

## 罗格列酮通过诱导 HO-1 减轻大鼠肝缺血再灌注损伤的作用机制

杨轶涵, 陈华梅, 方 育, 王玉鑫, 展 希  
(昆明医科大学第一附属医院麻醉科, 云南 昆明 650032)

**[摘要]** 目的 观察过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR- $\gamma$ ) 激动剂罗格列酮是否通过调控血红素加氧酶1(heme oxygenase 1, HO-1)活性来减轻大鼠肝缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)。方法 建立大鼠 70% 肝脏热缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)模型和缺氧缺糖/复氧复糖(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)诱导的大鼠肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs)损伤模型, 随机分为假手术组、模型组、罗格列酮预处理组和锌原卟啉(zinc protoporphyrin, ZnPP)组( $n=6$ )。全自动生化分析仪检测大鼠血清 ALT、AST 水平; HE 染色评估肝组织病理学损伤; Western blot 检测 PPAR- $\gamma$  和 HO-1 蛋白表达水平; CCK8 法测定 LSECs 的细胞活力, 流式细胞仪测定 LSECs 中活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量。结果 与 I/R 组相比, 罗格列酮预处理能显著降低肝 IRI 大鼠 ALT、AST 水平( $P<0.01$ ), 减少肝细胞凋亡并减轻肝组织 IRI ( $P<0.01$ )。Western blot 结果显示, 罗格列酮能上调 PPAR- $\gamma$  和 HO-1 蛋白的表达( $P<0.01$ )。此外, 罗格列酮预处理(10, 30  $\mu\text{mol/L}$ )能改善 OGD/R 诱导的 LSECs 存活率, 显著降低细胞 ROS 含量, 并呈剂量反应相关性( $P<0.01$ )。使用 ZnPP 阻断 HO-1 活性后, 罗格列酮对大鼠肝 IRI 的保护作用均消失。结论 罗格列酮通过上调 HO-1 活性介导抗氧化和抗炎作用, 减轻大鼠肝 IRI。

**[关键词]** 肝缺血再灌注损伤; PPAR- $\gamma$ ; HO-1; 肝窦内皮细胞

**[中图分类号]** R657.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095-610X(2024)07-0014-09

## Mechanism of Rosiglitazone in Reducing Liver Ischemia Reperfusion Injury in Rats by Inducing HO-1

YANG Yihan, CHEN Huamei, FANG Yu, WANG Yuxin, ZHAN Xi  
(Dept. of Anesthesiology, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University,  
Kunming Yunnan 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe whether rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR- $\gamma$ ) agonist, can attenuate hepatic ischemia-reperfusion injury (IRI) in rats by modulating heme oxygenase 1 (HO-1) activity. **Methods** A rat 70% hepatic thermal ischemia/reperfusion (I/R) model and hypoxia-glucose deprivation/reperfusion (OGD/R)-induced liver sinusoidal endothelial cells (LSECs) injury model in rats were established. The rats were randomly divided into sham operation group, model group, rosiglitazone pretreatment group and zinc protoporphyrin (ZnPP) group ( $n=6/\text{group}$ ). The serum ALT and AST levels of rats were detected by fully automatic biochemical analyzer. HE staining was used to assess liver histopathological injury. PPAR- $\gamma$  and HO-1 protein expression levels were detected by Western Blot. The cell viability of LSECs was determined by CCK8 method, and reactive oxygen species (ROS) content in LSECs was determined by flow cytometry. **Results** Compared with the I/R model group, rosiglitazone pretreatment significantly decreased ALT and AST levels, reduced liver cell apoptosis, and alleviated liver tissue IRI ( $P<0.01$ ). WB results showed that rosiglitazone upregulated the expression of PPAR- $\gamma$  and HO-1 protein ( $P<0.01$ ). In addition, compared with the OGD/R model group,

**[收稿日期]** 2024-03-15

**[基金项目]** 云南省科技厅-昆明医科大学应用基础研究联合专项基金资助项目(202001AY070001-041)

**[作者简介]** 杨轶涵(1997~), 女, 云南曲靖人, 医学硕士, 住院医师, 主要从事临床麻醉工作。

**[通信作者]** 展希, E-mail: 2489555365@qq.com

rosiglitazone pretreatment (10, 30  $\mu\text{mol/L}$ ) improved the survival rate of OGD/R-induced LSECs and significantly reduced the ROS content in cells in a dose-responsive manner ( $P < 0.01$ ). When ZnPP blocked HO-1 activity, the protective effect of rosiglitazone on hepatic IRI in rats disappeared. **Conclusion** Rosiglitazone can mediate antioxidant and anti-inflammatory effects through up-regulation of HO-1 activity and reduce hepatic IRI in rats.

[**Key words**] Hepatic ischemia reperfusion injury; PPAR- $\gamma$ ; HO-1; Liver sinusoidal endothelial cell

肝移植和肝切除是晚期肝脏相关疾病(如肝癌和肝硬化)患者唯一有效的治疗方法<sup>[1]</sup>, 而移植过程中的肝缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)引起的各种并发症是导致术后移植肝原发性无功能(primary non-function, PNF)甚至移植肝功能衰竭的主要原因<sup>[2]</sup>。因此, 如何减轻 IRI 是目前肝移植及器官保护的研究热点。肝 IRI 病理机制复杂, 涉及多种信号通路共同调控, 其主要包括缺血缺氧导致的肝脏细胞线粒体损伤、库弗细胞活化产生过量活性氧(reactive oxygen species, ROS)阶段; 再灌注时中性粒细胞浸润、细胞因子和趋化因子产生造成的免疫炎症级联反应和肝微循环障碍等阶段<sup>[3-4]</sup>。虽然很多研究在动物实验中取得了一些令人振奋的结论, 但仍存在很多不确定的因素, 在临床研究中缺乏大规模的应用和显著的阳性数据的支持, 难以在临床治疗中广泛推广。因此, 寻找新型的抗缺血再灌注损伤的药物是进一步研究的热点。

罗格列酮(rosiglitazone, RSG)是过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR- $\gamma$ ) 的 1 种激动剂, PPAR- $\gamma$  是核受体家族的一部分。在正常情况下, 参与机体生理上的脂质和葡萄糖代谢<sup>[5]</sup>, 临床上常被用作治疗糖尿病和胰岛素抵抗。近年来发现其在器官缺血再灌注疾病中具有保护作用<sup>[6]</sup>。然而, PPAR- $\gamma$  及其激动剂在肝 IRI 中的研究较少, 其防治肝 IRI 的机制及下游靶点也尚不清楚。血红素加氧酶(heme oxygenase 1, HO-1)已被证明是机体重要的内源性细胞保护酶, 具有抗氧化应激、抗炎、调节细胞周期和维持微循环等作用, 也是肝脏 IRI 应激时细胞保护的重要组成部分<sup>[7]</sup>。此外, HO-1 有助于维持肝窦内皮细胞(liver sinusoidal endothelial cells, LSECs)正常结构和功能<sup>[8]</sup>, 促进肝切除术后 LSECs 增殖以重建肝窦微循环, 提高肝细胞代谢和增殖, 从而维持正常肝脏功能<sup>[9]</sup>。已有多项研究表明 HO-1 是 PPAR- $\gamma$  通过过氧化物酶体增殖物反应元件调控的直接靶基因, PPAR- $\gamma$  激活可上调 HO-1 表达减轻内皮细胞炎症反应和抗增殖作用, PPAR- $\gamma$  激活后可通过

HO-1 减轻大鼠的炎症性疼痛、减少脑 IRI 时海马细胞凋亡和改善动脉粥样硬化等疾病<sup>[10-11]</sup>, 而目前关于 PPAR- $\gamma$  激动剂是否通过调控 PPAR- $\gamma$ /HO-1 信号通路在肝脏 IRI 中起保护作用还未见相关报道。因此, 笔者推测 PPAR- $\gamma$ /HO-1 信号通路可能是罗格列酮减轻肝脏 IRI 的潜在药物靶点。

本研究将建立大鼠 70% 肝缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)模型和缺氧缺糖/复氧复糖(oxygen-glucose deprivation/reperfusion, OGD/R)诱导的 LSECs 损伤模型, 给予 PPAR- $\gamma$  激动剂罗格列酮预处理, 从动物水平和细胞水平探索罗格列酮对肝脏 IRI 的保护作用及其潜在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与细胞

SPF 级, 雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠, 6~8 周龄, 体重 220~250 g。大鼠由昆明医科大学实验动物学部提供, 在正式实验前让大鼠适应 1 周, 自由摄食和饮水, 12 h 照明。本研究已通过昆明医科大学伦理委员会批准进行实验动物相关操作(kmmu20221615)。

大鼠原代肝窦内皮细胞购自武汉普诺赛生命科技公司, 该细胞是基于肝胶原酶灌注和免疫磁选方法分离出的大鼠原代 LSECs。LSECs 培养在含 10% 胎牛血清(FBS), 1% 青链霉素, 1% 谷氨酰胺和 1% 内皮细胞生长因子的 DMEM 中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$  和 5%  $\text{CO}_2$  条件下培养。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 药液配制** (1)罗格列酮溶液: 将罗格列酮用 0.9% 生理盐水进行充分溶解混匀, 配制成浓度为 1 mg/mL 的混悬液, 药液为现用现配; (2) 锌原卟啉溶液: 称取锌原卟啉 100 mg, 用 0.2M 氢氧化钠溶液 10 mL 溶解, 再用 0.2M 稀盐酸调整 pH 至 7.4, 然后用 0.9% 生理盐水溶液稀释至 20 mL, 浓度为 5 mg/mL, 颜色为暗褐色。

**1.2.2 I/R 模型建立及实验分组** 根据 Lhuillier 等<sup>[12]</sup> 方法建立大鼠 70% 肝脏热缺血再灌注(I/R)

模型, 热缺血时间为 45 min, 再灌注 6 h 后处死大鼠, 取血清和肝组织进行后续实验。将大鼠随机分成 4 组, 每组 6 只: (1) 假手术组 (Sham 组): 开腹后仅分离出大鼠肝动脉及门静脉, 未进行阻断, 其余操作同手术组; (2) 缺血再灌注损伤模型组 (I/R 组): 术前 24 h、1 h 腹腔注射生理盐水, 后进行大鼠 70% 肝脏热 I/R 模型操作; (3) 罗格列酮+缺血再灌注损伤组 (RSG+ I/R 组): 术前 24 h、1 h 给予罗格列酮 3 mg/kg 腹腔注射处理, 后进行大鼠 70% 肝脏热 I/R 模型操作; (4) 锌原卟啉+罗格列酮+缺血再灌注损伤组 (ZnPP+ RSG+ I/R 组): 术前 24 h、1 h 给予罗格列酮 3 mg/kg 腹腔注射处理, 术前 30 min 腹腔注射锌原卟啉 20 mg/kg。

**1.2.3 细胞 OGD/R 模型建立及分组** LSECs 在低氧 (94% N<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 1% O<sub>2</sub>) 条件下的无糖培养基中培养 12 h, 然后在常氧 (95% 空气, 5% CO<sub>2</sub>) 条件下的完全培养基中培养 12 h。

(1) 正常对照组: 在完全培养基中培养, 有氧培养 12 h 后再换完全培养基, 继续有氧培养 12 h; (2) OGD/R 模型组: 采用 OGD/R 模型体外模拟细胞的缺血再灌注损伤, 将细胞的完全培养基换成无糖培养基, 无氧培养 12 h 后再换成完全培养基, 继续有氧培养 12 h; (3) 低浓度罗格列酮 (RSG: 5 μmol/L)+ OGD/R 模型组: 给予 5 μmol/L 罗格列酮药物预处理细胞 1 h 后, 再进行 OGD/R 处理; (4) 中浓度罗格列酮 (RSG: 10 μmol/L)+ OGD/R 模型组: 给予 10 μmol/L 罗格列酮药物预处理细胞 1 h 后, 再进行 OGD/R 处理; (5) 高浓度罗格列酮 (RSG: 30 μmol/L)+ OGD/R 模型组: 给予 30 μmol/L 罗格列酮药物预处理细胞 1 h 后, 再进行 OGD/R 处理。

### 1.3 观察指标

**1.3.1 肝功能酶学测定** 通过全自动生化分析仪 (Roche, Germany) 测定血清丙氨酸转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 水平, 评估肝损伤程度。

**1.3.2 HE 染色及损伤病理评分** 用 4% 多聚甲醛固定肝组织石蜡包埋切片, 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色, 在光学显微镜 (Olympus, Japan) 下进行观察评估, 采用 Suzuki's 标准评分从肝组织淤血、空泡化、坏死程度 3 个方面来评估肝损伤情况。

**1.3.3 TUNEL 法检测肝细胞凋亡** 根据 TUNEL 凋亡检测试剂盒说明书进行检测。每组随机选择

3 张切片的视野 (×400)。观察并记录每个视野中凋亡细胞的个数。

**1.3.4 Western blot 检测肝组织 PPAR-γ 和 HO-1 蛋白表达** 用 RIPA 裂解液 (含 30 μl 蛋白酶抑制剂) 从肝组织提取全蛋白, BCA 法蛋白定量后, 10% SDS-PAGE 电泳分离, 转移至 PVDF 膜, 用 5% 牛血清白蛋白封闭。然后用 TBST 缓冲液按 1:2000 比例稀释的 HO-1 抗体和 β-actin 抗体、1:1000 比例稀释 PPAR-γ 抗体, 4 °C 孵育过夜, 洗涤后加入用 TBST 缓冲液按照 1:2000 的比例稀释的二抗, 室温下摇动孵育 2 h。采用美国 Bio-rad 公司化学发光成像仪对 Western blot 结果进行扫描分析。用 ImageJ 软件进行免疫印迹灰度值的定量分析。PPAR-γ 和 HO-1 蛋白的相对表达量的结果以检测蛋白与 β-actin 吸光度值的比值表示。

**1.3.5 CCK-8 法测定 LSECs 细胞活力** 根据 cell counting kit-8 (CCK-8) 试剂盒说明书进行操作, 评价罗格列酮对 LSECs 细胞活力的影响。

### 1.3.6 流式细胞仪检测 LSECs 细胞中 ROS 水平

使用含有荧光探针 2, 7-二氯荧光素二乙酸钠 (dichloride fluorescein diacetate, DCFH-DA) 的 ROS 测定试剂盒检测细胞内 ROS 含量。在细胞给药和造模处理完成后, 用 0.25% 胰酶消化, 离心后收集细胞, 将细胞接种于 6 孔板上, 用 PBS 洗涤细胞 2 次, 然后加入 1 mL DCFH-DA (溶于 0.1% 的无血清培养液中) 与细胞混合, 在 37 °C 下孵育 30 min。然后用 PBS 洗涤细胞 2 次, 弃上清后再用 1 mL PBS 重悬, 通过流式细胞仪检测二氯荧光素 (dichlorofluorescein, DCF) 的荧光强度, 得到 ROS 阳性细胞的百分比。

### 1.4 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析, 结果表示为均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ )。采用多组单因素方差分析 (ANOVA) 进行结果数据的比较, 两两比较采用 LSD 检验方法。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 罗格列酮预处理减轻 I/R 诱导的肝损伤

与假手术组相比, I/R 模型组大鼠血清 ALT 和 AST 活性显著增高 (P < 0.01)。与 I/R 组相比, 罗格列酮预处理能有效抑制血清 ALT 和 AST 活性升高 (P < 0.05), 见图 1A、图 1B。与罗格列酮组

相比, 锌原卟啉组的血清 ALT、AST 活性升高 ( $P < 0.01$ )。HE 染色结果显示, I/R 组肝组织表现为肝板排列紊乱, 肝窦充血, 可见空泡形成、炎性细胞和淋巴细胞浸润, 肝细胞坏死严重。罗格列酮组的病理变化减轻。锌原卟啉组的大鼠则显示出比罗格列酮组更严重的肝损伤, 肝细胞坏死面积增加, 见图 1C。组织病理学 Suzuki 评分进一步证实了这一观察结果, 见图 1D。总之, 从

ALT 和 AST 水平、肝细胞坏死程度以及组织病理学评分来看, 罗格列酮可以减轻 I/R 诱导的肝损伤。

## 2.2 罗格列酮预处理抑制了 I/R 诱导的细胞凋亡

广泛的细胞凋亡是肝 IRI 的 1 个重要现象。肝脏的 TUNEL 染色结果显示, I/R 模型组中 TUNEL 阳性细胞的数量显著增多, 见图 2B。然而, 罗格列酮预处理组的凋亡细胞减少 ( $P < 0.01$ )。表明罗格列酮可显著减轻 I/R 大鼠的肝细胞凋亡。

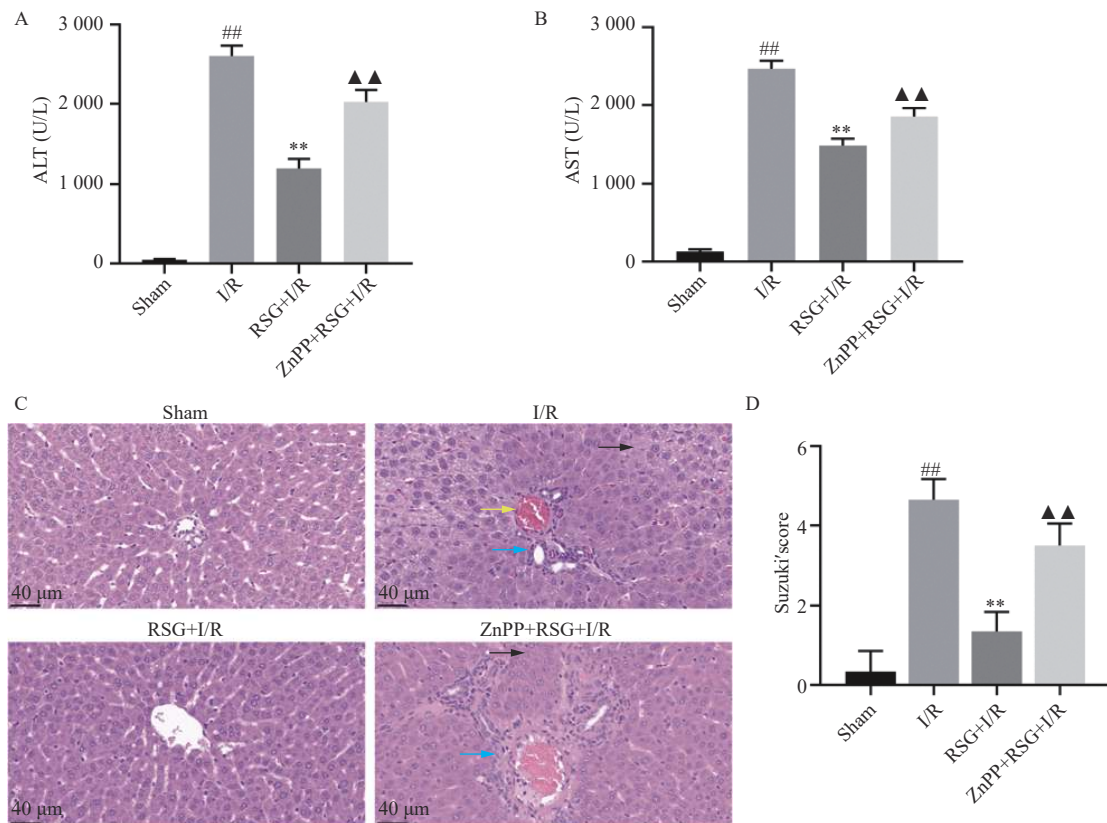


图 1 罗格列酮对 I/R 诱导的肝损伤的影响

Fig. 1 Effect of rosiglitazone on I/R-induced liver injury

A: 各组大鼠血清中 ALT 水平; B: 各组大鼠血清中 AST 水平; C: 大鼠肝脏 HE 染色 ( $\times 400$ ),  $\blackleftarrow$  表示坏死的肝细胞;  $\blackrightarrow$  代表炎细胞或免疫细胞浸润;  $\blacktriangleleft$  代表淤血; D: 肝组织病理 Suzuki 标准评分统计图, 与假手术组比较,  $^{##}P < 0.01$ ; 与 I/R 组比较,  $^{**}P < 0.01$ ; 与罗格列酮组比较,  $^{▲▲}P < 0.01$ 。

## 2.3 罗格列酮对肝 IRI 大鼠 PPAR- $\gamma$ 和 HO-1 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, I/R 模型组 PPAR- $\gamma$ 、HO-1 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.01$ )。与 I/R 组相比, 罗格列酮预处理组可显著增加 PPAR- $\gamma$  和 HO-1 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ); 与罗格列酮组相比, 给予 HO-1 抑制剂锌原卟啉后, PPAR- $\gamma$  和 HO-1 蛋白表达均降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 3。

## 2.4 罗格列酮对 OGD/R 诱导的 LSECs 细胞活力的影响

采用 CCK-8 法观察罗格列酮对 OGD/R 诱导的 LSECs 细胞活力的影响。与对照组相比, 暴露于 OGD/R

条件下的 LSECs 细胞活力显著降低 ( $P < 0.01$ )。当预先加入罗格列酮 (10, 30  $\mu\text{mol/L}$ ) 一起培养时, 与模型组相比, 细胞存活力显著提高 ( $P < 0.01$ ), 尤其在给予 30  $\mu\text{mol/L}$  罗格列酮时 LSECs 的细胞活力达到最高, 见图 4, 故笔者采用了 30  $\mu\text{mol/L}$  的罗格列酮作为后续细胞实验锌原卟啉组中的罗格列酮浓度, 表明罗格列酮能减轻 OGD/R 诱导的 LSECs 损伤。

## 2.5 罗格列酮对 OGD/R 诱导的 LSECs 中 ROS 的影响

与正常对照组相比, OGD/R 组显著增加了 LSECs 中的荧光强度, 即增加了细胞中 ROS 的含量 ( $P < 0.01$ ); 与 OGD/R 模型组相比, 罗格列酮

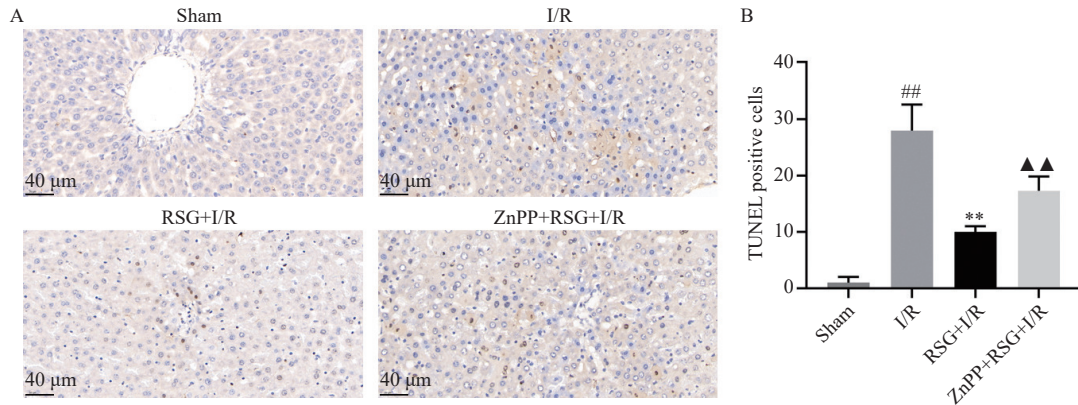


图 2 罗格列酮对大鼠 IRI 肝脏中 TUNEL 表达的影响

Fig. 2 Effect of rosiglitazone on TUNEL expression in rat IRI liver

A: 大鼠肝组织 TUNEL 染色图( $\times 400$ ); B: 大鼠肝组织中 TUNEL 阳性细胞数统计图。与假手术组比较,  $###P < 0.01$ ; 与 I/R 模型组比较,  $**P < 0.01$ ; 与罗格列酮组比较,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

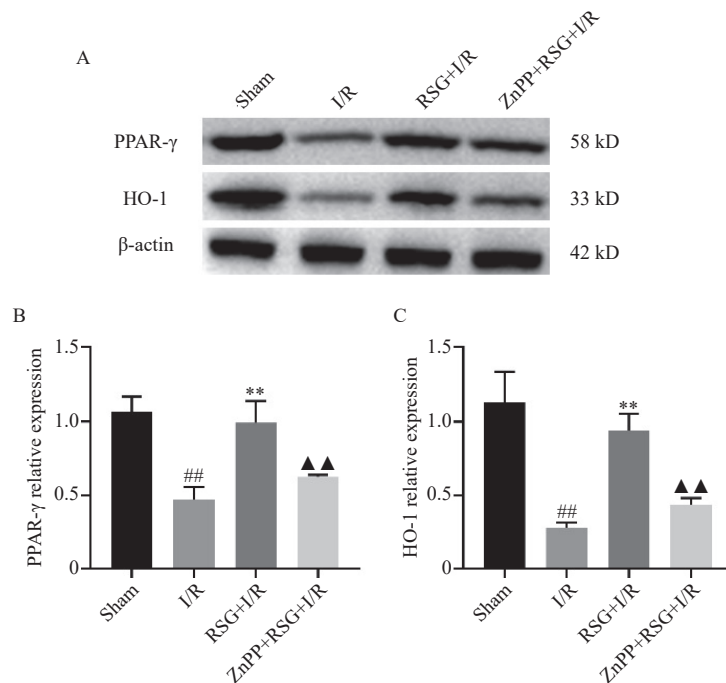


图 3 罗格列酮对大鼠 IRI 肝脏中 PPAR- $\gamma$  和 HO-1 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of rosiglitazone on the expression of PPAR- $\gamma$  and HO-1 proteins in the liver of rat IRI

A: 肝组织中 PPAR- $\gamma$ 、HO-1 蛋白表达条带图; B: 肝组织中 PPAR- $\gamma$  蛋白表达统计图; C: 肝组织中 HO-1 蛋白表达统计图。与假手术组比较,  $##P < 0.05$ ; 与 I/R 模型组比较,  $**P < 0.01$ ; 与罗格列酮组比较,  $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ 。

预处理(5、10、30  $\mu\text{mol/L}$ )组细胞中的 ROS 产生显著减少( $P < 0.01$ )。锌原卟啉处理组与高剂量罗格列酮组相比, LSECs 中的 ROS 含量显著增加( $P < 0.01$ ), 见图 5。

### 3 讨论

肝 IRI 是肝移植、肝部分切除术、创伤和低血容量性休克中的常见的 1 个病理生理过程, 也是导致肝移植术后肝脏原发性无功能甚至移植肝

功能衰竭的主要原因<sup>[13]</sup>。因此, 如何减轻肝脏 IRI 是目前肝移植及器官保护的研究热点。本研究发 现罗格列酮可以抑制免疫炎性细胞浸润肝脏, 减少肝细胞凋亡, 明显改善大鼠肝脏 IRI。此外, 由于在肝缺血再灌注激发的 LSECs 受损是引发一系列细胞级联反应和肝微循环障碍的重要诱导因素之一, 故维持正常的 LSECs 结构和功能对于减轻肝 IRI 非常重要。笔者的研究发现, 罗格列酮能提高 OGD/R 诱导的 LSECs 活力, 减少 LSECs 中氧化应激产物 ROS 的产生, 改善 OGD/R 诱导

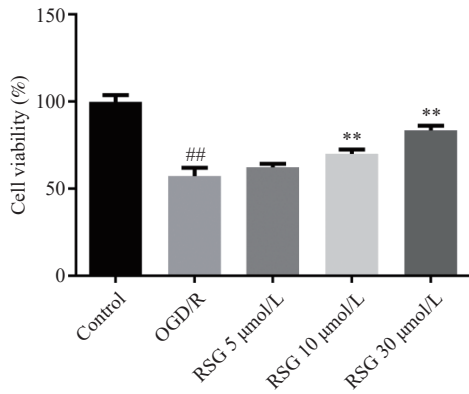


图 4 罗格列酮对 LSECs 细胞活力的影响

Fig. 4 Effect of rosiglitazone on the viability of LSECs cells with normal control group, ## $P < 0.01$ ; with OGD/R model group, \*\* $P < 0.01$ .

的 LSECs 损伤。而罗格列酮对肝 IRI 中肝脏和 LSECs 保护作用的分子机制可能与激活 PPAR- $\gamma$  后 HO-1 活性上调有关。

### 3.1 PPAR- $\gamma$ 激动剂罗格列酮预处理可通过抗炎、抗氧化减轻肝 IRI

过量 ROS 产生、免疫炎症反应和微循环障碍是导致肝 IRI 的关键病理机制<sup>[14]</sup>。罗格列酮作为 PPAR- $\gamma$  的 1 种激动剂, 其抗炎和抗氧化作用已被证实可改善多种器官 IRI, 包括心血管、脑、肾等<sup>[15-16]</sup>。PPAR- $\gamma$  激活后还具有促进血管生成和减少内皮功能障碍等作用<sup>[17]</sup>。另外, LSECs 被认为是肝移植中冷缺血再灌注损伤的早期靶点, LSECs 损伤可导致再灌注后肝脏微循环障碍, 加重移植后肝脏原发性无功能或原发性功能受损的

发展严重<sup>[18-19]</sup>。笔者发现罗格列酮预处理以剂量依赖性的方式减少了 OGD/R 诱导损伤的 LSECs 中 ROS 产生, 从而减轻了 OGD/R 诱导的 LSECs 氧化应激损伤。这些结果表明 PPAR- $\gamma$  的激活在调节内皮细胞的抗氧化作用具有重要意义, 能减轻肝脏缺血再灌注时 LSECs 的氧化损伤。在适当水平上, ROS 在调节各种生理功能(包括炎症反应)中起关键信号分子的作用。然而, 在过量水平下, ROS 发挥毒性作用, 直接氧化生物大分子, 如蛋白质、核酸和脂质, 进一步加剧炎症反应的发展, 并导致各种炎症疾病<sup>[20]</sup>。已有多项研究表明, PPAR- $\gamma$  激动剂在激活 PPAR- $\gamma$  后作用于炎症信号转导通路的多个环节, 如抑制 NF- $\kappa$ B/TLR4 炎症信号通路、调节库普弗细胞促炎表型等, 可以减轻肝脏疾病中的炎症反应和肝细胞凋亡<sup>[21-22]</sup>。这与本研究结果一致, 因此笔者认为罗格列酮在激活 PPAR- $\gamma$  后, 可以通过减少肝组织中免疫炎性细胞浸润, 减少肝细胞凋亡, 从而减轻肝 IRI。同时, 罗格列酮还能调节内皮细胞的抗氧化作用, 抑制 LSECs 中 ROS 的释放, 从而改善肝 IRI 中 LSECs 损伤。

### 3.2 罗格列酮预处理对肝 IRI 中肝组织和 LSECs 的保护作用依赖于 HO-1

HO-1 是机体重要的内源性细胞保护酶, 也是肝脏 IRI 应激时细胞保护机制的重要组成部分<sup>[23]</sup>。笔者先前的研究表明 HO-1 可以通过抑制 CD3<sup>+</sup>和 CD45R<sup>+</sup>淋巴细胞浸润从而抑制 IRI 引发的肝脏和胆管炎症<sup>[24]</sup>。Qu 等<sup>[25]</sup> 研究也表明, HO-

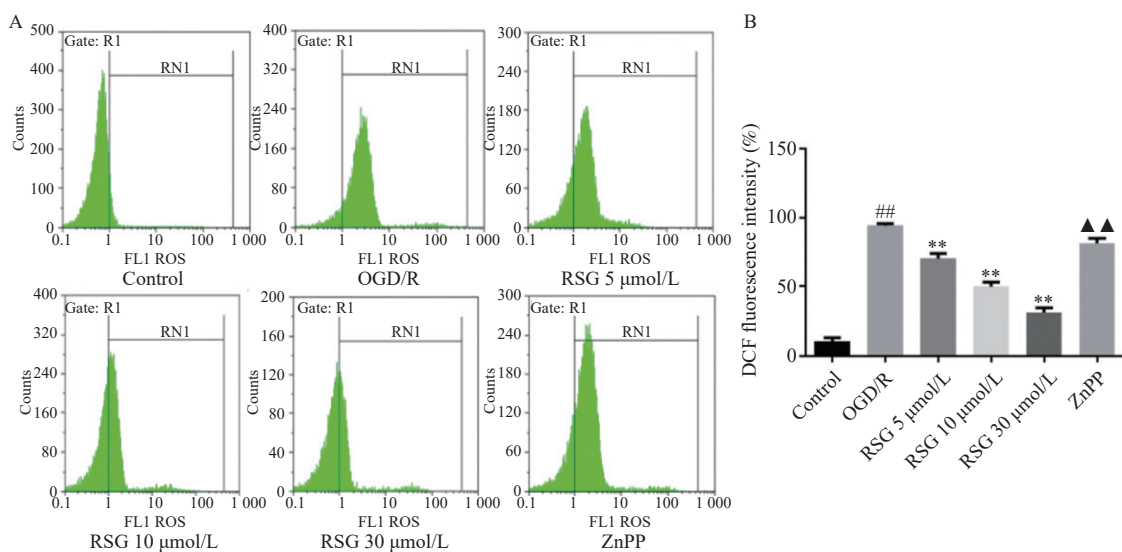


图 5 LSECs 中的 ROS 含量检测结果

Fig. 5 ROS content detection results in LSECs

A: 流式细胞仪检测各组 LSECs 中 ROS 含量结果图; B: 各组 LSECs 中 DCF 荧光强度统计图, 与正常对照组比较, ## $P < 0.01$ ; 与 OGD/R 模型组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与高剂量罗格列酮组比较, ▲▲ $P < 0.01$ 。

1 上调可增强缺氧/复氧诱导损伤的 LSECs 细胞活性, 抑制促炎细胞因子的释放来减轻 LSECs 损伤。综上, HO-1 目前已被认为是肝脏 IRI 的保护因子, 并能通过多种机制发挥抗氧化、抗炎和保护内皮细胞作用。此外, 多项研究表明, PPAR- $\gamma$  激活后能以时间和浓度依赖性诱导 HO-1 蛋白表达, 减轻了脂多糖诱导的肺部炎症和内皮祖细胞的氧化反应, 从而促进损伤动脉内皮修复<sup>[26-27]</sup>。人参皂苷 Rg1 能通过激活大鼠脑 IRI 海马中的 PPAR- $\gamma$ /HO-1 通路来抑制炎症和神经元凋亡<sup>[28]</sup>。但目前关于罗格列酮是否通过调控 PPAR- $\gamma$ /HO-1 信号通路在肝脏 IRI 中起保护作用至今未见相关报道。故为了进一步探索在肝 IRI 中 PPAR- $\gamma$  的潜在下游靶点, 笔者将研究重点放在 HO-1 蛋白上。

本研究结果显示在给予 HO-1 抑制剂 ZnPP 后肝细胞凋亡和坏死加重, 罗格列酮对大鼠 IRI 中肝脏组织和 LSECs 的保护作用消失。此外, 笔者发现无论是抑制大鼠肝组织中免疫炎细胞浸润还是减少 LSECs 中氧化应激产物的产生, 罗格列酮的这种抗炎和抗氧化作用均会被 HO-1 抑制剂 ZnPP 所抵消。由此可见, 罗格列酮激活 PPAR- $\gamma$  后对肝 IRI 中造成的组织损伤和血管内皮细胞损伤的保护作用可能是通过其下游靶基因 HO-1 通路来实现的。同时, 笔者还发现与罗格列酮组相比, ZnPP 组 IRI 肝脏中 PPAR- $\gamma$  和 HO-1 蛋白表达显著减少, 说明 ZnPP 有效地阻断了 HO-1 酶活性的同时也抑制了罗格列酮增加 PPAR- $\gamma$  表达。然而, HO-1 影响 PPAR- $\gamma$  活性的相关研究较少, 特别是在肝 IRI 中 HO-1 对 PPAR- $\gamma$  的影响尚不清楚。Yang 等<sup>[29]</sup>的研究发现, HO-1 会影响 PPAR- $\gamma$  的表达从而抑制肝星状细胞的增殖和激活, 改善肝纤维化。Jang 等<sup>[30]</sup>将 HO-1 基因和诱导 HO-1 表达的核转录因子 2 基因敲除后, 发现 PPAR- $\gamma$  激动剂诱导的细胞保护作用因 HO-1 活性下调而被抑制, 并且抑制了 PPAR- $\gamma$  激动剂对 PPAR- $\gamma$  的激活, 促进了乳腺癌细胞的侵袭, 这与我们的研究结果一致。由此, 笔者认为 HO-1 和 PPAR- $\gamma$  因子之间可能存在交叉作用, PPAR- $\gamma$  可以通过过氧化物酶体增殖物反应元件调节其直接靶基因 HO-1, 而 HO-1 启动子区的基因多态性又对 PPAR- $\gamma$  亚型的转录活性有影响。另外, 由于肝 IRI 的发生较为复杂, 是多条信号通路及多种因子相互作用的结果, 也体现了 PPAR- $\gamma$ /HO-1 信号通路在发挥抗氧化和抗炎作用时的器官和细胞差异性。总之, 本研究发现 PPAR- $\gamma$

与 HO-1 之间并非简单的上下游靶分子的关系, 二者可能存在双向调控作用。

综上所述, 罗格列酮作为 PPAR- $\gamma$  的特异性激动剂, 可减少氧化应激反应和炎症反应, 进而减少肝细胞和 LSECs 凋亡或死亡, 减轻大鼠肝 IRI。激活 PPAR- $\gamma$  后 HO-1 活性上调可能是罗格列酮发挥肝 IRI 保护作用的机制之一。本研究为罗格列酮防治肝 IRI 在临床上的应用提供了更充分的理论依据。然而, 本研究还具有一定的局限性。笔者研究结果显示 PPAR- $\gamma$  与 HO-1 之间可能存在双向调控关系, 但本实验目前还未能证明 PPAR- $\gamma$  与 HO-1 信号通路之间相互作用的机制, 需在后面实验中引入 PPAR- $\gamma$  特异性拮抗剂 GW9662 及 HO-1 激活剂血红素或采用基因敲除或过表达技术的动物模型作为对照, 进一步阐明罗格列酮激活 PPAR- $\gamma$  和 HO-1 后保护肝脏 IRI 的具体机制。

#### [参考文献]

- [1] Ling S, Jiang G, Que Q, et al. Liver transplantation in patients with liver Failure: Twenty years of experience from China[J]. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*, 2022, 42(9): 2110-2116.
- [2] Guan Y, Yao W, Yi K, et al. Nanotheranostics for the management of hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 2021, 17(23): e2007727.
- [3] Gao F, Qiu X, Wang K, Shao C, et al. Targeting the hepatic microenvironment to improve ischemia/reperfusion injury: New insights into the immune and metabolic compartments[J]. *Aging and Disease*, 2022, 13(4): 1196-1214.
- [4] Tang S P, Mao X L, Chen Y H, et al. Reactive oxygen species induce fatty liver and ischemia-reperfusion injury by promoting inflammation and cell death[J]. *Frontiers in Immunology*, 2022, 13: 870239.
- [5] Takada I, Makishima M. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists and antagonists: A patent review (2014-Present) [J]. *Expert Opinion on Therapeutic Pat-*

- ents, 2020, 30(1): 1–13.
- [6] Sauer S. Ligands for the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor gamma[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2015, 36(10): 688–704.
- [7] Katori M, Busuttill R W, Kupiec-Weglinski J W. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation[J]. *Transplantation*, 2002, 74(7): 905–912.
- [8] Sano N, Tamura T, Toriyabe N, et al. New drug delivery system for liver sinusoidal endothelial cells for ischemia-reperfusion injury[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2015, 21(45): 12778–12786.
- [9] Yuan B, Ming T, Qu S, et al. The effect of heme oxygenase-1 on liver sinusoidal endothelial cells proliferation and pro-regeneration[J]. *Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery*, 2022, 28(7): 536–541.
- [10] Shen X, Wang M, Bi X, et al. Resveratrol prevents endothelial progenitor cells from senescence and reduces the oxidative reaction via PPAR- $\gamma$ /HO-1 pathways[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 14(6): 5528–5534.
- [11] Abdalla H B, Napimoga M H, Lopes A H, et al. Activation of PPAR- $\gamma$  induces macrophage polarization and reduces neutrophil migration mediated by heme oxygenase 1[J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 84(7): 106565.
- [12] Lhuillier F, Parmantier P, Goudable J, et al. Hepatic ischemia is associated with an increase in liver parenchyma nitric oxide that is in part enzyme-independent[J]. *Anesthesiology*, 2003, 98(2): 373–378.
- [13] Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2003, 284(1): G15–26.
- [14] Roushansarai N S, Pascher A, Becker F. Innate immune cells during machine perfusion of liver grafts—the janus face of hepatic macrophages[J]. *Journal of Clinical Medicine*, 2022, 11(22):6669.
- [15] Kotlinowski J, Jozkowicz A. PPAR- $\gamma$  and angiogenesis: endothelial cells perspective[J]. *Journal of Diabetes Research*, 2016, 2016: 8492353.
- [16] Han X, Wu Y, Yang Q, et al. Peroxisome proliferator-activated receptors in the pathogenesis and therapies of liver fibrosis[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2021, 222(6): 107791.
- [17] Huang R, Zhang C, Wang X, et al. PPAR- $\gamma$  in ischemia-reperfusion injury: Overview of the biology and therapy[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12(4): 600618.
- [18] Hirao H, Nakamura K, Kupiec-Weglinski J W. Liver ischaemia-reperfusion injury: A new understanding of the role of innate immunity[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2022, 19(4): 239–256.
- [19] Abu-Amara M, Yang S Y, Tapuria N, et al. Liver ischemia/reperfusion injury: Processes in inflammatory networks—a review[J]. *Liver transplantation: Official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*, 2010, 16(9): 1016–1032.
- [20] Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: Promise and limitations of antioxidant therapy[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2021, 20(9): 689–709.
- [21] Linares I, Farrokhi K, Echeverri J, et al. PPAR- $\gamma$  activation is associated with reduced liver ischemia-reperfusion injury and altered tissue-resident macrophages polarization in a mouse model[J]. *PloS One*, 2018, 13(4): e0195212.
- [22] Zingarelli B, Chima R, O'Connor M, et al. Liver apoptosis is age dependent and is reduced by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in hemorrhagic shock[J]. *American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology*, 2010, 298(1): G133–141.
- [23] R G B, Panisello-Roselló A, Sanchez-Nuno S, et al. Nrf2 and oxidative stress in liver ischemia/reperfusion injury[J]. *The FEBS Journal*, 2022, 289(18): 5463–5479.
- [24] Zhan X, Zhang Z, Huang H, et al. Effect of heme oxygenase-1 on the protection of ischemia reperfusion injury of bile duct in rats after liver transplantation[J]. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 2018, 42(3): 245–254.

- [25] Qu S, Yuan B, Zhang H, et al. Heme oxygenase 1 attenuates hypoxia-reoxygenation injury in mice liver sinusoidal endothelial cells[J]. *Transplantation*, 2018, 102(3): 426-432.
- [26] Shen X, Wang M, Bi X, et al. Resveratrol prevents endothelial progenitor cells from senescence and reduces the oxidative reaction via PPAR- $\gamma$ /HO-1 pathways[J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016, 14(6): 5528-5534.
- [27] Cho R L, Yang C C, Tseng H C, et al. Heme oxygenase-1 up-regulation by rosiglitazone via ROS-dependent Nrf2-antioxidant response elements axis or PPAR- $\gamma$  attenuates LPS-mediated lung inflammation[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2018, 175(20): 3928-3946.
- [28] Yang Y, Li X, Zhang L, et al. Ginsenoside Rg1 suppressed inflammation and neuron apoptosis by activating PPAR/HO-1 in hippocampus in rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 2015, 8(3): 2484-2494.
- [29] Yang H, Zhang L, Chen J, et al. Heme oxygenase-1 inhibits the proliferation of hepatic stellate cells by activating PPAR- $\gamma$  and suppressing Nf- $\kappa$ B[J]. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, 2022, 2022: 8920861.
- [30] Jang H Y, Hong O Y, Youn H J, et al. 15d-PgJ2 inhibits Nf- $\kappa$ B and AP-1-mediated MMP-9 expression and invasion of breast cancer cell by means of a heme oxygenase-1-dependent mechanism[J]. *BMB Reports*, 2020, 53(4): 212-217.

## 征稿启事

为积极支持和推动昆明医科大学学科建设和发展,进一步提升《昆明医科大学学报》的办刊质量,不断扩大本刊的学术影响力,特对高质量稿源进行广泛征集。(1)国家自然科学基金资助课题的综述类论文可以在学报正刊发表;(2)对国家自然科学基金资助课题、云南省自然科学基金资助课题及昆明医科大学“十三五”省级、校级重点学科立项建设的研究论文,给予优先刊登。另外,投稿时需同时附:投稿单位证明、论文诚信承诺书以及基金项目证明。欢迎广大临床科研教学人员、硕士及博士研究生踊跃投稿。

网上投稿 <http://kmykdx.cnjournals.cn>, 电话: 0871-65936489, 65393133, 65922951, 65922874。

昆明医科大学学报编辑部

2024年1月1日