doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2024.11.023
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2024.11.023
China Journal of General Surgery, 2024, 33(11):1935-1940.

·简要论著·

吡非尼酮对肝缺血再灌注损伤的影响及其与ALOX12通路的关系

李丹，胡军，戴鑫杰，向康，吴登鼎，艾空，杨新宇，闵楠

（三峡大学附属第一临床医学院/宜昌市中心人民医院 肝胆胰外科，湖北 宜昌 443000）

摘　要

背景与目的：肝缺血再灌注损伤（HIRI）是肝切除术和肝移植术后常见的并发症，严重影响术后恢复并可能导致多器官功能障碍综合征。研究显示，吡非尼酮在多种器官中具有抗缺血再灌注损伤作用。因此，本研究在细胞与动物模型上观察吡非尼酮抗HIRI的作用，并分析其作用与ALOX12通路的关系。

方法：用正常肝细胞系构建缺氧/复氧模型，以无处理的正常肝细胞系为对照，观察吡非尼酮预处理对缺氧/复氧肝细胞炎症因子释放以及ALOX12蛋白表达的影响；用小鼠构建HIRI模型，以假手术小鼠为对照，观察吡非尼酮预处理对小鼠肝脏的保护作用以及对肝组织ALOX12蛋白表达的影响。

结果：细胞实验结果显示，吡非尼酮预处理后，肝细胞由缺氧/复氧引起的各炎症因子释放被明显抑制，且肝细胞中ALOX12蛋白的表达明显下调（均 $P<0.05$）。动物实验结果显示，吡非尼酮预处理后，由缺血再灌注引起的肝组织损伤与肝功能损伤明显减轻，以及由缺血再灌注诱导的肝组织ALOX12蛋白表达上调被明显抑制（均 $P<0.05$）。

结论：吡非尼酮具有抗HIRI作用，其机制部分可能与下调ALOX12表达有关。

关键词　肝切除术；再灌注损伤；吡非尼酮；花生四烯酸12-脂氧合酶

中图分类号：R657.3

肝缺血再灌注损伤（hepatic ischemia-reperfusion injury，HIRI）是肝切除术、肝移植术后等临床过程中常见的并发症，其主要特征是肝细胞因缺血及再灌注过程中的双重打击而产生的氧化应激、炎症反应、凋亡及坏死等病理过程[1]。HIRI不仅影响患者术后恢复，还可能导致多器官功能障碍综合征，是肝脏外科手术面临的重要挑战之一[2]。

吡非尼酮（pirfenidone）是一种具有抗纤维化及抗炎作用的药物，近年来在多种器官的缺血再灌注损伤中均表现出显著的保护作用[3-6]。研究[3-7]显示，吡非尼酮在肝脏、肾脏、肺部和脑部的缺血再灌注模型中，能够通过抑制促炎因子[如肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素1β（IL-1β）和白细胞介素6（IL-6）]的表达，减少炎症反应，降低氧化应激水平，最终改善组织损伤。此外，吡非尼酮还能够抑制纤维化相关基因的表达，调控细胞内钙离子稳态，从而在抑制肝细胞凋亡和坏死过程中发挥重要作用。

研究[1,8-9]表明，ALOX12-12-HETE-GPR31信号通路在HIRI过程中发挥着关键作用。ALOX12是催化花生四烯酸生成12-羟基-5，8，10，14-二十碳四烯酸（12-HETE）的重要酶，12-HETE进一步与G蛋白偶联受体31（GPR31）结合，激活下游的信号传导，从而导致炎症因子释放、氧化应激加剧和肝细胞凋亡，通过敲除ALOX12、12-HETE、GPR31基因可以有效抑制这些病理过程，减轻肝脏的缺血再灌注损伤。

基金项目：湖北省卫生厅科技计划基金资助项目（WJ2021M065）。

收稿日期：2024-03-05；**修订日期：**2024-10-28。

作者简介：李丹，三峡大学附属第一临床医学院/宜昌市中心人民医院硕士研究生，主要从事肝脏缺血再灌注损伤，肝癌的侵袭和转移方面的研究。

通信作者：胡军，Email: hu791205@126.com

对于HIRI，吡非尼酮可能通过多层面的调控发挥保护作用。首先，吡非尼酮通过减少氧化应激产物丙二醛的生成，增加抗氧化酶如超氧化物歧化酶的活性，减轻氧化应激对肝细胞的损伤。其次，吡非尼酮通过抑制炎症介质的释放，从而抑制炎症反应，减少对肝组织的进一步损害[10]。本研究在细胞模型及小鼠模型上进一步观察吡非尼酮抗HIRI作用，并分析其作用与ALOX12通路的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要试剂 吡非尼酮购自MCE有限公司；高糖DMEM购自Hyclone公司；胎牛血清购自Gibco公司；胰蛋白酶购自Gibco公司；RIPA裂解液购自Beyotime Biotech公司；SDS-PAGE凝胶配胶试剂盒购自Beyotime Biotech公司；显影定影试剂盒购自武汉巴菲尔生物技术服务有限公司；GAPDH抗体购自Proteintech Group公司；ALOX12抗体购自Invitrogen有限公司；HRP标记山羊抗兔二抗购自Proteintech Group公司；HRP标记山羊抗鼠二抗购自Proteintech Group公司。

1.1.2 实验细胞及实验动物 L-02细胞为三峡大学构建并惠赠予本实验室使用。清洁级雄性C57/BL6雄性小鼠36只，购自三峡大学实验动物中心，实验动物生产许可证号：SYXK（鄂）2022—0061；实验室动物中心动物伦理委员会批准号：2023070E。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞实验及动物实验分组及处理 L-02细胞分组：对照组、缺氧/复氧（H/R）组、H/R+吡非尼酮组，H/R组细胞恒温箱培养后缺氧8 h，复氧12 h，H/R+吡非尼酮细胞在恒温箱培养后予以吡非尼酮预（0.025 μmol/L）处理24 h，后予以缺氧8 h，复氧12 h。雄性C57/BL6小鼠36只分3组：假手术组、缺血/再灌注（I/R）组、I/R+吡非尼酮组，每组12只，I/R组与I/R+吡非尼酮组连续1周分别给予等量生理盐水与吡非尼酮（0.025 mL/g）预处理，然后用动脉夹夹闭肝动脉和肝静脉30 min，松开动脉夹，再灌注2 h。

1.2.2 L-02细胞H/R模型及小鼠肝脏I/R模型的建立 细胞造模：L-02细胞培养3 d后铺6孔板达到75%~80%左右，吡非尼酮处理12 h，按分组予以缺氧8 h，复氧12 h处理。动物造模：10%水合氯醛0.1 mL/10 g剂量麻醉小鼠，消毒，打开腹腔，分离门静脉（肝动脉、门静脉和胆管）用无创动脉夹夹闭30 min后松开，肝脏由紫黑色变为红色，再灌注成功，再灌注2 h后收集血液样本和肝脏样本。

1.2.3 Western blot法 用BCA法测蛋白质浓度后步骤：(1) 上样；(2) 电泳；(3) 制胶；(4) 转膜；(5) 封闭；(6) 孵一抗4 ℃过夜；(7) 孵二抗室温孵育2 h；(8) 显影。一抗抗体稀释比例：GAPDH 1∶5 000、ALOX12 1∶2 000；二抗抗体稀释比例：1∶4 000。

1.2.4 ELISA实验 TNF-α、IL-6、IL-1β的浓度采用相应的试剂盒进行检测。

1.2.5 肝功能检测 取小鼠血液样本上清，使用生化分析仪检测丙氨酸氨基转氨酶（ALT）及天门冬氨酸氨基转移酶（AST）的含量。

1.2.6 HE染色 取肝脏组织多聚甲醛固定，脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋、切片、烘烤固定、切片、染色，显微镜下观察肝细胞形态学改变。

1.3 统计学处理

所有实验结果均以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，两组间的数据比较采用独立样本t检验，多组数据间比较采用单因素方差分析；采用GraphPad Prism 9软件绘制直方图，$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞实验

2.1.1 各组细胞炎症因子水平 与对照组比较，H/R组与H/R+吡非尼酮组TNF-α、IL1-β、IL-6水平均明显升高，但H/R+吡非尼酮组的上述炎症因子升高程度明显低于H/R组（均$P<0.05$）（图1）。

2.1.2 各组细胞ALOX12蛋白表达水平 与对照组比较，H/R组ALOX12蛋白表达有所上调，但差异无统计学意义（$P>0.05$）；H/R+吡非尼酮组ALOX12蛋白表达明显上调，与对照组及H/R组差异均有统计学意义（均$P<0.05$）（图2）。

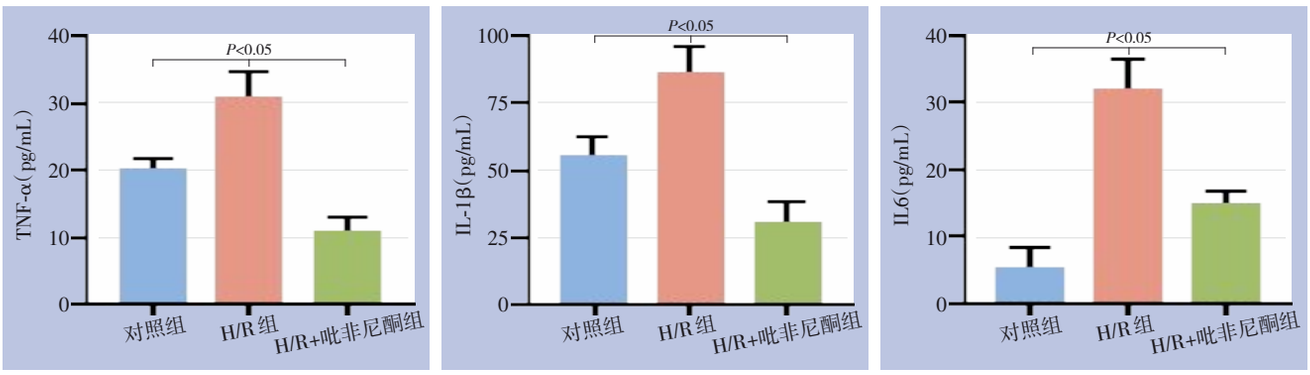

图 1　ELISA 检测各组细胞炎症因子水平

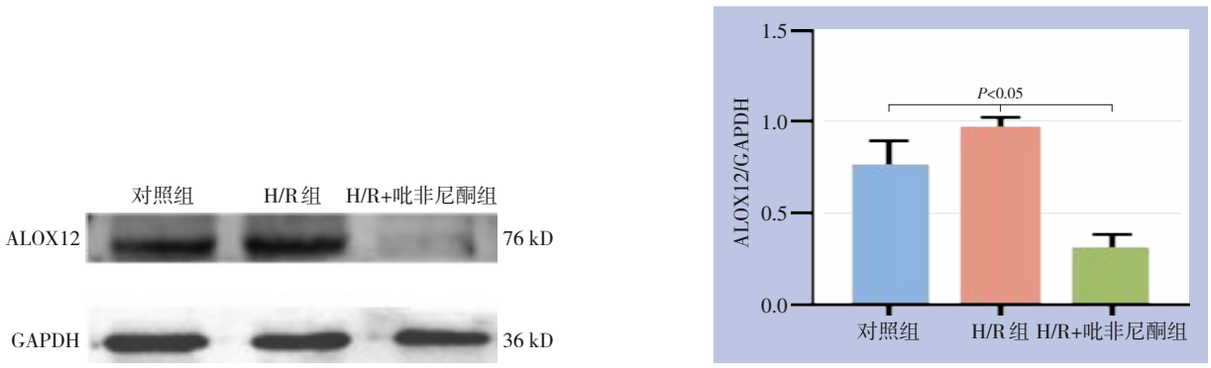

图 2　Western blot 检测各组细胞 ALOX12 蛋白表达

2.2　动物实验

2.2.1　各组小鼠肝组织病理学检测　假手术组肝小叶基本完整，肝细胞排列紧密，分布均匀；与假手术组比较，I/R 组与 I/R+吡非尼酮组肝组织均有不同程度的损伤，但前者损伤严重，可见大量肝细胞坏死及水肿，后者损伤较轻，可见肝细胞部分坏死及水肿（图 3）。

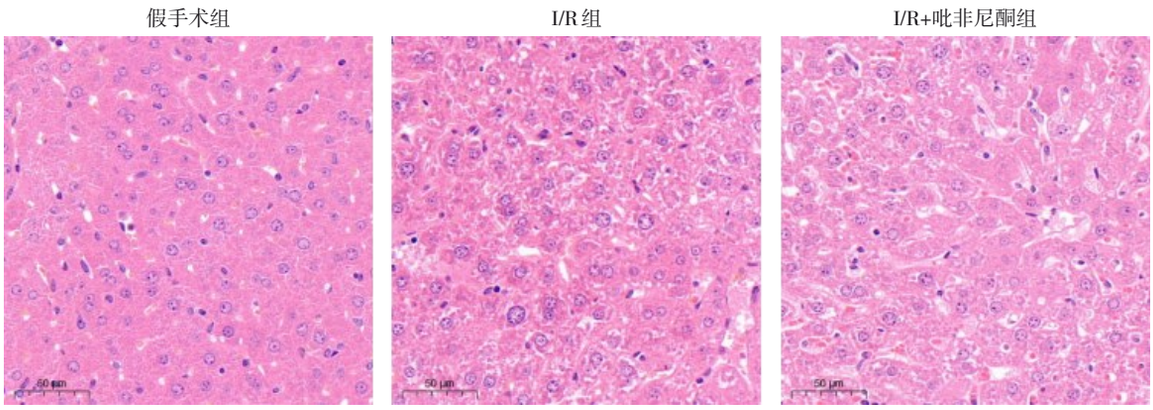

图 3　各组肝组织 HE 染色

2.2.2　各组小鼠肝功能指标　与假手术组比较，I/R 组与 I/R+吡非尼酮组 ALT、AST 水平均明显升高，但 I/R+吡非尼酮组 ALT、AST 的升高程度明显小于 I/R 组（均 $P<0.05$）（图 4）。

2.2.3　各组小鼠肝组织 ALOX12 蛋白表达水平　与假手术组比较，I/R 组与 I/R+吡非尼酮组肝组织 ALOX12 蛋白表达均明显上调，但 I/R+吡非尼酮组 ALOX12 蛋白表达的上调程度明显低于 I/R 组（均 $P<0.05$）（图 5）。

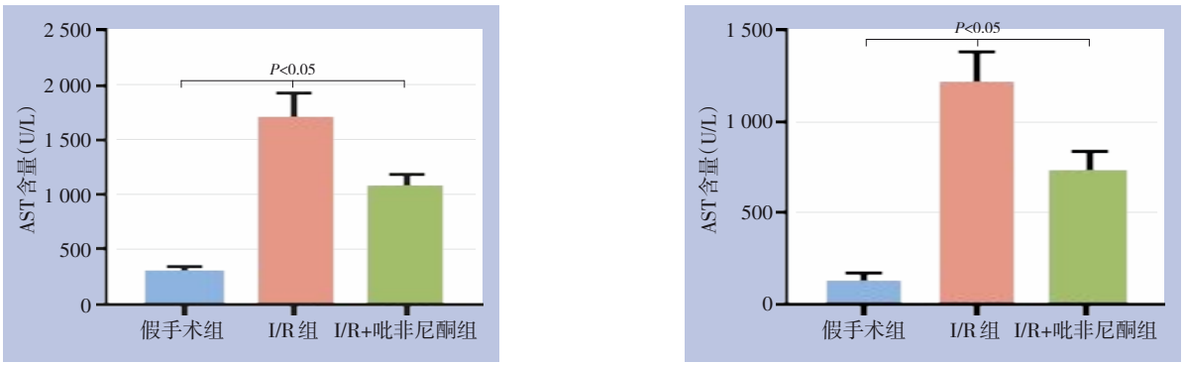

图4 各组小鼠肝功能指标比较

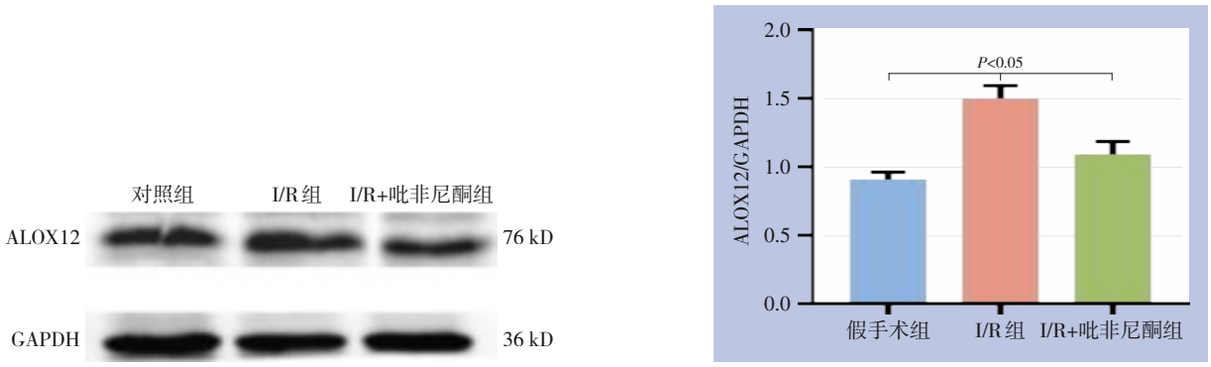

图5 各组小鼠肝组织ALOX12蛋白表达水平比较

3 讨 论

HIRI是临床上肝脏手术后常见的并发症之一。肝脏手术后虽然可以通过恰好的时机恢复血流补救肝脏的缺血，但是缺血肝脏再灌注依旧可以加剧组织损伤，甚至发展成无法挽救的严重坏死，目前临床中仍缺乏可以减弱HIRI的有用办法[1]。本实验通过细胞实验和动物实验并在两个层面上观察了吡非尼酮药物对HIRI作用，结果显示，吡非尼酮能减轻HIRI的炎症反应和肝损伤程度。

HIRI的涉及多种机制，包括炎症因子、氧化应激/活性氧、细胞凋亡等[11-14]。本研究首先在细胞实验中选择了TNF-α、IL-1β、IL-6作为炎症相关因子进行检测，结果显示，在H/R模型肝细胞中，TNF-α、IL-1β、IL-6的水平增高，而吡非尼酮预处理能抑制H/R肝细胞中上述炎症因子的释放。由于ALOX12信号通路在HIRI中起了关键作用，本研究继续观察了ALOX12蛋白在H/R肝细胞中的表达，结果显示，H/R肝细胞中ALOX12蛋白表达有所升高，而吡非尼酮预处理的肝细胞中ALOX12蛋白表达在H/R背景下仍低于对照组，说明吡非尼酮能有效抑制ALOX12的表达，且其抑制炎症反应的作用可能与该机制有关。

随后，本研究在动物模型中进一步验证吡非尼酮的抗HIRI作用，形态学与肝功能指标均显示，吡非尼酮预处理能有效减轻HIRI小鼠的肝组织损伤；进一步分析小鼠肝组织ALOX12蛋白的表达情况，结果显示，无论是I/R组还是I/R+吡非尼酮组肝组织ALOX12蛋白表达均较假手术组升高，这一点与细胞实验有所不同，但I/R+吡非尼酮组的升高程度明显减弱。笔者推测这种差异可能是因为细胞内的反应与在整体系统内反应的差异造成，但可以确定的是吡非尼酮能抑制ALOX12蛋白表达。

近些年，对于HIRI预防也有较多研究，先后研究了前列腺素E1、白藜芦醇、褪黑素、异丙酚、氨溴索、氟比洛芬酯、牛磺熊去氧胆酸、褪黑素在HIRI中的保护作用，而关于吡非尼酮在HIRI的研究中很少见[15-22]。吡非尼酮是一种低毒性、可以治疗纤维化及损伤并极具有潜力的药物[7]，近年来的基础研究和临床研究均发现吡非尼酮在多种器官的缺血再灌注损伤中发挥保护作用，比如吡非尼酮可以减轻大鼠小肠缺血再灌注损伤，减轻大鼠肺缺血再灌注损伤，预防大鼠急性肾损伤，改

善睾丸扭转诱导的大鼠缺血再灌注损伤[3-6,19]。关于吡非尼酮在 HIRI 的作用机制尚不明确，本研究结果将为其在 HIRI 作用机制深入探讨提供了切入点。

总之，本研究结果表明，吡非尼酮可通过抑制炎症反应发挥肝脏保护作用，其部分机制可能与其下调 ALOX12 的表达有关，进一步研究吡非尼酮抗 HIRI 的机制具有一定的科学价值和实际意义。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

作者贡献声明：胡军负责研究设计与论文统稿；李丹负责文献综述、实验实施、数据分析及初稿撰写；戴鑫杰负责数据核查与方法优化；闵楠负责图表制作、语言润色与论文审校；吴登鼎负责数据收集与整理；杨新宇负责数据收集与整理；艾空、向康负责数据收集与整理。

参考文献

[1] Zhang XJ, Cheng X, Yan ZZ, et al. An ALOX12-12-HETE-GPR31 signaling axis is a key mediator of hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. Nat Med, 2018, 24(1):73−83. doi:10.1038/nm.4451.

[2] Ke BB, Kupiec-Weglinski JW. Lipid metabolites: the alarm signal to trigger liver ischemia-reperfusion injury[J]. Transplantation, 2018, 102(6):887−889. doi:10.1097/TP.0000000000002206.

[3] Kaibori M, Yanagida H, Yokoigawa N, et al. Effect of pirfenidone on induction of chemokines in rat hepatocytes[J]. Transplant Proc, 2004, 36(7):1980−1984. doi:10.1016/j.transproceed.2004.08.065.

[4] Saito M, Chen-Yoshikawa TF, Suetsugu K, et al. Pirfenidone alleviates lung ischemia-reperfusion injury in a rat model[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2019, 158(1): 289−296. doi: 10.1016/j.jtcvs.2018.08.098.[PubMed]

[5] Arumugam TV, Shiels IA, Margolin SB, et al. Pirfenidone attenuates ischaemia-reperfusion injury in the rat small intestine[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2002, 29(11):996−1000. doi:10.1046/j.1440−1681.2002.03766.x.

[6] Kölükçü E, Firat F, Deresoy FA, et al. The effects of pirfenidone on ischaemia-reperfusion injury in testicular torsion-induced rat model[J]. Andrologia, 2021, 53(2):e13922. doi:10.1111/and.13922.

[7] 张讯, 陈聪地, 姚莎, 等. 吡非尼酮及其衍生物的研究进展[J]. 云南化工, 2024, 51(7): 17−20. doi: 10.3969/j. issn. 1004−275X. 2024.07.05.

Zhang X, Chen CD, Yao S, et al. Research Progress of Pirfenidone and Its Derivatives[J]. Yunnan Chemical Technology, 2024, 51(7): 17−20. doi:10.3969/j.issn.1004−275X.2024.07.05.

[8] Sharma I, Liao YJ, Zheng XP, et al. Modulation of gentamicin-induced acute kidney injury by myo-inositol oxygenase via the ROS/ALOX-12/12-HETE/GPR31 signaling pathway[J]. JCI Insight, 2022, 7(6):e155487. doi:10.1172/jci.insight.155487.

[9] Napolitano M. The role of the 12(S) -HETE/GPR31/12-HETER axis in cancer and ischemia-reperfusion injury[J]. Biochem Soc Trans, 2019, 47(2):743−754. doi:10.1042/BST20180635.

[10] 刘丽云, 赵娜, 王琳琳, 等. 吡非尼酮和尼达尼布药物的研究进展[J]. 山西化工, 2022, 42(2):49−51. doi:10.16525/j.cnki.cn14−1109/tq.2022.02.017.

Liu LY, Zhao N, Wang LL, et al. Research progress of pirfenidone and nintedanib drugs[J]. Shanxi Chemical Industry, 2022, 42(2):49−51. doi:10.16525/j.cnki.cn14−1109/tq.2022.02.017.

[11] Dar WA, Sullivan E, Bynon JS, et al. Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: cellular and molecular mechanisms[J]. Liver Int, 2019, 39(5):788−801. doi:10.1111/liv.14091.

[12] 白杨, 史冀华, 张水军. 程序性细胞死亡在肝脏缺血−再灌注损伤中的作用研究进展[J]. 器官移植, 2022, 13(5): 647−652. doi: 10.3969/j.issn.1674−7445.2022.05.015.

Bai Y, Shi JH, Zhang SJ. Research progress on the role of programmed cell death in hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. Organ Transplantation, 2022, 13(5): 647−652. doi: 10.3969/j.issn.1674−7445.2022.05.015.

[13] 邓银芝, 倪利华. 肝脏缺血再灌注损伤的机制及防治策略的研究进展[J]. 微循环学杂志, 2023, 33(2): 109−115. doi: 10.3969/j.issn.1005−1740.2023.02.020.

Deng YZ, Ni LH. Research Progress on the Mechanism and Prevention Strategies of Hepatic Ischemia-reperfusion Injury[J]. Chinese Journal of Microcirculation, 2023, 33(2): 109−115. doi: 10.3969/j.issn.1005−1740.2023.02.020.

[14] 陈亚茹, 胡宇凡, 闫瑾, 等. 药物预处理在肝脏缺血再灌注损伤中的保护作用研究进展[J]. 空军军医大学学报, 2024, 45(1):43−47. doi:10.13276/j.issn.2097−1656.2024.01.010.

Chen YR, Hu YF, Yan J, et al. Research progress on the protective effect of pharmacological preconditioning on hepatic ischemic-reperfusion injury[J]. Journal of Air Force Medical University, 2024, 45(1):43−47. doi:10.13276/j.issn.2097−1656.2024.01.010.

[15] 蒋凯, 张靖岩, 劳华毅, 等. 氨溴索对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(1):49−53. doi:10.7659/j.issn.1005−6947.2013.01.012.

Jiang K, Zhang JY, Lao HY, et al. Protective effect of ambroxol on hepatic ischemia reperfusion injury in rats[J]. China Journal of General Surgery, 2013, 22(1): 49−53. doi: 10.7659/j. issn. 1005−6947.2013.01.012.

[16] 何宗全, 章安庆, 叶显道, 等. 牛磺熊去氧胆酸对大鼠肝脏缺血再

灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(7):990-995. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.013.

He ZQ, Zhang AQ, Ye XD, et al. Protective effect of tauroursodeoxycholic acid against hepatic ischemia reperfusion injury in rats[J]. China Journal of General Surgery, 2015, 24(7): 990-995. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.013.

[17] 李玲, 傅华, 李汝泓, 等. 氟比洛酚酯对肝叶切除患者肝缺血再灌损伤保护作用的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(12):1810-1814. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.024.

Li L, Fu H, Li RH, et al. Protective effect of flurbiprofen axetil on hepatic ischemia-reperfusion injury in patients undergoing hepatectomy[J]. China Journal of General Surgery, 2016, 25(12): 1810-1814. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.12.024.

[18] 周党军, 吕毅, 安东均, 等. 门静脉注射异丙酚对家兔肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(7):654-657. doi:10.3969/j.issn.1005-6947.2008.07.007.

Zhou DJ, Lü Y, An DJ, et al. Protective effect of propofol delivered through portal vein on hepatic ischemia reperfusion injury in rabbits[J]. China Journal of General Surgery, 2008, 17(7):654-657. doi:10.3969/j.issn.1005-6947.2008.07.007.

[19] 王玉柱, 明英姿, 熊力, 等. 前列腺素E1对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(1):41-44. doi: 10.3969/j.issn.1005-6947.2008.01.012.

Wang YZ, Ming YZ, Xiong L, et al. Protective effects of Prostaglandin E1 in rat hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. China Journal of General Surgery, 2008, 17(1):41-44. doi:10.3969/j.issn.1005-6947.2008.01.012.

[20] 孙水平, 孙中杰, 吴胜利, 等. 白藜芦醇对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(2): 149-151. doi: 10.3969/j.issn.1005-6947.2005.02.020.

Sun SP, Sun ZJ, Wu SL, et al. The protective action of resveratrol on liver ischemia-reperfusion injury in rats[J]. China Journal of General Surgery, 2005, 14(2): 149-151. doi: 10.3969/j. issn. 1005-6947.2005.02.020.

[21] 张笑春, 张瑞明, 陈文斌, 等. 褪黑素对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(7): 538-541. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2005.07.018.

Zhang XC, Zhang RM, Chen WB, et al. Protective effect of melatonin on ischemia-reperfusion injury in rat liver [J]. China Journal of General Surgery, 2005, 14(7): 538-541. doi: 10.7659/j. issn.1005-6947.2005.07.018.

[22] 齐欣, 车向前, 王超, 等. 中药预处理对肝脏缺血再灌注损伤保护作用的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(1):88-90. doi: 10.3969/j.issn.1005-6947.2008.01.025.

Qi X, Che XW, Wang C, et al. Research advances on protective effect of Chinese medicine preconditioning on liver ischemia-reperfusion injury[J]. China Journal of General Surgery, 2008, 17 (1):88-90. doi:10.3969/j.issn.1005-6947.2008.01.025.

（本文编辑　姜晖）

本文引用格式：李丹, 胡军, 戴鑫杰, 等. 吡非尼酮对肝缺血再灌注损伤的影响及其与ALOX12通路的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2024, 33(11):1935-1940. doi：10.7659/j.issn.1005-6947.2024.11.023

***Cite this article as*:** Li D, Hu J, Dai XJ, et al. The effects of pirfenidone on hepatic ischemia-reperfusion injury and its relationship with the ALOX12 pathway[J]. Chin J Gen Surg, 2024, 33(11): 1935-1940. doi：10.7659/j.issn.1005-6947.2024.11.023