文章编号:1000-5404(2014)21-2191-05

论著

雷帕霉素对肝脏缺血再灌注中线粒体DNA损伤及修复机制的影响

余 曦[1],张 莹[2],范 伟[2],柳 扬[2],郭江福[2],龚 毅[2] (550000 贵阳,贵阳医学院第二临床学院外科学教研室[1];550000 贵阳,贵州省人民医院肝胆外科[2])

[摘要] **目的** 探讨大鼠肝缺血再灌注损伤中线粒体DNA的损伤和修复机制及雷帕霉素的干预作用。**方法** 建立大鼠全肝缺血再灌注损伤模型,分为4组:A组:缺血30 min组;B组:缺血50 min组;C组:术前雷帕霉素灌胃,缺血50 min组;D组:假手术组。术后24 h,第3、5天分别处死各组动物,测定血清AST、ALT;取出肝脏作病理学检测;mtDNA D-loop区扩增测序,查找变异位点;RT-PCR检测肝组织内线粒体DNA聚合酶γ mRNA的表达情况。**结果** 术后早期(24 h),A、B、C 3组AST、ALT均升高,肝组织病理学变化较重,线粒体DNA聚合酶γ mRNA表达量均升高,其中C组AST、ALT及肝组织病理学改变和线粒体DNA聚合酶γ mRNA表达量明显低于B组($P<0.01$);24 h后3组AST、ALT均降低,A、B 2组线粒体DNA聚合酶γ mRNA表达量逐渐降低,C组则较A、B 2组为低($P<0.01$),且术后一直维持在同一水平;C组mtDNA D-loop区DNA突变率明显低于B组($P<0.01$)。**结论** 肝脏缺血再灌注损伤存在mtDNA D-loop区突变,雷帕霉素可减轻大鼠肝脏缺血再灌注的病理损害,降低mtDNA的突变率,抑制线粒体DNA聚合酶γ mRNA表达量的过度升高,从而对线粒体DNA的氧化损伤起保护作用。

[关键词] 肝;缺血再灌注损伤;线粒体DNA;雷帕霉素;大鼠
[中图法分类号] R322.47; R363.22; R979.5 [文献标志码] A

Effect of rapamycin on mitochondrial DNA damage in rats after liver ischemia-reperfusion injury and repair mechanisms

Yu Xi[1], Zhang Ying[2], Fan Wei[2], Liu Yang[2], Guo Jiangfu[2], Gong Yi[2] ([1]Teaching Section of Surgery, Second Clinical Medical College, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550000; [2]Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou Province, 550000, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the injury and repair mechanism of mitochondrial DNA damage in rats after hepatic ischemia and reperfusion injury and to determine the intervention effect of rapamycin in the process. **Methods** Whole hepatic ischemia and reperfusion was performed in the rats according to the following ischemia period. The experimental rats were divided into 4 groups, group A (ischemia 30 min), group B (ischemia 50 min), group C [intra-gastric injection of 1.5 mg/(kg · d) rapamycin for 3 d before surgery, then ischemia 50 min and rapamycin injection again], and group D (sham operation). The rats were sacrificed in 24 h, and 3 and 5 d respectively after reperfusion in each group, and their serum levels of AST and ALT were tested and hepatic pathology was observed after HE staining. The mtDNA D-loop region was them amplified and sequenced to find the mutations. The mRNA expression of the mitochondrial DNA polymerase γ was detected in hepatic tissues by RT-PCR. **Results** In the early stage after injury (24 h), both serum levels of AST and ALT were increased in groups A, B and C, pathological injury was serious in hepatic tissues, mitochondrial DNA polymerase γ mRNA expression was increased. Among the 3 injured groups, the indexes were significantly lower in group C than group B ($P<0.01$). After 24 h, the serum levels of AST and ALT were decreased in the 3 groups, the expression level of mitochondrial DNA polymerase γ was gradually decreased in them, with those in the group C more lower ($P<0.01$), and maintaining at the same level after

[基金项目] 贵州省科技厅专项基金(黔科合J[2008]-2302);贵州省优秀青年科技人才基金(黔科合人字(2011)29)
[通信作者] 张 莹,E-mail:zhangyingdoc@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20141020.1015.011.html(2014-10-20)

operation. The mutant rate of mtDNA D-loop region was significantly lower in group C than group B ($P < 0.01$). **Conclusion** There are DNA mutations of mtDNA D-loop region in hepatic ischemia-reperfusion injury. Rapamycin attenuates the pathological damage induced by ischemia-reperfusion in rat liver, reduces the mtDNA mutation rate, suppresses the increased expression of mitochondrial DNA polymerase γ, and thus exerts a protective effect against oxidative damage.

[**Key words**] liver; ischemia-reperfusion injury; mitochondrial DNA; rapamycin; rats

Supported by the Special Fund of Guizhou Department of Science and Technology (2008-2302) and the Fund for Excellent Young Scientists of Guizhou Province (2011-29). Corresponding author: Zhang Ying, E-mail: zhangyingdoc@163.com

肝脏缺血再灌注损伤(hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI)是一个重要的临床问题,休克、感染、肝脏外伤、肝叶切除及肝移植所致的肝脏功能损害及肝功能衰竭都与之有关。如何延长肝脏缺血耐受时间,减少缺血再灌注损伤,保护肝功能,防止肝功能衰竭有重要的临床意义。众多研究表明,肝细胞线粒体DNA(mitochondrial DNA,mtDNA)的损伤在肝脏缺血再灌注损伤中起重要作用[1]。本研究通过建立大鼠全肝缺血再灌注损伤模型,探讨mtDNA常见变异位点、线粒体DNA聚合酶γ(mitochondrial DNA polymerase γ)表达与mtDNA受损后的修复机制,以及雷帕霉素对线粒体DNA可能的保护机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康清洁级雄性SD大鼠($n=60$),体质量200~250 g,购自第三军医大学实验动物中心,术前12 h禁食,自由饮水。雷帕霉素购自上海晶昕生物科技有限公司,临用前以灭菌药用蓖麻油溶解成终浓度为0.345 mg/mL的溶液。

1.2 分组、造模和给药

54只大鼠分为3组,A组:肝脏缺血30 min组;B组:肝脏缺血50 min组;C组:术前3 d及术后雷帕霉素[1.5 mg/(kg·d)]灌胃,肝脏缺血50 min组;剩余6只作为假手术对照组(D组)。A、B组术前3 d及术后以灭菌药用蓖麻油1 mL灌胃。各组大鼠均采用乙醚麻醉,参照Pringle's[2]法建立大鼠全肝缺血再灌注模型,上腹正中切口后以无创血管夹将肝动脉、门静脉及胆管一并夹闭,阻断肝门30、50 min时开放血流,形成肝缺血再灌注,D组麻醉后仅开腹翻动肝脏后即关腹。

1.3 测定

各组大鼠术后24 h、3、5 d分别处死各组动物。①股动脉取血2 mL,3 000 r/min,15 min取血清测定AST、ALT;②取部分肝脏组织(1.5 cm×1.5 cm×0.3 cm)固定于10%中性福尔马林溶液中,石蜡包埋后行HE染色,光镜观察肝脏损伤程度;③RT-PCR检测肝组织内线粒体DNA聚合酶γ mRNA的表达:取肝脏组织15 mg,按试剂盒说明提取总RNA,合成cDNA,取2 μL cDNA进行PCR反应,线粒体DNA聚合酶γ mRNA引物:上游引物5′-TCAAGGAAGTCACGATGG-3′;下游引物5′-AGGCACTGGTCAATGTCTAC-3′,扩增片段长度470 bp;内参β-actin引物由上海生工提供:扩增片段长度165 bp。扩增条件:94 ℃预变性3 min,94 ℃变性30 s,55 ℃退火30 s,72 ℃延伸60 s,反应30个循环。72 ℃延伸5 min。制备20 g/L琼脂凝胶,取5 μL PCR产物与1 μL上样缓冲液混合后点样,选用100~1 000 bp Marker 5 μL,120 V 40 min电泳,后紫外灯下观察并拍照。用Quantity one 4.6生物图像分析软件测定各电泳条带面积光密度值,计算与其相应β-actin面积光密度比值;④肝细胞mtDNA D-loop区提取、扩增、测序:取肝脏组织15 mg,按试剂盒说明提取肝脏组织基因组DNA,取2 μL基因组DNA溶液进行PCR反应,mtDNA D-loop区引物:上游引物5′-ACATTAAATTATTTTCCCCAAGCA-3′;下游引物5′-TTGGTGTATGTGGAATTTTCTGA-3′,扩增片段长度850 bp,扩增条件与线粒体DNA聚合酶γ mRNA PCR反应相同,取5 μL PCR产物进行电泳,电泳条件亦同前,拍照证明扩增目的条带成功,取PCR产物纯化后送上海生工测序,并对测序结果与NCBI GenBank参考序列对比查找变异位点。

1.4 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行数据处理,测序样本率用χ^2检验,其余检验数据均以$\bar{x}\pm s$表示,使用单因素方差分析进行不同时间点与组间差异性检验。

2 结果

2.1 各组大鼠成活率

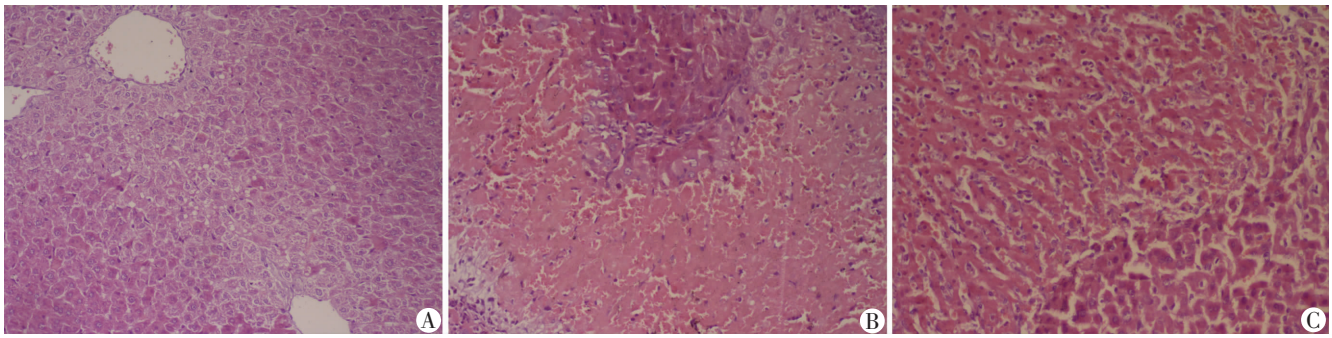
A组大鼠术后成活率18/18(100%),B组大鼠成活率18/45(40%),为保证动物模型标本量,补充造模至最终成活18只,而C组大鼠成活率18/24(75%),亦补充造模至最终成活18只。大鼠死亡均出现在开放肝脏血流再灌注后2~5 min。

2.2 各组大鼠术后一般表现

各组大鼠术后第1天均精神差,可饮水,但未见进食鼠料,皮毛凌乱,毛色暗淡,活动量明显减少,随时间推移以上表现逐渐恢复,观察到A组大鼠在术后2~3 d、B组大鼠在术后4~5 d、C组大鼠在术后3~4 d皮毛恢复光泽,饮食、活动量与正常大鼠无明显差异,D组大鼠在手术当日即可恢复术前状态。

2.3 各组大鼠AST、ALT变化

A、B、C 3组大鼠AST、ALT早期(24 h)升高明显,3 d后开始降低($P<0.01$,$P<0.05$),至术后5 d各组间比较已无统计学差异($P>0.05$),A、B、C 3组组内比较,术后第1、3天A、C组AST、ALT较B组明显降低($P<0.01$),术后第5天各组间无统计学差异($P>0.05$)。见表1。



A:A 组;B:B 组;C:C 组

图 1　术后 24 h 大鼠肝脏组织病理变化　(HE×200)

表 1　各组大鼠不同时间点血清 ALT、AST 变化(U/L,$n=6$,$\bar{x}\pm s$)

组别	ALT	AST
A 组		
24 h	416.50±145.87^{c}	559.67±124.68^{c}
3 d	47.14±7.31^{bc}	74.50±5.17^{bc}
5 d	35.00±5.29	62.67±8.14
B 组		
24 h	902.33±107.21	1592.67±245.72
3 d	135.50±23.92^{b}	373.17±46.79^{b}
5 d	61.50±13.47	109.00±13.83^{a}
C 组		
24 h	612.83±130.18^{c}	1011.83±217.40^{c}
3 d	85.00±9.78^{b}	229.17±38.52^{b}
5 d	59.67±8.31	92.50±9.95
D 组		
24 h	41.00±1.41	65.50±3.54
3 d	37.50±2.12	60.50±2.12
5 d	32.50±3.50	60.00±2.80

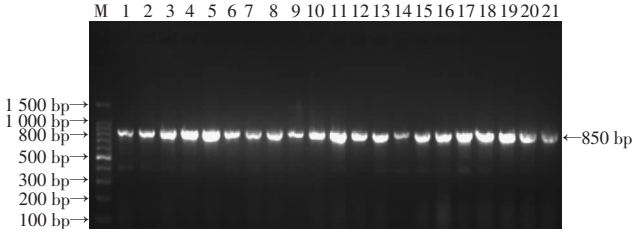
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与组内前一时间点比较;c:$P<0.01$,与 B 组比较

2.4　各组大鼠肝脏组织病理变化

A 组术后 24 h 肝小叶结构清晰,中央静脉周围肝细胞水肿变性明显,少许肝细胞空泡样变,未见坏死,汇管区少量炎性细胞浸润(图 1A);B 组术后 24 h 肝细胞大面积坏死,并且细胞形态消失,可见较多炎性细胞浸润(图 1B);C 组术后 24 h 见肝细胞部分坏死(图 1C,左上侧为坏死组织,右下侧为正常组织),但肝细胞索仍存在,并有炎性细胞浸润,较 B 组明显减轻;D 组为正常组织。

2.5　肝脏组织 mtDNA D-loop 区 PCR 产物扩增结果

各组大鼠肝脏组织 mtDNA D-loop 区 PCR 产物扩增于琼脂凝胶中电泳,均在 850 bp 左右出现大小清晰单一的条带(图 2)。

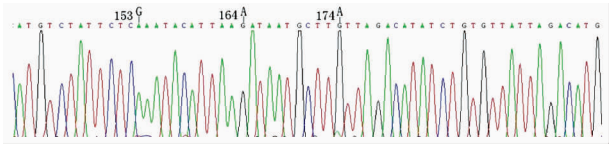


M:Marker;1~6:分别为术后 5 d A、B、C 3 组各 2 个条带;8~13:分别为术后 3 d A、B、C 3 组各 2 个条带;15~20:分别为术后 24 h A、B、C 3 组各 2 个条带;7、14、21:分别为 D 组术后 5、3 d、24 h 条带

图 2　各组大鼠肝脏组织 mtDNA D-loop 区 PCR 产物扩增凝胶成像结果

2.6　各组大鼠肝脏组织 mtDNA D-loop 区核苷酸突变情况

肝脏组织 mtDNA D-loop 区 PCR 扩增产物测序结果与NCBI GenBank 参考序列对比后共发现 62 个变异位点(部分图示见图 3),包括点突变、点缺失、插入及片段缺失,其中有 7 个位点 D 组与参考序列对比发现突变,我们考虑为 mtDNA D-loop 区的多态性,而其余与参考序列及 D 组对比所发现的突变我们考虑为 HIRI 所致,其中 B 组发现突变位点 54 个,突变率为 6.4%,A 组发现突变位点 31 个,突变率为 3.6%,与 B 组比较差异有统计学意义($\chi^2=6.551$,$P=0.01$),C 组发现突变位点 33 个,突变率为 3.9%,与 B 组比较差异有统计学意义($\chi^2=5.342$,$P=0.021$),见表 2。以上突变多为点突变,片段缺失主要发生在 B 组,且 B 组突变率明显高于 A、C 组。

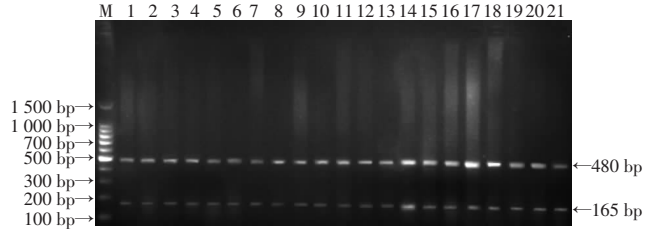


第 153、164 位点为多态性改变,174 位点为点突变

图 3　部分 mtDNA D-loop 区测序结果

2.7　肝脏组织线粒体 DNA 聚合酶 γ mRNA 表达量的变化

各组 RNA 提取以及 PCR 扩增产物电泳上样量都是相同的,排除了因上样量不同而造成的假阳性或假阴性。线粒体 DNA 聚合酶 γ mRNA 及 β-actin PCR 产物分别为 480 bp 和 165 bp(图 4),经 Quantity one 4.6 生物图像分析软件分析得出各条带面积光密度值,与其相应 β-actin 面积光密度比值做统计学分析。A、B、C 3 组肝脏组织线粒体 DNA 聚合酶 γ mRNA 表达量早期均升高(24 h),B 组升高最为显著($P<0.01$);术后 3 d 各组表达量仍较高,以 B 组为显著($P<0.01$),至术后 5 d A、B 组较前一时间点明显降低($P<0.01$,$P<0.05$),而 C 组在术后 24 h、3、5 d 均无明显差异($P>0.05$),见表 3。



M:marker;1~6:分别为术后 5 d A、B、C 3 组各 2 个条带;8~13:分别为术后 3 d A、B、C 3 组各 2 个条带;15~20:分别为术后 24 h A、B、C 3 组各 2 个条带;7、14、21:分别为 D 组术后 5、3 d、24 h 条带

图 4　RT-PCR 检测线粒体 DNA 聚合酶 γ mRNA 表达

表2 各组大鼠肝脏组织 mtDNA D-loop 区核苷酸突变情况

核苷酸位点	突变数(例)				GenBank	测序结果	变异性质
	A组	B组	C组	D组			
63		3			C	G	点突变
69	3	3			G	A	点突变
70	3	3			C	T/G	点突变
72		6			T	G	点突变
73		6			A	G/T	点突变
74		6			T	A	点突变
75	3	12	6		A	T/C/G	点突变
76	5	12	8		A	C/T/G	点突变
77		3			G	C/A	点突变
78	4	6	4		C	A/G	点突变
79	5	9	4		A	C/G/T	点突变
80	6	12	6		T	G/C/A	点突变
81－82		3			(－)	GT	插入
81	6	12	9		G	C/A	点突变
82	4	15	10		T	G/A	点突变
83	3	13	7		A	T/G	点突变
85		5	4		T	A	点突变
86	3	3	3		A	T	点突变
90		3			A	G	点突变
92	12	15	10		T	C	点突变
92－93		2			(－)	G	插入
93	6	6	3		T	C/G	点突变
94	6	7	6		A	T	点突变
94－95		1			(－)	TA	插入
116		3			A	T	点突变
118		3			C	G	点突变
121		3			A	G	点突变
123		2			C	(－)	缺失
131		4			T	G	点突变
134	*	*	*	*	T	C	多态性
153	*	*	*	*	G	A	多态性
156		3			T	A	点突变
160		4	1		T	C	点突变
161－167		1			TAAAATA	(－)	片段缺失
164	*	*	*	*	A	G	多态性
174	2	10	6		A	G	点突变
186		1			T	A	点突变
187	2	5	3		G	C	点突变
247	*	*	*	*	T	(－)	多态性
319	6	9	5		A	T	点突变
400	*	*	*	*	T	C	多态性
587	*	*	*	*	A	T	多态性
667－668		5	3		(－)	C	插入
678	2	9	6		C	(－)	缺失
846	*	*	*	*	T	C	多态性
857	1	1			C	T	点突变
874	4	8	4		C	T	点突变
883	12	12	9		A	T	点突变
884	3	3	2		T	C/A	点突变
885	9	9	6		T	A/G/C	点突变
885－886		2			TC	(－)	片段缺失
886	3	4	4		C	A	点突变
886－887		2			(－)	A	插入
887	7	9	8		C	A	点突变
888	2	3	3		A	C	点突变
888－889		1			(－)	T	插入
889	12	15	9		C	A/T	点突变
889－890	2	2	1		(－)	A/T	插入
891	8	9	8		T	C	点突变
893－894		1	1		(－)	A	插入
896	4	8	3		C	A	点突变
897		1	1		A	C	点突变
900	6	8	4		G	A	点突变

*:所有标本测序结果与 GenBank 均不一致;－:相对于 GenBank 或测序位点为核苷酸缺失

表3 各组大鼠术后不同时间肝脏组织线粒体 DNA 聚合酶γ mRNA 表达量的变化($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	24 h	3 d	5 d
A组	3.16 ± 0.19^{c}	2.91 ± 0.09^{c}	1.98 ± 0.08^{ac}
B组	3.80 ± 0.14	3.37 ± 0.10	3.02 ± 0.15^{b}
C组	2.43 ± 0.14^{c}	2.39 ± 0.17^{c}	2.36 ± 0.21^{d}
D组	1.66 ± 0.07	1.51 ± 0.07	1.82 ± 0.10

a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与组内前一时间点比较;c:$P<0.01$,d:$P<0.05$,与B组比较

3 讨论

肝脏缺血再灌注损伤的机制尚未完全明了,线粒体功能受损、能量代谢障碍被认为是重要原因之一[3-4]。线粒体是一个结构和功能复杂而敏感的重要细胞器,在细胞能量代谢中起重要作用。缺血缺氧可引起线粒体结构和功能异常,而线粒体异常往往会引起其他细胞器和整个细胞的变化,同时,在 HIRI 中活性氧(reactive oxygen species,ROS)的产生可通过氧化修饰和核酸内切酶介导的 DNA 片段化引起 DNA 损伤,而 mtDNA 比核 DNA 更容易发生突变,它的损伤直接影响细胞的能量代谢过程,导致 ATP 生成减少,进而加剧细胞损伤[1,4]。目前国内外对 HIRI 从基因水平的研究甚少,本研究从调控能量代谢的线粒体 DNA 入手,探讨了肝缺血再灌注损伤中线粒体 DNA 的损伤和修复机制及雷帕霉素的干预作用。

mtDNA 其仅有的非编码区或控制区被称作 D-loop 区,大鼠 mtDNA D-loop 区长度为 901 bp,包含复制和翻译的重要遗传信息,其含有复制的起始位点和转录的启动子,对 mtDNA 复制和转录具有调控作用[5],mtDNA D-loop 区的突变可能会影响 mtDNA 的复制速度,从而改变其拷贝数,且该片段存在较高的突变率,是 mtDNA 突变的热点区域[6],因此我们选择 D-loop 区作为我们研究的突变位点。本实验中,HIRI 早期,在长度为 850 bp 的测序长度中,共发现 62 个变异位点,且每例大鼠均出现变异,反映了线粒体 DNA D-loop 的高度突变性,对缺血缺氧的耐受性差,随着肝脏血流阻断时间的延长,突变率明显升高,并且血清 ALT、AST 明显升高,光镜肝组织细胞形态学观察显示肝组织损伤较重,表明在 HIRI 早期肝细胞线粒体 DNA D-loop 损伤,并发生突变,可能导致 mtDNA 复制和转录的异常,随之相应的线粒体呼吸链蛋白表达异常,致使肝组织受损。

在线粒体 DNA 损伤修复机制中,碱基切除修复(BER)起主要作用,线粒体 DNA 聚合酶γ是迄今为止唯一被证实存在于脊椎动物线粒体的 DNA 聚合酶,对 mtDNA 的复制、合成与修复起着独一无二的作用[7]。线粒体 DNA 的复制过程由 DNA 聚合酶γ催化,一旦 DNA 聚合酶γ的结构发生变化,线粒体 DNA 的复制将受到影响;在其修复过程 BER 途径中,被氧化或损

伤的碱基由一种特定的脱嘌呤嘧啶核酸内切酶切割此位点5'的磷酸二酯主链,形成一段悬浮的脱氧核糖核酸片段,由DNA聚合酶γ来填充这一个碱基空隙,并由DNA连接酶封闭缺口,完成修复[8]。本实验中各组实验动物线粒体DNA聚合酶γ mRNA表达在再灌注早期升高,表达强度与肝脏受损相一致,表明线粒体DNA聚合酶γ在线粒体受损早期即以启动修复,随着线粒体DNA的修复,肝功能及肝脏组织结构逐渐恢复正常,线粒体DNA聚合酶γ mRNA表达也随之降低。另外,尽管B组术后早期(24 h)线粒体DNA聚合酶γ mRNA表达明显增高,但可能由于线粒体内存在较高浓度的ROS,影响线粒体DNA聚合酶γ活性。并且近年来的研究表明,mtDNA修复酶的过高表达亦会引起恶性病理变化[9],线粒体DNA聚合酶γ的过度升高,可能会打破线粒体DNA修复系统的动态平衡,更加加重DNA的损伤,这就可以解释为何B组线粒体DNA聚合酶γmRNA表达高,而大鼠肝功能损害重这一现象。

雷帕霉素最初是从吸水链霉菌中分离出来作为抗真菌药物,其可通过抑制细胞周期G_0期和G_1期,阻断G_1进入S期而发挥作用,从而抑制淋巴细胞的增殖[10],最新研究表明线粒体是雷帕霉素的靶点,对线粒体有保护作用[11],Villa-Cuesta等[12]研究发现雷帕霉素可以通过提高缺氧线粒体的琥珀酸脱氢酶的活性和降低过氧化氢的产生从而增强线粒体的呼吸作用,Pan等[13]应用雷帕霉素预处理的方法,可以减轻乳胞素引起的细胞变性凋亡,亦可减轻线粒体损伤。Dai等[14]研究发现雷帕霉素可以治疗线粒体DNA突变的相关疾病。

本实验研究发现,雷帕霉素治疗组(C组)突变率明显下降,肝脏病理损害明显减轻,大鼠肝生存率高于B组,表明雷帕霉素能够减轻肝脏缺血再灌注损伤。其机制可能是雷帕霉素降低线粒体DNA的突变;增强线粒体的呼吸作用,利于细胞对缺氧环境的适应;另外亦可增强细胞自噬,为细胞修复及能量系统重建提供能量和原材料,促进受损细胞的恢复。另外,C组术后各个时间点线粒体DNA聚合酶γ mRNA表达量均有所升高,说明大鼠肝脏缺血再灌注损伤后,mtDNA的碱基脱落、断裂、减少直接导致线粒体DNA聚合酶γ的表达增加,修复受损的DNA片段。但C组线粒体DNA聚合酶γ mRNA表达量较B组为低,且术后各时间点其表达量均维持在同一水平,表明雷帕霉素可以抑制HIRI中线粒体DNA聚合酶γ mRNA的过度表达,更利于修复受损的mtDNA;且可通过减少DNA突变,降低线粒体DNA聚合酶γ mRNA的表达,通过这2种机制维持线粒体的正常功能,从而减轻肝脏的缺血再灌注损伤,为DNA聚合酶γ奠定良好的修复环境。

综上所述,肝脏缺血再灌注过程中mtDNA出现基因突变和缺失,导致呼吸链功能异常,继而线粒体能量代谢障碍,肝功能损害。DNA聚合酶γ是线粒体DNA修复的关键因子,线粒体DNA聚合酶γ mRNA的表达与线粒体DNA损伤程度相一致。雷帕霉素对肝脏缺血再灌注损伤有保护作用,其机制可能是:通过增强细胞在缺氧环境下的适应能力,抑制淋巴细胞增殖,减轻肝脏炎症反应,减少mtDNA碱基的损伤,降低DNA突变率,维持线粒体的功能;同时雷帕霉素还能抑制线粒体DNA聚合酶γ过度升高所致的进一步病理损害,从而改善HIRI后肝脏的能量代谢,维持mtDNA复制、翻译、转录的稳定进行,对HIRI后肝功能的恢复有积极作用。

参考文献:

[1] 张莹, 别平, 石承先. 线粒体ATP酶6、8基因及编码蛋白表达改变对移植肝脏能量代谢的影响[J]. 中华医学杂志, 2010, 90(10): 708-711.
[2] Pannen B H, Al-Adili F, Bauer M, *et al*. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat[J]. Hepatology, 1998, 27(3): 755-764.
[3] 冷玉芳, 胡文胜, 顾俊明, 等. 缺血后处理对大鼠肝缺血再灌注时肝细胞线粒体损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2009, 29(4): 356-358.
[4] 张莹, 范伟, 张玉, 等. 移植肝冷保存-再灌注过程中线粒体Ⅴ复合体蛋白表达与肝细胞凋亡的关系[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(12): 1247-1249.
[5] 马佳, 陈治文, 梅传忠, 等. 淋巴瘤组织中线粒体DNA突变的研究[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2010, 39(2): 202-206, 211.
[6] Guo W, Yang D, Xu H, *et al*. Mutations in the D-loop region and increased copy number of mitochondrial DNA in human laryngeal squamous cell carcinoma[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(1): 13-20.
[7] Holt I J, Reyes A. Human mitochondrial DNA replication[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012, 4(12): a012971.
[8] 丁一宗, 李稻. DNA聚合酶γ基因突变研究进展[J]. 医学综述, 2012, 18(3): 344-347.
[9] 侯伊玲, 薄海, 刘子泉, 等. 白藜芦醇下调线粒体DNA修复酶对重症急性胰腺炎大鼠胰腺腺泡细胞凋亡的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(28): 2892-2898.
[10] 陈广顺, 司中洲, 李杰群, 等. 雷帕霉素对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2014, 35(1): 85-88.
[11] McCormick M A, Tsai S Y, Kennedy B K. TOR and ageing: a complex pathway for a complex process[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2011, 366(1561): 17-27.
[12] Villa-Cuesta E, Holmbeck M A, Rand D M. Rapamycin increases mitochondrial efficiency by mtDNA-dependent reprogramming of mitochondrial metabolism in Drosophila[J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 10): 2282-2290.
[13] Pan T, Rawal P, Wu Y, *et al*. Rapamycin protects against rotenone-induced apoptosis through autophagy induction[J]. Neuroscience, 2009, 164(2): 541-551.
[14] Dai Y, Zheng K, Clark J, *et al*. Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA mutation[J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(3): 637-647.

(**收稿**:2014-06-02;**修回**:2014-09-17)
(编辑 邓强庭)