



学校代码：10132

学 号：2021120205

中图分类号：R616.2

内蒙古医科大学

INNER MONGOLIA MEDICAL UNIVERSITY

硕士学位论文

双重动脉血供联合部分肝切除术大鼠模型中 线粒体分裂融合自噬的变化规律及 其与肝再生的关系

Changes in mitochondrial fission fusion autophagy and its relationship
with liver regeneration in a rat model of dual arterial blood supply
combined with partial hepatectomy

学科专业：外科学

研 究 生：刘 赫

指导教师：张俊晶 教 授

完成时间：二〇二四年五月

目 录

前言.....	5
1 材料与amp;方法.....	6
2 结果.....	16
3 讨论.....	20
4 结论.....	22
参考文献.....	24
文献综述 肝损伤后肝再生与自噬的关系	27
参考文献.....	35
缩略语表.....	41

中文摘要

目的 建立大鼠双重动脉血供联合部分肝切除手术模型，探究双重动脉血供联合部分肝切除术后线粒体功能变化及其与肝再生之间的关系。

方法 1、随机将 54 只 6-8 周雄性清洁级 SD 大鼠划分为 3 组，分别为 68%部分肝切除组（partial hepatectomy, PH）组、假手术（sham operation group, SO）组、68%肝切除结合肝脏双重动脉血供（liver dual arterial blood supply, LDABS）组。造模成功后分别在术后 0、12、24、72、120 和 168h 取材。Western blot 检测细胞增殖抗原 Ki-67、动力蛋白相关蛋白 1（dynamin-related protein1, Drp1）、线粒体融合蛋白 1（mitochondrial fusion protein 1, MFN1）及微管相关蛋白 1 轻链 3（microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3）的表达。2、使用 SPSS 27.0, $\bar{x}\pm s$ 描述计量资料，统计方法采用单因素方差分析，方差齐时，多组间均数的两两比较使用 LSD 检验；若方差不齐，则使用 Brown-Forsythe 检验， $P<0.05$ 时，认为存在统计学差异，具有显著性意义。

结果 （1）相比于 SO 组，PH 组及 LDABS 组术后细胞增殖指标呈高表达状态，其中在术后 72-120h 时间段内，LDABS 与 PH 组的 Ki67 表达量均高于 SO 组（ $P<0.05$ ），具有显著性差异；而 LDABS 组与 PH 组相比，虽表达量皆有所升高，但并无显著性差异。

（2）与 SO 组相比，LDABS 组及 PH 组线粒体分裂相关蛋白 Drp1 表达均呈先上升后下降的趋势，其中术后 120h 具有显著性差异（ $P<0.05$ ），而在其余时间点，LDABS 组表达量虽高于其余两组，但并无显著性差异。（3）术后 12h，PH 与 LDABS 组线粒体融合相关蛋白 MFN1 的表达量均低于 SO 组，且具有显著性差异（ $P<0.05$ ）；术后 24h，LDABS 组 MFN1 表达量高于 PH 组，具有显著性差异（ $P<0.05$ ）；术后 168h，LDABS 组与 PH 组 MFN1 表达量均高于 SO 组，具有显著性差异（ $P<0.05$ ）。其余时间点 LDABS 组线粒体融合水平虽升高，但并无显著差异。（4）术后 24-120h，LDABS 组线粒体自噬相关指标 LC3 的表达量低于其余两组，其中在术后的 24h-120h 存在显著性差异（ $P<0.05$ ）；术后 168h，LDABS 和 PH 组 LC3 表达量均高于 SO 组，存在显著性差异（ $P<0.05$ ）；其余时间点 LC3 表达水平均无显著性差异。

结论 LDABS 后的肝再生水平并未显著提高，与 PH 组相比，LDABS 线粒体分裂水平增加，线粒体融合及自噬水平均呈先降低后增高的趋势。

关键词: 肝再生, 肝脏双重动脉血供, 线粒体分裂、融合、自噬, 肝部分切除术

Changes in mitochondrial fission fusion autophagy and its relationship with liver regeneration in a rat model of dual arterial blood supply combined with partial hepatectomy

ABSTRACT

Objective : Establish a rat model of dual arterial blood supply combined with partial hepatectomy to explore the effects and patterns of dual arterial blood supply on liver regeneration and mitochondrial function changes after partial hepatectomy.

Methods: : 1. 54 6-8 week male clean grade SD rats were randomly divided into three groups: 68% partial hepatectomy (PH group), sham operation group (SO group), and 68% liver resection combined with dual arterial blood supply (LDABS group). After successful modeling, samples were taken at 0, 12, 24, 72, 120, and 168 hours postoperatively. Western blot was used to detect the expression of cell proliferation antigen Ki-67, dynamic related protein 1 (Drp1), mitochondrial fusion protein 1 (MFN1), and microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3).2. Use SPSS 27.0, $\bar{x} \pm s$ to describe the quantitative data, and use one-way analysis of variance. When the variance is homogeneous, use LSD test for pairwise comparison of multiple group means. If the variance is not homogeneous, use Brown Forsythe test. When $P < 0.05$, statistical differences are considered significant and significant.

Results: (1) Compared with the SO group, the postoperative cell proliferation indicators in the PH group and LDABS group were highly expressed. During the postoperative period of 72-120 hours, the Ki67 expression levels in LDABS and PH groups were significantly higher than those in the SO group ($P < 0.05$), indicating a significant difference; Compared with the PH group, the LDABS group showed an increase in expression levels, but there was no significant difference.(2) Compared with the SO group, the expression of mitochondrial division related protein Drp1 in both the LDABS group and the PH group showed a trend of first increasing and then decreasing. There was a significant difference at 120 hours after surgery ($P < 0.05$), while at other time points, although the expression level of the LDABS

group was higher than the other two groups, there was no significant difference.(3) After 12 hours of surgery, the expression levels of mitochondrial fusion related protein MFN1 in the PH and LDABS groups were lower than those in the SO group, and there was a significant difference ($P<0.05$); 24 hours after surgery, the expression level of MFN1 in the LDABS group was higher than that in the PH group, with a significant difference ($P<0.05$); 168 hours after surgery, the expression levels of MFN1 in the LDABS group and the PH group were both higher than those in the SO group, with significant differences ($P<0.05$). At other time points, although the mitochondrial fusion level in the LDABS group increased, there was no significant difference.(4) At 24-120 hours post surgery, the expression level of mitochondrial autophagy related indicator LC3 in the LDABS group was lower than that in the other two groups, with a significant difference observed between 24 hours and 120 hours post surgery ($P<0.05$); After 168 hours of surgery, the expression levels of LC3 in the LDABS and PH groups were higher than those in the SO group, with significant differences ($P<0.05$); There was no significant difference in the expression level of LC3 at other time points.

Conclusions: The level of liver regeneration after LDABS did not significantly improve. Compared with the PH group, the mitochondrial division level of LDABS increased, and the levels of mitochondrial fusion and autophagy showed a trend of first decreasing and then increasing.

KEY WORDS: Liver regeneration, Liver dual arterial blood supply, Mitochondrial division, fusion, and autophagy, Partial hepatectomy

双重动脉血供联合部分肝切除大鼠模型中线粒体分裂融合自噬的变化规律及其与肝再生的关系

前言

正常生理情况下，肝脏的血供由门静脉与肝动脉共同组成，肝动脉将含氧丰富的血液输入肝脏，门静脉则把来自消化道富含营养成分的血液输入肝脏，这是维持肝脏正常功能的基础。双重动脉血供（liver dual arterial blood supply, LDABS）是指在保持肝固有动脉血供前提下，肝外门静脉部分或者全部通过动脉血灌注，即为肝脏双重动脉血供技术。门静脉供血占肝脏总供血的 75%，当出现门静脉受损、急性肝衰竭、门静脉血栓形成及肝移植等特殊状况时，应用 LDABS 可能会实现理想的效果^[1-3]。

由于 LDABS 改变了正常的解剖结构，门静脉的血液成分及血流动力学发生了改变，使得 LDABS 后的肝再生机制与常规的部分肝切除术（partial hepatectomy, PH）不同。课题组前期对 PH 大鼠以及 LDABS 结合 PH 大鼠的肝组织进行测序发现，与线粒体分裂有关的一种蛋白：动力蛋白相关蛋白 1(dynamin-related protein 1, Drp1) 的表达量出现了显著上升。Drp1 是调控线粒体分裂的核心蛋白，越来越多的研究证实，有效抑制线粒体分裂可保护各种组织免受应激性损伤^[4-5]。肝再生增强因子（augmenter of liver regeneration, ALR）可通过 Drp1 抑制线粒体分裂并促进线粒体内膜的融合从而减轻线粒体损伤^[6]。以上研究结果表明，Drp1 可能通过调节线粒体动力学来影响肝细胞再生能力。此外，前期预实验对 LDABS 术后大鼠线粒体自噬水平进行检测，发现在术后早期，线粒体自噬水平呈先下降后上升的趋势。Drp1 介导的线粒体分裂与线粒体自噬是可以相互影响，共同作用的，Drp1 的线粒体招募是启动线粒体自噬的关键步骤^[7]，这个过程是非常复杂的，探究其与 LDABS 后肝再生的相关性有助于发现新的促进肝再生的方式以及完善 LDABS 理论成果。

课题组前期研究了 LDABS 对肝再生线粒体能量代谢的影响^[8]及 LDABS 对肝再生氧化应激的影响^[9]，发现 LDABS 术后肝再生氧化应激水平与 PH 组相比并未产生不利影响，与 SO 组相比能够促进细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2（B-cell lymphoma 2）的表达。同时 LDABS 在肝再生的能量代谢发挥重要作用，可通过提高能量代谢的方式来促进肝再

生。但 LDABS 是否影响线粒体分裂、融合及自噬尚未报道。为研究 LDABS 对 PH 后线粒体分裂、融合及自噬的变化规律及其与肝再生的关系,进行本实验。通过建立 LDABS 联合 PH 手术模型,检测细胞增殖抗原 Ki-67、线粒体分裂相关蛋白 Drp1、线粒体融合蛋白 1 (mitochondrial fusion protein 1, MFN1) 及微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein1 light chain 3, LC3) 的表达,来探究 LDABS 对 PH 后线粒体分裂、融合及自噬的变化规律及其与肝再生的关系。该实验结果能够增加 LDABS 研究的全面性,为临床实践提供一定的理论基础,以下为具体报告。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

准备 54 只体重为 200-300g、周龄为 6-8 周、雄性、清洁级 SD 大鼠,全部购自北京维通利华公司,动物许可证号: SCXK(京)2021-0006。将实验动物放入实验室笼盒内,接受 1w 的常规自由饲喂,期间温度与湿度设定各是 $22\pm 3^{\circ}\text{C}$ 、 $55\pm 5\%$ 。随机把所有实验动物划分成下述 3 组: SO 组 (n=18)、PH 组 (n=18)、LDABS 组 (n=18)。分别于术后 0、12、24、72、120、168 h 每个时间点随机选择 3 只实验动物处死,将所提取的标本置入 -80 摄氏度冰箱内短期存放。此项研究各项操作都全部遵守《关于善待实验动物的指导性意见》(2006 版)。此项实验研究得到呼和浩特市第一医院伦理准可 (No: IRB2021001)

1.1.2 主要实验试剂、材料和仪器

1.1.2.1 主要实验试剂与材料

伊诺肝素钠注射液	苏州二叶制药有限公司
硫酸阿托品注射液	河南润弘制药股份有限公司
碳酸氢钠注射液	上海现代哈森(商丘)药业有限公司
0.9%氯化钠注射液	石家庄四药有限公司
5%葡萄糖注射液	石家庄四药有限公司
10-0 非可吸收医用缝合线	扬州富达医疗器械有限公司
4-0 非可吸收医用缝线	扬州市金环医疗器械厂
医用纱布敷料	河南亚都实业有限公司
蛋白提取液	北京百奥思科生物医学技术有限公司

BCA 蛋白浓度测定 kit	北京百奥思科生物医学技术有限公司
蛋白分子量 marker	苏州博奥龙科技有限公司
蛋白酶抑制剂	北京百奥思科生物医学技术有限公司
二抗	北京百奥思科生物医学技术有限公司
蛋白裂解液	碧云天生物
SDS-PAGE 制胶套装	北京百奥思科生物医学技术有限公司
KI67	江苏亲科生物研究中心有限公司
PCNA	江苏亲科生物研究中心有限公司
LC3B	江苏亲科生物研究中心有限公司
DRP1	江苏亲科生物研究中心有限公司
MFN1	江苏亲科生物研究中心有限公司
Mitofusin 2	江苏亲科生物研究中心有限公司
NC 膜 (0.22 μ m)	北京北方同正生物技术有限公司
3MM 滤纸	沃特曼中国

1.1.2.2 主要实验仪器

脱色摇床仪器	海门其林贝尔仪器制造公司
电泳仪	北京百晶生物技术有限公司
离心机	北京兰杰柯科技有限公司
SDS-PAGE 电泳仪器	伯乐生命医学产品有限公司
凝胶成像系统	上海峰志仪器有限公司
化学发光成像系统	上海勤翔科学仪器有限公司
微量加样器	上海大龙生物科技有限公司
电热恒温水浴槽	上海一恒科学仪器有限公司
-80 $^{\circ}$ C超低温冰箱	海尔生物医疗有限公司
4 $^{\circ}$ C冷藏冰箱	赛默飞世尔科技有限公司
连续变倍体式显微镜	上海彼爱姆光学仪器制造有限公司
便携式小动物气体麻醉呼吸机	深圳瑞沃德生命科技股份有限公司
小动物实验用显微器械	上海医疗器械(集团)有限公司
肾动脉与肝门静脉处连接用聚乙烯管	上海超高工程塑料有限公司

1.2 实验方法

1.2.1 实验模型制备

LDABS 组：本组大鼠模型的制备采用本团队前期研究肝 LDABS 模型的建立与理论应用^[10]一文中的模型制备。

- 1) 大鼠术前至少 12 小时禁食，不限饮水；
- 2) 术前 2 小时皮下注射肝素钠；
- 3) 将大鼠放入小动物气体麻醉剂，使用异氟烷与纯氧混合麻醉，异氟烷浓度 5%诱导，1.5%面罩维持，氧气流量 3L/min；
- 4) 称重；
- 5) 将大鼠放在试验台上，备皮，消毒；
- 6) 取腹部正中切口 5cm 左右，上至胸骨剑突 0.5cm，逐层进腹；
- 7) 4-0 医用丝线绑住胸骨剑突并向上提起，自制拉钩左右暴露视野；
- 8) 使用显微剪剪下大鼠镰状韧带、肝胃韧带；
- 9) 4-0 医用丝线包绕肝左外叶及肝中叶肝蒂，向上轻拉提起，打结，注意打结时不要损伤下腔静脉，可见肝脏颜色变化如图 1；
- 10) 显微剪剪下肝左外叶及肝中叶，生理盐水冲洗，切除的肝组织如图 2，剩余肝组织如图 3；
- 11) 用生理盐水浸润的洁净纱布将肠道包裹住，同时置于腹腔外部，术中助手向纱布不定时注入生理盐水，使纱布呈湿润状态；
- 12) 在连续变倍体式显微镜下，显微镊游离下腔静脉，近肝侧放置 4-0 医用丝线备用；
- 13) 显微镊游离门静脉，在门静脉靠近肝门处放置 4-0 医用丝线备用；
- 14) 游离右肾静脉，放置 4-0 丝线备用；
- 15) 在下腔静脉左侧游离肾动脉，如图 4；
- 16) 在肾动脉下方放置两根 4-0 医用丝线备用；
- 17) 生理盐水充分冲洗大鼠腹腔，纱布吸净多余的生理盐水；
- 18) 血管夹夹闭右肾动脉；
- 19) 备用丝线在距离血管夹 1.5cm 处打结做提拉用，如图 5；
- 20) 结扎右肾静脉；

21) 于提拉丝线下方斜行剪开一小口，插入聚乙烯管，如图 6；

22) 丝线绑定聚乙烯管，放开血管夹，可见动脉血充盈聚乙烯管，证明插管成功，迅速再次夹闭血管夹；

23) 在脾静脉上方紧贴脾静脉处，血管夹夹闭门静脉；

24) 显微镊暂时夹闭门静脉近肝侧，斜行将门静脉半剪开，将聚乙烯管插入，通过备用丝线加以绑定，再将显微镊和肾动脉血管夹放开；

25) 查看肝脏颜色及聚乙烯管通常情况；

26) 于切口处剪断门静脉；

27) 生理盐水冲洗腹腔；

28) 血管夹夹闭下腔静脉远端，备用丝线活结绑定下腔静脉近肝侧；

29) 下腔静脉剪一鱼口状切口，10-0 线吻合门静脉与下腔静脉，按照血管外-内-内-外的顺序进行吻合，吻合口上下两端使用“拐角褥式水平缝合”方法进行吻合。

30) 缝合至末针时，先不打结，将门静脉和下腔静脉的血管夹短暂放开，使高凝血流出，同时用 1ml 注射器注入大量肝素水对下腔静脉进行冲洗；

31) 打结最后一针，检查吻合口有无渗血及狭窄，吻合后腹腔情况如图 7；

32) 检查腹腔有无其他出血，足量生理盐水冲洗，吸净后关腹。

造模注意事项：

1) 在进行 PH 时，剪除镰状韧带时注意不要损伤到下腔静脉，见韧带出现细小分叉时即可，结扎时向上提起可避免结扎到部分下腔静脉，导致狭窄；

2) 门静脉周围血运丰富，并有伴行血管，游离时应小心操作，注意避免损伤门静脉或其他血管导致失血过多；

3) 游离肾静脉时，应注意与其下方的肾动脉分开游离，以防止损伤血管；

4) 在游离肾动脉时，如出现小分支，应在分支处打一活结，插管位置应高于分支部位并靠近肾脏；

5) 肾动脉插入聚乙烯管时，插管深度不宜超过分支处，以避免影响血运；

6) 聚乙烯管应修剪为合适长度，并术前充满肝素水，经课题组反复实验，聚乙烯管长度 $22\pm 2\text{mm}$ 为宜；

7) 在游离肾动脉、下腔静脉及门静脉后，应用足量生理盐水冲洗腹腔并吸净，防止细小脂肪组织、纱布碎屑及细小棉絮进入血管内，影响造模成功率；

8) 在游离门静脉时, 游离门静脉长度及分支静脉长度应尽量长, 以防止门腔端侧吻合时张力过大, 导致吻合口或分支静脉受损;

PH 组:

- 1) 大鼠术前至少 12 小时禁食, 不限饮水;
- 2) 术前 2 小时皮下注射肝素钠;
- 3) 将大鼠放入小动物气体麻醉剂, 使用异氟烷与纯氧混合麻醉, 异氟烷浓度 5% 诱导, 1.5% 面罩维持, 氧气流量 3L/min;
- 4) 称重;
- 5) 将大鼠放在试验台上, 备皮, 消毒;
- 6) 取腹部正中切口 5cm 左右, 上至胸骨剑突 0.5cm, 逐层进腹;
- 7) 4-0 医用丝线绑住胸骨剑突并向上提起, 自制拉钩左右暴露视野;
- 8) 使用显微剪剪下大鼠镰状韧带、肝胃韧带;
- 9) 4-0 医用丝线包绕肝左外叶及肝中叶肝蒂, 向上轻拉提起, 打结, 注意打结时不要损伤下腔静脉;
- 10) 显微剪剪下肝左外叶及肝中叶, 生理盐水冲洗,
- 11) 检查有无活动性出血, 关腹。

SO 组: 术前准备及麻醉同 LDABS 及 PH 组相同, 只剪除镰状韧带、肝胃韧带后关腹。

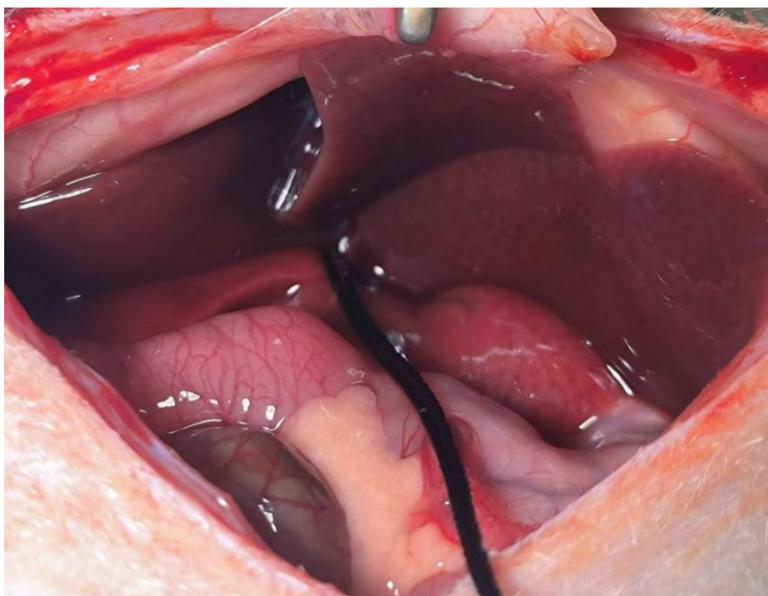


图 1 结扎后肝组织颜色对比



图 2 切除的肝组织

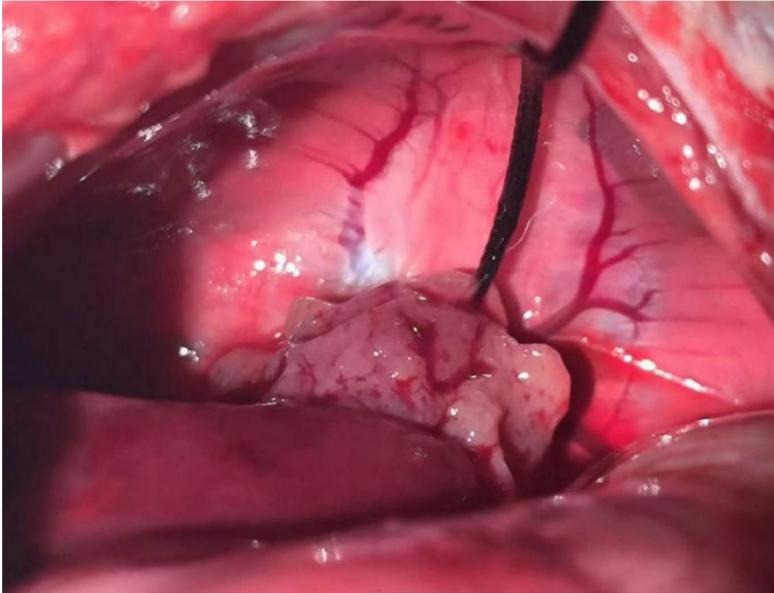
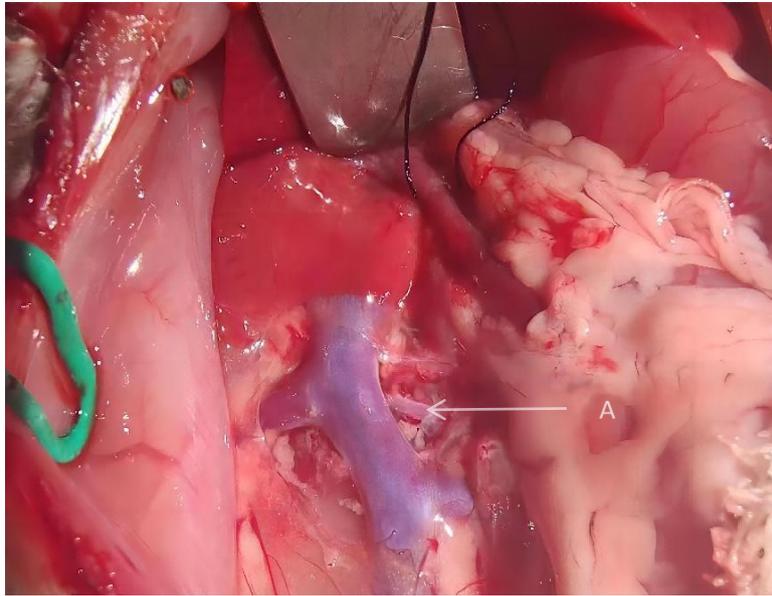


图 3 残余的肝组织



A: 肾动脉

图4 游离肾动脉

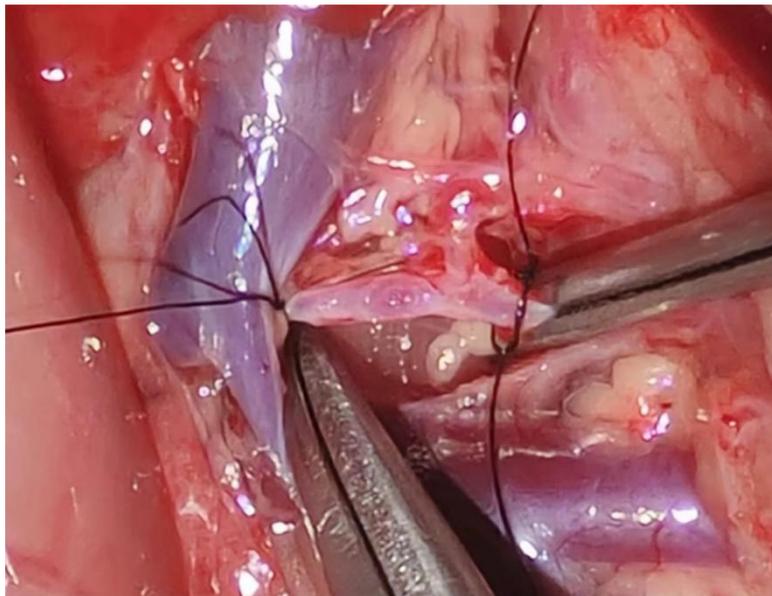


图5 提起肾动脉

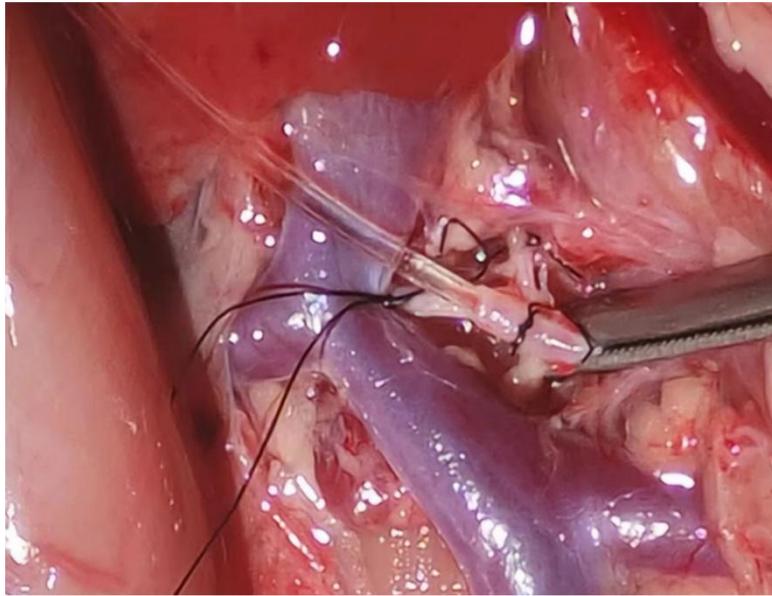


图6 肾动脉插管

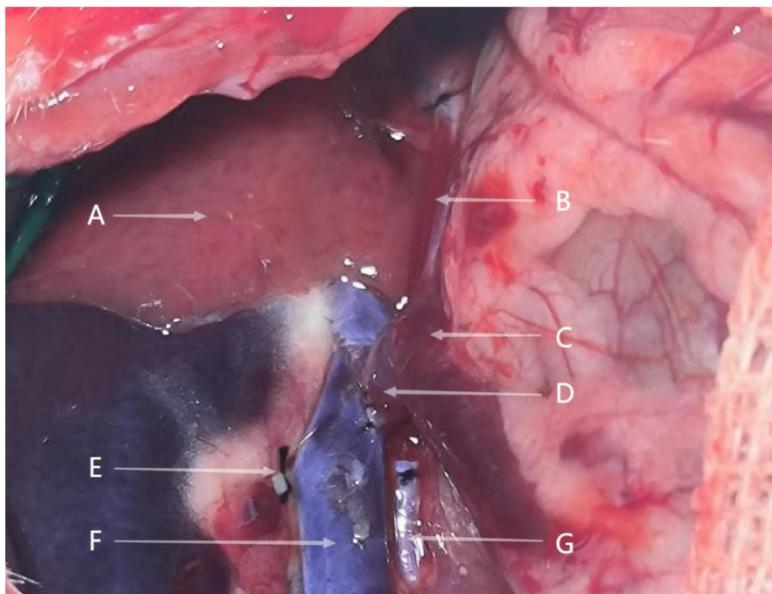


图7 门静脉腔静脉端侧吻合

- A.实验大鼠肝脏；B.右肾动脉与门静脉通过聚乙烯管连接；C.实验大鼠门静脉；
D.实验大鼠门静脉与腔静脉端侧吻合口；E.结扎后的肾静脉；F.下腔静脉；G.肾动脉

1.2.2 动物处死

将大鼠放置在小动物气体麻醉机中，在异氟烷麻醉条件下处死大鼠，迅速摘取大鼠肝组织，生理盐水灌洗后保存于-80℃备用。

1.2.3 Western Blot 检测 Ki-67 及线粒体分裂、融合及自噬相关指标 Drp1、MFN1、LC3。

1.2.3.1 蛋白提取

- 1)在肝脏组织加入液氮，实施匀浆处理。
- 2)添加 1 毫升 PBS，实施 5 分钟离心处理，转速为 500g。
- 3)将残留的所有 PBS 吸除掉，放入肝组织样本 5 倍量的裂解液，彻底混合。
- 4)于冰上对细胞实施 3 遍超声震荡处理，功率为 20%，每遍用时 10 秒。
- 5)实施 15 分钟离心处理（12000rpm、4℃），收集上清放入新的离心管中。
- 6)蛋白上样 Buffer 把蛋白定量成 4mg/ml，存储于-20℃下，待用。不可多次重复冻融。

1.2.3.2 蛋白浓度测定

- 1)对牛血清白蛋白（BSA）标准品行梯度稀释处理。
- 2)完成 BCA 工作液的制备。
- 3)向试管或微孔板内放入待检蛋白质样品与不同浓度蛋白质标准品，各自再放入 BCA 工作液，彻底混合。
- 4)密封，置于 37℃环境下保温（30-60min）。
- 5)使温度下降至室温水平，对照采用空白标准样品，于 562nm 波长处对待检蛋白质样品吸光值展开测定。
- 6)计算吸光值。

1.2.3.3 SDS-PAGE 电泳

1)制备 SDS-PAGE 凝胶

A.先将玻璃板洗净，再晾干，接着固定，对制作下层胶液面的标志线加以明确（与样品梳子最下方相距大概 0.5-1.0cm）；

B.制备 8ml 的 10%分离胶（具体配置见下表），再迅速且精准地向玻璃槽注入，液面应与标志线相齐（灌注期间需要控制不要有气泡形成）；

C.快速放入去离子水，将胶面覆盖（用以隔绝空气，对凝胶聚合有所帮助），于室温中静置 40min 左右的时间，待分离胶彻底凝固；

D.制备 4ml 浓缩胶（浓度为 5%）。

E.将覆盖液清除掉，通过吸水纸将残留的所有液体吸除掉；

F.再次垂直放入凝胶板，低速注入 5%浓缩胶（灌注期间应控制不要有气泡形成），再将样品梳插入，室温中凝胶大概 40min。

G.轻轻去除梳子，使电泳槽与玻璃板的“凹”面紧密相连，专用夹子固定。

SDS-PAGE 凝胶配比表

总体积	10%分离胶		5%浓缩胶	
	8mL	4mL	4mL	2mL
30%丙烯酰胺	2.67mL	1.33mL	0.66mL	0.33mL
1.5M Tris-cl (PH 8.8)	2.0mL	1.0mL	/	/
1.0M Tris-cl (PH 6.8)	/	/	0.5mL	0.25mL
10%SDS	0.08mL	0.04mL	0.04mL	0.02mL
10%AP	0.08mL	0.04mL	0.04mL	0.02mL
TEMED	3.2μl	1.6μl	4μl	2μl

2)电泳

A.取出样品并快速置入冰内；

B.根据蛋白定量结果，放入样品以及缓冲液（5×），充分混合，再于 95°C下变性 10min，迅速插至冰内，备用；

C.向凝胶孔内加样，80V 电泳，使样品通过浓缩胶和分离胶

D.待染料跑到下层胶适宜区域，停止电泳；

E.接着用转移电泳的方式使蛋白条带向 NC 膜上转印。

1.2.3.4 Western Blot

1)转膜

A.先把 NC 膜移至 100%MT 内浸泡（2-3min），再水漂洗两遍，2 分钟/遍，接着通过电转液进行两遍漂洗，2 分钟/遍，最后移至电转液内，待用；

B.对滤纸进行合理剪裁，放入缓冲液中浸泡，待用；

C.放平电泳板，取出垫片，取下玻璃板，裁剪多余凝胶，电转液漂洗；

D.完成膜、样品胶、转膜夹板的安装，自阴极起，先是海绵垫片，之后为滤纸层（3 层）接着为滤纸，再是样品胶，其后依次是 NC 膜、滤纸层（3 层），最后是海绵垫片，将转膜夹板扣紧，移至转移电泳槽（内含转膜缓冲液）内；

E.在 100v 恒压下转膜 60 分钟。

F.以 marker 为对照,对膜进行合理裁剪(应参照目标条带分子量水平)。

2)抗体孵育

A.封闭:将转移膜移至封闭液内,置于室温下摇床封闭一小时。

B.一抗反应:稀释一抗,将膜分别置入对应一抗工作液内,4°C过夜

C.洗膜:把反应膜置于平皿内, TBST (1×) 洗涤 3 遍,将没有结合的一抗都清洗掉。

D.二抗反应: TBST (1×) 将二抗稀释 300 倍;一抗膜置于二抗工作液内,室温低速摇动 1 小时,期间注意遮光。

E.洗膜:通过 TBST (1×) 洗膜,将游离二抗清洗掉。

1.2.3.5 显色及成像

1)按 1: 1 (v/v),对 ECL 试剂盒内 2 类液体进行混合。

2)向 NC 膜表面均匀铺布上述混合液体,室温静置 1 分钟后放入化学发光成像系统成像。

1.3 主要观察指标

造模结束后,记录 SO 组、PH 组及 LDABS 组的手术用时与其门静脉阻断时间;观察 3 组实验动物对刺激的反应、精神状态、活跃度与毛发情况等;观察 3 组实验动物术后 3d 生存状况;记录大鼠死亡数量;Western Blot 检测 Ki-67、PCNA 以及线粒体分裂、融合及自噬相关指标 Drp1、MFN1、LC3。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 27.0, $\bar{x}\pm s$ 描述计量资料,统计方法采用单因素方差分析,方差齐时,多组间均数的两两比较使用 LSD 检验;若方差不齐,则使用 Brown-Forsythe 检验。 $P<0.05$ 时,认为存在统计学差异,具有显著性意义。

2 结果

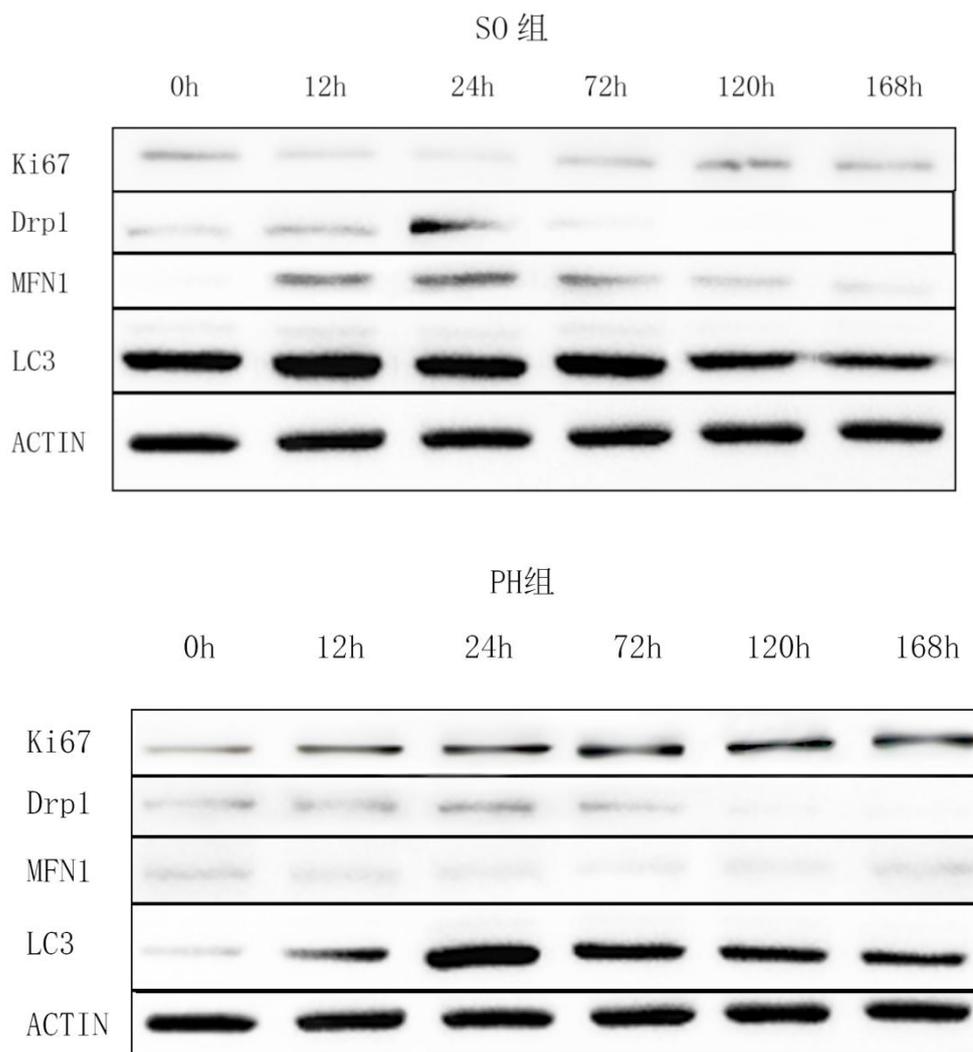
2.1 各组大鼠术中及术后情况

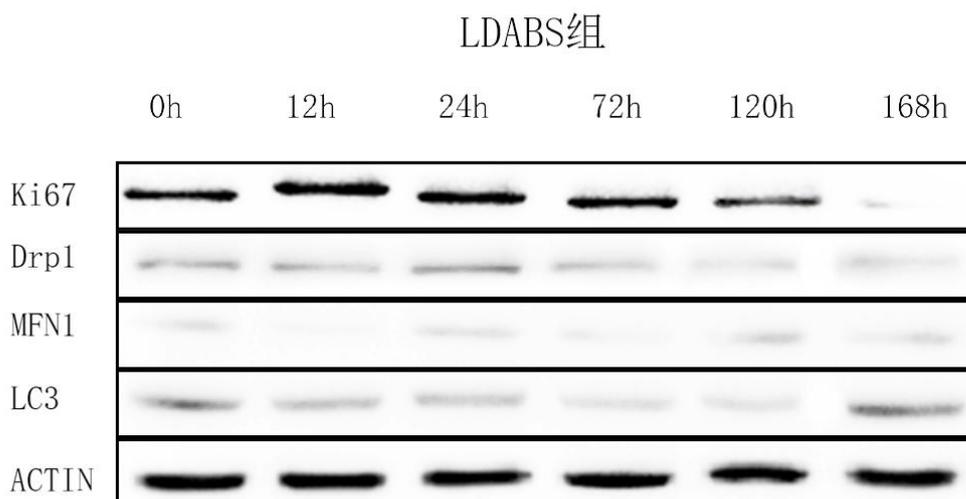
3 组实验动物皆建模成功,在 LDABS 组,大鼠手术用时为 90 ± 10 min,门静脉开放时间在 5 秒以内,门腔吻合口用时 15 ± 5 min。空白对照组及部分肝切除组大鼠手术平均用时为 30 ± 5 min,门静脉阻断时间为 10 分钟。3 组动物术后皆可正常活动,精神也无异常,毛发 6 小时回归顺滑状态,同时进食良好。LDABS 组大鼠术后 72h 成活率 61%

（11/18），其中肝坏死 3 只，肠道坏死 2 只，吻合口出血 1 只，吻合口狭窄 1 只。补齐死亡的大鼠。术后 CG 组和 PH 组生存率 100%。

2.2 Western blot 检测 Ki-67 及线粒体分裂、融合及自噬相关指标 Drp1、MFN1、LC3。

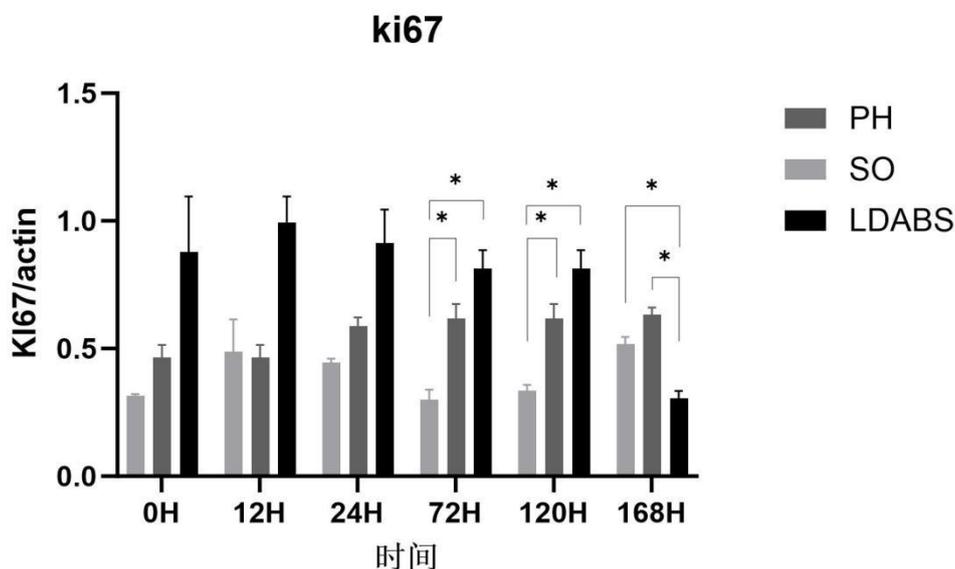
分别提取每个组实验动物的肝脏组织总蛋白，并用 Western blot 方法检测 Ki-67 及线粒体分裂、融合及自噬相关指标 Drp1、MFN1、LC3 蛋白表达情况，结果见下图。





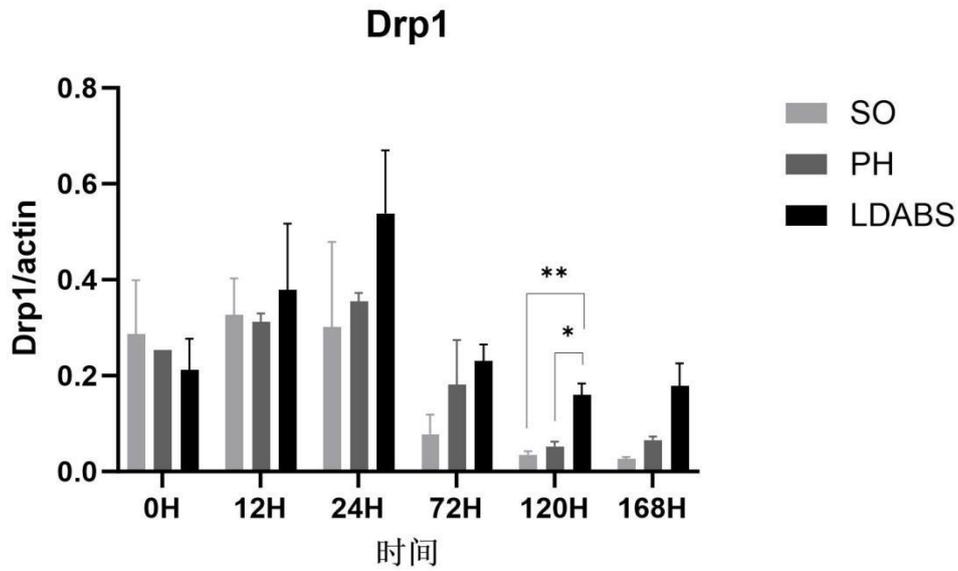
2.2.1 肝组织 Ki67 结果测定

对肝组织 Ki67 表达水平进行测定, 结果表明: 相比于 SO 组, PH 组及 LDABS 组术后细胞增殖指标呈高表达状态, 其中在术后 72-120h 时间段内, LDABS 与 PH 组的 Ki67 表达量均高于 SO 组 ($P < 0.05$), 具有显著性差异; 而 LDABS 组与 PH 组相比, 虽表达量皆有所升高, 但并无显著性差异。



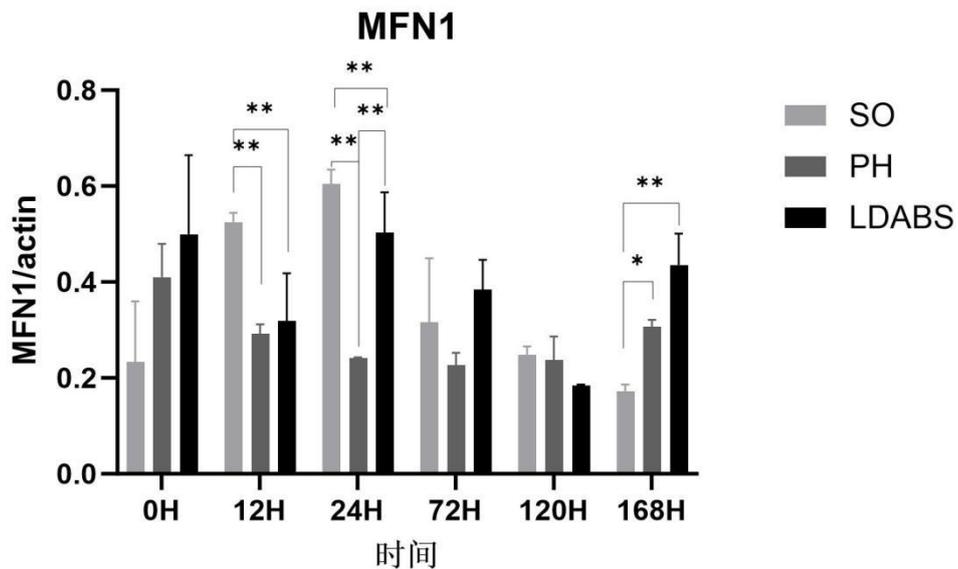
2.2.2 肝组织 Drp1 结果测定

对肝组织 Drp1 表达水平进行测定, 结果表明: 与 SO 组相比, LDABS 组及 PH 组线粒体分裂相关蛋白 Drp1 表达均呈先上升后下降的趋势, 其中术后 120h 具有显著性差异 ($P < 0.05$), 而在其余时间点, LDABS 组表达量虽高于其余两组, 但并无显著性差异。



2.2.3 肝组织 MFN1 结果测定

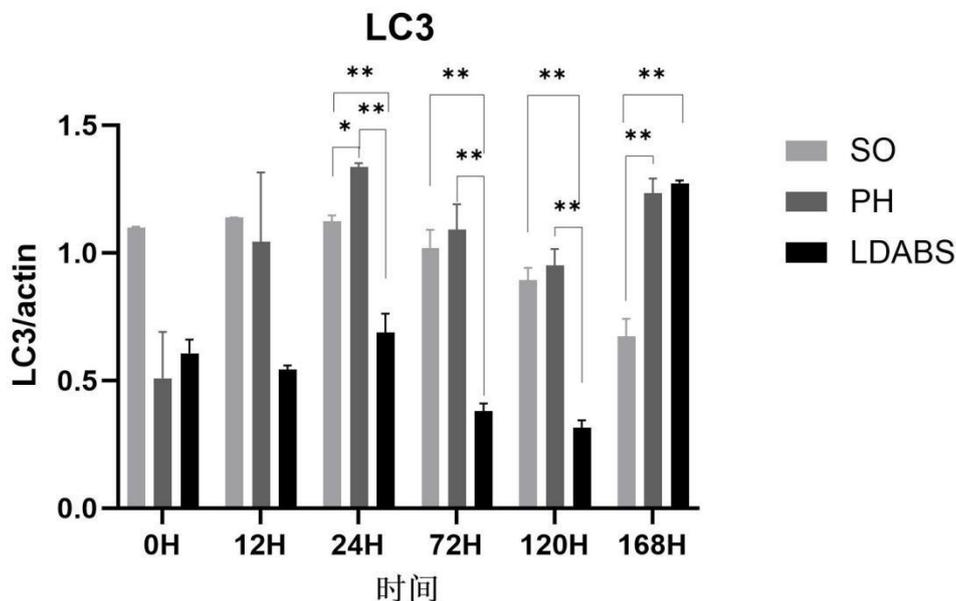
对肝组织 MFN1 表达水平进行测定，结果表明：术后 12h，PH 与 LDABS 组线粒体融合相关蛋白 MFN1 的表达量均低于 SO 组，且具有显著性差异 ($P < 0.05$)；术后 24h，LDABS 组 MFN1 表达量高于 PH 组，具有显著性差异 ($P < 0.05$)；术后 168h，LDABS 组与 PH 组 MFN1 表达量均高于 SO 组，具有显著性差异 ($P < 0.05$)。其余时间点 LDABS 组线粒体融合水平虽升高，但并无显著差异。



2.2.4 肝组织 LC3 结果测定

对肝组织 LC3 表达水平进行测定，结果表明：术后 24-120h，LDABS 组线粒体自

噬相关指标 LC3 的表达量低于其余两组, 其中在术后的 24h-120h 存在显著性差异 ($P < 0.05$); 术后 168h, LDABS 和 PH 组 LC3 表达量均高于 SO 组, 存在显著性差异 ($P < 0.05$); 其余时间点 LC3 表达水平均无显著性差异。



3 讨论

肝脏是人体内再生能力很强的器官, 当部分肝切除术后或肝脏暴露于病原体、病毒、化学物质和毒素中时, 肝脏可以在短时间内修复损伤。肝切除术是治疗多种肝脏疾病的有效手段之一, 如占位性疾病、炎症性疾病、外伤以及先天性异常等。但如果肝切除术后残余的肝脏太小或质量太低, 无法维持正常的器官功能, 就容易出现并发症^[11-13]。促进肝再生是治疗慢性肝病、部分肝切除术后和肝移植的潜在策略^[14]。因此, 寻找有效的促进肝脏再生手段是临床上提升肝切除术预后水平的主要目标^[15]。

由于 LDABS 改变了正常的肝脏生理解剖关系, 门静脉的血液成份与血流动力学发生了变化, 其肝再生机理与经典的 PH 后肝再生机理不尽相同, 探寻 LDABS 后肝再生的机理成为了重要的研究方向。本研究结果显示 LDABS 与 PH 后肝再生水平均高于 SO 组, 但 LDABS 与 PH 组相比, 可在一定程度上促进肝脏再生, 但效果并不明显。

线粒体是细胞的“发电站”, 为无数细胞产生必要的能量。线粒体同时也是一种一直处于动态变化中的细胞器, 能够不断进行融合和分裂循环, 使得线粒体大小、形态与位置时刻处于变化中, 此生理活动即为线粒体动力学^[16]。线粒体动力学由于其与线粒体功能的密切联系, 引起了越来越多的关注。线粒体动力学过程受线粒体蛋白的调控, 其中

动力蛋白相关蛋白 1(Drp1)是主要的促分裂蛋白,而两个有丝分裂蛋白(MFN1 和 MFN2)则负责线粒体膜的融合^[17]。它们的活性受到严格控制,以确保维持线粒体分裂融合的动态平衡以及满足细胞不断变化的代谢和能量需求^[18]。针对许多细胞功能,线粒体分裂与融合稳态起着非常关键的作用,包括 ATP 的产生、线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)的分布、钙信号传导、线粒体呼吸活动、细胞凋亡以及细胞存活。当线粒体动力学失衡时会导致线粒体结构改变和功能障碍,线粒体分裂不充分可使其失活,并造成受损线粒体体积聚,而线粒体未充分融合可引发线粒体碎裂,从而影响细胞的正常功能。

线粒体分裂使得线粒体可以运输到不同的细胞位置,从而分离受损线粒体,以便通过线粒体自噬的方式清除受损线粒体并重新融合线粒体,因此可以作为一种修复机制^[19]。而 LDABS 作为一种独特的手术方式,对于术后肝再生与线粒体分裂融合及自噬的影响目前仍不清楚,本实验可以探究其相关性并完善 LDABS 理论成果。

当发生线粒体分裂时, Drp1 从细胞质中被招募到线粒体外膜上,以二聚体或四聚体的形式形成螺旋寡聚体,包裹线粒体外膜并将其分裂^[7]。有研究表明, Drp1 是肝脏和心脏缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI) 过程中发挥作用的关键蛋白,有效抑制线粒体分裂可以保护各种组织免受应激性损伤,如 IRI^[20]。而线粒体功能障碍,如线粒体跨膜电位丧失、ATP 生成减少和线粒体分裂融合异常,会加速肝纤维化、肝硬化和肝细胞性肝癌的发展^[21-23]。肝再生增强因子可通过 Drp1 抑制线粒体分裂并促进线粒体内膜的融合从而减轻线粒体损伤^[24]。从慢性酒精暴露的小鼠模型中发现, Drp1 的表达量增加和 MFN1 的表达降低与线粒体功能受损有关。在人类中,重度酒精性肝炎患者的肝组织显示 Drp1 转录上调,表明线粒体损伤可以通过线粒体动力学的改变或线粒体自噬修复^[25]。在对裸鼠模型的研究发现, Drp1 表达的上调使线粒体分裂增加,而这与肝细胞性肝癌的肝内和远处转移有关^[26]。MFN1 的下调则与肝细胞性肝癌组织中血管侵犯和预后相关^[27]。由此可见,线粒体动力学与肝细胞再生存在相关性。本研究结果显示: LDABS 术后肝脏线粒体分裂活跃度高于其余两组,并呈先上升后下降的趋势,其中术后 24h 达到最高点,120h 同其余两组有显著差异。LDABS 组线粒体融合水平则在术后 24h 较 PH 组存在显著差异。

线粒体自噬是防止细胞死亡和促进细胞恢复的一种关键保护机制,在活性氧 (reactive oxygen species, ROS)含量增加、能量不足、细胞衰老等外部因素作用下,可使细胞内 mtDNA 突变并不断累积,同时可导致细胞内线粒体膜电位下降,并发生去极化

损伤。为了使线粒体处在健康的动态平衡中,从而避免受损线粒体对细胞造成伤害,自噬体会特异性吞噬不健康的线粒体并与溶酶体融合,我们称之为线粒体自噬。可简单理解为:线粒体自噬是一种通过特异性清除细胞质中功能损伤的线粒体,从而维持线粒体功能完整性和细胞内环境稳态的一种选择性自噬方式。在敲除自噬相关蛋白 7 (recombinant autophagy related protein 7, Atg7) 或用氯喹预处理的模型中,通过抑制自噬导致 PH 后肝脏生长和肝细胞增殖降低,并可以减缓肝脏损伤早期的细胞再生^[28]。通过研究自噬相关蛋白 5 敲除 (recombinant autophagy related protein 5 knockout Atg5 KO, Atg5 KO) 后的转基因小鼠发现,在 90% PH 模型中,大约 50%的对照组小鼠存活,而所有 Atg5 KO 小鼠在 24 小时后死亡。这表明自噬的活跃程度对调节肝细胞蛋白质和细胞器的合成至关重要。同时,肝切除术后增殖型肝细胞自噬的激活可能影响了细胞存活和肝脏再生^[29]。在化学性肝损伤方面,线粒体自噬在对乙酰氨基酚诱导的肝细胞损伤的恢复阶段发挥重要作用^[30]。肝脏再生/修复是一个能量消耗的过程,通过清除肝脏自噬活性区的受损线粒体,可以提供能量帮助肝损伤后的细胞恢复^[31]。这都表明了自噬在调控肝再生和肝损伤中发挥了重要的保护作用。本研究结果显示:LDABS 后 24-120h,线粒体自噬水平均低于其余两组,具有显著性差异。

4 结论

本研究显示:与 PH 相比,LDABS 术后 Ki67 表达水平虽持续性高表达,但并无显著差异;Drp1、MFN1 表达水平在部分时间段内显著高于 PH 组,而 LC3 表达水平则明显低于 PH 组。LDABS 相比与传统的肝切除术,手术时间长,造成创伤大,且改变了原有的解剖结构,使得肝脏门静脉由肾动脉血液灌注;而较长时间阻断门静脉也会导致缺血/再灌注损伤,进而加重肝组织的损伤。线粒体分裂水平的降低可造成受损线粒体的积聚,线粒体融合水平降低会引发线粒体碎裂,从而影响细胞的正常功能。根据本研究结果推测:LDABS 术后早期,线粒体分裂融合水平增加,可以减少受损线粒体的积累;而线粒体自噬水平受到抑制,则有助于机体在解剖结构发生变化后,残余肝脏仍然可以进行自我修复,从而增加肝脏线粒体能量代谢水平,对肝再生产生了一定程度的促进,但效果并不显著。

综上所述,LDABS 后的肝再生水平并未显著提高,与 PH 组相比,LDABS 线粒体分裂水平增加,线粒体融合及自噬水平均呈先降低后增高的趋势。LDABS 作为一种非常规的手术方式,导致机体内发生一系列复杂的生理生化过程,虽然已经取得了一定的成果,

但仍需不断深入研究。

参考文献

- [1] Cavallari G, Bonaiuto E, Tsivian M, Vaccarisi S, Nardo B. Partial portal vein arterialization in acute liver failure. *Updates Surg.* 2014. 66(3): 183-187.
- [2] YASUHIRO M, MASAOKI H, FLORIAN P, et al. Partial portal vein arterialization during living-donor liver transplantation: a case report[J]. *Surgical Case Reports*, 2020, 6(1) : 723-738.
- [3] Yoshiya S, Yoshizumi T, Iseda N, et al. Anastomosis of the Common Hepatic Artery and Round Ligament as Portal Vein Arterialization for Hepatic Artery Occlusion After Deceased Donor Liver Transplantation: A Case Report. *Transplant Proc.* 2020. 52(2): 641-643.
- [4] Zhou H, Hu S, Jin Q, Shi C, Zhang Y, Zhu P, et al. Mff-dependent mitochondrial fission contributes to the pathogenesis of cardiac microvasculature ischemia/reperfusion injury via induction of mROS-mediated cardiolipin oxidation and HK2/VDAC1 disassociation involved mPTP opening. *J Am Heart Assoc.* 2017;6:e005328.
- [5] Li Y, Liu X. Novel insights into the role of mitochondrial fusion and fission in cardiomyocyte apoptosis induced by ischemia/reperfusion. *J Cell Physiol.* 2018;233:5589-97.
- [6] Long RT, Peng JB, Huang LL, et al. Augmenter of Liver Regeneration Alleviates Renal Hypoxia-Reoxygenation Injury by Regulating Mitochondrial Dynamics in Renal Tubular Epithelial Cells. *Mol Cells.* 2019. 42(12): 893-905.
- [7] Jin JY, Wei XX, Zhi XL, Wang XH, Meng D. Drp1-dependent mitochondrial fission in cardiovascular disease. *Acta Pharmacol Sin.* 2021;42(5):655-664.
- [8] 田全发. 双重动脉血供模型的建立及对大鼠肝再生线粒体能量代谢的影响[D].内蒙古医科大学,2021.
- [9] 郑卫华. 双重动脉血供对肝部分切除术后肝再生氧化应激的影响[D].内蒙古医科大学,2021(03).
- [10] 田全发, 郑卫华, 王子航等. 肝双重动脉血供模型的建立与理论应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(07): 15-20.
- [11] Clavien PA, Oberkofler CE, Raptis DA, Lehmann K, Rickenbacher A, El-Badry AM. What is critical for liver surgery and partial liver transplantation: size or quality?. *Hepatology.* 2010;52(2):715-729.
- [12] Schuppan D, Popov Y. Rationale and targets for antifibrotic therapies. *Gastroenterol Clin Biol.* 2009;33(10-11):949-957.
- [13] Aydemir TB, Sitren HS, Cousins RJ. The zinc transporter Zip14 influences c-Met phosphorylation and hepatocyte proliferation during liver regeneration in mice.

Gastroenterology. 2012;142(7):1536-46.e5.

[14]Clavien PA, Oberkofler CE, Raptis DA, Lehmann K, Rickenbacher A, El-Badry AM. What is critical for liver surgery and partial liver transplantation: size or quality?. Hepatology. 2010;52(2):715-729.

[15]Lin CW, Chen YS, Lin CC, et al. Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy. Sci Rep. 2015;5:15807.

[16]Zhou H, et al. Role of mitochondrial quality surveillance in myocardial infarction: From bench to bedside. Ageing Res Rev. 2021;66:101250.

[17]Li YJ, Cao YL, Feng JX, et al. Structural insights of human mitofusin-2 into mitochondrial fusion and CMT2A onset. Nat Commun. 2019;10(1):4914.

[18]Simula L, Campanella M, Campello S. Targeting Drp1 and mitochondrial fission for therapeutic immune modulation. Pharmacol Res. 2019;146:104317.

[19]Middleton P, Vergis N. Mitochondrial dysfunction and liver disease: role, relevance, and potential for therapeutic modulation. Therap Adv Gastroenterol. 2021;14:17562848211031394.

[20]Zhou H, Hu S, Jin Q, Shi C, Zhang Y, Zhu P, et al. Mff-dependent mitochondrial fission contributes to the pathogenesis of cardiac microvasculature ischemia/reperfusion injury via induction of mROS-mediated cardiolipin oxidation and HK2/VDAC1 disassociation-involved mPTP opening. J Am Heart Assoc. 2017;6:e005328.

[21]Liang YJ, Teng W, Chen CL, et al. Clinical implications of HBV PreS/S mutations and the effects of PreS2 deletion on mitochondria, liver fibrosis, and cancer development. Hepatology.2021;74(2):641-655.

[22]Larosche I, Lette´ron P, Fromenty B, et al. Tamoxifen inhibits topoisomerases, depletes mitochondrial DNA, and triggers steatosis in mouse liver. J Pharmacol Exp Therapeut. 2007;321(2):526-535.

[23]Arduini A, Serviddio G, Escobar J, et al. Mitochondrial biogenesis fails in secondary biliary cirrhosis in rats leading to mitochondrial DNA depletion and deletions. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011;301(1):G119-G127.

[24]Long RT, Peng JB, Huang LL, et al. Augmenter of Liver Regeneration Alleviates Renal Hypoxia-Reoxygenation Injury by Regulating Mitochondrial Dynamics in Renal Tubular Epithelial Cells. Mol Cells. 2019. 42(12): 893-905.

[25]Middleton P, Vergis N. Mitochondrial dysfunction and liver disease: role, relevance, and

potential for therapeutic modulation. *Therap Adv Gastroenterol.*2021;14:17562848211031394.

[26]Sun X, Cao H, Zhan L, et al. Mitochondrial fission promotes cell migration by Ca²⁺/CaMKII/ERK/FAK pathway in hepatocellular carcinoma. *Liver Int* 2018; 38: 1263–1272.

[27]Zhang Z, Li TE, Chen M, et al. MFN1-dependent alteration of mitochondrial dynamics drives hepatocellular carcinoma metastasis by glucose metabolic reprogramming. *Br J Cancer* 2020;122: 209–220.

[28]Lin C-W, Chen Y-S, Lin C-C, et al. Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy. *Sci Rep.* 2015;5:15807.

[29]Toshima T., Shirabe K., Fukuhara T. Ikegami T., Yoshizumi T., Seojima Y., Ikeda T., Okano S., Maehara Y. Suppression of autophagy during liver regeneration impairs energy charge and hepatocyte senescence in mice. *Hepatology.* 2014;60:290–300.

[30]H.Jaeschke, M.L. Bajt, Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death, *Toxicological Sciences* 89 (1) (2006) 31–41.

[31]Ni HM, Williams JA, Jaeschke H, Ding WX. Zonated induction of autophagy and mitochondrial spheroids limits acetaminophen-induced necrosis in the liver. *Redox Biol.* 2013;1:427–432.

文献综述

肝损伤后肝再生与自噬的关系

摘要: 自噬是一种生物体内的分解代谢过程,通过溶酶体降解消除细胞内无用的物质,来维持细胞内的稳态,并同时可以为生物提供营养和能量。肝脏具有很强的再生能力,在受到损伤后,会进行修复与再生,以恢复肝脏的正常功能,肝损伤后的再生情况与自噬有很强的相关性。本文综述了自噬与肝损伤后肝再生之间的关系,并阐述了线粒体在相关疾病中的作用。

关键词: 肝再生, 肝损伤, 自噬

The relationship between liver regeneration and autophagy after liver injury

ABSTRACT: Autophagy is a metabolic process in organisms that involves the degradation of useless substances by lysosomes to maintain cellular homeostasis, while also providing nutrients and energy for living organisms. The liver has a strong regenerative ability, and after being damaged, it will undergo repair and regeneration to restore normal liver function. The regeneration after liver injury is strongly correlated with autophagy. This article reviews the relationship between autophagy and liver regeneration after liver injury, and elucidates the role of mitochondria in related diseases.

KEY WORDS: Liver regeneration, liver injury, autophagy

肝脏是人体内再生能力很强的器官,当部分肝切除术后或肝脏暴露于病原体、病毒、化学物质和毒素中时,肝脏可以在短时间内修复损伤。研究表明,肝脏疾病的发展与肝细胞凋亡和增殖的反复循环有关^[1]。肝再生是一个复杂的过程,不同的信号通路协调不同阶段的进展,包括肝细胞退出静止期,进入细胞周期,细胞分裂的停止,最后肝细胞重新进入到静止期^[2]。自噬是生物体内的一种分解代谢方式,溶酶体通过降解掉无用的细胞内物质,来维持细胞内稳态,并可以提供营养和能量^[3]。自噬不仅是一种大量的、非选择性的降解机制,还可以选择性地消除某些细胞组分,比如受损的线粒体,以促进线粒体的转换,这一过程被称为“线粒体自噬”。近些年来的研究表明,自噬可能与各种肝脏疾病的发病机制有密切联系,如各种原因导致的肝损伤,部分肝切除术后的肝再生、肝脂肪变性、肝癌、

肝硬化、病毒性肝炎等^[4]。当处于正常生理状态时，自噬活动呈正常表现；然而当处于饥饿、激素缺乏、低氧、生长因子缺乏、高温、胞内压力等情况时，自噬水平短时间内大幅度增加，用来应对细胞中 ATP 的不足^[5-6]。研究自噬与肝再生之间的关系有助于我们优化当前治疗和干预肝脏疾病的策略。

1 部分肝切除术后肝再生与自噬的关系

肝切除术是治疗多种肝脏疾病的有效手段之一，但如果残余的肝脏太小或质量太低，无法维持足够的器官功能，术后就容易出现并发症^[7-9]。促进肝再生是治疗慢性肝病、部分肝切除术后和肝移植的潜在策略^[10]。因此，寻找有效的肝脏再生手段是临床上提升肝切除术后预后的主要目标^[11]。

有研究报道，部分肝切除术（partial hepatectomy, PH）后肝细胞的自噬水平呈先下降后升高的趋势^[12]。Chih-Wen Lin 等通过对 70%肝切除的啮齿动物模型的研究发现，LC3-II 蛋白水平在 PH 术 6h 后显著增加，至 72h 达到峰值，并在 120h 恢复到基准水平。而通过在电镜下对自噬体的观察发现，自噬体数量在 PH 后显著增加，24h-72h 达到峰值，在 168h 后恢复到基准水平。在敲除 Atg7 或用氯喹预处理的模型中，通过抑制自噬导致 PH 后肝细胞增殖降低，并可以降低肝脏损伤早期的细胞再生能力。这都表明了自噬在 PH 后调控肝再生和肝损伤中发挥了重要的保护作用^[11]。

Takeo Toshima 等使用 Atg5 KO 小鼠来研究自噬相关通路在 PH 后肝脏再生中的作用。通过建立 90% PH 的小鼠模型，发现 90% PH 后，大约 50%的对照组小鼠存活，而所有 Atg5 KO 小鼠在 24 小时后死亡。这表明自噬的活跃程度对调节肝细胞蛋白质和细胞器的合成至关重要。同时，肝切除术后，增殖型肝细胞自噬的激活可能影响了细胞存活和肝脏再生^[13]。自噬还可以调节肝脏再生过程中的细胞衰老，在 p21 激活的衰老过程中，自噬相关基因与肝脏再生呈负相关。此外，抑制自噬增强了衰老基因的表达，包括与衰老相关的 IL-6 和 IL-8 的分泌。结果表明，自噬在肝细胞再生过程中通过蛋白质快速转换维持肝细胞质量，负调控衰老表型^[13]。

通过对大鼠 2/3 肝切除模型的研究发现，在术后的 6-36h 中，自噬相关通路 p53 减弱，mTOR, AMPK, PI3K /AKT 和 Hedgehog 有不同程度的激活^[14]。在大鼠肝切除术后 6 小时内，ATP 含量不断减少^[15]，而肝细胞的再生依赖于大量能量，所以和能量相关的 AMPK 信号通路激活，用来应对低 ATP 状态并且可以提供更多能量。此研究还发现，直接参与自噬的溶酶体膜蛋白以及大量酸性水解酶呈高表达现象，线粒体内膜相关蛋白含量增加，由此可推断线粒体的功能未发生较大变化。对此可提出假说：溶酶体与线粒体能够共存。待溶酶体融合自噬体后，不会将所有线粒体都消化掉，线粒体内膜和溶酶体外膜形成了一种共存的状态，以此来快速提供能量^[14]。由此可见，肝部分切除术后，自噬可以一定程度调

节肝脏再生, 修复细胞损伤。

2 非酒精性脂肪性肝病中肝再生与自噬的关系

非酒精性脂肪性肝病 (non alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是导致肝功能异常的最常见病因, 它包括了多种情况下的肝脏损伤, 如肝脂肪变性、非酒精性脂肪性肝炎(non alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化和肝细胞癌^[16]。肝脏缺血本身会导致肝损伤和肝再生障碍^[17], 而在 NAFLD 的情况下, 脂肪变性会进一步加重肝脏对缺血性损伤的敏感性, 还会在肝脏修复过程中削弱肝脏的再生能力^[18]。

已有多项研究表明自噬在 NAFLD 的发病中起到重要作用^[19], 细胞内脂质的增加可以改变自噬小体和溶酶体的内膜脂质组成, 从而降低了自噬小体和溶酶体结合的能力, 导致自噬减少^[20]。在 NAFLD 和 NASH 小鼠的模型中, 肝脏的自噬被抑制, 而通过过表达 Atg7 增强自噬的方式, 有效改善了高脂饮食小鼠模型的肝脏脂肪变性^[21]。

另外在高脂饮食小鼠模型的肝脏中发现, 高脂饮食可影响肝脏自噬, 进而调控 NAFLD 的进展。在饥饿状态下, 活跃的自噬导致脂肪分解和游离 FA 的产生, 提供额外的能量来源。在肝脏中脂肪堆积过多的情况下, 自噬下调导致肝脏中脂肪堆积的额外增加^[22]。

3 化学性肝损伤与自噬

急性肝损伤 (acute liver injury, ALI) 所指当病人在没有慢性肝脏疾病的情况下, 由各类因素所致的急性肝脏功能与结构异常。诸多因素都会导致 ALI, 其中主要有感染、放射性损伤、药物、肝脏外伤、过度摄入乙醇、摄入或接触毒性物质等。

3.1 对乙酰氨基酚

对乙酰氨基酚(acetaminophen, APAP)是最常用的镇痛和退热剂。但过量使用 APAP 可引起肝毒性, 这在许多发达国家中是引起急性肝功能衰竭的主要原因^[23]。近年来, 许多研究发现自噬参与了 APAP 诱导的肝损伤^[24], 这一过程涉及自噬小体降解受损或功能失调的细胞成分。而最近, 这被证明是一种细胞适应机制, 通过促进自噬来抵消 APAP 诱导的肝毒性^[24]。胡婷等人对 ALR 通过促进自噬保护 APAP 诱导对小鼠急性肝损伤的研究中发现, 自噬可以通过选择性地清除受损的线粒体, 来保护线粒体损伤引起的氧化应激和坏死细胞死亡^[25]。氧化应激是 APAP 导致肝损伤的一个主要因素, 它通过谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 耗竭和 ROS 的产生来破坏肝细胞防御机制^[26]。此外, 线粒体可以放大氧化应激信号通路, 参与 APAP 诱导的肝损伤的发病机制^[27]。

Hong-Ming Ni 等的研究发现, 在肝脏自噬活性区外的区域中, 大部分细胞的增殖指标 (PCNA) 呈阳性。而肝脏的自我修复能力可以在 APAP 诱导的肝细胞损伤^[28]的恢复阶段发挥重要作用, 而肝脏再生/修复是一个能量消耗的过程, 有可能通过清除肝脏自噬活性区的受损线粒体, 来提供能量帮助肝损伤的修复^[29]。对于 APAP 导致的肝损伤, 诱导自噬/线粒体

自噬可能有助于限制坏死区域, 促进肝脏再生和恢复。因此, 调节自噬/自噬通路可能为治疗 APAP 导致的肝损伤提供一种新的治疗途径^[29]。

3.2 CCl₄

四氯化碳 (carbon tetrachloride, CCl₄) 是导致化学性肝损伤的常见原因之一, 由 CCl₄ 导致的 ALI 也是目前常用的肝损伤模型, 有研究表明, 经腹腔注射浓度为 0.1% CCl₄ 溶液即可引起 ALI^[30]。胡晨霞等的研究发现, CCl₄ 通过上调缺氧诱导转录因子-1 α (HIF-1 α) 的表达和激活 TLR4/NF- κ B 途径诱导肝组织氧化应激、炎症、坏死和凋亡^[31]。在 CCl₄ 诱导的 ALF 模型中, KLF6 的表达通过诱导 ATG7 和 Beclin-1 以 p53 依赖的方式增强自噬和肝再生^[32]。这表明, 自噬的激活有助于保护 CCl₄ 诱导的肝损伤后的修复与再生。

韩佳佳等在对 CCl₄ 急性肝损伤模型的研究中发现, ALR+CCl₄ 干预组的自噬相关蛋白 LC3、Beclin-1、Atg7 在实验中的表达水平均高于 CCl₄ 诱导的急性肝损伤组, 推测 ALR 通过对自噬通路的控制来促进 CCl₄ 诱导的急性肝损伤后的肝再生, 而当敲除自噬相关基因后, ALR 无法促进 CCl₄ 诱导的急性肝损伤后的肝再生^[33]。

此外, 有报道称, 在 CCl₄ 诱导的大鼠急性肝损伤模型中, CCl₄ 处理 24 小时后, 自噬相关标志物的表达显著上调, 而细胞因子如 TNF- α 和 IL-1 β 的表达仅轻度上调, 表示此阶段细胞自噬活跃, 炎症反应远低于 D-gal/LPS 组。D-gal/LPS 处理引发了强烈的细胞因子风暴, 导致肝细胞严重坏死、凋亡, 抑制自噬和再生, 使得在肝再生恢复阶段, 自噬活跃的 CCl₄ 组 PCNA 和 cyclin D1 表达明显升高, 促进肝再生和修复^[34]。

4 酒精性肝病肝再生与自噬

酒精性肝病 (alcoholic liver disease, ALD) 是指酒精滥用 (大于每天 20 g 乙醇) 引起的肝损伤, 如脂肪变性、酒精性脂肪性肝病 (alcoholic fatty liver disease, AFLD)、酒精性肝炎及酒精性肝硬化^[35]。

酒精性肝病 (ALD) 每年在世界范围内造成约 200 万人死亡^[36]。酒精介导的肝损害种类包括肝脏脂肪变性、肝脏纤维化、酒精性肝炎、肝硬化和肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)。当摄入酒精后, 乙醇被乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase, ADH) 转化为乙醛, 或被 CYP2E1 代谢产生 ROS。而 ROS 可以使细胞内酶失活或使蛋白质变性, 引起膜结合脂质过氧化, 破坏膜完整性, 引起 DNA 突变, 并最终导致线粒体和肝细胞损伤。ALR 可能通过促进线粒体自噬来保护酒精性肝病后的肝损伤并促进肝再生。在体内和体外, ALR 过表达可以上调 Atg5 和 beclin-1 的表达, 并增加了乙醇刺激后 Parkin 向线粒体的易位。这些结果表明, ALR 增强了自噬和线粒体自噬, 以应对乙醇诱导的肝损伤^[37]。

在酒精性脂肪性肝病 (AFLD) 中, 乙醇可以抑制线粒体自噬, 而自噬水平的上升在肝损伤恢复过程中发挥了重要作用。FoxO3a 诱导的线粒体自噬可以预防肝脏脂肪变性和线粒体

结构破坏,通过激活 AMPK-FoxO3a 通路,使受到抑制的线粒体自噬功能得到恢复^[35]。此外,有报道称,帕金森依赖和非帕金森通路均可调控线粒体自噬,并可能为乙醇过度摄入^[38]后导致的肝脏疾病提供新的治疗靶点。由此可见,对酒精性肝病后自噬的研究可以帮助我们进一步了解其与肝再生的关系,并为之后的临床治疗提出新的思路。

5 肝癌与自噬

肝细胞癌的病死率在全世界区域内位居第 3,每年因其死亡的人数在 70 万以上^[39-40]。作为一种高死亡率的癌症,HCC 病情的发展与许多疾病存在相关性,如乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染、酒精性肝病(ALD)以及非酒精性脂肪性肝病(NAFLD)。在导致 HCC 发病的高危因素中,已证实肝自噬水平下降会增加 NAFLD、ALD、HBV 与 HCV 肝炎的发生风险^[41-46]。由此可见,自噬水平下降和 HCC 的发展机制可能有关。通过对肿瘤不同阶段的病理学特性进行研究发现,自噬可能在其中起着双重功能。自噬可以在正常细胞向肿瘤细胞转化前对肿瘤细胞的增殖进行抑制,但其同时也会促进已转化的肿瘤细胞向恶性发展^[47]。在癌症中自噬所表现的复杂双重效能极具研究价值,因为其对于肿瘤的防治有着积极作用。例如,可使自噬水平提升的药物对于肿瘤发生具有预防功能,而对自噬存在抑制作用的药物对于进展期癌症具有治疗作用。

在对肿瘤的抑制或促进方面,自噬具有环境依赖性特点。在肿瘤的初期阶段,自噬以清理受损细胞器的方式抑制肿瘤细胞的发展。而当肿瘤进展到后期时,癌细胞利用自噬可以获取更多能量,从而提高自身生存机会。NAFLD、ALD 以及病毒感染都能够引发自噬水平降低,进而诱发 HCC。故而,在防治 HCC 方面,可以尝试通过不同的途径来控制自噬,以预防肿瘤的发生。

Beth Levine 博士小组的研发结果显示,老年 beclin1 杂合小鼠体内许多组织(含肝脏)都存在自发性肿瘤的现象^[48-49],同时 beclin1 表达的降低也与 HCC 分级相关。肝脏特异性 Atg5(或 Atg7) KO 小鼠体内也会出现自发性肝脏肿瘤,可见自噬与肝脏肿瘤的发生有关。此项功能和自身能够清除受损细胞器可能有关,若受损细胞器未能及时被清除,就会导致氧化和代谢应激增加的级联反应,最终导致细胞向恶性转化^[50-54]。

Yap 是 Hippo 信号途径的主要构成部分,同时发挥着转录共激活因子作用。Lee 等学者观察到,肝脏特异性 Atg7 KO 小鼠的肝脏细胞质与细胞核内,存在大量 Yap 蛋白积聚,使得 Yap 蛋白靶基因的表达上调。另外,若自噬受到抑制,则会上调 Yap 蛋白的表达量,由此可见 Yap 蛋白可能在自噬过程中扮演着重要的角色。通过观察肝脏特异性 Atg7 KO 小鼠的肝细胞发现,Yap 蛋白表达量下降会导致肝细胞变小、纤维化及肝脏炎症的产生。而在 Yap/Atg7 双 KO 小鼠内,显示肝脏肿瘤大小与肿瘤细胞数量皆会下降^[55]。

雷帕霉素机械靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)通过调节细胞合成及代谢,

从而满足细胞增殖所需的能量。因癌细胞增殖率较高,故而包括肝细胞性肝癌在内的 1/2 左右的人类癌症,皆存在 mTOR 异常激活现象。mTOR 的缺失减少了幼龄(2 个月大)Atg5 KO 小鼠的肝肿大、炎症与细胞死亡,但未发现对肝纤维化产生影响。对于处于 6-12 个月大的 Atg5/mTOR 敲除小鼠而言,上述影响逐渐消失,原因在于此类小鼠都会在 12 个月大时形成肿瘤^[56]。1/2 以上的 Atg5/mTOR 敲除小鼠出现自发性肿瘤,而 Atg5 KO 小鼠在 6 个月左右大时无肿瘤形成。综上所述, Yap 和 mTOR 都参与了自噬缺陷肝脏肿瘤的发生。

通过对肝特异性 Atg5 或 Atg7 KO 小鼠的研究发现,这些肝自噬缺陷小鼠大部分都不会出现恶性 HCC,这表明,在肿瘤进展晚期,自噬可能参与了良性肿瘤的恶化^[57]。不断有新的研究结果证实,诸多肿瘤细胞(含肝癌细胞)面对饥饿、药物、生长因子剥夺、蛋白酶体抑制与缺氧等诸多应激因素的刺激,会显著激活自噬,进而将毒性氧自由基或者错误折叠蛋白清理掉,使线粒体可保持正常功能,能够继续进行代谢,避免肿瘤朝良性发展。这是促进癌细胞生存的重要机制^[58-63]。

总之,在肝癌的进展过程中,自噬存在着复杂的双重功能。在肿瘤形成初期,自噬可以抑制肿瘤细胞的增殖,但同时也可促进肿瘤的进展及恶化。对肝癌发展过程中自噬的研究有助于我们详细了解其影响机制,并为肝癌治疗的方法提供新的思路。

6 病毒性肝炎与自噬

乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)是慢性肝脏感染的两种主要肝炎病毒,并与肝纤维化进展为 HCC 相关^[64]。Chen 等人探索了 miR-155 在 HBV 复制中的作用,并证明 miR-155 通过增强 SOCS1/Akt/mTOR 轴促进自噬来增强 HBV 的复制^[65]。越来越多的证据表明,HBV 和 HCV 感染都会影响自噬过程,导致自噬水平降低^[66]。HBV 基因组或乙型肝炎病毒 X 蛋白(hepatitis B virus x protein, HBx)的过度表达可诱导自噬体的增加。在机制上,X 蛋白和磷脂酰肌醇 3-激酶(Phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)直接结合,提升后者活性,使得肝细胞内自噬表达量提高^[67]。自噬除了可对 HBV 的复制加以促进,同时对 HBV 相关肿瘤的形成可能具有抑制作用。

而 HCV 感染同样可提高自噬的活跃水平,使得自噬体无法正常融合溶酶体,引发自噬水平下降,之后的研究明确指出 HCV 所致自噬水平下降的时间变化特点。HCV 感染可导致自噬水平变化,在初期时 HCV 对自噬水平的影响较低,然而进入后期时影响较大^[68-69]。HCV 可以通过多种机制调节肝细胞的自噬水平,受到 HCV 非结构多蛋白(Hepatitis C Virus non-structural protein NS-3/NS5B, HCV NS3-NS5B)表达的影响,自身自噬体生成量提高。免疫相关 GTPase 家族 M 蛋白(Immunity-Related GTPase Family M Protein, IRGM)属于 GTPase 小家族,它可以和 Atg5、Atg10 协同作用,从而对自噬进行调节。实验证实,HCV NS3 和 IRGM 互相作用,进而间接诱导自噬水平的提高^[70]。另外,作为一类 RNA 聚合酶,

NS5B 对 RNA 具有依赖性, 同时是 HCV 复制复合体的构成部分, 其和 Atg5 进行协同作用, 以提高自噬水平^[71]。除了对自噬的直接影响外, HCV 感染还可以通过内质网应激和氧化应激增加等间接机制诱导自噬^[72]。除了常见的自噬种类, HCV 与 HBV 同时能够上调 Parkin 与 Pink1 的表达, 以及促进 Drp1 相关的线粒体分裂, 从而增加线粒体自噬水平。

综上所述, 在病毒性肝炎中 HBV 及 HCV 通过诱导自噬的方式来促进肝炎的发展, 并阻止肝再生。

7 缺血再灌注损伤与自噬

肝组织的短暂缺血和再灌注可以在体内诱导肝缺血再灌注组织损伤(IRI)和炎症反应。肝 IRI 可分为暖性 IRI 和冷性 IRI, 在啮齿类动物和 IRI 患者中, 以细胞凋亡、坏死和自噬三种主要类型为特征。在肝切除术、肝窦阻塞综合征 (sinusoidal obstruction syndrome, SOS)、出血性休克、心脏骤停、外伤的病人或动物模型中, 当通过夹闭血管从而减少肝组织正常的血液灌注时, 会出现暖性 IRI。而冷 IRI 是一种仅影响肝移植(liver transplantation,LT)患者的疾病, 是在进入暖性 IRI 阶段之前将捐献的肝脏保存在低温环境中引起的。

短期饥饿对肝 IRI 损伤有保护作用, 通过观察小鼠模型发现, 其能够下调血清转氨酶以及肝细胞凋亡水平, 同时使肝脏的病理损伤得到改善。另外, 饥饿会使 IRI 肝组织内肝细胞的自噬表达量大幅上调。研究者通过使用血管钳夹闭小鼠门静脉, 使门静脉周围肝组织短暂缺血(10-15 分钟), 然后取下血管钳引起短暂缺血再灌注发现, 缺血预处理(ischemia preconditioning,IP)可以减少氨基转移酶和炎症细胞因子释放并显著增加自噬水平, 从而保护肝组织免受 IRI 诱导的损伤。远端缺血预处理(remote ischemic preconditioning,RIPC)已被证明通过诱导有丝分裂活化蛋白激酶依赖性自噬来保护肝脏免受 IRI 损伤^[73]。尽管各种实验研究体现了肝手术中 IP 的显著益处, 但一项分析却显示 IP 未能改善肝切除术或 IT 后患者的预后^[74-75], 所以肝脏手术中 IP 预处理是否可以改善患者的预后水平暂无定论。

一些研究表明, 自噬抑制基因的表达可加重肝损伤, 而自噬增强可防止 IRI 损伤。Atg 7 基因敲除可加重肝脏 IRI 损伤, 并通过破坏自噬小体和线粒体来抑制肝脏再生^[76]。在肝 IRI 模型中, 通过对 Parkin 敲除的方式可以抑制线粒体自噬并增加肝细胞的凋亡, 导致 DNA 受损加剧, 使得肝细胞的存活率下降^[77]。然而, 有学者却发现, 自噬的激活会加重肝 IRI 损伤, 而自噬的抑制可以防止 PH 诱导的损伤。在动物模型中, MIR-17 的过表达增强了自噬水平, 随后加重了肝脏 IRI 损伤^[78]。而在 70%PH 小鼠模型中, 通过敲除 p53 凋亡刺激蛋白 2 (apoptosis stimulating protein 2 of p53, ASPP2) 发现, mTORC1 途径诱导的自噬水平出现下降, 并显著增强了 70% PH 后小鼠肝脏的再生^[79]。

一般来说, 自噬的激活被认为是一种保护肝脏免受 IRI 损伤的机制, 而过度自噬则被认为是具有加速肝细胞和/或肝非实质细胞凋亡的作用。尽管暖性/冷性肝 IRI 损伤的发病机制

与自噬、坏死和细胞凋亡的复杂相互作用有关，但人们普遍认为，刺激自噬一般能促进肝脏再生。自噬是提高暖性/冷性 IRI 后患者肝细胞存活率的潜在机制，因为它降解细胞内多余成分并消除受损细胞器和错误折叠的蛋白。然而，在暖性/冷性肝脏 IRI 过程中，有关自噬调节作用的研究结果仍然不一致。部分研究表明，自噬水平的降低可以抑制炎症、细胞凋亡和坏死从而保护肝脏免受热或冷 IRI 损伤。而在部分动物模型中，自噬的增强则会加重肝脏 IRI 的损伤。自噬的双重作用提示上调或下调自噬水平可能是抑制肝损伤的有效治疗策略。在动物模型中，通过基因修饰的方法可以调节自噬水平，可以作为一种潜在方法来影响自噬蛋白的表达，因此在肝 IRI 模型中被认为是一种有效的保护肝功能的治疗方法。而此种方法是否可以应用于临床治疗，则有待进一步研究

小结

肝脏作为具有强大再生能力的器官，兼顾了代谢、解毒、免疫和凝血等功能，在肝脏受到不同情况的损伤后，会发挥出强大的再生能力，通过促进自噬来调节蛋白质和细胞质合成、提供能量、清除受损的细胞和细胞器以及促进肝细胞的增殖，由此来改善肝脏损伤后的恢复情况。在部分肝切除术后的肝损伤中，自噬通过促进肝细胞增殖与调控肝细胞衰老基因表达来促进肝脏再生，从而帮助部分肝切除后肝损伤的修复；在化学性肝损伤中，肝脏通过选择性的清除受损线粒体、提供能量及 ALR 来促进自噬，以此来保护受损细胞并增强肝再生的能力；在 NAFLD 中，细胞内脂质的增加抑制了自噬，进而对肝再生功能产生影响；在 HCC 的发展中，自噬发挥着复杂的双重功能。肿瘤形成初期，其具抑制功能，但同时对肿瘤的进展以及恶变具有促进作用；在病毒性肝炎中 HBV 及 HCV 通过诱导自噬的方式来促进肝炎的发展，并阻止肝再生；在肝 IRI 模型中，自噬被认为是一种有效的保护肝功能的治疗方法。因此，通过正确的方式增强或抑制自噬，可以为不同情况下肝损伤的治疗方案提供新的临床思路。

参考文献

- [1] Fausto N. Liver regeneration: from laboratory to clinic. *Liver Transpl.* 2001; 7(10):835-44.
- [2] Diehl AM, Chute J. Underlying potential: cellular and molecular determinants of adult liver repair. *J Clin Invest* 2013;123:1858-1860.
- [3] Levine, B.; Packer, M.; Codogno, P. Development of autophagy inducers in clinical medicine. *J. Clin. Investig.* 2015, 125, 14-24
- [4] Choi, A.M.; Ryter, S.W.; Levine, B. Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* 2013, 368,651-662
- [5] Ke, P.Y. Mitophagy in the Pathogenesis of Liver Diseases. *Cells* 2020,9, 831MELENDEZ A,NEUFELD T P.The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story[J]. *Development*, 2008, 135(14) : 2347-2360
- [6] KIEL J A K. Autophagy in unicellular eukaryotes [J] . *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2010, 365(1541) : 819 -830.
- [7] Clavien, P. A. et al. What is critical for liver surgery and partial liver transplantation: size or quality? *Hepatology* 52, 715-729 (2010).
- [8] Schuppan, D. & Popov, Y. Rationale and targets for antifibrotic therapies. *Gastroenterol Clin Biol* 33, 949-957 (2009).
- [9] Aydemir, T. B., Sitren, H. S. & Cousins, R. J. The zinc transporter Zip14 influences c-Met phosphorylation and hepatocyte proliferation during liver regeneration in mice. *Gastroenterology* 142, 1536-1546 (2012).
- [10] Clavien PA, Petrowsky H, DeOliveira ML, Graf R. Strategies for safer liver surgery and partial liver transplantation. *N Engl J Med.* 2007;356(15):1545-1559.
- [11] Lin C-W, Chen Y-S, Lin C-C, et al. Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy. *Sci Rep.* 2015;5:15807.
- [12] Pfeifer U. Inhibited autophagic degradation of cytoplasm during compensatory growth of liver cells after partial hepatectomy. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.* 1979. 30(3): 313-33.
- [13] Toshima T., Shirabe K., Fukuhara T., Ikegami T., Yoshizumi T., Seojima Y., Ikeda T., Okano S., Maehara Y. Suppression of autophagy during liver regeneration impairs energy charge and hepatocyte senescence in mice. *Hepatology.* 2014;60:290-300.
- [14] 尹丽,徐存拴.自噬在大鼠肝再生中作用的初步探讨[J].*生物信息学*,2017,15(03):156-163.
- [15] Pibiri M. Liver regeneration in aged mice: new insights. *Aging (Albany NY).* 2018;10(8):1801-1824.

- [16]Zhang, Z., Yao, Z., Chen, Y., Qian, L., Jiang, S., Zhou, J., et al. (2018). Lipophagy and liver disease: new perspectives to better understanding and therapy. *Biomed. Pharmacother.* 97, 339-348.
- [17]McCormack, L., Petrowsky, H., Jochum, W., Furrer, K., and Clavien, P. A. (2007). Hepatic steatosis is a risk factor for postoperative complications after major hepatectomy: a matched case-control study. *Ann. Surg.* 245, 923-930
- [18]Alvarez-Mercado AI, Rojano-Alfonso C, Mico-Carnero M, Caballeria-Casals A, Peralta C, Casillas-Ramirez A. New insights into the role of autophagy in liver surgery in the setting of metabolic syndrome and related diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9:670273
- [19]Samala, N., Tersey, S. A., Chalasani, N., Anderson, R. M., and Mirmira, R. G. (2017). Molecular mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease: potential role for 12-lipoxygenase. *J. Diabetes Complications* 31, 1630-1637
- [20]Koga, H., Kaushik, S., and Cuervo, A. M. (2010). Altered lipid content inhibits autophagic vesicular fusion. *FASEB J.* 24, 3052-3065.
- [21]Gong, L. L., Li, G. R., Zhang, W., Liu, H., Lv, Y. L., Han, F. F., et al. (2016). Akebia saponin D decreases hepatic steatosis through autophagy modulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 359, 392-400.
- [22]Ullah R, Rauf N, Nabi G, et al. Role of Nutrition in the Pathogenesis and Prevention of Non-alcoholic Fatty Liver Disease: Recent Updates. *Int J Biol Sci.* 2019;15(2):265-276.
- [23]Budnitz DS, Lovegrove MC, Crosby AE. Emergency department visits for overdoses of acetaminophen-containing products. *Am J Prev Med.* 2011;40(6):585-592.
- [24]Ni HM, Bockus A, Boggess N, Jaeschke H, Ding WX. Activation of autophagy protects against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Hepatology.* 2012;55(1):222-232.
- [25]Lee J, Giordano S, Zhang J. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J.* 2012;441(2):523-540.
- [26]Jaeschke H, Knight TR, Bajt ML. The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol Lett.* 2003;144(3):279-288.
- [27]Jaeschke H, McGill MR, Ramachandran A. Oxidant stress, mitochondria, and cell death mechanisms in drug-induced liver injury: lessons learned from acetaminophen hepatotoxicity. *Drug Metab Rev.* 2012;44(1):88-106.
- [28]Jaeschke H, Bajt ML. Intracellular signaling mechanisms of acetaminophen-induced liver cell death. *Toxicol Sci.* 2006;89(1):31-41.
- [29]Ni HM, Williams JA, Jaeschke H, Ding WX. Zonated induction of autophagy and mitochondrial spheroids limits acetaminophen-induced necrosis in the liver. *Redox Biol.* 2013;1:427-432.
- [30]伍智慧,冉喆,张晴晴等.枸杞多糖对四氯化碳致急性肝损伤小鼠的保护作用[J].宁夏医科大学学报,2021,43(04):364-370.

- [31]Guo R, Lin B, Pan JF, et al. Inhibition of caspase-9 aggravates acute liver injury through suppression of cytoprotective autophagy. *Sci Rep.* 2016;6:32447.
- [32]Sydor S, Manka P, Best J, et al. Kruppel-like factor 6 is a tran-scriptional activator of autophagy in acute liver injury. *Sci Rep.*2017;7:8119.
- [33]韩伟佳,时红波,时红林,等. 肝再生增强因子通过增加自噬水平促进CC14诱导的急性肝损伤中HL-7702细胞的增殖[J]. *中华肝脏病杂志*,2016,24(10):761-766.
- [34]Shuai Shao , Yu Zhang , Guantong Li The dynamics of cell death patterns and regeneration during acute liver injury in mice. *FEBS Open Bio.* 2022 May;12(5):1061-1074.
- [35]Gao, B., Ahmad, M. F., Nagy, L. E., Tsukamoto, H., Inflammatory pathways in alcoholic steatohepatitis. *J. Hepatol.* 2019, 70, 249-259.
- [36]Rehm J, Samokhvalov AV, Shield KD: Global burden of alcoholic liver diseases.*J. Hepatol* 2013,59:160-8.
- [37]Limin Liu , Ping Xie , Wen Li , Yuan Wu :Augmenter of liver regeneration protects against ethanol-induced acute liver injury by promoting autophagy. *Am J Pathol.* 2019 Mar;189(3):552-567.
- [38]Williams, J. A., Ding, W. X., A mechanistic review of mitophagy and its role in protection against alcoholic liver disease. *Biomolecules* 2015, 5, 2619-2642.
- [39]Yang JD, Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: a global view. *NatRev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:448-458.6.
- [40]Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A.Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394-424.
- [41]Chao X, Ding WX. Role and mechanisms of autophagy in alcohol induced liver injury. *Adv Pharmacol* 2019;85:109-131.
- [42]Ma X, McKeen T, Zhang J, Ding WX. Role and Mechanisms of Mitophagy in Liver Diseases. *Cells.* 2020;9(4):837.
- [43]Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective hepatic autophagy in obesity promotes ER stress and causes insulin resistance. *Cell Metab* 2010;11:467-478.
- [44]Sir D, Ann DK, Ou JH. Autophagy by hepatitis B virus and for hepatitis B virus. *Autophagy* 2010;6:548-549.
- [45]Sir D, Chen WL, Choi J, Wakita T, Yen TS, Ou JH. Induction of incomplete autophagic response by hepatitis C virus via the unfolded protein response. *Hepatology.* 2008;48(4): 1054-1061.
- [46]Chao X, Wang S, Zhao K, et al. Impaired TFEB-Mediated Lysosome Biogenesis and Autophagy Promote Chronic Ethanol-Induced Liver Injury and Steatosis in Mice. *Gastroenterology.* 2018;155(3):865-879.e12.

- [47]Chen P, Yao L, Yuan M, et al. Mitochondrial dysfunction: A promising therapeutic target for liver diseases. *Genes Dis.* 2023;11(3):101115.
- [48]Liang XH, Jackson S, Seaman M, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* 1999;402(6762):672-676.
- [49]Qu X, Yu J, Bhagat G, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1809-1820.
- [50]Ding WX, Ni HM, Gao W, et al. Oncogenic transformation confers a selective susceptibility to the combined suppression of the proteasome and autophagy. *Mol Cancer Ther.* 2009;8(7):2036-2045.
- [51]Ding WX, Yin XM. Sorting, recognition and activation of the misfolded protein degradation pathways through macroautophagy and the proteasome. *Autophagy* 2008;4:141-150.
- [52]Chen N, Debnath J. Autophagy and tumorigenesis. *FEBS Lett* 2010;584:1427-1435.
- [53]Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62 [published correction appears in *Cell.* 2011 Apr 15;145(2):322]. *Cell.* 2009;137(6):1062-1075.
- [54]Vessoni AT, Filippi-Chiela EC, Menck CF, Lenz G. Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ.* 2013;20(11):1444-1454.
- [55]Autophagy is a gatekeeper of hepatic differentiation and carcinogenesis by controlling the degradation of Yap.
- [56]Chao X, Qian H, Wang S, Fulte S, Ding WX. Autophagy and liver cancer. *Clin Mol Hepatol.* 2020;26(4):606-617.
- [57]Tian Y, Kuo CF, Sir D, Wang L, Govindarajan S, Petrovic LM, et al. Autophagy inhibits oxidative stress and tumor suppressors to exert its dual effect on hepatocarcinogenesis. *Cell Death Differ* 2015;22:1025-1034.
- [58]Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol Cancer.* 2020;19(1):12.
- [59]Barnard RA, Regan DP, Hansen RJ, Maycotte P, Thorburn A, Gustafson DL. Autophagy Inhibition Delays Early but Not Late-Stage Metastatic Disease. *J Pharmacol Exp Ther.* 2016;358(2):282-293.
- [60]Guo JY, Xia B, White E. Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell* 2013;155:1216-1219.
- [61]White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;12:401-410.
- [62]Ding WX, Ni HM, Gao W, et al. Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability. *Am J Pathol.* 2007;171(2):513-524.
- [63]Ding WX, Ni HM, Gao W, et al. Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced

autophagy on cell survival. *J Biol Chem*. 2007;282(7):4702-4710.

[64] Alavian SM, Ande SR, Coombs KM, et al. Virus-triggered autophagy in viral hepatitis - possible novel strategies for drug development. *J Viral Hepat*. 2011;18(12):821-830.

[65] Chen L, Ming X, Li W, et al. The microRNA-155 mediates hepatitis B virus replication by reinforcing SOCS1 signalling-induced autophagy. *Cell Biochem Funct*. 2020;38(4):436-442.

[66] Huang H, Kang R, Wang J, Luo G, Yang W, Zhao Z. Hepatitis C virus inhibits AKT-tuberous sclerosis complex (TSC), the mechanistic target of rapamycin (MTOR) pathway, through endoplasmic reticulum stress to induce autophagy. *Autophagy*. 2013;9(2):175-195.

[67] Tang H, Da L, Mao Y, et al. Hepatitis B virus X protein sensitizes cells to starvation-induced autophagy via up-regulation of beclin 1 expression [published correction appears in *Hepatology*. 2010 Sep;52(3):1176]. *Hepatology*. 2009;49(1):60-71.

[68] Lee EB, Sung PS, Kim JH, Park DJ, Hur W, Yoon SK. microRNA-99a Restricts Replication of Hepatitis C Virus by Targeting mTOR and de novo Lipogenesis. *Viruses*. 2020;12(7):696.

[69] Wang HJ, Park JY, Kwon O, et al. Chronic HMGCR/HMG-CoA reductase inhibitor treatment contributes to dysglycemia by upregulating hepatic gluconeogenesis through autophagy induction. *Autophagy*. 2015;11(11):2089-2101.

[70] Grégoire IP, Richetta C, Meyniel-Schicklin L, et al. IRGM is a common target of RNA viruses that subvert the autophagy network. *PLoS Pathog*. 2011;7(12):e1002422.

[71] Guévin C, Manna D, Bélanger C, Konan KV, Mak P, Labonté P. Autophagy protein ATG5 interacts transiently with the hepatitis C virus RNA polymerase (NS5B) early during infection. *Virology*. 2010;405(1):1-7.

[72] Medvedev R, Ploen D, Spengler C, et al. HCV-induced oxidative stress by inhibition of Nrf2 triggers autophagy and favors release of viral particles. *Free Radic Biol Med*. 2017;110:300-315.

[73] Wang Y, Shen J, Xiong X, et al. Remote ischemic preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury via heme oxygenase-1-induced autophagy. *PLoS One*. 2014;9(6):e98834.

[74] O'Neill S, Leuschner S, McNally SJ, et al. Meta-analysis of ischaemic preconditioning for liver resections. *Br J Surg*. 2013;100:1689-1700.

[75] Azoulay D, Del Gaudio M, Andreani P, et al. Effects of 10 minutes of ischemic preconditioning of the cadaveric liver on the graft's preservation and function: the ying and the yang. *Ann Surg*. 2005;242:133-139.

[76] Lin CW, Chen YS, Lin CC, et al. Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy. *Sci Rep*. 2015;5:15807.

[77] Ning XJ, Yan X, Wang YF, et al. Parkin deficiency elevates hepatic ischemia/reperfusion injury accompanying decreased mitochondrial autophagy, increased apoptosis, impaired DNA

damage repair and altered cell cycle distribution. *Mol Med Rep.* 2018;18:5663-5668.

[78]Li S, Zhang J, Wang Z, et al. MicroRNA--17 regulates autophagy to promote hepatic ischemia/reperfusion injury via suppression of signal transductions and activation of transcription--3 expression. *Liver Transpl.* 2016;22:1697-1709.

[79]Shi H, Zhang Y, Ji J, et al. Deficiency of apoptosis--stimulating protein two of p53 promotes liver regeneration in mice by activating mammalian target of rapamycin. *Sci Rep.* 2018;8:17927.

缩略语表

中文	英文	缩写
肝脏双重动脉血供	Liver dual arterial blood supply	LDABS
部分肝切除术	partial hepatectomy	PH
假手术组	sham operation group	SO
细胞增殖抗原	Ki-67	Ki-67
动力蛋白相关蛋白 1	dynamamin-related protein1	Drp1
线粒体融合蛋白 1	mitochondrial fusion protein 1	MFN1
微管相关蛋白 1 轻链 3	microtubule- associated protein1 light chain 3	LC3
肝再生增强因子	augmenter of liver regeneration	ALR
细胞凋亡相关蛋白	B-cell lymphoma 2	Bcl-2
线粒体 DNA	Mitochondrial DNA	mtDNA
缺血再灌注损伤	ischemia-reperfusion injury	IRI
活性氧	reactive oxygen species	ROS
自噬相关蛋白 7	recombinant autophagy related protein 7	Atg7
自噬相关蛋白 5 敲除	recombinant autophagy related protein 5 knockoutAtg5 KO	Atg5 KO
增殖细胞核抗原指标	proliferating cell nuclear antigen	PCNA
非酒精性脂肪性肝病	non alcoholic fatty liver disease	NAFLD
非酒精性脂肪性肝炎	non alcoholic steatohepatitis	NASH
对乙酰氨基酚	acetaminophen	APAP
谷胱甘肽	glutathione	GSH
四氯化碳	carbon tetrachloride	CCL4
急性肝损伤	acute liver injury	ALI
酒精性肝病	alcoholic liver disease	ALD
酒精性脂肪性肝病	alcoholic fatty liver disease	AFLD
乙醇脱氢酶	alcohol dehydrogenase	ADH
肝细胞癌	hepatocellular carcinoma	HCC
雷帕霉素机械靶蛋白	mammalian target of rapamycin	mTOR
二乙基亚硝胺	diethylnitrosamine	DEN
乙型肝炎病毒	hepatitis B virus	HBV
丙型肝炎病毒	hepatitis C virus	HCV

乙型肝炎病毒 X 蛋白	hepatitis B virus x protein	HBx
肝移植	liver transplantation	LT
缺血预处理	ischemia preconditioning	IP
远端缺血预处理	remote ischemic preconditioning	RIPC
磷脂酰肌醇 3-激酶	phosphatidylinositide 3-kinases	PI3K
免疫相关 GTPase 家族 M 蛋白	Immunity-Related GTPase Family M Protein	IRGM
HCV 非结构多蛋白	Hepatitis C Virus non-structural protein NS-3-NS5B	HCV NS3-NS5B
肝窦阻塞综合征	sinusoidal obstruction syndrome	SOS
p53 凋亡刺激蛋白 2	apoptosis stimulating protein 2 of p53	ASPP2