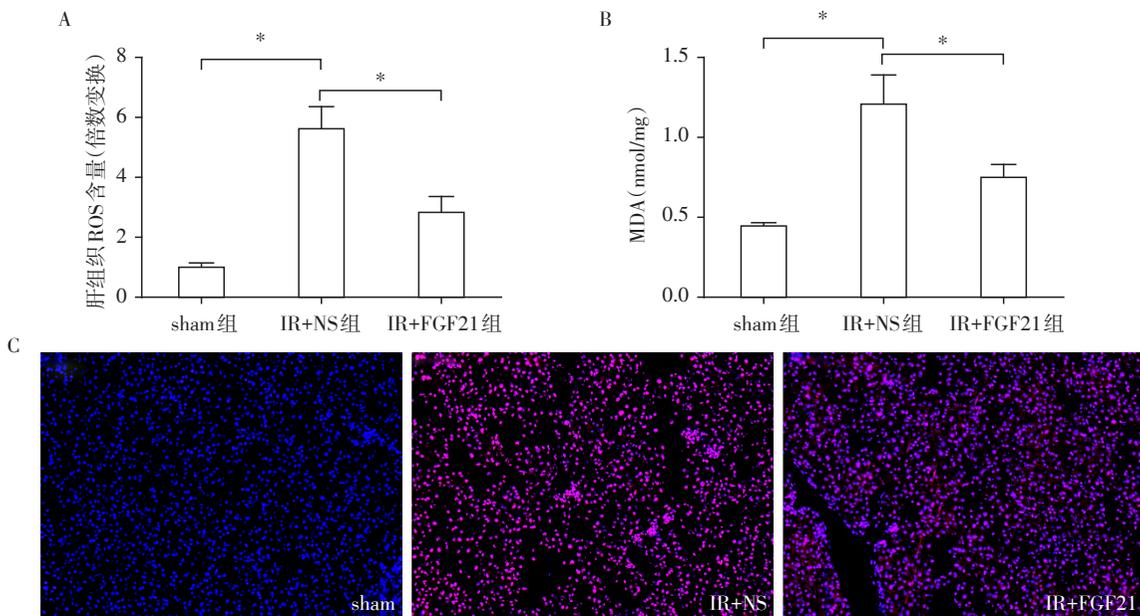
等重要结构引起细胞损伤^[8]。因此增强机体的抗氧化能力,清除过量的氧自由基可以有效减轻缺血再

灌注损伤。

FGF21是FGFs家族的成员,属于FGF19亚族。FGF21主要在肝脏表达,在骨骼肌、胰腺 β 细胞和脂肪组织也有表达。近年来对FGF21的研究主要集中在其对糖脂代谢的调节功能上,而FGF21在肝脏缺血再灌注损伤中的作用还未见相关报道。

本研究采用70%小鼠肝脏缺血再灌注模型,术前尾静脉注射rmFGF21,与注射生理盐水的对照组比较,术后12h血清ALT、AST含量明显下降;肝组织的病理分析和TUNEL染色显示IR+FGF21组样本病理损伤较轻,说明rmFGF21的预处理能减轻小鼠肝脏缺血再灌注损伤。SOD和GSH对机体的氧化与抗氧化平衡起着关键作用,能加速清除体内自由基和过氧化物,减轻其对细胞和组织的损伤^[9]。MDA是非饱和脂质过氧化的终产物,而非饱和脂质是细胞膜的重要组成成分,因此组织内MDA含量是氧化应激反应程度及水平的敏感指标。本实验结果显示,肝脏IR损伤后肝组织内ROS、MDA含量明显增加,SOD、GSH含量明显下降,而用rmFGF21预处理小鼠能减少这一改变,说明FGF21能够提高机体的抗氧化能力,减少细胞内的ROS含量、减轻脂质过氧化,进而减轻肝脏的缺血再灌注损伤。

FGF21是通过何种途径提高机体抗氧化能力、降低组织的ROS水平的,其机制有待进一步研究。然而既往研究显示,在对乙酰氨基酚过量摄入引起



A: 再灌注后12h各组肝脏标本内ROS含量(以sham组为基准的倍数值); B: 再灌注后12h各组肝脏标本内MDA含量(两组比较, $P < 0.01$); C: 再灌注12h后各组肝脏标本二氢乙锭染色代表性图片($\times 200$)。

图3 FGF21预处理减少缺血再灌注小鼠肝脏组织ROS含量,减轻脂质过氧化损伤

Figure 3 Pretreatment of FGF21 reduces the contents of ROS in liver tissue and reduces the damage of lipid peroxidation

的小鼠肝脏损伤中,FGF21可以通过促进过氧化物酶体增殖物激活受体共激活剂蛋白1 α (PGC-1 α)的表达激活Nrf2,导致下游抗氧化相关基因的表达,提高细胞抗氧化能力^[10-11]。这一机制在小鼠缺血再灌注损伤模型中或许同样适用。

目前尚未见到关于FGF21在肝脏缺血再灌注中作用研究的报道,本研究发现FGF21对小鼠肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与抑制肝缺血再灌注后的氧化应激反应有关,提示FGF21有可能在肝脏外科领域中有其应用价值。当然这仍需要大量的基础及临床试验验证,其具体机制也需要进一步研究探索,但本研究为临床上应对肝脏手术后的缺血再灌注损伤提供了一个新线索。

[参考文献]

- [1] Miyashita T, Nakanuma S, Ahmed AK, et al. Ischemia reperfusion-facilitated sinusoidal endothelial cell injury in liver transplantation and the resulting impact of extravasated platelet aggregation[J]. *Eur Surg*, 2016, 48(1):92-98
- [2] Suyavaran A, Thirunavukkarasu C. Preconditioning methods in the management of hepatic ischemia reperfusion-induced injury: update on molecular and future perspectives [J]. *Hepatol Res*, 2016, 47(1):31-48
- [3] Li J, Li RJ, Lv GY, et al. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(11):2036-2047
- [4] Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF21[J]. *Annu Rev Physiol*, 2016, 78(3):223-241
- [5] Ye D, Wang Y, et al. Fibroblast growth factor 21 protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity by potentiating peroxisome proliferator-activated receptor coactivator protein-1 α -mediated antioxidant capacity in mice [J]. *Hepatology*, 2014, 60(7):977-989
- [6] Ye D, Li H, Wang Y, et al. Circulating fibroblast growth factor 21 is a sensitive biomarker for severe ischemia/reperfusion injury in patients with liver transplantation [J]. *Sci Rep*, 2016, 6:19776
- [7] Asakawa H, Jeppsson B, Mack P, et al. Acute ischemic liver failure in the rat: A reproducible model not requiring portal decompression [J]. *Eur Surg Res*, 1989, 21(1):42-48
- [8] Kevin A. Morano, Chris M. Grant, et al. The response to heat shock and oxidative stress in *saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2012, 190(4):1157-1195
- [9] 骆助林,汤礼军,汪涛,等.氢气生理盐水对大鼠肝缺血再灌注后氧化应激损伤的保护作用[J]. *创伤外科杂志*, 2013, 15(2):157-159
- [10] Aquilano K, Baldelli S, Ciriolo MR. Nuclear recruitment of neuronal nitric-oxide synthase by α -synuclein is crucial for the induction of mitochondrial biogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(1):365-378
- [11] Aquilano K, Baldelli S, Barbera LL, et al. Adipose triglyceride lipase decrement affects skeletal muscle homeostasis during aging through FAs-PPAR α -PGC-1 α antioxidant response [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(17):23019-23032

[收稿日期] 2017-12-23

(上接第1042页)

- of coronary artery calcification as expression of subclinical atherosclerosis [J]. *Clin Biochem*, 2017, 50(18):1048-1055
- [8] Xing Y, Lai J, Liu X, et al. Netrin-1 restores cell injury and impaired angiogenesis in vascular endothelial cells upon high glucose by PI3K/AKT-eNOS [J]. *J Mol Endocrinol*, 2017, 58(4):167-177
 - [9] Kotas ME, Medzhitov R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility [J]. *Cell*, 2015, 160(5):816-827
 - [10] Gurses KM, Ozmen F, Kocyigit D, et al. Netrin-1 is associated with macrophage infiltration and polarization in human epicardial adipose tissue in coronary artery disease [J]. *J Cardiol*, 2017, 69(6):851-858
 - [11] Ramkhalawon B, Yang Y, van Gils JM, et al. Hypoxia induces netrin-1 and Unc5b in atherosclerotic plaques: mechanism for macrophage retention and survival [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(6):1180-1188
 - [12] Wang J, Zhou X, Lu H, et al. Fluoxetine induces VEGF/Netrin overexpression via the mediation of Hypoxia-inducible factor 1- α in SH-SY5Y cells [J]. *J Neurochem*, 2015. DOI:10.1111/jnc.13521. [Epub ahead of print]
 - [13] Ramkhalawon B, Hennessy EJ, Menager M, et al. Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity [J]. *Nat Med*, 2014, 20(4):377-384
 - [14] Liu C, Ke X, Wang Y, et al. The level of netrin-1 is decreased in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus patients [J]. *BMC Endocr Disord*, 2016, 16(1):33

[收稿日期] 2018-02-21