

沈钦海, 张盟辉, 秦召敏, 等. 槲皮素预处理调节 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬途径改善大鼠肝缺血再灌注损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(3): 16-22.

Shen QH, Zhang MH, Qin ZM, et al. Quercetin pretreatment modulates the autophagy pathway mediated by the AMPK/mTOR signaling pathway and improves liver ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(3): 16-22.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 03. 003

槲皮素预处理调节 AMPK/mTOR 信号通路介导的 自噬途径改善大鼠肝缺血再灌注损伤

沈钦海¹, 张盟辉², 秦召敏^{1*}, 刘 军³

(1. 山东医学高等专科学校医学系, 济南 250002; 2. 山东省济南市第四人民医院普通外科, 山东大学附属省立医院, 济南 250000; 3. 山东大学齐鲁医院, 济南 250021)

【摘要】 目的 探讨槲皮素预处理通过 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬对肝缺血再灌注损伤的保护作用。**方法** 大鼠使用随机数字表法分为对照组、模型组、槲皮素组、氯喹(自噬抑制剂)组和槲皮素+氯喹组。手术前 3 d, 槲皮素组大鼠灌胃给予 0.1 g/kg 槲皮素, 氯喹组大鼠腹腔注射 0.02 g/kg 氯喹, 槲皮素+氯喹组灌胃给予槲皮素同时腹腔注射氯喹, 对照组和模型组给予等体积溶剂, 每天 1 次。构建肝缺血再灌注大鼠模型并于再灌注 6 h 后处死大鼠。全自动生化分析仪检测大鼠肝功能指标, 包括谷氨酸-丙酮酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST); 苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠肝组织病理学变化; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组大鼠血清中炎症因子含量, 包括白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β); 单磺尸胺染色法(MDC)观察并计算各组大鼠肝组织细胞自噬率; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK、mTOR 蛋白磷酸化水平。**结果** 对照组大鼠肝组织结构完整, 肝细胞排列整齐, 无显著坏死现象。与对照组相比, 模型组大鼠肝组织结构紊乱, 肝细胞排列疏松, 出现坏死, ALT、AST 水平、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高($P < 0.05$), 肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著降低($P < 0.05$)。与模型组相比, 槲皮素组大鼠肝组织上述病理损伤显著缓解, ALT、AST 水平、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平显著降低($P < 0.05$), 肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著升高($P < 0.05$); 氯喹组大鼠肝组织上述病理损伤显著加重, ALT、AST 水平、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高($P < 0.05$), 肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著降低($P < 0.05$)。与槲皮素组相比, 槲皮素+氯喹组大鼠肝组织病理损伤显著加重, ALT、AST 水平、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高($P < 0.05$), 肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著降低($P < 0.05$); 与氯喹组相比, 槲皮素+氯喹组大鼠肝组织病理损伤显著减轻, ALT、AST 水平、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平显著降低($P < 0.05$), 肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著升高($P < 0.05$)。**结论** 槲皮素预处理可能通过激活肝缺血再灌注损伤大鼠肝组织中 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬, 从而减少炎症反应, 缓解肝损伤。

【关键词】 槲皮素; 肝缺血再灌注损伤; 自噬; AMPK/mTOR 通路; 炎症反应

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 03-0016-07

Quercetin pretreatment modulates the autophagy pathway mediated by the AMPK/mTOR signaling pathway and improves liver ischemia-reperfusion injury in rats

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81770646)。

[作者简介] 沈钦海(1966—), 男, 教授, 博士, 研究方向: 肝病发病机制及治疗。E-mail: sdyzsqh@126.com

[通信作者] 秦召敏(1969—), 女, 副教授, 研究方向: 传染病研究及教学。E-mail: sdyzqzm@126.com

SHEN Qin Hai¹, ZHANG Menghui², QIN Zhaomin^{1*}, LIU Jun³

(1. Department of medicine, Shandong Medical College, Jinan 250002, China. 2. Department of general surgery, the Fourth People's Hospital of Jinan, Shandong Province, Provincial hospital affiliated to Shandong University, Jinan 250000. 3. Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250021)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of quercetin pretreatment on hepatic ischemia-reperfusion injury by autophagy mediated via the AMPK/mTOR signaling pathway. **Methods** Rats were randomly divided into control, model, quercetin, chloroquine (autophagy inhibitor) and quercetin+chloroquine groups. Three days before the operation, the quercetin group was administered 0.1 g/kg quercetin, the chloroquine group was intraperitoneally injected with 0.02 g/kg chloroquine, the quercetin+chloroquine group was administered quercetin by gavage and chloroquine was injected intraperitoneally at 3 days, and the control and model groups were administered an equal volume of solvent once a day. The rat model of hepatic ischemia-reperfusion was established and rats were sacrificed at 6 hours after reperfusion. Liver function indexes, which included glutamic pyruvate transaminase (ALT) and aspartate acyltransferase (AST), were measured by an automatic biochemical analyzer. Pathological changes of liver tissue were observed by hematoxylin eosin (HE) staining. The serum levels of inflammatory factors, which included interleukin (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-1 β were measured by enzyme-linked immunosorbent assays. The autophagy rate was calculated by monosulfonamide (MDC) staining. Expression of Beclin1 protein and the phosphorylation of AMPK and mTOR proteins in liver tissue were detected by Western blot. **Results** In the control group, the liver tissue structure was complete, hepatocytes were arranged in order, and there was no significant necrosis. Compared with the control group, the liver tissue structure of the model group was disordered, the arrangement of hepatocytes was loose, and necrosis had appeared, the levels of ALT and AST, contents of IL-6, TNF- α and IL-1 β , phosphorylation level of mTOR protein were significantly higher ($P < 0.05$), and the autophagy rate, expression level of Beclin1 protein, and phosphorylation level of AMPK protein were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the model group, the above pathological damage of liver tissue in the quercetin group was alleviated significantly, the levels of ALT and AST, the contents of IL-6, TNF- α , IL-1 β and the phosphorylation level of mTOR protein were significantly lower ($P < 0.05$), and the autophagy rate, expression level of Beclin1 protein, and phosphorylation level of AMPK protein were significantly higher ($P < 0.05$). In the chloroquine group, the above pathological damage of liver tissue was aggravated significantly, the levels of ALT and AST, contents of IL-6, TNF- α and IL-1 β and phosphorylation level of mTOR protein were significantly higher ($P < 0.05$), and the autophagy rate, expression level of Beclin1 protein, and phosphorylation level of AMPK protein were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the quercetin group, the pathological damage of liver tissue in the quercetin + chloroquine group was more serious, the levels of ALT and AST, contents of IL-6, TNF- α and IL-1 β . and phosphorylation level of mTOR protein were significantly higher ($P < 0.05$) and the autophagy rate, expression level of Beclin1 protein, and phosphorylation level of AMPK protein were significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the chloroquine group, the pathological damage of liver tissue in the quercetin+chloroquine group was significantly reduced, the levels of ALT and AST, the contents of IL-6, TNF- α and IL-1 β , and phosphorylation level of mTOR protein were significantly lower ($P < 0.05$), and the autophagy rate, expression level of Beclin1 protein, and phosphorylation level of AMPK protein were significantly higher ($P < 0.05$). **Conclusions** Quercetin pretreatment may activate autophagy mediated by the AMPK/mTOR signaling pathway in liver tissue of rats with hepatic ischemia-reperfusion injury, thereby reducing the inflammatory response and alleviating liver injury.

【Keywords】 quercetin; hepatic ischemia-reperfusion injury; autophagy; AMPK/mTOR pathway; inflammatory response

肝缺血再灌注损伤常见于出血性休克、肝手术、肝移植术等过程中,可引起肝损伤、肝衰竭等,也是肝手术移植失败的重要原因^[1]。自噬是一个将自身细胞器或细胞质中的蛋白包被形成囊泡,通

过自噬溶酶体,使囊泡内容物降解的过程,在机体生理和病理过程中常见^[2],其发挥的作用在不同组织和细胞中各不相同。前人研究发现,在肝缺血再灌注损伤过程中,上调细胞自噬具有保护肝功能的

作用^[3]。另外,通过提高腺苷酸活化蛋白激酶(adenosine monophosphate activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路调节的自噬,可缓解缺血再灌注诱导的肝损伤^[4]。槲皮素是一种天然的膳食黄酮,具有显著的抗氧化作用,可通过降低炎症反应,对心脏等器官起保护作用^[5]。而且槲皮素能有效改善大鼠肝缺血再灌注损伤^[6],但是槲皮素预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的缓解作用及对 AMPK/mTOR 信号通路介导自噬途径的影响,未见报道。本研究使用槲皮素及自噬抑制剂氯喹预处理肝缺血再灌注损伤的大鼠模型,旨在从 AMPK/mTOR 信号通路探讨槲皮素对缺血再灌注损伤大鼠自噬的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠(50 只,雄性,5 周龄,体重 170~180 g)购自山东大学医学院实验中心[SCXK(鲁)2018-0003],于山东大学实验室饲养[SYXK(鲁)2019-0043],符合山东大学实验室动物伦理保护标准及相关法律法规规定(2020-S-09),按照 3R 原则关照实验动物。

1.2 主要试剂与仪器

槲皮素(原料药,纯度 $\geq 98\%$)购自南京泽朗医药科技有限公司;自噬抑制物-氯喹(规格:50 mg,纯度:97%),购自麦克林生化科技有限公司。

苏木素-伊红(HE)染色试剂盒购自上海雅吉生物科技有限公司;单丹磺酰尸胺(monodansylcadaverin, MDC)购自上海基尔顿生物科技有限公司; β -actin 鼠抗购自 Sigma 公司;Beclin1、磷酸化(phosphorylation, p)-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR 一抗和辣根过氧化物酶标记的 IgG 二抗均购自 Abcam 公司。

全自动生化分析仪(BK-200 型)购自山东博科;酶标仪(Fax-20100 型)购自美国 INStat;光学显微镜(SMZ745 型)购自日本尼康;ChemiDoc-MP 全能型凝胶成像分析系统购自山东三瑞科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肝缺血再灌注大鼠模型的建立及分组

将 SPF 级 SD 大鼠使用随机数字表法分为对照组、模型组、槲皮素组、氯喹组和槲皮素+氯喹组。

手术前 3 天,槲皮素组大鼠灌胃给予槲皮素(0.5%羧甲基纤维素钠溶解),给药剂量 0.1 g/kg^[7],氯喹组大鼠腹腔注射 0.02 g/kg 氯喹^[8](自噬抑制剂,蒸馏水溶解),槲皮素+氯喹组灌胃给予槲皮素同时腹腔注射氯喹,对照组和模型组给予等体积蒸馏水和 0.5%羧甲基纤维素钠溶剂,每天 1 次。参考马志勇等^[9]方法构建肝缺血再灌注大鼠模型:大鼠术前禁食 12 h,自由饮水,腹腔注射 1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,固定于手术板上,切开腹壁,游离肝蒂,使用血管夹钳夹肝蒂进行肝缺血,60 min 后松开血管夹使血液灌注 6 h,其中对照组仅游离肝蒂不进行嵌夹,所有大鼠血液再灌注 6 h 后处死,收集各组大鼠血液、肝组织进行检测。

1.3.2 全自动生化分析仪检测大鼠肝功能指标

分离上述 1.3.1 中收集的各组大鼠部分新鲜血液中血清(剩余血清置于 4℃ 冰箱中,用于后续检测),置于全自动生化分析仪上检测血清中谷氨酸-丙酮酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸酰基转移酶(AST)水平。两者用于反映肝功能的指标,水平越高表明肝损伤越严重。

1.3.3 HE 染色观察各组大鼠肝组织病理学变化

取上述 1.3.1 中收集的各组大鼠部分新鲜肝组织,经过固定(4%多聚甲醛,24 h)、包埋(石蜡)、切片(5 μ m),然后脱蜡(二甲苯)、脱水(梯度乙醇)、染色(苏木精-伊红)等过程,具体操作步骤严格按照 HE 染色试剂盒进行,最后在石蜡切片中滴 1 滴中性树胶进行封片,光学显微镜观察。

1.3.4 ELISA 法检测血清中炎症因子含量

取上述 1.3.1 中置于 4℃ 冰箱中的各组大鼠剩余血清,严格按照 IL-6、TNF- α 、IL-1 β ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.3.5 MDC 观察并计算各组肝组织细胞中自噬率

取上述 1.3.1 中收集的各组大鼠新鲜肝组织各 0.05 g 剪碎、胰蛋白酶制成单细胞悬液(剩余肝组织置于-80℃ 冰箱中保存),接种至 6 孔板(2 mL/孔),将 6 孔板离心、PBS 缓冲液洗涤、1 mL 4%多聚甲醛固定、50 μ mol/L MDC 染色、37℃ 温育,30 min 后,观察并计数 MDC 阳性细胞, MDC 阳性细胞率即为细胞自噬率。

1.3.6 Western blot 法检测各组大鼠肝组织中 Beclin1、AMPK、mTOR 蛋白表达水平

取上述 1.3.5 中置于-80℃ 冰箱中的大鼠肝组织,提取总蛋白并对蛋白进行定量,然后进行十二

烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭,与 Beclin1、AMPK、p-AMPK、p-mTOR、mTOR、 β -actin 鼠抗(稀释比均为 1:2000)4℃ 孵育过夜,与辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG 二抗(1:5000)室温孵育 2 h 后、显色、凝胶成像分析系统分析条带灰度值。

1.4 统计学方法

使用软件 SPSS 24.0 进行统计分析,平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示计量数据,多组间比较和进一步两两间比较分别行单因素方差分析和 SNK- q 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠肝功能指标的影响

模型组 ALT 和 AST 水平显著高于对照组($P<0.05$);槲皮素组 ALT 和 AST 水平显著低于模型组($P<0.05$),氯喹组 ALT 和 AST 水平显著高于模型组($P<0.05$)。与槲皮素组相比,槲皮素+氯喹组 ALT 和 AST 水平显著升高($P<0.05$);与氯喹组相比,槲皮素+氯喹组 ALT 和 AST 水平显著降低($P<0.05$)。见表 1。

2.2 槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠肝组织病理学变化的影响

对照组大鼠肝组织结构完整,肝细胞排列整齐,无显著坏死现象;模型组大鼠肝组织结构紊乱,肝细胞排列疏松,出现坏死,槲皮素组较模型组大鼠肝组织病理损伤有所缓解,氯喹组较模型组大鼠肝组织病理损伤加重;槲皮素+氯喹组较槲皮素组大鼠肝组织病理损伤加重,较氯喹组大鼠肝组织病理损伤减轻。见图 1。

2.3 槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠血清中炎症因子含量的影响

模型组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量显著高于对照组($P<0.05$);与模型组相比,槲皮素组

大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量显著降低($P<0.05$),氯喹组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量显著升高($P<0.05$)。与槲皮素组相比,槲皮素+氯喹组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量显著升高($P<0.05$);与氯喹组相比,槲皮素+氯喹组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量显著降低($P<0.05$)。见表 2。

2.4 槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠肝组织细胞自噬率的影响

与对照组相比,模型组大鼠肝组织细胞自噬率显著降低($P<0.05$);与模型组相比,槲皮素组大鼠肝组织细胞自噬率显著升高($P<0.05$),氯喹组大鼠肝组织细胞自噬率显著降低($P<0.05$)。与槲皮素组相比,槲皮素+氯喹组大鼠肝组织细胞自噬率显著降低($P<0.05$);与氯喹组相比,槲皮素+氯喹组大鼠肝组织细胞自噬率显著升高($P<0.05$)。见表 3、图 2。

2.5 槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠肝组织 Beclin1、AMPK、mTOR 蛋白表达水平的影响

模型组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著低于对照组($P<0.05$),

表 1 各组大鼠肝功能指标比较($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 1 Liver function indexes of rats in each group

组别 Groups	ALT(IU/L)	AST(IU/L)
对照组 Control group	32.09 $\pm$ 3.31	72.34 $\pm$ 7.53
模型组 Model group	1024.55 $\pm$ 118.37 ^a	1326.67 $\pm$ 133.29 ^a
槲皮素组 Quercetin group	458.33 $\pm$ 76.51 ^b	725.39 $\pm$ 73.69 ^b
氯喹组 Chloroquine group	1935.56 $\pm$ 20.28 ^b	2107.52 $\pm$ 216.89 ^b
槲皮素+氯喹组 Quercetin+chloroquine group	985.42 $\pm$ 99.25 ^{cd}	1279.34 $\pm$ 128.59 ^{cd}

注:与对照组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$;与槲皮素组相比,^c $P<0.05$;与氯喹组比较,^d $P<0.05$ 。

Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with quercetin group, ^c $P<0.05$. Compared with chloroquine group, ^d $P<0.05$.

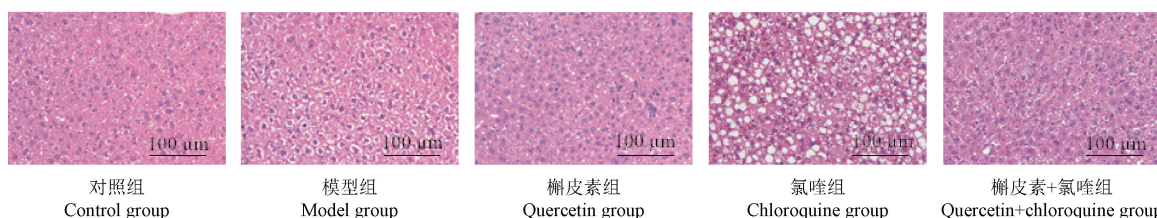


图 1 各组大鼠肝组织病理学 HE 染色图

Figure 1 Hepatic histopathological HE staining of rats in each group

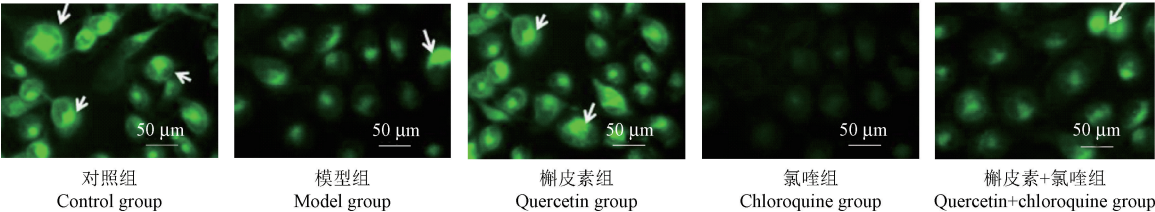
mTOR 蛋白磷酸化水平显著高于对照组 ($P<0.05$)。槲皮素组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著高于模型组 ($P<0.05$)，mTOR 蛋白磷酸化水平显著低于模型组 ($P<0.05$)；氯喹组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著低于模型组 ($P<0.05$)，mTOR 蛋白磷酸化水平显著高于模型组。与槲皮素

组比，槲皮素+氯喹组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著降低 ($P<0.05$)，mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高 ($P<0.05$)；与氯喹组比，槲皮素+氯喹组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平显著升高 ($P<0.05$)，mTOR 蛋白磷酸化水平显著降低 ($P<0.05$)。见表 4、图 3。

表 2 各组大鼠血清中 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)
Table 2 Contents of IL-6, TNF- α and IL-1 β in serum of rats in each group

组别 Groups	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)
对照组 Control group	34.23 $\pm$ 3.56	28.34 $\pm$ 2.95	22.76 $\pm$ 2.39
模型组 Model group	1067.24 $\pm$ 128.53 ^a	976.83 $\pm$ 978.54 ^a	679.24 $\pm$ 68.29 ^a
槲皮素组 Quercetin group	543.17 $\pm$ 57.31 ^b	213.56 $\pm$ 22.47 ^b	154.85 $\pm$ 17.23 ^b
氯喹组 Chloroquine group	1328.57 $\pm$ 133.09 ^b	1242.29 $\pm$ 126.27 ^b	916.13 $\pm$ 92.34 ^b
槲皮素+氯喹组 Quercetin+chloroquine group	943.86 $\pm$ 95.56 ^{cd}	909.88 $\pm$ 97.29 ^{cd}	554.35 $\pm$ 57.18 ^{cd}

注：与对照组相比，^a $P<0.05$ ；与模型组相比，^b $P<0.05$ ；与槲皮素组相比，^c $P<0.05$ ；与氯喹组相比，^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with quercetin group, ^c $P<0.05$. Compared with chloroquine group, ^d $P<0.05$.



注：箭头所示为 MDC 染色阳性细胞。

图 2 各组细胞自噬小体荧光图

Note. Arrow is MDC positive cells.

Figure 2 Fluorescence of autophagosomes in each group

表 3 各组大鼠肝组织细胞自噬率比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Table 3 Autophagy rates in liver tissue cells of rats in each group

组别 Groups	MDC 阳性细胞率 (%) MDC positive cell rate
对照组 Control group	36.17 $\pm$ 3.72
模型组 Model group	11.26 $\pm$ 1.29 ^a
槲皮素组 Quercetin group	29.48 $\pm$ 3.06 ^b
氯喹组 Chloroquine group	4.33 $\pm$ 0.42 ^b
槲皮素+氯喹组 Quercetin+chloroquine group	13.36 $\pm$ 1.48 ^{cd}

注：与对照组相比，^a $P<0.05$ ；与模型组相比，^b $P<0.05$ ；与槲皮素组相比，^c $P<0.05$ ；与氯喹组比较，^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with quercetin group, ^c $P<0.05$. Compared with chloroquine group, ^d $P<0.05$.

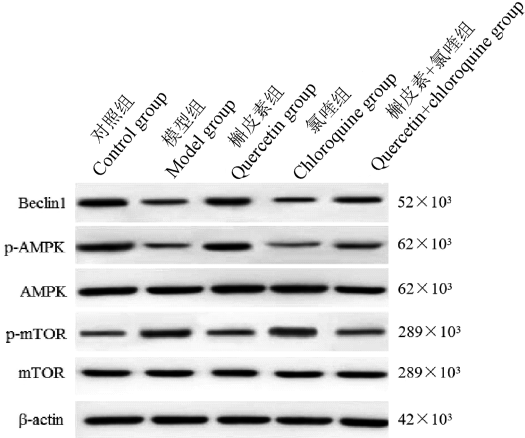


图 3 各组大鼠肝组织中 Beclin1、p-AMPK、AMPK、p-mTOR、mTOR 蛋白表达条带图

Figure 3 Expression of Beclin1, p-AMPK, AMPK, p-mTOR and mTOR proteins in liver tissue of rats in each group

表 4 各组大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达及 AMPK 和 mTOR 蛋白磷酸化水平比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Comparison of Beclin1 protein and AMPK, mTOR phosphorylation proteins expression levels in liver tissue of rats in each group

组别 Groups	Beclin1/ β -actin	p-AMPK/AMPK	p-mTOR/mTOR
对照组 Control group	0.94 $\pm$ 0.11	0.96 $\pm$ 0.10	0.14 $\pm$ 0.02
模型组 Model group	0.35 $\pm$ 0.05 ^a	0.29 $\pm$ 0.03 ^a	0.84 $\pm$ 0.09 ^a
槲皮素组 Quercetin group	0.73 $\pm$ 0.08 ^b	0.84 $\pm$ 0.09 ^b	0.27 $\pm$ 0.03 ^b
氯喹组 Chloroquine group	0.12 $\pm$ 0.02 ^b	0.15 $\pm$ 0.02 ^b	0.92 $\pm$ 0.10 ^b
槲皮素+氯喹组 Quercetin+chloroquine group	0.38 $\pm$ 0.04 ^{cd}	0.33 $\pm$ 0.04 ^d	0.36 $\pm$ 0.04 ^{cd}

注:与对照组相比, ^a $P<0.05$;与模型组相比, ^b $P<0.05$;与槲皮素组相比, ^c $P<0.05$;与氯喹组比较, ^d $P<0.05$ 。
Note. Compared with control group, ^a $P<0.05$. Compared with model group, ^b $P<0.05$. Compared with quercetin group, ^c $P<0.05$. Compared with chloroquine group, ^d $P<0.05$.

3 讨论

肝缺血再灌注是肝手术或肝移植的必要组成部分,缺血过程中不可避免会造成肝细胞损伤,再灌注后肝功能也不太可能迅速恢复正常^[10]。在大多数情况下,术后会出现肝炎症、损伤甚至严重的肝功能障碍,严重者甚至可导致多器官功能衰竭甚至死亡^[11]。因此,预防和减轻肝缺血再灌注损伤对改善患者预后、降低死亡率具有重要影响。何莹等^[12]研究发现老年大鼠肝缺血再灌注损伤伴随自噬作用降低及自噬相关蛋白水平显著下降。本研究通过构建大鼠肝缺血再灌注损伤,发现模型组大鼠肝组织结构紊乱,肝细胞排列疏松,出现坏死,ALT 和 AST 水平、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量显著升高,肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平显著降低,提示肝缺血再灌注大鼠肝组织出现病理损伤及炎症反应,且细胞自噬减少。

槲皮素可以降低血压、血脂,抗癌、抗炎和抗氧化应激,对多种心血管疾病具有良好的治疗效果,广泛存在于双子植物中,是一种黄酮类化合物^[13]。其中,槲皮素不但能显著抑制乳腺癌细胞的生长^[14],还能诱发原发积液性淋巴瘤细胞的自噬^[15]。另外,Uylas 等^[16]研究发现,槲皮素在正确剂量下可有效预防肝缺血再灌注损伤,He 等^[17]研究发现槲皮素可以通过 mTOR 途径增强缺氧诱导的肺动脉平滑肌细胞自噬,治疗缺氧相关性肺动脉高压疾病。本研究发现,槲皮素可显著缓解肝缺血再灌注大鼠肝组织病理损伤,降低肝功能指标 ALT 和 AST 水平以及炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量,提高肝组织细胞自噬率和 Beclin1 蛋白表达水平,提示槲皮素能够激活细胞自噬,缓解肝损伤。但其中的机制尚需进一步研究。

Wang 等^[18]研究发现高血糖通过抑制 AMPK/mTOR 介导的自噬,促进肝内巨噬细胞 NLRP3 炎症小体的激活,加重急性肝损伤。本研究发现,肝缺

血再灌注模型大鼠肝组织中 Beclin1 蛋白表达水平、AMPK 蛋白磷酸化水平显著降低,mTOR 蛋白磷酸化水平显著升高,提示 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬在模型大鼠中处于抑制状态,而经槲皮素预处理后,AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬得到激活。另外,肾上腺髓质素可能通过 AMPK/mTOR 轴激活自噬,从而保护间质细胞的甾体生成功能,防止细胞焦亡^[19];阻碍 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬能够促进小鼠非酒精性脂肪肝^[20]。为进一步探究槲皮素是通过 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬发挥肝缺血再灌注损伤的保护作用,本研究通过采用自噬抑制剂氯喹单独及槲皮素和氯喹联合预处理肝缺血再灌注大鼠,发现大鼠肝组织病理损伤程度介于槲皮素和氯喹单独干预之间;ALT 和 AST 水平、IL-6、TNF- α 、IL-1 β 含量以及 mTOR 蛋白磷酸化水平比槲皮素单独干预升高,比氯喹单独干预降低,肝组织细胞自噬率、Beclin1 蛋白表达水平及 AMPK 蛋白磷酸化水平比槲皮素单独干预降低,比氯喹单独干预升高,提示槲皮素改善肝缺血再灌注大鼠肝损伤的作用可被氯喹逆转,进一步说明槲皮素减轻肝缺血再灌注大鼠肝损伤的作用机制与激活 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬有关。

综上所述,槲皮素预处理可能通过激活肝缺血再灌注大鼠肝组织中 AMPK/mTOR 信号通路介导的自噬,缓解肝损伤。但是自噬涉及的信号通路较多且肝缺血再灌注的作用机制较为复杂,槲皮素预处理对肝缺血再灌注大鼠的保护作用,是否还涉及自噬相关的其他信号通路,尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 张北平,翟淑萍,苑伟,等. 茵陈蒿汤联合加味大柴胡汤对肝缺血再灌注损伤大鼠的影响 [J]. 中国医学导报, 2018, 15(30): 15-18.
[2] 宋斯佳,罗森. 自噬在呼吸系统疾病中的研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2019, 19(78): 44-45.
[3] 杨龙灿,张旭阳,潘宁波,等. 雷帕霉素在肝脏缺血再灌注

- 损伤中对自噬相关蛋白 ULK1, LC3 表达的影响 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(10): 2261-2265.
- [4] Liu H, Dong J, Song S, et al. Spermidine ameliorates liver ischaemia-reperfusion injury through the regulation of autophagy by the AMPK-mTOR-ULK1 signalling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(2): 227-233.
- [5] Kumar M, Kasala ER, Bodduluru LN, et al. Molecular and biochemical evidence on the protective effects of quercetin in isoproterenol-induced acute myocardial injury in rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2017, 31(1): 1-8.
- [6] 王甲甲, 钟佳伶, 张娟, 等. 槲皮素对缺血再灌注大鼠肝脏损伤的保护作用 [J]. 山东医药, 2015, 5(22): 22-24.
- [7] 叶苗, 刘丽仙, 梁晓美. 槲皮素对大鼠肾缺血再灌注损伤模型的保护作用 [J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2019, 1(12): 1041-1043.
- [8] 陈铭欣, 杜洪印, 喻文立, 等. 自噬在氢抑制原位肝移植术大鼠海马神经元凋亡中的作用 [J]. 中华麻醉学杂志, 2017, 37(2): 184-187.
- [9] 马志勇, 李雪平, 侯振宇, 等. 七氟烷通过 JAK2-sTAT3 通路对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响 [J]. 局解手术学杂志, 2020, 29(9): 693-697.
- [10] Donadon M, Molinari AF, Corazzi F, et al. Pharmacological modulation of ischemic-reperfusion injury during pringle maneuver in hepatic surgery a prospective randomized pilot study [J]. *World J Surg*, 2016, 40(9): 2202-2212.
- [11] Olthof PB, van Golen RF, Meijer B, et al. Warm ischemia time-dependent variation in liver damage, inflammation, and function in hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(2): 375-385.
- [12] 何莹, 张季, 赵圆圆, 等. 老年大鼠肝脏缺血再灌注损伤抑制自噬的作用机理 [J]. 中华器官移植杂志, 2016, 37(11): 677-681.
- [13] 陈振华, 胡晓艳, 赵滕, 等. 槲皮素对心血管系统疾病的影响及其新剂型研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(2): 440-443.
- [14] Li X, Zhou N, Wang J, et al. Quercetin suppresses breast cancer stem cells (CD44⁺/CD24⁻) by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR-signaling pathway [J]. *Life Sci*, 2018, 196(1): 56-62.
- [15] Granato M, Rizzello C, Montani MSG, et al. Quercetin induces apoptosis and autophagy in primary effusion lymphoma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR and STAT3 signaling pathways [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 41(1): 124-136.
- [16] Uylas MU, Şahin A, Şahintürk V, et al. Quercetin dose affects the fate of hepatic ischemia and reperfusion injury in rats: An experimental research [J]. *Int J Surg*, 2018, 5(53): 117-121.
- [17] He Y, Cao X, Guo P, et al. Quercetin induces autophagy via FOXO1-dependent pathways and autophagy suppression enhances quercetin-induced apoptosis in PASMCs in hypoxia [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 2(103): 165-176.
- [18] Wang Q, Wei S, Zhou S, et al. Hyperglycemia aggravates acute liver injury by promot liver-resident macrophage NLRP3 inflammasome activation via the inhibition of AMPK/mTOR-mediated autophagy induction [J]. *Immunol Cell Biol*, 2020, 98(1): 54-66.
- [19] Li MY, Zhu XL, Zhao BX, et al. Adrenomedullin alleviates the pyroptosis of Leydig cells by promoting autophagy via the ROS-AMPK-mTOR axis [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(7): 489-509.
- [20] Lu W, Mei J, Yang J, et al. ApoE deficiency promotes non-alcoholic fatty liver disease in mice via impeding AMPK/mTOR mediated autophagy [J]. *Life Sci*, 2020, 252(1): 1-10.

[收稿日期]2021-01-18