

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002185

IPI549 调控小鼠肝脏缺血再灌注损伤的作用研究

张雨驰¹, 范晶², 黄佐天¹, 郑道峰¹, 吴忠均¹

(1. 重庆医科大学附属第一医院肝胆外科, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属第一医院急诊科, 重庆 400016)

【摘要】目的:研究 IPI549 特异性抑制 PI3K γ 对小鼠肝脏缺血再灌注损伤的作用。**方法:**构建 C57BL/6J 小鼠肝脏缺血再灌注损伤模型和 RAW264.7 巨噬细胞缺氧复氧模型, 给予 IPI549 (PI3K γ 抑制剂) 干预, 以 ALT、HE 染色、TUNEL 判断肝脏损伤情况, Western blot 检测组织和原代细胞 p110 γ (PI3K γ) 蛋白表达变化和 RAW264.7 细胞缺氧复氧过程 TNF- α 、JNK、p-JNK 蛋白表达情况, ELISA 检测细胞上清 TNF- α 水平。**结果:**相比于原代肝细胞, 枯否细胞明显高表达 p110 γ 。与 Sham 组比较, IR 组肝组织中 p110 γ 的蛋白水平降低; 使用 PI3K γ 特异性抑制剂 (IPI549) 干预小鼠, 可加重小鼠肝脏缺血再灌注后肝组织损伤和肝组织细胞凋亡, 而利用 GdCl₃ 预处理封闭枯否细胞, 可使得 IPI549 引起的肝组织细胞损伤和凋亡加重得到缓解。在体外实验中, IPI549 干预使 RAW264.7 细胞缺氧复氧过程 JNK 磷酸化水平升高, TNF- α 蛋白表达增加, 细胞上清 TNF- α 分泌增多。**结论:**PI3K γ 抑制剂 IPI549 干预使小鼠肝脏缺血再灌注损伤加重, 其机制与 IPI549 抑制枯否细胞中的 PI3K γ 影响 JNK 信号通路的活化, 发挥促炎作用有关。

【关键词】肝脏缺血再灌注损伤; PI3K γ ; 巨噬细胞**【中图分类号】**R619.9; R392.32**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-04-22

Effect of IPI549 on hepatic ischemia-reperfusion injury in mice

Zhang Yuchi¹, Fan Jing², Huang Zuotian¹, Zheng Daofeng¹, Wu Zhongjun¹

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University;

2. Emergency Department of The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of specific inhibition of PI3K γ by IPI549 on hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. **Methods:** C57BL/6J mice were used to establish a model of hepatic ischemia-reperfusion injury, and RAW264.7 macrophages were used to establish a model of hypoxia and reoxygenation. The mice and RAW264.7 macrophages were treated with the PI3K γ inhibitor IPI549, and alanine aminotransferase, HE staining, and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling were used to evaluate hepatic injury. Western blot was used to measure the changes in the protein expression of p110 γ (PI3K γ) in tissue and primary cells and the protein expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α), c-Jun N-terminal kinase (JNK), and phosphorylated JNK (p-JNK) in RAW264.7 cells during hypoxia and reoxygenation. ELISA was used to measure the level of TNF- α in cell supernatant. **Results:** Kupffer cells had significantly higher expression of p110 γ than primary hepatocytes. Compared with the sham group, the ischemia-reperfusion injury group had a significant reduction in the protein expression of p110 γ in liver tissue. The mice treated with the PI3K γ inhibitor IPI549 showed aggravation of liver injury and cell apoptosis after hepatic ischemia-reperfusion, and GdCl₃ pretreatment to block Kupffer cells alleviated the aggravation of cell injury and apoptosis in liver tissue caused by IPI549. In vitro experiments showed that IPI549 intervention of RAW264.7 cells increased the phosphorylation level of JNK, the protein expression of TNF- α , and the secretion of TNF- α in cell supernatant. **Conclusion:** Intervention with the PI3K γ inhibitor IPI549 can aggravate hepatic ischemia-reperfusion injury in mice, possibly by inhibiting PI3K γ in Kupffer cells to affect activation of the JNK signaling pathway and exerting a pro-inflammatory effect

【Key words】hepatic ischemia-reperfusion injury; PI3K γ ; macrophage

作者介绍: 张雨驰, Email: m13983734815@163.com,

研究方向: 肝胆外科。

通信作者: 吴忠均, Email: wzjtcy@126.com。

基金项目: 重庆市委基金资助项目 (编号: cstc2016shms-ztx10006-5); 重庆市卫生计生委医学科研项目面上资助项目 (编号: 2017MSXM017); 重庆市研究生科研创新资助项目 (编号: CYS17161)。优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190528.1717.004.html>
(2019-05-29)

肝脏缺血再灌注 (ischemia reperfusion, IR) 损伤是肝胆外科手术的主要并发症, 常见于失血性休克、肝切除和肝移植等手术过程中, 给肝移植等手术的预后带来了严峻的挑战^[1]。肝脏 IR 损伤的主要病理机制包括缺血直接造成的肝细胞损伤和血液再灌注炎症激活导致的组织损伤和功能障碍。肝脏 IR 早期枯否细胞 (Kupffer cell, KCs) 易发生活化, 通过释放大量的炎性因子和趋化因子在肝脏 IR 损伤中发挥着关键作用^[2]。研究发现肝脏 IR 过程中 KCs 活化并促进肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、IL-1 β 等炎性因子的生成, 其中 KCs 来源的 TNF- α 是诱导肝细胞坏死凋亡的主要促炎因子^[3-4]。

PI3K γ 是 PI3K 家族的一员, 由催化亚基 p110 γ 和调节亚基 p85 紧密结合构成, PI3K γ 可以从上游细胞膜表面 G 蛋白偶联受体接收并传递信号, 而其他 PI3K 亚型主要由膜表面酪氨酸激酶受体所激活^[5]。研究发现 PI3K γ 明显高表达于巨噬细胞, 参与调控巨噬细胞炎症应答, 抑制免疫反应^[6]。然而 PI3K γ 在肝脏 IR 损伤中 PI3K γ 调控 KCs 发挥的作用及机制尚未见报道。IPI549 是一种特异性的 PI3K γ 抑制剂, 具有生物利用率高、血浆中半衰期长的特点, 可以诱导巨噬细胞向促炎方向分化^[7]。既往研究证实 JNK 信号通路参与肝脏损伤过程 KCs 的激活和 TNF- α 的合成^[8-9]。但参与调控 KCs 激活及分泌炎性细胞因子的上游调控机制尚未完全阐释清楚。因此, 我们推测 IPI549 抑制 PI3K γ 可能影响 KCs 下游 JNK 信号通路, 增强炎症反应进而加重肝脏 IR 损伤。本研究拟建立小鼠肝脏 IR 模型和 RAW264.7 巨噬细胞缺氧复氧 (hypoxia reoxygenation, H/R) 模型, 探讨 IPI549 抑制 PI3K γ 对小鼠肝脏 IR 损伤的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

6~8 周龄健康雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 18~22 g, 购于重庆医科大学动物实验中心。恒温恒湿常规饲养, 适应性饲养 1 周后方可进行手术实验, 术前 12 h 禁食。水合氯醛、多聚甲醛 (谷歌生物, 中国); JNK、p-JNK、TNF- α 、Tubulin、GAPDH 抗体 (武汉博士德, 中国); p110 γ 抗体 (CST, 美国); IPI549 (MCE, 美国); 氯化钆 GdCl₃ (Sigma, 美国); Mouse TNF

alpha ELISA Kit (博士德, 中国); TUNEL 凋亡试剂盒 (Roche, 瑞士); 胎牛血清、DMEM 高糖培养基 (Gibco, 美国); ALT 试剂盒 (南京建成, 中国); HRP 标记二抗、RIPA、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、快速封闭液、BCA 试剂盒 (碧云天, 中国)。

1.2 模型建立

参考文献方法^[10], 建立肝脏 IR 损伤模型。4%水合氯醛按 10 mL/kg 腹腔注射麻醉后脱毛备皮, 取腹中线剑突下纵切口 1.5 cm, 逐层开腹并游离暴露肝区解剖结构, 夹闭右肝上的肝动脉和门静脉共干以阻断肝左、中叶血供 (约占肝体积 70%), 肝组织夹闭成功后呈灰色, 1 h 后恢复血供; 假手术 (Sham) 组仅开腹但不进行缺血处理, 1 h 后正常关腹。术中术后电热毯维持体温。C57BL/6J 小鼠随机分为假手术 (Sham) 组、IPI549+Sham 组、IR 组、IPI549+IR 组、GdCl₃+IR 组、GdCl₃+IPI549+IR 组, 每组 6 只。用于封闭 KCs 的 GdCl₃ 干预参考文献方法^[11]于术前 24 h 经尾静脉注射 7.5 mg/kg。PI3K γ 抑制剂 (IPI549) 干预参考文献^[6]于术前 1 h 腹腔注射 IPI549 15 mg/kg。对照组术前同时间同方式注射等量生理盐水 (NS)。

1.3 标本采集处理

再灌注 6 h 后水合氯醛过量麻醉加二氧化碳吸入处死小鼠, 经下腔静脉采血并取肝组织, 血液静置 1 h 后, 4 °C 离心机 3 000 r/min 离心 15 min 收集上清。血清按 ALT 试剂盒说明书在 510 nm 波长检测吸光度。肝左叶组织取黄豆大小用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 制作石蜡切片, 行 HE 染色、TUNEL 检测肝组织细胞凋亡, TUNEL 具体检测方法参照说明书。HE 结果通过 Suzuki 评分系统进行损伤评估。

1.4 细胞培养和处理

RAW264.7 小鼠巨噬细胞培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 培养至细胞融合度为 60%。更换无血清培养基继续培养 6~8 h 使细胞保持饥饿状态, 然后将细胞转入缺氧培养箱 (37 °C、5%CO₂、1%O₂), 模拟缺血状态。9 h 后取出细胞, 置换含 10% 胎牛血清的新鲜培养基, 置入正常细胞培养箱复氧培养, 模拟再灌注过程。IPI549 按实验分组需要于放入缺氧培养箱前加入 1 μ mol/L。

1.5 原代细胞提取

参照本课题组已有成熟经验和参考文献^[12], 分别提取原代肝细胞和原代 KCs, 培养基选择含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 培养超过 24 h 后可以用于实验检测。

1.6 Western blot

肝组织和细胞用冷 PBS 清洗后加入适量 RIPA 裂解液与蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂 (100:1:1) 超速离心裂解, 4 °C 用 12 000 g 离心 15 min 收集上清后提取总蛋白。BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度。适量蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。快速封闭液室温摇床封闭 10 min, 一抗 4 °C 摇床过夜, 二抗室温摇床孵育 1 h 后 ECL 显影。使用 Fusion 软件灰度半定量分析条带, 相对表达量=目的条带 Volume/内参条带 Volume。

1.7 ELISA

收集细胞上清液,1 000 r/min 短暂离心 2 min 去除沉淀,参照 Mouse TNF alpha ELISA Kit 说明书测定细胞分泌 TNF- α 浓度。

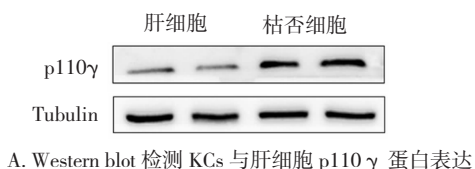
1.8 统计学处理

应用 SPSS 19.0 统计软件分析数据,计量数据资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

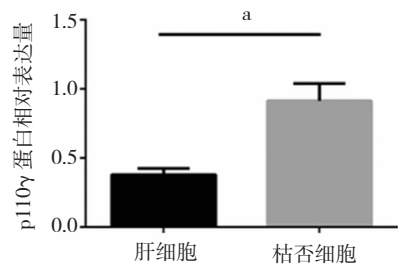
2 结果

2.1 Western blot 检测 p110 γ 蛋白表达水平

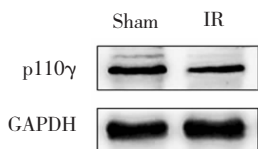
差速离心分离提取小鼠原代 KCs 和肝细胞,Western blot 结果显示和肝细胞比较,KCs 明显高表达 p110 γ 蛋白 ($P=0.002$,图 1A、B)。小鼠肝脏 IR 组和 Sham 组对比,肝组织 p110 γ 蛋白表达明显降低 ($P=0.002$,图 1C、D)。



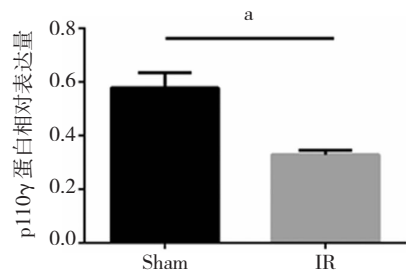
A. Western blot 检测 KCs 与肝细胞 p110 γ 蛋白表达



B. 原代细胞 p110 γ 蛋白半定量分析



C. Western blot 法检测肝组织 p110 γ 蛋白表达



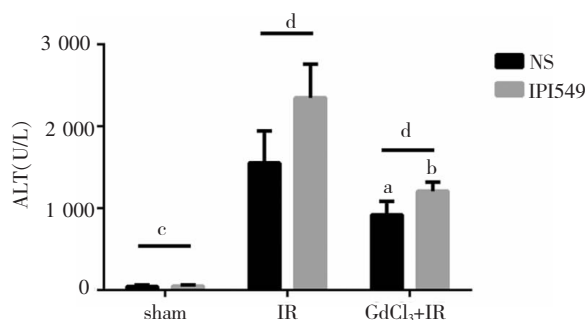
D. 肝组织 p110 γ 蛋白半定量分析

注:a, $P<0.01$

图 1 p110 γ 蛋白表达水平变化

2.2 IPI549 抑制 PI3K γ 对 IR 处理的小鼠血清中 ALT 的影响

Sham 组和 IPI549+Sham 组 2 组间 ALT 无统计学差异 [Sham 组: (45.170 \pm 7.133) U/L、IPI549+Sham 组: (52.050 \pm 4.596) U/L, $P=0.437$]。IR 组和 IPI549 + IR 组比较 [IR 组: (1553.0 \pm 160.8) U/L、IPI549+IR 组: (2349.0 \pm 166.9) U/L, $P=0.006$]、IPI549 预处理 ALT 明显升高,说明 IPI549 干预使 IR 过程血清 ALT 升高更加明显,加重损伤。GdCl₃+IR 组对比 IR 组 ALT 有明显降低 [GdCl₃+IR 组: (921.90 \pm 67.44) U/L, $P=0.005$]、证实 GdCl₃ 封闭 KCs 使其丧失功能减轻了 IR 过程的肝脏损伤;同时 GdCl₃+IPI549+IR 组相较于 IPI549+IR 组 ALT 也有明显降低 [GdCl₃+IPI549+IR 组: (1210.00 \pm 43.95) U/L, $P=0.000$]。结合以上结果可以证实:IPI549 加重肝脏 IR 损伤这一作用可以被 GdCl₃ 封闭 KCs 所逆转,提示 IPI549 预处理主要通过抑制 KCs 中的 PI3K γ 加重了肝脏 IR 损伤(图 2)。



注:a,与 IR 组比较, $P<0.01$;b:与 IPI549+IR 组比较, $P<0.01$; c: $P>0.05$;d: $P<0.01$

图 2 各组血清 ALT 水平 (U/L)

2.3 HE 检测肝脏组织病理学改变

肝脏 IR 损伤的病理特征主要表现为肝小叶结构破坏,肝细胞水肿、坏死,肝血窦充血肿胀,门管区炎性细胞浸润等。Sham 组和 IPI549+Sham 组肝小叶及肝窦结构均正常,未见肝细胞空泡、坏死等,Suzuki 评分无统计学差异 (Sham 组: 0.33 \pm 0.17、IPI549+Sham 组: 0.33 \pm 0.17, $P>0.99$)。与 Sham 组对比,IR 组可见局部小片状坏死灶和门管区炎性细胞浸润,肝血窦充血肿胀,部分肝细胞水肿、排列紊乱;IPI549 + IR 组与 IR 组相比肝组织损伤更为严重,肝组织出现片状坏死伴有大量炎症细胞浸润,肝血窦结构界线不清,肝细胞广泛空泡样变,肝小叶周边细胞较中央变性严重,Suzuki 评分有统计学差异 (IR 组: 2.33 \pm 0.17; IPI549+IR 组: 3.33 \pm 0.17, $P=0.013$)。使用 GdCl₃ 尾静脉注射封闭 KCs 后,本研究发现 GdCl₃+IR 组对比 IR 组损伤减轻,肝细胞点灶状坏死,细胞水肿减轻,肝小叶中央结构正常 (GdCl₃+IR 组: 1.33 \pm 0.17, $P=0.013$);GdCl₃+IPI549+IR 组对比 IPI549+IR 组损伤也有了明显减轻,炎性细胞浸润减少,有部分肝细胞水肿、坏死,未见

片状坏死灶, Suzuki 评分具有统计学差异 (GdCl₃+IPI549+IR 组: 2.00 ± 0.29, P=0.016)(图 3、图 4)。HE 染色肝脏损伤情况同样说明了 IPI549 干预通过抑制 KCs 中的 PI3K γ 加重肝脏 IR 损伤。

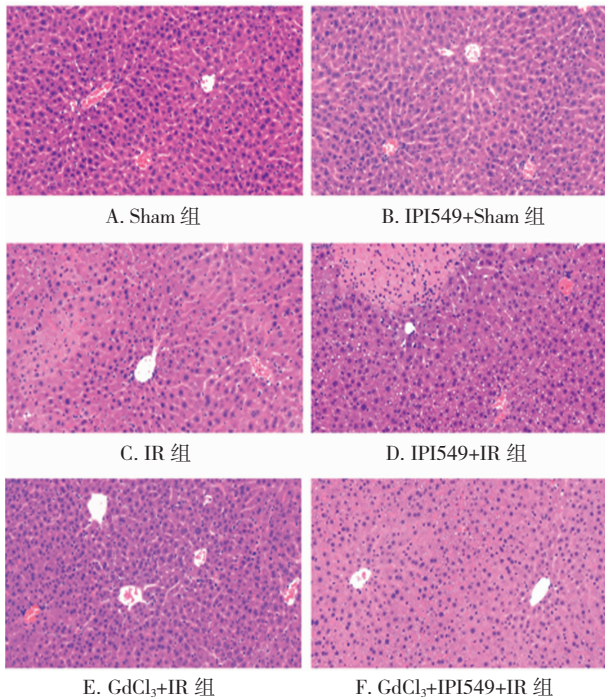
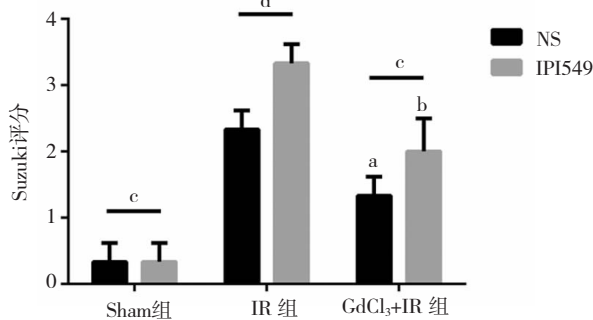


图 3 IPI549 对肝脏 IR 损伤组织病理学的影响(H 染色, 400 ×)



注: a, 与 IR 组比较, P<0.05; b, 与 IPI549+IR 组比较, P<0.05; c: P>0.05; d: P<0.05

图 4 肝组织损伤 Suzuki 评分

2.4 TUNEL 法检测肝组织细胞凋亡

IR 组可见部分肝组织细胞凋亡, 阳性细胞多集中在门管区; IPI549+IR 组可见明显的细胞凋亡程度增高, 细胞核固缩、碎裂; GdCl₃+IR 组较 IR 组肝细胞凋亡明显减少, 细胞核染色正常, 此外 GdCl₃+IPI549+IR 组对比 IPI549+IR 组损伤也有了明显减轻, 凋亡细胞数量明显减少。证明 IPI549 加重了肝 IR 过程肝组织细胞的凋亡, 这一作用可以被 GdCl₃ 封闭 KCs 后所逆转(图 5、图 6)。

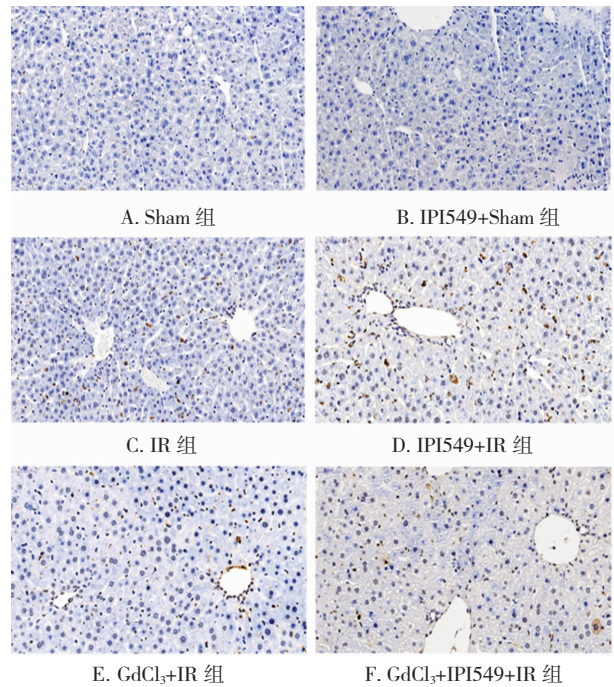
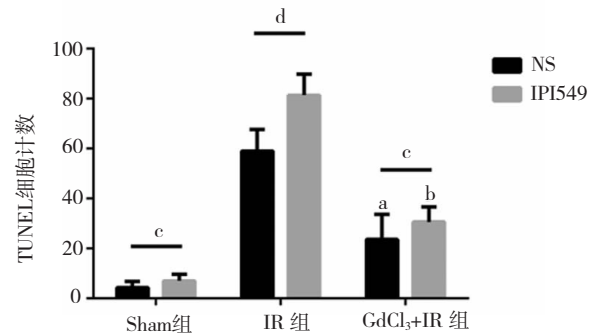


图 5 IPI549 对肝组织细胞凋亡的影响(TUNEL 染色, 400 ×)



注: a, 与 IR 组比较, P<0.05; b: 与 IPI549+IR 组比较, P<0.05; c: P>0.05; d: P<0.05

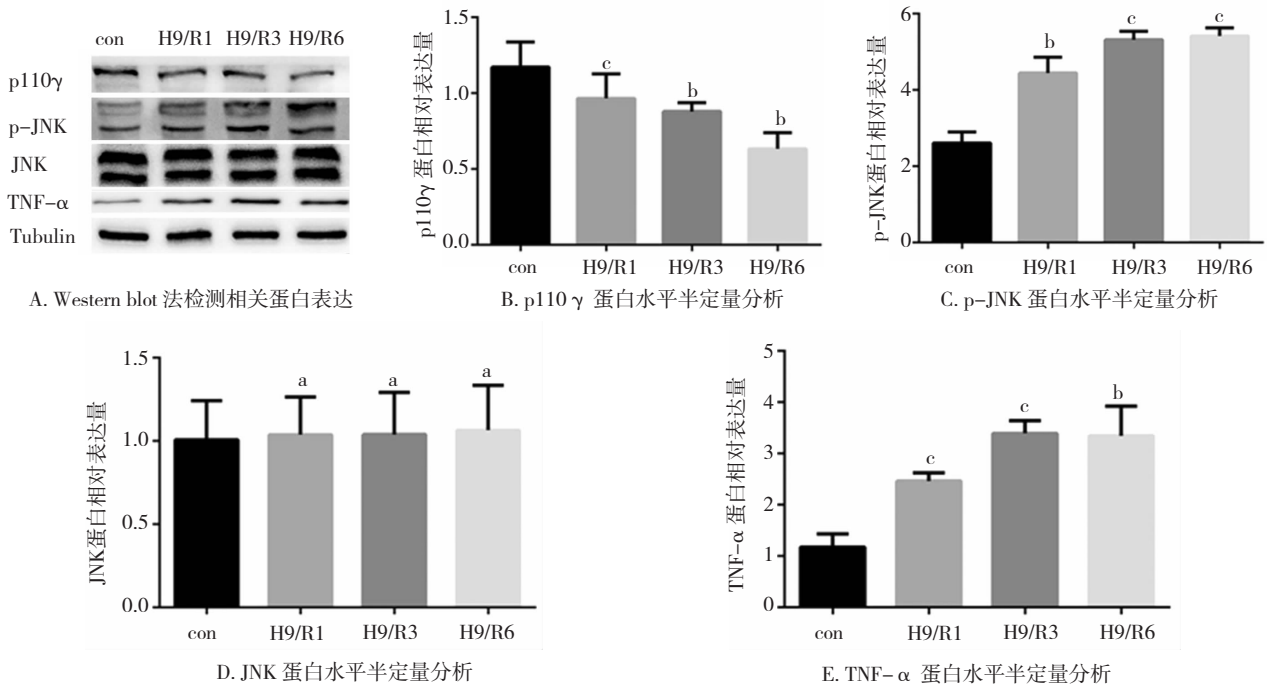
图 6 TUNEL 凋亡细胞计数

2.5 Western blot 检测 RAW264.7 细胞中 JNK 及 TNF- α 蛋白表达

由于 KCs 无法稳定耐受 H/R 刺激, 故本实验采用 RAW264.7 细胞株替代。固定缺氧时间为 9 h, Western blot 结果显示 RAW264.7 细胞随复氧时间延长, 与 con 组比较 p110 γ 稍有降低 (H9/R1 vs. con, P=0.000, H9/R3 vs. con, P=0.048, H9/R6 vs. con, P=0.033), p-JNK (H9/R1 vs. con, P=0.010, H9/R3 vs. con, P=0.004, H9/R6 vs. con, P=0.002) 和 TNF- α (H9/R1 vs. con, P=0.002, H9/R3 vs. con, P=0.000, H9/R6 vs. con, P=0.028) 蛋白水平增强, 而 JNK 表达无明显差异 (H9/R1 vs. con, P=0.608, H9/R3 vs. con, P=0.159, H9/R6 vs. con, P=0.111)。结果表明 RAW264.7 细胞 H/R 过程中 JNK 发生磷酸化过程, TNF- α 蛋白表达逐渐增多(图 7)。接着在 RAW264.7 细胞 H/R 处理前给予 IPI549 干预, 结合课题组已有实验基础

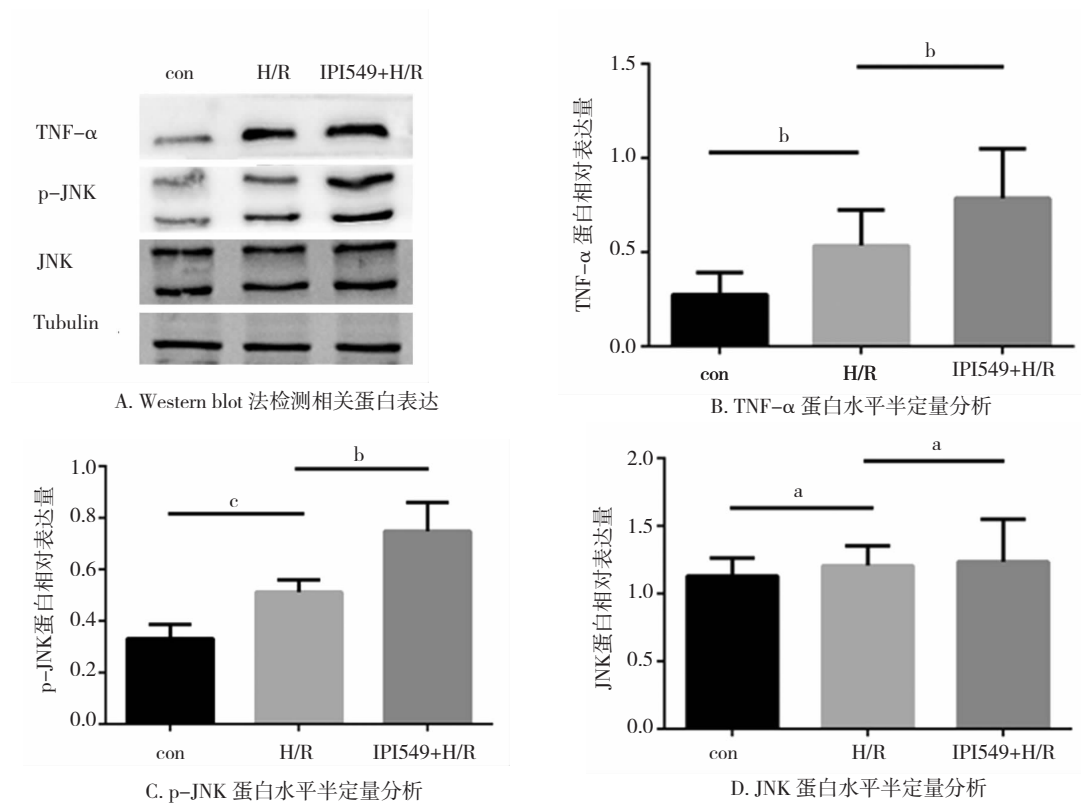
选取复氧时间为 1 h, 各组 p-JNK(H/R vs. con, $P=0.003$ 、IPI549+H/R vs. H/R, $P=0.044$) 和 TNF- α (H/R vs. con, $P=0.031$ 、IPI549+H/R vs. H/R, $P=0.030$) 蛋白表达差异明显, JNK 蛋白

表达无明显差异(H/R vs. con, $P=0.057$ 、IPI549+H/R vs. H/R, $P=0.817$)(图 8)。本课题组推测 IPI549 抑制 PI3K γ 有可能通过影响 RAW264.7 细胞的 JNK 信号通路促进炎症反应。



注: 与对照相比, a: $P>0.05$; b: $P<0.05$; c: $P<0.01$

图 7 Western blot 检测 H/R 不同时间点相关蛋白表达

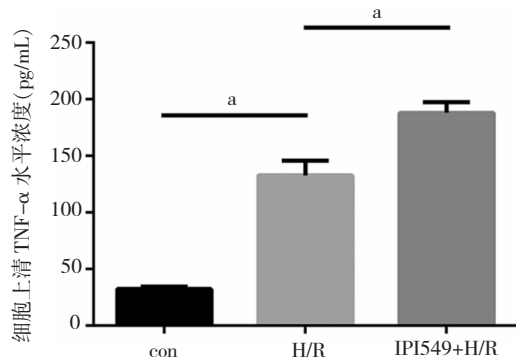


注: a, $P>0.05$; b, $P<0.05$; c, $P<0.01$

图 8 IPI549 干预后蛋白表达变化

2.6 ELISA 检测细胞上清中 TNF- α 水平

ELISA 结果显示与 con 组相比,RAW264.7 细胞 H/R 组有明显升高(H/R vs. con, $P=0.000$)。此外 IPI549+H/R 组相比 H/R 组也有升高,数据具有统计学差异(H/R vs. IPI549+H/R, $P=0.004$) (图 9)。此部分数据进一步证实 IPI549 干预使 RAW264.7 细胞 H/R 过程 TNF- α 分泌水平升高。



注:a, $P < 0.01$

图 9 细胞上清 TNF- α 水平比较

3 讨论

肝脏 IR 损伤是一个双相的病理生理过程。在缺血损伤阶段,缺氧和伴随的代谢紊乱导致肝细胞死亡并释放各种损伤信号分子,如损伤相关分子模式、活性氧和 DNA 碎片等。在再灌注阶段,肝脏定居的免疫细胞被激活并促进炎症反应的形成,接着募集循环免疫细胞,扩大和维持免疫级联反应,导致临床肝功能障碍和进行性衰竭^[2]。既往研究表明,固有免疫的激活和以 KCs 为主分泌的细胞毒性分子介导的肝细胞损伤是肝脏 IR 的主要病理特征^[1]。在本实验中, $GdCl_3$ 具有抑制 KCs 吞噬、分泌功能的作用^[11], $GdCl_3$ 预处理后肝脏 IR 损伤明显减轻,证明 KCs 在肝 IR 中发挥关键作用,促进肝组织损伤,符合既往研究结果^[13]。同时本实验发现, IPI549 会加重小鼠肝脏 IR 损伤, $GdCl_3$ 预处理可缓解 IPI549 引起的肝组织损伤和肝脏组织细胞凋亡加重,此部分结果表明 IPI549 主要通过抑制 KCs 的 PI3K γ 在肝脏 IR 过程中发挥作用。

KCs 是体内最大的组织定居巨噬细胞群,在肝脏免疫应答中起着重要作用。在病理状态下, KCs 可根据肝脏微环境变化(如危险信号、脂肪酸、细胞碎片的吞噬等)调整其功能及表型,这也赋予了 KCs

在不同疾病及疾病的不同时期多重甚至相反的功能^[4]。因为肝脏长期暴露于肠道血液, KCs 在稳态下会保持免疫耐受状态,对肠源性内毒素 LPS 具有耐受作用。尽管肠源性内毒素 LPS 参与维持炎症反应,但可能不会触发肝脏 IR 过程 KCs 炎症级联反应^[14]。除经典的 TLR4-NF- κ B 通路以外,肝脏 IR 可能通过其他信号通路激活 KCs。因此本课题组采用细胞 H/R 模拟肝 IR 过程,尽可能地还原肝 IR 的损伤机制。

JNK 信号通路属于丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)超家族成员之一。MAPKs 是调节细胞增殖、分化和凋亡等细胞活动的关键调节通路。JNK 信号途径是 MAPK 通路的一个重要分支,也被称为应激激活蛋白激酶,可以被多种外界环境刺激激活。研究证实 JNK 信号激活可以导致上调转录调节因子 c-jun,活化蛋白 ap-1 表达增加,促进巨噬细胞活化发挥促炎作用^[15]。I-marisio 等^[16]研究发现肝脏损伤过程中 KCs 的 JNK 信号通路激活,分泌 TNF- α 和 IL-1 β 等加重损伤。KCs 产生的促炎因子 TNF- α 就是参与肝脏 IR 的主要细胞因子之一。TNF- α 通过直接结合肝细胞表面 TNF 受体激活 NF- κ B 和 JNK 通路,加重肝细胞损伤和凋亡。抑制 KCs 的活化和促炎因子的分泌能有效改善肝脏 IR 损伤^[4]。本研究发现, H/R 过程中 RAW264.7 巨噬细胞 JNK 磷酸化水平升高, TNF- α 表达水平同样升高,和上述研究结果类似; IPI549 预处理后 JNK 磷酸化水平进一步升高,提示 IPI549 抑制 PI3K γ 可能调节下游 JNK 通路合成并分泌 TNF- α , 放大炎症反应。

Kaneda 等^[16]研究发现, PI3K γ 特异性高表达于巨噬细胞,调节巨噬细胞发挥抑炎作用。PI3K γ 在炎症、氧化应激、组织损伤和肿瘤发生发展中起着重要作用,但有关 PI3K γ 对巨噬细胞的作用机制仍需深入研究^[17-18]。本研究通过建立小鼠肝脏缺血再灌注损伤模型和细胞模拟实验,探讨 PI3K γ 抑制剂 IPI549 对肝脏缺血再灌注的影响作用。实验结果显示 KCs 特异性高表达 PI3K γ , 肝脏 IR 损伤过程 PI3K γ 表达降低,进一步使用 IPI549 抑制 PI3K γ 后肝脏缺血再灌注损伤加重。在细胞实验中该结论也得到了证实, IPI549 预处理使 RAW264.7 巨噬细胞经 H/R

刺激后炎症因子 TNF- α 合成及分泌进一步增多。因此可以作出推断,PI3K γ 可能通过影响 KCs 的 JNK 信号通路活化,影响 TNF- α 等炎性因子的分泌来调节肝脏 IR 损伤。

综上所述,IPI549 主要通过抑制 KCs 中的 PI3K γ 加重肝脏缺血再灌注损伤;这可能与 IPI549 抑制 KCs 中的 PI3K γ 调节 JNK 通路活化,上调 TNF- α 等炎症因子的表达有关。本研究进一步阐明了 KCs 与肝脏缺血再灌注的损伤机制,为聚焦调节 KCs 防治肝脏 IRI 提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] Zhai Y, Petrowsky H, Hong J C, et al. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation—from bench to bedside[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2013, 10(2): 79–89.
- [2] Zhai Y, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation[J]. *Am J Transplant*, 2011, 11(8): 1563–1569.
- [3] Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair[J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(4): 1269–1339.
- [4] Lu TF, Yang TH, Zhong CP, et al. Dual effect of hepatic macrophages on liver ischemia and reperfusion injury during liver transplantation[J]. *Immune Netw*, 2018, 18(3): e24.
- [5] Thorpe LM, Yuzugullu H, Zhao JJ. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(1): 7–24.
- [6] Kaneda MM, Messer KS, Ralainirina N, et al. PI3K γ is a molecular switch that controls immune suppression[J]. *Nature*, 2016, 539(7629): 437–442.
- [7] Evans CA, Liu T, Lescarbeau A, et al. Discovery of a selective phosphoinositide-3-kinase(PI3K)- γ inhibitor (IPI-549) as an immuno-oncology clinical candidate[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2016, 7(9): 862–867.
- [8] Behmoaras J, Bhargal G, Smith J, et al. Jund is a determinant of macrophage activation and is associated with glomerulonephritis susceptibility[J]. *Nat Genet*, 2008, 40(5): 553–559.
- [9] Chen XJ, Tang ZZ, Zhu GG, et al. JNK signaling is required for the MIP1 α associated regulation of Kupffer cells in the heat stroke response[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(3): 2389–2396.
- [10] Zheng D, Li Z, Wei X, et al. Role of miR-148a in mitigating hepatic ischemia-reperfusion injury by repressing the TLR4 signaling pathway via targeting CaMKII α in vivo and in vitro[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 49(5): 2060–2072.
- [11] Kim TH, Lee SH, Lee SM. Role of Kupffer cells in pathogenesis of sepsis-induced drug metabolizing dysfunction[J]. *FEBS J*, 2011, 278(13): 2307–2317.
- [12] Aparicio-Vergara M, Tencerova M, Morgantini C, et al. Isolation of kupffer cells and hepatocytes from a single mouse liver[J]. *Methods Mol Biol*, 2017, 1639: 161–171.
- [13] Li JY, Gu X, Zhang WH, et al. GdCl₃ abates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting apoptosis in rats[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(5): 518–523.
- [14] Zhai Y, Qiao B, Shen XD, et al. Evidence for the pivotal role of endogenous toll-like receptor 4 ligands in liver ischemia and reperfusion injury[J]. *Transplantation*, 2008, 85(7): 1016–1022.
- [15] Hannemann N, Jordan J, Paul S, et al. The AP-1 transcription factor c-jun promotes arthritis by regulating cyclooxygenase-2 and arginase-1 expression in macrophages[J]. *J Immunol*, 2017, 198(9): 3605–3614.
- [16] Imarisio C, Alchera E, Bangalore Revanna C, et al. Oxidative and ER stress-dependent ASK1 activation in steatotic hepatocytes and Kupffer cells sensitizes mice fatty liver to ischemia/reperfusion injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 112: 141–148.
- [17] Luo L, Wall AA, Tong SJ, et al. TLR crosstalk activates LRP1 to recruit Rab8a and PI3K γ for suppression of inflammatory responses[J]. *Cell Reports*, 2018, 24(11): 3033–3044.
- [18] Uehara M, Mcgrath MM, Ohori S, et al. Regulation of T cell alloimmunity by PI3K γ and PI3K δ [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 951.

(责任编辑:唐秋姗)