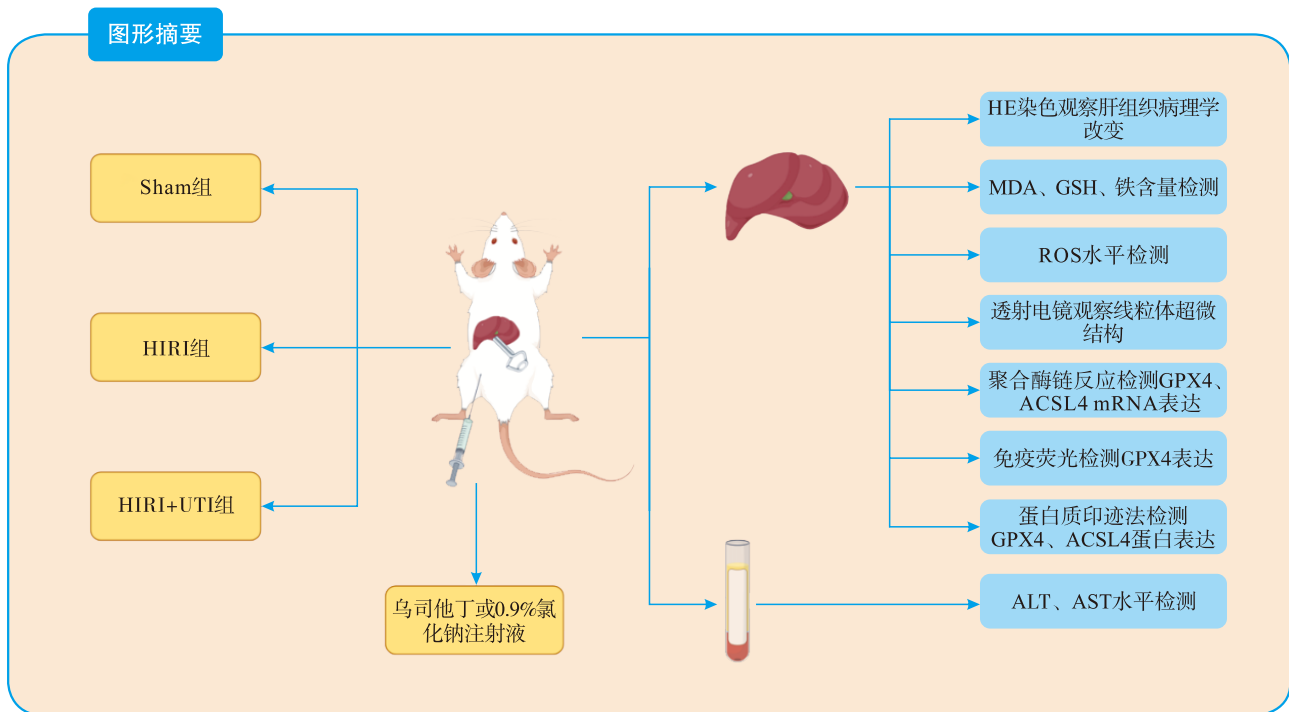


# 基于铁死亡探讨乌司他丁对肝缺血-再灌注损伤的保护作用

陈实 赵漾 周尧 郁冬玲 黄娇 蓝雨雁



**【摘要】** 目的 探讨乌司他丁对肝缺血-再灌注损伤的保护作用及机制。方法 24只雄性SD大鼠分成3组，分别为假手术组（Sham组）、肝缺血-再灌注损伤组（HIRI组）、肝缺血-再灌注损伤+乌司他丁预处理组（HIRI+UTI组），每组8只。采用阻断肝门静脉和肝动脉1h的方法建立大鼠HIRI模型，HIRI+UTI组于造模前30min腹腔注射乌司他丁，Sham组和HIRI组腹腔注射等量的生理盐水。造模6h后处死大鼠，收集大鼠血清检测丙氨酸转氨酶（ALT）和天冬氨酸转氨酶（AST）水平；采用苏木素-伊红（HE）染色法检测肝组织病理学改变；透射电镜观察肝组织线粒体超微结构改变；免疫荧光检测谷胱甘肽过氧化酶4（GPX4）表达；检测肝组织丙二醛（MDA）、谷胱甘肽（GSH）、铁、活性氧簇（ROS）及GPX4含量；检测肝组织GPX4、酰基辅酶A合成酶长链家族4（ACSL4）信使RNA（mRNA）和蛋白表达水平。结果 与Sham组相比，HIRI组血清ALT、AST水平升高，肝脏出现淤血、肝细胞坏死和肝小叶结构异常等病理改变，病理学评分升高，线粒体缩小，膜密

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2024097

基金项目: 广西自然科学基金(2018GXNSFAA281101)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院麻醉科(陈实、赵漾、郁冬玲、黄娇、蓝雨雁); 广西医学科学院广西壮族自治区人民医院急诊科(周尧)

作者简介: 陈实(ORCID 0009-0005-0823-2863), 硕士, 住院医师, 研究方向为小儿麻醉与肝移植, Email: 475046360@qq.com

通信作者: 蓝雨雁(ORCID 0000-0002-5052-2910), 硕士, 主任医师, 研究方向为小儿麻醉与肝移植, Email: blueyuyan@163.com

度增加, 线粒体嵴断裂甚至消失, ROS、MDA、铁含量升高, GSH 含量下降, GPX4 荧光强度减弱, ACSL4 mRNA 及蛋白相对表达量升高, GPX4 mRNA 和蛋白相对表达量降低 (均为  $P<0.05$ )。与 HIRI 组比较, HIRI+UTI 组血清 ALT、AST 水平降低, 肝组织损伤减轻, 病理学评分降低, 线粒体缩小、嵴断裂情况改善, ROS、MDA、铁含量降低, GSH 含量升高, GPX4 荧光强度增强, ACSL4 mRNA 和蛋白相对表达量降低, GPX4 mRNA 和蛋白相对表达量升高 (均为  $P<0.05$ )。结论 乌司他丁可减轻大鼠肝缺血-再灌注损伤, 其机制可能是通过抑制铁死亡。

【关键词】 缺血-再灌注损伤; 肝移植; 乌司他丁; 铁死亡; 谷胱甘肽过氧化酶 4; 酰基辅酶 A 合成酶长链家族 4; 活性氧簇; 丙二醛

【中图分类号】 R617, R657.3 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2024) 05-0014-09

**Protective effect of ulinastatin on hepatic ischemia-reperfusion injury based on ferroptosis** Chen Shi\*, Zhao Yang, Zhou Yao, Yu Dongling, Huang Jiao, Lan Yuyan. \*Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: Lan Yuyan, Email: blueyuyan@163.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the protective effect and underlying mechanism of ulinastatin on hepatic ischemia-reperfusion injury. **Methods** Twenty-four male SD rats were divided into three groups: sham operation group (Sham group), hepatic ischemia-reperfusion injury group (HIRI group) and hepatic ischemia-reperfusion injury + ulinastatin pretreatment group (HIRI+UTI group), with 8 rats in each group. The HIRI rat models were established by occluding hepatic portal vein and hepatic artery for 1 h. In the HIRI+UTI group, the rats were intraperitoneally injected with ulinastatin at 30 min before model establishment, and an equivalent amount of normal saline was given in the Sham and HIRI groups. The rats were sacrificed at 6 h after model establishment. Serum samples were collected to detect alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) levels. Pathological changes of liver tissues were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. Ultrastructural changes of mitochondria in liver tissues were observed by transmission electron microscopy. The expression of glutathione peroxidase 4 (GPX4) was determined by immunofluorescent staining. The contents of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), Fe, reactive oxygen species (ROS) and GPX4 were detected. The expression levels of GPX4 and acyl-CoA synthetase long-chain family 4 (ACSL4) messenger RNA (mRNA) and proteins in liver tissue were measured. **Results** Compared with the Sham group, serum ALT and AST levels were up-regulated, pathological changes such as congestion, hepatocyte necrosis and abnormal hepatic lobule structure were observed, pathological score was increased, the mitochondria shrank, the membrane density was increased, the mitochondrial crest was damaged or even absent, the contents of ROS, MDA and Fe were elevated, the GSH content was decreased, the fluorescent intensity of GPX4 was weakened, the relative expression levels of ACSL4 mRNA and protein were up-regulated, and the relative expression levels of GPX4 mRNA and protein were down-regulated in the HIRI group (all  $P<0.05$ ). Compared with the HIRI group, serum ALT and AST levels were down-regulated, liver tissue injury was alleviated, pathological score was decreased, mitochondrial shrinkage and crest breakage were mitigated, the contents of ROS, MDA and Fe were down-regulated, the GSH content was up-regulated, the fluorescent intensity of GPX4 was enhanced, the relative expression levels of ACSL4 mRNA and protein were down-regulated, and the relative expression levels of GPX4 mRNA and protein were up-regulated in the HIRI+UTI group (all  $P<0.05$ ). **Conclusions** Ulinastatin may alleviate hepatic ischemia-reperfusion injury in rats probably through inhibiting ferroptosis.

【Key words】 Ischemia-reperfusion injury; Liver transplantation; Ulinastatin; Ferroptosis; Glutathione peroxidase 4; Acyl-CoA synthetase long-chain family 4; Reactive oxygen species; Malondialdehyde

肝脏接受双重血液供应, 这使得它更容易受到缺血和缺氧的影响<sup>[1]</sup>。肝缺血-再灌注损伤是指在长时间缺血缺氧后, 由于器官和组织的血供恢复而引起的损伤, 是肝切除、肝移植等复杂手术后导致肝功能障碍

和肝衰竭的重要危险因素<sup>[2-4]</sup>。铁死亡是一种由脂质过氧化引起的铁依赖性细胞死亡形式, 其特征是活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 产生增加和脂质过氧化<sup>[5-6]</sup>。乌司他丁是一种存在于尿液中的尿胰

蛋白酶抑制剂,已被广泛用于治疗急性胰腺炎、败血性休克、器官衰竭等疾病<sup>[7]</sup>。近年来,乌司他丁被证明可以通过抑制足细胞 ROS 聚集来减轻铁死亡,从而缓解脂多糖诱导的急性肾损伤<sup>[8]</sup>。临床研究中已证实其能够有效减轻心脏、肝脏、肾脏、大脑和肺等器官的缺血-再灌注损伤<sup>[9-10]</sup>,但乌司他丁在肝缺血-再灌注损伤中的保护机制尚未明确。因此,本研究旨在通过建立大鼠肝缺血-再灌注损伤模型,探讨乌司他丁能否通过抑制铁死亡发挥对肝缺血-再灌注损伤的保护作用。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

1.1.1 试剂和器材 乌司他丁购自广东天普生化医药股份有限公司,谷胱甘肽过氧化酶 4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 抗体购自上海 Abmart 医药科技有限公司,酰基辅酶 A 合成酶长链家族 4 (acyl-CoA synthetase long-chain family 4, ACSL4) 抗体购自上海生工生物工程有限公司,甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司, Cy3 标记山羊抗兔 IgG、ROS 探针、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 试剂盒、电镜固定液购自武汉赛维尔生物科技有限公司,组织铁含量检测试剂盒、二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司,丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所,透射电镜购自日本 HITACHI 公司, Odessey 红外荧光扫描仪器购自美国 Licor 公司。

1.1.2 实验动物与分组 24 只雄性无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 级 SD 大鼠,体质量 200~220 g,购于广西医科大学实验动物中心。所有动物饲养于 SPF 级动物房,在适宜温度下维持 12 h 昼夜节律,自由进食水。实验经广西医科大学实验动物伦理委员会批准 (审批号: 202303131)。

按随机数字表法将 24 只大鼠随机平均分成 3 组,分别为假手术组 (Sham 组)、肝缺血-再灌注损伤组 (HIRI 组)、肝缺血-再灌注损伤组+乌司他丁预处理组 (HIRI+UTI 组),每组 8 只。采用异氟烷全麻后,中线切口打开腹腔,用微型腹部扩张器暴露肝

脏,然后用无创血管夹夹闭肝左叶和中叶的门静脉及肝动脉,使 70% 肝脏缺血,观察被夹闭的肝脏颜色变浅表明肝血管阻断成功。1 h 后松开血管夹,观察肝脏由白转红表明再灌注成功。假手术组不进行缺血-再灌注处理,仅开腹钝性分离血管。造模前 30 min, HIRI+UTI 组腹腔注射乌司他丁 (100 000 U/kg), Sham 组和 HIRI 组腹腔注射等量的生理盐水。手术结束后 6 h 处死大鼠,收集血清标本和肝组织进行后续实验。

### 1.2 研究内容与方 法

1.2.1 肝组织病理学检查 取各组大鼠肝脏,4% 多聚甲醛固定 24 h 后,常规石蜡包埋、切片、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色,显微镜下观察肝脏病理变化。病理学评分采用 Suzuki 评分, Suzuki 评分含肝窦淤血、肝细胞坏死和细胞质空泡化,每项指标损伤程度由轻到重以 0~4 计分。

1.2.2 肝功能检测 取大鼠下腔静脉血,4 ℃ 2 700×g 离心 15 min 后收集上清。根据 ALT 和 AST 测定试剂盒说明书进行操作,采用全自动分析仪,计算各样本 ALT、AST 水平。

1.2.3 肝组织 MDA、GSH、铁含量检测 将大鼠肝组织称重后,加入 9 倍体积预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 机械匀浆,制备成 10% 的匀浆液,3 150×g 离心 10 min 后取上清液待测。按照试剂盒说明书检测肝组织中 MDA、GSH、铁含量。

1.2.4 肝组织 ROS 水平检测 取各组大鼠肝脏冰冻切片,复温后加入自发荧光淬灭剂,然后将切片和 ROS 染液在 37 ℃ 下避光孵育 30 min。使用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 复染细胞核后在荧光显微镜下观察并采集图像。

1.2.5 透射电镜观察线粒体超微结构 各组大鼠取材后,迅速将肝脏切成 1 mm<sup>3</sup> 大小,然后立即置于 4 ℃ 电镜固定液内避光固定 2~4 h,缓冲液冲洗后投入 1% 锇酸固定液中室温固定 1~3 h,经漂洗、室温脱水、渗透包埋、切片后用醋酸铀、柠檬酸铅对切片进行双染,在透射电镜下观察线粒体结构,并采集图像分析。

1.2.6 聚合酶链反应检测肝组织 GPX4、ACSL4 的信使 RNA 表达 取大鼠肝脏组织,用 Trizol 试剂提取总 RNA 并逆转录为互补 DNA,后进行扩增。计算 GPX4、ACSL4 信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 的相对表达量。引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成,引物序列见表 1。

表 1 本实验所用基因的引物序列

Table 1 Primer sequences of genes in the experiment

基因名称	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')
GPX4	CCGACGTAAACTACACTCAGCTA	TCTTGATTACTTCCTGGCTCCTG
ACSL4	GCAGCACCTTCGATCCCA	GCGTGACAGAGCGATATGGA
GAPDH	AGACAGCCGCATCTTCTTGT	TACGGCCAAATCCGTTTACA

1.2.7 免疫荧光检测肝组织 GPX4 表达 取肝组织石蜡切片, 经脱蜡至水、抗原修复及封闭后, 加入 GPX4 抗体 (1:200) 4℃ 孵育过夜, 次日加 Cy3 标记山羊抗兔 IgG 室温孵育 1h。使用 DAPI 复染细胞核, 抗荧光淬灭封片剂封片后采用荧光显微镜观察并采集图像。

1.2.8 蛋白质印迹法检测蛋白表达 新鲜肝组织中加入蛋白裂解液提取总蛋白, 使用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 电泳转膜后, 使用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1h, 洗膜后 GPX4、ACSL4、GAPDH 一抗 4℃ 孵育过夜。次日洗涤后加入二抗室温摇床孵育 2h。使用 Odessey 红外荧光扫描仪扫描膜并显影, Image J 软件分析图像。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料用均数±标准差表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠肝组织病理学改变比较

Sham 组肝组织结构完整, 肝细胞排列致密、整齐, 肝窦呈放射状; HIRI 组肝小叶结构改变, 肝细胞变形、坏死, 门管区大量炎症细胞浸润, 肝血窦受

压严重变窄; HIRI+UTI 组肝脏充血肿胀, 肝细胞坏死数量减少, 周围炎症细胞浸润等病理改变较 HIRI 组减轻。Suzuki 评分显示, HIRI 组评分高于 Sham 组, HIRI+UTI 组评分低于 HIRI 组, 差异均有统计学意义 (均为  $P<0.05$ , 图 1)。

### 2.2 各组大鼠肝功能比较

与 Sham 组比较, HIRI 组 ALT 和 AST 水平升高; 与 HIRI 组比较, HIRI+UTI 组 ALT 和 AST 水平降低 (均为  $P<0.05$ , 图 2)。

### 2.3 各组大鼠肝细胞线粒体超微结构变化

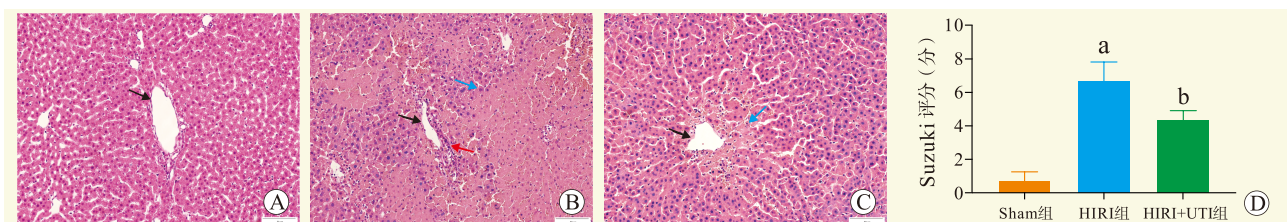
透射电镜下, Sham 组线粒体形态规则, 多呈圆形或椭圆形, 线粒体膜外形完整, 细胞核膜清晰; HIRI 组线粒体萎缩, 膜密度增加, 线粒体嵴断裂甚至消失; HIRI+UTI 组线粒体形态变化较 HIRI 组明显改善 (图 3)。

### 2.4 各组大鼠肝组织 MDA、GSH、铁含量比较

与 Sham 组比较, HIRI 组 MDA、铁含量升高, GSH 含量降低; 与 HIRI 组比较, HIRI+UTI 组 MDA、铁含量降低, GSH 含量升高 (均为  $P<0.05$ , 图 4)。

### 2.5 各组大鼠肝组织 ROS 表达比较

与 Sham 组比较, HIRI 组 ROS 水平升高; 与 HIRI 组比较, HIRI+UTI 组 ROS 水平降低 (均为  $P<0.05$ , 图 5)。



注: A~C 图分别为 Sham 组、HIRI 组、HIRI+UTI 组肝组织病理学检查, 黑色箭头示中央静脉, 红色箭头示炎症细胞浸润, 蓝色箭头示肝细胞坏死 (HE,  $\times 200$ ); D 图为病理学评分的比较, 与 Sham 组比较,  $^a P<0.05$ , 与 HIRI 组比较,  $^b P<0.05$ 。

图 1 各组大鼠肝组织病理学改变及评分比较

Figure 1 Comparison of histopathological changes and scores in liver tissues of rats among each group

### 2.6 各组大鼠肝组织中 GPX4、ACSL4 mRNA 表达水平比较

与 Sham 组比较, HIRI 组 GPX4 mRNA 相对表达量降低, ACSL4 mRNA 相对表达量升高; 与 HIRI 组比较, HIRI+UTI 组 GPX4 mRNA 相对表达量升高, ACSL4 mRNA 相对表达量降低 (均为  $P<0.05$ , 图 6)。

### 2.7 各组大鼠肝组织 GPX4 免疫荧光结果

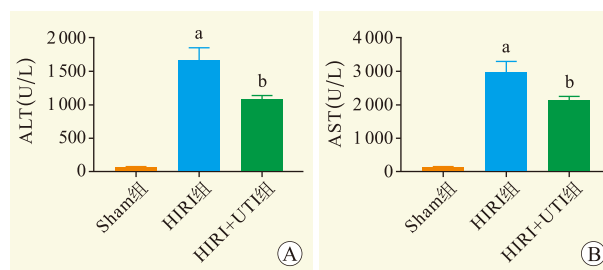
与 Sham 组比较, HIRI 组 GPX4 蛋白表达减少; 与 HIRI 组比较, HIRI+UTI 组 GPX4 蛋白表达增多 (均为  $P<0.05$ , 图 7)。

### 2.8 各组大鼠肝组织 GPX4、ACSL4 蛋白表达水平比较

与 Sham 组比较, HIRI 组 GPX4 蛋白相对表达量下降, ACSL4 蛋白相对表达量升高; 与 HIRI 组比较, HIRI+UTI 组 GPX4 蛋白相对表达量升高, ACSL4 蛋白相对表达量下降 (均为  $P<0.05$ , 图 8)。

## 3 讨论

肝缺血-再灌注损伤是肝供血中断引起并在再灌注后加重的病理状态, 是肝移植等肝脏手术中最致



注: A 图为各组大鼠血清 ALT 水平; B 图为各组大鼠血清 AST 水平。与 Sham 组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 HIRI 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ 。

图 2 各组大鼠血清 ALT 和 AST 的比较

Figure 2 Comparison of ALT and AST in serum of rats among each group

命的危险之一<sup>[11]</sup>。缺血-再灌注损伤的过程涉及一系列事件, 炎症和过量的 ROS 是导致细胞凋亡、组织损伤和器官功能障碍的最关键因素<sup>[12-13]</sup>。再灌注损伤主要来源于  $O_2$  重新进入缺血组织后产生的毒性 ROS, 这些 ROS 直接影响组织损伤, 并引发一系列有害的细胞反应, 导致炎症、细胞死亡和器官衰竭<sup>[14-17]</sup>。本研究结果显示, HIRI 组大鼠血清 ALT、AST 水平升高, 病理学染色结果显示肝组织出现大范围缺血灶, 肝细胞发生肿胀、变形及坏死, 提示阻

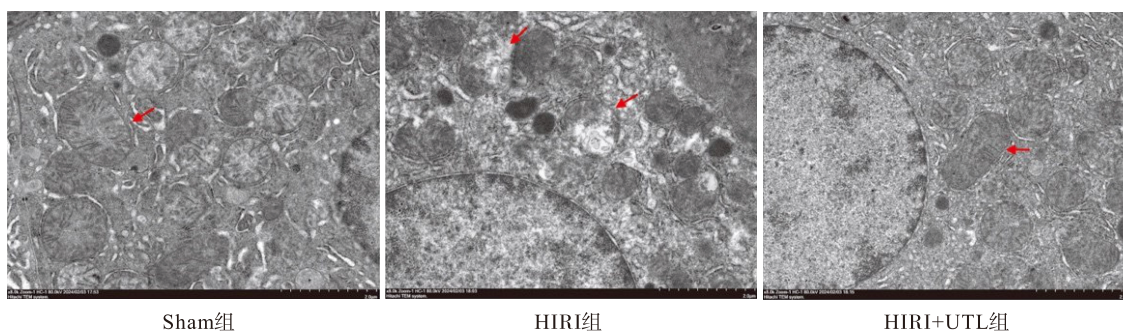
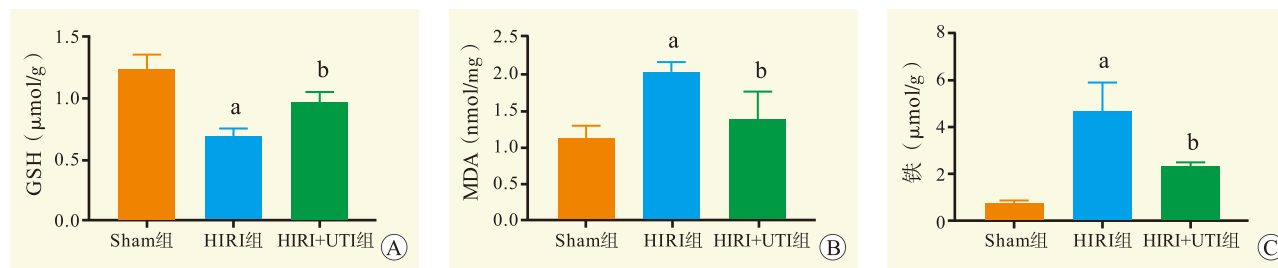


图 3 各组大鼠线粒体超微结构变化 ( $\times 8\ 000$ )

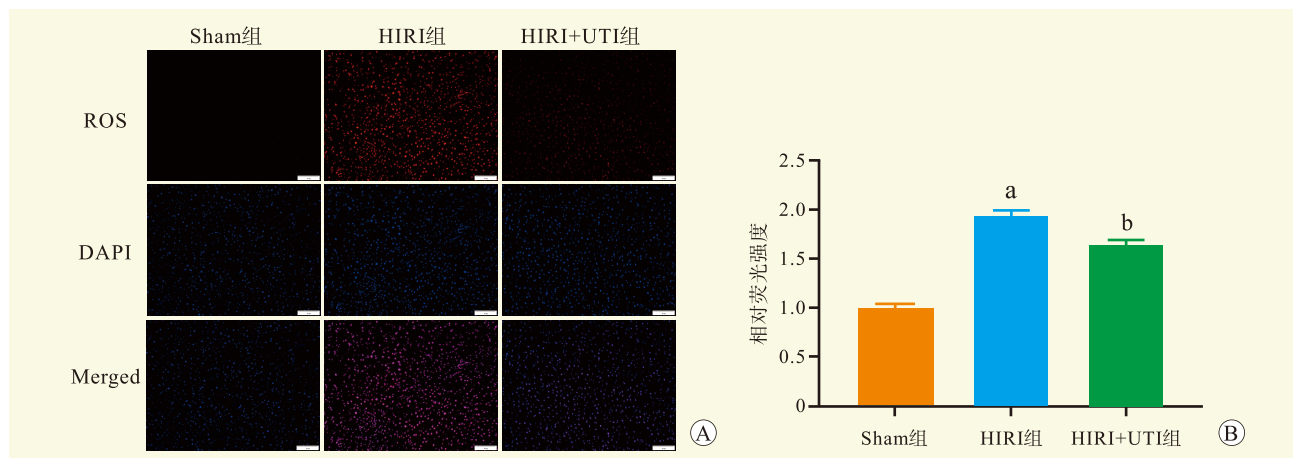
Figure 3 Changes of mitochondria ultrastructure of rats in each group



注: A 图为各组 GSH 比较; B 图为各组 MDA 比较; C 图为各组铁含量比较。与 Sham 组比较, <sup>a</sup> $P<0.05$ ; 与 HIRI 组比较, <sup>b</sup> $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠肝组织 MDA、GSH 和铁含量的比较

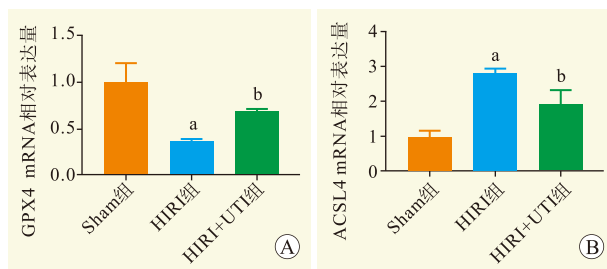
Figure 4 Comparison of MDA, GSH and iron levels in liver tissues of rats among each group



注: A 图为各组 ROS 表达情况 (免疫荧光,  $\times 200$ ); B 图为各组 ROS 相对荧光强度, 与 Sham 组比较,  $^a P < 0.05$ , 与 HIRI 组比较,  $^b P < 0.05$ 。

图 5 各组大鼠肝组织 ROS 的表达情况

Figure 5 Expression of ROS in liver tissues of rats in each group



注: A 图为各组 GPX4 mRNA 表达情况; B 图为 ACSL4 mRNA 表达情况。与 Sham 组比较,  $^a P < 0.05$ ; 与 HIRI 组比较,  $^b P < 0.05$ 。

图 6 各组大鼠肝组织 GPX4、ACSL4 mRNA 表达水平的比较

Figure 6 Comparison of expression levels of GPX4 and ACSL4 mRNA in liver tissues of rats among each group

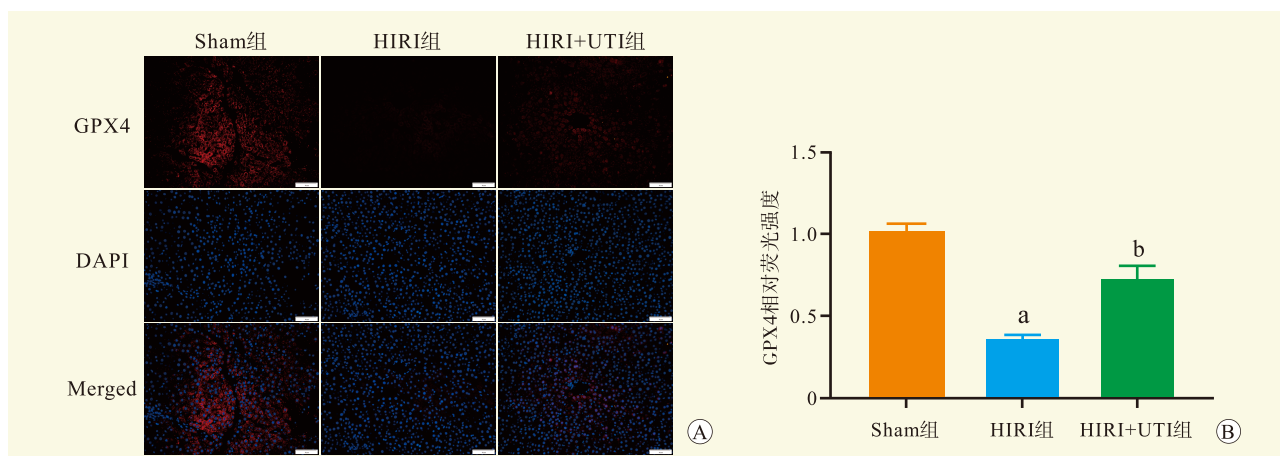
断肝动脉和门静脉后成功引起了肝缺血-再灌注损伤。且大鼠肝组织 ROS 水平显著升高, 与之前的研究结果一致<sup>[18-20]</sup>。

铁死亡是一种细胞死亡形式, 当铁代谢紊乱引起细胞内游离铁增多时, 催化产生大量 ROS, ROS 进一步促进脂质过氧化, 引起脂质过氧化物集聚, 破坏细胞内氧化还原平衡, 最终使细胞发生死亡<sup>[21]</sup>。铁死亡发生机制复杂, 线粒体缩小、嵴断裂或消失是铁死亡的典型形态学改变<sup>[22-23]</sup>。铁超载驱动的芬顿反应被认为是发生铁死亡的必要条件<sup>[5]</sup>。MDA 被认为是脂质过氧化的标志<sup>[24]</sup>。GSH 是细胞内重要的抗氧化剂, 也是 GPX4 重要的辅助因子, GSH 被 GPX4 利用以减轻脂质过氧化的发生, 从而抑制铁死亡的发

生<sup>[25-27]</sup>。GPX4 可以将细胞毒性脂质过氧化物转化为脂质醇, 减少 ROS 的产生, 被认为是铁死亡的重要调控因子<sup>[28-30]</sup>。ACSL4 通过促进磷脂过氧化导致铁死亡的发生, 是铁死亡激活的标志<sup>[31-33]</sup>。铁死亡与癌症、神经变性疾病和缺血-再灌注组织损伤密切相关<sup>[34-37]</sup>。本研究中, 阻断肝动脉和门静脉后, 肝脏的线粒体出现萎缩, 嵴断裂甚至消失, 伴随 ROS、MDA 和铁含量升高, GSH 含量降低, GPX4 蛋白表达减少, ACSL4 蛋白表达增多, 表明铁死亡在缺血-再灌注后肝脏损伤的机制中可能发挥着重要作用。

乌司他丁是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂, 目前广泛应用于临床<sup>[38-41]</sup>。研究表明乌司他丁可通过抑制机体内氧自由基的产生、激活肝细胞自噬、抑制细胞因子的产生和释放、抑制水解酶、稳定溶酶体膜、减轻肝脏组织过氧化反应, 从而减轻由缺血-再灌注造成的肝脏损伤<sup>[42-44]</sup>。本研究中, HIRI+UTI 组大鼠较 HIRI 组血清 ALT、AST 水平降低, 肝组织坏死减少, 表明乌司他丁对肝缺血-再灌注损伤具有保护作用, 与之前的研究结果一致<sup>[45-46]</sup>。且 HIRI+UTI 组大鼠肝组织中 ROS 水平、MDA 和铁含量下降, GSH 含量增加, GPX4 蛋白表达增多, ACSL4 蛋白表达减少, 表明乌司他丁是通过抑制铁死亡减轻了肝缺血-再灌注损伤。

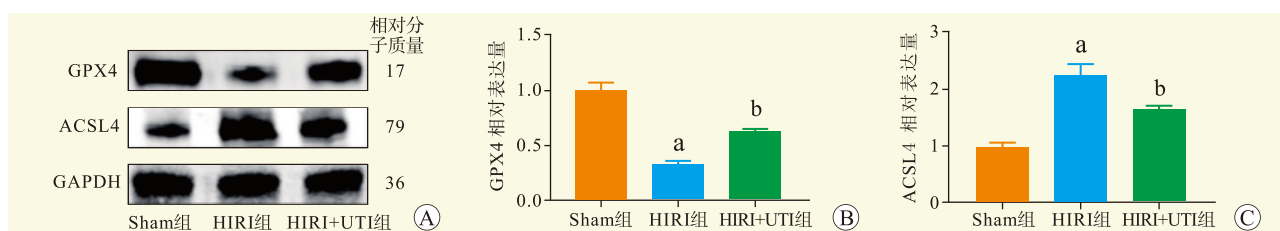
综上所述, 乌司他丁可通过减轻铁死亡, 对肝缺血-再灌注损伤发挥保护作用, 这可能成为未来治疗肝缺血-再灌注损伤的新靶点。



注：A 图为各组 GPX4 表达情况（免疫荧光，×200）；B 图为各组 GPX4 相对荧光强度，与 Sham 组比较，<sup>a</sup>*P*<0.05；与 HIRI 组比较，<sup>b</sup>*P*<0.05。

图 7 各组大鼠肝组织 GPX4 表达情况

Figure 7 Expression of GPX4 in liver tissues of rats in each group



注：A 图为各组大鼠肝组织的 GPX4、ACSL4 蛋白表达情况；B 图为 GPX4 蛋白相对表达量；C 图为 ACSL4 蛋白相对表达量。与 Sham 组比较，<sup>a</sup>*P*<0.05；与 HIRI 组比较，<sup>b</sup>*P*<0.05。

图 8 各组大鼠肝组织 GPX4、ACSL4 蛋白表达水平比较

Figure 8 Comparison of GPX4 and ACSL4 protein expression level in liver tissues of rats among each group

参考文献:

- [1] 王宇, 王民, 张冠华, 等. 循环系统疾病的肝脏表现[J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(4): 362-366. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20220318-00121.
- [2] CHULLO G, PANISELLO-ROSELLO A, MARQUEZ N, et al. Focusing on ischemic reperfusion injury in the new era of dynamic machine perfusion in liver transplantation[J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(2): 1117. DOI: 10.3390/ijms25021117.
- [3] 曾侯帅, 王运兵, 陈刘璇子, 等. Maresin 1 抑制核因子 κB/胱天蛋白酶-3/焦孔素 E 信号途径减轻肝脏缺血再灌注损伤[J]. 中华肝脏病杂志, 2023, 31(6): 594-600. DOI: 10.3760/cma.j.cn501113-20221208-00596.
- [4] 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.ijssu.2016.05.050.
- [5] JIANG X, STOCKWELL BR, CONRAD M. Ferroptosis: mechanisms, biology and role in disease[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2021, 22: 266-282. DOI: 10.1038/s41580-020-00324-8.
- [6] WANG B, WANG Y, ZHANG J, et al. ROS-induced lipid peroxidation modulates cell death outcome: mechanisms behind apoptosis, autophagy, and ferroptosis[J]. Arch Toxicol, 2023, 97(6): 1439-1451. DOI: 10.1007/s00204-023-03476-6.
- [7] MENG F, DU C, ZHANG Y, et al. Protective effect of rhubarb combined with ulinastatin for patients with sepsis[J]. Medicine, 2020, 99(7): e18895. DOI: 10.1097/MD.00000000000018895.
- [8] YANG X, GUO N. Ulinastatin ameliorates podocyte ferroptosis via regulating miR-144-3p/SLC7A11 axis in acute kidney injury[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2023, 59(9): 697-705. DOI: 10.1007/s11626-023-00814-x.
- [9] LI XF, ZHANG XJ, ZHANG C, et al. Ulinastatin

- protects brain against cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting MMP-9 and alleviating loss of ZO-1 and occludin proteins in mice[J]. *Exp Neurol*, 2018, 302: 68-74. DOI: 10.1016/j.expneurol.2017.12.016.
- [10] LIU L, LIU J, WANG J, et al. Ulinastatin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via Rho/ROCK signaling pathway[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2023, 69(15): 249-253. DOI: 10.14715/cmb/2023.69.15.41.
- [11] ZHAO Y, MAIN K, AUJLA T, et al. Necroptosis in organ transplantation: mechanisms and potential therapeutic targets[J]. *Cells*, 2023, 12(18): 2296. DOI: 10.3390/cells12182296.
- [12] G BARDALLO R, 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.
- [13] MAO XL, CAI Y, CHEN YH, et al. Novel targets and therapeutic strategies to protect against hepatic ischemia reperfusion injury[J]. *Front Med*, 2021, 8: 757336. DOI: 10.3389/fmed.2021.757336.
- [14] ZHANG M, LIU Q, MENG H, et al. Ischemia-reperfusion injury: molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 12. DOI: 10.1038/s41392-023-01688-x.
- [15] ELIAS-MIRÓ M, JIMÉNEZ-CASTRO M B, RODÉS J, et al. Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion[J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(8): 555-568. DOI: 10.3109/10715762.2013.811721.
- [16] XIANG Q, YI X, ZHU XH, et al. Regulated cell death in myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2024, 35(3): 219-234. DOI: 10.1016/j.tem.2023.10.010.
- [17] PERALTA C, JIMÉNEZ-CASTRO MB, GRACIA-SANCHO J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu[J]. *J Hepatol*, 2013, 59(5): 1094-1106. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.06.017.
- [18] NI D, WEI H, CHEN W, et al. Ceria nanoparticles meet hepatic ischemia-reperfusion injury: the perfect imperfection[J]. *Adv Mater*, 2019, 31(40): e1902956. DOI: 10.1002/adma.201902956.
- [19] SHA Z, YANG Y, LIU R, et al. Hepatic ischemia-reperfusion injury in mice was alleviated by Rac1 inhibition - more than just ROS-inhibition[J]. *J Clin Transl Hepatol*, 2022, 10(1): 42-52. DOI: 10.14218/JCTH.2021.00057.
- [20] ZHANG Y, WEI H, WANG M, et al. Dexmedetomidine alleviates ferroptosis following hepatic ischemia-reperfusion injury by upregulating Nrf2/GPx4-dependent antioxidant responses[J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 169: 115915. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.115915.
- [21] HASSANNIA B, VANDENABEELE P, VANDEN BERGHE T. Targeting ferroptosis to iron out cancer[J]. *Cancer Cell*, 2019, 35(6): 830-849. DOI: 10.1016/j.ccell.2019.04.002.
- [22] GAO M, YI J, ZHU J, et al. Role of mitochondria in ferroptosis[J]. *Mol Cell*, 2019, 73(2): 354-363. e3. DOI: 10.1016/j.molcel.2018.10.042.
- [23] ADEGBORO AG, AFOLABI IS. Molecular mechanisms of mitochondria-mediated ferroptosis: a potential target for antimalarial interventions[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2024, 12: 1374735. DOI: 10.3389/fcell.2024.1374735.
- [24] PARK MW, CHA HW, KIM J, et al. NOX4 promotes ferroptosis of astrocytes by oxidative stress-induced lipid peroxidation via the impairment of mitochondrial metabolism in Alzheimer's diseases[J]. *Redox Biol*, 2021, 41: 101947. DOI: 10.1016/j.redox.2021.101947.
- [25] WU J, WANG Y, JIANG R, et al. Ferroptosis in liver disease: new insights into disease mechanisms[J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7(1): 276. DOI: 10.1038/s41420-021-00660-4.
- [26] 张鹏飞, 章立华, 华东. Triapine 通过 ROS/GSH/GPx4 轴诱导 A549 细胞铁死亡[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(5): 833-838. DOI: 10.12360/CPB202204041.
- ZHANG PF, ZHANG LH, HUA D. Triapine induces ferroptosis via ROS/GSH/GPx4 axis in A549 cells[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2023, 39(5): 833-838. DOI: 10.12360/CPB202204041.
- [27] 刘玉倩, 杨雯茜, 王海涛. GSH/GPx4 介导的铁死亡通路在有氧运动预防自然衰老小鼠模型肝过氧化损伤中的作用[J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(12): 1581-1587. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.008.
- LIU YQ, YANG WQ, WANG HT. Role of the ferroptosis pathway mediated by GSH/GPx4 in preventing hepatocyte peroxidative injury following aerobic exercise in an elderly mouse model[J]. *Acta Lab Animalis Sci Sin*, 2023, 31(12): 1581-1587. DOI: 10.3969/j.issn.1005-4847.2023.12.008.
- [28] LUO L, MO G, HUANG D. Ferroptosis in hepatic ischemia-reperfusion injury: regulatory mechanisms and new methods for therapy[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 23(3): 225. DOI: 10.3892/mmr.2021.11864.
- [29] LIU Y, WAN Y, JIANG Y, et al. GPX4: the hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2023, 1878(3): 188890. DOI: 10.1016/j.bbcan.2023.188890.
- [30] FORCINA GC, DIXON SJ. GPX4 at the crossroads of lipid homeostasis and ferroptosis[J]. *Proteomics*, 2019, 19(18): e1800311. DOI: 10.1002/pmic.201800311.
- [31] DOLL S, PRONETH B, TYURINA YY, et al. ACSL4 dictates ferroptosis sensitivity by shaping cellular lipid composition[J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 91-98. DOI: 10.1038/nchembio.2239.
- [32] 刘燕. ACSL4 介导铁死亡与心血管疾病的研究进展[J]. *右江民族医学院学报*, 2023, 45(4): 666-670. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5817.2023.04.021.
- LIU Y. Research progress of ACSL4-mediated iron death and cardiovascular diseases[J]. *J Youjiang Med Univ Natl*, 2023, 45(4): 666-670. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5817.2023.04.021.
- [33] 谭璐璐, 方鑫富, 陈兴华. 亚低温通过影响 ACSL4 调节铁死亡改善脑缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *广东医学*, 2024, 45(5): 656-660. DOI: 10.13820/j.cnki.gdyx.20233125.
- TAN LL, FANG XF, CHEN XH. Progress in the study of

- mild hypothermia improving brain ischemia-reperfusion injury by regulating iron death via ACSL4[J]. *Guangdong Med J*, 2024, 45(5): 656-660. DOI: 10.13820/j.cnki.gdyx.20233125.
- [34] 刘思齐, 杨正飞. 铁死亡: 心肌缺血再灌注损伤分子机制和药物治疗研究新靶点[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(5): 712-719. DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0504.  
LIU SQ, YANG ZF. Ferroptosis: novel research targets of molecular mechanism and drug therapy for myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(5): 712-719. DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).2022.0504.
- [35] MAHONEY-SÁNCHEZ L, BOUCHAOU H, AYTUN S, et al. Ferroptosis and its potential role in the pathophysiology of Parkinson's disease[J]. *Prog Neurobiol*, 2021, 196: 101890. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2020.101890.
- [36] YAN HF, ZOU T, TUO QZ, et al. Ferroptosis: mechanisms and links with diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6(1): 49. DOI: 10.1038/s41392-020-00428-9.
- [37] LI D, WANG Y, DONG C, et al. CST1 inhibits ferroptosis and promotes gastric cancer metastasis by regulating GPX4 protein stability via OTUB1[J]. *Oncogene*, 2023, 42(2): 83-98. DOI: 10.1038/s41388-022-02537-x.
- [38] PARK SJ, PARK S, KANG SY, et al. The effect of ulinastatin on acute kidney injury in patients undergoing off-pump cardiac bypass surgery[J]. *J Cardiothorac Surg*, 2024, 19(1): 96. DOI: 10.1186/s13019-024-02562-9.
- [39] DIAN D, ZHANG W, LU M, et al. Clinical efficacy of ulinastatin combined with azithromycin in the treatment of severe pneumonia in children and the effects on inflammatory cytokines and oxidative stress: a retrospective cohort study[J]. *Infect Drug Resist*, 2023, 16: 7165-7174. DOI: 10.2147/IDR.S428900.
- [40] 周拓, 丁锋. 乌司他丁联合美罗培南治疗重症肺炎的效果分析[J]. *临床医学工程*, 2024, 31(4): 445-446. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4659.2024.04.0445.  
ZHOU T, DING F. Analysis on the effect of ulinastatin combined with meropenem in the treatment of severe pneumonia[J]. *Clin Med Eng*, 2024, 31(4): 445-446. DOI: 10.3969/j.issn.1674-4659.2024.04.0445.
- [41] 《乌司他丁用于临床常见急危重症的专家共识》专家组. 乌司他丁用于临床常见急危重症的专家共识[J]. *中国急救医学*, 2023, 43(6): 421-433. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2023.06.001.  
“Expert consensus on the application of ulinastatin in clinical common emergency and critical diseases” Expert Group. Expert consensus on the application of ulinastatin in clinical common emergency and critical diseases[J]. *Chin J Crit Care Med*, 2023, 43(6): 421-433. DOI: 10.3969/j.issn.1002-1949.2023.06.001.
- [42] MAO J, ZHANG L, SONG AL, et al. Effect of ulinastatin donor-pretreatment on liver graft during cold preservation in rats[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011, 124(4): 574-580.
- [43] 欧毅, 刘刚, 殷凤伟, 等. 乌司他丁联合右美托咪定对肝脏缺血再灌注损伤起保护作用: 基于 80 例肝癌合并肝硬化行腹腔镜肝切除术患者[J]. *南方医科大学学报*, 2022, 42(12): 1832-1838. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2022.12.11.  
OU Y, LIU G, YIN FW, et al. Protective effect of ulinastatin combined with dexmedetomidine against hepatic ischemia-reperfusion injury in laparoscopic hepatectomy for liver cancer and cirrhosis: a randomized controlled trial[J]. *J Southern Med Univ*, 2022, 42(12): 1832-1838. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2022.12.11.
- [44] ZHANG X, SU C, ZHAO S, et al. Combination therapy of ulinastatin with thrombomodulin alleviates endotoxin (LPS) - induced liver and kidney injury via inhibiting apoptosis, oxidative stress and HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(2): 2951-2970. DOI: 10.1080/21655979.2021.2024686.
- [45] ZHAO Y, CAI H, ZHOU P, et al. Protective effect of ulinastatin on hepatic ischemia reperfusion injury through autophagy activation in Chang liver cells[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14960-14970. DOI: 10.1002/jcb.28758.
- [46] TONG Y, TANG Z, YANG T, et al. Ulinastatin preconditioning attenuates inflammatory reaction of hepatic ischemia reperfusion injury in rats via high mobility group box 1(HMGB1) inhibition[J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(4): 337-343. DOI: 10.7150/ijms.7861.

(收稿日期: 2024-04-24)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)