

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.36.002

过氧化物酶体增殖物 PGC-1 α 对肝缺血再灌注损伤的保护作用研究毕华强, 李晓武, 刘 辉, 张 曦 Δ

(陆军军医大学西南医院肝胆外科, 重庆 400038)

[摘要] **目的** 探讨过氧化物酶体增殖物受体 γ 共激活因子-1 α (PGC-1 α)对肝缺血再灌注损伤的保护作用。**方法** 构建大鼠肝缺血再灌注损伤模型,恢复灌注后 12 h,以蛋白免疫印迹(Western blot)检测 PGC-1 α 表达情况,并检测肝脏活性氧、三磷酸腺苷(ATP)水平及血丙氨酸氨基转移酶(ALT)活性变化,评估肝功能情况。另一方面,构建 PGC-1 α 慢病毒过表达载体,并在大鼠缺血再灌注前转染,于缺血再灌注后,再以 Western blot 检测 PGC-1 α 表达,肝脏活性氧、ATP 水平和血肝酶活性变化,评估 PGC-1 α 表达对肝缺血再灌注损伤的保护作用。**结果** 缺血再灌注肝脏 PGC-1 α 表达较假手术组及对照组(未手术)明显降低(均 $P < 0.05$),同时肝脏活性氧水平及 ALT 活性显著升高,而肝 ATP 产生减少(均 $P < 0.05$)。PGC-1 α 慢病毒过表达载体转染显著上调缺血再灌注肝脏 PGC-1 α 表达,同时肝脏活性氧水平及 ALT 活性较未转染组显著降低,而肝 ATP 产生增加(均 $P < 0.05$)。**结论** PGC-1 α 表达有利于保护肝缺血再灌注损伤。

[关键词] 过氧化物酶体增殖物受体 γ 共激活因子-1 α ;肝;再灌注损伤

[中图分类号] R657.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)36-5044-03

Protective effect of peroxisome proliferator receptor γ coactivator-1 α on hepatic ischemia-reperfusion injuryBi Huaqiang, Li Xiaowu, Liu Hui, Zhang Xi Δ

(Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, the Army Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of peroxisome proliferator receptor γ coactivator (PGC)-1 α on hepatic ischemia-reperfusion injury. **Methods** The rat model of hepatic ischemia-reperfusion injury was established. The expression of PGC-1 α was detected by Western blot after 12 hours of reperfusion. The changes of reactive oxygen species(ROS), ATP level and serum liver enzyme activity were measured, and the liver function was evaluated. On the other hand, PGC-1 α lentiviral overexpression vector was constructed and transfected in rat before ischemia-reperfusion. After ischemia-reperfusion, the expression of PGC-1 α , liver ROS, ATP level were measured by Western blot to explore the protective role of PGC-1 α in liver ischemia reperfusion injury. **Results** The expression of PGC-1 α in ischemia-reperfusion liver was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). The level of ROS[(325.4 ± 70.9) RLU vs. (108.5 ± 25.2) RLU, $P < 0.05$], the ALT activity in serum[(367.8 ± 82.7) U/L vs. (98.7 ± 16.8) U/L, $P < 0.05$] in ischemia-reperfusion liver were increased than that in the control group, whereas liver ATP production was reduced[(6.1 ± 3.7) pmol vs. (19.8 ± 3.1) pmol, $P < 0.05$]. The expression of PGC-1 α in the liver was significantly up-regulated by PGC-1 α lentiviral overexpression vector (57.3 ± 21.3 U/L vs. 311.2 ± 25.8 U/L, $P < 0.05$), down-regulated ROS[(98.7 ± 18.9) RLU vs. (300.2 ± 45.6) RLU, $P < 0.05$] and serum glutamic-pyruvic transaminase[(105.3 ± 21.3) U/L vs. (311.2 ± 25.8) U/L, $P < 0.05$], and increased liver ATP production [(17.3 ± 3.1) pmol vs. (5.8 ± 2.0) pmol, $P < 0.05$] in contrast to non-transfected rats. **Conclusion** PGC-1 α contributes to protect liver ischemia reperfusion injury.

[Key words] peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α ; liver; reperfusion injury

肝缺血再灌注损伤是肝移植及肝切除术后急性肝功能损伤的主要原因^[1-2]。研究发现肝缺血再灌注后,肝脏线粒体融合蛋白 2(Mfn2)表达显著降低,且与肝功能损害程度相关。进一步研究表明 Mfn2 作为下游靶蛋白,受过氧化物酶体增殖物受体 γ 共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator-1 α , PGC-1 α)调节,同时过氧化物酶体增殖物受体 γ 激动剂罗格列酮也可减轻肝缺血再灌注损伤^[3],提示 PGC-1 α 可能对肝缺血再灌注损伤具有保护作用。本研究建立大鼠肝缺血再灌注模型,观察 PGC-1 α 的表达变化与肝功能损伤间的关系,并构建 PGC-1 α 的蛋白启动子慢病毒过表达载体,使 PGC-1 α 在肝脏特异性过表达,观察 PGC-1 α 过表达后,对缺血再灌注肝功能的影响,探讨 PGC-1 α 对肝缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 动物与材料 体质量 250~300 g 雄性 SD 大鼠购自陆军军医大学动物实验中心。慢病毒包装颗粒购自上海吉凯生物技术有限公司,PGC-1 α 一抗及血丙氨酸氨基转移酶(ALT)活

性检测试剂盒购自美国 Abcam 公司。 β -actin 一抗和二抗购自美国 Santa Cruz 生物公司。活性氧检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司,三磷酸腺苷(ATP)检测试剂盒、ECL 发光试剂盒购自南京碧云天生物科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 PGC-1 α 慢病毒过表达载体构建 聚合酶链反应(PCR)扩增鼠清蛋白启动子(-449 ~ +100, GenBank accession no. NM_009654),并克隆至 pMD19-T 载体,然后将此载体插入慢病毒颗粒的 Pac I 和 BamH I 限制性酶切位点间,以替代原慢病毒 GC 启动子,再将大鼠 PGC-1 α 基因(GenBank accession no. NM_031347.1)克隆至上述慢病毒载体中,使其位于清蛋白启动子下游。将此慢病毒颗粒包装入质粒 pHelper 1.0,应用脂质体 2000 转染入 293T 细胞,应用实时定量 PCR 证实功能性病毒滴度后,以亲和色谱浓缩、纯化上述慢病毒颗粒。

1.2.2 大鼠慢病毒过表达载体转染及肝缺血再灌注模型建立 将 2×10^7 TU 的 PGC-1 α 慢病毒或空载体慢病毒重悬入 1

mL Opti-MEM I 培养基,并经尾静脉注射。2 周后,麻醉大鼠,开腹,以无损伤血管夹阻断供应肝中叶及肝左叶的肝动脉和门静脉血流 90 min,然后开放血管夹恢复血供,建立肝缺血再灌注损伤模型(模型组)^[4]。以不阻断肝血供的假手术模型(假手术组)作为对照。动物实验经陆军军医大学动物实验伦理委员会批准。

1.2.3 蛋白免疫印迹(Western blot) 肝血供恢复后 12 h 处死大鼠,取 1 g 肝组织匀浆后,加入蛋白裂解液提取总蛋白。煮沸变性后按 30 μg /孔上样,经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,以 5% 脱脂奶粉封闭 60 min,加入 PGC-1α 一抗(1:1 000)4 ℃ 孵育过夜,二抗室温孵育 1 h 后,ECL 发光,曝光显影。

1.2.4 肝活性氧检测 将 1 g 肝组织匀浆后应用清洁液漂洗,再以 300 r/min 离心 5 min。将组织沉淀依据试剂盒说明书处理后,用荧光分光光度计检测活性氧水平。

1.2.5 肝 ATP 检测 将 20 mg 肝组织用组织裂解液裂解后,以 12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。上清液依据试剂盒说明书处理后,用荧光分光光度计检测 ATP 水平。

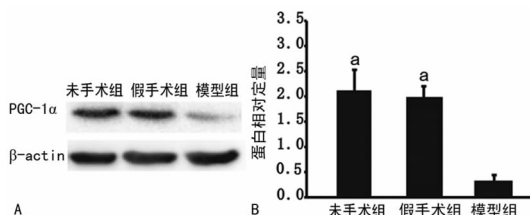
1.2.6 ALT 活性检测 大鼠处死后,收集血液,以 3 000 r/min 离心 10 min 获取血清,血清依据试剂盒说明书处

理后,用酶标仪检测 ALT 活性。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间差异比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

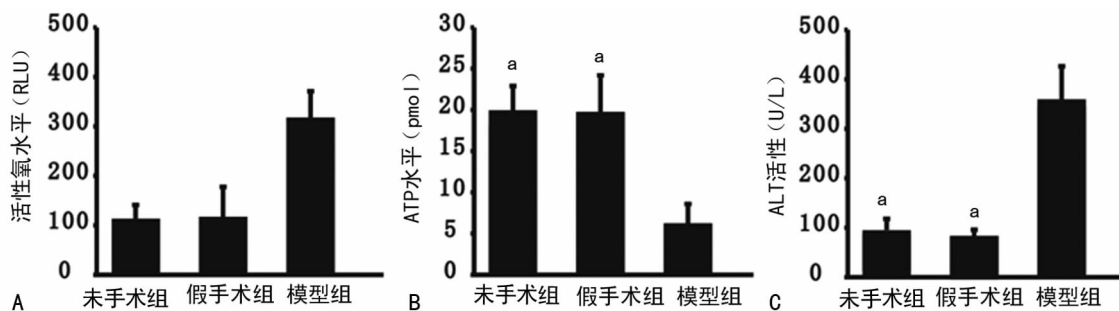
2 结 果

2.1 肝 PGC-1α 表达与缺血再灌注损伤 Western blot 检测显示,肝脏缺血再灌注 12 h 后,模型组 PGC-1α 表达水平较正常肝脏(未手术组)及假手术组肝脏明显降低(图 1)。同时模型组肝脏活性氧水平较假手术组及未手术组显著升高,而 ATP 产生明显减少,ALT 活性也显著上升(均 $P < 0.05$),见图 2。



A: Western blot; B: 定量分析图; *: $P < 0.05$, 与模型组比较

图 1 各组大鼠肝脏 PGC-1α 的表达比较

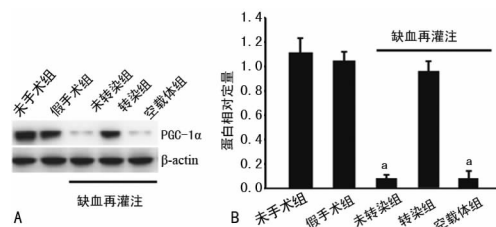


A: 肝活性氧; B: 肝 ATP; C: ALT; *: $P < 0.05$, 与模型组比较。

图 2 各组大鼠肝功能性损伤检测结果比较

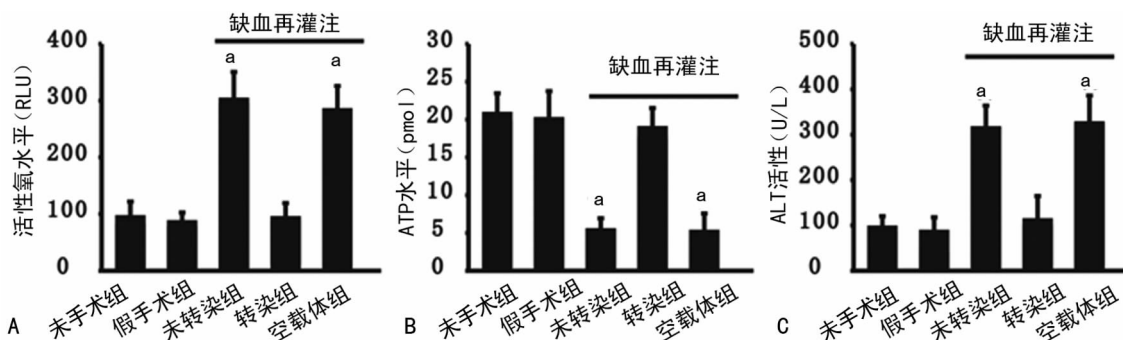
2.2 PGC-1α 慢病毒过表达载体转染保护缺血再灌注肝 PGC-1α 表达 于术前 2 周,经尾静脉注射转染含清蛋白启动子的 PGC-1α 慢病毒过表达载体,2 周后行缺血再灌注手术,恢复再灌注 12 h 后,转染组缺血再灌注肝脏 PGC-1α 表达水平较未转染组及转染空载体组显著升高,见图 3。

2.3 保护肝 PGC-1α 表达减轻缺血再灌注损伤 经转染含清蛋白启动子的 PGC-1α 慢病毒过表达载体,保护肝脏 PGC-1α 表达后,缺血再灌注肝活性氧水平较未转染组及空载体组显著降低,而 ATP 产生明显增加,ALT 活性也显著下降(均 $P < 0.05$),见图 4。



A: Western blot; B: 定量分析图; *: $P < 0.05$, 与转染组比较。

图 3 各组大鼠肝 PGC-1α 水平比较



A: 肝活性氧; B: 肝 ATP; C: ALT; *: $P < 0.05$, 与转染组比较。

图 4 肝 PGC-1α 表达对肝缺血再灌注损伤的影响

3 讨 论

肝缺血再灌注损伤造成的肝功能异常显著增加肝移植术患者、肝切除术患者及肝创伤患者的病死率^[1-2,5]。防止缺血再灌注损伤是防止肝脏术后肝功能异常,改善患者生存率的重要策略。肝细胞线粒体形态、功能损伤是肝缺血再灌注损伤的主要超微病理特征^[6-7]。近来研究发现 PGC-1 α 是热源性的转录共激活因子,通过调节线粒体的形态和呼吸功能而参与细胞能量代谢,PGC-1 α 的表达缺失将导致生理刺激产生的 ATP 减少^[8-9]。因此探讨 PGC-1 α 在缺血再灌注损伤中的作用,对于开发防治缺血再灌注损伤策略具有重要意义。

本研究发现,肝缺血再灌注后,肝脏 PGC-1 α 表达明显降低,而肝脏活性氧水平显著升高,ATP 产生减少,提示 PGC-1 α 表达与缺血再灌注后肝细胞线粒体功能障碍显著相关。有研究表明,肝缺血再灌注后,PGC-1 α 低表达可造成肝细胞活性氧水平显著增加,而活性氧对线粒体的能量代谢呼吸链具有显著损伤、破坏及毒性作用,进而导致线粒体肿胀,ATP 能量产生障碍,最终使得肝细胞死亡^[3]。肝细胞死亡使得肝酶释放入血,进而造成 ALT 等活性增加,提示肝功能损害。因此,PGC-1 α 的表达与肝细胞线粒体损伤和肝功能损害呈负相关。而转染含清蛋白启动子的 PGC-1 α 慢病毒过表达载体,可使 PGC-1 α 在清蛋白启动子调控下在缺血再灌注后的肝脏特异性表达。当 PGC-1 α 表达逆转后,肝脏 ATP 的产生明显增加,活性氧水平显著下降,ACT 活性降低,提示 PGC-1 α 的表达对于肝缺血再灌注损伤具有显著保护作用。

本研究提示 PGC-1 α 可能是肝缺血再灌注损伤的重要调节因子。罗格列酮作为过氧化物酶体增殖物受体 γ 激动剂,可促进 PGC-1 α 表达而减轻肝缺血再灌注损伤。因此,研发新的 PGC-1 α 表达诱导剂,有助于更有效防治缺血再灌注损伤。同时研究发现,PGC-1 α 对线粒体形态功能的保护调节作用,依赖于下游线粒体融合蛋白 Mfn2 的表达,PGC-1 α 通过调节 Mfn2 表达减轻线粒体形态功能损伤^[3],因此,研发 PGC-1 α /Mfn2 通路激活剂,可能是防治肝缺血再灌注损伤的又一新策略。

参考文献

[1] J Sosa RA, Zarrinpar A, Rossetti M, et al. Early cytokine

signatures of ischemia/reperfusion injury in human orthotopic liver transplantation [J]. *JCI Insight*, 2016, 1 (20): e89679.

[2] Theodoraki K, Tympa A, Karmanioliou I, et al. Ischemia/reperfusion injury in liver resection: a review of preconditioning methods [J]. *Surg Today*, 2011, 41(5): 620-629.

[3] Li J, Ke W, Zhou Q, et al. Tumour necrosis factor- α promotes liver ischaemia-reperfusion injury through the PGC-1 α /Mfn2 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2014, 18(9): 1863-1873.

[4] Ji H, Shen D, Zhang Y, et al. Activation of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase a signaling prevents liver ischemia/reperfusion injury in mice [J]. *Liver Transpl*, 2012, 18(6): 659-670.

[5] Guo A. The search for a magic bullet to fight multiple organ failure secondary to ischemia/reperfusion injury and abdominal compartment syndrome [J]. *J Surg Res*, 2013, 184(2): 792-793.

[6] Lin HC, Liu SY, Lai HS, et al. Isolated mitochondria infusion mitigates ischemia-reperfusion injury of the liver in rats [J]. *Shock*, 2013, 39(3): 304-310.

[7] Chen HH, Chen YT, Yang CC, 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.

[8] Villena JA. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond [J]. *FEBS J*, 2015, 282(4): 647-672.

[9] Gleyzer N, Scarpulla RC. Concerted action of PGC-1-related coactivator (PRC) and c-MYC in the stress response to mitochondrial dysfunction [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(49): 25529-25541.

(收稿日期:2017-08-18 修回日期:2017-09-26)

(上接第 5043 页)

trends of brominated flame retardants in the environment [M]. Heidelberg: Springer, 2010.

[18] 冯承莲, 许宜平, 何悦, 等. 十溴联苯醚 (BDE209) 在虹鳟体内的羟基代谢产物及其对甲状腺激素水平影响的初步研究 [J]. *生态毒理学报*, 2010, 5(3): 327-333.

[19] Venditti P, Di Meo S. Thyroid hormone-induced oxidative stress [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(4): 414-434.

[20] Videla A. Hormetic responses of thyroid hormone calorigenesis in the liver: association with oxidative stress [J].

IUBMB Life, 2010, 62(6): 460-466.

[21] 刘微, 熊吉东, 陶永红, 等. 甲状腺功能异常伴发精神障碍的临床分析 [J]. *中国地方病学杂志*, 2003, 22(3): 262-263.

[22] 石峰, 刘春蓉, 李兰英, 等. 甲状腺功能亢进对大鼠中枢神经系统 II 型脱碘酶 mRNA 表达的影响 [J]. *中国地方病学杂志*, 2006, 25(3): 250-253.

(收稿日期:2017-08-19 修回日期:2017-09-27)