

PGC-1 α 介导的线粒体生物合成在 AMPK 激动剂抗肝脏缺血再灌注损伤中的作用

敖 宇,张旭阳,唐 聃,刘公伟,黄 丹,蔡治方
(遵义医科大学第二附属医院肝胆外科,遵义 563000)

摘要 **目的** 探讨 PGC-1 α 介导的线粒体生物合成在腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)激动剂抗肝脏缺血再灌注损伤(HIRI)中的作用及机制。**方法** 将SD大鼠随机分为对照组(Control)、HIRI组、HIRI + AMPK 激动剂 AICAR 组(HIRI + AICAR)、HIRI + PGC-1 α 抑制剂 SR-18292 组(HIRI + SR-18292)和 HIRI + AICAR + SR-18292 组,每组 8 只。于术前分别经腹腔注射 AICAR (500 mg/kg)或 SR-18292 (32 mg/kg)干预大鼠,采用无创血管夹阻断法构建 HIRI 模型,再灌注 24 h 后取材。检测血清中丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)含量及肝脏组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和三磷酸腺苷(ATP)水平;HE 染色观察肝组织病理学变化;荧光探针法检测肝组织中活性氧(ROS)水平和线粒体膜电位变化;qRT-PCR 检测肝组织中线粒体 DNA(mtDNA)拷贝数及线粒体生物合成相关基因 PGC-1 α 、NRF1、TFAM、UQCRC2 mRNA 表达水平;Western blot 检测肝组织中 AMPK α 、p-AMPK α 、mTOR、p-mTOR、PGC-1 α 和 TFAM 蛋白表达水平。**结果** 与 Control 组比较,HIRI 组大鼠血清中 ALT、AST 水平及肝组织中 MDA、ROS 水平升高,SOD 和 ATP 水平降低(均 $P < 0.05$);同时,肝组织中 mtDNA 拷贝数、线粒体膜电位及 PGC-1 α 、NRF1、TFAM、UQCRC2 mRNA 表达水平降低,p-AMPK α /AMPK α 蛋白比值和 PGC-1 α 、TFAM 蛋白表达水平降低,p-mTOR/mTOR 蛋白比值升高(均 $P < 0.05$)。与 HIRI 组比较,HIRI + AICAR 组大鼠血清中 ALT、AST 水平及肝组织中 MDA、ROS 水平降低,SOD 和 ATP 水平升高(均 $P < 0.05$);同时,肝组织中 mtDNA 拷贝数、线粒体膜电位及 PGC-1 α 、NRF1、TFAM、UQCRC2 mRNA 表达水平升高,p-AMPK α /AMPK α 蛋白比值和 PGC-1 α 、TFAM 蛋白表达水平升高,p-mTOR/mTOR 蛋白比值降低(均 $P < 0.05$)。联合 SR-18292 干预可明显逆转 AICAR 对 HIRI 大鼠肝组织的保护作用。**结论** PGC-1 α 介导的线粒体生物合成参与调节 AMPK 激动剂介导的 HIRI 保护作用,其作用机制可能与激活 AMPK/mTOR 信号通路有关。

关键词 缺血再灌注损伤;腺苷酸活化蛋白激酶;mTOR;PGC-1 α ;线粒体生物合成;AMPK/mTOR 信号通路

中图分类号 R 657

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2025)07 - 1194 - 10

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.07.005

肝脏缺血再灌注损伤(hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI)是肝切除、肝移植等手术中常见的继发性组织损伤,可导致肝功能衰竭^[1],其核心机制与缺血再灌注过程中活性氧(reactive oxygen species, ROS)爆发引起的线粒体功能障碍及能量代谢障碍密切相关^[2-4]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)作为细胞能量稳态的核心调节因子,通过调控巨噬细胞极化、抑制铁死亡和改善能量代谢等途径在脑、心肌、肝脏等多种组织器官缺血再灌注损伤中发挥保护作用^[5-7],其机制可能与过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor

gamma coactivator-1 α , PGC-1 α)介导的线粒体生物合成有关。AMPK 磷酸化可激活 PGC-1 α ,通过 AMPK/PGC-1 α /Nrf2 通路调节线粒体功能和氧化还原稳态^[8]。基因沉默实验也证实 PGC-1 α 是 AMPK 的下游靶标,激活 AMPK/PGC-1 α 通路可缓解肝脏代谢异常^[9]。以上研究提示,PGC-1 α 介导的线粒体生物合成可能是参与调节 AMPK 抗 HIRI 的重要分子机制。该研究拟建立 HIRI 模型大鼠,并给予 AMPK 激动剂预处理,探讨 PGC-1 α 介导的线粒体生物合成在 AMPK 激动剂抗 HIRI 过程中的作用,旨在为以 AMPK 为靶点的 HIRI 治疗药物开发提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 88 只,鼠龄 8 周,体质量 220 ~ 240 g,购自遵义医科大学实验动

2025 - 03 - 30 接收

基金项目:贵州省卫生健康委科学技术基金(编号:WJW-2021-014)

作者简介:敖 宇,女,硕士研究生;

蔡治方,男,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: 2128985306@qq.com

物中心,生产许可证号:SCXK(黔)2021-0002。饲养于独立通风换气笼中,温度 22~24℃,湿度 40%~70%,适应性喂养 1 周。本研究获得遵义医科大学第二附属医院医学伦理审查委员会批准(审批号: KYLL-2025-001)。

1.1.2 主要试剂 AMPK 激动剂 AICAR、PGC-1 α 抑制剂 SR-18292(货号: HY-13417、HY-101491)购自美国 Med Chem Express 公司; AMPK α 、p-AMPK α (Thr172)、mTOR、p-mTOR (Ser2448)、PGC-1 α 、TFAM、GAPDH 抗体(货号: ab32047、ab133448、ab134903、ab109268、ab313559、ab307302、ab181602)购自英国 Abcam 公司; 丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、ROS、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒(货号: S0131、S0101、S0033、S0026)购自上海碧云天生物技术有限公司; Super-ScriptTM III PlatinumTM 一步法 qRT-PCR 试剂盒(货号: 11732020)购自美国 Thermo Fisher 公司; HE 染液、JC-1 线粒体膜电位试剂盒(货号: G1005、G1515)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.1.3 主要仪器 呼吸麻醉机(型号: R500IE)购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司; 酶标仪、实时荧光定量 PCR 系统(型号: MultiskanTM FC、Quant-StudioTM 1 Plus)购自美国 Thermo 公司; 自动生化分析仪(型号: BS-350S)购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司; 化学发光成像仪(型号: ChemiScope S6)购自上海勤翔科学仪器有限公司。

1.1.4 动物造模 采用无创血管夹阻断法构建 HIRI 大鼠模型^[10], 具体方法如下: 使用呼吸麻醉机麻醉大鼠, 固定四肢, 腹部剃毛备皮, 延腹中线作切口开腹腔, 暴露第一肝门, 使用无创血管夹阻断肝脏左侧门静脉支, 观察到 70% 的肝脏表面颜色由红变为灰白即为缺血成功, 缺血 45 min 后进行再灌注。

1.2 方法

1.2.1 分组与干预 将 88 只大鼠随机进行以下分组及处理, 造模失败或死亡大鼠及时进行补充。为了考察不同再灌注时间对大鼠肝组织线粒体生物合成水平的影响, 分别对大鼠进行缺血再灌注 0、6、12、24、48 h 处理, 另设置正常组(Normal)大鼠, 每组 8 只。另, 为了探讨 PGC-1 α 介导的线粒体生物合成在 AMPK 激动剂抗 HIRI 中的作用及机制, 将大鼠随机分为: Control 组: 大鼠正常饲养, 不做干

预; HIRI 组: 大鼠按照“1.1.4”项下方法缺血后再灌注 24 h 取材; HIRI + AICAR 组: 于术前 1 h 腹腔注射 AICAR(500 mg/kg)^[7] 干预大鼠, 缺血后再灌注 24 h 取材; HIRI + SR-18292 组: 于术前 50 min 腹腔注射 SR-18292(32 mg/kg)^[11] 干预大鼠, 缺血后再灌注 24 h 取材; HIRI + AICAR + SR-18292 组: 于术前 1 h 腹腔注射 AICAR(500 mg/kg), 10 min 后再次经腹腔注射 SR-18292(32 mg/kg) 干预大鼠, 缺血后再灌注 24 h 取材, 每组 8 只。

1.2.2 生化分析仪检测 麻醉大鼠, 经腹主动脉采血, 4℃离心取上清液, 设置生化分析仪参数, 上样检测各组血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)含量。

1.2.3 试剂盒检测 取各组大鼠肝组织, 0.9% 氯化钠溶液漂洗后剪碎, 制备肝组织匀浆液, 严格按照试剂盒说明书操作, 检测肝组织中 ATP、MDA 和 SOD 水平。

1.2.4 ROS 检测 取各组大鼠肝组织制作冰冻切片, 复温后控干水分, 使用组画笔在组织周围画圈, 向圈内滴加 DCFH-DA 荧光探针, 37℃恒温孵育 30 min, 然后滴加 DAPI 染核, 显微镜下观察并采集图像, ROS 活性结果以荧光度值表示。

1.2.5 qRT-PCR 检测 取各组大鼠肝组织, 分别提取组织中总 RNA 和线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA), 使用一步法 qRT-PCR 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA, 设计目的基因引物(表 1), 与 cDNA 样本、聚合酶及脱氧核糖核苷三磷酸等混合得到反应体系, 于实时荧光定量 PCR 系统上进行扩增

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Genes	Primer sequences (5'-3')
mtDNA	F: TCTCGATGCTAACGGGTCT
	R: ACGGCTATGTTGAGGAAGG
PGC-1 α	F: GGACGAATACCGCAGAGACT
	R: CCATCATCCCCGACAGTTTAC
NRF1	F: AAACCGAACACATGGCTACC
	R: CTGCCCCTGGAGTTGAGTATG
TFAM	F: CACCCAGATGCAAAACTTTTCAG
	R: CTGCTCTTTTACTTGTCTCACAG
UQCRC2	F: AAAGGGCAACTGCTAGAGCC
	R: TCCCTTGTGTGCAGTCACACTTA
GAPDH	F: CAGATCCACAACGGATATATTGGG
	R: CATGACAACCTTGGCATTTGTGG

(反应条件:95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s,72 ℃ 5 min,循环40次),以线粒体编码基因 NADH 脱氢酶 1 基因表达作为 mtDNA 拷贝数,以 GAPDH 内参,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 值法计算 mtDNA 以及 PGC-1 α 、NRF1、TFAM、UQCRC2 基因 mRNA 相对表达水平。

1.2.6 HE 染色 取大鼠部分肝组织于 10% 多聚甲醛中固定 24 h,石蜡包埋并制作石蜡切片,依次将切片放入二甲苯和梯度乙醇中脱蜡至水,再入苏木精和伊红染液中染色,流水冲洗,脱水、封片,显微镜下观察组织病理学改变,细胞核呈蓝色,细胞质呈红色。

1.2.7 线粒体膜电位检测 按照“1.2.4”项下方法制备大鼠肝组织冰冻切片,向圈内滴加 JC-1 染色工作液,恒温孵育 20 min,荧光显微镜下观察线粒体膜电位水平,红色荧光为线粒体膜电位正常,绿色荧光为线粒体膜电位下降。

1.2.8 Western blot 检测 取各组大鼠肝组织,加入 RIPA 裂解液,于冰上碾磨后离心提取上清液即为总蛋白溶液,BCA 法测定蛋白浓度。取 20 μ g 蛋白溶液经沸水浴变性,使用 SDS-PAGE 凝胶电泳分

离蛋白,随后转至 PVDF 膜上,加入 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗稀释液 (p-AMPK α 、AMPK α 、p-mTOR、mTOR、PGC-1 α 、TFAM、GAPDH,1 : 1 000 稀释)4 ℃ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,加入 HRP 标记的二抗稀释液(1 : 10 000 稀释)室温孵育 1 h,曝光显影,采用 Image J 软件分析目的蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 26.0 软件分析数据,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同肝脏再灌注时间对大鼠肝组织线粒体水平的影响 与 Normal 组比较,缺血再灌注不同时间点大鼠血清中 ALT 和 AST 水平以时间依赖方式升高($P < 0.05$),而肝组织中 ATP 水平及 mtDNA 拷贝数以时间依赖方式降低($P < 0.05$)。见图 1。与 Normal 组比较,缺血再灌注不同时间点大鼠肝组织中线粒体生物合成相关基因 PGC-1 α 、NRF1、TFAM、

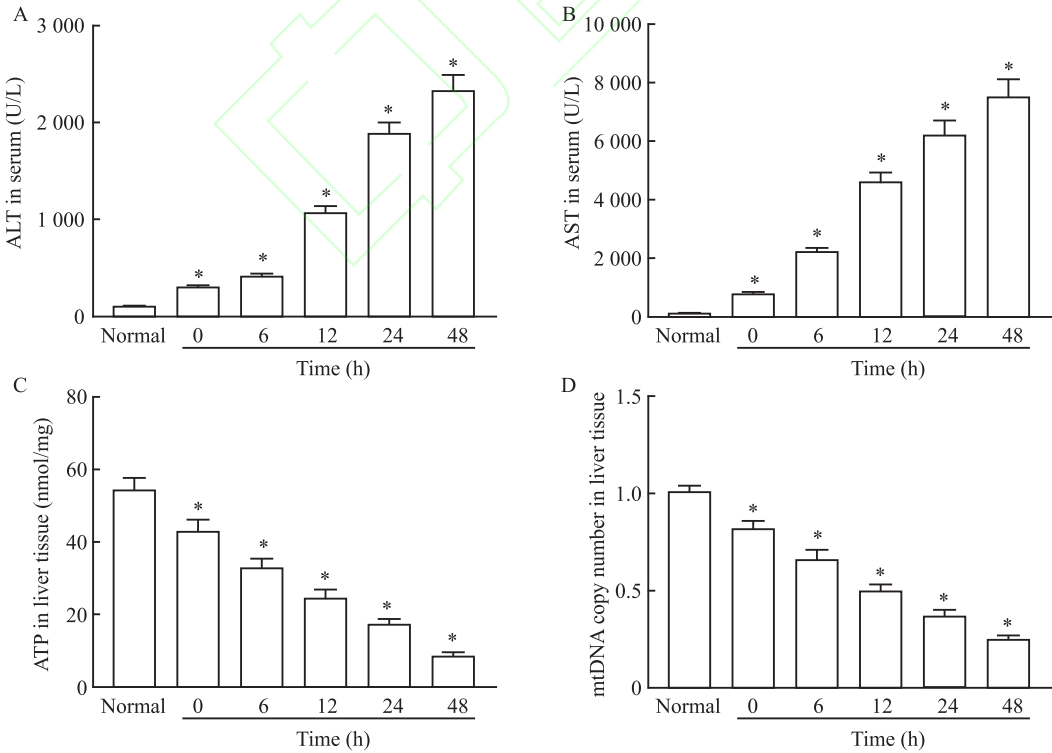


图1 各组大鼠血清肝功能和肝组织中 ATP 及 mtDNA 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.1 Comparison of serum liver function and the levels of ATP and mtDNA in liver tissue among groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

A: ALT levels in serum; B: AST levels in serum; C: ATP levels in liver tissue; D: Cellular mtDNA copy number in liver tissue; * $P < 0.05$ vs Normal group.

UQCRC2 mRNA 表达水平以时间依赖方式降低($P < 0.05$)。见图 2。本研究后续实验选择缺血再灌注 24 h 取材。

2.2 各组大鼠肝组织病理学改变 Control 组大鼠肝组织结构正常,无细胞损伤;HIRI 组和 HIRI + SR-18292 组大鼠肝组织出现大面积细胞质空泡化、核固缩及边界模糊,大量血窦膨胀,炎性细胞渗入;HIRI + AICAR 组大鼠肝组织病理损伤较 HIRI 组明显改善,多数细胞结构恢复正常,炎性细胞渗入减少,而 HIRI + AICAR + SR-18292 组大鼠肝组织损伤较 HIRI + AICAR 组再次加重。见图 3。

2.3 各组大鼠血清肝功能指标水平 与 Control 组比较,HIRI 组大鼠血清中 ALT 和 AST 水平升高($P < 0.05$)。与 HIRI 组比较,HIRI + AICAR 组大鼠血

清中 ALT 和 AST 水平降低($P < 0.05$);而 HIRI + SR-18292 组大鼠血清中 ALT 和 AST 水平升高($P < 0.05$)。与 HIRI + AICAR 组比较,HIRI + AICAR + SR-18292 组大鼠血清中 ALT 和 AST 水平升高($P < 0.05$)。见图 4。

2.4 各组大鼠肝组织中氧化应激水平 与 Control 组比较,HIRI 组大鼠肝组织中 MDA 和 ROS 水平升高,SOD 水平降低($P < 0.05$)。与 HIRI 组比较,HIRI + AICAR 组大鼠肝组织中 MDA 和 ROS 水平降低,SOD 水平升高($P < 0.05$);而 HIRI + SR-18292 组大鼠肝组织中 MDA 和 ROS 水平升高,SOD 水平降低($P < 0.05$)。与 HIRI + AICAR 组比较,HIRI + AICAR + SR-18292 组大鼠肝组织中 MDA 和 ROS 水平升高,SOD 水平降低($P < 0.05$)。见图 5。

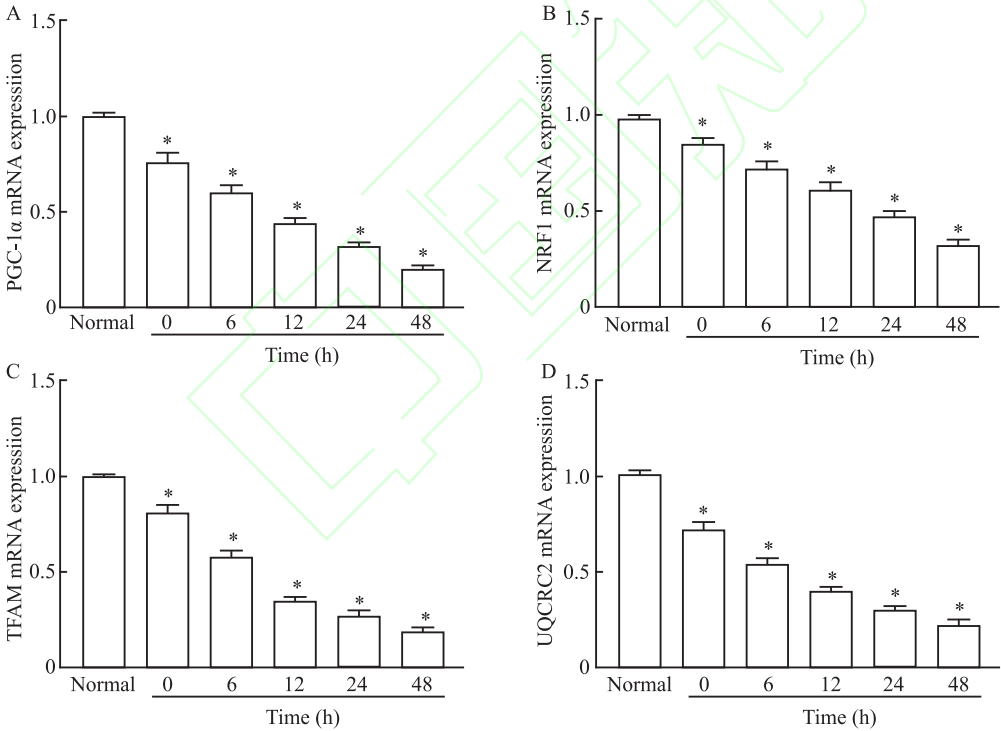


图 2 各组大鼠肝组织中线粒体生物合成相关基因表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Comparison of mitochondrial biosynthesis-related gene expression levels in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
A:PGC-1α mRNA expression level in liver tissue;B:NRF1 mRNA expression level in liver tissue;C:TFAM mRNA expression level in liver tissue;D:UQCRC2 mRNA expression level in liver tissue; * $P < 0.05$ vs Normal group.

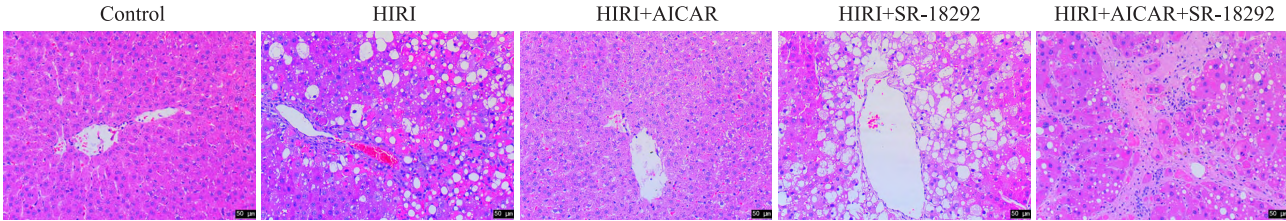


图 3 各组大鼠肝组织病理学改变 HE × 200

Fig. 3 Liver histopathological changes in each group HE × 200

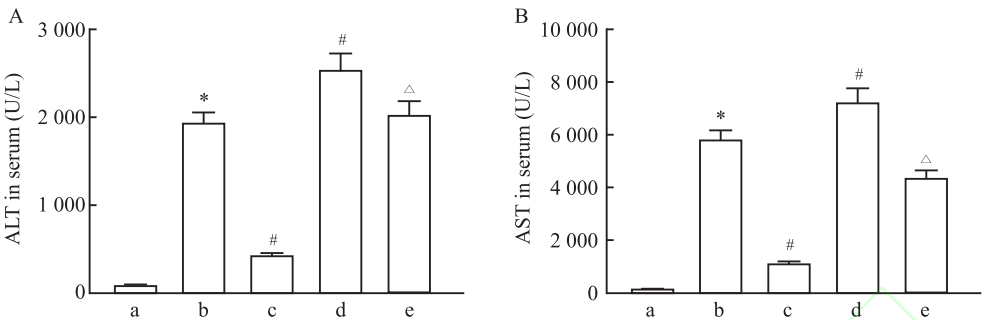


图 4 各组大鼠血清肝功能指标水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 The levels of serum liver function index in each group were compared ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

A: ALT levels in serum; B: AST levels in serum; a: Control group; b: HIRI group; c: HIRI + AICAR group; d: HIRI + SR-18292 group; e: HIRI + AICAR + SR-18292 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs HIRI group; Δ $P < 0.05$ vs HIRI + AICAR group.

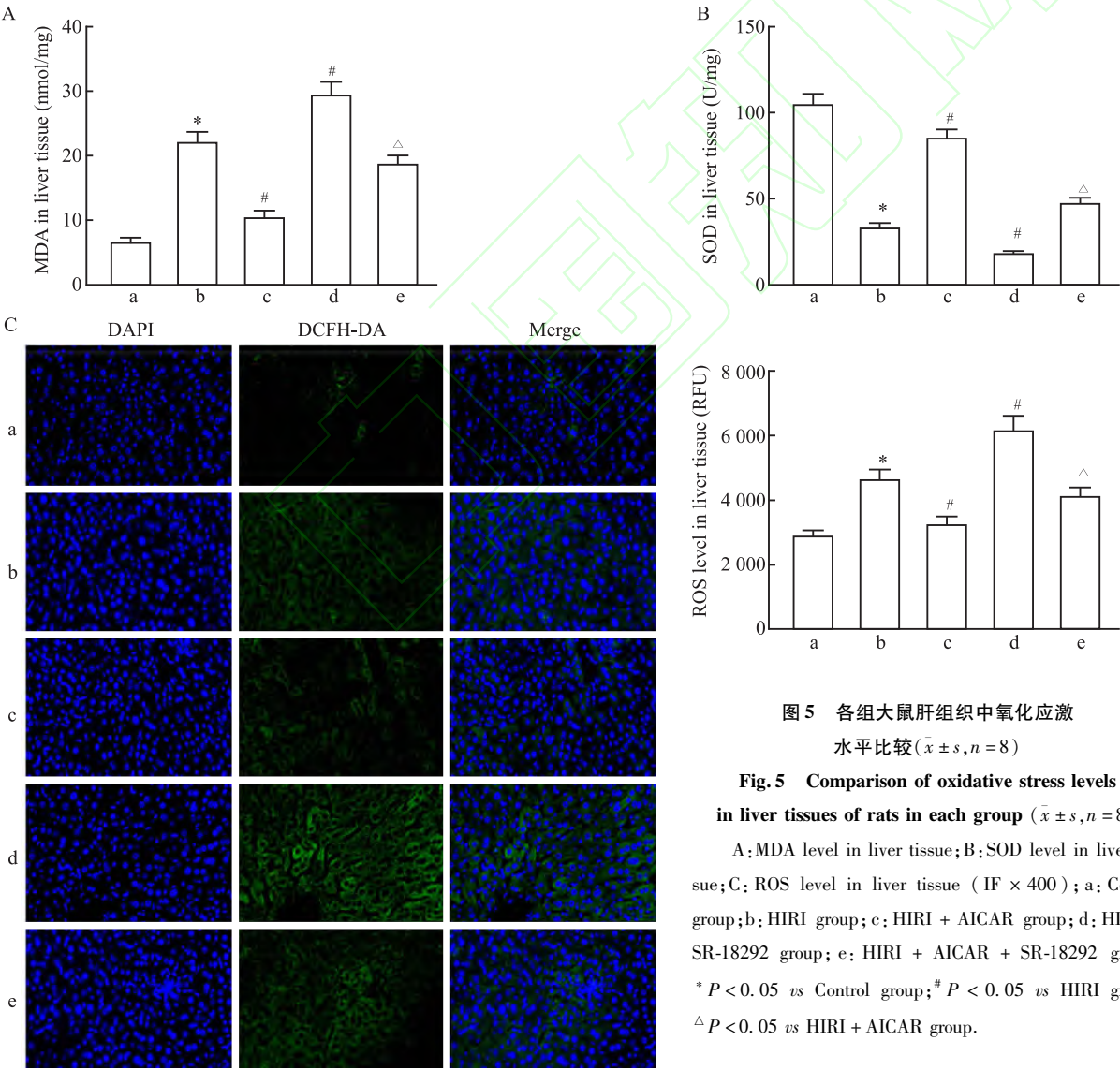


图 5 各组大鼠肝组织中氧化应激水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Comparison of oxidative stress levels in liver tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

A: MDA level in liver tissue; B: SOD level in liver tissue; C: ROS level in liver tissue (IF $\times 400$); a: Control group; b: HIRI group; c: HIRI + AICAR group; d: HIRI + SR-18292 group; e: HIRI + AICAR + SR-18292 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs HIRI group; Δ $P < 0.05$ vs HIRI + AICAR group.

2.5 各组大鼠肝组织细胞线粒体膜电位水平 与 Control 组比较,HIRI 组大鼠肝组织细胞线粒体膜电位水平降低;与 HIRI 组比较,HIRI + AICAR 组大鼠

肝组织细胞线粒体膜电位水平升高,而 HIRI + SR-18292 组降低;与 HIRI + AICAR 组比较,HIRI + AICAR + SR-18292 组大鼠肝组织细胞线粒体膜电

位水平降低。见图 6。

2.6 各组大鼠肝组织中线粒体生物合成水平 与 Control 组比较,HIRI 组大鼠肝组织中 ATP 水平、mtDNA 拷贝数及线粒体生物合成相关基因 PGC-1 α 、NRF1、TFAM、UQCRC2 mRNA 表达水平均降低(均 $P < 0.05$);与 HIRI 组比较,HIRI + AICAR 组大鼠肝组织中 ATP 水平、mtDNA 拷贝数及线粒体生物

合成相关基因 PGC-1 α 、NRF1、TFAM、UQCRC2 mRNA 表达水平均升高,而 HIRI + SR-18292 组均降低(均 $P < 0.05$);与 HIRI + AICAR 组比较,HIRI + AICAR + SR-18292 组大鼠肝组织中 ATP 水平、mtDNA 拷贝数及线粒体生物合成相关基因 PGC-1 α 、NRF1、TFAM、UQCRC2 mRNA 表达水平均降低(均 $P < 0.05$)。见图 7。

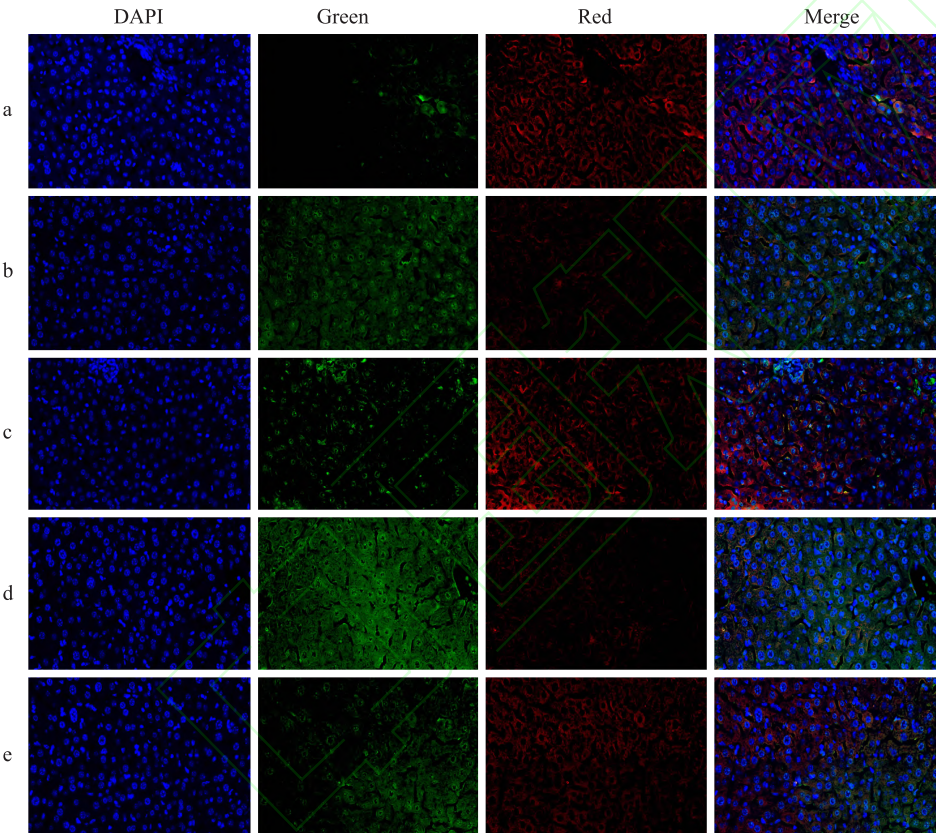


图 6 各组大鼠肝组织细胞线粒体膜电位水平比较 IF $\times 400$

Fig. 6 Comparison of mitochondrial membrane potential of liver tissue cells in each group IF $\times 400$

a: Control group; b: HIRI group; c: HIRI + AICAR group; d: HIRI + SR-18292 group; e: HIRI + AICAR + SR-18292 group.

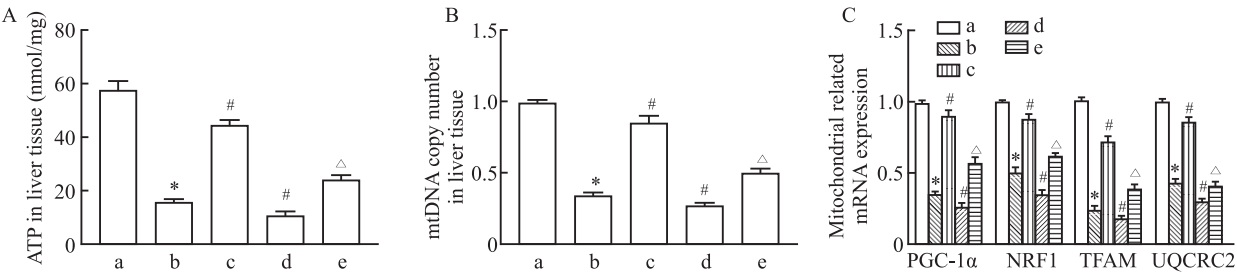


图 7 各组大鼠肝组织中线粒体生物合成相关基因表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Comparison of mitochondrial biosynthesis-related gene expression levels in liver tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

A: ATP level in liver tissue; B: Cellular mtDNA copy number in liver tissue; C: mRNA expression levels of mitochondrial biosynthesis-related genes in liver tissues; a: Control group; b: HIRI group; c: HIRI + AICAR group; d: HIRI + SR-18292 group; e: HIRI + AICAR + SR-18292 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs HIRI group; $\Delta P < 0.05$ vs HIRI + AICAR group.

2.7 各组大鼠肝组织中 AMPK/mTOR 信号通路和线粒体相关蛋白表达水平 与 Control 组比较, HIRI 组大鼠肝组织中 p-AMPK α /AMPK α 蛋白比值和 PGC-1 α 、TFAM 蛋白表达水平降低,而 p-mTOR/mTOR 蛋白比值升高(均 $P < 0.05$)。与 HIRI 组比较, HIRI + AICAR 组大鼠肝组织中 p-AMPK α /AMPK α 蛋白比值和 PGC-1 α 、TFAM 蛋白表达水平升高, p-mTOR/mTOR 蛋白比值降低(均 $P < 0.05$) ; HIRI + SR-18292 组大鼠肝组织中 PGC-1 α 和 TFAM 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$) , p-AMPK α /AMPK α 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达比值无显著变化 ($P > 0.05$)。与 HIRI + AICAR 组比较, HIRI + AICAR + SR-18292 组大鼠肝组织中 PGC-1 α 和 TFAM 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$) , p-AMPK α /AMPK α 和 p-mTOR/mTOR 蛋白表达比值无显著变化 ($P > 0.05$)。见图 8。

3 讨论

HIRI 是一个由多因素参与的复杂病理过程,包括氧自由基的损伤、钙超载损伤和多种细胞因子、黏附分子等作用导致的损伤^[12-13]。线粒体作为细胞

进行有氧呼吸和代谢的主要场所,为细胞制造能量,而肝脏作为人体内最大的代谢器官,依赖于线粒体的正常功能以保证肝组织细胞的结构完整^[14]。众多研究^[15-17]表明,线粒体对脑、心肌、肝脏等多器官缺血、缺氧敏感,再灌注过程中线粒体基层内钙超载,通过高通透性的线粒体膜,触发氧自由基损伤,导致细胞死亡;同时,组织缺血缺氧导致细胞中磷酸肌酸快速耗竭,ATP 生成显著减少,线粒体呼吸功能受限,细胞无法进行正常的有氧代谢致细胞酸中毒死亡,进而损伤组织功能。本研究采用无创血管夹阻断法构建 HIRI 大鼠模型,检测结果显示,随着再灌注时间的延长,大鼠肝功能受损,ATP 耗竭,同时 mtDNA 拷贝数和线粒体生物合成相关基因表达水平逐渐降低,说明再灌注过程中肝细胞线粒体生物合成功能被破坏,进而导致肝脏功能受损,与 Lu et al^[18]研究结果一致。提示促进线粒体生物合成及恢复线粒体数量和功能可能是预防和治疗 HIRI 的有效途径。

AMPK 作为一种细胞能量传感器,被证明在 Thr172 位点激活可以调节线粒体生物发生和裂变,减轻各种病理过程中的细胞凋亡^[19-20]。本研究结

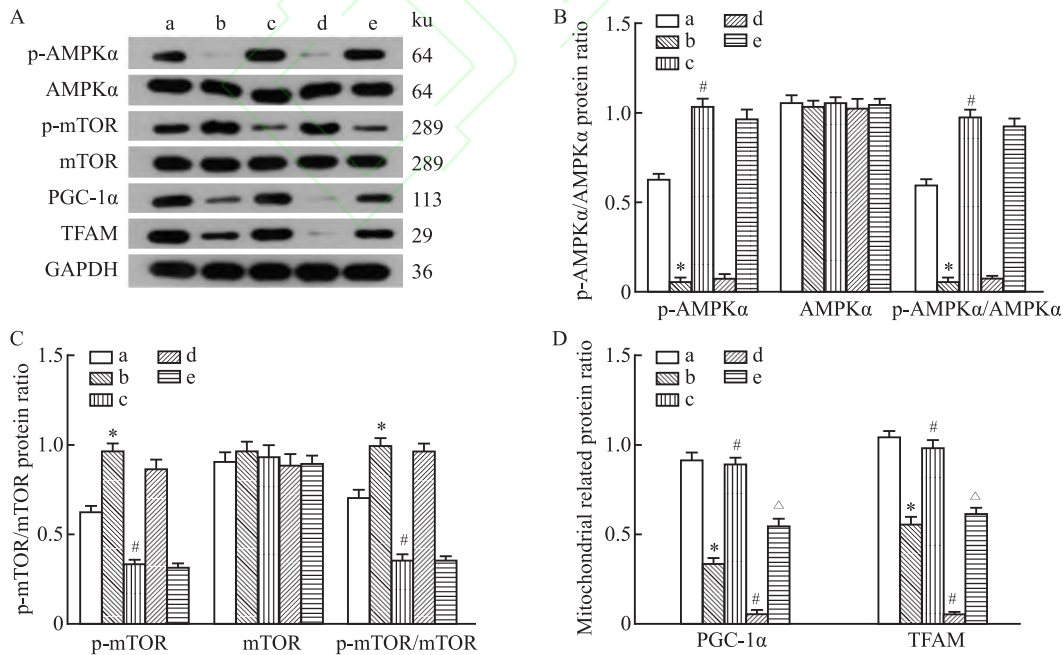


图 8 各组大鼠肝组织中 AMPK/mTOR 信号通路和线粒体相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig.8 Comparison of AMPK/mTOR signaling pathway and mitochondria-related protein expression levels in liver tissues of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

A: Pattern of protein bands; B: p-AMPK α /AMPK α protein ratio in liver tissue; C: p-mTOR/mTOR protein ratio in liver tissue; D: Mitochondrial related protein expression levels in liver tissue; a: Control group; b: HIRI group; c: HIRI + AICAR group; d: HIRI + SR-18292 group; e: HIRI + AICAR + SR-18292 group; * $P < 0.05$ vs Control group; # $P < 0.05$ vs HIRI group; Δ $P < 0.05$ vs HIRI + AICAR group.

果显示, AMPK 激动剂 AICAR 预处理可改善 HIRI 大鼠血清肝功能, 提高肝脏组织中 ATP 水平和 mtDNA 拷贝数, 同时降低肝组织中 MDA 含量和 ROS 水平, 提高 SOD 活性水平和线粒体膜电位, 说明 AMPK 可能通过抑制氧化应激, 改善线粒体功能, 减轻 HIRI 大鼠肝组织损伤。AMPK/mTOR 信号通路是经典的自噬调控通路, 雷帕霉素与其抗真菌特性的靶标 TOR 蛋白复合物 TORC1 结合形成复合体 mTOR, 其活性被激活的 AMPK 抑制, 参与整合细胞内、外信号调节机体的生理病理过程^[21]。而 AMPK 和 mTOR 同时也在细胞能量代谢过程中扮演关键角色, AMPK 可直接感应细胞 ATP 水平, 生理状态下, 细胞营养和能量降低时 AMPK 被激活, 通过抑制合成代谢减缓 ATP 消耗, 而 mTOR 在高营养状态下被激活调控分解和代谢, 二者功能相反, 相互制约, 共同维持着细胞内的营养物质水平和代谢平衡^[22]。既往研究^[23-24]表明, 调节 AMPK/mTOR 信号通路可改善脑和肝脏等多组织缺血再灌注损伤, 但其作用机制均集中于增强自噬、抑制凋亡方面。而 Zhu et al^[25]研究显示, 激活 AMPK/mTOR 信号通路可通过抑制心肌细胞中的线粒体损伤和细胞凋亡, 保护心肌缺血再灌注损伤的心肌组织, 但 AMPK/mTOR 信号通路是否在 HIRI 中发挥线粒体保护作用, 目前尚不明确。本研究结果显示, HIRI 大鼠肝组织中 p-AMPK α /AMPK α 蛋白比值及 PGC-1 α /TFAM 蛋白表达水平较正常大鼠降低, p-mTOR/mTOR 蛋白比值升高, 说明 AMPK/mTOR 信号通路被抑制; 而 AICAR 预处理可上调 HIRI 大鼠肝组织中 p-AMPK α /AMPK α 蛋白比值及 PGC-1 α /TFAM 蛋白表达水平, 下调 p-mTOR/mTOR 蛋白比值, 说明 AICAR 对 HIRI 大鼠肝组织损伤的改善作用可能是通过激活 AMPK/mTOR 信号通路实现的。

PGC-1 α 是一个主要在心脏、肝脏、肾脏等富含线粒体的组织中表达的转录共激活因子, 具有促进线粒体生物合成、葡萄糖代谢、脂肪酸氧化等多种生理学功能^[26]。NRF1 和 TFAM 是 PGC-1 α 的下游目标基因, PGC-1 α 通过对 NRF1 和 TFAM 的转录控制维持 mtDNA 的转录和复制, 同时促进线粒体呼吸链复合物 III 中的 UQCRC2 基因表达, 促进 ATP 的产生, 为组织细胞提供能量^[27]。研究^[28]显示, PGC-1 α 受 AMPK 调控, 在 Thr172 位点磷酸化激活 AMPK 会上调蛛网膜下腔出血大鼠脑组织中的 PGC-1 α , 通过

改善线粒体损伤发挥神经保护作用。而 Li et al^[29]研究通过调节 AMPK-PGC1 α 信号通路介导的抗炎、抗氧化和抗凋亡作用减轻小鼠 HIRI 损伤。但 PGC1 α 介导的线粒体生物合成在 AMPK 抗 HIRI 中作用如何, 目前尚不明确。本研究结果显示, AICAR 预处理可显著上调 HIRI 大鼠肝组织中线粒体生物合成相关基因 PGC-1 α 、NRF1、TFAM、UQCRC2 mRNA 表达水平, 而 SR-18292 联合干预可明显逆转激活 AMPK 对 HIRI 大鼠肝组织的保护作用, 说明激活 AMPK/mTOR 信号通路可能通过调节 PGC-1 α 介导的线粒体生物合成改善 HIRI 大鼠肝组织损伤。

综上所述, 在 HIRI 过程中肝脏线粒体受氧化应激损伤, 由 PGC-1 α 介导的线粒体生物合成能力降低。激活 AMPK/mTOR 信号通路, 可通过上调 PGC-1 α 表达, 促进线粒体生物合成, 减轻 HIRI 引起的肝脏损伤。本研究阐明了 PGC-1 α 介导的线粒体生物合成在 AMPK 激动剂抗 HIRI 中的作用机制, 为肝脏外科手术中缺血再灌注损伤的预防及治疗提供理论依据。

参考文献

- [1] Tong G, Chen Y, Chen X, et al. FGF18 alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury via the USP16-mediated KEAP1/Nrf2 signaling pathway in male mice[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 6107. doi: 10.1038/s41467-023-41800-x.
- [2] Goikoetxea-Usandizaga N, Serrano-Maciá M, Delgado T C, et al. Mitochondrial bioenergetics boost macrophage activation, promoting liver regeneration in metabolically compromised animals[J]. Hepatology, 2022, 75(3): 550-66. doi: 10.1002/hep.32149.
- [3] 苑伟, 毛本亮, 孙楠楠, 等. 通腑泄热法中药通过线粒体 DNA/Toll 样受体 9/微小 RNA-223 通路抑制肝脏缺血再灌注损伤[J]. 中华实验外科杂志, 2022, 39(3): 459-63. doi: 10.3760/cma.j.cn421213-20210811-01234.
- [3] Yuan W, Mao B L, Sun N N, et al. Traditional Chinese medicine for purging fu-organs and relieving heat inhibits liver ischemia-reperfusion injury through mitochondrial DNA/Toll-like receptor 9/MicroRNA-223 pathway[J]. Chin J Exp Surg, 2022, 39(3): 459-63. doi: 10.3760/cma.j.cn421213-20210811-01234.
- [4] Sharma A, Anand S K, Singh N, et al. AMP-activated protein kinase: an energy sensor and survival mechanism in the reinstatement of metabolic homeostasis[J]. Exp Cell Res, 2023, 428(1): 113614. doi: 10.1016/j.yexcr.2023.113614.
- [5] Xu X, Gao W, Li L, et al. Annexin A1 protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by modulating microglia/macrophage polarization via FPR2/ALX-dependent AMPK-mTOR pathway[J]. J Neuroinflammation, 2021, 18(1): 119. doi: 10.1186/s12974-021-02174-3.
- [6] Wang Z, Yao M, Jiang L, et al. Dexmedetomidine attenuates myo-

- cardial ischemia/reperfusion-induced ferroptosis *via* AMPK/GSK-3 β /Nrf2 axis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 154; 113572. doi: 10.1016/j.biopha.2022.113572.
- [7] 潘宁波, 张旭阳, 张 玉, 等. AMPK 激动剂预处理对肝缺血再灌注损伤大鼠模型的影响及相关机制[J]. *临床肝胆病杂志*, 2021, 37(5): 1152 – 7. doi: 10.3969/j.issn.1001 – 5256.2021.05.034.
- [7] Pan N B, Zhang X Y, Zhang Y, et al. Effect of AMPK agonist preconditioning on rat model of hepatic ischemia-reperfusion injury and its related mechanism[J]. *J Clin Hepatol*, 2021, 37(5): 1152 – 7. doi: 10.3969/j.issn.1001 – 5256.2021.05.034.
- [8] Cheng D, Zhang M, Zheng Y, et al. α -Ketoglutarate prevents hyperlipidemia-induced fatty liver mitochondrial dysfunction and oxidative stress by activating the AMPK-pgc-1 α /Nrf2 pathway[J]. *Redox Biol*, 2024, 74; 103230. doi: 10.1016/j.redox.2024.103230.
- [9] Yang Y, Qiu W, Xiao J, et al. Dihydromyricetin ameliorates hepatic steatosis and insulin resistance *via* AMPK/PGC-1 α and PPAR α -mediated autophagy pathway[J]. *J Transl Med*, 2024, 22(1): 309. doi: 10.1186/s12967 – 024 – 05060 – 7.
- [10] 徐志广, 张朴花. 虎杖苷通过调控 Nrf2/HO-1 信号通路减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤[J]. *中成药*, 2021, 43(2): 362 – 8. doi: 10.3969/j.issn.1001 – 1528.2021.02.012.
- [10] Xu Z G, Zhang P H. Polydatin attenuates liver ischemia-reperfusion injury in rats by regulating Nrf2/HO-1 signaling pathway[J]. *Chin Tradit Pat Med*, 2021, 43(2): 362 – 8. doi: 10.3969/j.issn.1001 – 1528.2021.02.012.
- [11] Sharabi K, Lin H, Tavares C D J, et al. Selective chemical inhibition of PGC-1 α gluconeogenic activity ameliorates type 2 diabetes[J]. *Cell*, 2017, 169(1): 148 – 60. doi: 10.1016/j.cell.2017.03.001.
- [12] Bardallo R, Panisello-Roselló A, Sanchez-Nuno S, et al. NRF2 and oxidative stress in liver ischemia/reperfusion injury[J]. *FEBS J*, 2022, 289(18): 5463 – 79. doi: 10.1111/febs.16336.
- [13] Liu R, Cao H, Zhang S, et al. ZBP1-mediated apoptosis and inflammation exacerbate steatotic liver ischemia/reperfusion injury[J]. *J Clin Invest*, 2024, 134(13): e180451. doi: 10.1172/JCI180451.
- [14] 伍 敏, 金 虹, 李可欣, 等. 对乙酰氨基酚致肝损伤的线粒体机制研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2023, 37(5): 393 – 400. doi: 10.3867/j.issn.1000 – 3002.2023.05.009.
- [14] Wu M, Jin H, Li K X, et al. Research progress on mitochondrial mechanism of acetaminophen-induced liver injury[J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2023, 37(5): 393 – 400. doi: 10.3867/j.issn.1000 – 3002.2023.05.009.
- [15] Cai Y, Yang E, Yao X, et al. FUNDC1-dependent mitophagy induced by tPA protects neurons against cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Redox Biol*, 2021, 38; 101792. doi: 10.1016/j.redox.2020.101792.
- [16] Jiang W, Zhang Y, Zhang W, et al. Hirsutine ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury through improving mitochondrial function *via* CaMKII pathway[J]. *Clin Exp Hypertens*, 2023, 45(1): 2192444. doi: 10.1080/10641963.2023.2192444.
- [17] Wang L, Feng Z J, Ma X, et al. Mitochondrial quality control in hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *Heliyon*, 2023, 9(7): e17702. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e17702.
- [18] Lu Y, Kan H, Wang Y, et al. Asiatic acid ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury in rats *via* mitochondria-targeted protective mechanism[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2018, 338: 214 – 23. doi: 10.1016/j.taap.2017.11.023.
- [19] Zhang Y, Wang Y, Xu J, et al. Melatonin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury *via* improving mitochondrial fusi on/mitophagy and activating the AMPK-OPA1 signaling pathways[J]. *J Pineal Res*, 2019, 66(2): e12542. doi: 10.1111/jpi.12542.
- [20] Zhou H, Wang S, Zhu P, et al. Empagliflozin rescues diabetic myocardial microvascular injury *via* AMPK-mediated inhibition of mitochondrial fission[J]. *Redox Biol*, 2018, 15: 335 – 46. doi: 10.1016/j.redox.2017.12.019.
- [21] Alers S, Löffler A S, Wesselborg S, et al. Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks[J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(1): 2 – 11. doi: 10.1128/MCB.06159 – 11.
- [22] Chun Y, Kim J. AMPK-mTOR signaling and cellular adaptations in hypoxia[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(18): 9765. doi: 10.3390/ijms22189765.
- [23] Sun X, Wang D, Zhang T, et al. Eugenol attenuates cerebral ischemia-reperfusion injury by enhancing autophagy *via* AMPK-mTOR-P70S6K pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 84. doi: 10.3389/fphar.2020.00084.
- [24] Liu H, Dong J, Song S, et al. Spermidine ameliorates liver ischemia-reperfusion injury through the regulation of autophagy by the AMPK-mTOR-ULK1 signalling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 519(2): 227 – 33. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.08.162.
- [25] Zhu J, Wang Y F, Chai X M, et al. Exogenous NADPH ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats through activating AMPK/mTOR pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(4): 535 – 45. doi: 10.1038/s41401 – 019 – 0301 – 1.
- [26] Halling J F, Pilegaard H. PGC-1 α -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications[J]. *Appl Physiol Nutr Metab*, 2020, 45(9): 927 – 36. doi: 10.1139/apnm – 2020 – 0005.
- [27] Abu Shelbayeh O, Arroum T, Morris S, et al. PGC-1 α is a master regulator of mitochondrial lifecycle and ROS stress response[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(5): 1075. doi: 10.3390/antiox12051075.
- [28] Fan H, Ding R, Liu W, et al. Heat shock protein 22 modulates NRF1/TFAM-dependent mitochondrial biogenesis and DRP1-sparked mitochondrial apoptosis through AMPK-PGC1 α signaling pathway to alleviate the early brain injury of subarachnoid hemorrhage in rats[J]. *Redox Biol*, 2021, 40; 101856. doi: 10.1016/j.redox.2021.101856.
- [29] Li J, Li J, Fang H, et al. Isolongifolene alleviates liver ischemia/reperfusion injury by regulating AMPK-PGC1 α signaling pathway-mediated inflammation, apoptosis, and oxidative stress[J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 113(Pt A): 109185. doi: 10.1016/j.intimp.2022.109185.

The role of PGC-1 α mediated mitochondrial biosynthesis in the protection of AMPK agonist against hepatic ischemia-reperfusion injury

Ao Yu, Zhang Xuyang, Tang Dan, Liu Gongwei, Huang Dan, Cai Zhifang

(Dept of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563000)

Abstract *Objective* To investigate the role and mechanism of PGC-1 α -mediated mitochondrial biosynthesis in AMP-activated protein kinase (AMPK) agonist anti-hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI). *Methods* SD rats were randomly divided into Control group, HIRI group, HIRI + AICAR group, HIRI + SR-18292 group and HIRI + AICAR + SR-18292 group, with 8 rats in each group. The rats were intraperitoneally injected with AICAR (500 mg/kg) or SR-18292 (32 mg/kg) before operation, and then the HIRI model was established by non-invasive vascular clamp clamping method. The samples were taken 24 hours after reperfusion. The contents of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum and the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and adenosine triphosphate (ATP) in liver tissue were detected. HE staining was used to observe the pathological changes of liver tissue. The level of reactive oxygen species (ROS) and the changes of mitochondrial membrane potential in liver tissue were detected by fluorescence probe. The copy number of mitochondrial DNA (mtDNA) and the mitochondrial biosynthesis-related genes PGC-1 α , NRF1, TFAM, UQCRC2 and other mRNA expression levels were detected by qRT-PCR. Western blot was used to detect the protein expression levels of AMPK α , p-AMPK α , mTOR, p-mTOR, PGC-1 α and TFAM in liver tissue. *Results* Compared with the control group, the levels of ALT and AST in serum and MDA and ROS in liver tissue of rats in HIRI group increased, while the levels of SOD and ATP decreased (all $P < 0.05$). At the same time, the mtDNA copy number, mitochondrial membrane potential and the mRNA expression levels of PGC-1 α , NRF1, TFAM, and UQCRC2 in liver tissues decreased, and the protein ratio of p-AMPK α /AMPK α and the protein expression levels of PGC-1 α and TFAM decreased. The ratio of p-mTOR/mTOR protein increased (both $P < 0.05$). Compared with HIRI group, the levels of ALT and AST in serum and MDA and ROS in liver tissue of rats in HIRI + AICAR group decreased, while the levels of SOD and ATP increased (all $P < 0.05$). At the same time, the mtDNA copy number, mitochondrial membrane potential and the mRNA expression levels of PGC-1 α , NRF1, TFAM, and UQCRC2 in liver tissue increased, and the protein ratio of p-AMPK α /AMPK α and the protein expression levels of PGC-1 α and TFAM increased. The ratio of p-mTOR/mTOR protein decreased (both $P < 0.05$). However, combined with SR-18292 intervention, the protective effect of AICAR on liver tissue of HIRI rats was significantly reversed. *Conclusion* PGC-1 α mediated mitochondrial biosynthesis is involved in the regulation of AMPK agonist-mediated protective effect of HIRI, and its mechanism may be related to the activation of AMPK/mTOR signaling pathway.

Key words ischemia-reperfusion injury; AMP-activated protein kinase; mTOR; PGC-1 α ; mitochondrial biosynthesis; AMPK/mTOR signaling pathway

Fund program Scientific and Technological Project of Guizhou Health Commission (No. WJW-2021-014)

Corresponding author Cai Zhifang, E-mail: 2128985306@qq.com