

## 整合素 $\alpha_v$ 重组腺病毒的构建和鉴定及对人肝癌细胞黏附特性的影响

李旭艳 刘靖华 李志杰 莫永炎 刘亚伟 刘志锋 邓鹏 姜勇

**【摘要】** 目的 构建表达人整合素  $\alpha_v$  亚基(整合素  $\alpha_v$ )重组腺病毒,并在人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞中表达,探讨整合素  $\alpha_v$  对肝癌细胞黏附特性的影响。方法 将人整合素  $\alpha_v$  cDNA 克隆到腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-巨细胞病毒(CMV)启动子下游,与腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1 在细菌内同源重组,在 HEK-293A 细胞中包装成整合素  $\alpha_v$  重组腺病毒。以重组腺病毒感染 SMMC-7721 细胞 24 h 后,用蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测整合素  $\alpha_v$  的表达;通过黏附实验研究其对 SMMC-7721 细胞黏附的影响。结果 构建了整合素  $\alpha_v$  重组腺病毒载体并制备出高滴度重组腺病毒。重组腺病毒感染 SMMC-7721 细胞后,整合素  $\alpha_v$  能够正确表达,并且 SMMC-7721 细胞黏附率显著高于对照组和空白组( $P < 0.01$ )。结论 整合素  $\alpha_v$  基因在 SMMC-7721 细胞的黏附中起重要作用,是肿瘤转移的重要分子基础。

**【关键词】** 整合素; 细胞黏附; 腺病毒载体

**Construction of a recombinant adenoviral vector carrying integrin  $\alpha_v$ , and the influence of integrin  $\alpha_v$  on the adhesion characteristics of SMMC-7721 cells** LI Xu-yan, LIU Jing-hua, LI Zhi-jie, MO Yong-yan, LIU Ya-wei, LIU Zhi-feng, DENG Peng, JIANG Yong. Department of Pathophysiology, Key Laboratory of Functional Proteomics of Guangdong Province, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

Corresponding author: JIANG Yong (Email: yjiang@fimmu.com)

**【Abstract】 Objective** To establish human integrin  $\alpha_v$  adenovirus expressed in human liver cancer SMMC-7721 cells and analyze the characteristics of integrin  $\alpha_v$  adhesion to liver cancer cells. **Methods** Human integrin  $\alpha_v$  cDNA was cloned into the plasmid pAdTrack-CMV. Then, pAdTrack-integrin  $\alpha_v$  was cotransformed with adenoviral backbone vector into E. coli strain BJ5183. The recombinant adenoviral plasmid was identified by restriction analysis with Pac I and transfected into HEK-293A cells to package and amplify recombinant adenovirus particles. Western blot showed that integrin  $\alpha_v$  gene was exactly transcribed and expressed in SMMC-7721 cells. Twenty-four hours after transfection, the effect of integrin  $\alpha_v$  on adhesion of SMMC-7721 cells was detected by adhesion experiment. **Results** Recombinant adenovirus vector of integrin  $\alpha_v$  gene was successfully constructed and high titers of recombinant adenovirus was obtained. Adhesion cell count was significantly higher in integrin  $\alpha_v$ -transfected cells than in untransfected and Ad-null-transfected cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Over-expression of integrin  $\alpha_v$  promotes adhesion of SMMC-7721 cells, is an important molecular mechanism of tumor metastasis.

**【Key words】** integrin; cell adhesion; adenovirus vector

整合素(integrin)是一类细胞表面受体,是由  $\alpha$  和  $\beta$  两条链通过非共价键连接而成的异二聚体跨膜糖蛋白,广泛分布于多种动物细胞。整合素通过构型改变对细胞内外的刺激作出反应,并进行双向跨膜信号转导,在细胞黏附、迁移、增殖与分化及特异性基因转录调控中起重要作用<sup>[1]</sup>。整合素  $\alpha_v\beta_3$  具有介导细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)

基金项目:国家“973”计划重点基础研究项目(2002CB513005);广东省科技计划项目(A1090202);广州市科技计划项目(2001-Z-035-01-1);广东省自然科学基金重点项目(13058)

作者单位:510515 广东广州,南方医科大学病理生理学教研室,广东省功能蛋白质组学重点实验室

通讯作者:姜勇(Email: yjiang@fimmu.com)

作者简介:李旭艳(1978-),女(汉族),山东莱阳人,硕士研究生,助教,主要从事细胞信号转导的研究。

黏附、血小板聚集、免疫、组织修复、肿瘤浸润、血管生长等功能。为了进一步研究整合素  $\alpha_v$  亚基(整合素  $\alpha_v$ )的生物学功能,我们构建了整合素  $\alpha_v$  重组腺病毒载体并制备出高滴度重组腺病毒,通过感染人肝癌细胞株 SMMC-7721 细胞,观察整合素  $\alpha_v$  对 SMMC-7721 细胞黏附的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 试剂和仪器:**各种限制性内切酶、T4 连接酶、KOD-plus 高保真聚合酶(TOYOBO 公司),脂质体 Lipofectamine™2000(Gibco 公司),RPMI 1640 培养基以及胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, HyClone 公司),其他试剂均为进口或国产分析纯。

**1.2 菌株、质粒和细胞株:**整合素  $\alpha_v$ /PCI 由美国斯科里普斯(Scripps)研究院韩家淮(J. Han)博士馈

赠;腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-巨细胞病毒(CMV)、腺病毒骨架质粒 pAdEasy-1、大肠杆菌 BJ5183 购自 Stratagene 公司。大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、HEK-293A 细胞、SMMC-7721 细胞为本室保存。

**1.3 腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-整合素  $\alpha_v$  的构建**<sup>[2]</sup>:扩增整合素  $\alpha_v$  的上游引物:5'-TA GGT ACC ATG GCT TTT CCG CCG CGG CGAC-3' (下划线碱基为 Kpn I 酶切位);下游引物:5'-AC TCT AGA TTA AGT TTC TGA GTT TCC TTC-3' (下划线碱基为 Xba I 酶切位点);以整合素  $\alpha_v$ /PCI 质粒为模板,用 KOD-plus 高保真聚合酶进行聚合酶链反应(PCR):94 C、2 min,94 C、15 s,54 C、30 s,68 C、4 min,共 30 个循环;将 PCR 产物用 Kpn I 和 Xba I 双酶切,然后亚克隆至腺病毒穿梭质粒 pAdTrack-CMV 的载体中,形成转移质粒 pAdTrack-整合素  $\alpha_v$ ,分别行 PCR 及双酶切鉴定。

**1.4 细菌内同源重组产生 pAdEasy-整合素  $\alpha_v$  重组腺病毒质粒**:取 pAdTrack-整合素  $\alpha_v$  1  $\mu$ g,用 Pme I 线性化后,转化含 pAdEasy-1 的 BJ5183 感受态菌<sup>[3]</sup>,卡那霉素平板筛选,进行细菌内同源重组,16~20 h 后,挑取克隆,Pac I 酶切后产生特征性片段鉴定重组成功,为获得高拷贝的重组质粒,再转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,提取重组病毒质粒 5~10  $\mu$ g,用 Pac I 酶切使之线性化,同时切去 Kana 和 Ori 等载体构件,暴露反转录末端重复序列,酶切产物加去离子水至 100  $\mu$ l,加入 1/20 体积的醋酸钠 3 mol/L (pH 5.2) 和 2.5 倍体积预冷的无水乙醇,振荡混匀,-20 C 静置 30 min,4 C 下 12 000 r/min (离心半径 8.2 cm) 离心 10 min,小心吸去上清,再加入 500  $\mu$ l 预冷体积分数为 75% 的乙醇洗 1~2 次,沉淀溶于 10  $\mu$ l TE (DNA 洗脱液 (pH 为 8.0 的 10 mmol/L Tris  $\cdot$  Cl, pH 为 8.0 的 1 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA))) 备用。

**1.5 重组腺病毒在 HEK-293A 细胞的包装及鉴定**:转染前 1 d,将生长状态良好的 HEK-293A 细胞  $1 \times 10^6$  个铺到 6 cm 皿中,培养至细胞融合率达到 50%~70% 时再进行转染。将上述 Pac I 酶切后的重组腺病毒质粒,用 Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 转染 HEK-293A 细胞,继续培养并在荧光显微镜下观察增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 的表达,7~10 d 后收获细胞。在 37 C/-80 C 条件下反复冻融 4 次,得到病毒。重复以上步骤 3 次,可以得到高滴度病毒。取 2  $\mu$ l 重组腺病毒上清为模板,依照前述条件进行 PCR 反应扩增目的基因整合素  $\alpha_v$ ,以鉴定重组腺病毒。

取适量重组腺病毒感染 SMMC-7721 细胞,荧光显微镜下观察 EGFP 的表达,收集细胞,蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 鉴定整合素  $\alpha_v$  在 SMMC-7721 细胞中的表达,所用一抗为鼠抗人整合素  $\alpha_v$  抗体 (1:300),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 抗体 (1:2 000),最后用 LumiGLO 化学发光试剂 (英国 NEB 公司生产) 显色曝光,通过 IS 2000 R 多功能影像系统获得图像。病毒的量以空斑形成单位 (pfu) 表示。

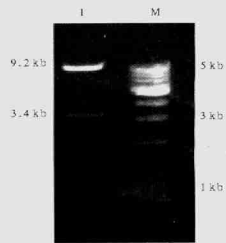
**1.6 黏附实验及分组**:分组:①重组腺病毒 Ad-整合素  $\alpha_v$  感染实验组 (实验组);②空病毒 Ad-null 对照组 (空白组);③正常细胞对照组 (对照组),以复合感染 (MOI)=80 的空病毒 Ad-null 和重组腺病毒 Ad-整合素  $\alpha_v$  分别感染 SMMC-7721 细胞,感染 24 h 后,在倒置荧光显微镜下观察,超过 95% 的细胞表达 EGFP,细胞状态良好。质量分数为 0.1% 的胰酶消化、离心、收集细胞,并用无血清 RPMI 1640 悬浮细胞,将细胞悬液分别接种于 24 孔板内,  $5 \times 10^4$  个细胞/孔 (0.5 ml/孔),每组设 6 个复孔。40 min 时弃去未黏着细胞,磷酸盐缓冲液 (PBS) 轻洗 2 遍,经 0.1% 胰酶消化后收集黏附细胞并计数。

黏附率 (%) = 黏附细胞数 / 总细胞数  $\times$  100%

**1.7 统计学处理**:用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行录入分析,实验结果用均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用单因素方差分析和 SNK 方法进行样本均数比较,  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 质粒 pAdTrack-整合素  $\alpha_v$  构建及鉴定 (图 1)**:用 Kpn I 和 Xba I 双酶切 pAdTrack-整合素  $\alpha_v$ ,可见 9.2 kb 和 3.4 kb 左右 2 个条带,与预测片段大小符合。

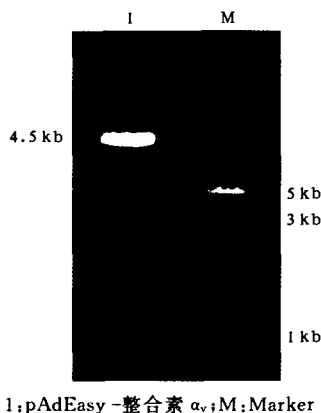


1: pAdTrack-整合素  $\alpha_v$ ; M: Marker

图 1 pAdTrack-整合素  $\alpha_v$  的酶切鉴定

Figure 1 Identification of pAdTrack-integrin  $\alpha_v$  by Kpn I and Xba I enzyme digestion

2.2 重组 pAdEasy-整合素  $\alpha_v$  腺病毒的酶切鉴定(图 2):Pme I 线性化的 pAdTrack-整合素  $\alpha_v$  与 pAdEasy-1 在 BJ5183 菌中能够发生重组,重组腺病毒质粒可在含卡那霉素的培养板上生长,根据质粒的大小进行初筛,经过 Pac I 酶切后产生一个 4.5 kb 的特异性条带,说明生成的重组腺病毒载体是正确的。



1: pAdEasy-整合素  $\alpha_v$ ; M: Marker

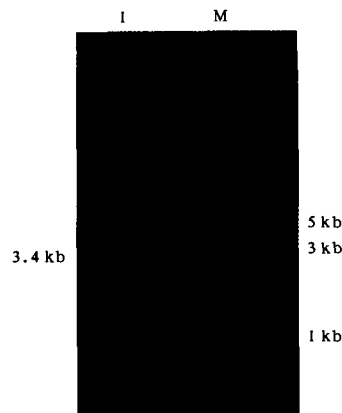
图 2 pAdEasy-整合素  $\alpha_v$  的酶切鉴定

Figure 2 Identification of pAdEasy-integrin- $\alpha_v$  by Pac I

2.3 Ad-整合素  $\alpha_v$  重组腺病毒的包装及滴度测定:线性化病毒载体转染 HEK-293A 细胞 24 h 后,应用荧光显微镜动态观察绿色荧光蛋白在细胞内的表达。开始 1~2 d,仅有少数细胞表达绿色荧光蛋白(彩色插页图 3A),3 d 后绿色荧光蛋白表达逐渐增多,出现典型的慧星样形态(彩色插页图 3B),取病毒上清感染 HEK-293A 细胞 3~4 次,有大量的绿色荧光蛋白表达(彩色插页图 3C)。病毒上清的滴度可达到  $3 \times 10^6$  pfu/ml。

2.4 Ad-整合素  $\alpha_v$  重组腺病毒的鉴定:以收集的病毒上清为模板,进行 PCR 反应,在预期位置可见特异性的条带,与插入目的片段大小一致,表明重组腺病毒构建成功(图 4)。Western blot 分析结果显示,Ad-整合素  $\alpha_v$  感染的 SMMC-7721 细胞中有约 120 ku 的蛋白条带存在(图 5),未感染或感染空病毒的细胞未见明显条带,提示由腺病毒介导的整合素  $\alpha_v$  能在 SMMC-7721 细胞中大量表达。

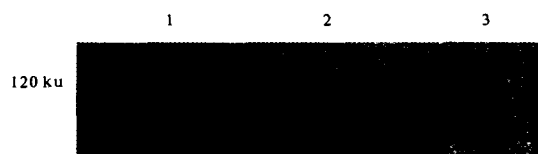
2.5 Ad-整合素  $\alpha_v$  对 SMMC-7721 细胞黏附的影响(图 6):接种 40 min,实验组的细胞黏附率为  $(88.33 \pm 2.58)\%$ ,分别是对照组  $(71.67 \pm 2.58)\%$  和空白组  $(60.00 \pm 3.16)\%$  的 1.232 倍和 1.472 倍 ( $P$  均  $< 0.01$ )。经单因素方差分析,3 组间差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ );3 组均数间经 SNK 检验比较,实验组与对照组、实验组与空白组差异均有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。



1: AdTrack-整合素  $\alpha_v$ ; M: Marker

图 4 AdTrack-整合素  $\alpha_v$  的 PCR 鉴定

Figure 4 Identification of AdTrack-integrin- $\alpha_v$  by PCR



1: 实验组; 2: 空白组; 3: 对照组

图 5 AdTrack-整合素  $\alpha_v$  的 Western blot 鉴定

Figure 5 Identification of AdTrack-integrin- $\alpha_v$  by Western blot

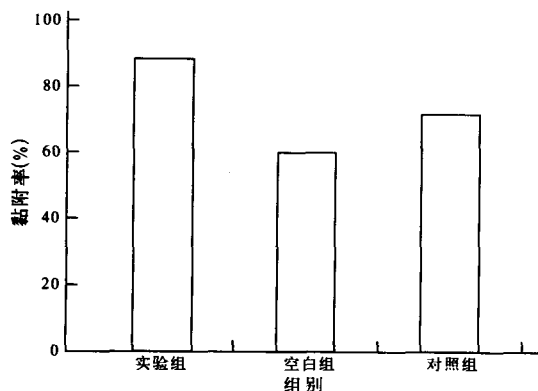


图 6 Ad-整合素  $\alpha_v$  对 SMMC-7721 细胞黏附特性的影响

Figure 6 Ad-integrin- $\alpha_v$  enhance SMMC-7721 adhesion

### 3 讨论

整合素功能多样,它能够参与细胞的增殖、分化、凋亡、细胞周期和淋巴细胞的归巢等多种细胞活动。所有这些功能,均是整合素通过介导 ECM 配体与细胞内骨架蛋白的信号传递实现的。整合素转导的信号是一个相当复杂的网络系统<sup>[4,5]</sup>。正常情况下整合素  $\alpha_v\beta_3$  在肿瘤细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞和白细胞等细胞中均有表达,在静息期血管内皮细胞表面整合素  $\alpha_v\beta_3$  呈低水平表达,但在血管形成过程中整合素  $\alpha_v\beta_3$  的表达上升<sup>[6,7]</sup>。肿瘤细胞转移与具有功能活性的整合素  $\alpha_v\beta_3$  有关<sup>[8]</sup>。整合素  $\alpha_v\beta_3$  通过多种途径在肿瘤的侵袭转移中发挥重要作用。

细胞黏附分子作用机制有 3 种模式:相邻细胞

表面同种黏附分子 (cell adhesion molecule, CAM) 间相互识别与结合 (亲同性黏附); 相邻细胞表面不同种 CAM 分子间相互识别与结合 (亲异性黏附); 相邻细胞表面相同 CAM 分子借细胞外的连接分子相互识别与结合<sup>[9]</sup>。肿瘤生成的极早期主要是降低整合素与基底膜或 ECM 蛋白的黏附力, 即使肿瘤细胞间的亲同性黏附下降, 促进肿瘤细胞从瘤体上脱落下来。当肿瘤细胞进入血液循环后整合素的表达增强, 使肿瘤细胞与宿主细胞间的亲异性黏附增加, 促进肿瘤的种植转移。ECM 是肿瘤侵袭的屏障, 它的溶解会促进肿瘤的侵袭转移。金属蛋白酶在 ECM 降解、破坏中起重要作用<sup>[10]</sup>。整合素可调节金属蛋白酶的表达和激活<sup>[11]</sup>。整合素在某一特定肿瘤中的表达是复杂的, 因为每一种肿瘤整合素在位表达显示出大量的异质性, 而不能在相同组织的培养细胞中完全再现。但其上调或下调的趋势在低分化肿瘤中可作为标志。如在低分化乳腺癌中整合素  $\alpha_2\beta_1$  和  $\alpha_5\beta_1$  低表达, 在转移性乳腺癌中整合素  $\alpha_v\beta_3$  高表达<sup>[12]</sup>。

为进一步研究整合素  $\alpha_v$  参与信号转导通路及与肿瘤侵袭转移间的关系, 我们选择人腺病毒载体作为工具表达整合素  $\alpha_v$ 。腺病毒用作载体, 不但能将外源基因导入细胞做瞬时表达, 也能直接导入动物体内表达, 病毒基因组与宿主染色体发生稳定整合的几率很低, 可介导外源基因高水平表达<sup>[13]</sup>。我们构建了整合素  $\alpha_v$  腺病毒载体, 并获得了高滴度重组病毒颗粒, 成功检测到整合素  $\alpha_v$  在 SMMC-7721 细胞的表达。接下来又对表达的整合素  $\alpha_v$  进行初步探讨, 发现整合素  $\alpha_v$  对 SMMC-7721 细胞黏附有明显的促进作用。整合素  $\alpha_v$  在 SMMC-7721 细胞内的定位及对细胞黏附的影响为下一步进行整合素

$\alpha_v$  功能研究打下了良好的基础。

#### 参考文献:

- 1 Camenisch G, Pisabarro M T, Sherman D, et al. ANGPTL3 stimulates endothelial cell adhesion and migration via integrin alpha v beta 3 and induces blood vessel formation in vivo [J]. J Biol Chem, 2002, 277: 17281 - 17290.
- 2 刘靖华, 孙学刚, 李志杰, 等. 人 Toll 样受体 4 胞浆内段融合蛋白表达载体的构建与表达 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 163 - 166.
- 3 李红乐, 秦清和, 王静珍, 等. 应用细菌同源重组法快速构建和制备重组腺病毒 [J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18: 1451 - 1454.
- 4 Amano M, Mukai H, Ono Y, et al. Identification of a putative target for Rho as the serine-threonine kinase protein kinase N [J]. Science, 1996, 271: 648 - 650.
- 5 Watanabe G, Saito Y, Madaule P, et al. Protein kinase N (PKN) and PKN-related protein rhophilin as targets of small GTPase Rho [J]. Science, 1996, 271: 645 - 648.
- 6 Mizejewski G J. Role of integrins in cancer: survey of expression patterns [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1999, 222: 124 - 138.
- 7 Sengupta S, Chattopadhyay N, Mitra A, et al. Role of alphavbeta3 integrin receptors in breast tumor [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2001, 20: 585 - 590.
- 8 Jin H, Varner J. Integrins: roles in cancer development and astreatment targets [J]. Br J Cancer, 2004, 90: 561 - 565.
- 9 李志杰, 刘靖华, 姜勇. Toll 样受体的发现及其研究进展 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 694 - 697.
- 10 Yang C, Zeisberg M, Mosterman B, et al. Liver fibrosis: insights into migration of hepatic stellate cells in response to extracellular matrix and growth factors [J]. Gastroenterology, 2003, 124: 147 - 159.
- 11 Deryugina E I, Ratnikov B I, Strongin A Y. Prinomastat, a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteinases, has a complex effect on migration of breast carcinoma cells [J]. Int J Cancer, 2003, 104: 533 - 541.
- 12 Silvestri I, Longanesi Cattani I, Franco P, et al. Engaged urokinase receptors enhance tumor breast cell migration and invasion by upregulating alpha (v) beta5 vitronectin receptor cell surface expression [J]. Int J Cancer, 2002, 102: 562 - 571.
- 13 Zhao H, Piwnicka-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1 [J]. Mol Cell Biol, 2001, 21: 4129 - 4139.

(收稿日期: 2006-04-22 修回日期: 2006-05-15)

(本文编辑: 李银平)

#### • 读者 • 作者 • 编者 •

#### 欢迎订阅 2006 年《中国危重病急救医学》杂志

《中国危重病急救医学》杂志系中华医学会和天津市天和医院主办的中华医学会系列杂志, 是我国急救医学界权威性学术期刊, 为中文核心期刊和中国科技核心期刊。本刊为月刊, 每月 10 日出版, 国际通用 16 开大版本, 内文用 80 克铜版纸印刷, 内容丰富, 且适合各种病理图片印刷。欢迎广大读者到当地邮局办理 2006 年的订阅手续。邮发代号: 6-58; 定价: 7.8 元/期, 全年 93.6 元。

订阅本刊的读者如果遇有本刊装订错误, 请将刊物寄回编辑部调换, 我们将负责免费邮寄新刊。

《中国危重病急救医学》杂志已进入美国 NLM《MEDLINE》、美国《化学文摘》(CA)、荷兰《医学文摘》(EM)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、“中国期刊网”、“中国学术期刊(光盘版)”、“万方数据网络系统 (China Info)”、“中文科技期刊数据库”和“em120.com 危重病急救在线”。投本刊论文作者需对本刊以上述方式使用论文无异议, 并由全部作者或由第一作者全权代表其他作者在版权转让协议和校稿上签字同意。稿酬已在本刊付酬时一次付清, 不同意者论文可不投本刊。本刊设有各种栏目, 欢迎广大作者踊跃投稿。

地址: 天津市和平区睦南道 122 号天和医院内; 邮编: 300050。

(本刊编辑部)

## 整合素 $\alpha_v$ 重组腺病毒的构建和鉴定及对人肝癌细胞黏附特性的影响

(正文见413页)



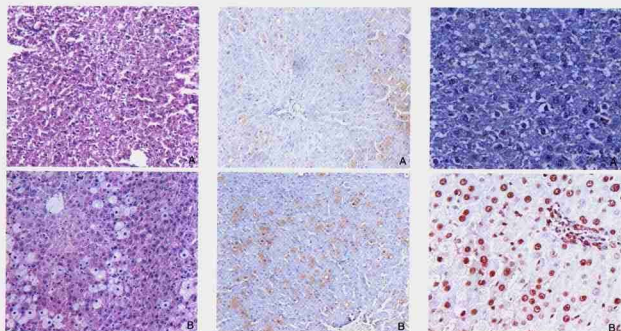
A: 转染整合素  $\alpha_v$  重组腺病毒质粒 ( $\times 100$ ); B: 整合素  $\alpha_v$  重组腺病毒携带的绿色荧光蛋白形态 ( $\times 100$ ); C: 用整合素  $\alpha_v$  重组腺病毒再次感染HEK-293A细胞 ( $\times 200$ )

图3 增强型绿色荧光蛋白在重组腺病毒中表达的动态观察

Figure 3 Dynamic observation of the expression of EGFP in recombinant adenovirus

## 急性肝损伤大鼠肝脏Fas和FasL的表达及其意义

(正文见417页)



A: 正常对照组; B: 实验组16 h

图1 大鼠肝组织病理学变化 (HE,  $\times 100$ )

Figure 1 Pathological changes of liver tissue in rats (HE,  $\times 100$ )

A: Fas; B: FasL

图2 实验组大鼠24 h肝组织Fas和FasL表达 (免疫组化,  $\times 100$ )

Figure 2 Expression of Fas and FasL in liver tissue at 24 hours in rats of experiment group (immunohistochemistry,  $\times 100$ )

A: 正常对照组; B: 实验组24 h

图3 大鼠肝细胞凋亡情况 (TUNEL,  $\times 400$ )

Figure 3 Hepatocyte apoptosis of rats (TUNEL,  $\times 400$ )

## 潘生丁预处理对大鼠肝缺血/再灌注损伤的保护作用

(正文见425页)

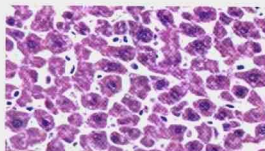


图1 潘生丁组肝组织病理学变化 (HE,  $\times 400$ )  
Figure 1 Pathological changes of liver tissues in dipycamole group (HE,  $\times 400$ )

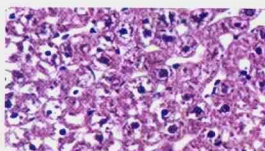


图2 缺血/再灌注组肝组织病理学变化 (HE,  $\times 400$ )  
Figure 2 Pathological changes of liver tissues in I/R group (HE,  $\times 400$ )