

文章编号 1006-8147(2022)05-0459-07

论著

锌转运体 ZIP13 在小鼠肝脏缺血再灌注损伤中的作用

江天铎,程欣欣,徐哲龙

(天津医科大学基础医学院病理生理学教研室,天津 300070)

摘要 目的:探讨锌转运体 ZIP13(SLC39A13)在肝脏缺血再灌注损伤中的作用及机制。方法:通过结扎肝左叶和肝中叶的门静脉及肝动脉共干,建立小鼠在体肝脏缺血再灌注模型,将小鼠分组如下:(1)ZIP13^{fl/fl}-Sham 组、ZIP13^{fl/fl}+IIR12 组和 ZIP13^{fl/fl}+IIR12 组。(2)ZIP13^{fl/fl}-Sham 组、ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组和 ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组。(3)Vector-Sham 组、Vector+IIR12 组和 ZIP13^{OE}+IIR12 组。(4)Vector-Sham 组、Vector+IIR24 组和 ZIP13^{OE}+IIR24 组,上述每组小鼠 3~4 只。采用电感耦合等离子发射光谱仪(ICP-OES)测量肝组织的锌含量;试剂盒检测丙氨酸转氨酶(ALT)和门冬氨酸转氨酶(AST)水平;HE 染色观察病理学改变;原位末端转移酶标记法(TUNEL 法)检测细胞凋亡;Western 印迹检测 CHOP、GRP78 和凋亡蛋白表达。结果:与 ZIP13^{fl/fl} 小鼠相比,ZIP13^{fl/fl} 小鼠肝脏中 ZIP13 表达明显下降($t=6.26, P<0.01$),而与 Vector 感染对照小鼠相比,ZIP13^{OE} 小鼠肝脏 ZIP13 蛋白表达明显增加($t=4.17, P<0.05$)。与 ZIP13^{fl/fl}-Sham 组相比,ZIP13^{fl/fl}+IIR12 组血清 ALT、AST 水平升高($t=11.43, 13.70$, 均 $P<0.001$),ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组小鼠肝组织锌含量明显降低($t=13.49, P<0.001$),内质网应激蛋白 CHOP 和 GRP78 表达增强($t=4.76, 4.54$, 均 $P<0.05$),凋亡蛋白 Cleaved Caspase9 和 Cleaved Caspase3 表达升高($t=4.56, 3.73$, 均 $P<0.05$)。与相应的 ZIP13^{fl/fl} 缺血再灌注组相比,ZIP13^{fl/fl}+IIR12 组血清 ALT、AST 水平进一步升高($t=2.95, 3.20$, 均 $P<0.05$),ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组肝组织中锌含量显著降低($t=3.29, P<0.05$),内质网应激蛋白表达上调($t=2.60, 2.98$, 均 $P<0.05$),凋亡蛋白表达也明显升高($t=3.44, 2.49$, 均 $P<0.05$)。与相应的 Vector 感染缺血再灌注组相比,ZIP13^{OE}+IIR12 组血清 ALT、AST 水平明显下降($t=3.69, 4.26$, 均 $P<0.05$),ZIP13^{OE}+IIR24 组小鼠肝组织中锌含量增加($t=3.88, P<0.05$),内质网应激蛋白表达下降($t=3.47, 2.88$, 均 $P<0.05$),凋亡蛋白的表达水平也呈现降低($t=3.02, 2.96$, 均 $P<0.05$)。结论:肝脏缺血再灌注时,ZIP13 通过维持肝脏锌稳态,减轻内质网应激和细胞凋亡。

关键词 锌转运蛋白 ZIP13;肝脏缺血再灌注;锌;内质网应激;细胞凋亡

中图分类号 R363

文献标志码 A

Role of zinc transporter ZIP13 in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice

JIANG Tian-duo, CHENG Xin-xin, XU Zhe-long

(Department of Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role of zinc transporter ZIP13 (SLC39A13) in hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury and the underlying mechanism. **Methods:** Mouse liver I/R model *in vivo* was established by ligating the common trunk of portal vein and hepatic artery in the left and middle lobes of the liver. Mice were grouped as follows: (1) ZIP13^{fl/fl}-Sham group, ZIP13^{fl/fl}+IIR12 group and ZIP13^{fl/fl}+IIR12 group. (2) ZIP13^{fl/fl}-Sham group, ZIP13^{fl/fl}+IIR24 group and ZIP13^{fl/fl}+IIR24 group. (3) Vector-Sham group, Vector+IIR12 group and ZIP13^{OE}+IIR12 group. (4) Vector-Sham group, Vector+IIR24 group and ZIP13^{OE}+IIR24 group, with 3~4 mice in each group. Hepatic zinc levels were measured by inductively coupled plasma-optical emission spectrometer (ICP-OES). The levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were detected by the assay kits. HE staining was adopted to observe the structure changes of liver tissues. TUNEL staining was performed to assess apoptosis. Western blotting analysis was conducted to detect the expressions of CHOP, GRP78, and apoptotic proteins in the liver. **Results:** Compared with ZIP13^{fl/fl} mice, the expression of ZIP13 protein in the liver of ZIP13^{fl/fl} mice was obviously decreased ($t=6.26, P<0.01$), while its protein level was clearly increased in the liver of ZIP13^{OE} mice ($t=4.17, P<0.05$). Compared with the ZIP13^{fl/fl}-Sham group, the levels of ALT and AST in ZIP13^{fl/fl}+IIR12 group were increased (t values were 11.43 and 13.70, $P<0.001$), and hepatic zinc content in the ZIP13^{fl/fl}+IIR24 group was decreased ($t=13.49, P<0.001$). Additionally, the expressions of endoplasmic reticulum stress proteins CHOP and GRP78 were enhanced ($t=4.76, 4.54$, both $P<0.05$), and the expressions of apoptosis proteins Cleaved Caspase9 and Cleaved Caspase3 were also increased ($t=4.56, 3.73$, both $P<0.05$). Compared with the corresponding ZIP13^{fl/fl} mice subjected to I/R, the ZIP13^{fl/fl}+IIR12 group increased ALT and AST levels (t values were 2.95 and 3.2, both $P<0.05$), and the ZIP13^{fl/fl}+IIR24 group showed a further decrease in hepatic zinc content ($t=3.29, P<0.05$). Moreover, the expressions of endoplasmic reticulum stress proteins were upregulated ($t=2.6, 2.98$, both $P<0.05$), and the expressions of apoptotic proteins were obviously increased ($t=3.44, 2.49$, both $P<0.05$). In contrast, compared with the corresponding vector-infected I/R control group, the levels of ALT and AST in the ZIP13^{OE}+IIR12 group were significantly reduced ($t=3.69, 4.26$, both $P<0.05$). In the ZIP13^{OE}+IIR24 group, the increase in hepatic

基金项目 天津市自然科学基金青年项目(20JCQNJC00190)

作者简介 江天铎(1995-),男,硕士在读,研究方向:病理学与病理生理学;通信作者:徐哲龙, E-mail: zxu@tmu.edu.cn.

zinc content was observed ($t=3.88, P<0.05$), the expressions of reticulum stress proteins were decreased ($t=3.47, 2.88$, both $P<0.05$), and the expression levels of apoptotic proteins were also reduced ($t=3.02, 2.96$, both $P<0.05$). **Conclusion:** During liver I/R, ZIP13 alleviates endoplasmic reticulum stress and apoptosis by maintaining liver zinc homeostasis.

Key words zinc transporter ZIP13; hepatic ischemia/reperfusion; zinc; endoplasmic reticulum stress; apoptosis

肝脏缺血再灌注损伤常见于肝脏外科手术过程中,如肝移植、肝切除等。肝脏缺血再灌注损伤是缺血肝组织在恢复血液供应后,肝损伤反而进一步加重的现象,会引起一系列生理生化改变,包括炎症、氧化应激、内质网应激和细胞凋亡等^[1-3],但其具体发病和保护机制尚不清楚。

锌是维持人体正常生理功能所必需的微量元素,在人体内参与300余种酶的活化以及1000余种转录因子三维结构的稳定。研究表明,维持锌离子的稳态有助于减轻肾、胃、肝、心等器官缺血再灌注损伤^[4]。细胞锌离子的稳态受离子通道、金属硫蛋白及锌转运体的严格调控^[5-6]。ZIP13作为锌转运蛋白家族成员之一,在调控锌离子稳态中起到重要的作用,它主要定位于高尔基体、内质网和其他细胞器内^[7-8]。本研究组最新的研究结果证明,ZIP13在小鼠心肌缺血再灌注损伤中起着重要作用^[9],但ZIP13在肝脏缺血再灌注损伤中的作用还尚不清楚。因此,本研究的目的是探讨ZIP13在肝脏缺血再灌注损伤中的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6J野生型雄性小鼠由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供[动物批号:SYXK-20190004,许可证号SCXK(京)2019-0010]。ZIP13 flox (ZIP13^{fllox})小鼠由南京大学-南京生物医药研究院提供。Alb-Cre小鼠为常永生教授赠送。所有小鼠均在SPF级动物房饲养繁殖。动物实验方案获得天津医科大学实验动物伦理委员会批准,并严格按照国家实验动物管理及使用指南操作。

选取8周龄雄性ZIP13^{fllox}和ZIP13^{fllox}小鼠,采用随机数字表法将24只小鼠分组如下:(1)假手术组(ZIP13^{fllox}-Sham组)、缺血1h再灌注12h组(ZIP13^{fllox}+I1R12组)和肝脏ZIP13基因特异性敲除缺血1h再灌注12h组(ZIP13^{fllox}+I1R12组),每组小鼠各4只。(2)ZIP13^{fllox}-Sham组、缺血1h再灌注24h组(ZIP13^{fllox}+I1R24组)和肝脏ZIP13基因特异性敲除缺血1h再灌注24h组(ZIP13^{fllox}+I1R24组),每组小鼠各4只。选取8周龄雄性腺相关病毒(AAV)感染小鼠,采用随机数字表法将24只小鼠分组如下:(1)空载体感染假手术组(Vector-Sham组)、空载体感染缺血1h再灌注12h组(Vector+I1R12组)、ZIP13

过表达载体感染缺血1h再灌注12h组(ZIP13^{OE}+I1R12组),每组小鼠各4只。(2)Vector-Sham组、空载体感染缺血1h再灌注24h组(Vector+I1R24组)、ZIP13过表达载体感染缺血1h再灌注24h组(ZIP13^{OE}+I1R24组),每组小鼠各4只。

1.1.2 实验试剂 丙氨酸氨基转移酶(ALT)和门冬氨酸氨基转移酶(AST)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;TUNEL凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;Caspase 9抗体(10380-1-AP)、Caspase 3抗体(19677-1-AP)、GRP78抗体(11587-1-AP)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;CHOP抗体(2895S)、抗-GAPDH抗体(2118S)、Anti-rabbit IgG抗体(7074S)均购自美国Cell Signaling Technology公司;BCL-2抗体(Sc-492)购自美国Santa Cruz公司;Anti Mouse IgG抗体(RS0001)购自美国ImmunoWay Biotechnology公司;AAV购自上海汉恒生物科技有限公司;改良苏木素染色液购自北京雷根生物技术有限公司;伊红染色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 肝脏特异性敲除ZIP13转基因小鼠的构建 首先将ZIP13^{fllox}小鼠和Alb-Cre小鼠杂交获得F1代,基因型为ZIP13^{fllox}/Alb-Cre。F1代小鼠成年后继续与ZIP13 flox小鼠杂交,通过提取鼠尾基因组进行基因型鉴定,即可得肝脏特异性表达Cre的ZIP13 flox纯合小鼠,基因型为ZIP13^{fllox}/Alb-Cre(ZIP13^{fllox})。

1.2.2 肝脏特异性过表达ZIP13转基因小鼠的构建 将24只4周龄C57BL/6J野生型雄性小鼠按照随机数字表法根据1.1.1实验动物安排进行分组,通过尾静脉向相应分组小鼠分别注射ZIP13过表达腺病毒载体(ZIP13^{OE})和对照空载体(Vector),注射剂量为100 μ L/只,4周后取小鼠肝脏,通过Western印迹检测ZIP13蛋白表达水平并进行后续实验。

1.2.3 小鼠肝脏缺血再灌注模型的建立 按照1.1.1实验动物分组,对相应动物建立缺血再灌注模型。动物术前12h禁食,不禁水。经2.5%三溴乙醇腹腔麻醉,腹部至剑突区剃毛,75%乙醇术区消毒,取上腹正中切口并迅速打开腹腔。充分暴露第一肝门,小心分离出肝左叶和肝中叶,并游离出门静脉和肝动脉,用显微血管夹夹闭,使得肝左叶和肝中叶缺血,以实现70%的肝组织缺血。临时关腹,并用

动物体温维持仪对小鼠体温进行监控,保持小鼠体温恒定。小鼠肝脏均接受 1 h 缺血,根据不同分组需要分别再灌注 12 h 或者 24 h。假手术组仅开腹、游离血管及关腹等操作,不进行脉管夹闭。

1.2.4 小鼠肝功能测定 肝脏缺血再灌注后 12 h 处死小鼠,其中包括以下分组:(1)ZIP13^{fl/fl}-Sham 组、ZIP13^{fl/fl}+IIR12 组、ZIP13^{fl/fl}+IIR12 组,每组小鼠各 4 只。(2)Vector-Sham 组、Vector+IIR12 组、ZIP13^{OE}+IIR12 组,每组小鼠各 4 只。采用心脏穿刺法收集血液,4℃静置过夜,2 000×g 离心 20 min,取血清,按照试剂盒说明书检测 ALT 和 AST 含量。

1.2.5 肝脏组织病理学检测 肝脏缺血再灌注后 24 h 处死小鼠,其中包括以下分组:(1)ZIP13^{fl/fl}-Sham 组、ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组、ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组,每组小鼠各 4 只。(2)Vector-Sham 组、Vector+IIR24 组、ZIP13^{OE}+IIR24 组,每组小鼠各 4 只。肝组织经 4% 多聚甲醛固定,梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后进行组织切片,HE 染色,中性树胶封片,显微镜下观察组织病理学改变。

1.2.6 肝脏组织锌含量的测定 取适量肝组织,真空干燥箱干燥 2 h 后称重,剪碎后加入浓硝酸,120℃ 硝解 1 h,13%硝酸定容至 3 mL。配置标准 Blank 液及含 Zn²⁺标准品溶液,建立 Zn²⁺浓度标准曲线。使用 ICP-OES 在 206.2 nm 波长对 Zn²⁺浓度进行测量。

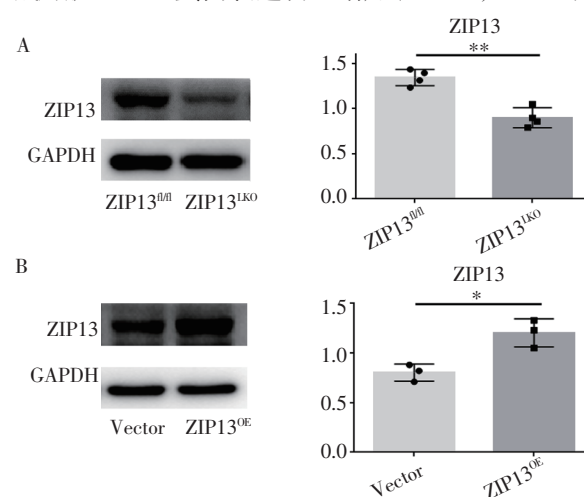
1.2.7 TUNEL 法染色检测肝细胞凋亡 将石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇复水,滴加 20 μg/mL 不含 DNase 的蛋白酶 K,37℃孵育 20 min 进行抗原修复。PBS 洗涤 3 次,加入 TUNEL 检测液,37℃避光孵育 60 min。PBS 洗涤 3 次,荧光显微镜观察肝细胞凋亡。

1.2.8 Western 印迹检测肝脏相关蛋白表达 取小鼠肝组织,在冰上剪成小块,加入 RIPA 裂解液(裂解液:PMSF=100:1)充分研磨,冰上静置 30 min,12 000×g,4℃离心 15 min。取上清液用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白经变性后,配制 12%分离胶和 5%浓缩胶进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将凝胶内的蛋白转移至 PVDF 膜上。用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。一抗 GAPDH(1:2 000)、Caspase 9(1:1 000)、Caspase 3(1:1 000)、Bcl-2(1:500)、CHOP(1:500)、GRP78(1:5 000)4℃孵育过夜。第二天用 TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。二抗 Anti-rabbit IgG(1:2 000)Anti Mouse IgG(1:5 000)室温孵育 1 h,TBST 洗涤 3 次,每次 10 min。化学发光液显色曝光,用 Image J 软件分析,其中以 GAPDH 为内参,以目的蛋白与内参的灰度值比值反应目的蛋白的表达水平。

1.3 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,采用 Graph-Pad Prism 8.0 统计软件进行统计学处理,采用 *t* 检验以及单因素方差分析(one-way ANOVA),*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脏特异性 ZIP13 基因敲除(ZIP13^{fl/fl})小鼠和过表达(ZIP13^{OE})小鼠的鉴定 分别提取 8 周龄 ZIP13^{fl/fl}、ZIP13^{fl/fl}、Vector 和 ZIP13^{OE} 小鼠肝脏组织蛋白,检测 ZIP13 蛋白表达,如图 1 所示,与 ZIP13^{fl/fl} 小鼠相比,ZIP13^{fl/fl} 小鼠肝脏中 ZIP13 表达明显下降(*t*=6.26,*P*<0.01);与 Vector 小鼠相比,ZIP13^{OE} 小鼠肝脏 ZIP13 蛋白表达明显增加(*t*=4.17,*P*<0.05)。



注:**P*<0.05,***P*<0.01;A:ZIP13^{fl/fl}小鼠肝脏中 ZIP13 的蛋白表达;B:ZIP13^{OE}小鼠肝脏中 ZIP13 的蛋白表达

图 1 Western 印迹检测 ZIP13 蛋白在 ZIP13^{fl/fl}和 ZIP13^{OE}小鼠肝脏中的表达

Fig 1 Expressions of ZIP13 protein in ZIP13^{fl/fl} and ZIP13^{OE} mice detected by Western blotting analysis

2.2 ZIP13 对小鼠肝功能的影响 与 ZIP13^{fl/fl}-Sham 组相比,ZIP13^{fl/fl}+IIR12 组血清 ALT、AST 水平显著升高(*t*=11.43、13.70,均 *P*<0.001);与 ZIP13^{fl/fl}+IIR12 组相比,ZIP13^{fl/fl}+IIR12 组血清 ALT、AST 水平显著升高(*t*=2.95、3.20,均 *P*<0.05)(表 1)。而与 Vector+IIR12 组相比,ZIP13^{OE}+IIR12 组血清 ALT、AST 水平明显下降(*t*=3.69、4.26,均 *P*<0.05)(表 2)。

表 1 各组小鼠 ALT 和 AST 活性的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Comparison of ALT and AST activities in mice among various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AST(U/L)	ALT(U/L)
ZIP13 ^{fl/fl} -Sham 组	4	17.63±1.75	10.89±3.36
ZIP13 ^{fl/fl} +IIR12 组	4	105.52±3.56 ^a	67.48±5.57 ^a
ZIP13 ^{fl/fl} +IIR12 组	4	130.06±4.59 ^b	91.63±4.86 ^b
<i>F</i>		145.2	102.6
<i>P</i>		<0.001	<0.001

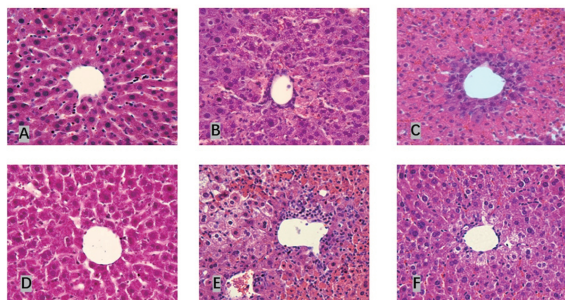
注:除 Sham 组,其余小鼠均做肝脏缺血 1 h 再灌注 12 h(IIR12)处理;与 ZIP13^{fl/fl}-Sham 组相比,^a*P*<0.001;与 ZIP13^{fl/fl}+IIR12 组相比,^b*P*<0.05;ALT:丙氨酸氨基转移酶;AST:天门冬氨酸氨基转移酶

表 2 注射相应腺相关病毒后,各组小鼠 ALT 和 AST 活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab 2 Comparison of ALT and AST activities in mice among various groups after AAV infection ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AST (U/L)	ALT (U/L)
Vector-Sham 组	4	18.19±1.99	9.34±3.69
Vector+IIR24 组	4	96.40±12.25 ^a	82.40±7.30 ^a
ZIP13 ^{OE} +IIR24 组	4	76.31±12.96 ^b	67.49±10.42 ^b
F		143.9	236.9
P		<0.001	<0.001

注:除 Sham 组,其余小鼠均做肝脏缺血 1 h 再灌注 12 h(IIR24)处理;与 Vector-Sham 组相比,^a $P<0.001$;与 Vector+IIR24 组相比,^b $P<0.05$;ALT:丙氨酸氨基转移酶;AST:天门冬氨酸氨基转移酶

2.3 ZIP13 对小鼠肝脏形态学的影响 光镜下观察发现,ZIP13^{fl/fl}-Sham 组肝索排列整齐,肝细胞形态正常,胞质染色均匀,核完整,肝窦无明显扩展、淤血、炎细胞浸润等病理改变(图 2A)。与 ZIP13^{fl/fl}-Sham 组相比,ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组肝脏肝索结构紊乱,细胞明显水肿形成空泡结构,肝血窦受挤压,有炎性细胞聚集、肝细胞坏死等病理改变(图 2A、2B)。与 ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组相比,ZIP13^{IKO}+IIR24 组肝细胞水肿更明显,肝淤血更严重、肝细胞坏死更严重(图 2B、2C)。与 Vector+IIR24 组相比,ZIP13^{OE}+IIR24 组肝细胞水肿减轻,肝细胞坏死减轻,淤血与炎细胞浸润等病理改变减轻(图 2E、2F)。



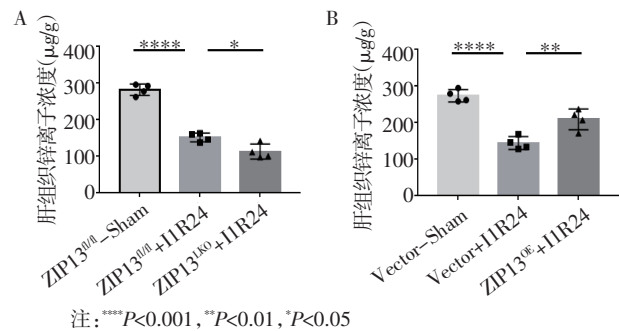
注:A:ZIP13^{fl/fl}-Sham 组; B:ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组; C:ZIP13^{IKO}+IIR24 组; D: Vector-Sham 组; E: Vector+IIR24 组; F:ZIP13^{OE}+IIR24 组
图 2 HE 染色在显微镜下观察肝脏病理结构(400×)

Fig 2 HE staining was used to observe the pathological structure of liver under microscope(400×)

2.4 ZIP13 对小鼠肝细胞内锌水平的影响 在肝脏缺血再灌注时,与 ZIP13^{fl/fl}-Sham 组相比,ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组肝组织内锌水平明显降低($t=13.49, P<0.001$);与 ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组相比,ZIP13^{IKO}+IIR24 组肝组织锌含量进一步降低($t=3.29, P<0.05$)(图 3A)。与 Vector+IIR24 组相比,ZIP13^{OE}+IIR24 组肝组织锌含量明显上升($t=3.88, P<0.05$)(图 3B)。

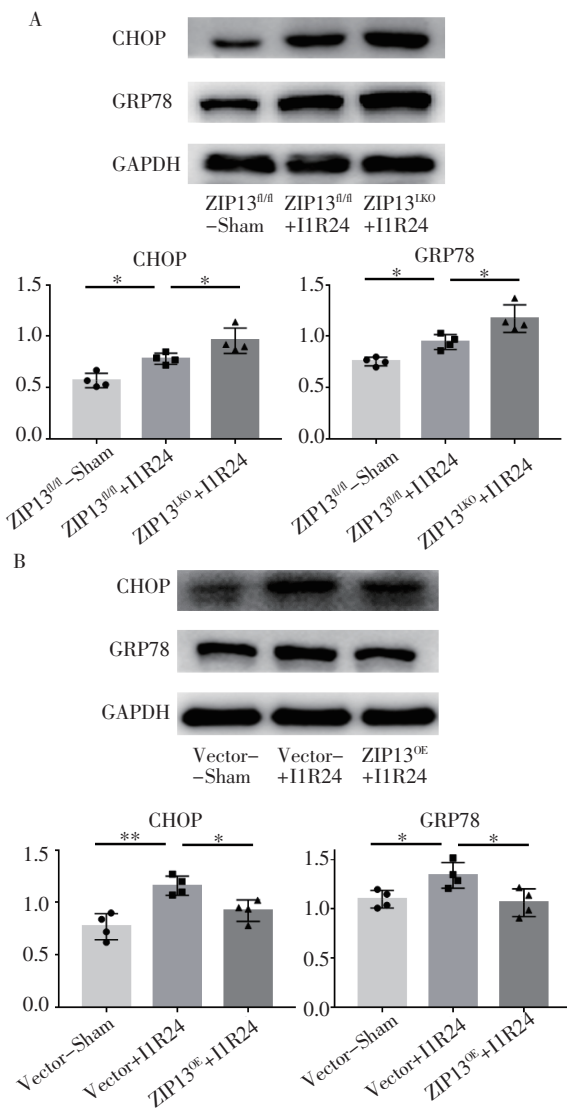
2.5 ZIP13 对小鼠内质网的影响 Western 印迹显示,肝脏缺血再灌注时,与 ZIP13^{fl/fl}-Sham 组相比,ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组肝细胞内质网应激相关蛋白 CHOP 和 GRP78 的表达明显增加($t=4.76、4.54$,均 $P<0.05$);

与 ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组相比,ZIP13^{IKO}+IIR24 组 CHOP 和 GRP78 蛋白表达进一步增加($t=2.60、2.98$,均 $P<0.05$)(图 4A);与 Vector+IIR24 组相比,ZIP13^{OE}+IIR24 组 CHOP 和 GRP78 蛋白表达降低($t=3.47、2.88$,均 $P<0.05$)(图 4B)。



注:**** $P<0.001$,** $P<0.01$,* $P<0.05$
图 3 ICP-OES 法测定肝脏 Zn²⁺水平

Fig 3 Liver Zn²⁺ levels measured by ICP-OES



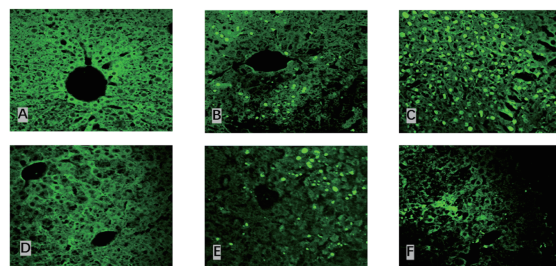
注:** $P<0.01$,* $P<0.05$

图 4 Western 印迹检测 CHOP 和 GRP78 蛋白表达

Fig 4 Expression of CHOP and GRP78 detected by Western blotting

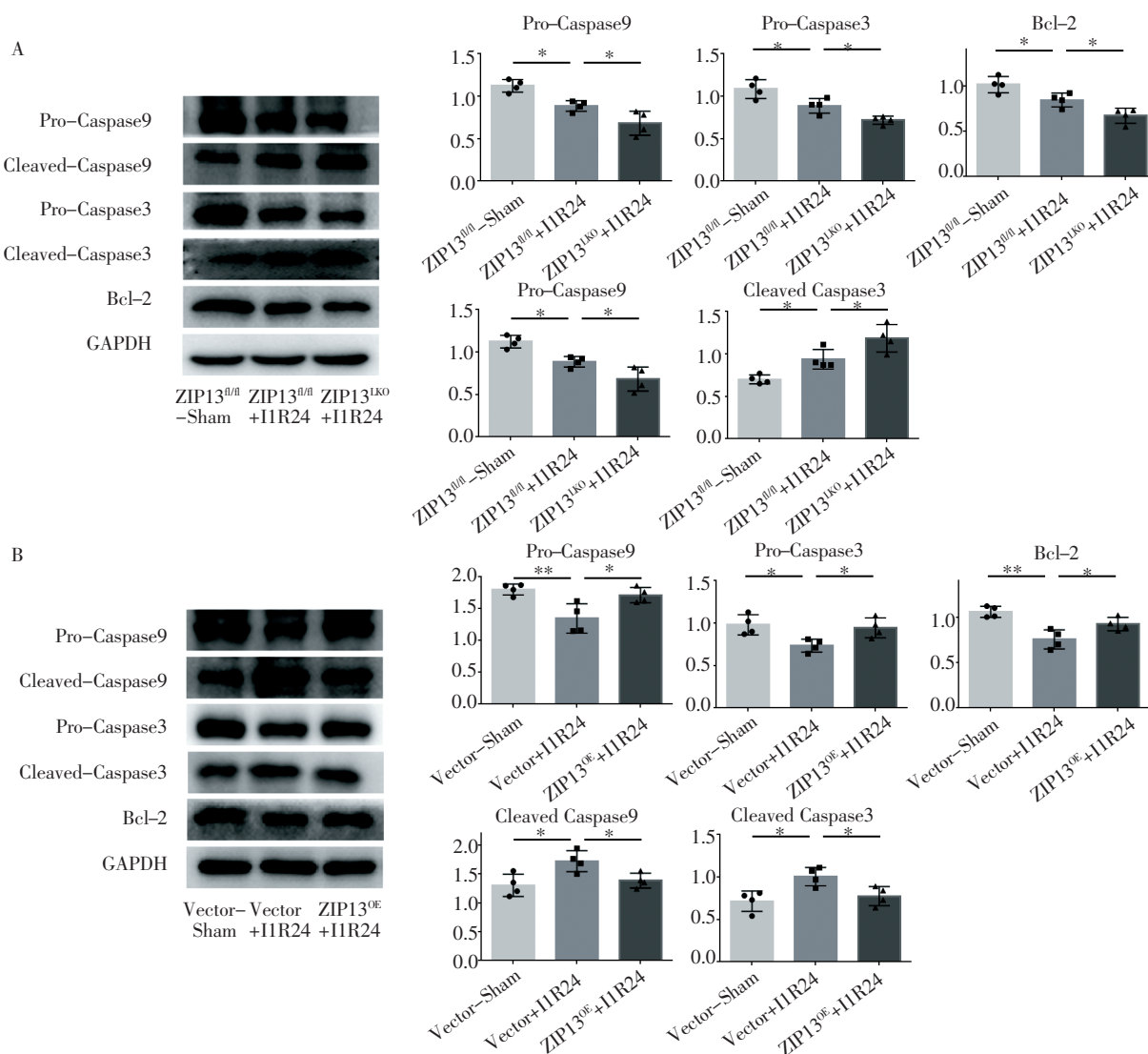
2.6 ZIP13 对小鼠肝细胞凋亡的影响 从 TUNEL 结果上看,与 ZIP13^{fl/fl}-Sham 组相比,肝脏缺血再灌注后,肝细胞凋亡明显增加(图 5A、5B、5C);与 ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组相比,ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组肝细胞凋亡小体明显增加(图 5B、5C);与 Vector+IIR24 组相比,ZIP13^{OE}+IIR24 组肝细胞凋亡小体减少(图 5E、5F)。Western 印迹显示,与 ZIP13^{fl/fl}-Sham 组相比,ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组肝组织活化形式的凋亡蛋白 Cleaved Caspase9、Cleaved Caspase3 表达升高($t=4.56, 3.73$, 均 $P<0.05$),而未活化的凋亡蛋白 Caspase9 和 Caspase3 以及抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量降低($t=4.92, 2.8, 2.89$, 均 $P<0.05$)。与 ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组相比,ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组活化形式的凋亡蛋白 Cleaved Caspase9、Cleaved Caspase3 表达增加($t=3.44, 2.49$, 均 $P<0.05$),而 Caspase9、Caspase3 和 Bcl-2 蛋白表达降低($t=2.62$ 、

$3.43, 3.07$, 均 $P<0.05$)(图 6A)。与 Vector+IIR24 组相比,ZIP13^{OE}+IIR24 组活化形式的凋亡蛋白 Cleaved Caspase9、Cleaved Caspase3 表达降低($t=3.02, 2.96$, 均 $P<0.05$),而 Caspase9、Caspase3 和 Bcl-2 蛋白表达升高($t=2.8, 3.02, 2.64$, 均 $P<0.05$)(图 6B)。



注: A: ZIP13^{fl/fl}-Sham 组; B: ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组; C: ZIP13^{fl/fl}+IIR24 组; D: Vector-Sham 组; E: Vector+IIR24 组; F: ZIP13^{OE}+IIR24 组
图 5 TUNEL 染色后,共聚焦显微镜下检测凋亡小体(400 \times)

Fig 5 Apoptotic bodies detected by TUNEL staining kit under confocal microscope(400 \times)



注: ** $P<0.01$; * $P<0.05$

图 6 Western 印迹检测肝组织中凋亡蛋白 Caspase 3 及裂解形式, Caspase 9 及裂解形式及抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达

Fig 6 Apoptosis protein Caspase 3 and its cleaved form, Caspase 9 and its cleaved form and anti-apoptotic protein Bcl-2 detected in whole liver tissue lysates by Western blotting

3 讨论

肝脏缺血再灌注损伤的发生机制十分复杂,与酸中毒、肝细胞钙超载、氧自由基产生过多、Kupffer 细胞与中性粒细胞浸润及细胞因子等密切相关^[10-11]。肝脏缺血再灌注损伤可严重损害肝功能,甚至产生不可逆的损害,从而导致多器官功能障碍的级联反应^[2]。在肝脏移植、肝癌切除等手术中,预防并减轻肝脏缺血再灌注损伤,是肝功能恢复和提高手术质量的关键^[3]。

锌离子可通过多种途径调节相关炎症信号转导起到抗炎、抗氧化应激的作用^[12]。研究表明,外源给予锌能够通过多种机制减轻肝脏缺血再灌注损伤^[13-15]。本研究结果首次证实了肝脏缺血再灌注时,肝细胞内锌水平显著降低,这可能是肝脏缺血再灌注损伤的机制之一。近年来,锌转运蛋白在 I/R 中的作用已成为国内外研究的热点。哺乳动物细胞中锌离子稳态主要由两个锌转运蛋白家族来维持,即 SLC39A(solute-linked carrier 39A,SCL39A)和 SLC30A(solute-linked carrier 30A,SLC30A)。SLC39A 家族又称 ZIP(Zrt-and-Irt-like proteins)家族,其功能是将锌离子从细胞外或细胞器内转运到细胞质中,以增加胞浆锌离子浓度,而 SLC30A 家族的主要作用是将锌离子从细胞质转移到细胞器内和细胞外,以降低细胞浆锌离子浓度^[16-17]。ZIP13 是 SLC93A 成员之一,位于高尔基体、内质网等细胞器内。Bin 等^[18]证明,ZIP13 基因突变通过含缬氨酸蛋白连接的泛素-蛋白酶体途径加速蛋白质降解,降低功能蛋白水平,引起细胞内锌稳态紊乱,导致脊椎软骨发育性 Ehlers-Danlos 综合征(SCD-EDS)。研究表明,ZIP13 通过减少 CCAAT 增强子结合蛋白 β 蛋白在抑制脂肪细胞褐变中起关键作用^[19]。然而 ZIP13 在肝脏缺血再灌注损伤中的具体作用还不清楚。本研究发现,ZIP13 的敲除导致肝细胞内锌水平降低,肝脏缺血再灌注损伤加重,而过表达 ZIP13 则会升高肝细胞内锌水平,减轻缺血再灌注损伤。这些结果提示 ZIP13 是肝细胞内起主要作用的锌转运蛋白,能够通过维持肝细胞锌稳态保护肝脏。

肝细胞代谢活跃,含有丰富的内质网结构,内质网是真核细胞修饰和分泌蛋白的重要场所,参与钙稳态、蛋白质折叠和脂质生物合成等^[20]。当肝细胞缺血缺氧再灌注后,会导致大量未折叠蛋白质或错误折叠的蛋白质聚集在内质网,引起内质网应激^[21]。适度的内质网应激可通过抑制蛋白质合成而促进错误折叠蛋白质降解起到保护作用,这一过程称为未折叠蛋白反应(UPR),而持续过强的内质网应激

则会超过 UPR 能力,引起细胞凋亡,进而引起严重的肝损伤^[22-23]。内质网应激标志性蛋白是 GRP78 和 CHOP 蛋白,GRP78 是一种分子伴侣热休克蛋白,是正常细胞内质网中 UPR 的主体。当内质网应激发生时,GRP78 活性增强,它与错误折叠的蛋白质或未折叠的蛋白质结合成复合物,以促使其恢复正常结构,并维持内质网稳态^[24]。CHOP 蛋白在细胞凋亡、自噬中起重要作用^[25]。CHOP 蛋白是内质网应激时启动细胞凋亡的标志性蛋白。内质网应激时,CHOP 蛋白的高表达可通过抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 而诱导细胞凋亡^[26]。本研究发现,肝脏缺血再灌注时,肝细胞 GRP78 和 CHOP 蛋白明显升高,内质网应激明显加重。ZIP13 敲除会进一步加重内质网应激;而过表达 ZIP13 则减轻内质网应激。这些结果提示,ZIP13 可能通过参与调控内质网应激,从而在肝脏缺血再灌注中发挥重要作用。

细胞凋亡是肝缺血再灌注过程中的病理生理特征之一。半胱天冬酶家族是凋亡的关键介质。其中 Caspase3 是细胞凋亡的典型标志物,活化的 Caspase3 在凋亡细胞的染色质凝聚和 DNA 断裂中起到关键作用。因此 Caspase3 在凋亡小体形成的过程中是必不可少的。Caspase9 是 Caspase3 的上游调控蛋白,活化的 Caspase9 能激活 Caspase3,从而启动细胞凋亡^[27-28]。本研究结果表明,肝脏缺血再灌注时,ZIP13 的敲除能够促进肝细胞凋亡,造成严重的肝损伤;而过表达 ZIP13 则可降低肝细胞凋亡,减轻肝损伤。这些结果提示,ZIP13 还可通过调控细胞凋亡参与肝脏缺血再灌注损伤。

综上所述,本研究首次证实了肝脏缺血再灌注时,肝细胞内锌水平显著降低可能是缺血再灌注损伤的机制之一。并且在此基础上,笔者首次证实锌转运体 ZIP13 能够通过维持肝细胞锌稳态来调控内质网应激和细胞凋亡,从而发挥肝脏保护作用。

参考文献:

- [1] SAIDI R F,KENARI S K. Liver ischemia/reperfusion injury:an overview[J]. J Invest Surg, 2014, 27(6): 366-379.
- [2] CANNISTRA M,RUGGIERO M,ZULLO A,et al. Hepatic ischemia reperfusion injury:a systematic review of literature and the role of current drugs and biomarkers[J]. Int J Surg, 2016, 33(Suppl 1): S57-S70.
- [3] DAR W A,SULLIVAN E,BYNON J S,et al. Ischaemia reperfusion injury in liver transplantation: cellular and molecular mechanisms[J]. Liver Int, 2019, 39(5): 788-801.
- [4] AKBARI G. Role of Zinc supplementation on ischemia/reperfusion injury in various organs[J]. Biol Trace Elem Res, 2020, 196(1): 1-9.
- [5] FUKADA T,YAMASAKI S,NISHIDA K,et al. zinc homeostasis and signaling in health and diseases: zinc signaling [J]. J Biol Inorg

- Chem, 2011, 16(7):1123–1134.
- [6] KAMBE T, TSUJI T, HASHIMOTO A, et al. The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism[J]. *Physiol Rev*, 2015, 95(3): 749–784.
- [7] SUN Q, ZHONG W, ZHANG W, et al. Zinc deficiency mediates alcohol-induced apoptotic cell death in the liver of rats through activating ER and mitochondrial cell death pathways[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2015, 308(9): G757–G766.
- [8] TAKAGISHI T, HARA T, FUKADA T. Recent advances in the role of slc39a/zip zinc transporters *in vivo*[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(12): 2708–2729.
- [9] WANG J, CHENG X, ZHAO H, et al. Downregulation of the zinc transporter SLC39A13 (ZIP13) is responsible for the activation of CaMKII at reperfusion and leads to myocardial ischemia/reperfusion injury in mouse hearts[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 152: 69–79.
- [10] GUAN L Y, FU P Y, LI P D, et al. Mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and protective effects of nitric oxide[J]. *World J Gastrointest Surg*, 2014, 6(7): 122–128.
- [11] LI J, LI R J, LV G Y, et al. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(11): 2036–2047.
- [12] PRASAD A S, BAO B, BECK F W, et al. Antioxidant effect of zinc in humans[J]. *Free Radic Biol Med*, 2004, 37(8): 1182–1190.
- [13] CHEUNG E, NIKFARJAM M, JACKETT L, et al. The protective effect of zinc against liver ischaemia reperfusion injury in a rat model of global ischaemia[J]. *J Clin Exp Hepatol*, 2020, 10(3): 228–235.
- [14] 石恩金, 孟凡东, 郑新宇, 等. 锌对大鼠肝脏缺血再灌注损伤保护作用的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2008, 37(1): 6–7.
- [15] 蒋与刚, 郭长江, 韦京豫, 等. 锌对缺血再灌注肝脏自由基含量和细胞凋亡的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2001, 17(3): 37–39.
- [16] LIUZZI J P, COUSINS R J. Mammalian zinc transporters[J]. *Annu Rev Nutr*, 2004, (24): 151–172.
- [17] HUANG L, TEPAAMORNDECH S. The SLC30 family of zinc transporters—a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles[J]. *Mol Aspects Med*, 2013, 34(2/3): 548–560.
- [18] BIN B H, HOJYO S, RYONG L T, et al. Spondylocheirodysplastic Ehlers–Danlos syndrome(SCD–EDS) and the mutant zinc transporter ZIP13[J]. *Rare Dis*, 2014, 2(1): e974982.
- [19] FUKUNAKA A, FUKADA T, BHIN J, et al. Zinc transporter ZIP13 suppresses beige adipocyte biogenesis and energy expenditure by regulating C/EBP- β expression[J]. *PLoS Genet*, 2017, 13(8): e1006950.
- [20] FOLCH-PUY E, PANISELLO A, OLIVA J, et al. Relevance of endoplasmic reticulum stress cell signaling in liver cold ischemia reperfusion injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(6): 807–819.
- [21] GOTOH T, MORI M. Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2006, 26(7): 1439–1446.
- [22] TOKUNAGA F, BROSTROM C, KOIDE T, et al. Endoplasmic reticulum (ER)-associated degradation of misfolded N-linked glycoproteins is suppressed upon inhibition of ER mannosidase 1 [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(52): 40757–40764.
- [23] XIA S W, WANG Z M, SUN S M, et al. Endoplasmic reticulum stress and protein degradation in chronic liver disease[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 161(33): 105218.
- [24] IBRAHIM I M, ABDELMALEK D H, ELFIKY A A. GRP78: a cell's response to stress[J]. *Life Sci*, 2019, 226(49): 156–163.
- [25] MINOGUE P J, BEYER E C, BERTHOUD V M. CHOP is dispensable for lens transparency in wild-type and connexin50 mutant mice[J]. *Mol Vis*, 2019, 25: 535–545.
- [26] KIM I, XU W, REED J C. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7(12): 1013–1030.
- [27] SHALINI S, DORSTYN L, DAWAR S, et al. Old, new and emerging functions of caspases[J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(4): 526–539.
- [28] PORTER A G, JANICKE R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6(2): 99–104.

(2022-01-20 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅