DOI:10.16016/j.1000-5404.201512050

白藜芦醇在缺氧/复氧诱导的肝细胞损伤中的保护作用及与 TLR4/NF-κB 通路的关系

何 雕,张国庆,郑道峰,魏续福,刘 锐,吴忠均 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院肝胆外科)

[摘要] **目的** 探讨白藜芦醇(resveratrol,RES)在缺氧/复氧(hypoxia reoxygenation,H/R)诱导的大鼠肝细胞损伤中的保护作用及其相关分子机制。**方法** 建立 BRL-3A 细胞(大鼠肝细胞株)H/R 模型。建模前分别用 RES 和 TLR4 抑制剂(HTA125)预处理细胞。建模完成后,检测细胞存活率及细胞凋亡,观察细胞形态变化,检测细胞培养液中谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)及炎症因子含量,检测细胞 TLR4、NF-κB p65 基因 mRNA 及蛋白水平表达及 NF-κB p65 入核情况。**结果** H/R 条件使细胞存活率明显降低,细胞凋亡率增加($P<0.01$),受损细胞明显增多,ALT、IL-1β 含量增多($P<0.01$),TLR4 和 NF-κB p65 表达水平显著提高($P<0.01$),p65 入核细胞比例提高($P<0.01$)。经 RES 及 HTA125 预处理后,细胞存活率显著提高,细胞凋亡比例显著缩小($P<0.01$),受损细胞减少,ALT、IL-1β 含量降低($P<0.01$),TLR4 和 NF-κB p65 表达水平明显降低($P<0.01$),p65 入核细胞比例下降($P<0.01$)。**结论** RES 可以减轻 H/R 诱导的 BRL-3A 肝细胞损伤,该作用可能与抑制 TLR4/NF-κB 信号通路有关。

[关键词] 白藜芦醇;缺氧/复氧;肝细胞损伤;Toll 样受体 4;核因子-κB
[中图法分类号] R285.5; R322.47; R364.4 [文献标志码] A

Resveratrol protects hepatocytes against hypoxia/reoxygenation injury and its relationship with TLR4/NF-κB pathway

He Diao, Zhang Guoqing, Zheng Daofeng, Wei Xufu, Liu Rui, Wu Zhongjun (Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the protective effect of resveratrol (RES) on hepatocytes induced by hypoxia/reoxygenation (H/R) and investigate the molecular mechanism. **Methods** Before H/R model was established, BRL-3A cells were treated with RES or HTA125 (TLR4 inhibitor). Survival rate and apoptosis were detected in the cells. Alanine transaminase (ALT) and interleukin-1β (IL-1β) in the culture were determined. The mRNA and protein expression levels of TLR4 and NF-κB p65 in the cells were determined by quantitative real-time PCR and Western blotting. **Results** H/R stimulation decreased cell survival rate and enhanced the apoptosis ($P<0.01$). The expression levels of ALT and IL-1β were enhanced significantly ($P<0.01$), and the expression levels of TLR4 and NF-κB p65 were markedly increased ($P<0.01$). After pretreatment with RES or HTA125, the cell survival rate was increased ($P<0.01$) while the apoptosis decreased ($P<0.01$). ALT and IL-1β were reduced significantly ($P<0.01$), and the expression levels of TLR4 and NF-κB p65 were decreased ($P<0.01$). Moreover, RES inhibited the translocation of NF-κB p65 after H/R stimulation in BRL-3A cells ($P<0.01$). **Conclusion** RES can alleviate the hepatocyte injury induced by H/R, which may be related with inhibition of TLR4/NF-κB signaling pathway.

[**Key words**] resveratrol; hypoxia/reoxygenation; hepatocyte injury; toll-like receptor 4; nuclear factor-κB

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81171562) and the Project of Scientific and Technological Talent Cultivation Plan of Chongqing Science and Technology Commission (CSTC2013kjrc-qnrc10006). Corresponding author: Wu Zhongjun, E-mail: wzjtcy@126.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81171562);重庆市科委科技人才培养计划(CSTC2013kjrc-qnrc10006)
[通信作者] 吴忠均,E-mail:wzjtcy@126.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160304.1011.005.html(2016-03-04)

肝脏缺血再灌注损伤(hepatic ischemia reperfusion injury,HIRI)是指各种原因导致的肝血流中断或不足使肝缺血一段时间,在重新恢复肝脏血供之后肝功能不仅得不到恢复,反而进一步加重的现象。在 HIRI 过

程中,炎症反应的产生是其中一个重要因素[1-2]。研究报道 TLR4(Toll-like receptor4)/NF-κB(nuclear factor-κB)信号通路是细胞内重要的炎症信号通路,在诱导细胞产生炎症反应、释放炎症因子过程中发挥重要作用,阻断细胞 TLR4/NF-κB 信号通路的传导能够有效抑制细胞炎症反应的发生[3]。白藜芦醇(resveratrol,RES)是植物体内一种天然的多酚类化合物质,广泛存在于葡萄籽、虎杖等植物中[4]。因为其具有抗癌、抗氧化损伤和抗炎等作用[5],被称为植物抗毒素并受到广泛关注。但目前少见 RES 在肝脏保护方面的报道。Wang 等[6]提出缺氧/复氧(hypoxia reoxygenation,H/R)处理对肝细胞造成的损伤是肝缺血再灌注损伤的有效体外实验模型。本实验建立 BRL-3A 细胞 H/R 损伤模型,探讨 RES 是否在 H/R 状态下对 BRL-3A 细胞发挥保护作用,以及这种保护作用与 TLR4/NF-κB 信号通路之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和药品

BRL-3A 肝细胞株购于中国科学院细胞库;RES(纯度 >98%),DMSO 试剂购于美国 Sigma 公司;CCK-8 试剂购自日本同仁化学研究所;谷丙转氨酶(Alanine transaminase, ALT)试剂盒购于南京建成生物工程研究所;Annexin V-PE 细胞凋亡试剂盒购于凯基生物公司;ELISA 试剂盒购自深圳欣博盛生物科技有限公司;TRIzol、PrimeScript RT Reagent Kit 及 SYBP Premix *Ex Taq* 试剂购于 TaKaRa-宝生物工程(大连)有限公司;RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、ECL 发光液、免疫荧光染色试剂盒及抗荧光淬灭封片液购于碧云天生物研究所;小鼠抗大鼠 TLR4 抗体及 TLR4 抑制剂(HTA125)购于英国 Abcam 公司;兔抗大鼠 NF-κB 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 细胞培养及药物配置

BRL-3A 细胞株培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中。RES 溶于 DMSO 中配制成母液,于 -20 ℃避光保存,使用时用 DMEM/F12 培养液将母液稀释到相应浓度(确保 DMSO 含量 <0.1%),将 HTA125 稀释至 10 μg/mL。

1.3 实验分组及 H/R 模型

①空白对照组:不接受任何处理;②RES 实验组(RES):加入 RES 并在正常培养箱中培养;③H/R 模型组(H/R):接受 H/R 处理;④RES 处理组(H/R + RES):在接受 H/R 处理 2 h 前加入与 RES 组等量的 RES;⑤TLR4 抑制剂处理组(H/R + HTA125):在接受 H/R 处理 2 h 前加入 10 μg/mL HTA125。H/R 模型建立:待传代细胞生长 24 h 后进行细胞换液,加入不含血清培养基,将细胞置于三气培养箱(1% O_2,5% CO_2,94% N_2)中缺氧培养 12 h,经缺氧处理后将细胞移至正常培养箱(95% 空气,5% CO_2)中复氧 4 h。

1.4 CCK-8 检测细胞存活率

将细胞接种于 3 块 96 孔板(标记为 1、2、3 号板),每孔中接种 5×10^3 个细胞。1、2 号板分别设置空白组、5 μmol/L RES 组、10 μmol/L RES 组、20 μmol/L RES 组;3 号板设置空白组、10 μg/L HTA125 组;每组各设 3 个平行孔,同时设除零组(只加入培养基,不接种细胞,以消除培养基对光密度影响)。待细胞生长 24 h 后换液,1 号板每孔分别加入含对应浓度 RES 的培养基 100 μL;2 号板每孔分别加入含对应浓度 RES 但不含血清的细胞培养基;3 号板每孔加入含 HTA125 但不含血清的培养基。2 h 后,将 2、3 号板置于三气培养箱中缺氧 12 h,再移至正常培养箱中复氧 4 h,1 号板则一直在正常培养箱中培养。4 h 后 3 块板每孔分别加入 10 μL CCK-8 试剂,继续在正常培养箱中培养 2 h,酶标仪检测 450 nm 波长下光密度值[D(450)]。按以下公式计算细胞存活率,以 1 号板空白组作为对照组,其他各组皆作为实验组。细胞存活率 = [D(450)实验组 - D(450)除零组]/[D(450)空白组 - D(450)除零组] ×100%。

1.5 细胞 HE 染色

将细胞消化离心后(800 r/min,5 min),用培养基调整细胞数为 1×10^5/mL,滴加于盖玻片上,放入正常培养箱中培养,待细胞生长 24 h 后建模,取出细胞爬片,PBS 洗涤 3 次。样品固定:4% 多聚甲醛固定 30 min,后 PBS 洗涤 2 次;染核:苏木精染色 15 min,双蒸水洗涤 2 次;染细胞质:伊红染色 5 min,双蒸水洗涤 2 次。晾干爬片,中性树胶封片,显微镜下观察细胞形态。

1.6 检测 ALT 活力

取经建模处理后各组细胞上清液,测定 ALT 活力。操作按照 ALT 检测试剂盒说明书进行。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

用 0.25% 胰酶将经建模处理后的各组细胞消化,800 r/min 离心 5 min 后收集细胞,按 Annexin V-PE 细胞凋亡试剂盒说明书操作,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.8 实时荧光定量 PCR 检测 mRNA 表达

采用 TRIzol 法提取细胞总 RNA,并用 PrimeScript RT Reagent Kit 试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA。反转录条件:42 ℃孵育 30 min,95 ℃灭活 3 min。取反转录合成的 cDNA 进行荧光定量 PCR,检测 TLR4 及 NF-κB 的 mRNA 表达水平,并以 GAPDH 作为内参。TLR4 引物序列(140 bp):上游 5′-GGAGTACAAAACTCTG-CGCC-3′,下游 5′-ACTTCCTTGTGCCCTGTGAG-3′;NF-κB-p65 引物序列(135 bp):上游 5′-CATACGCTG-ACCCTAGCCTG-3′,下游 5′-TTTCTTCAATCCGGTGG-

CGA-3′;GAPDH 引物序列(252 bp):上游 5′-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3′,下游 5′-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3′。PCR 反应体系:SYBR green 5 μL、上下游引物各 0.3 μL、cDNA 1 μL、Nase-free H_2O 3.4 μL;反应条件:95 ℃预变性 5 min,95 ℃变性 30 s,59 ℃退火 30 s(TLR4,NF-κB)/57 ℃退火 30 s(GAPDH),72 ℃延伸 1 min,反应 40 个循环。循环结束后,72 ℃延伸 5 min。

1.9 Western blot 法检测蛋白表达

按照 RIPA 试剂盒说明书提取处理后各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。每孔上样 50 μg,按浓缩胶 80 V、分离胶 100 V 电压下分离,再用 250 mA 恒流将凝胶上的蛋白湿转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,分别加入小鼠抗大鼠 TLR4 抗体(1∶1 000)、兔抗大鼠 NF-κB 抗体、小鼠抗大鼠 β-actin 抗体(1∶1 000),4 ℃孵育过夜;次日用 TBST 充分洗膜后,加入辣根过氧化物标记的羊抗小鼠 IgG(1∶5 000)、山羊抗兔 IgG(1∶5 000),室温孵育 1 h。ECL 显色,曝光显影,行灰度值扫描分析。

1.10 免疫荧光检测 NF-κB p65 核转录

细胞爬片及建模处理同 1.5,将处理后的各组细胞按照标准免疫荧光染色步骤进行固定、穿透、封闭、抗体孵育、DAPI 染核及封片[7]。NF-κB 抗体稀释浓度为(1∶50),荧光二抗稀释浓度为(1∶100),荧光显微镜下观察 p65 入核情况。

1.11 ELISA 法检测 IL-1β 含量

取经建模处理后的各组细胞上清液,采用 ELISA 技术检测 IL-1β 含量,操作过程按照 ELISA 试剂盒说明书进行。每组标本设置 3 个平行孔,结果取平均值。

1.12 统计学分析

实验至少重复 3 次,采用 SPSS 17.0 统计软件及 Graphpad prism 5.0,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD-t 法。

2 结果

2.1 CCK-8 实验

在 1 号板中,空白组、5 μmol/L RES 组、10 μmol/L RES 组及 20 μmol/L RES 组存活率比较差异无统计学意义($F=0.958$,$P=0.436$),说明 RES 浓度为 5、10、20 μmol/L 时对细胞的存活率没有明显影响。在 2 号板中,5 μmol/L RES 组与空白组相比存活率有提升($P=0.045$),10、20 μmol/L 组存活率均较空白组有显著提升($P<0.01$),且细胞存活率在 RES 浓度为 20 μmol/L 时达到最高(表 1)。因此,我们选取 20 μmol/L RES 进行后续实验。

在 3 号板中,空白组细胞存活率(60.44 ± 5.56)% 相对于对照组(100.00 ± 0.00)% 明显降低($P<0.01$),但应用 HTA125 预处理细胞后,细胞存活率显著升高[(81.65 ± 7.68)%,$P<0.01$]。

表 1 不同浓度 RES 对 BRL-3A 细胞存活率的影响

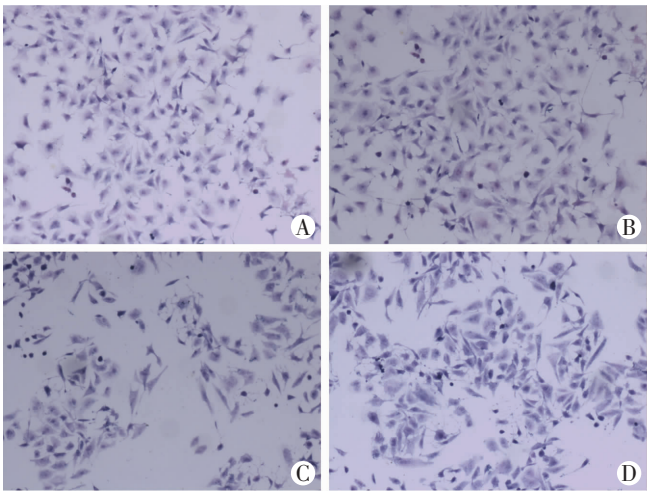
($n=5$,$\bar{x} \pm s$,%)

组别	正常培养	H/R 培养
空白组	100.00 ± 0.00	57.59 ± 5.29
5 μmol/L RES 组	100.60 ± 3.13	67.92 ± 6.71[a]
10 μmol/L RES 组	101.50 ± 3.09	73.12 ± 8.24[b]
20 μmol/L RES 组	98.84 ± 2.44	78.79 ± 8.21[b]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与空白组比较

2.2 HE 染色观察细胞形态学变化

显微镜下观察,空白组与 RES 组细胞生长状态良好,形状规则,呈梭形或多角形。与空白组细胞相比,H/R 组细胞胞体缩小、皱缩,呈不规则状;细胞核固缩、碎裂,培养液中有较多的细胞碎片。与 H/R 组细胞相比,H/R + RES 组细胞形态较规则,受损细胞明显减少。见图 1。



A:空白组;B:RES 组;C:H/R 组;D:H/R + RES 组

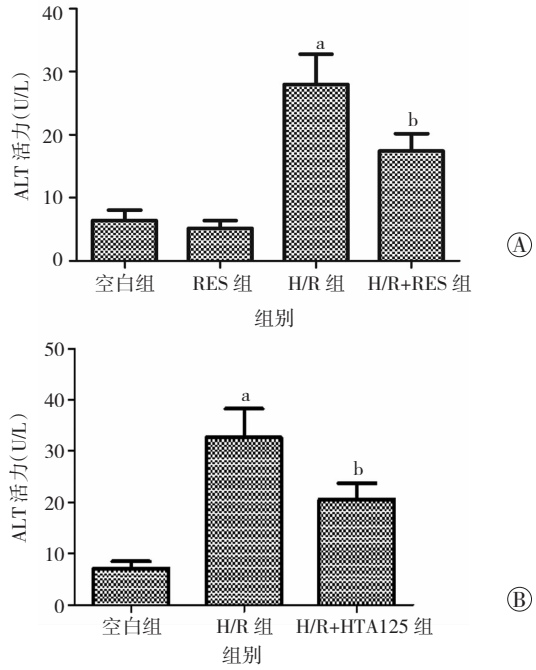
图 1 显微镜观察各组 BRL-3A 细胞形态学变化 (HE ×100)

2.3 ALT 活力检测

RES 预处理,H/R 组 ALT 活力较空白组明显升高($P<0.01$);与 H/R 组相比,H/R + RES 组 ALT 活力显著降低($P=0.002$,图 2A)。HTA125 预处理,H/R 组 ALT 活力较空白组明显升高($P<0.01$);与 H/R 组相比,H/R + HTA125 组 ALT 活力显著降低($P=0.008$,图 2B)。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

空白组、RES 组、H/R 组、H/R + RES 组细胞凋亡率分别为(6.53 ± 1.07)%、(7.64 ± 1.26)%、(37.25 ± 5.21)%、(22.49 ± 4.87)%。H/R 组细胞凋亡率较空白组明显升高($P<0.01$);与 H/R 组相比,H/R + RES 组细胞凋亡率显著降低($P=0.001$,图 3)。



A:RES 预处理;B:HTA125 预处理　a: $P<0.01$,与空白组比较;b: $P<0.01$,与 H/R 组比较

图 2　RES 和 HTA125 对细胞 ALT 活力的影响

2.5　实时荧光定量 PCR 检测

H/R 组 TLR4、NF-κB-p65 mRNA 表达水平均较空白组升高($P<0.01$);与 H/R 组相比,H/R + RES 组 TLR4、NF-κB-p65 mRNA 表达水平均显著降低($P=0.001$,表 2)。

表 2　RES 对 TLR4、NF-κB mRNA 表达的影响($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

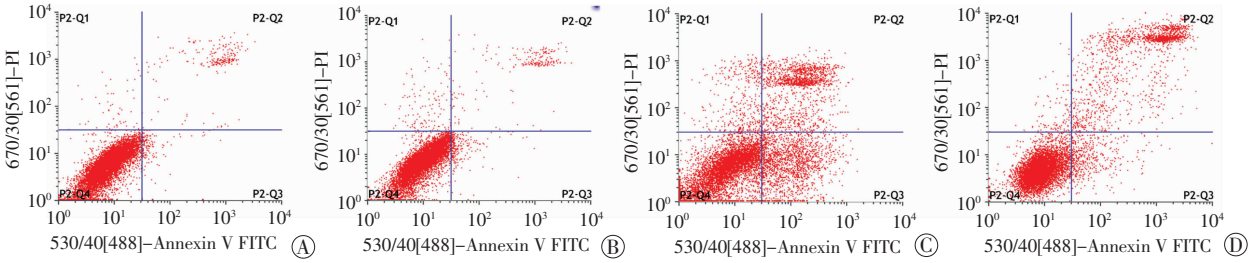
组别	TLR4 mRNA	NF-κB-p65 mRNA
空白组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
RES 组	1.067 ± 0.037	1.050 ± 0.037
H/R 组	1.870 ± 0.149[a]	1.924 ± 0.173[a]
H/R + RES 组	1.483 ± 0.103[b]	1.477 ± 0.125[b]

a: $P<0.01$,与空白组比较;b: $P<0.01$,与 H/R 组比较

2.6　Western blot 检测

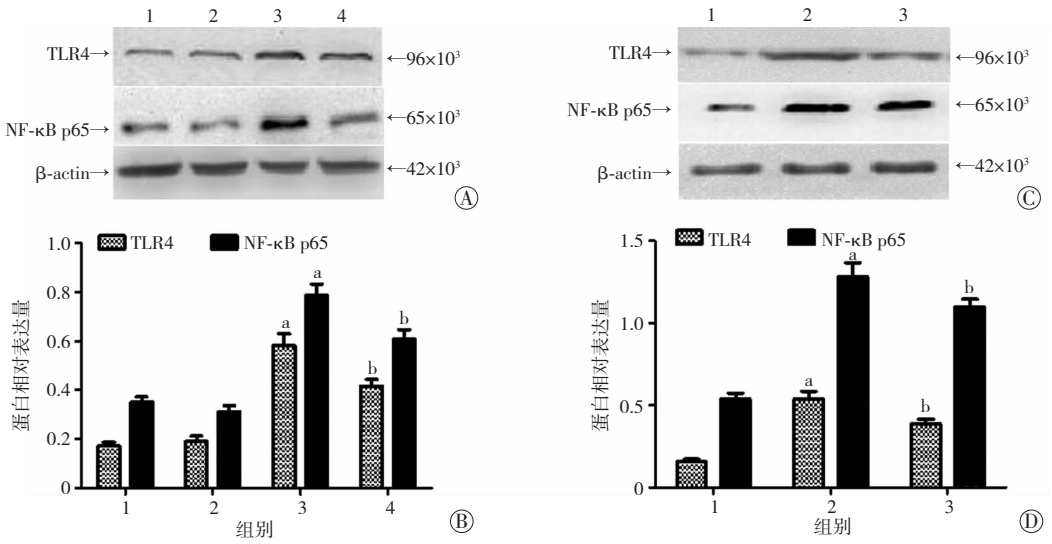
RES 预处理,H/R 组 TLR4、NF-κB-p65 蛋白表达水平均较空白组升高($P<0.01$);与 H/R 组相比,H/R + RES 组 TLR4、NF-κB-p65 蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$,图 4A、B)。

HTA125 预处理,H/R 组 TLR4、NF-κB-p65 蛋白表达水平均较空白组升高($P<0.01$);与 H/R 组相比,H/R + HTA125 组 TLR4、NF-κB-p65 蛋白表达水平均显著降低($P=0.001$,图 4C、D)。



A:空白组;B:RES 组;C:H/R 组;D:H/R + RES 组

图 3　流式细胞术检测各组细胞凋亡情况



A、B:RES 预处理的 Western blot 检测及半定量分析　1:空白组,2:RES 组,3:H/R 组,4:H/R + RES 组;C、D:HTA125 预处理的 Western blot 检测及半定量分析　1:空白组,2:H/R 组,3:H/R + HTA125 组;a: $P<0.01$,与空白组比较;b: $P<0.01$,与 H/R 组比较

图 4　Western blot 检测 TLR4、NF-κB 蛋白的表达

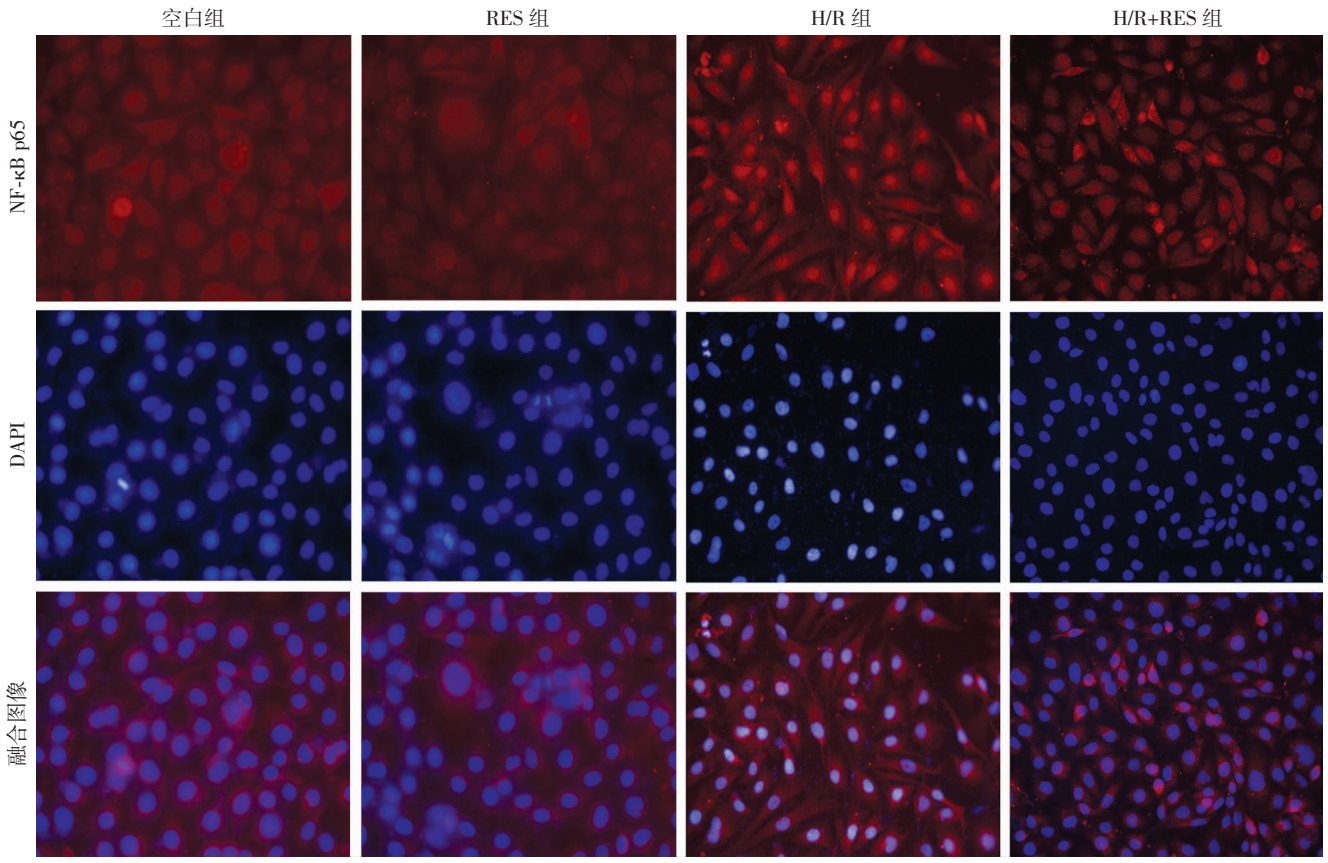


图 5 免疫荧光检测 NF-κB p65 入核情况 (×400)

2.7 免疫荧光检测

荧光显微镜观察空白组、RES 组、H/R 组、H/R + RES 组 p65 入核细胞比例分别为(9.44 ± 2.25)%、(9.18 ± 2.38)%、(89.55 ± 6.40)%、(44.60 ± 4.29)%。H/R 组 p65 入核比例较空白组急剧升高($P<0.01$);与 H/R 组相比,H/R + RES 组入核细胞比例显著降低($P<0.01$,图 5)。

2.8 ELISA 检测

H/R 组(201.10 ± 30.01) pg/mL IL-1β 含量显著高于空白组[(52.85 ± 8.81) pg/mL, $P<0.01$];与 H/R 组细胞相比,H/R + RES 组 IL-1β 含量明显降低[(134.80 ± 16.94) pg/mL, $P=0.002$]。

3 讨论

HIRI 是目前复杂肝切除术、肝移植术等临床手术中经常涉及到的病理生理过程,也是引起术后肝功能恶化甚至丧失肝功能的重要原因[8-9]。研究表明 HIRI 的发生可能与钙超载线粒体通透转换孔道、氧化应激反应、炎症反应、一氧化氮等有关[2]。作为肝脏复杂手术中不能避免的问题,如何进一步了解 HIRI 机制,以及运用合适的方法来防治 HIRI 仍然是研究的热点。由于 RES 具有抗炎和抗氧化损伤等作用,其对心脏缺血再灌注损伤的保护已有报道[10],而 RES 对 HIRI 的保护作用在国内却鲜见报道,所以本实验以 H/R 处理 BRL-3A 细胞模拟肝脏缺血再灌注模型,着重从抑制炎症反应方面探讨 RES 对 HIRI 的影响及其潜在的分子机制。本研究发现:①当 RES 浓度为 5、10、20 μmol/L 时,对 BRL-3A 细胞造成的毒性作用可以忽略不计;②RES 和 TLR4 抑制剂都能够缓解 H/R 诱导的细胞损伤及凋亡;③RES 能下调由 H/R 诱导造成的细胞 TLR4、NF-κB p65 mRNA 及蛋白水平的表达;④RES 能抑制 NF-κB p65 入核;⑤RES 能够减少由 H/R 诱导的炎症因子(IL-1β)的释放。本实验证明 RES 能够通过抑制 H/R 诱导的 BRL-3A 细胞炎症反应从而发挥对细胞的保护作用,而这种保护作用可能与抑制 TLR4/NF-κB 信号通路的传导有关。

细胞存活率和 ALT 活力通常被看作细胞损伤指标。本研究发现,在 H/R 状态下 BRL-3A 细胞的存活率显著降低及细胞上清液中 ALT 活力明显提高,提示 BRL-3A 细胞受到了严重损伤。但是 RES(5、10、20 μmol/L)和 HTA125(10 μg/mL)能够显著提高 H/R 状态下 BRL-3A 细胞的存活率及降低细胞上清液中 ALT 活力,提示 RES 可能对 BRL-3A 细胞产生保护作用。

本研究还发现,TLR4 和 NF-κB p65 在 H/R 模型

中的表达上调,而 RES 和 HTA125 能够抑制 H/R 诱导的 TLR4 和 NF-κB p65 过表达。已有研究证明,TLR4 在肝缺血再灌注过程中表达上调,从而激活下游信号通路,进而引起一系列连锁反应[11],而在由 TLR4 调控的细胞炎症反应相关的信号通路中,NF-κB 又是其中一个重要的转录因子[12-13]。本研究发现,在 H/R 诱导的 TLR4 过表达状态下,NF-κB 也表达上调,且促进 p65 入核,进而 IL-1β 分泌增多;应用了 RES 及 HTA125 之后,由 H/R 诱导的 BRL-3A 细胞 TLR4、NF-κB 的表达都明显下降,p65 入核细胞比例下降。综合以上结果说明,TLR4/NF-κB 通路可能在缺氧/复氧诱导的肝细胞损伤中发挥重要作用,而 RES 很可能是通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路的传导来抑制炎症反应的发展,从而发挥对细胞的保护作用。

TLR4 信号通路由 MyD88 依赖途径、MyD88 非依赖途径或两者共同传导来激活 NF-κB,进而刺激炎症因子的释放。NF-κB 在静息状态下与其抑制性蛋白(IκB)以三聚体的形式结合,此时 NF-κB 功能被抑制并以失活状态存在于细胞质中。在接到上游信号分子的刺激之后,IκB 激酶(IKK)复合体诱导 IκB 磷酸化,使其变性降解,因此 IκB 对 NF-κB 的抑制作用减弱甚至消失,NF-κB 逐渐活化并向细胞核移位,从而调控炎症因子的释放[14]。本实验证明 RES 能降低 TLR4、NF-κB 的表达,并抑制 p65 入核,其作用机制可能是抑制 TLR4 的活化或者降低 IKK 复合体的活性,使其不能诱导 IκB 磷酸化,那么 NF-κB 仍以失活状态存在于细胞质,不能入核参与炎症因子的表达。

综上所述,我们建议将 RES 的应用作为防治 HIRI 的新策略。在后续的实验中,我们也将继续增加动物实验,以探究 RES 在治疗 HIRI 过程中的确切机制以及其他潜在的保护作用。

参考文献:

[1] Zhai Y, Busuttil R W, Kupiec-Weglinski J W. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation[J]. Am J Transplant, 2011, 11(8): 1563-1569. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03579.x

[2] 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. DOI: 10.4240/wjgs.v6.i7.122

[3] Hassan-Khabbar S, Vamy M, Cottart C H, *et al*. Protective effect of post-ischemic treatment with trans-resveratrol on cytokine production and neutrophil recruitment by rat liver[J]. Biochimie, 2010, 92(4): 405-410. DOI: 10.1016/j.biochi.2009.12.009

[4] 安梅, 周瑾, 陈晓宇. 白藜芦醇药理学作用的研究进展[J]. 肿瘤医学, 2014, 4(4): 242-246. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1264.2014.049

[5] Pangeni R, Sahni J K, Ali J A, *et al*. Resveratrol: review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery[J]. Expert Opin Drug Deliv, 2014, 11(8): 1285-1298. DOI: 10.1517/17425247.2014.919253

[6] Wang R, Huang F, Chen Z, *et al*. Downregulation of connexin 32 attenuates hypoxia/reoxygenation injury in liver cells[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2015, 29(4): 189-197. DOI: 10.1002/jbt.21684

[7] 李胜君, 李梦文, 张燕, 等. 反式激活蛋白-NEMO 结合域抑制胆红素诱导的大鼠皮层星形胶质细胞 NF-κB 活化[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(21): 2131-2136. DOI:10.16016/j.1000-5404.201503068

[8] Karatzas T, Neri A A, Baibaki M E, *et al*. Rodent models of hepatic ischemia-reperfusion injury: time and percentage-related pathophysiological mechanisms[J]. J Surg Res, 2014, 191(2): 399-412. DOI: 10.1016/j.jss.2014.06.024

[9] 麻勇,汪大伟,刘连新,等.小鼠肝脏部分缺血再灌注损伤模型的建立[J].中华消化外科杂志,2013,12(9):703-708. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2013.09.015

[10] Zhang C, Lin G, Wan W, *et al*. Resveratrol, a polyphenol phytoalexin, protects cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury *via* the TLR4/NF-κB signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2012, 29(4): 557-563. DOI: 10.3892/ijmm.2012.885

[11] Zhai D, Zhang J, Zheng Q, *et al*. Significance of rosiglitazone inhibiting TLR4 expression in partial hepatic ischemia/reperfusion of mice[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2008, 28(5): 564-567. DOI: 10.1007/s11596-008-0516-8

[12] Cui L, Feng L, Zhang Z H, *et al*. The anti-inflammation effect of baicalin on experimental colitis through inhibiting TLR4/NF-κB pathway activation[J]. Int Immunopharmacol, 2014, 23(1): 294-303. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.09.005

[13] Li J, Xie C, Zhuang J, *et al*. Resveratrol attenuates inflammation in the rat heart subjected to ischemia-reperfusion: Role of the TLR4/NF-κB signaling pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(2): 1120-1126. DOI: 10.3892/mmr.2014.2955

[14] Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways[J]. Gastroenterol Res Pract, 2010, 2010:240365. DOI: 10.1155/2010/240365

(**收稿**:2015-12-09;**修回**:2016-01-02)

(编辑 龙 亮)