

自噬在血红素氧合酶 1 抑制大鼠肝脏缺血 / 再灌注损伤中的作用

蓝升 李金泰 刘毅

200433 上海, 第二军医大学附属长海医院麻醉科

通讯作者: 刘毅, Email: ziboliuyi@yeah.net

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2017.03.008

【摘要】 目的 探讨自噬在血红素氧合酶 1 (HO-1) 减轻肝缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤中的作用。**方法** 按随机数字表法将 40 只健康雄性 SD 大鼠分为 5 组, 每组 8 只。以肝左叶和中叶缺血 1 h / 再灌注 6 h 制备肝部分 I/R 损伤模型; 假手术 (Sham) 组只开腹, 不进行肝脏 I/R。钴原卟啉 (CoPP) 组于 I/R 前 24 h 腹腔注射 HO-1 诱导剂 CoPP 5 mg/kg, 而锌原卟啉 (ZnPP) 组和 6-氨基-3-甲基嘌呤 (3-MA) 组分别在 CoPP 预处理后、I/R 前 1 h 腹腔注射 HO-1 抑制剂 ZnPP 25 mg/kg 或自噬抑制剂 3-MA 30 mg/kg。于再灌注 6 h 取下腔静脉血和肝组织, 采用全自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 水平; 苏木素-伊红 (HE) 染色后光镜下观察肝组织病理学改变并进行病理评分; 原位末端缺刻标记试验 (TUNEL) 检测肝细胞凋亡情况并计算凋亡指数 (AI); 电镜下观察肝组织自噬体形成情况; 反转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测肝组织 HO-1、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3 (caspase-3) 及自噬相关基因 Beclin-1、Atg-5 的 mRNA 表达; 胆红素生成法检测肝组织 HO-1 活性。**结果** 与 Sham 组比较, I/R 组血清 ALT 明显升高 (U/L: 560.3 ± 73.6 比 49.1 ± 13.8 , $P < 0.01$), HE 染色显示肝组织损伤严重, 肝组织病理评分显著升高 (分: 12.0 ± 2.0 比 1.3 ± 0.9 , $P < 0.01$), TUNEL 检测显示凋亡细胞明显增多, AI 和 caspase-3 mRNA 表达明显增加 [AI: (19.38 ± 3.07)% 比 (3.25 ± 1.28)%, caspase-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$): 4.62 ± 0.40 比 1.05 ± 0.15 , 均 $P < 0.01$], 而 HO-1 表达和自噬表达差异均无统计学意义。与 I/R 组比较, CoPP 组肝脏损伤程度明显减轻 [ALT (U/L): 223.3 ± 34.4 比 560.3 ± 73.6 , 病理评分 (分): 5.6 ± 2.3 比 12.0 ± 2.0 , AI: (11.38 ± 2.39)% 比 (19.38 ± 3.07)%, caspase-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$): 2.42 ± 0.33 比 4.62 ± 0.40 , 均 $P < 0.01$], HO-1 表达及肝细胞自噬增加 [HO-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$): 3.01 ± 0.71 比 1.14 ± 0.20 , HO-1 活性 ($\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$): 259 ± 37 比 113 ± 26 , 自噬体计数 (个): 8.75 ± 0.87 比 1.25 ± 0.71 , Beclin-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$): 2.85 ± 0.28 比 1.15 ± 0.11 , Atg-5 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$): 2.44 ± 0.25 比 1.14 ± 0.12 , 均 $P < 0.01$]。给予 ZnPP 后可消除 CoPP 预处理增加自噬表达及减轻肝损伤的作用; 而给予 3-MA 则不影响 CoPP 预处理后 HO-1 的表达及活性增加, 但可抑制自噬表达, 同时也消除了 CoPP 预处理的保护作用。**结论** HO-1 可调控肝 I/R 时自噬的表达, 而自噬可能介导了 HO-1 减轻肝脏 I/R 损伤的作用。

【关键词】 缺血 / 再灌注, 肝; 血红素氧合酶 1; 自噬; 预处理**基金项目:** 国家自然科学基金 (81201455); 上海市自然科学基金 (12ZR1438600)

Study on the role of autophagy in heme oxygenase 1 preventing hepatic ischemia/reperfusion injury in rats

Lan Sheng, Li Jintai, Liu Yi

Department of Anesthesiology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Liu Yi, Email: ziboliuyi@yeah.net

【Abstract】 Objective To identify the role of autophagy in the protective mechanism of heme oxygenase 1 (HO-1) against hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** Forty healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly (random number table) divided into five groups ($n = 8$ in each group), namely sham group, model group, cobalt protoporphyrin (CoPP) group, zinc protoporphyrin (ZnPP) group and 6-amino-3-methylpurine (3-MA) group. Partial hepatic I/R model was established by clamping the pedicles of left and median lobes for 1 hour and reopening for 6 hours in rats, and the rats in sham group were only received celiotomy without hepatic I/R. In the CoPP group, CoPP (a HO-1 inducer, 5 mg/kg) was administered i.p. 24 hours before I/R. In the ZnPP or 3-MA group, besides pretreatment with CoPP, the rats were given ZnPP (a HO-1 inhibitor, 25 mg/kg) or 3-MA (an autophagy inhibitor, 30 mg/kg) i.p. 1 hour before I/R. Serum alanine aminotransferase (ALT) was determined with automatic biochemistry analyzer. The hepatic pathological scores (PS) were determined under light microscope using hematoxylin-eosin (HE) staining. The hepatocyte apoptosis index (AI) was assessed with terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) staining. Autophagosomes in liver tissue were counted under electron microscope. The mRNA expressions of HO-1, caspase-3, Beclin-1 and Atg-5 in the liver were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The HO-1 activity was also measured by the generation of bilirubin with the method of double-wave spectrophotometry. **Results** Compared with the sham group, the level of serum ALT significantly increased in the I/R group (U/L: 560.3 ± 73.6 vs. 49.1 ± 13.8 , $P < 0.01$), HE staining showed a severe hepatic injury (PS: 12.0 ± 2.0 vs. 1.3 ± 0.9 ,

$P < 0.01$), TUNEL staining showed a higher hepatocytes apoptosis and the expression of caspase-3 significantly increased [AI: $(19.38 \pm 3.07)\%$ vs. $(3.25 \pm 1.28)\%$, caspase-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$): 4.62 ± 0.40 vs. 1.05 ± 0.15 , both $P < 0.01$]. However, there was no significant difference in the expression of HO-1 and the genes associated with autophagy between the two groups. In the CoPP group, the hepatic injury was blunted compared with that in the I/R group [ALT (U/L): 223.3 ± 34.4 vs. 560.3 ± 73.6 , PS: 5.6 ± 2.3 vs. 12.0 ± 2.0 , AI: $(11.38 \pm 2.39)\%$ vs. $(19.38 \pm 3.07)\%$, caspase-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$): 2.42 ± 0.33 vs. 4.62 ± 0.40 , all $P < 0.01$]. HO-1 was induced in the CoPP group and autophagy was also increased significantly after I/R when compared with those in the I/R group [HO-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$): 3.01 ± 0.71 vs. 1.14 ± 0.20 , HO-1 activity ($\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$): 259 ± 37 vs. 113 ± 26 , the number of autophagosomes: 8.75 ± 0.87 vs. 1.25 ± 0.71 , Beclin-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$): 2.85 ± 0.28 vs. 1.15 ± 0.11 , Atg-5 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$): 2.44 ± 0.25 vs. 1.14 ± 0.12 , all $P < 0.01$]. In the ZnPP group, the activity of HO-1 was much lower than that in the CoPP group, and as a result autophagy was decreased and liver injury was increased. In the 3-MA group, although there was no difference in the activity of HO-1 compared with that in the CoPP group, autophagy was inhibited, and the protective effect of CoPP was eliminated. **Conclusion** HO-1 could regulate the level of autophagy during liver I/R, and in turn autophagy might mediate the protective effects of HO-1 against liver I/R injury.

[Key words] Hepatic ischemia/reperfusion; Heme oxygenase 1; Autophagy; Pretreatment

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81201455); Shanghai Municipal Natural Science Foundation of China (12ZR1438600)

肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤是导致肝脏移植手术、肝脏肿瘤切除术、失血性休克以及心肺复苏肝功能障碍、甚至衰竭的主要原因,目前临床上尚无很好的预防措施^[1-2]。自噬是细胞应对不良环境,维持自身能量代谢稳定的重要途径。在肝 I/R 时,肝细胞自噬受到抑制,而诱导肝细胞自噬可减轻肝 I/R 损伤^[3-4]。血红素氧合酶 1(HO-1)是维持细胞内能量代谢稳定、减轻氧化应激损伤的重要保护机制,研究显示其在减轻肝脏 I/R 损伤中发挥着重要作用^[5-6]。有研究表明,HO-1 减轻脓毒症肝脏损伤与其诱导肝细胞自噬相关^[7],提示自噬可能在 HO-1 保护机制中扮演重要角色。本实验通过诱导或抑制 HO-1,探讨 HO-1 对肝脏 I/R 大鼠肝细胞自噬的调控作用,并通过自噬抑制剂进一步明确自噬在 HO-1 减轻肝脏 I/R 损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂: 清洁级雄性 SD 大鼠,体重 200 ~ 250 g,购自第二军医大学实验动物中心,动物许可证号:SCXK(沪)2012-0003。HO-1 诱导剂钴原卟啉(CoPP)、HO-1 抑制剂锌原卟啉(ZnPP)、自噬抑制剂 6-氨基-3-甲基嘌呤(3-MA)、血红素、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸葡萄糖脱氢酶均购自美国 Sigma 公司,还原型辅酶 II(NADPH)购自德国 Boehringer Mannheim 公司;原位末端缺刻标记试验(TUNEL)试剂盒、总 RNA 提取试剂盒、反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒购于美国 Invitrogen 公司。

1.2 动物分组及肝脏 I/R 损伤模型制备: 按随机数字表法将大鼠分为假手术(Sham)组、I/R 组、CoPP 组、ZnPP 组、3-MA 组 5 组,每组 8 只。腹腔注射

10%水合氯醛 300 mg/kg 麻醉大鼠,开腹顿性分离肝脏左叶和中叶动脉、门静脉及胆管支,用小号无损伤动脉夹选择性夹闭左叶和中叶肝脏动脉、门静脉,保证肝脏右叶和尾状叶血流通畅以免胃肠道淤血及全身血流动力学改变;1 h 后移除动脉血管夹,逐层关腹。Sham 组只开腹,不进行肝脏 I/R。CoPP 组于肝脏 I/R 前 24 h 腹腔注射 CoPP 5 mg/kg; ZnPP 组、3-MA 组于 CoPP 预处理后、肝脏 I/R 前 1 h 分别腹腔注射 ZnPP 25 mg/kg、3-MA 30 mg/kg。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标及方法: 于再灌注 6 h,用水合氯醛麻醉大鼠,开腹取下腔静脉血,离心 15 min 收集血清于 -80°C 保存备用。取肝脏左叶,部分置于 10% 多聚甲醛溶液中 4°C 固定保存 48 h,制备石蜡包块;剩余部分置于含有 2% 低聚甲醛和 2% 戊二醛的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)中浸泡,制备超薄切片,用于电镜观察。取肝脏中叶置于 -80°C 液氮中冷冻保存备用。

1.3.1 血清丙氨酸转氨酶(ALT)测定: 应用全自动生化仪,采用速率法测定血清 ALT 水平。

1.3.2 肝组织病理学观察: 取肝组织石蜡包块,切片后行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肝组织病理学改变,并由病理科医师独立进行病理评分。评价方法^[8]: 光镜下选择 10 个视野,观察肝组织细胞质染色消失、空泡形成、核固缩、核裂解、核消失及红细胞淤积情况,根据每项病理学改变所占视野的百分比记分,0% 记 0 分,0 ~ 10% 记 1 分,10% ~ 50% 记 2 分,50% ~ 100% 记 3 分。以 6 项病理学改变评分总和进行统计。

1.3.3 肝组织细胞凋亡检测: 取肝组织石蜡切片,

脱蜡后水合,根据 TUNEL 试剂盒说明书步骤操作,计数视野中 TUNEL 染色阳性细胞数,以其占视野中总的有核细胞数的比例作为凋亡指数(AI)。

1.3.4 自噬体观察:取超薄切片脱水,乙酸双氧铀和柠檬酸铅双染,电镜下观察,每个标本随机选取 5 个视野进行自噬体计数。

1.3.5 RT-PCR 检测肝组织 HO-1、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3) 以及自噬相关基因 Beclin-1、Atg-5 的 mRNA 表达:取 50~100 mg 冷冻肝脏组织,用 TRIzol 法提取总 RNA,测定吸光度(A)值后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳筛选标本;最后取 5 μ g RNA 进行反转录、扩增,以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照,计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 值。引物序列由上海欧易生物医学科技有限公司合成。

1.3.6 HO-1 活性测定:取冷冻肝脏组织,加入 4 倍 PBS 制备组织匀浆,离心取上清,加到含有 NADPH、6-磷酸葡萄糖、6-磷酸葡萄糖脱氢酶、血红素及正常大鼠肝组织匀浆液(作为胆绿素还原酶的来源)的反应体系中,37 $^{\circ}$ C 水浴避光反应,通过检测 464 nm 和 530 nm 双波长的 A 值,计算生成的胆红素量,以每小时胆红素的生成量来反映 HO-1 的活性^[9]。

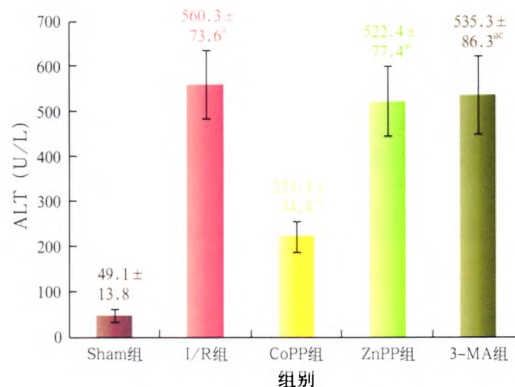
1.4 统计学方法:使用 SPSS 17.0 软件处理数据,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ALT(图 1):与 Sham 组比较, I/R 组血清 ALT 水平明显增高($P < 0.01$)。CoPP 组血清 ALT 水平较 I/R 组明显下降($P < 0.01$)。ZnPP 组和 3-MA 组血清 ALT 水平均明显高于 CoPP 组(均 $P < 0.01$)。说明给予 ZnPP 或 3-MA 可消除 CoPP 的保护作用。

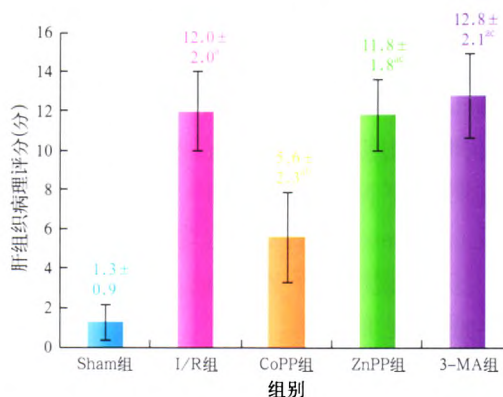
2.2 肝组织病理学改变(图 2~3):光镜下观察, I/R 组肝脏损伤明显,肝细胞出现灶状或片状坏死;病

理评分较 Sham 组明显升高($P < 0.01$)。CoPP 组肝组织病理损伤较 I/R 组明显减轻,病理评分较 I/R 组明显降低($P < 0.01$)。而 ZnPP 组和 3-MA 组肝组织病理损伤与 I/R 组相似,病理评分与 I/R 组差异也无统计学意义(均 $P > 0.05$)。说明给予 ZnPP 或 3-MA 可消除 CoPP 减轻肝损伤的作用



注: Sham 为假手术, I/R 为缺血/再灌注, CoPP 为血红素氧合酶 1 (HO-1) 诱导剂钴原卟啉, ZnPP 为 HO-1 抑制剂锌原卟啉, 3-MA 为自噬抑制剂 6-氨基-3-甲基嘌呤, ALT 为丙氨酸转氨酶; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 I/R 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 CoPP 组比较, ^c $P < 0.01$

图 1 各组大鼠肝脏 I/R 损伤后血清 ALT 水平比较



注: Sham 为假手术, I/R 为缺血/再灌注, CoPP 为血红素氧合酶 1 (HO-1) 诱导剂钴原卟啉, ZnPP 为 HO-1 抑制剂锌原卟啉, 3-MA 为自噬抑制剂 6-氨基-3-甲基嘌呤; 与 Sham 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 I/R 组比较, ^b $P < 0.01$; 与 CoPP 组比较, ^c $P < 0.01$

图 2 各组大鼠肝脏 I/R 损伤后肝组织病理评分比较

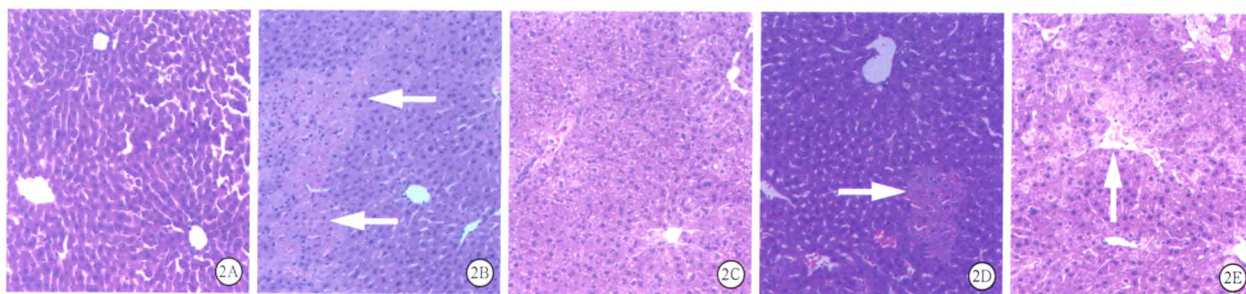


图 3 光镜下观察各组大鼠肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤后 6 h 肝组织病理学改变 假手术(Sham)组(A)肝细胞呈多面体形,胞核大而圆、居中,肝小叶结构基本完整,肝细胞索结构清晰; I/R 组(B)肝小叶变形,肝细胞空泡变性,部分肝组织出现片状坏死;血红素氧合酶 1 (HO-1) 诱导剂钴原卟啉(CoPP)组(C)肝细胞损伤较 I/R 组减轻; HO-1 抑制剂锌原卟啉(ZnPP)组(D)和自噬抑制剂 6-氨基-3-甲基嘌呤(3-MA)组(E)大量肝细胞空泡样改变,肝细胞片状坏死,肝小叶结构破坏;箭头所示为肝组织灶状坏死 HE 染色 中倍放大

2.3 HO-1 的基因表达及活性(表 1): I/R 组 HO-1 mRNA 表达及活性与 Sham 组比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。CoPP 组、ZnPP 组、3-MA 组 HO-1 mRNA 表达均较 I/R 组显著升高(均 $P<0.01$)，且 3 组间无差异。CoPP 组、3-MA 组 HO-1 活性均较 I/R 组显著升高(均 $P<0.01$)；而 ZnPP 组 HO-1 活性显著低于 CoPP 组($P<0.01$)。说明给予 3-MA 对 CoPP 增加 HO-1 表达及活性无影响。

表 1 各组大鼠肝脏 I/R 损伤后 HO-1 的基因表达及活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	HO-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	HO-1 活性 ($\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
Sham 组	8	1.01 ± 0.10	104 ± 23
I/R 组	8	1.14 ± 0.20	113 ± 26
CoPP 组	8	3.01 ± 0.71^{ab}	259 ± 37^{ab}
ZnPP 组	8	3.22 ± 0.54^{ab}	82 ± 21^c
3-MA 组	8	2.86 ± 0.54^{ab}	245 ± 30^{ab}
F 值		40.509	70.606
P 值		0.001	0.001

注:Sham 为假手术, I/R 为缺血/再灌注, CoPP 为血红素氧合酶 1(HO-1)诱导剂钴原卟啉, ZnPP 为 HO-1 抑制剂锌原卟啉, 3-MA 为自噬抑制剂 6-氨基-3-甲基嘌呤;与 Sham 组比较, $^aP<0.01$;与 I/R 组比较, $^bP<0.01$;与 CoPP 组比较, $^cP<0.01$

2.4 肝组织细胞凋亡情况(图 4;表 2): I/R 组肝组织可见大量凋亡细胞, AI 及 caspase-3 mRNA 表达均较 Sham 组明显升高(均 $P<0.01$)。与 I/R 组比较, CoPP 组凋亡细胞明显减少, AI 及 caspase-3 mRNA 表达均明显下降(均 $P<0.01$)。ZnPP 组和 3-MA 组 AI 及 caspase-3 mRNA 表达均明显高于 CoPP 组(均 $P<0.01$)。说明给予 ZnPP 或 3-MA 可消除 CoPP 抑制肝细胞凋亡的作用。

2.5 自噬体及自噬相关基因表达(表 3): CoPP 组自噬体计数及自噬相关基因 Beclin-1 和 Atg5 的 mRNA 表达均较 Sham 组显著增加(均 $P<0.01$)，而其他各组自噬体及自噬相关基因表达与 Sham 组比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

表 2 各组大鼠肝脏 I/R 损伤后肝细胞 AI 和 caspase-3 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	AI (%)	caspase-3 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Sham 组	8	3.25 ± 1.28	1.05 ± 0.15
I/R 组	8	19.38 ± 3.07^a	4.62 ± 0.40^a
CoPP 组	8	11.38 ± 2.39^{ab}	2.42 ± 0.33^{ab}
ZnPP 组	8	19.63 ± 3.50^{ac}	3.85 ± 0.64^{ac}
3-MA 组	8	20.00 ± 3.81^{ac}	5.01 ± 0.30^{ac}
F 值		49.635	135.893
P 值		0.001	0.001

注:Sham 为假手术, I/R 为缺血/再灌注, CoPP 为血红素氧合酶 1(HO-1)诱导剂钴原卟啉, ZnPP 为 HO-1 抑制剂锌原卟啉, 3-MA 为自噬抑制剂 6-氨基-3-甲基嘌呤, AI 为凋亡指数, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3;与 Sham 组比较, $^aP<0.01$;与 I/R 组比较, $^bP<0.01$;与 CoPP 组比较, $^cP<0.01$

表 3 各组大鼠肝脏 I/R 损伤后肝组织自噬体计数及自噬相关基因 Beclin-1 和 Atg5 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	自噬体计数 (个)	Beclin-1 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	Atg5 mRNA ($2^{-\Delta\Delta CT}$)
Sham 组	8	0.75 ± 0.46	1.01 ± 0.09	1.02 ± 0.09
I/R 组	8	1.25 ± 0.71	1.15 ± 0.11	1.14 ± 0.12
CoPP 组	8	8.75 ± 0.87^{ab}	2.85 ± 0.28^{ab}	2.44 ± 0.25^{ab}
ZnPP 组	8	1.00 ± 0.54^c	1.08 ± 0.18^c	1.33 ± 0.17^c
3-MA 组	8	0.63 ± 0.52^c	0.93 ± 0.27^c	0.99 ± 0.24^c
F 值		240.800	126.762	82.280
P 值		0.001	0.001	0.001

注:Sham 为假手术, I/R 为缺血/再灌注, CoPP 为血红素氧合酶 1(HO-1)诱导剂钴原卟啉, ZnPP 为 HO-1 抑制剂锌原卟啉, 3-MA 为自噬抑制剂 6-氨基-3-甲基嘌呤;与 Sham 组比较, $^aP<0.01$;与 I/R 组比较, $^bP<0.01$;与 CoPP 组比较, $^cP<0.01$

3 讨论

本研究探讨了自噬在 HO-1 预防肝 I/R 损伤中的作用。结果显示, CoPP 预处理可诱导 HO-1 高表达,显著增加肝 I/R 时自噬的表达,抑制肝细胞凋亡及坏死;给予 HO-1 抑制剂 ZnPP 消除了 CoPP 增加自噬表达及减轻肝脏损伤的作用;给予自噬抑制剂 3-MA 不影响 CoPP 预处理后 HO-1 的表达及活性增加,但抑制了自噬表达,同样也消除了 CoPP 预处理的保护作用。提示诱导和抑制 HO-1 可调控肝 I/R

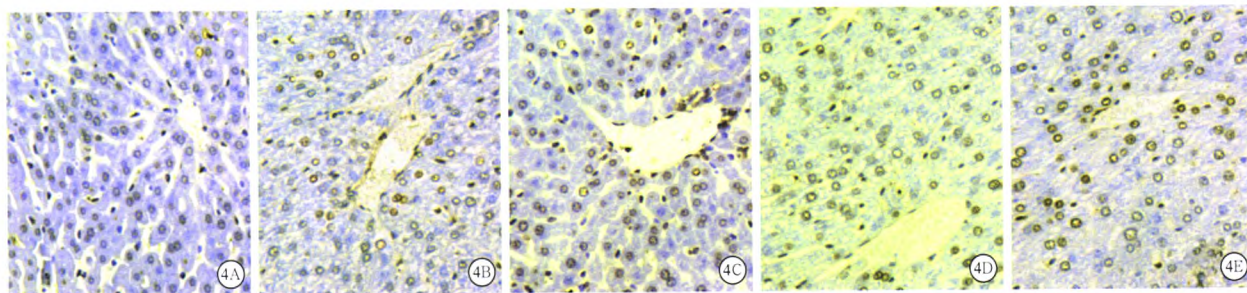


图 4 光镜下观察各组大鼠肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤后 6 h 肝细胞凋亡情况 凋亡细胞呈棕色;假手术(Sham)组(A)可见散在凋亡细胞;I/R 组(B)可见大量凋亡细胞;血红素氧合酶 1(HO-1)诱导剂钴原卟啉(CoPP)组(C)凋亡细胞较 I/R 组明显减少;HO-1 抑制剂锌原卟啉(ZnPP)组(D)和自噬抑制剂 6-氨基-3-甲基嘌呤(3-MA)组(E)细胞凋亡情况与 I/R 组无明显区别 TUNEL 中倍放大

后自噬的表达,而自噬可能介导了 HO-1 减轻肝 I/R 损伤的作用。

HO 有 3 种同工酶,其中 HO-1 是体内含量最高、分布最广泛、可诱导表达的亚型^[5-6]。HO-1 降解血红素产生等摩尔的胆绿素和一氧化碳(CO),同时释放 Fe^{2+} ;胆绿素在胆绿素还原酶的作用下进一步降解为胆红素,而 Fe^{2+} 可诱导铁蛋白的表达。既往研究表明,HO-1 调节炎症反应、细胞毒性反应,恢复内环境稳定与其具有抗炎和细胞保护作用有关。如陶绍富等^[10]研究显示,CoPP 诱导肝脏 HO-1 表达可以降低肝 I/R 时肥大细胞脱颗粒反应,减轻 I/R 损伤;牛占丛等^[11]研究显示,腹腔注射 HO-1 诱导剂能够增加脓毒症肺损伤小鼠肺组织 HO-1 表达,减轻支气管灌洗液中中性粒细胞水平,降低血清炎症性介质 C-反应蛋白(CRP)、白细胞介素-6(IL-6)及高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)的水平;而谭向龙等^[12]研究显示,抑制 HMGB1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎症介质表达能够显著减轻肝 I/R 损伤程度。使用 HO-1 酶抑制剂能够抵消诱导 HO-1 表达的保护作用^[10-11],提示 HO-1 降解血红素的产物发挥了重要作用。韩遵义和杨光田^[13]研究显示,脑 I/R 损伤大鼠脑组织 HO-1 活性与全血碳氧血红蛋白(COHB)含量呈正相关,证明诱导或抑制 HO-1 可调节内源性 CO 的生成。有研究显示,给予 CO 前体可抑制脂多糖(LPS)诱导的血小板激活,减少血小板聚集,保护血管内皮细胞^[14]。而给予外源性的胆红素或胆绿素也可预防器官 I/R 损伤^[15]、移植排斥反应、内毒素休克、自身免疫反应等^[16]。

自噬作为细胞的自我保护机制,在维持细胞生长发育及应对不良刺激中起着重要作用。刘烨等^[17]报道,在不良外界刺激下,自噬功能障碍能诱发炎症性肠病(IBD),加重肺结核、脓毒症等炎症性疾病的程度。尽管多数研究提示自噬发生可抑制细胞死亡,但也有研究显示抑制自噬能够促进细胞存活。于瑶等^[18]研究显示,牡荆素能够抑制肝脏细胞自噬蛋白表达和细胞凋亡,对小鼠肝 I/R 损伤具有保护作用。以上研究结果的差异可能是源于自噬上游不同调控通路的激活,而这些调控通路决定了自噬促细胞存活或促细胞死亡信号的产生^[19]。

有研究显示,HO-1 具有调控细胞自噬和产生促细胞存活信号的作用。Carchman 等^[7]最先提出 HO-1 可通过调控自噬减轻脓毒症肝损伤,该研究显示,HO-1 基因过表达可诱导肝细胞自噬,同时减

轻 LPS 所致的肝细胞损伤;而自噬抑制剂 3-MA 或自噬通路激活蛋白 Vsp34 基因敲除能够消除 HO-1 的保护作用。Liu 等^[20]研究显示,肝脏缺血预处理诱导 HO-1 表达,而 HO-1 表达能够增加再灌注损伤后肝细胞自噬,无论是抑制 HO-1 或是抑制自噬都可消除缺血预处理的保护作用,提示缺血预处理的保护机制与诱导 HO-1 促进自噬表达相关,而自噬介导了 HO-1 在肝脏缺血预处理中的保护作用。同样,Yun 等^[21]观察到肝 I/R 后自噬受到明显抑制,而血红素可诱导 HO-1 表达,促进自噬,从而减轻肝 I/R 损伤。以上几项研究中给予 HO-1 抑制剂可显著抑制自噬表达,提示 HO-1 降解血红素的酶解产物可能具有促进自噬表达的作用。Lancel 等^[22]研究显示,给予 CO 释放分子能够诱导心肌细胞自噬,从而保护高脂饮食大鼠心肌细胞收缩功能及线粒体的代谢。但是其他血红素降解产物如胆绿素、胆红素能否调控自噬目前鲜有报道。

HO-1 或血红素代谢产物调控自噬的信号转导通路在不同实验模型中可能有所不同。Dong 等^[23]研究显示,抑制腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)可以逆转 HO-1 诱导自噬的作用,从而消除 HO-1 对高糖肾足细胞的保护作用。Cao 等^[24]研究显示,在慢性髓样白血病,HO-1 诱导的自噬表达与哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抑制有关。丝裂素活化蛋白激酶(MAPKs)是体内氧化应激损伤的重要信号通路,Carchman 等^[7]研究显示,该激酶系统中的 p38MAPK 介导了脓毒症时肝脏细胞 HO-1 对自噬的调控,而非细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)或 c-Jun 氨基末端蛋白激酶(JNK)。此外还有研究显示,HO-1 能够激活转录因子 EB(TFEB),而后者可诱导溶酶体和自噬体的形成,减轻 LPS 致心肌损伤^[25]。相对于以上研究,肝脏 I/R 时 HO-1 对自噬调控的机制还不清楚,需进一步研究证实。

综上所述,肝脏 I/R 时 HO-1 可调控自噬表达,而自噬可能介导了 HO-1 抑制肝 I/R 损伤的作用。

参考文献

- [1] Siniscalchi A, Gamberini L, Laici C, et al. Post reperfusion syndrome during liver transplantation: From pathophysiology to therapy and preventive strategies [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22 (4): 1551-1569. DOI: 10.3748/wjg.v22.i4.1551.
 - [2] Papadopoulos D, Siempis T, Theodorakou E, et al. Hepatic ischemia and reperfusion injury and trauma: current concepts [J]. Arch Trauma Res, 2013, 2 (2): 63-70. DOI: 10.5812/atr.12501.
 - [3] 佟辉,杨卫平,邱伟华. 细胞自噬在肝脏疾病中的研究进展 [J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29 (10): 2097-2098. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2012.10.084.
- Tong H, Yang WP, Qiu WH. Research progress of autophagy in

- liver diseases [J]. Chin J Exp Surg, 2012, 29 (10): 2097-2098. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2012.10.084.
- [4] Cursio R, Colosetti P, Gugenheim J. Autophagy and liver ischemia-reperfusion injury [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 417590. DOI: 10.1155/2015/417590.
- [5] Liu B, Qian JM. Cytoprotective role of heme oxygenase-1 in liver ischemia reperfusion injury [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8 (11): 19867-19873.
- [6] 曾仲, 黄汉飞, 宋飞, 等. 血红素氧合酶-1 减轻大鼠移植肝缺血再灌注损伤的作用及机制 [J]. 中华器官移植杂志, 2010, 31 (1): 41-45. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2010.01.012.
- Zeng Z, Huang HF, Song F, et al. Effect and mechanism of Heme oxygenase-1 alleviating rat liver graft ischemia/reperfusion injury [J]. Chin J Organ Transplant, 2010, 31 (1): 41-45. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-1785.2010.01.012.
- [7] Carchman EH, Rao J, Loughran PA, et al. Heme oxygenase-1-mediated autophagy protects against hepatocyte cell death and hepatic injury from infection/sepsis in mice [J]. Hepatology, 2011, 53 (6): 2053-2062. DOI: 10.1002/hep.24324.
- [8] Heijnen BH, Straatsburg IH, Gouma DJ, et al. Decrease in core liver temperature with 10 degrees C by in situ hypothermic perfusion under total hepatic vascular exclusion reduces liver ischemia and reperfusion injury during partial hepatectomy in pigs [J]. Surgery, 2003, 134 (5): 806-817. DOI: 10.1016/S0039.
- [9] Schmidt R, Tritschler E, Hoetzel A, et al. Heme oxygenase-1 induction by the clinically used anesthetic isoflurane protects rat livers from ischemia/reperfusion injury [J]. Ann Surg, 2007, 245 (6): 931-942. DOI: 10.1097/01.sla.0000256891.45790.4d.
- [10] 陶绍富, 王春锋, 丁晶, 等. 上调肝脏 HO-1 抑制肥大细胞脱颗粒减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤 [J]. 中华普通外科杂志, 2011, 26 (9): 766-769. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-631X.2011.09.018.
- Tao SF, Wang CF, Ding J, et al. HO-1 up-regulation decreases liver ischemia/reperfusion injury by inhibiting mast cells degranulation [J]. Chin J Gen Surg, 2011, 26 (9): 766-769. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-631X.2011.09.018.
- [11] 牛占丛, 段国辰, 刘军肖, 等. 血红素加氧酶-1 对脓毒症小鼠肺损伤炎症反应的调节作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (4): 373-377. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.04.009.
- Niu ZC, Duan GC, Liu JX, et al. The regulation of heme oxygenase-1 on inflammatory response in mice with lung injury induced by sepsis [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (4): 373-377. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.04.009.
- [12] 谭向龙, 王世斌, 姚咏明, 等. 高迁移率族蛋白 B1 在大鼠肝脏缺血/再灌注损伤中的作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16 (3): 168-170. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.03.015.
- Tan XL, Wang SB, Yao YM, et al. The potential role of high mobility group box-1 protein in rats with liver warm ischemia/reperfusion injury [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2009, 16 (3): 168-170. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.03.015.
- [13] 韩遵义, 杨光田. 左旋四氢巴马汀对脑缺血/再灌注大鼠脑组织血红素氧化酶-1 及内源性一氧化氮的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13 (2): 89-92. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2006.02.009.
- Han ZY, Yang GT. Effects of L-tetrahydropalmatine on hemeoxygenase-1 in cerebral tissue of rats and endogenous carbon monoxide during global cerebral ischemia/reperfusion [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2006, 13 (2): 89-92. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2006.02.009.
- [14] 刘大东, 徐晓涵, 庄明峰, 等. 外源性一氧化氮对脓毒症时血小板异常释放的抑制作用及其分子机制 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (2): 110-116. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.006.
- Liu DD, Xu XH, Zhuang MF, et al. Suppressive effect of exogenous carbon monoxide on abnormal platelet exocytosis and its molecular mechanism in sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (2): 110-116. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.006.
- [15] 张仁伟, 刘煜敏, 封红亮, 等. 胆红素对脑缺血再灌注大鼠半暗带区神经保护作用实验研究 [J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2016, 30 (4): 343-345. DOI: 10.13507/j.issn.1674-3474.2016.04.011.
- Zhang RW, Liu YM, Feng HL, et al. Experiment of the neuroprotective effect of bilirubin on penumbra of cerebral ischemia-reperfusion rat models [J]. J Chin Pract Diagn Ther, 2016, 30 (4): 343-345. DOI: 10.13507/j.issn.1674-3474.2016.04.011.
- [16] Ollinger R, Wang H, Yamashita K, et al. Therapeutic applications of bilirubin and biliverdin in transplantation [J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9 (12): 2175-2185. DOI: 10.1089/ars.2007.1807.
- [17] 刘焯, 余娇, 蔡艳星, 等. 自噬在炎症性疾病中的研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (6): 527-529. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.022.
- Liu Y, Yu J, Cai YX, et al. Research progress regarding autophagy in inflammatory diseases [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (6): 527-529. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.022.
- [18] 于瑶, 何金丹, 王振, 等. 杜荆素调节自噬对小鼠肝缺血/再灌注损伤的保护作用 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4 (1): 27-31. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.005.
- Yu Y, He JD, Wang Z, et al. Vitexin: The protective effect of hepatic ischemia-reperfusion injury through the autophagy regulation in mice [J/CD]. Pract J Organ Transplant (Electron Version), 2016, 4 (1): 27-31. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2016.01.005.
- [19] 黄贵华, 纪云西, 蒋历, 等. 自噬是缺血再灌注损伤中细胞存活的关键因素 [J]. 医药前沿, 2012, 2 (2): 110-111. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1752.2012.02.104.
- Huang GH, Ji YX, Jiang L, et al. Autophagy is a crucial factor for cell survival during ischemia reperfusion injury [J]. Med Front, 2012, 2 (2): 110-111. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1752.2012.02.104.
- [20] Liu A, Fang H, Wei W, et al. Ischemic preconditioning protects against liver ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1-mediated autophagy [J]. Crit Care Med, 2014, 42 (12): e762-771. DOI: 10.1097/CCM.0000000000000659.
- [21] Yun N, Cho HI, Lee SM. Impaired autophagy contributes to hepatocellular damage during ischemia/reperfusion: heme oxygenase-1 as a possible regulator [J]. Free Radic Biol Med, 2014, 68: 168-177. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.12.014.
- [22] Lancel S, Montaigne D, Marechal X, et al. Carbon monoxide improves cardiac function and mitochondrial population quality in a mouse model of metabolic syndrome [J]. PLoS One, 2012, 7 (8): e41836. DOI: 10.1371/journal.pone.0041836.
- [23] Dong C, Zheng H, Huang S, et al. Heme oxygenase-1 enhances autophagy in podocytes as a protective mechanism against high glucose-induced apoptosis [J]. Exp Cell Res, 2015, 337 (2): 146-159. DOI: 10.1016/j.yexcr.2015.04.005.
- [24] Cao L, Wang J, Ma D, et al. Heme oxygenase-1 contributes to imatinib resistance by promoting autophagy in chronic myeloid leukemia through disrupting the mTOR signaling pathway [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 78: 30-38. DOI: 10.1016/j.biopha.2015.12.029.
- [25] Unuma K, Aki T, Funakoshi T, et al. Cobalt protoporphyrin accelerates TFEB activation and lysosome reformation during LPS-induced septic insults in the rat heart [J]. PLoS One, 2013, 8 (2): e56526. DOI: 10.1371/journal.pone.0056526.

(收稿日期: 2016-09-29)

欢迎订阅 2017 年《中华危重病急救医学》杂志 CN 12-1430/R

中华医学会主办 中文核心期刊 中国科技论文统计源期刊

电子版杂志网址: <http://www.cccm-em120.com> 投稿邮箱: cccm@em120.com

全国各地邮局订阅, 邮发代号: 6-58 定价: 每期 45 元 全年 540 元

本刊社地址: 天津市和平区睦南道 122 号 电话: 022-23197150