

· 基础研究 ·

## Urantide对急性肝衰竭小鼠肝组织 p120-catenin 表达的影响

何玉, 钟欢, 杨雪, 施青青, 徐国荣, 刘亮明\*

南京医科大学附属上海松江区中心医院感染科, 上海 201600

**[摘要]** 目的:探讨尾加压素Ⅱ(urotensinⅡ, UⅡ)受体拮抗剂 urantide对急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)小鼠肝组织 p120-catenin(p120ctn)表达的影响。方法:24只雄性 Balb/c 小鼠随机分为健康对照组、预处理对照组、ALF模型组和预处理 ALF组(6只/组)。ALF模型组和预处理 ALF组均以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)50 μg/kg联合 D-半乳糖胺(D-galactosamin, D-GalN)800 mg/kg腹腔注射诱导 ALF,健康对照组注射等体积的0.9%氯化钠溶液;预处理 ALF组在造模前30 min给予0.6 mg/kg urantide尾静脉注射;预处理对照组经同样预处理后腹腔注射等体积的0.9%氯化钠溶液。造模12 h后,采集动物肝组织标本。肝组织 p120ctn mRNA和蛋白质表达分别采用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)和免疫印迹(Western blot)分析方法检测。结果:p120ctn mRNA和蛋白相对表达水平在健康对照组和预处理对照组之间差异无统计学意义;而健康对照组、预处理对照组和预处理 ALF组 p120ctn mRNA和蛋白相对表达水平均显著高于 ALF模型组( $P < 0.05$ )。结论:LPS/D-GalN诱导 ALF小鼠肝内 p120ctn 表达受抑可能与 UⅡ/UT 信号系统的激活有关。

**[关键词]** 急性肝衰竭;urantide;p120-catenin;肝组织;小鼠

**[中图分类号]** R575.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)04-495-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20190406

## An effect of urantide on hepatic p120-catenin expression in acute hepatic failure mice

He Yu, Zhong Huan, Yang Xue, Shi Qinqin, Xu Guorong, Liu Liangming\*

Department of Infectious Diseases, Shanghai Songjiang Hospital Affiliated to NMU, Shanghai 201600, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of urantide, a urotensinⅡ receptor antagonist, on hepatic p120-catenin(p120ctn) expression in acute liver failure(ALF) mice. **Methods:** A total of 24 male Balb/c mice were randomly divided into the healthy control group, pretreatment control group, ALF model group and pretreatment ALF group (6/group). ALF model mice were induced by lipopolysaccharide(LPS) 50 μg/kg combined with D-galactosamine(D-GalN) 800 mg/kg intraperitoneal injection of ALF, and control mice were injected with an equal volume of 0.9% sodium chloride solution; the pretreated ALF group was given a 0.6 mg/kg urantide tail vein injection 30 min before modeling; the pretreatment control group was replaced with an equal volume of 0.9% sodium chloride solution. And then, liver specimens were collected after 12 h. The levels of hepatic p120ctn mRNA and protein were detected by real-time PCR and Western blot analysis. **Results:** There was no significant difference in the relative expression levels of p120ctn mRNA and protein between the healthy control group and the pretreatment control group, while the relative expression level of p120ctn mRNA and protein in the healthy control group and the pretreatment ALF group was significantly higher than that in the ALF model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The inhibition of p120ctn expression may be associated with the activation of UⅡ/UT signaling system in LPS/D-GalN-induced ALF mice.

**[Key words]** acute liver failure;urantide;p120-catenin;liver tissues;mouse

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(04):495-499]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81770612, 81070357, 30660066);南京医科大学科技发展基金重点项目(2016NJMUZD090)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuliangming@hotmail.com

急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)是一种免疫炎症相关的,以大量肝细胞坏死丢失后,短期内肝功能严重丧失为特征的肝损伤性疾病<sup>[1]</sup>。尾加压素Ⅱ(urotensin Ⅱ, UⅡ)是一种含有11个氨基酸的生长抑素样多肽类分子,病理生理学活性多样,可以调节内分泌、肾脏、心血管及免疫系统疾病的发生发展<sup>[2]</sup>。UⅡ分子主要通过其特异性孤儿G蛋白偶联受体(即UT)来发挥作用<sup>[3]</sup>。已证实,UⅡ/UT信号系统与ALF肝内免疫炎症损伤的发生发展存在着密切的联系<sup>[4-5]</sup>。研究显示,在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)/D-半乳糖(D-galactosamin, D-GalN)诱导的ALF动物模型中UⅡ/UT表达增高<sup>[6]</sup>,且在ALF中UⅡ/UT系统可以通过增强核因子(nuclear factor, NF)- $\kappa$ B p65亚基核移位并增强其与DNA结合能力<sup>[7]</sup>,从而促进ALF早期发生炎症因子肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )和白介素1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )瀑布式表达和释放<sup>[2]</sup>。近年研究发现,一种与维持组织和细胞屏障功能有关的黏附连接蛋白p120-catenin(p120ctn)可抑制Toll样受体4(Toll like receptor 4, TLR4)的功能,并阻止该分子TIR结构域与接头蛋白MyD88的同源结构域的相互作用,抑制I $\kappa$ B $\alpha$ 的磷酸化和降解,从而阻止NF- $\kappa$ B核转位,抑制炎症因子TNF- $\alpha$ 以及IL-1 $\beta$ 的释放<sup>[8-9]</sup>。这提示p120ctn存在免疫炎症抑制效应。为进一步研究UⅡ/UT系统与肝内p120ctn表达之间的关系,在本实验中,我们采用了UT受体特异性拮抗剂urantide阻断UⅡ/UT信号的转导,观察了实验鼠在LPS/D-GalN攻击后,肝内p120ctn的表达情况,借以更深入地阐明UⅡ/UT系统的肝组织免疫炎症反应机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

6周龄健康雄性Balb/c小鼠,清洁级,体重20~22 g,小鼠购于上海市交通大学附属第一人民医院实验动物中心,许可证号:SYXK(沪)2009-0086。LPS及D-GalN(Sigma公司,美国);urantide(Peptides International公司,日本);SYBRGreen PCR试剂盒及逆转录试剂盒(TaKaRa公司,日本);TRIzol(Thermo公司,美国);RIPA裂解液及BCA蛋白浓度测定试剂盒(北京碧云天公司);PCR引物由上海生工生物工程有限公司合成;p120ctn抗体(Abcam公司,英国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物分组及处理

24只雄性Balb/c小鼠按照随机数字表随机分成

4组(每组6只):健康对照组、预处理对照组、ALF模型组和预处理ALF组。ALF小鼠模型的制备参考文献<sup>[2]</sup>,以LPS 50  $\mu$ g/kg联合D-GalN 800 mg/kg,用0.2 mL 0.9%氯化钠溶液溶解后腹腔注射。健康对照组动物仅腹腔内注射0.2 mL 0.9%氯化钠溶液;预处理ALF小鼠则在LPS/D-GalN联合注射30 min前,以urantide 0.6 mg/kg(0.9%氯化钠溶液溶解)尾静脉注射,预处理对照组经相同预处理后以0.9%氯化钠溶液腹腔注射。12 h后采集肝组织标本。

#### 1.2.2 Real-time PCR分析

取50~100 mg肝组织,采用TRIzol处理,总RNA的提取按照试剂盒说明书进行操作。2  $\mu$ g总RNA作为模板用于第1链cDNA合成(5 $\times$ PrimeScript RT Master Mix 2  $\mu$ L,以无核酸酶水补至终体积10  $\mu$ L,37  $^{\circ}$ C孵育15 min,95  $^{\circ}$ C加热5 s,将cDNA置于-20  $^{\circ}$ C保存)。引物设计借助于Primer Premier 6.0软件设计,基因检测引物序列和产物长度如表1。Real-time PCR操作方法按照试剂盒说明书进行:2 $\times$ Pre-mix Ex Taq<sup>TM</sup> II 10  $\mu$ L,上、下游引物各0.4  $\mu$ L,ROX Reference Dye II 0.4  $\mu$ L,DNA模板2  $\mu$ L,加灭菌蒸馏水至20  $\mu$ L,建立反应体系。在ABI7500仪器按照两步法进行扩增:第1步:50  $^{\circ}$ C 2 min,1个循环;第2步:95  $^{\circ}$ C 5 min,40个循环。GAPDH作为内参照。检测结束后,得到每个样本的C<sub>T</sub>值,按照 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 公式计算各组mRNA相对表达量定值。

表1 不同基因检测引物序列

Table 1 Different gene detection primer sequences	
基因	引物序列(5'→3')
P120ctn	上游:GTTGCTTTGGAGCCAAGAAG
	下游:TACTAGCCTCGAGCAGGACT
GAPDH	上游:GACATGCCGCTGGAGAAAC
	下游:GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG

#### 1.2.3 免疫印迹(Western blot)分析

将肝组织剪成大小基本相等的细小碎片,按照每20 mg组织加入150~250  $\mu$ L的比例加入RIPA裂解液(含蛋白酶抑制剂),匀浆器匀浆至组织完全裂解,裂解后的样本4  $^{\circ}$ C 12 000 r/min离心15 min,取上清。用BCA蛋白浓度试剂盒测定各样本蛋白浓度,取50  $\mu$ g蛋白,水浴煮沸10 min后进行12%十二烷基硫酸钠/聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳,转移至硝酸纤维素(NC)膜上。5%脱脂奶粉室温2 h封闭结合含有蛋白质的NC膜,封闭结束后,分别加入适量p120ctn及内参 $\beta$ -actin抗体,4  $^{\circ}$ C下孵育过夜。

0.1%的PBST漂洗3次,每次5 min。加辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下孵育2 h后,0.1%的PBST漂洗3次,每次5 min。结果用ECL-Plus化学发光试剂盒检测,X线片曝光。X线片显影和定影后观察结果,并采用Image J软件进行灰度值分析,计算蛋白相对表达量。

### 1.3 统计学方法

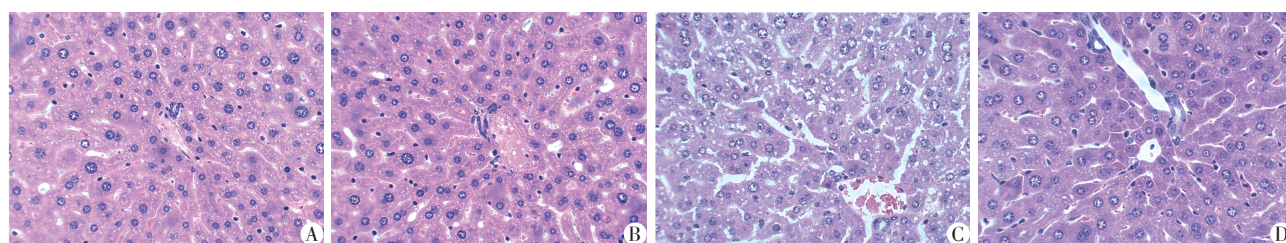
所有实验重复操作6次。实验数据的分析及处理采用SPSS19.0软件,计量数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用两因素方差分析进行组间比较,以

$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠肝组织病理特征

如图1所示,健康对照组和预处理对照组肝细胞凋亡较少,肝组织结构正常,出血较少,ALF模型组见大量肝细胞凋亡,肝组织结构紊乱,血管内见较多的红细胞,预处理ALF组见肝细胞凋亡减少,肝组织结构恢复,血管内红细胞减少。这提示LPS/D-GalN可以成功诱导小鼠ALF模型,而且urantide



A:健康对照组;B:预处理对照组;C:ALF模型组;D:预处理ALF组。

图1 急性肝衰竭小鼠肝组织病理(HE,×400)

Figure 1 Liver histopathology in acute liver failure mice(HE,×400)

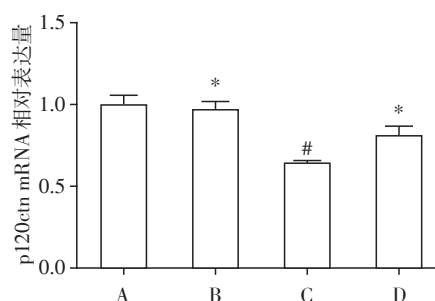
可以减轻或逆转ALF模型。

### 2.2 小鼠肝组织p120ctn mRNA的表达

各组小鼠肝组织p120ctn mRNA的表达情况如图2。结果显示,健康对照组和预处理对照组之间无统计学差异( $F=0.669, P=0.451$ ),表明urantide本身对p120ctn mRNA表达没有影响;健康对照组的p120ctn mRNA相对表达量比ALF模型组高0.365(95%CI:0.309~0.420,  $F=2\ 667.600, P < 0.001$ ),表明LPS/D-GalN可使ALF小鼠肝组织p120ctn mRNA表达明显下降;预处理ALF组的p120ctn mRNA相对表达量比ALF模型组高0.175(95%CI:0.103~0.247,  $F=38.918, P=0.002$ ),这提示urantide可减轻或逆转LPS/D-GalN诱导的ALF小鼠肝内p120ctn mRNA表达下调。

### 2.3 小鼠肝组织内p120ctn的表达

各组小鼠肝组织内p120ctn表达情况见图3。结果显示,健康对照组和预处理对照组之间无统计学差异( $F=2.377, P=0.221$ ),表明urantide本身对p120ctn蛋白表达没有影响;健康对照组的p120ctn蛋白相对表达量比ALF模型组高2.060(95%CI:1.637~2.483,  $F=240.204, P=0.001$ ),表明LPS/D-GalN可使ALF小鼠肝组织p120ctn蛋白表达明显下降;预处理ALF组的p120ctn蛋白相对表达量比ALF模型组高0.502(95%CI:0.190~0.815,  $F=26.195, P=$



A:健康对照组;B:预处理对照组;C:ALF模型组;D:预处理ALF组;与健康对照组比较,\* $P < 0.001$ ;与ALF模型组比较,\* $P < 0.01$ 。

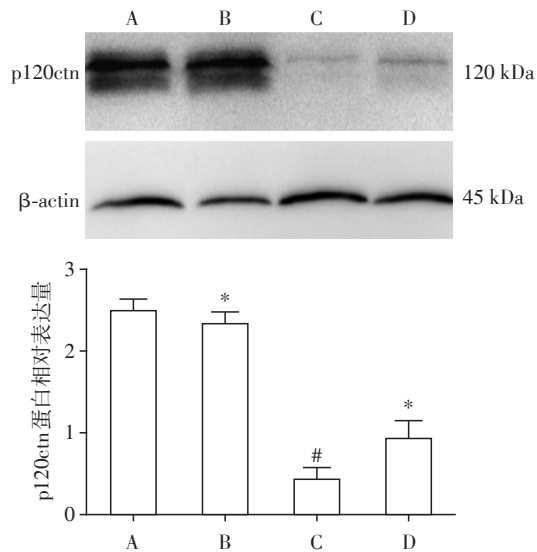
图2 Real-time PCR分析急性肝衰竭小鼠肝组织p120ctn mRNA表达情况

Figure 2 Expression of p120ctn mRNA in liver tissue of mice with acute hepatic failure by real-time PCR

0.014),这提示urantide可减轻或逆转LPS/D-GalN诱导ALF小鼠肝内p120ctn蛋白表达的下调。

## 3 讨论

本实验采用了前期构建的免疫炎症相关性ALF小鼠模型<sup>[10]</sup>。在该模型中,LPS/D-GalN攻击12 h内,实验鼠的死亡率即达50%,肝内出现重度炎症性损伤和大量肝细胞凋亡。同时,肝组织中U II和UT的表达也显著增加<sup>[6,11]</sup>。采用UT受体特异性拮抗剂urantide对实验鼠进行预处理后,肝内U II/UT



A:健康对照组;B:预处理对照组;C:ALF模型组;D:预处理ALF组;与健康对照组比较,\* $P=0.001$ ;与ALF模型组比较,\* $P<0.05$ 。

图3 急性肝衰竭小鼠肝组织p120ctn蛋白表达情况

Figure 3 Expression of p120ctn protein in liver of mice with acute hepatic failure

的表达和肝组织炎症损伤被显著抑制,且保护了实验鼠免于LPS/D-GalN攻击诱导的死亡,减轻了肝对促炎细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 等的分泌<sup>[7]</sup>。进一步研究还发现,在ALF极早期,血中U II水平即出现显著升高,且是较TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 分泌更加早期的事件,urantide有助于阻止TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 在ALF早期的瀑布式释放<sup>[4]</sup>。这提示,U II/UT系统介导了LPS/D-GalN诱导的ALF,且该信号系统的激活可能是ALF肝组织免疫炎症损伤的触发者(trigger)。

本研究发现,该ALF模型小鼠免疫炎症损伤肝组织内p120ctn基因和蛋白质的表达均显著降低。p120-catenin是犰狳蛋白重复结构域蛋白(armadillo repeat domain protein)超家族的重要成员,也被称作cadherin结合蛋白(cadherin-associated protein)。p120-catenin主要通过与其胞浆结构域直接结合,以维持细胞-细胞连接的完整性。研究证实,p120-catenin并非简单地成为组织结构的“建筑砖块”(building block),而是能作为分子传感器(molecular sensor),在细胞之间传递信息,调节细胞生物学行为<sup>[12]</sup>。报告显示,p120-catenin在细胞-细胞黏附<sup>[13]</sup>、脏器发育<sup>[14]</sup>、细胞增殖<sup>[15]</sup>和肿瘤进展<sup>[16]</sup>等方面均有重要作用。p120-catenin也是内皮细胞(endothelial cell, EC)黏附连接的主要成分。EC是机体内十分重要的固有免疫细胞,其功能失调可释放包括TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 在内的多种炎症介质,诱导急性炎

症反应和组织损伤<sup>[17]</sup>,即产生所谓的“内皮炎症”(endothelial inflammation)。p120-catenin在EC中的正常表达有助于维持内皮屏障和固有免疫功能,并能调控内皮炎症反应<sup>[9]</sup>、减轻内皮炎症性损伤<sup>[18]</sup>。最近研究发现,p120-catenin基因敲除可诱导支气管上皮细胞炎症信号分子NF- $\kappa$ B激活<sup>[19]</sup>。ALF模型小鼠肝组织内p120-catenin表达下调,提示其可能与肝组织炎症损伤调控相关。结合我们前期对同一实验动物模型研究的结果<sup>[7]</sup>,还可以得出这样一个推论,即在LPS/D-GalN诱导ALF小鼠肝内U II/UT信号系统的活性与p120-catenin的表达呈负相关关系。

为进一步验证以上推论,在本实验中采用了UT受体特异性拮抗剂urantide以阻断U II/UT信号转导。本研究发现,urantide的应用明显减轻了ALF肝内p120-catenin的受抑制程度。这提示实验鼠肝内p120-catenin的表达受到U II/UT系统的影响,U II/UT系统的激活可抑制肝内p120-catenin的表达。在肝脏p120-catenin主要表达于肝窦EC<sup>[7]</sup>。肝窦EC是肝内数量最多的非实质细胞和重要的固有免疫细胞。p120ctn的正常表达和活性有助于抑制TLR4及其下游NF- $\kappa$ B信号激活,从而抑制炎症和免疫性损伤<sup>[20]</sup>。因此,ALF的发生可能与U II/UT信号系统激活后,对p120-catenin的抑制作用有关。p120-catenin表达水平下调可能诱导肝脏EC功能失调和“内皮炎症”反应,并进而造成肝组织免疫炎症损伤效应。“内皮炎症”在ALF发生的研究中尚是一个新领域,U II/UT系统在“内皮炎症”中的作用以及U II/UT系统的“内皮炎症”效应在ALF发生中的地位和作用均是值得深入研究的课题。

#### [参考文献]

- [1] 马虎成,王鑫,吴旻娜,等.骨髓间充质干细胞对急性肝衰竭的治疗作用及机制[J].中华肝胆外科杂志,2017,10(23):694-699
- [2] 赵亮,梁冬雨,刘亮明,等.急性肝衰竭早期尾加压素II表达及其前炎细胞因子TNF- $\alpha$ 和IL-1 $\beta$ 的关系[J].上海交通大学学报(医学版),2012,5(32):543-549
- [3] Castel H, Desrues L, Joubert JE, et al. The G protein-coupled receptor UT of the neuropeptide urotensin II displays structural and functional chemokine feature[J]. Front Endocrinol(lausanne),2017,8:76
- [4] Liu LM, Zhao L, Liang DY, et al. Effects of urotensin-II on cytokines in early acute liver failure in mice[J]. World J Gastroenterol,2015,21(11):3239-3244
- [5] Liu LM, Liang DY, Ye CG, et al. The U II/UT system mediates upregulation of proinflammatory cytokines through

- p38 MAPK and NF- $\kappa$ B pathways in LPS-stimulated kupffer cells[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3):e0121383
- [6] 刘亮明,梁冬雨,张芳芳,等. Urotensin II在急性肝衰竭小鼠肝组织中的表达及损伤作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 20(18):1616-1622
- [7] Liang DY, Liu LM, Ye CG, et al. Inhibition of UH/UTR system relieves acute inflammation of liver through preventing activation of NF- $\kappa$ B pathway in ALF mice[J]. *PLoS One*, 2013, 8(6):e64895
- [8] Liu N, Li AL, Zhou XP, et al. P120 catenin attenuates lipopolysaccharide-induced blood-brain barrier dysfunction and inflammatory responses in human brain microvascular endothelial cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(4):4204-4212
- [9] Hu G. P120-catenin: A novel regulator of innate immunity and inflammation[J]. *Crit Rev Immunol*, 2012, 32(2):127-138
- [10] 刘亮明,叶长根,梁冬雨,等. UT受体拮抗剂urantide对急性肝衰竭小鼠肝组织NF- $\kappa$ B信号通路分子的影响[J]. *肝脏*, 2013, 18(2):88-91
- [11] 于芳苹,赵亮,刘亮明,等. Urantide对小鼠急性肝细胞凋亡的影响及其机制[J]. *中华医学杂志*, 2011, 91(47):3358-3362
- [12] Perez-Moreno M, Fuchs E. Catenins: keeping cells from getting their signals crossed[J]. *Dev Cell*, 2006, 11(5):601-612
- [13] Shahbazi MN, Megias D, Epifano C, et al. CLASP2 interacts with P120-catenin and governs microtubule dynamics at adherens junctions[J]. *J Cell Biol*, 2013, 203(6):1043-1061
- [14] Hendley AM, Provost E, Bailey JM, et al. P120 catenin is required for normal tubulogenesis but not epithelial integrity in developing mouse pancreas[J]. *Dev Biol*, 2015, 399(1):41-53
- [15] Nagy TA, Wroblewski LE, Wang D, et al.  $\beta$ -catenin and P120 mediate PPAR  $\delta$ -dependent proliferation induced by helicobacter pylori in human and rodent epithelial[J]. *Gastroenterology*, 2011, 141(2):553-564
- [16] Schackmann RC, Klarenbeek S, Vlug EJ, et al. Loss of P120-catenin induces metastatic progression of breast cancer by inducing anoikis resistance and augmenting growth factor receptor signaling[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(15):4937-4949
- [17] Pate M, Damaria V, Chi DS, et al. Endothelial cell biology: role in the inflammation response[J]. *Adv Clin Chem*, 2010, 52:109-130
- [18] 何庆,艾娇,黄煜. 百草枯所致血管内皮损伤与P120连环蛋白的关系及芒果苷的保护作用[J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(6):369-373
- [19] Qin S, Qin L, Zhang C, et al. P120-catenin modulating nuclear factor- $\kappa$ B activation is partially RhoA/ROCK dependent in scratch injury[J]. *Wound Repair Regen*, 2015, 23(2):231-240
- [20] Wang YL, Malik AB, Sun Y, et al. Innate immune function of the adherens junction protein p120-catenin in endothelial response to endotoxin[J]. *J Immunol*, 2011, 186(5):3180-3187
- [收稿日期] 2018-03-31

(上接第484页)

- cardiotoxic actions of terfenadine[J]. *JAMA*, 1993, 269(12):1532-1536
- [14] Hove-Madsen L, Llach A, Molina CE, et al. The proarrhythmic antihistaminic drug terfenadine increases spontaneous calcium release in human atrial myocytes[J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 553(1-3):215-221
- [15] Somberg JC, Preston RA, Ranade V, et al. Developing a safe intravenous sotalol dosing regimen[J]. *Am J Ther*, 2010, 17(4):365-372
- [16] Pratt CM, Camm AJ, Cooper W, et al. Mortality in the Survival With ORal D-sotalol (SWORD) trial: why did patients die?[J]. *Am J Cardiol*, 1998, 81(7):869-876
- [17] Knobloch K, Brendel J, Peukert S, et al. Electrophysiological and antiarrhythmic effects of the novel I(Kur)channel blockers, S9947 and S20951, on left vs. right pig atrium *in vivo* in comparison with the I(Kr)blockers dofetilide, azimilide, d, l-sotalol and ibutilide[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2002, 366(5):482-487
- [18] Oshikawa N, Watanabe I, Masaki R, et al. Frequency-dependent electrophysiological effect of ibutilide on human atrium and ventricle[J]. *J Interv Card Electrophysiol*, 2001, 5(1):81-87
- [19] Wood MA, Gilligan DM, Brown-Mahoney C, et al. Clinical and electrophysiologic effects of calcium channel blockers in patients receiving ibutilide[J]. *Am Heart J*, 2002, 143(1):176-180
- [收稿日期] 2018-11-16