



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.015  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.015  
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(1):97-102.

· 基础研究 ·

## 硫化氢抑制自噬减轻肝硬化大鼠肝脏缺血再灌注损伤

魏来, 陈文雁, 邹毅, 黄红珏, 潘冰冰, 金盛, 孔高茵

(湖南省人民医院 麻醉科, 湖南 长沙 410005)

### 摘要

**目的:** 探讨硫化氢 ( $H_2S$ ) 预处理对肝硬化大鼠肝脏缺血再灌注损伤 (HIRI) 的影响及机制。

**方法:** 将 32 只采用胆总管结扎法制作的肝硬化模型大鼠随机均分为 4 组, 分别行假手术 (假手术组)、30 min 肝门阻断及 4 h 再灌注诱导 HIRI 模型 (HIRI 组)、硫化氢钠 (NaHS, 外源性  $H_2S$  供体) 预处理 +HIRI 模型诱导 (NaHS 组)、NaHS+ 雷帕霉素 (RPM, mTOR 抑制剂) 预处理 +HIRI 模型诱导 (RPM 组), 随后检测血清谷草转氨酶 (AST)、谷丙转氨酶 (ALT) 浓度, 分别用光镜与电镜观察肝组织病理学变化与自噬水平, Western blot 检测肝组织 LC3-II (自噬特异性标记) 以及 mTOR、磷酸化 mTOR (p-mTOR) 蛋白表达。

**结果:** 除假手术组外, 其余各组肝组织在肝硬化表现的基础上均出现明显的炎症反应、细胞肿胀与局灶性坏死等损伤改变, 但 NaHS 组的损伤程度明显轻于 HIRI 组与 RPM 组。与假手术组比较, 其他各组血清 AST、ALT 水平均明显升高、肝细胞内自噬体数量明显增多、肝组织 LC3-II 蛋白表达明显升高, 而 p-mTOR 蛋白表达 (p-mTOR/mTOR 比值) 明显降低 (均  $P < 0.05$ ), 但 NaHS 组转氨酶升高幅度、细胞内噬体数量、肝组织 LC3-II 蛋白升高及 p-mTOR 蛋白降低程度均明显低于 HIRI 组 (均  $P < 0.05$ ), 而 RPM 组与 HIRI 组间各项指标差异均无统计学意义 (均  $P > 0.05$ )。

**结论:**  $H_2S$  预处理能减轻肝硬化大鼠 HIRI, 其机制可能与通过活化 mTOR 途径抑制自噬有关。

### 关键词

肝; 再灌注损伤; 肝硬化; 硫化氢; 自噬

中图分类号: R657.3

## Protective effect of hydrogen sulfide against hepatic ischemia-reperfusion injury in cirrhotic rats by autophagy inhibition

WEI Lai, CHEN Wenyan, ZOU Yi, HUANG Hongjue, PAN Bingbing, JIN Sheng, KONG Gaoyin

(Department of Anesthesiology, Hunan Provincial People's Hospital, Changsha 410005, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the influence of hydrogen sulfide ( $H_2S$ ) pretreatment on hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI) in rats with liver cirrhosis and the mechanism.

**Methods:** Thirty-two rats with liver cirrhosis that was induced by common bile duct ligation were equally randomized into 4 groups, and were subjected to sham operation (sham group), HIRI model creation by 30-min hepatic inflow occlusion/4-h reperfusion (HIRI group), sodium hydrosulfide (NaHS, an exogenous  $H_2S$  donor) pretreatment and then HIRI model creation (NaHS group), and NaHS plus rapamycin (RPM, mTOR

基金项目: 湖南省科技厅科研条件创新专项立项资助项目 (2014TT2019)。

收稿日期: 2015-11-10; 修订日期: 2015-12-18。

作者简介: 魏来, 湖南省人民医院副主任医师, 主要从事围术期重要器官功能保护方面的研究。

通信作者: 陈文雁, Email: 448027999@qq.com

inhibitor) pretreatment and then HIRI model creation (RPM group), respectively. Subsequently, the serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were measured, the pathologic and autophagic changes in the liver tissues were observed by light microscope and electron microscope respectively, and the protein expressions of LC3-II (an autophagosome marker), mTOR and phosphorylated mTOR (p-mTOR) in the liver tissues were determined by Western blot analysis.

**Results:** Except in sham group, the liver tissues in all the other groups, apart from the presence of cirrhosis, presented the injury-induced changes that included inflammatory responses, cellular swelling and focal necrosis, but the degree of these changes in NaHS group was markedly milder than that in HIRI group or RPM group. Compared with sham group, the serum levels of AST and ALT were elevated, the number of autophagosomes in hepatic cells was increased, and protein expression of LC3-II was up-regulated while p-mTOR (p-mTOR/mTOR ratio) in liver tissues was down-regulated significantly in the other three groups ( $P < 0.05$ ), in which the amplitude of aminotransferase increase, number of autophagosomes in hepatic cells, degree of LC3-II protein increase and p-mTOR protein decrease in NaHS group were all significantly lower than those in HIRI group (all  $P < 0.05$ ), but all these parameters showed no statistical difference between RPM group and HIRI group (all  $P > 0.05$ ).

**Conclusion:** H<sub>2</sub>S pretreatment can alleviate HIRI in cirrhotic rats, and its mechanism may be responsible for autophagy inhibition via mTOR signaling pathway activation.

#### Key words

Liver; Reperfusion Injury; Liver Cirrhosis; Hydrogen Sulfide; Autophagy

CLC number: R657.3

肝硬化是大多数肝脏疾病的最终病理表现,常伴随较差的肝功能储备,肝脏手术过程中缺血再灌注损伤可进一步损害肝功能,甚至导致肝衰竭,因此减轻肝硬化患者肝脏缺血再灌注损伤(hepatic ischemia-reperfusion injury, HIRI)是临床工作的重点和难点。硫化氢(hydrogen sulfide, H<sub>2</sub>S)是重要的内源性气体信号分子,参与多种生理和病生过程,有研究表明H<sub>2</sub>S对正常大鼠缺血再灌注器官具有保护作用,机制可能与对自噬的调节相关<sup>[1]</sup>。基于以上研究基础,本研究提出假说:H<sub>2</sub>S能通过调节自噬减轻肝硬化大鼠的肝脏缺血再灌注损伤。本研究通过构建肝硬化大鼠模型,摸索H<sub>2</sub>S对肝硬化大鼠HIRI的影响,并观察自噬在其中发挥的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与主要试剂

SPF级雄性SD大鼠,32只,体质量200~250 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司;外源性H<sub>2</sub>S供体硫氢化钠(NaHS)、mTOR抑制剂雷帕霉素(RPM)购自美国Sigma-Aldrich公司,兔抗大鼠LC3 II抗体、兔抗大鼠mTOR抗体、兔抗大

鼠p-mTOR抗体、兔抗大鼠β-actin抗体购自美国Cell Signaling Technology公司。

### 1.2 模型建立

胆总管结扎肝硬化模型:大鼠称重后,0.3%戊巴比妥钠1 mL/100 g腹腔注射麻醉,固定,消毒,中上腹部正中切口进腹,在十二指肠降部肠系膜中找到透明的胆总管,双重结扎,常规关腹。根据预实验结果确定肝硬化模型成模时间为30 d。HIRI模型:大鼠麻醉后固定,消毒铺巾,原切口进腹,分离组织,暴露第一肝门,无损伤血管夹Pringle法阻断肝动脉、门静脉和胆管造成缺血,松开血管夹即开放形成再灌注。

### 1.3 动物分组和观察指标

32只肝硬化大鼠随机分为4组:假手术组,HIRI组,NaHS组,RPM组。假手术组仅开腹及游离暴露肝门,不结扎;HIRI组行肝门阻断30 min,再灌注4 h建立HIRI模型;NaHS组和RPM组建立HIRI模型,并于开放阻断前5 min腹腔注射NaHS 28 μmol/kg, RPM组给予NaHS 28 μmol/kg后静脉注射雷帕霉素5 mg/kg, HIRI组注射等剂量生理盐水。

各组再灌注末(假手术组于相应时间)于下腔静脉取血3 mL,静置,4 000 r/min 4 ℃离心15 min、收集上层血清,全自动生化仪检测谷丙

转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 含量; 取部分左肝外叶组织, 4 ℃生理盐水冲洗, 10%福尔马林固定24 h, 脱水, 石蜡包埋, 切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色后光学显微镜下行病理学检查; 取部分左肝外叶组织4 ℃生理盐水冲洗, 2.5%戊二醛固定, 脱水、包埋、染色后透射电镜 (日立H-7500) 观察检查肝细胞中自噬体, 每个标本随机选取3~5个高倍视野 ( $\times 8\ 900$ ) 用于自噬体计数; 取部分左肝外叶组织, 用Western blot法检测各组细胞自噬特异性标记LC3-II、mTOR、磷酸化mTOR (p-mTOR) 蛋白表达水平, 计算条带光密度, 计算LC3-II/actin和p-mTOR/mTOR比值, 以LC3-II/actin比值反映肝细胞自噬情况, 以p-mTOR/mTOR比值反映mTOR信号通路的活化程度。

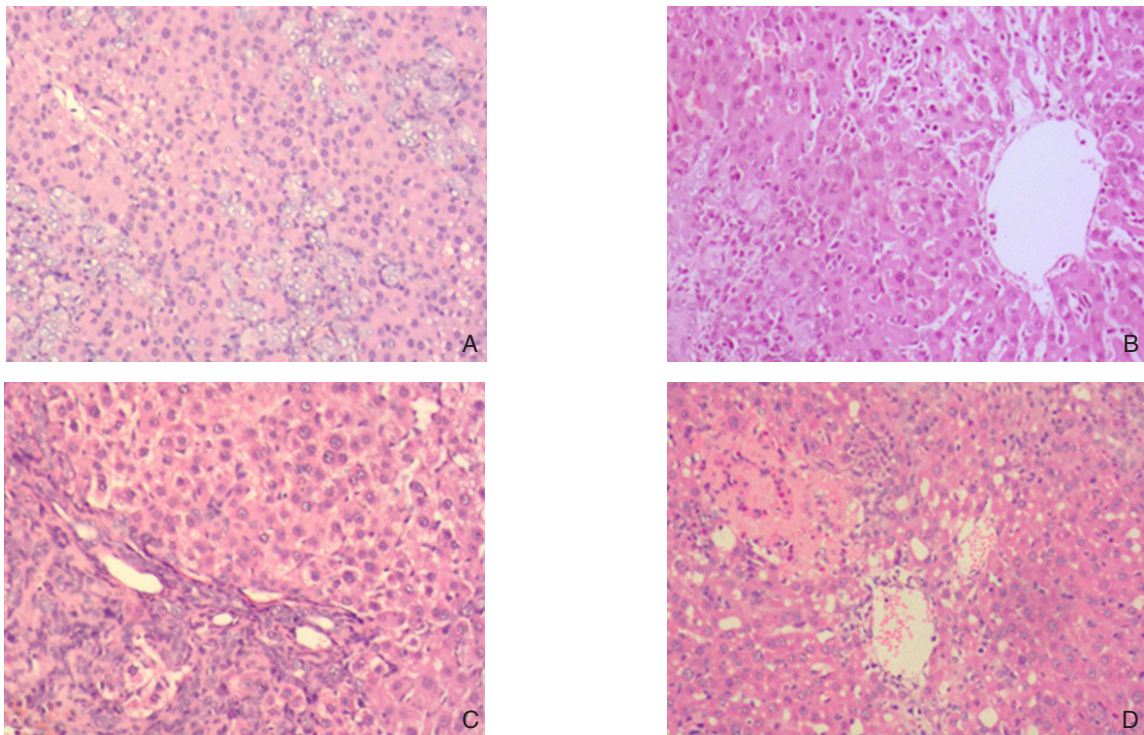


图1 肝组织病理学检查 (HE  $\times 100$ ) A: 假手术组; B: HIRI组; C: NaHS组; D: RPM组

Figure 1 Pathological examination of the liver specimens (HE  $\times 100$ ) A: Sham group; B: HIRI group; C: NaHS group; D: RPM group

## 2.2 血清转氨酶检测结果

与假手术组比较, 其余各组缺血再灌注4 h后AST、ALT水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 其中NaHS组较HIRI组和RPM组损伤轻 ( $P < 0.05$ ), HIRI组和RPM组无统计学差异 ( $P > 0.05$ ) (表1)。

## 1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 计量资料采用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝脏病理学改变

假手术组肝窦紊乱, 但无明显炎症细胞浸润、细胞肿胀、坏死表现; HIRI组和RPM组肝窦紊乱、明显炎症细胞浸润、肝细胞严重肿胀、较多局灶坏死; NaHS组肝窦紊乱、肝细胞肿胀变性、坏死以及炎症细胞浸润, 但病变程度较HIRI组和RPM组减轻 (图1)。

表1 各组血清ALT、AST水平比较 ( $n=8$ )

Table 1 Comparison of the serum ALT and AST levels among groups ( $n=8$ )

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)
假手术组	146.5 $\pm$ 16.5	253.8 $\pm$ 25.5
HIRI组	623.54 $\pm$ 35.7 <sup>1)</sup>	853.4 $\pm$ 45.7 <sup>1)</sup>
NaSH组	378.8 $\pm$ 24.9 <sup>1),2)</sup>	464.3 $\pm$ 32.6 <sup>1),2)</sup>
RPM组	588.2 $\pm$ 24.7 <sup>1)</sup>	784.5 $\pm$ 46.3 <sup>1)</sup>

注: 1) 与假手术组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 与HIRI组比较,  $P < 0.05$

Note: 1)  $P < 0.05$  vs. sham group; 2)  $P < 0.05$  vs. HIRI group



### 2.3 电镜观察结果

透射电镜下观察自噬体数量，与假手术组比较，其余3组自噬体数量明显增加（均 $P < 0.05$ ），

HIRI组和RPM组之间无统计学差异（ $P > 0.05$ ），NaHS组明显少于HIRI组和RPM组（均 $P < 0.05$ ）（图2）。

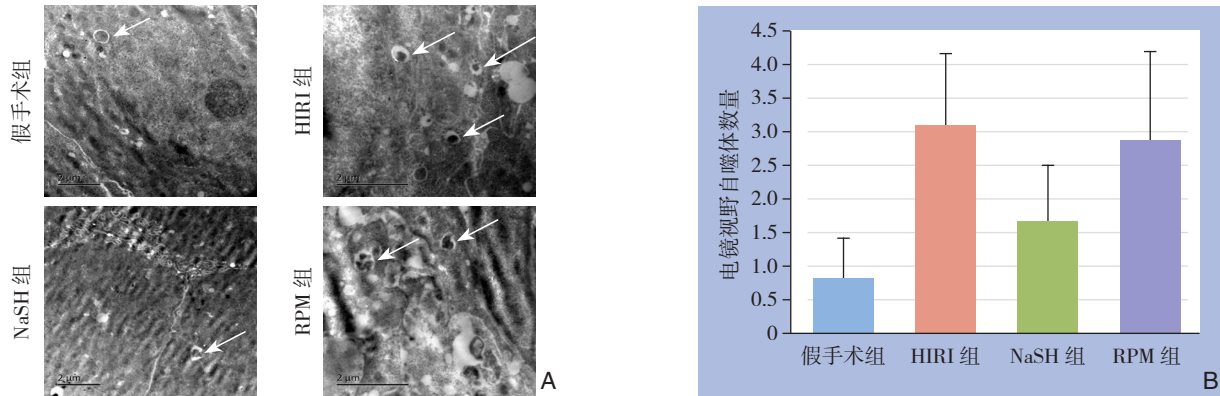


图 2 各组肝组织自噬情况 A: 电镜照片 ( $\times 8\ 900$ , 箭头示自噬体); B: 各组肝细胞自噬体数量比较

**Figure 2 Autophagy observation in liver tissues of each group** A: Electron microscope images ( $\times 8\ 900$ , arrow marking the autophagosomes); B: Comparison of the number of autophagosomes in the hepatic cells among groups

### 2.4 肝组织 LC3-II、mTOR、p-mTOR 蛋白表达

与假手术组比较，其余3组的LC3-II蛋白表达水平（LC3-II/actin比值）均明显增高（均 $P < 0.05$ ），其中NaHS组低于HIRI组和RPM组（均 $P < 0.05$ ），HIRI与RPM组无统计学差异

（ $P > 0.05$ ）；其余3组p-mTOR水平（p-mTOR/mTOR比值）均明显降低（均 $P < 0.05$ ），其中NaHS组高于HIRI组和RPM组（均 $P < 0.05$ ），HIRI和RPM组无统计学差异（ $P > 0.05$ ）（图3）。

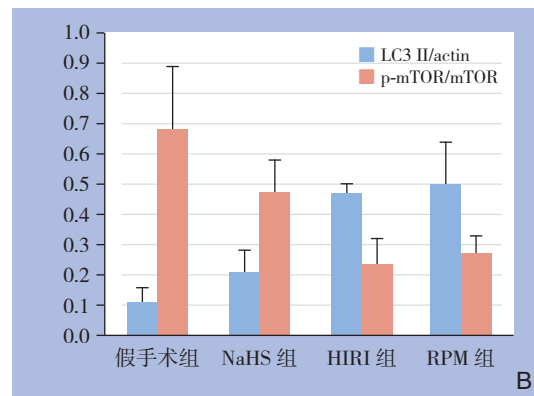
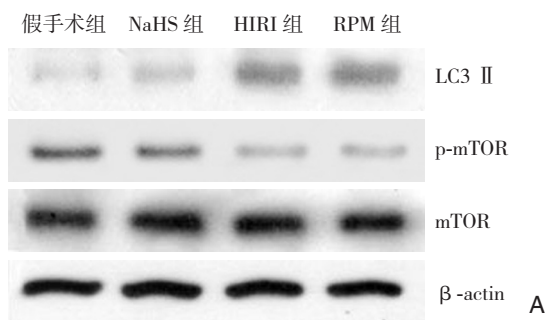


图 3 各组肝组织 LC3-II、p-mTOR、mTOR 表达 A: Western blot 结果; B: 蛋白表达量比较

**Figure 3 Expressions of LC3-II, p-mTOR and mTOR in liver tissues of group** A: Results of Western blot analysis; B: Comparison of protein expression levels

## 3 讨论

肝移植、肝叶切除术中常需短暂阻断入肝血流，有利于维持术野清晰和减少出血，但伴随的缺血再灌注损伤可严重损害肝功能<sup>[1]</sup>。对于肝功能

受损、储备极其有限的肝硬化患者而言，HIRI更是对机体的重大打击，可能造成术后肝功能衰竭甚至死亡<sup>[2]</sup>，因此深入研究HIRI相关机制及防治办法具有重要的意义<sup>[3]</sup>。

H<sub>2</sub>S是机体内源性气体信号分子，在体内以

低浓度存在,可自由扩散通过细胞膜,参与多种重要的生理和病生过程。硫化氢是常用的外源性H<sub>2</sub>S供体<sup>[4-5]</sup>。研究表明H<sub>2</sub>S在HIRI中能产生保护作用,其机制涉及直接或间接对抗氧化应激<sup>[6]</sup>、eNOS的活化和NO的生成<sup>[7]</sup>、Akt-GSK-3 $\beta$ 信号通路的激活和线粒体渗透性转化<sup>[8]</sup>以及对自噬的调控等。肝硬化是肝病发展的终末状态,围术期HIRI对其影响更大,目前H<sub>2</sub>S对肝硬化大鼠肝功能保护的研究较少,值得深入研究。自噬是真核细胞利用溶酶体降解受损的长寿蛋白和细胞器提供能量的过程,是细胞对不利环境的适应性反应。自噬在HIRI中发挥的作用目前尚未完全明确,体内和体外研究均发现激活自噬能减少活性氧簇对线粒体的损害,从而减轻HIRI<sup>[9]</sup>,而通过药物抑制自噬也能减轻HIRI<sup>[10]</sup>,提示自噬与HIRI关系密切而复杂,在不同阶段可发挥不同作用<sup>[11]</sup>。

本研究通过胆总管结扎建立肝硬化模型,观察H<sub>2</sub>S对肝硬化大鼠HIRI的影响及自噬在其中发挥的作用,模拟临床上由于胆道阻塞、胆汁淤积,高浓度胆酸和胆红素损伤肝细胞,造成胆汁性肝硬化的患者经历HIRI的过程。预实验时胆总管结扎后取肝脏组织行Masson染色,第30天时观察到肝内大量增生的胆管上皮细胞呈花环状密布,胆管上皮细胞外周胶原沉积,细胞外基质增加、肝星状细胞活化、增殖,是肝纤维化的中心环节<sup>[12]</sup>,从而确定胆汁性肝硬化模型制备成功。在肝硬化的基础上,肝脏经历缺血再灌注损伤对肝功能造成巨大的影响,表现为AST、ALT急剧上升,而NaHS组肝功能指标上升低于HIRI组,HE染色光镜下肝脏组织病理学改变显示肝损伤的程度和范围均低于HIRI组,此保护效应可被mTOR抑制剂雷帕霉素部分逆转。

自噬是细胞内的再循环系统,在应激状态下能提供能量、清除受损蛋白和细胞器,促进细胞生存,是机体重要的保护和修复机制,与细胞坏死、凋亡关系密切<sup>[13]</sup>,过度或失控的自噬通过激烈的自我消化会促进细胞死亡,对肿瘤、低氧、炎症、饥饿等的研究均提示自噬在其中发挥“双刃剑”作用,可能促进细胞生存也可能损伤细胞<sup>[14-15]</sup>。自噬的调控非常复杂,mTOR是其中的中心信号调节因子。mTOR是一种非典型的丝氨酸/苏氨酸激酶,在细胞生长、分化以及增殖等功能中起着中心调节的作用<sup>[16-17]</sup>。mTOR存在两种复合物形式,与自噬、凋亡、能量代谢相关的主

要是mTORC1<sup>[18]</sup>。mTOR的上游调控信号通路非常复杂,目前尚未完全阐明,大体上可分为PI3K/Akt依赖性和非依赖性两大途径。自噬在肝病的发展中起到了重要的作用<sup>[19]</sup>,通过药物调节自噬已经成为肝病治疗的新思路<sup>[20]</sup>。本研究中,和假手术组比较,电镜下自噬体数量和自噬标志性蛋白LC3-II的表达水平均显示,HIRI后肝细胞自噬明显增强,开放肝门前给予NaHS预处理后,再灌注4 h时NaSH组自噬比假手术组强,而弱于HIRI组。mTOR对自噬产生负向调节作用,雷帕霉素是其特异性抑制剂,能通过抑制mTORC1而激活自噬。HIRI组p-mTOR/mTOR水平较高,HIRI可以通过抑制p-mTOR激活自噬,而给予NaSH后,磷酸化形式升高,抑制自噬,提示H<sub>2</sub>S可能通过激活mTOR信号通路发挥肝脏保护作用。RPM组雷帕霉素激活自噬,导致H<sub>2</sub>S抑制LC3-II表达的作用明显减弱,但不能完全阻断H<sub>2</sub>S抑制自噬的作用,表明H<sub>2</sub>S抑制肝硬化大鼠肝细胞自噬的作用至少部分是通过mTOR信号转导通路介导的。

本研究显示H<sub>2</sub>S可能通过调节自噬发挥减轻肝硬化大鼠HIRI的作用,对H<sub>2</sub>S及其与自噬的关系进行了初步研究,在再灌注期,抑制自噬的过度表达可能有利于对抗HIRI损伤,其具体机制有待进一步深入研究。

## 参考文献

- [1] 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.  
He ZQ, Zhang AQ, YE XD, et al. Protective effect of tauroursodeoxycholic acid against hepatic ischemia reperfusion injury in rats[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(7):990-995.
- [2] Li L, Jiang HK, Li YP, et al. Hydrogen sulfide protects spinal cord and induces autophagy via miR-30c in a rat model of spinal cord ischemia-reperfusion injury[J]. J Biomed Sci, 2015, 22:50. doi: 10.1186/s12929-015-0135-1.
- [3] 章正威,王楷,梅铭惠.不同入肝血流阻断法行肝硬化大鼠肝切除的比较[J].中国普通外科杂志,2014,23(1):58-63.  
Zhang ZW, Wang K, Mei MH. Comparison of different hepatic inflow occlusion methods for hepatectomy in rats with liver cirrhosis[J]. Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(1):58-63.
- [4] 杜津,王国林.硫化氢对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响[J].中华麻醉学杂志,2011,31(9):1136-1138.

- Du J, Wang GL. Effects of hydrogen sulfide on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Chinese Journal of Anesthesiology, 2011, 31(9):1136-1138.
- [5] Sun L, Zhang S, Yu C, et al. Hydrogen sulfide reduces serum triglyceride by activating liver autophagy via the AMPK-mTOR pathway[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2015, 309(11):E925-935.
- [6] Shimada S, Fukai M, Wakayama K, et al. Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver[J]. Surg Today, 2015, 45(7):892-903.
- [7] King AL, Polhemus DJ, Bhushan S, et al. Hydrogen sulfide cytoprotective signaling is endothelial nitric oxide synthase-nitric oxide dependent[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(8):3182-3187.
- [8] Zhang Q, Fu H, Zhang H, et al. Hydrogen sulfide preconditioning protects rat liver against ischemia/reperfusion injury by activating Akt-GSK-3 $\beta$  signaling and inhibiting mitochondrial permeability transition[J]. PLoS One, 2013, 8(9):e74422. doi: 10.1371/journal.pone.0074422.
- [9] Liu A, Fang H, Wei W, et al. Ischemic preconditioning protects against liver ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1-mediated autophagy[J]. Crit Care Med, 2014, 42(12):e762-771.
- [10] Gupta NA, Kolachala VL, Jiang R, et al. Mitigation of autophagy ameliorates hepatocellular damage following ischemia-reperfusion injury in murine steatotic liver[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2014, 307(11):G1088-1099.
- [11] Cursio R, Colosetti P, Gugenheim J. Autophagy and liver ischemia-reperfusion injury[J]. Biomed Res Int, 2015: 417590. doi: 10.1155/2015/417590.
- [12] Lee UE, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011, 25(2):195-206.
- [13] Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy[J]. Biochim Biophys Acta, 2013, 1833(12):3448-3459.
- [14] Anding AL, Baehrecke EH. Autophagy in Cell Life and Cell Death[J]. Curr Top Dev Biol, 2015, 114:67-91. doi: 10.1016/bs.ctdb.2015.07.012.
- [15] Ozpolat B, Benbrook DM. Targeting autophagy in cancer management - strategies and developments[J]. Cancer Manag Res, 2015, 11(7):291-299.
- [16] Kim YC, Guan KL. mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation[J]. J Clin Invest, 2015, 125(1):25-32.
- [17] Xu X, Ye L, Araki K, et al. mTOR, linking metabolism and immunity[J]. Semin Immunol, 2012, 24(6):429-435.
- [18] Perl A. mTOR activation is a biomarker and a central pathway to autoimmune disorders, cancer, obesity, and aging[J]. Ann N Y Acad Sci, 2015, 1346(1):33-44.
- [19] Czaja MJ, Ding WX, Donohue TM Jr, et al. Functions of autophagy in normal and diseased liver[J]. Autophagy, 2013, 9(8):1131-1158.
- [20] Gracia-Sancho J, Guixé-Muntet S, Hide D, et al. Modulation of autophagy for the treatment of liver diseases[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2014, 23(7):965-977.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 魏来, 陈文雁, 邹毅, 等. 硫化氢抑制自噬减轻肝硬化大鼠肝脏缺血再灌注损伤[J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(1):97-102. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.015

**Cite this article as:** WEI L, CHEN WY, ZOU Y, et al. Protective effect of hydrogen sulfide against hepatic ischemia-reperfusion injury in cirrhotic rats by autophagy inhibition[J]. Chin J Gen Surg, 2016, 25(1):97-102. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.015