

川陈皮素防治肝缺血再灌注损伤的作用机制研究

杨超君, 王跃武, 周开珩

宁波市医疗中心李惠利医院 药剂科, 浙江 宁波 315000

摘要:目的 探究川陈皮素防治肝缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI) 的作用及机制。方法 SD 大鼠随机分为对照组、模型组和川陈皮素 (10 mg/kg) 组, 采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法考察各组大鼠肝组织病理变化; 采用透射电子显微镜 (TEM) 观察各组大鼠肝细胞线粒体结构; 采用 Western blotting 和 qRT-PCR 考察各组大鼠肝组织自噬相关蛋白 Beclin1、微管相关蛋白 1 轻链 3-II (microtubule associated protein 1 light chain 3-II, LC3-II)、自噬相关基因-7 (autophagy-related gene-7, ATG-7)、p62 蛋白和 mRNA 表达情况。采用 H₂O₂ 诱导大鼠肝细胞 BRL 建立氧化损伤细胞模型, 设置对照组、模型组和川陈皮素 (10 μmol/L) 组, 采用 Western blotting 和 qRT-PCR 考察各组细胞 Beclin1、LC3-II、ATG-7、p62 蛋白和 mRNA 表达情况; 采用 MitoTracker 染色和免疫荧光法考察各组细胞自噬蛋白与线粒体的共定位情况; 考察自噬抑制剂和诱导剂对川陈皮素细胞保护作用的影响。结果 与对照组比较, 模型组大鼠血清 ALT 和 AST 活性均显著升高 ($P < 0.05$), 肝组织病变, 肝细胞线粒体数目增加, 结构错乱, 受损的线粒体被吞噬, 肝组织中 LC3-II、Beclin1、ATG-7 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), p62 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 川陈皮素组大鼠血清 ALT 和 AST 活性明显降低 ($P < 0.05$), 肝组织病变程度减轻, 线粒体形态变化得到明显改善, 肝组织中 LC3-II、Beclin1、ATG-7 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), p62 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。氧化损伤细胞模型中 BRL 细胞 LC3-II、Beclin1、ATG-7 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), p62 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Beclin1 和 MitoTracker 的共定位数目增加; 与模型组比较, 川陈皮素组 BRL 细胞中 LC3-II、Beclin1、ATG-7 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), p62 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), Beclin1 和 MitoTracker 的共定位数目减少; 自噬抑制剂 3-MA (1、5 mmol/L) 显著增强川陈皮素对 BRL 细胞的保护作用 ($P < 0.05$), 自噬诱导剂雷帕霉素显著抑制川陈皮素对 BRL 细胞 Beclin1 蛋白和 mRNA 表达水平的下调作用 ($P < 0.05$)。结论 川陈皮素对 HIRI 具有较好的防治作用, 其机制可能与抑制线粒体自噬有关。

关键词: 川陈皮素; 线粒体; 自噬; 肝脏; 缺血再灌注损伤

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2021)08-2343-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.08.017

Protective effect and mechanism of nobiletin on hepatic ischemia reperfusion injury

YANG Chao-jun, WANG Yue-wu, ZHOU Kai-heng

Department of Pharmacy, Ningbo Medical Center Lihuili Hospital, Ningbo 315000, China

Abstract: Objective To explore the effect and mechanism of nobiletin on preventing and treating hepatic ischemia reperfusion injury (HIRI). **Methods** SD rats were randomly divided into control group, model group, and nobiletin (10 mg/kg) group. Activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum of rats in each group were detected by ELISA; Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the pathological changes of liver tissue in rats; Transmission electron microscope (TEM) was used to observe the mitochondrial structure of hepatocytes in rats; Western blotting and qRT-PCR were used to investigate protein and mRNA expressions of autophagy-related protein Beclin1, microtubule associated protein 1 light chain 3-II (LC3-II) and autophagy-related gene-7 (ATG-7) and p62. H₂O₂ was used to induce BRL cells to establish oxidative damage cell models. Control group, model group and nobiletin (10 μmol/L) group were set up, Western blotting and qRT-PCR were used to

收稿日期: 2020-11-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82003755)

作者简介: 杨超君 (1982—), 女, 主管药师, 研究方向为药学。Tel: 13456166729 E-mail: woshiyangcj@126.com

investigate the protein and mRNA expressions of Beclin1, LC3-II, ATG-7 and p62 in BRL cells; MitoTracker staining and immunofluorescence were used to investigate the co-localization of autophagy proteins and mitochondria in BRL cells of each group; Effects of autophagy inhibitors and inducers on protective effect of cells of nobiletin was investigated. **Results** Compared with control group, activities of ALT and AST in serum of rats in model group were significantly increased ($P < 0.05$), liver tissue was diseased, number of hepatocyte mitochondria was increased and structure was disordered, the damaged mitochondria were phagocytosed, protein and mRNA expressions of LC3-II, Beclin1, ATG-7 were significantly increased ($P < 0.05$), p62 protein and mRNA expressions were significantly reduced ($P < 0.05$); Compared with model group, activities of ALT and AST in serum of rats in nobiletin group was significantly reduced ($P < 0.05$), liver tissue lesions were reduced, mitochondrial morphological changes were improved, protein and mRNA expressions of LC3-II, Beclin1, ATG-7 in liver tissue were significantly reduced ($P < 0.05$), p62 protein and mRNA expressions were significantly increased ($P < 0.05$). In oxidative damage cells model, protein and mRNA expressions of LC3-II, Beclin1, ATG-7 in BRL cells were significantly increased ($P < 0.05$), p62 protein and mRNA expressions were significantly reduced ($P < 0.05$), Co-localization numbers of Beclin1 and MitoTracker were increased; Compared with model group, protein and mRNA expressions of LC3-II, Beclin1, ATG-7 in BRL cells of nobiletin group were significantly reduced ($P < 0.05$), p62 protein and mRNA expressions were significantly increased ($P < 0.05$), co-localizations numbers of Beclin1 and MitoTracker was reduced; Autophagy inhibitor 3-MA (1, 5 mmol/L) significantly enhanced the protective effect of nobiletin on BRL cells ($P < 0.05$), autophagy inducer rapamycin significantly inhibited the down-regulation of nobiletin on protein and mRNA expressions of Beclin1 in BRL cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Nobiletin has a good preventive effect on HIRI, and the mechanism may be related to the inhibition of mitochondrial autophagy.

Key words: nobiletin; mitochondria; autophagy; liver; ischemia-reperfusion injury

肝损伤、失血性休克、肝移植术、肝切除术等情况下会发生肝缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI), 导致肝脏甚至多器官衰竭, 造成肝脏手术围手术期的死亡率上升^[1-2]。尽管目前已有药物防治 HIRI 的相关报道^[3-5], 但目前尚无公认有效的治疗方法。HIRI 过程中, 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平升高, 内源性抗氧化剂大量消耗, 导致其对肝细胞的保护作用减弱。线粒体是 ROS 的主要来源, 极易受到氧化损伤的影响^[6]。线粒体自噬是氧化应激损伤的线粒体被溶酶体吞噬的过程, 微管相关蛋白 1 轻链 3-II (microtubule associated protein 1 light chain 3-II, LC3-II)、Beclin1、自噬相关基因-7 (autophagy-related gene-7, ATG-7) 和 p62 的表达水平与线粒体自噬过程密切相关^[7-12]。线粒体可以抑制氧化应激等过程, 从而保护 HIRI^[13-16]。川陈皮素是柑橘皮中一种常见的多甲氧基黄酮, 具有抗氧化、抗炎等作用, 常用于治疗哮喘、结肠炎、阿尔茨海默病、缺血性脑卒中等疾病^[17]。川陈皮素能够保护心肌缺血再灌注、脓毒症小鼠肝损伤^[18-19]。本研究通过体内、外实验, 探究川陈皮素防治 HIRI 的作用机制及其对线粒体功能的影响。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 30 只, 6~8 周龄, 体质量 200~220 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限

公司, 动物许可证号 SYXK (京) 2017-0033。动物于无特殊病原体环境中适应性饲养 1 周, 温度 25~27 °C, 湿度 45%~50%, 自由进食饮水。动物实验经温州医科大学动物伦理委员会批准 (批准号 wydw2019-0561)。

1.2 细胞

大鼠肝细胞 BRL 购自中国科学院细胞库。

1.3 药品与试剂

川陈皮素 (质量分数 >98%, 批号 182001) 购自上海同田生物科技股份有限公司; DAPI (批号 183212412) 购自梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司; 丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 试剂盒 (批号 A171301B) 购自上海一研生物科技有限公司; 天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒 (批号 KT17019TO) 购自上海哈灵生物科技有限公司; TRIzol 试剂 (批号 17596-026)、MitoTracker Red CMXRos 试剂盒 (批号 1583080)、LC3-II 抗体 (批号 VB2934447)、Beclin1 抗体 (批号 RE2205142)、ATG-7 抗体 (批号 VB2947563)、p62 抗体 (批号 UA2708368C)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 QB216541)、FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体 (批号 1825822) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 3-甲基腺嘌呤 (3-methyladenine, 3-MA)、雷帕霉素购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 10%

中性福尔马林缓冲溶液(批号 180382)、无水乙醇(批号 180613)购自成都科龙化工试剂有限公司;二甲苯(批号 1861634)、2.5%戊二醛(批号 1784161)、多聚甲醛(批号 1853827)、PBS 缓冲液(批号 00915270)购自青岛捷世康生物科技有限公司。

1.4 仪器

分光光度计(郑州宏朗仪器设备有限公司);酶标仪、显微镜(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);透射电子显微镜(TEM, 日本电子株式会社);荧光显微镜(日本 Olympus 有限公司)。

2 方法

2.1 动物模型制备、分组与给药

根据前期研究^[20], SD 大鼠随机分为对照组、模型组和川陈皮素(10 mg/kg)组, 每组 10 只。大鼠禁食 12 h, 自由饮水, 模型组和川陈皮素组大鼠 ip 氯胺酮(25 mg/kg)麻醉, 打开腹腔, 充分暴露肝门, 用非创伤性血管钳夹闭肝蒂的左、中支, 当肝脏颜色从鲜红色变为深紫色时, 缺血 45 min, 然后取下夹子进行肝脏血液再灌注; 对照组大鼠仅打开腹腔, 暴露肝门。川陈皮素溶于含 0.5%聚山梨酯 80 的生理盐水中, 配制质量浓度为 10 mg/mL 的溶液, 造模前 30 min 川陈皮素组 ip 川陈皮素, 对照组和模型组 ip 等体积含 0.5%聚山梨酯 80 的生理盐水。HIRI 6 h 后肝功能发生明显损害^[21], 大鼠脱颈椎处死, 取血和肝组织。

2.2 川陈皮素对 HIRI 大鼠血清中 ALT 和 AST 活性的影响

收集各组大鼠下腔静脉血液, 室温静置 1 h, 1000×g 离心 15 min, 分离血清, 按照试剂盒说明书测定大鼠血清中 ALT 和 AST 活性。

2.3 川陈皮素对 HIRI 大鼠肝组织病理变化的影响

取各组大鼠肝组织, 于 10%中性福尔马林缓冲溶液固定 48 h, 乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切片(厚 5 μm), 进行苏木素-伊红(HE)染色, 于显微镜下观察并拍照。

2.4 川陈皮素对 HIRI 大鼠肝细胞线粒体结构的影响

取各组大鼠肝组织, 于含 2.5%戊二醛的 PBS 溶液中固定 2 h, 于 1%四氧化锇中固定 1 h, 环氧树脂包埋后切片(厚 100 nm), 于 TEM 观察样品的超微结构。

2.5 川陈皮素对 HIRI 大鼠肝组织 Beclin1、LC3-II、ATG-7 和 p62 蛋白表达的影响

各组大鼠肝组织加入含蛋白酶抑制剂的

RIPA 裂解液, 于冰上裂解, 4 °C、12 000×g 离心 15 min, 吸取上清液, 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质量浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后, 分别加入 LC3-II 抗体(1:500)、Beclin1 抗体(1:500)、ATG-7(1:200)抗体、p62 抗体(1:500)和 GAPDH 抗体(1:1000), 4 °C 孵育过夜; 洗涤后加入 FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体, 孵育后洗涤, 加入发光液显影, 采用 Image J 软件分析图像。

2.6 川陈皮素对 HIRI 大鼠肝组织 Beclin1、LC3-II、ATG-7 和 p62 mRNA 表达的影响

按照试剂盒说明书提取各组大鼠肝组织总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列: LC3-II 上游引物 5'-GATGTCCGACTTATTCG-AGAGC-3', 下游引物 5'-TTGAGCTGTAAGCGC-CTTCTA-3'; Beclin1 上游引物 5'-CTGGACACG-AGTTTCAAGATCCT-3', 下游引物 5'-TCGCCTG-GGCTGTGGTA-3'; ATG-7 上游引物 5'-TGCTATC-CTGCCCTCTGTCTT-3', 下游引物 5'-TGCCCTC-CTTTCTGGTTCTTTT-3'; p62 上游引物 5'-ACCC-ATCCACAGGTGAACTC-3', 下游引物 5'-GTGG-GAGATGTGGGTACAGG-3'; β-actin 上游引物 5'-TGAGACCTTCAACACCCCAG-3', 下游引物 5'-GCCATCTCTTGCTCGAAGTC-3'。

2.7 细胞培养

BRL 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

2.8 川陈皮素对 BRL 细胞 Beclin1、LC3-II、ATG-7 和 p62 蛋白表达的影响

取处于对数生长期的 BRL 细胞, 以 2×10⁵/mL 接种于 6 孔板中, 培养 12 h。设置对照组、模型组和川陈皮素(10 μmol/L)组^[22]。模型组和川陈皮素组加入 H₂O₂(200 μmol/L)处理 18 h, 建立氧化损伤细胞模型, 川陈皮素组在加入 H₂O₂ 前加入川陈皮素预处理 2 h, 对照组加入不含药物的培养基。按“2.5”项下方法检测 BRL 细胞 Beclin1、LC3-II、ATG-7 和 p62 蛋白表达情况。

2.9 川陈皮素对 BRL 细胞 Beclin1、LC3-II、ATG-7 和 p62 mRNA 表达的影响

按“2.8”项下处理细胞, 按“2.6”项下方法检测 BRL 细胞 Beclin1、LC3-II、ATG-7 和 p62 mRNA 表达情况。

2.10 川陈皮素对 BRL 细胞自噬蛋白与线粒体的共定位的影响

按“2.8”项下处理细胞,收集细胞,于 5%多聚甲醛固定 15 min,制备冷冻切片(厚 10 μm),PBS 溶液洗涤。加入 1%山羊血清,室温封闭 30 min,使内源过氧化物酶失活;加入 Beclin1 抗体(1:200),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBS 溶液洗涤 3 次,加入 FITC 标记的山羊抗大鼠 IgG 抗体(1:150),室温孵育 60 min,PBS 溶液洗涤 3 次;加入 DAPI (1 mg/mL) 染色细胞核,按照 MitoTracker Red CMXRos 试剂盒说明书染色线粒体,于荧光显微镜下观察并拍照。

2.11 自噬抑制剂对 BRL 细胞活性的影响

取处于对数生长期的 BRL 细胞,以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 96 孔板中,培养 12 h。设置对照组、模型组、川陈皮素(10 $\mu\text{mol/L}$)组和川陈皮素(10 $\mu\text{mol/L}$)联合自噬抑制剂 3-MA(1、5、10 mmol/L)组。模型组、川陈皮素组和川陈皮素联合 3-MA 组加入 H_2O_2 (200 $\mu\text{mol/L}$) 处理 18 h,建立氧化损伤细胞模型,川陈皮素组和川陈皮素联合 3-MA 组在加入 H_2O_2 前加入相应药物预处理 2 h,对照组加入不含药物的培养基。加入 100 μL CCK-8 溶液,孵育 1 h,采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度(A)值。

2.12 自噬诱导剂对 BRL 细胞 Beclin1 蛋白和 mRNA 表达的影响

取处于对数生长期的 BRL 细胞,以 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 6 孔板中,培养 12 h。设置对照组、模型组、川陈皮素(10 $\mu\text{mol/L}$)组和川陈皮素(10 $\mu\text{mol/L}$)联合自噬诱导剂雷帕霉素(10 nmol/L)组,按“2.11”项下方法处理细胞。按“2.5”和“2.6”项下方法检测 BRL 细胞 Beclin1 蛋白和 mRNA 表达。

2.13 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 软件进行数据处理,采用 t 检验、单因素 ANOVA 分析和最小显著性差异法进行组间比较。

3 结果

3.1 川陈皮素对 HIRI 大鼠血清中 ALT 和 AST 活性的影响

如表 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠血清中 ALT 和 AST 活性均显著升高($P < 0.05$);与模型组比较,川陈皮素组大鼠血清中 ALT 和 AST 活

表 1 川陈皮素对 HIRI 大鼠血清中 ALT 和 AST 活性的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of nobiletin on activities of ALT and AST in serum of HIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	ALT/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	AST/($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	23.52 ± 1.12	47.26 ± 4.60
模型	—	$86.06 \pm 4.71^{\#}$	$116.60 \pm 8.70^{\#}$
川陈皮素	10	$37.00 \pm 5.24^*$	$65.00 \pm 4.30^*$

与对照组比较: $^{\#}P < 0.05$; 与模型组比较: $^*P < 0.05$

$^{\#}P < 0.05$ vs control group; $^*P < 0.05$ vs model group

性明显降低($P < 0.05$)。

3.2 川陈皮素对 HIRI 大鼠肝组织病理变化的影响

如图 1 所示,对照组大鼠肝组织形态正常,模型组大鼠肝细胞水样变性和大片状点状坏死,有出血灶;川陈皮素组大鼠肝组织结构发生轻度改变。

3.3 川陈皮素对 HIRI 大鼠肝细胞线粒体结构的影响

如图 2 所示,对照组大鼠肝细胞线粒体均匀分布在细胞质中,结构排列合理;模型组大鼠肝细胞线粒体数目增加,集中分布在细胞核周围,且十字型结构发生错乱,受损的线粒体被吞噬;川陈皮素

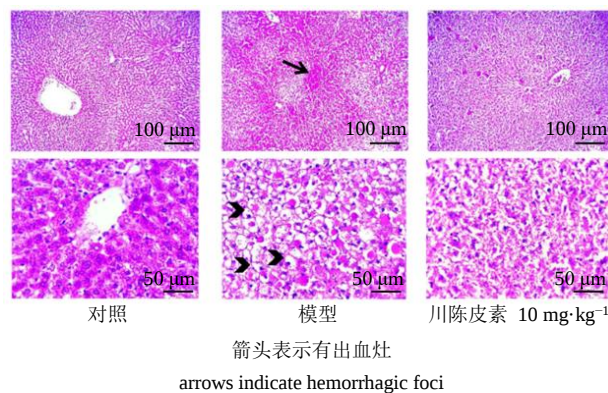


图 1 川陈皮素对 HIRI 大鼠肝组织病理变化的影响

Fig. 1 Effect of nobiletin on histopathological changes of liver in HIRI rats

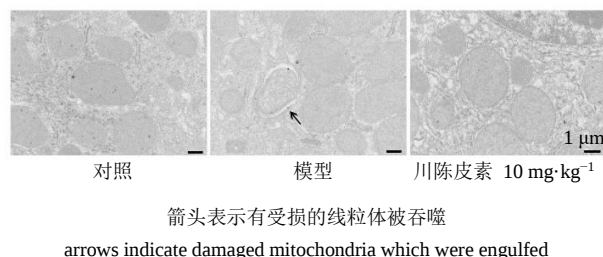


图 2 川陈皮素对 HIRI 大鼠肝细胞线粒体结构的影响($\times 10\ 000$)

Fig. 2 Effect of nobiletin on mitochondrial structure of liver cells in HIRI rats ($\times 10\ 000$)

组大鼠线粒体形态变化得到明显改善。

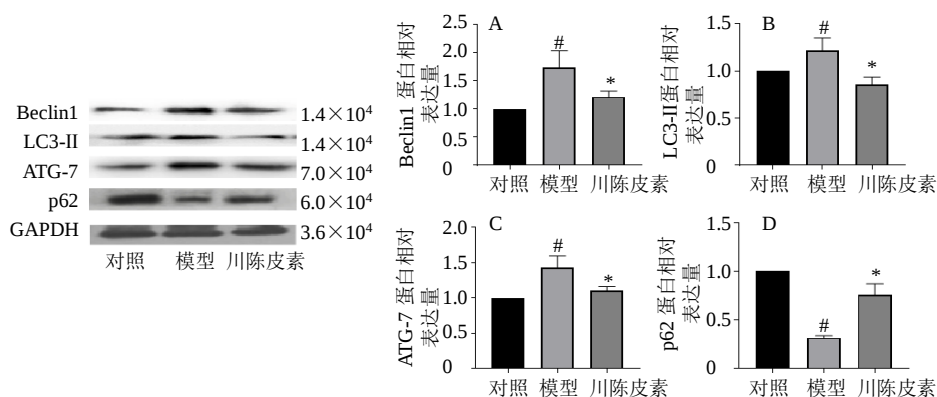
3.4 川陈皮素对 HIRI 大鼠肝组织 Beclin1、LC3-II、ATG-7、p62 蛋白和 mRNA 表达的影响

如图 3、4 所示，与对照组比较，模型组大鼠肝组织中 LC3-II、Beclin1、ATG-7 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$)，p62 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，川陈

皮素组大鼠肝组织中 LC3-II、Beclin1、ATG-7 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P<0.05$)，p62 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P<0.05$)。

3.5 川陈皮素对 BRL 细胞 Beclin1、LC3-II、ATG-7、p62 蛋白和 mRNA 表达的影响

如图 5、6 所示，与对照组比较，模型组 BRL 细胞中 LC3-II、Beclin1、ATG-7 蛋白和 mRNA 表



与对照组比较： $\#P<0.05$ ；与模型组比较： $*P<0.05$ ，下图同

$\#P<0.05$ vs control group; $*P<0.05$ vs model group, same as belows

图 3 川陈皮素对 HIRI 大鼠肝组织 Beclin1 (A)、LC3-II (B)、ATG-7 (C) 和 p62 (D) 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 3 Effect of nobiletin on expressions of Beclin1 (A), LC3-II (B), ATG-7 (C) and p62 (D) in liver of HIRI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

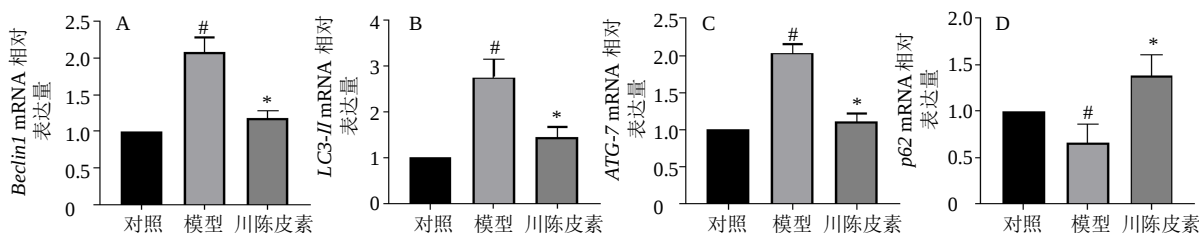


图 4 川陈皮素对 HIRI 大鼠肝组织 Beclin1 (A)、LC3-II (B)、ATG-7 (C) 和 p62 (D) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 4 Effect of nobiletin on mRNA expressions of Beclin1 (A), LC3-II (B), ATG-7 (C) and p62 (D) in liver of HIRI rats ($\bar{x} \pm s, n=10$)

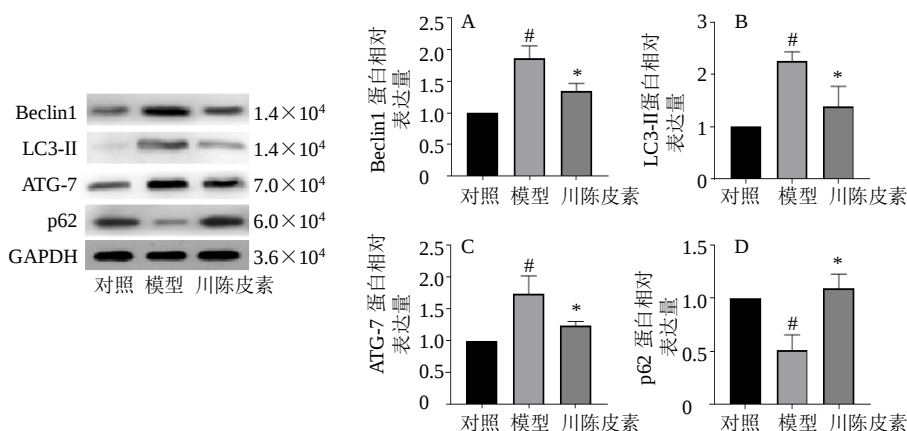


图 5 川陈皮素对 BRL 细胞 Beclin1 (A)、LC3-II (B)、ATG-7 (C) 和 p62 (D) 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 5 Effect of nobiletin on expressions of Beclin1 (A), LC3-II (B), ATG-7 (C) and p62 (D) in BRL cells ($\bar{x} \pm s, n=10$)

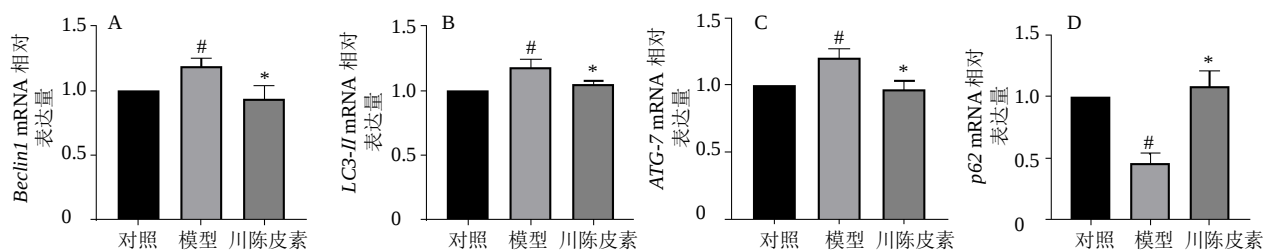


图 6 川陈皮素对 BRL 细胞 *Beclin1* (A)、*LC3-II* (B)、*ATG-7* (C) 和 *p62* (D) mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 6 Effect of nobletin on mRNA expressions of *Beclin1* (A), *LC3-II* (B), *ATG-7* (C) and *p62* (D) in BRL cells ($\bar{x} \pm s, n=10$)

达水平显著升高 ($P < 0.05$), *p62* 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 川陈皮素组 BRL 细胞中 *LC3-II*、*Beclin1*、*ATG-7* 蛋白和 mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.05$), *p62* 蛋白和 mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。

3.6 川陈皮素对 BRL 细胞自噬蛋白与线粒体的共定位的影响

如图 7 所示, 模型组 BRL 细胞中 *Beclin1* 和 MitoTracker 的共定位数目增加, 川陈皮素组 BRL 细胞中 *Beclin1* 和 MitoTracker 的共定位数目降低,

表明川陈皮素可以减少自噬蛋白与线粒体的共定位, 川陈皮素可以通过抑制线粒体自噬减轻 HIRI。

3.7 自噬抑制剂和诱导剂对川陈皮素细胞保护作用的影响

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组 BRL 细胞活力显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 川陈皮素组、川陈皮素联合自噬抑制剂 3-MA (1、5 mmol/L) 组 BRL 细胞活力显著升高 ($P < 0.05$)。

如图 9 所示, 与对照组比较, 模型组 BRL 细胞 *Beclin1* 蛋白和 mRNA 表达水平均显著升高 ($P <$

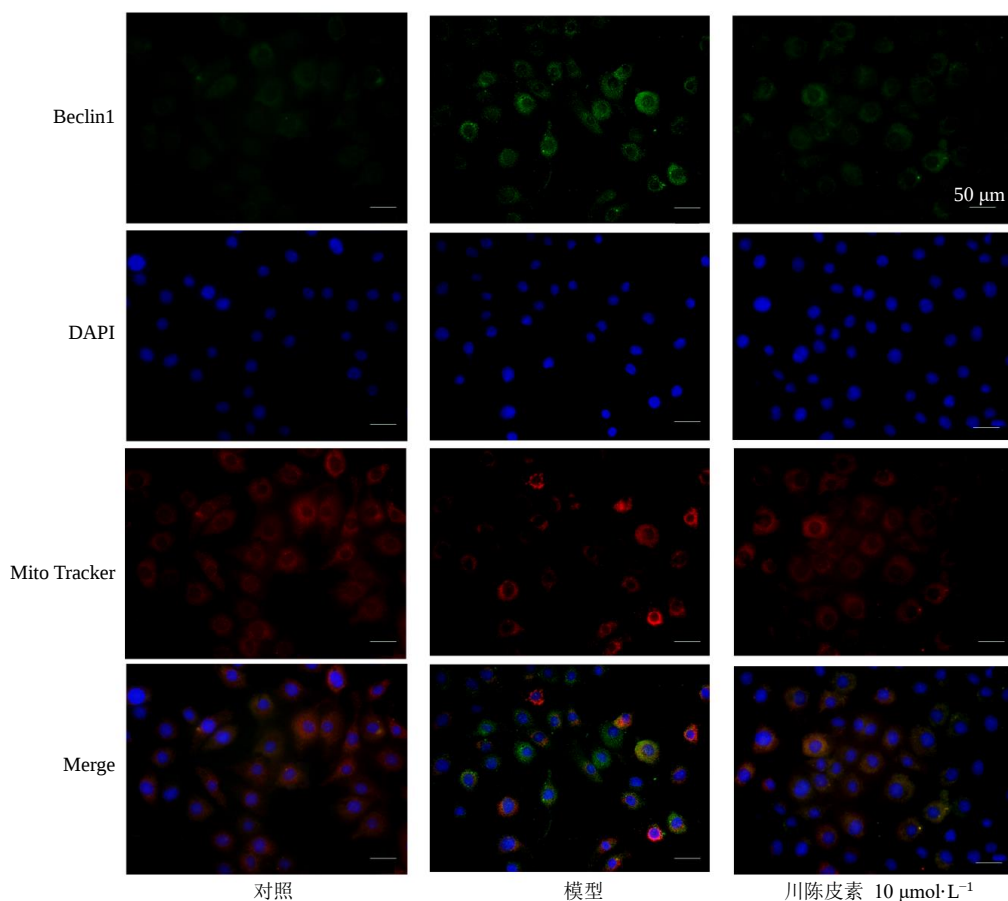


图 7 川陈皮素对 BRL 细胞自噬蛋白与线粒体共定位的影响 ($\times 200$)

Fig. 7 Effect of nobletin on co-localization of *Beclin1* and MitoTracker in BRL cells ($\times 200$)

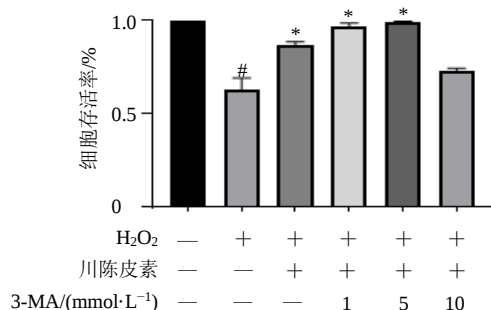


图 8 3-MA 对 BRL 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 8 Effect of 3-MA on cell viability of BRL cells ($\bar{x} \pm s, n=10$)

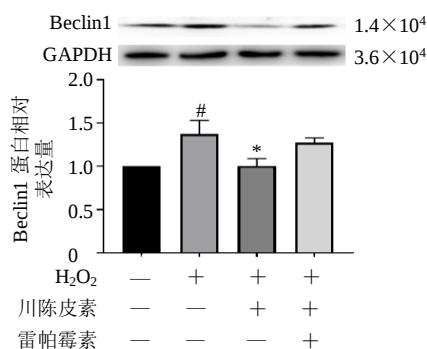


图 9 雷帕霉素对 BRL 细胞 Beclin1 蛋白和 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Fig. 9 Effect of rapamycin on Beclin1 protein and mRNA expressions in BRL cells ($\bar{x} \pm s, n=10$)

0.05);与模型组比较,川陈皮素组 BRL 细胞 Beclin1 蛋白和 mRNA 表达水平均显著降低 ($P<0.05$),川陈皮素联合自噬诱导剂雷帕霉素组 BRL 细胞 Beclin1 蛋白和 mRNA 表达水平无明显变化,表明雷帕霉素能够抑制川陈皮素对 BRL 细胞氧化损伤的改善作用,川陈皮素可能通过调控线粒体自噬过程,从而保护肝细胞。

4 讨论

HIRI 发病机制涉及多种细胞和结构,线粒体自噬在此过程中尤其重要^[23]。线粒体受损后,细胞内 ROS 水平升高,促进细胞死亡;自噬效应可通过清

除功能异常的线粒体,从而保护细胞^[11,24]。本研究发现,作为抗氧化剂和抗炎药物,川陈皮素对 HIRI 大鼠具有一定保护作用,可改善 HIRI 大鼠肝细胞线粒体形态;川陈皮素可显著上调 HIRI 大鼠肝组织和 H₂O₂ 诱导的 BRL 细胞中 LC3-II、Beclin1、ATG-7 蛋白和 mRNA 表达水平,显著下调 p62 蛋白和 mRNA 表达水平,表明川陈皮素可以通过调控线粒体自噬,从而发挥对 HIRI 的防治作用。

研究发现,川陈皮素对大鼠缺血后氧化应激的产生具有一定的疗效^[17];川陈皮素对神经细胞氧化损伤具有保护作用^[25]。本研究结果显示,川陈皮素可减少 H₂O₂ 诱导的 BRL 细胞中自噬蛋白与线粒体的共定位数量,表明川陈皮素可以逆转氧化损伤后线粒体产生的变化。本研究采用自噬抑制剂 3-MA 和自噬诱导剂雷帕霉素,验证川陈皮素是否通过调控线粒体自噬过程保护肝细胞,发现川陈皮素可改善 BRL 细胞氧化损伤,雷帕霉素可抑制川陈皮素对 BRL 细胞氧化损伤的改善作用,3-MA(1、5 mmol/L)可增强川陈皮素对 BRL 细胞氧化损伤的改善作用,3-MA(10 mmol/L)抑制川陈皮素对 BRL 细胞氧化损伤的改善作用。自噬的增强可以提高肝脏对 HIRI

的耐受性,但过度的自噬会造成 HIRI 后肝细胞大量死亡^[26-27]。这可能是本研究中川陈皮素联用过量自噬抑制剂后疗效减弱的原因。

综上所述,本研究发现川陈皮素对 HIRI 具有较好的防治作用,其机制与调控线粒体自噬有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王清卿,赵鑫,陈玉超,等. 肝脏缺血再灌注损伤机制及干预的研究进展 [J]. 临床肝胆病杂志, 2016, 32(6): 1225-1229.
- [2] Zhai Y, Busuttil R W, Kupiec-Weglinski J W. Liver ischemia and reperfusion injury: New insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation [J]. *Am J Transplant*, 2011, 11(8): 1563-1569.
- [3] 王希红,张超. 匹立尼酸对小鼠肝缺血再灌注损伤的防治作用 [J]. 广东医学, 2019, 40(21): 2985-2990.
- [4] 傅天啸,朱星喻,钱苏海,等. 联合应用参附注射液与葛根素注射液对大鼠肝脏缺血再灌注损伤防治的实验研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2016, 40(4): 306-311.
- [5] 闫书鸣,王建国,李泽信,等. 门冬氨酸鸟氨酸治疗肝癌切除术后患者对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用研究 [J]. 实用肝病杂志, 2018, 21(6): 932-935.

- [6] 李欢, 熊静, 杨树龙, 等. 线粒体通路、氧化应激在肝脏缺血再灌注损伤细胞凋亡中作用机制的研究进展 [J]. 山东医药, 2018, 58(40): 99-102.
- [7] Feng J, Zhang Q H, Mo W H, *et al.* Salidroside pretreatment attenuates apoptosis and autophagy during hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting the mitogen-activated protein kinase pathway in mice [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2017, 11: 1989-2006.
- [8] Liu T, Zhang Q H, Mo W H, *et al.* The protective effects of shikonin on hepatic ischemia/reperfusion injury are mediated by the activation of the PI3K/Akt pathway [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 44785.
- [9] Xu S Z, Niu P Q, Chen K, *et al.* The liver protection of propylene glycol alginate sodium sulfate preconditioning against ischemia reperfusion injury: Focusing MAPK pathway activity [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 15175.
- [10] Sun Y X, Yao X, Zhang Q J, *et al.* Beclin-1-dependent autophagy protects the heart during sepsis [J]. *Circulation*, 2018, 138(20): 2247-2262.
- [11] Ueno T, Komatsu M. Autophagy in the liver: Functions in health and disease [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(3): 170-184.
- [12] Song S B, Jang S Y, Kang H T, *et al.* Modulation of mitochondrial membrane potential and ROS generation by nicotinamide in a manner independent of SIRT1 and mitophagy [J]. *Mol Cells*, 2017, 40(7): 503-514.
- [13] Lu Y, Kan H, Wang Y, *et al.* Asiatic acid ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats via mitochondria-targeted protective mechanism [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 338: 214-223.
- [14] Yu W, Gao D P, Jin W, *et al.* Propofol prevents oxidative stress by decreasing the ischemic accumulation of succinate in focal cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *Neurochem Res*, 2018, 43(2): 420-429.
- [15] Panel M, Ruiz I, Brillet R, *et al.* Small-molecule inhibitors of cyclophilins block opening of the mitochondrial permeability transition pore and protect mice from hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. *Gastroenterology*, 2019, 157(5): 1368-1382.
- [16] Chen H H, Chen Y T, Yang C C, *et al.* Melatonin pretreatment enhances the therapeutic effects of exogenous mitochondria against hepatic ischemia-reperfusion injury in rats through suppression of mitochondrial permeability transition [J]. *J Pineal Res*, 2016, 61(1): 52-68.
- [17] Zhang L, Zhang X, Zhang C, *et al.* Nobiletin promotes antioxidant and anti-inflammatory responses and elicits protection against ischemic stroke *in vivo* [J]. *Brain Res*, 2016, 1636: 130-141.
- [18] 陈才, 吴继雄, 王靓, 等. 川陈皮素后处理减轻心肌缺血再灌注损伤时细胞凋亡 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(7): 944-950.
- [19] 何振兴. 川陈皮素对脓毒症小鼠肝损伤的保护作用及分子机制研究 [D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.
- [20] Wang T, Wang F, Yu L, *et al.* Nobiletin alleviates cerebral ischemic-reperfusion injury via MAPK signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(9): 5967-5977.
- [21] 宋虎, 张建军, 王振, 等. FOXO3a 调控线粒体自噬在肝脏缺血再灌注损伤中的作用 [J]. 天津医药, 2017, 45(12): 1242-1247.
- [22] Wang J X, Yu S N, Li J G, *et al.* Protective role of N-acetyl-L-tryptophan against hepatic ischemia-reperfusion injury via the RIP2/caspase-1/IL-1 β signaling pathway [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 385-391.
- [23] Lee S, Kim J S. Mitophagy: therapeutic potentials for liver disease and beyond [J]. *Toxicol Res*, 2014, 30(4): 243-250.
- [24] 何大立. 一氧化碳在大鼠肝脏缺血再灌注损伤中的保护作用及其机制研究 [D]. 西安: 第四军医大学, 2017.
- [25] 苏明媛. 柑橘黄酮类成分对神经细胞氧化损伤的保护及作用机制研究 [D]. 上海: 华东理工大学, 2011.
- [26] Boya P, Reggiori F, Codogno P. Emerging regulation and functions of autophagy [J]. *Nat Cell Biol*, 2013, 15(7): 713-720.
- [27] Cheng P, Wang F, Chen K, *et al.* Hydrogen sulfide ameliorates ischemia/reperfusion-induced hepatitis by inhibiting apoptosis and autophagy pathways [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 935251.

[责任编辑 李亚楠]