

褪黑素调控 TXNIP/NLRP3 信号减轻 HRI 后的细胞焦亡

盛亚鑫,王洁,陈雨婷,范佳琦,蒋吉英,于树娜*

(山东第二医科大学 基础医学院,山东 潍坊 261053)

摘要:为探讨褪黑素(Melatonin, Mel)调控核苷酸结合寡聚化结构域(Nucleotide-Binding Oligomerization Domain, NOD)样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NLRP3)炎性小体信号减轻小鼠肝脏缺血再灌注(Hepatic Ischemia-reperfusion, HIR)后细胞焦亡的机制,本文通过构建HIR模型进行机制的研究。选取清洁级(SPF)C57BL/6雄性小鼠40只,利用手术构建HIR模型,利用过氧化氢(H₂O₂)诱导AML-12细胞来模拟细胞氧化应激损伤,添加或不添加Mel处理。实验结果表明,与假手术(Sham Operation Group, Sham)组相比,HIR后肝组织发生形态学损伤,丙氨酸氨基转移酶(Alanine Aminotransferase, ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(Aspartate Aminotransferase, AST)水平升高,说明HIR后出现肝功能障碍,而补充Mel能够缓解HIR后肝功能障碍,提高经H₂O₂处理细胞的活力。HIR后,焦亡相关蛋白肝脏NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(Apoptosis-Associated Speck-Like Protein Containing a CARD, ASC)、切割后的半胱天冬酶p20(Cleaved Caspase-1)、焦孔素D(Gasdermin D, GSDMD)表达的阳性细胞增加,mRNA和蛋白水平平均升高,而补充Mel能够降低肝脏焦亡相关蛋白阳性细胞,并能够降低焦亡相关蛋白mRNA和蛋白表达水平。此外,Mel预处理能够抑制HIR诱导的促炎介质白介素1 β (IL-1 β)、白介素18(IL-18)表达升高。以上结果表明,Mel可显著改善HIR导致的肝细胞焦亡引起的损伤。Mel预处理能够抑制HIR诱导的硫氧还蛋白相互作用蛋白(Thioredoxin-Interacting Protein, TXNIP)的升高,而TXNIP处于NLRP3的上游,与NLRP3的活化密切相关。实验结果发现, TXNIP的抑制与Mel预处理结果趋于一致,说明Mel极有可能通过抑制TXNIP来缓解焦亡的发生。综上所述,Mel极有可能通过抑制TXNIP的表达从而抑制NLRP3介导的细胞焦亡,进而缓解HIR造成的肝脏损伤。

关键词:肝脏;缺血再灌注;褪黑素;炎性小体;细胞焦亡

中图分类号:R657.3

文献标志码:A

文章编号:0253-2395(2026)02-0365-12

Melatonin Regulates TXNIP/NLRP3 Signaling to Reduce Pyroptosis After HRI

SHENG Yaxin, WANG Jie, CHEN Yuting, FAN Jiaqi, JIANG Jiying, YU Shuna*

(College of Basic Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang 261053, China)

Abstract: To explore the mechanism by which melatonin (Mel) regulates the nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor pyrin domain-containing 3 (NLRP3) inflammasome signaling to alleviate pyroptosis in the liver after hepatic ischemia-reperfusion (HIR) in mice, this study constructed a HIR model for mechanism research. A total of forty specific pathogen-free (SPF) C57BL/6 male mice were selected for surgical construction of an HIR model. AML-12 cells were exposed to hydrogen peroxide (H₂O₂) induction to simulate cellular oxidative stress injury, with or without Mel treatment. The experimental findings demonstrated that compared to the sham group, exhibited morphological damage after HIR, and accompanied by elevated levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), indicative of impaired liver dysfunction post-HIR. Whereas, supplementa-

收稿日期:2024-05-27;修回日期:2024-09-25

基金项目:山东省医药卫生科技发展计划项目(202001020642)

作者简介:盛亚鑫(1991—),男,河北沧州人,硕士,研究方向为缺血再灌注损伤。E-mail:413652134@qq.com

*通信作者:于树娜(YU Shuna),E-mail:yushn@126.com

引文格式:盛亚鑫,王洁,陈雨婷,等.褪黑素调控 TXNIP/NLRP3 信号减轻 HRI 后的细胞焦亡[J].山西大学学报(自然科学版),2026,49(2):365-376. DOI:10.13451/j.sxu.ns.2024125.

tion with Mel was found to alleviate liver dysfunction after HIR and improve the viability of cells treated with H_2O_2 . After HIR, the positive cells of liver NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), cleaved caspase-1, and gasdermin D (GSDMD) increased, and upregulated at both mRNA and protein levels. However, supplementation with Mel could attenuate the positive cells of liver pyroptosis-related proteins and reduce their mRNA and protein expression levels. Furthermore, pretreatment with Mel could also inhibit the upregulation of pro-inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18 (IL-18) induced by HIR. These results indicate that Mel can significantly alleviate the damage caused by hepatocyte pyroptosis resulting from HIR. Additionally, Mel pretreatment inhibits the upregulation of thioredoxin-interacting protein (TXNIP) induced by HIR, which is upstream of NLRP3 and closely associated with its activation. Experimental results indicate that the inhibition of TXNIP is consistent with the results of Mel pretreatment, suggesting that Mel likely alleviates necrosis occurrence by inhibiting TXNIP. In conclusion, it is highly probable that Melatonin mitigates NLRP3-mediated cell necrosis by suppressing TXNIP expression, thereby attenuating liver damage caused by HIR.

Key words: live; ischemia-reperfusion; melatonin; inflammasome; pyroptosis

0 引言

肝脏缺血再灌注(Hepatic Ischemia-reperfusion, HIR)损伤是指在长时间缺血后恢复血流供应时发生的组织损伤,常见于肝移植、肝肿瘤切除及创伤等肝脏手术过程中,且难以完全避免^[1-2]。此类损伤可能导致多种术后并发症,包括肝功能恢复延迟、原发性移植植物功能不全或无功能、移植植物排斥甚至移植失败^[3],进而引发严重的肝功能障碍或肝功能衰竭,甚至多器官功能不全,不仅加重患者的痛苦,也显著增加其经济负担。

HIR包括两个阶段:缺血期可导致组织缺氧、营养供应不足及代谢紊乱,从而引发细胞坏死;再灌注期则伴随循环中先天免疫细胞的浸润与大量炎症因子的释放,进一步加剧肝损伤^[4-5]。氧化应激、促炎信号通路的激活以及多种细胞死亡方式是肝缺血再灌注损伤的主要病理表现^[6-7]。在该损伤的发生与发展过程中,肝细胞死亡起关键作用,其形式包括凋亡、焦亡和坏死等^[8]。越来越多的证据表明核苷酸结合寡聚化结构域(Nucleotide-Binding Oligomerization Domain, NOD)样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)介导的细胞焦亡在心肌、脑、肾、肝和视网膜等器官的缺血再灌注损伤过程中发挥重要作用^[9-12]。我们前期的研究也表明,肝缺血再灌注可激活NLRP3炎性小体并增强细胞焦亡,而抑制其活化则能减轻焦亡水平,从而缓解肝脏损伤^[13]。因此,靶向抑制NLRP3炎性小体活化及其介导的细胞焦亡,可能成为治疗缺血再灌注损伤的有效策略。

NLRP3炎性小体是由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(Apoptosis-associated Speck-like Protein Containing a CARD, ASC)、Caspase-1共同组成的多蛋白复合体,作为NLR(NoD-like Receptor)家族中被研究最为深入的一种亚型,因其可被多种病原体或信号激活,在天然免疫中扮演关键角色,广泛参与机体免疫反应及多种疾病的发生与发展过程^[14]。在受到外界刺激时,NLRP3与ASC结合,进而招募并剪切Caspase-1。活化的Caspase-1可切割gasdermin D(GSDMD),其N端结构域(GSDMD-N)转位至细胞膜并形成跨膜孔道,促使水分内流,引发细胞肿胀与裂解。同时,活化的Caspase-1还能剪切IL-1 β 和IL-18的前体^[15],促进两者成熟,并通过GSDMD-N所形成的孔道释放至胞外,增强局部组织中免疫细胞的募集效应^[16]。研究表明,NLRP3炎性小体的激活及其介导的IL-1 β 、IL-18等促炎因子的产生,与多种慢性炎症性疾病密切相关,并在病毒性肝炎、急慢性肝病、肝硬化、肝脓肿及非酒精性脂肪肝等肝脏疾病中发挥重要作用^[17-18]。

褪黑素(Melatonin, Mel),化学名为N-乙酰-5-甲氧基色胺,是由松果体分泌的一种关键激素,在昼夜节律调节中起核心作用,同时也是调控机体发育、行为及能量代谢的重要因子。Mel具有广泛的生物学活性,包括抗炎^[19-20]、抗氧化^[21]、抗细胞坏死^[22]和抗肿瘤作用^[23]。因其易于透过血脑屏障,Mel在神经保护研究中备受关注,已被证实可促进髓鞘形成^[24]、改善记忆障碍^[25],并通过减轻兴奋性毒性、氧化应激、内质网应激、线粒体功能障碍及血脑屏障

损伤,从而缓解脑缺血再灌注损伤,延缓脑梗死进展^[26-27]。Mel对神经损伤的保护作用与其抑制NLRP3炎性小体相关蛋白表达及促炎介质释放密切相关^[28-29]。此外,Mel在脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导的小鼠急性肺损伤模型中,可抑制NLRP3炎性小体活化及其介导的细胞焦亡^[30]。实际上,Mel在多种疾病模型中均显示出对NLRP3炎性小体介导的细胞焦亡具有缓解作用^[31-32]。然而,Mel是否能够抑制HIR损伤过程中NLRP3炎性小体的活化及其介导的细胞焦亡,进而缓解HIR损伤,目前尚不明确。硫氧还蛋白相互作用蛋白(Thioredoxin-Interacting Protein, TXNIP)作为NLRP3炎性小体的上游信号分子,在受到刺激后与硫氧还蛋白(Thioredoxin, TRX)解离,参与NLRP3的组装与活化过程^[33]。尽管Mel在多种模型中可抑制NLRP3炎性小体活化及细胞焦亡,其对TXNIP的作用机制仍有待阐明。本研究拟通过建立小鼠HIR损伤模型及H₂O₂诱导模型,探讨Mel对HIR过程中细胞焦亡的影响及其潜在机制,以期为临床防治HIR损伤提供理论支持。

1 材料

1.1 实验动物

选用清洁级(Specific Pathogen Free, SPF) C57BL/6雄性小鼠40只,7~8周龄,体重为20 g~25 g,购于济南朋悦实验动物中心,许可证号:SCXK(鲁)20190003。饲养条件:室温20℃~26℃,湿度40%~70%,光照12:12 h明暗,所有动物实验及操作均得到山东第二医科大学实验动物伦理委员会批准(伦理号:2021SPL024),并严格遵循中华人民共和国科学技术部颁布的《实验动物管理条例》。

1.2 主要的仪器及试剂

石蜡包埋机(德国Leica, EG1120)、光学显微镜(Olympus, BX53MRF-S)、离心机(美国Thermo Electron, Fresco21)。褪黑素(美国Sigma, M5250),天门冬氨酸氨基转移酶(南京建成生物, C010-2-1);丙氨酸氨基转移酶(南京建成生物, C009-2-1);兔抗TXNIP(美国CST, D5F3E)、兔抗NLRP3多克隆抗体(博奥森(北京)生物技术有限公司, bs-24563R)、兔抗焦孔素D(Gasdermin D, GSDMD)抗体(武汉三鹰生

物技术有限公司, 20770-1-AP)、Caspase-1 p20抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司, AF4005)、ASC抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司, DF6304)、IL-1 β 抗体(江苏亲科生物研究中心有限公司, AF5103);逆转录试剂盒(日本TOYOBO公司, FSQ-101), PCR扩增试剂盒(瑞士Roche公司, 07339577001)。

2 方法

2.1 动物模型构建和实验分组

采用随机分组法,将小鼠分为假手术(Sham)组、模型(HIR)组、模型治疗(HIR+Mel)组及褪黑素(Mel)组,每组10只。小鼠称重,碘伏消毒后,Sham组和Mel组沿腹部正中皮肤切开不夹闭肝中叶和左叶肝蒂分支,后缝合皮肤,Mel组按照10 mg/kg提前30 min腹腔注射。HIR组和HIR+Mel组,沿腹部正中皮肤切开并夹闭肝中叶和左叶肝蒂分支,可阻断肝脏70%血流,夹闭血管后若肝脏颜色变为深红表明造模成功,45 min后取出止血夹缝合皮肤,常规喂养,再灌注6 h后眼球取血、取肝左叶待用。

2.2 细胞分组及模型构建

将正常小鼠肝脏来源的alpha小鼠肝12(Alpha Mouse Liver 12, AML-12)细胞,在37℃,体积分数5%CO₂温湿度的培养箱中培养,随机分组为Control组、H₂O₂组、H₂O₂+Mel组和H₂O₂+TXNIP-IN-1组。Control组仅使用含体积分数10%胎牛血清完全培养基培养正常培养,不做任何处理;H₂O₂组,用200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂处理4 h,建立氧化应激损伤模型。H₂O₂+Mel组,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Mel预处理4 h,随后用200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂处理4 h。H₂O₂+TXNIP-IN-1组,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的TXNIP-IN-1预处理24 h,随后用200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂处理4 h。

2.3 HE染色

将肝组织经过多聚甲醛固定、梯度脱水、透明、浸蜡处理后用包埋机制成石蜡切块。制片,厚度为5 μm 。二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化、苏木素染核、盐酸酒精分色、氨水返蓝、伊红染细胞质、乙醇脱水、固色,二甲苯透明、中性树胶封片,最后待树胶干后在显微镜下观察并拍照。

2.4 血清学检测肝功能

每个样本设置3个复孔。添加天冬氨酸氨基转移酶(Aspartate transaminase, AST)基质液20 μL ,血清复温后,待测孔加入样本5 μL ,对照孔不添加样本。混匀静置后加入2,4-二硝基苯胍液20 μL ,对照孔加入5 μL 样本,待测孔不添加样本,静置后加入0.4 mol/L H_2O_2 溶液200 μL ,静置后用酶标仪测定各孔光密度(Optical Density, OD)值。随后根据标准品制成的标准曲线计算AST活力值。丙氨酸氨基转移酶(Alanine aminotransferase, ALT)活力值测定基本同上,详细步骤请参阅南京建成说明书。

2.5 CCK-8检测细胞活性

细胞计数后,将细胞接种于96孔板中,空白孔中加入磷酸盐缓冲盐水(Phosphate-Buffered Saline, PBS)防止培养液蒸发,随后在 CO_2 培养箱中培养24 h。按照分组,用10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Mel和200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 H_2O_2 处理细胞,细胞处理结束后,加入55 μL 含有体积分数10% CCK-8的含各种氨基酸和葡萄糖的培养基(dulbecco's modified eagle medium F12, DMEM F12)(含血清)混合液,继续在 CO_2 培养箱中培养,随后分别在1 h、2 h,使用酶标仪在450 nm处测量OD值。根据OD值计算细胞相对活力,细胞相对活力=(模型组-空白组/Control组-空白组) $\times 100\%$ 。

2.6 免疫荧光

组织免疫荧光:组织免疫荧光简要步骤如下,二甲苯脱蜡;梯度乙醇水化;枸橼酸混合液抗原修复,冷却至室温。体积分数0.1% Triton-X 100打孔,4 $^\circ\text{C}$ 预冷的PBS浸洗;山羊血清封闭;一抗孵育,滴加相应一抗(体积比为1:200)并置于4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜,一抗包含TXNIP, NLRP3, ASC, Caspase-1 p20, GSDMD, IL-1 β ;去除一抗,4 $^\circ\text{C}$ 预冷的PBS浸洗,复温后避光条件下滴加荧光二抗室温孵育1 h,4 $^\circ\text{C}$ 预冷的PBS浸洗;4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-Diamidino-2-Phenylindole, DAPI)染色,4 $^\circ\text{C}$ 预冷的PBS浸洗;封片剂封片。随后用正置荧光显微镜观察并拍照。

细胞免疫荧光:细胞免疫荧光简要步骤如下,细胞处理结束后,去除培养基,4 $^\circ\text{C}$ 预冷的PBS浸洗;甲醛固定,4 $^\circ\text{C}$ 预冷的PBS浸洗;体积分数0.1% Triton-X 100打孔,4 $^\circ\text{C}$ 预冷的PBS浸

洗;山羊血清封闭,室温孵育1 h;滴加相应一抗(体积比1:200)并置于4 $^\circ\text{C}$ 冰箱过夜,一抗为TXNIP, NLRP3, ASC, Caspase-1 p20, GSDMD;去除一抗,4 $^\circ\text{C}$ 预冷的PBS浸洗,复温后避光条件下滴加荧光二抗室温孵育1 h,4 $^\circ\text{C}$ 预冷的PBS浸洗;DAPI染色,4 $^\circ\text{C}$ 预冷的PBS浸洗;封片剂封片。随后用正置荧光显微镜观察并拍照。

2.7 qRT-PCR检测肝组织NLRP3、IL-1 β 、IL-18 mRNA的表达

称取适量肝组织加入Trizol充分研磨再加入氯仿,振荡离心,吸取上清加入等体积异丙醇,混匀静置后离心弃去液体保留RNA沉淀,75%乙醇洗涤离心后弃去液体,焦碳酸二乙酯(Diethyl PyroCarbonate, DEPC)水溶解RNA沉淀。测定RNA浓度并调整。逆转录合成cDNA;PCR扩增;根据CT值,计算出每个样品目的基因相对内参基因的表达量 ΔCT ,计算对照组中 ΔCT 的均值,再用处理组的每一个 ΔCT 减去刚刚计算的对照组的 ΔCT 均值,得到 $\Delta\Delta\text{CT}$ (实验组相对对照的表达量),用公式 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算出实验组每个样品相对对照组的表达量。然后再求实验组的平均值,最后在GraphpadPrism软件中作柱状图统计比较。引物信息如下:NLRP3, Forward: 5'-AAGG ACCAGCCAGAGTGGAATGAC-3', Reverse: 5'-CTGCGTGTAGCGACTGTTGAGG-3'; TXNIP, Forward: 5'-GGCAATCAGTAGGCAAGTCTCC A-3', Reverse: 5'-TTCCGACATTCACCCAGC AA-3'; IL-1 β , Forward: 5'-CTGTCCTGTGTA ATGAAAGACGGCA-3', Reverse: 5'-GCATTA GAAACAGTCCAGCCATAC-3'; IL-18, Forward: 5'-ACGGAGCATAAATGACCAAGTTC-3', Reverse: 5'-TCTGGGATTCGTTGGCTGTT-3'; GAPDH, Forward: 5'-TGGCCTCCAAGGAG TAAGAAAC-3', Reverse: 5'-AGTTGGGATAG GGCTCTCTTG-3'。

2.8 Western blot检测肝组织中NLRP3、ASC、GSDMD、TXNIP的表达

将组织块置于匀浆器中加放射免疫沉淀法裂解缓冲液(Radio-Immunoprecipitation Assay, RIPA)和苯甲基磺酰氟(Phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)研磨成浆离心后取上清,用二辛可宁酸(Bicinchoninic acid, BCA)方法进行蛋白含量测定。制胶,电泳后转膜,牛奶封闭,加入相应抗体(体积比为1:1000)4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,

一抗包括 NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, TXNIP, GAPDH。次日 Tris 缓冲盐吐温溶液 (Tris-Buffered Saline with Tween 20, TBST) 洗涤后滴加羊抗兔二抗室温孵育 1.5 h。TBST 洗涤后,用化学发光成像系统分析,计算目的蛋白条带的相对表达量。

2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计学数据分析。计量资料采用均数±标准差表示,组间差异显著性采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Mel对HIR后肝功能损伤及肝形态学的影响

为评估 Mel 对 HIR 后肝组织形态学以及肝功能的影响,我们构建了小鼠 HIR 模型与

AML-12 细胞氧化应激损伤模型。与 Sham 组相比,HIR 后肝小叶、肝细胞索、细胞核发生明显病理样变;肝细胞肿胀明显,可见弥漫大小不一脂肪空泡,伴炎性细胞浸润和气球样变(图 1(a));血清 ALT、AST 水平明显升高(图 1(c)、(d))。而 Mel 处理后肝小叶结构、轮廓、肝细胞形态、炎性细胞浸润等较 IR 组均有所改善,ALT 和 AST 活性下降(图 1(a)、(c)、(d))。细胞实验表明, H_2O_2 处理导致细胞形态、排列不规则,细胞变圆发亮,细胞膜可见气泡,细胞核固缩,细胞萎缩,细胞活性显著降低(图 1(b)、(e)),而 Mel 预处理可明显改善细胞活力(图 1(b)、(e))。结果提示,HIR 可显著降低肝细胞活力,肝功能异常及肝组织损伤,而 Mel 干预能有效改善上述病理变化,显示出对 HIR 所致肝损伤的显著保护作用。

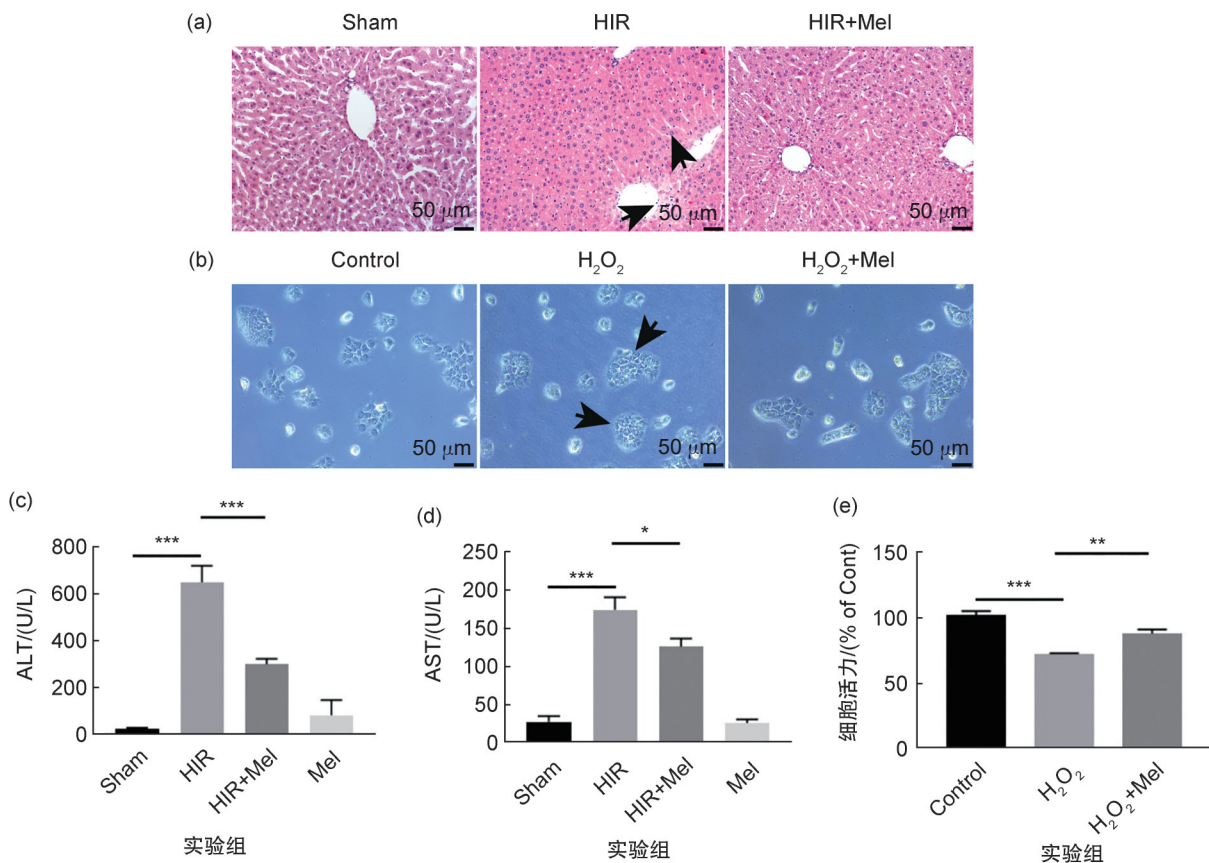


图1 Mel对HIR后肝功能损伤及肝形态学的影响

(a) H&E染色,图片放大为 $20\times$,比例尺为 $50\mu m$; (b) AML-12细胞形态学变化,图片放大为 $20\times$,比例尺为 $50\mu m$; (c,d) 血清ALT、AST水平; (e) AML-12细胞相对活力。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$ 代表差异显著。

Fig 1 The impact of Mel on HIR-induced hepatic function injury and hepatic morphology

(a) H&E staining, magnification shown is $20\times$, and the scale bar represents $50\mu m$; (b) The morphological changes of AML-12 cells; (c, d) The level of ALT and AST in serum; (e) The relative cellular vitality of AML-12 cells. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$,

$***P < 0.001$ represent significant differences.

3.2 Mel对HIR后NLRP3炎性小体介导的细胞焦亡的影响

NLRP3炎性小体的激活及其介导的细胞焦亡是导致HIR损伤的重要因素。结果显示,与Sham组比较,HIR后可明显增加NLRP3、ASC、

Caspase-1 p20、GSDMD阳性细胞数量(图2(a)、(b)),而Mel的预处理能明显降低其阳性细胞数量(图2(a)、(b))。此外,HIR促进NLRP3蛋白、mRNA的表达(图2(c)、(d)),促进NLRP3炎性小体相关蛋白ASC、Caspase-1 p20、GSDMD的表

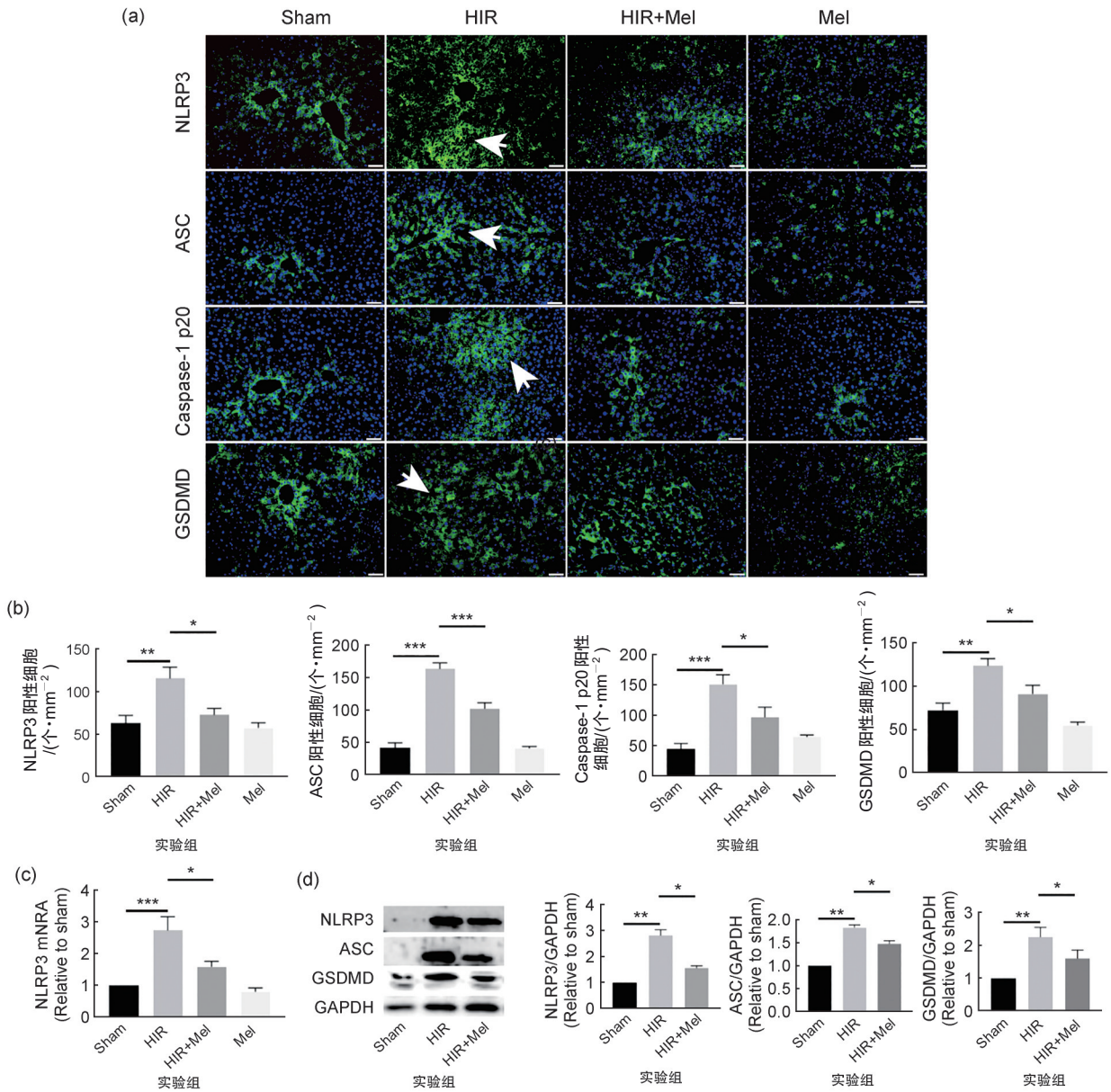


图2 Mel对HIR后NLRP3炎性小体介导的细胞焦亡的影响

(a) 组织免疫荧光分析NLRP3、ASC、Caspase-1 p20、GSDMD阳性细胞数量,图片放大为20×,比例尺为50 μm。箭头标记为NLRP3、ASC、Caspase-1 p20、GSDMD阳性细胞;(b) NLRP3、ASC、Caspase-1 p20、GSDMD阳性细胞统计(mm²);(c) NLRP3 mRNA的表达;(d) NLRP3、ASC、GSDMD的蛋白表达。*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001代表差异显著。

Fig 2 The effect of Mel on HIR-induced NLRP3 inflammasome-mediated cell pyroptosis

(a) Immunofluorescence analysis was performed to quantify the number of NLRP3, ASC, Caspase-1 p20, and GSDMD positive cells in the organization, magnification shown is 20 ×, and the scale bar represents 50 μm. The arrow indicates NLRP3, ASC, Caspase-1 p20, GSDMD-positive cells; (b) The count of cells positive for NLRP3, ASC, Caspase-1 p20, and GSDMD (mm²); (c) The expression level of NLRP3 mRNA; (d) The expression of NLRP3, ASC, and GSDMD protein. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 represent significant differences.

达(图2(d))。然而,补充Mel,不但能够降低NLRP3蛋白、mRNA的表达,同样能够降低ASC、Caspase-1 p20、GSDMD蛋白的表达(图2(d))。以上结果说明,Mel预处理不仅可以减轻NLRP3炎性小体的表达,同样抑制其介导的细胞焦亡。

3.3 Mel对HIR后炎症反应的影响

IL-1 β 和IL-18是NLRP3炎性小体介导的

下游促炎介质。免疫荧光结果显示,HIR组IL-1 β 阳性细胞增加,而Mel预处理显著降低IL-1 β 阳性细胞数量(图3(a)、(b))。qRT-PCR结果显示,HIR后IL-1 β 和IL-18 mRNA表达水平显著高于,而Mel预处理显著降低其表达水平(图3(c)),以上结果说明Mel可能抑制HIR后的炎症反应。

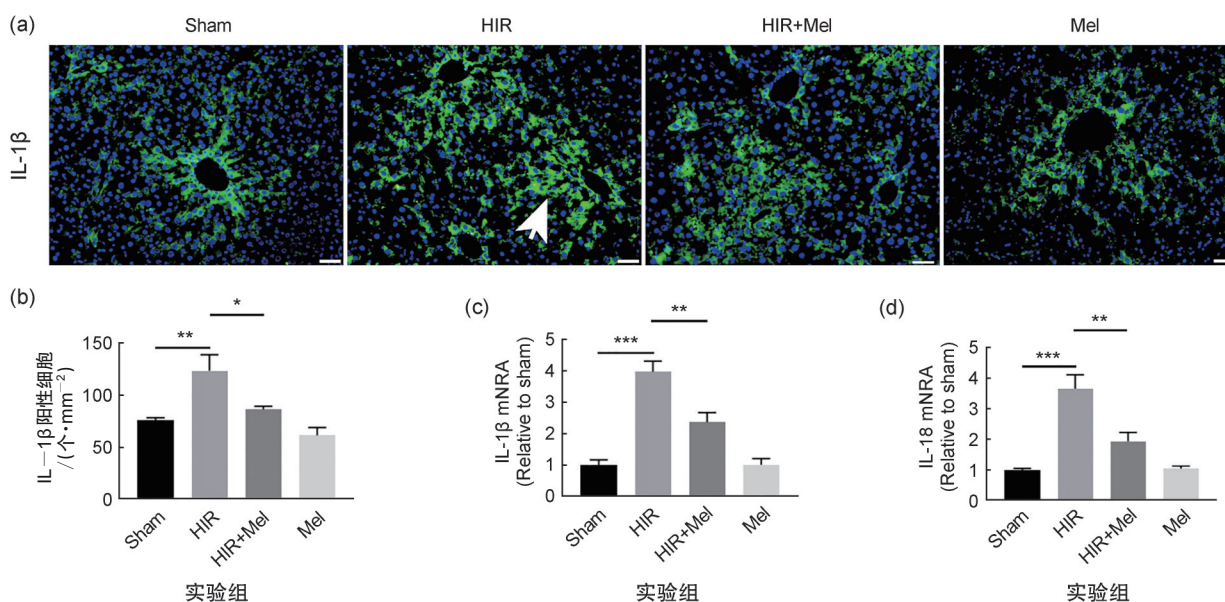


图3 Mel对HIR后炎症反应的影响

(a) 组织免疫荧光分析IL-1 β 阳性细胞数量,图片放大为20 \times ,比例尺为50 μ m。箭头标记为IL-1 β 阳性细胞;(b) IL-1 β 阳性细胞统计(mm²);(c,d) IL-1 β 和IL-18 mRNA的表达。* P <0.05,** P <0.01,** P <0.001代表差异显著。

Fig 3 The impact of Mel on the inflammatory response after HIR

(a) Immunofluorescence analysis was performed to quantify the number of IL-1 β positive cells in the organization, magnification shown is 20 \times , and the scale bar represents 50 μ m. The arrow indicates IL-1 β -positive cells; (b) The counts of cells positive for IL-1 β (mm²); (c, d) The expression levels of IL-1 β and IL-18 mRNA. * P <0.05,** P <0.01,** P <0.001 represent significant differences.

3.4 Mel对HIR后NLRP3炎性小体上游因子TXNIP表达的影响

TXNIP是一种促氧化蛋白,负向调节硫氧还蛋白活性及其抗氧化功能,HIR后引起氧化应激,随后介导TXNIP与TRX解离,促使其下游NLRP3炎性小体的激活。实验结果显示,与Sham组比较,HIR组TXNIP表达于细胞质且阳性细胞数明显增加,而Mel预处理能明显降低TXNIP阳性细胞数量(图4(a)、(b))。此外,HIR组TXNIP蛋白与mRNA表达均明显升高,而Mel预处理能明显降低其mRNA和蛋白的表达(图4(e)、(f))。细胞实验表明,与Control组比较,H₂O₂组TXNIP阳性细胞数明显增加(图4(c)、(d)),Mel干预后阳性细胞数减少,且

TXNIP抑制剂TXNIP-IN-1预处理后与H₂O₂+Mel组趋势一致(图4(c)、(d))。以上结果说明,HIR后促进TXNIP的表达,而Mel可以逆转TXNIP在肝细胞中的表达。

3.5 Mel对H₂O₂诱导AML-12细胞中NLRP3介导细胞焦亡的影响

结果显示,与Sham组比较,H₂O₂诱导后,TXNIP下游分子NLRP3炎性小体相关蛋白NLRP3、ASC、Caspase-1 p20和GSDMD蛋白表达水平升高,阳性细胞增加(图5(a)、(b));Mel预处理后可使NLRP3、ASC、Caspase-1 p20、GSDMD蛋白表达降低,阳性细胞数量下降(图5(a)、(b))。此外,TXNIP的抑制与Mel预处理均能降低NLRP3、ASC、Caspase-1 p20

和 GSDMD 蛋白表达及阳性细胞数量(图 5 (a)、(b)),说明 Mel 极有可能是通过调控

TXNIP 来抑制 NLRP3 炎性小体介导的细胞焦亡。

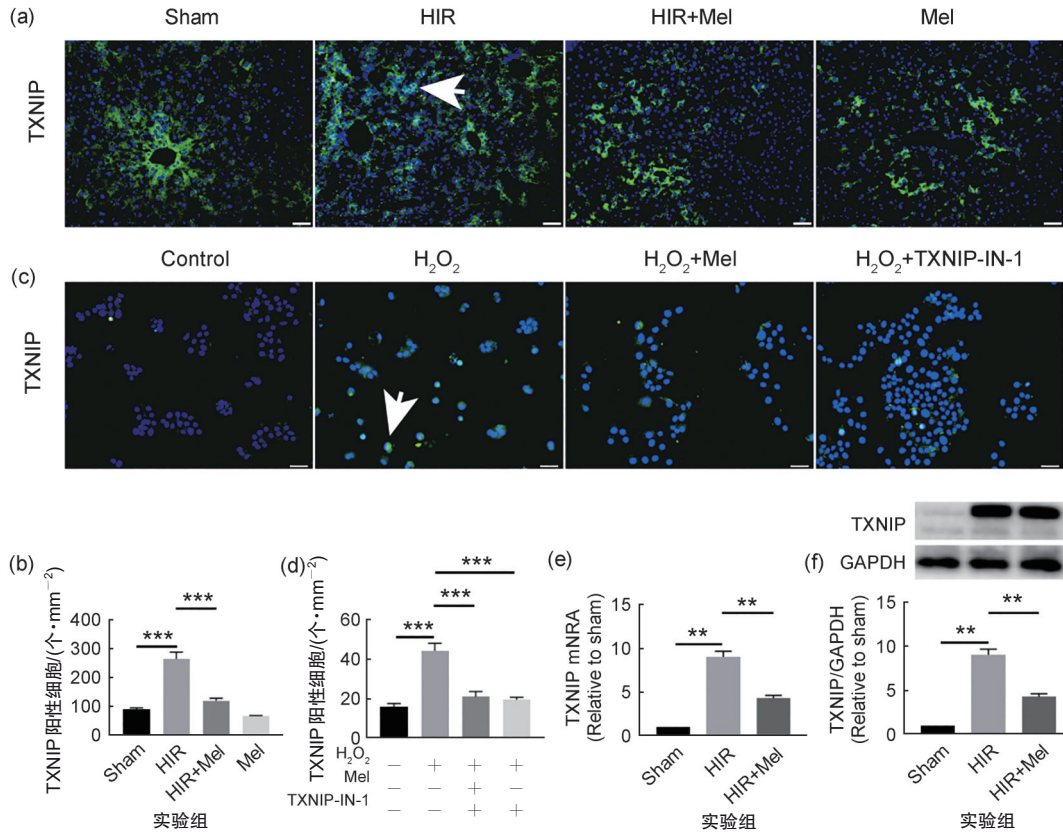


图4 Mel对HIR后NLRP3炎性小体上游因子TXNIP表达的影响

(a) 组织免疫荧光分析TXNIP阳性细胞数量,图片放大为20×,比例尺为50 μm。箭头标记为TXNIP阳性细胞;(b) TXNIP阳性细胞统计(mm²);(c) 细胞免疫荧光分析TXNIP阳性细胞数量,图片放大为20×,比例尺为50 μm。箭头标记为TXNIP阳性细胞;(d) TXNIP阳性细胞统计(mm²);(e) TXNIP的mRNA表达;(f) TXNIP的蛋白表达。^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01, ^{***}*P*<0.001代表差异显著。+表示添加药物,-表示未添加药物。

Fig 4 The effect of Mel on the expression of TXNIP which is the upstream factor of NLRP3 inflammasome post-HIR

(a) Immunofluorescence analysis was performed to quantify the number of TXNIP positive cells in the organization, magnification shown is 20 ×, and the scale bar represents 50 μm. The arrow indicates TXNIP-positive cells; (b) The counts of cells positive for TXNIP (mm²); (c) Cellular immunofluorescence analysis was performed to quantify the number of TXNIP positive cells, magnification shown is 20 ×, and the scale bar represents 50 μm. The arrow indicates TXNIP-positive cells; (d) The counts of cells positive for TXNIP (mm²); (e) The expression levels of TXNIP mRNA; (f) The expression level of TXNIP protein. ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01, ^{***}*P*<0.001 represent significant differences. + indicates the addition of the drug, while - indicates no addition.

4 讨论

HIR是肝胆外科手术中常见的病理生理过程,其核心机制为术中暂时性夹闭肝门血管导致肝脏缺血,并在血流恢复后通过氧化应激、炎症级联反应及细胞死亡等途径造成继发性损伤。HIR本质上具有“双刃剑”效应,再灌注虽能为缺血组织提供氧气和营养物质,但也会因线粒体功能障碍、中性粒细胞浸润等机制加剧

肝损伤,成为肝切除或肝移植术后并发症的重要诱因。减轻HIR损伤对于肝手术患者的预后具有重要意义,然而目前其具体发生与发展机制尚未完全阐明。尽管已有研究提出缺血预处理及药物干预等策略^[34-35],但其效果仍不理想。因此,目前尚缺乏针对HIR损伤的有效干预手段和治疗药物^[36],探索其治疗靶点或开发有效药物具有重要的临床意义。已有研究表明,HIR导致严重的肝脏损伤,表现为明显的肝

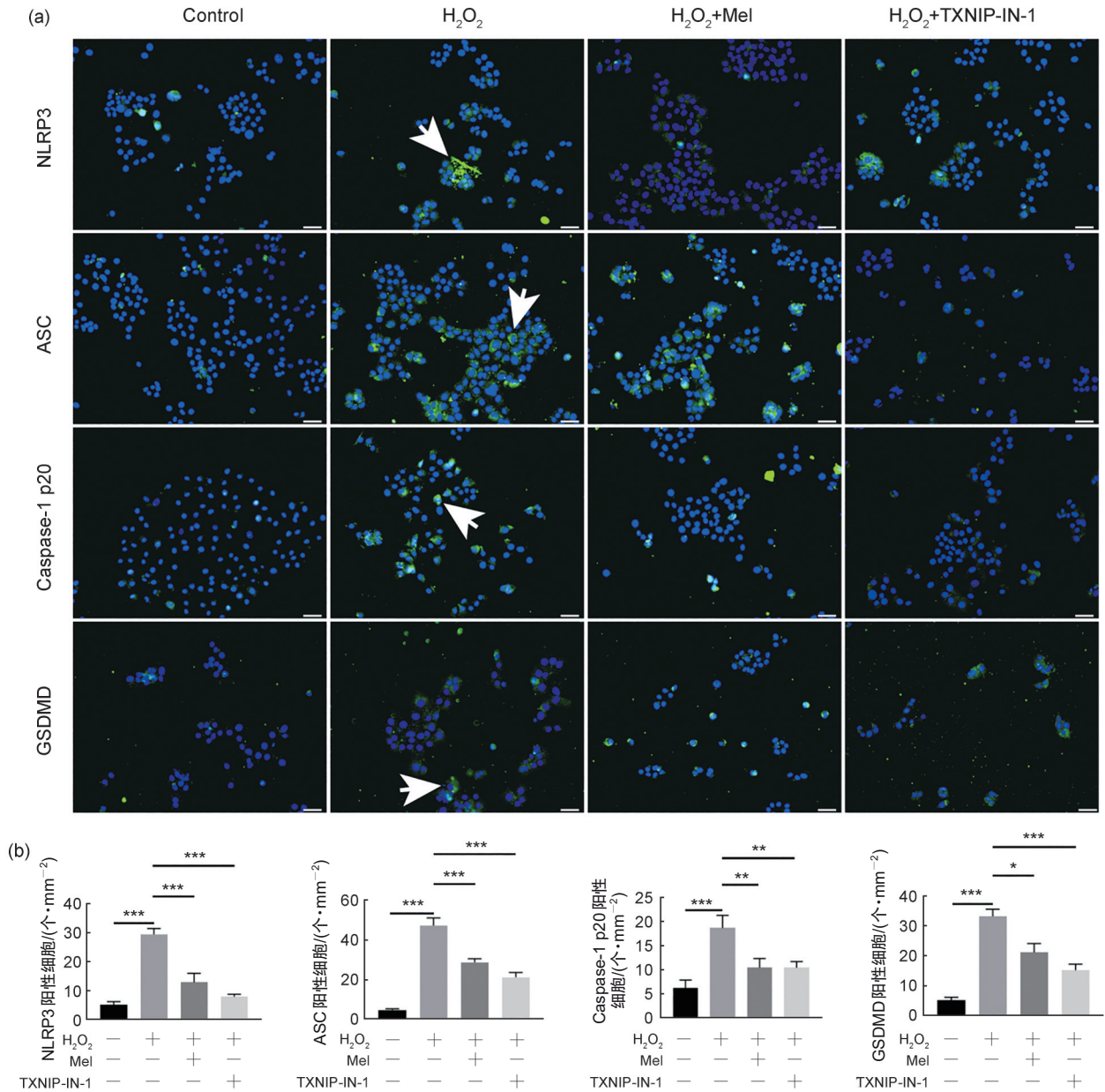


图5 Mel对H₂O₂诱导AML-12细胞中NLRP3介导细胞焦亡的影响

(a) 细胞免疫荧光分析NLRP3、ASC、Caspase-1 p20和GSDMD阳性细胞数量,图片放大为20×,比例尺为50 μm。箭头分别标记NLRP3、ASC、Caspase-1 p20和GSDMD阳性细胞;(b) NLRP3、ASC、Caspase-1 p20和GSDMD阳性细胞统计(mm²)。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001代表差异显著。+表示添加药物,-表示未添加药物。

Fig 5 The impact of Mel on NLRP3-mediated cellular pyroptosis induced by H₂O₂ in AML-12 cells

(a) Cellular immunofluorescence analysis was performed to quantify the number of NLRP3、ASC、Caspase-1 p20 and GSDMD positive cells, magnification shown is 20×, and the scale bar represents 50 μm. The arrow indicates NLRP3、ASC、Caspase-1 p20 and GSDMD-positive cells; (b) The counts of cells positive for NLRP3、ASC、Caspase-1 p20 and GSDMD. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 represent significant differences. + indicates the addition of the drug, while - indicates no addition.

组织病理学改变以及血清AST和ALT水平升高^[37]。本实验证实,HIR处理成功诱导了肝组织损伤,并伴随AST和ALT的释放增加,表明HIR模型构建成功。经Mel预处理后,肝组织损伤程度显著减轻,肝功能指标明显改善,提

示Mel预处理对肝缺血再灌注损伤具有保护作用,但其具体机制仍有待进一步阐明。

多项研究证实,NLRP3介导的细胞焦亡在心肌、脑、肾、肝及视网膜等器官的缺血再灌注损伤中具有重要作用^[9-12]。在HIR小鼠模型中,

NLRP3 炎性小体被异常激活,细胞焦亡水平上升,肝脏炎症反应增强,从而加剧肝损伤^[38]。因此,我们探讨了 Mel 是否通过调节 NLRP3 炎性小体的活化来改善 HIR 所致的肝损伤。本研究发现,HIR 可显著增加肝组织中 NLRP3、ASC、Caspase-1 p20 及 GSDMD 阳性细胞的数量,并上调 NLRP3、ASC 和 GSDMD 蛋白的表达,表明 HIR 损伤确实促进了 NLRP3 的活化。而补充 Mel 后,NLRP3、ASC、Caspase-1 p20 和 GSDMD 阳性细胞数量显著减少,同时 NLRP3、ASC 和 GSDMD 蛋白的表达也受到抑制,说明 Mel 能够有效抑制 HIR 损伤中细胞焦亡的发生。为进一步验证上述结果,我们检测了 NLRP3 炎性小体介导的细胞焦亡下游促炎介质 IL-1 β 和 IL-18 的变化。结果显示,HIR 可引起 IL-1 β 阳性细胞明显增多,IL-1 β 和 IL-18 的表达水平升高;而 Mel 处理则显著降低了 IL-1 β 阳性细胞数量,并抑制了 IL-1 β 和 IL-18 的表达。以上结果表明,HIR 确实促进了 NLRP3 炎性小体的活化及其介导的细胞焦亡过程,而 Mel 能够显著抑制该过程。已有研究报道,Mel 可通过抑制 NLRP3 炎性小体的激活及其介导的细胞焦亡,缓解小鼠急性肺损伤^[30],并在心脏及神经系统疾病中发挥类似的抑制作用^[31-32]。本研究结果进一步支持 Mel 通过抑制 NLRP3 炎性小体活化及其介导的细胞焦亡,从而减轻 HIR 损伤。

HIR 损伤可引起肝组织氧化还原稳态失衡,削弱其清除活性氧(Reactive Oxygen Species, ROS)的能力^[39-40],导致 ROS 大量积聚。ROS 的积累进一步引发生物分子氧化损伤与线粒体功能障碍,从而激活广泛的炎症级联反应并促进肝细胞凋亡,加剧肝组织损伤^[41]。此外,ROS 的过度积累可促使 TXNIP 与硫氧还蛋白(Thioredoxin, TRX)解离,游离的 TXNIP 进而促进 NLRP3 炎性小体的组装与活化,诱发细胞焦亡^[28]。前期研究表明,HIR 损伤可导致 NLRP3 炎性小体过度活化,但 TXNIP 在此过程中的具体作用,以及褪黑素(Mel)是否调控 TXNIP,目前尚不明确。本研究发现,HIR 可增加 TXNIP 阳性细胞数并促进其表达;在 H₂O₂ 诱导的细胞氧化应激模型中也观察到 TXNIP 表达及阳性细胞数的上升。而补充 Mel 则能显

著降低 TXNIP 的表达水平及阳性细胞数量。同时,使用 TXNIP 抑制剂 TXNIP-IN-1 也可抑制 TXNIP 的表达及阳性细胞数。据此我们推测,Mel 可能通过抑制 TXNIP 表达,进而抑制 NLRP3 活化及其介导的细胞焦亡。为验证该假设,我们在 H₂O₂ 诱导的氧化应激模型中进一步检测发现,Mel 能显著减少 NLRP3、ASC、Caspase-1 p20 及 GSDMD 的阳性细胞数。同样,加入 TXNIP-IN-1 也可抑制上述因子的表达及阳性细胞数量。上述结果表明,Mel 可能通过下调 TXNIP 表达,抑制 NLRP3 炎性小体活化及细胞焦亡,从而减轻 HIR 损伤。

综上所述,本研究评估了 Mel 对 TXNIP/NLRP3 通路、促炎介质和焦亡相关因子表达的影响,结果表明 Mel 能够减轻 HIR 后的肝细胞损伤,改善肝功能,并通过调控 NLRP3 炎性小体及相关促炎介质的表达抑制细胞焦亡,从而发挥肝脏保护作用。本研究为临床治疗 HIR 提供了重要的理论依据。

参考文献:

- [1] ZHAI Y, PETROWSKY H, HONG J C, *et al.* Ischaemia-reperfusion Injury in Liver Transplantation: From Bench to Bedside[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, **10**(2): 79-89. DOI: 10.1038/nrgastro.2012.225.
- [2] ZHOU J B, CHEN J, WEI Q, *et al.* The Role of Ischemia/Reperfusion Injury in Early Hepatic Allograft Dysfunction[J]. *Liver Transpl*, 2020, **26**(8): 1034-1048. DOI: 10.1002/lt.25779.
- [3] ITO T, NAINI B V, MARKOVIC D, *et al.* Ischemia-reperfusion Injury and Its Relationship with Early Allograft Dysfunction in Liver Transplant Patients[J]. *Am J Transplant*, 2021, **21**(2): 614-625. DOI: 10.1111/ajt.16219.
- [4] KHAN H A, AHMAD M Z, KHAN J A, *et al.* Crosstalk of Liver Immune Cells and Cell Death Mechanisms in Different Murine Models of Liver Injury and Its Clinical Relevance[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2017, **16**(3): 245-256. DOI: 10.1016/s1499-3872(17)60014-6.
- [5] SHI S J, VERSTEGEN M M A, MEZZANOTTE L, *et al.* Necroptotic Cell Death in Liver Transplantation and Underlying Diseases: Mechanisms and Clinical Perspective[J]. *Liver Transpl*, 2019, **25**(7): 1091-1104. DOI: 10.1002/lt.25488.
- [6] KALTENMEIER C, WANG R H, POPP B, *et al.* Role of Immuno-inflammatory Signals in Liver Ischemia-

- reperfusion Injury[J]. *Cells*, 2022, **11**(14): 2222. DOI: 10.3390/cells11142222.
- [7] KADONO K, KAGEYAMA S, NAKAMURA K, *et al.* Myeloid Ikaros-SIRT1 Signaling Axis Regulates Hepatic Inflammation and Pyroptosis in Ischemia-stressed Mouse and Human Liver[J]. *J Hepatol*, 2022, **76**(4): 896–909. DOI: 10.1016/j.jhep.2021.11.026.
- [8] GUJRAL J S, BUCCI T J, FARHOOD A, *et al.* Mechanism of Cell Death During Warm Hepatic Ischemia-reperfusion in Rats: Apoptosis or Necrosis?[J]. *Hepatology*, 2001, **33**(2): 397–405. DOI: 10.1053/jhep.2001.22002.
- [9] ZHANG J, HUANG L L, SHI X, *et al.* Metformin Protects Against Myocardial Ischemia-reperfusion Injury and Cell Pyroptosis via AMPK/NLRP3 Inflammasome Pathway[J]. *Aging*, 2020, **12**(23): 24270–24287. DOI: 10.18632/aging.202143.
- [10] WANG L X, REN W, WU Q J, *et al.* NLRP3 Inflammasome Activation: A Therapeutic Target for Cerebral Ischemia-reperfusion Injury[J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, **15**: 847440. DOI: 10.3389/fnmol.2022.847440.
- [11] MINUTOLI L, PUZZOLO D, RINALDI M, *et al.* ROS-mediated NLRP3 Inflammasome Activation in Brain, Heart, Kidney, and Testis Ischemia/Reperfusion Injury [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, **2016**: 2183026. DOI: 10.1155/2016/2183026.
- [12] GHAFOURI-FARD S, SHOOREI H, POORNAJAF Y, *et al.* NLRP3: Role in Ischemia/Reperfusion Injuries[J]. *Front Immunol*, 2022, **13**: 926895. DOI: 10.3389/fimmu.2022.926895.
- [13] PAN Y T, YU S N, WANG J X, *et al.* N-acetyl-L-tryptophan Attenuates Hepatic Ischemia-reperfusion Injury via Regulating TLR4/NLRP3 Signaling Pathway in Rats [J]. *PeerJ*, 2021, **9**: e11909. DOI: 10.7717/peerj.11909.
- [14] SHAO B Z, XU Z Q, HAN B Z, *et al.* NLRP3 Inflammasome and its Inhibitors: A Review[J]. *Front Pharmacol*. 2015; **6**: 262. DOI: 10.3389/fphar.2015.00262.
- [15] HE W T, WAN H Q, HU L C, *et al.* Gasdermin D is an Executor of Pyroptosis and Required for Interleukin-1beta Secretion[J]. *Cell Res*. 2015; **25**: 1285–1298. DOI:10.1038/cr.2015.139.
- [16] SHI J J, ZHAO Y, WANG K, *et al.* Cleavage of GSDMD by Inflammatory Caspases Determines Pyroptotic Cell Death[J]. *Nature*. 2015; **526**: 660–665. DOI: 10.1038/nature15514.
- [17] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y H, *et al.* The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation[J]. *Int J Mol Sci*. 2019; **20**. DOI: 10.3390/ijms20133328.
- [18] FU J N, WU H. Structural Mechanisms of NLRP3 Inflammasome Assembly and Activation[J]. *Annu Rev Immunol*. 2023; **41**: 301–316. DOI: 10.1146/annurev-immunol-081022-021207.
- [19] YUGE K, NAGAMITSU S, ISHIKAWA Y, *et al.* Long-term Melatonin Treatment for the Sleep Problems and Aberrant Behaviors of Children with Neurodevelopmental Disorders[J]. *BMC Psychiatry*, 2020, **20**(1): 445. DOI: 10.1186/s12888-020-02847-y.
- [20] FAVERO G, FRANCESCHETTI L, BONOMINI F, *et al.* Melatonin as an Anti-inflammatory Agent Modulating Inflammasome Activation[J]. *Int J Endocrinol*, 2017, **2017**: 1835195. DOI: 10.1155/2017/1835195.
- [21] REITER R J, MAYO J C, TAN D X, *et al.* Melatonin as an Antioxidant: Under Promises but over Delivers[J]. *J Pineal Res*, 2016, **61**(3): 253–278. DOI: 10.1111/jpi.12360.
- [22] ZHANG Y, LIU X, BAI X, *et al.* Melatonin Prevents Endothelial Cell Pyroptosis via Regulation of Long Noncoding RNA MEG3/miR-223/NLRP3 Axis[J]. *J Pineal Res*, 2018, **64**(2): 10.1111/jpi.12449. DOI: 10.1111/jpi.12449.
- [23] SHIN Y Y, SEO Y, OH S J, *et al.* Melatonin and Verteporfin Synergistically Suppress the Growth and Stemness of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma through the Regulation of Mitochondrial Dynamics[J]. *J Pineal Res*, 2022, **72**(1): e12779. DOI: 10.1111/jpi.12779.
- [24] ZHOU Q P, LIN L F, LI H Y, *et al.* Melatonin Reduces Neuroinflammation and Improves Axonal Hypomyelination by Modulating M1/M2 Microglia Polarization via JAK2-STAT3-telomerase Pathway in Postnatal Rats Exposed to Lipopolysaccharide[J]. *Mol Neurobiol*, 2021, **58**(12): 6552–6576. DOI: 10.1007/s12035-021-02568-7.
- [25] WANG X T, WANG Z X, CAO J, *et al.* Gut Microbiota-derived Metabolites Mediate the Neuroprotective Effect of Melatonin in Cognitive Impairment Induced by Sleep Deprivation[J]. *Microbiome*, 2023, **11**(1): 17. DOI: 10.1186/s40168-022-01452-3.
- [26] YAWOOT N, GOVITRAPONG P, TOCHARUS C, *et al.* Ischemic Stroke, Obesity, and the Anti-inflammatory Role of Melatonin[J]. *BioFactors*, 2021, **47**(1): 41–58. DOI: 10.1002/biof.1690.
- [27] CHUMBOATONG W, KHAMCHAI S, TOCHARUS C, *et al.* Agomelatine Protects Against Permanent Cerebral Ischaemia via the Nrf2-HO-1 Pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, **874**: 173028. DOI: 10.1016/j.ejphar.2020.173028.
- [28] DONG Y S, FAN C X, HU W, *et al.* Melatonin Attenuated Early Brain Injury Induced by Subarachnoid Hem-

- orrhage via Regulating NLRP3 Inflammasome and Apoptosis Signaling[J]. *J Pineal Res*, 2016, **60**(3): 253–262. DOI: 10.1111/jpi.12300.
- [29] CAO S L, SHRESTHA S, LI J R, *et al.* Melatonin-mediated Mitophagy Protects Against Early Brain Injury after Subarachnoid Hemorrhage through Inhibition of NLRP3 Inflammasome Activation[J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 2417. DOI: 10.1038/s41598-017-02679-z.
- [30] KANG J Y, XU M M, SUN Y, *et al.* Melatonin Attenuates LPS-induced Pyroptosis in Acute Lung Injury by Inhibiting NLRP3-GSDMD Pathway via Activating Nrf2/HO-1 Signaling Axis[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, **109**: 108782. DOI: 10.1016/j.intimp.2022.108782.
- [31] ARIÖZ B I, TASTAN B, TARAKCIOGLU E, *et al.* Melatonin Attenuates LPS-induced Acute Depressive-like Behaviors and Microglial NLRP3 Inflammasome Activation through the SIRT1/Nrf2 Pathway[J]. *Front Immunol*, 2019, **10**: 1511. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01511.
- [32] WEN L H, WANG M N, LUO P Y, *et al.* Melatonin Exerts Cardioprotective Effects by Inhibiting NLRP3 Inflammasome-induced Pyroptosis in Mice Following Myocardial Infarction[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, **2021**: 5387799. DOI: 10.1155/2021/5387799.
- [33] HAN Y C, XU X X, TANG C Y, *et al.* Reactive Oxygen Species Promote Tubular Injury in Diabetic Nephropathy: The Role of the Mitochondrial Ros-txnip-nlrp3 Biological Axis[J]. *Redox Biol*, 2018, **16**: 32–46. DOI: 10.1016/j.redox.2018.02.013.
- [34] XIONG C, DU Z D, ZHU Y W, *et al.* Mycophenolate Mofetil Preconditioning Protects Mouse Liver Against Ischemia/Reperfusion Injury in Wild Type and Toll-like Receptor 4 Knockout Mice[J]. *Transpl Immunol*, 2021, **65**: 101357. DOI: 10.1016/j.trim.2020.101357.
- [35] RICCA L, LEMOINE A, CAUCHY F, *et al.* Ischemic Postconditioning of the Liver Graft in Adult Liver Transplantation[J]. *Transplantation*, 2015, **99**(8): 1633–1643. DOI: 10.1097/TP.0000000000000685.
- [36] CANNISTRÀ M, RUGGIERO M, ZULLO A, *et al.* Hepatic Ischemia Reperfusion Injury: A Systematic Review of Literature and the Role of Current Drugs and Biomarkers[J]. *Int J Surg*, 2016, **33**(Suppl 1): S57–S70. DOI: 10.1016/j.ijisu.2016.05.050.
- [37] YAO W F, LI H B, HAN X, *et al.* MG53 Anchored by Dysferlin to Cell Membrane Reduces Hepatocyte Apoptosis which Induced by Ischaemia/Reperfusion Injury in Vivo and in Vitro[J]. *J Cell Mol Med*. 2017; **21**: 2503–2513. DOI: 10.1111/jcmm.13171.
- [38] HUANG R, ZHAO Z Z, JIANG X J, *et al.* Liposomal Chrysin Attenuates Hepatic Ischaemia-Reperfusion Injury: Possible Mechanism via Inhibiting NLRP3 Inflammasome[J]. *J Pharm Pharmacol*. 2022; **74**: 216–226. DOI:10.1093/jpp/rgab153.
- [39] SADRKHANLOO M, ENTEZARI M, OROUEI S, *et al.* Targeting Nrf2 in Ischemia-reperfusion Alleviation: From Signaling Networks to Therapeutic Targeting[J]. *Life Sci*, 2022, **300**: 120561. DOI: 10.1016/j.lfs.2022.120561.
- [40] BARDALLO R G, PANISELLO-ROSELLÓ A, SANCHEZ-NUNO S, *et al.* Nrf2 and Oxidative Stress in Liver Ischemia/Reperfusion Injury[J]. *FEBS J*, 2022, **289**(18): 5463–5479. DOI: 10.1111/febs.16336.
- [41] ZHANG J, PAN W Q, ZHANG Y, *et al.* Comprehensive Overview of Nrf2-related Epigenetic Regulations Involved in Ischemia-reperfusion Injury[J]. *Theranostics*, 2022, **12**(15): 6626–6645. DOI: 10.7150/thno.77243.