DOI:10.16016/j.1000-5404.202007131

DIDS 通过抑制氯离子通道 2 型的开放缓解肝缺血再灌注损伤

邓 永,唐腾骞,张庆仪,张雷达 400038 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第一附属医院肝胆外科

[**摘要**] **目的** 探讨氯离子通道 2 型(type 2 chloride channel, ClC2)及其阻断剂 4,4-二异硫氰基芪-2,2'-二磺酸(4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid, DIDS)在肝缺血再灌注损伤中的作用。**方法** 成年 SD 大鼠以经典法建立肝缺血再灌注模型。采用 q-PCR 技术对缺血再灌注后肝组织中 ClC2 的表达进行检测,采用肝功能血生化分析、活性氧浓度检测、ELISA 及流式细胞技术观察缺血再灌注及应用 DIDS 后对肝功能、氧自由基水平、炎性细胞因子及细胞周期等方面的影响。**结果** 缺血再灌注后肝组织中 ClC2 mRNA 表达显著升高($P<0.05$),并伴随有活性氧浓度升高($P<0.05$)、谷丙及谷草转氨酶升高($P<0.05$)和炎性细胞因子浓度升高。术后即时使用 DIDS 组相比缺血再灌注组在 ClC2 表达、转氨酶浓度、活性氧水平及炎性因子表达方面均有所逆转($P<0.05$),术后 8 h 应用 DIDS 组相比缺血再灌注组在 ClC2 表达、转氨酶浓度及 iNOS(一氧化氮合酶)表达方面有显著差异($P<0.05$),而预用 DIDS 1 h 组相比缺血再灌注组未观察到统计学差异。**结论** DIDS 可以对肝缺血再灌注损伤引起的肝实质损害、炎性反应及氧化应激起保护作用。

[**关键词**] 肝脏;缺血再灌注损伤;DIDS;ClC2
[**中图法分类号**] R364.12;R657.3;R966 [**文献标志码**] A

DIDS alleviates hepatic ischemia-reperfusion injury by inhibiting the opening of type 2 chloride channel in rats

DENG Yong, TANG Tengqian, ZHANG Qingyi, ZHANG Leida Department of Hepatobiliary Surgery, First Affiliated Hospital, Army Military Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400038, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the roles of type 2 chloride channel (ClC2) and its blocker, 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid (DIDS), in rat model of hepatic ischemia-reperfusion (I/R) injury. **Methods** A total of 75 health adult SD rats were randomly divided into sham operation group, hepatic I/R injury group, I/R+immediate treatment of DIDS group, I/R+8 h later treatment of DIDS group, and 1 h pretreatment of DIDS+I/R group, with 15 animals in each group. The rat model of hepatic I/R injury was established by classical method, and DIDS was given by intraperitoneal injection at a dose of 50 mg/kg at corresponding time points. The expression of ClC2 in the liver tissues was detected with q-PCR. Then blood biochemical analysis, detection of reactive oxygen concentration, ELISA and flow cytometry were employed respectively to analyze and compare the liver function, level of reactive oxygen species (ROS), contents of inflammatory cytokines and cell cycle of hepatic cells among the different groups. **Results** The rats with hepatic I/R injury had significantly enhanced expression of ClC2 mRNA ($P<0.05$), increased production of ROS ($P<0.05$), elevated contents of inflammatory cytokines in liver tissues, and raised serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) ($P<0.05$). However, all above phenomena were reversed in the rats from the I/R+immediate treatment of DIDS group when compared with the

[**通信作者**] 张雷达, E-mail: 2518569931@qq.com

model group ($P<0.05$). Significant differences were also observed in the ClC2 expression, transaminase concentrations, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) level between the model group and the group using DIDS 8 h after operation ($P<0.05$). But no statistical difference was found in comparison with the group undergoing pretreatment of DIDS 1 h before operation. **Conclusion** DIDS has a protective effect on liver parenchymal damage, inflammatory reaction and oxidative stress induced by hepatic I/R injury.

[**Key words**] liver; ischemia-reperfusion injury; 4,4′-diisothiocyanostilbene-2,2′-disulfonic acid; type 2 chloride channel

Corresponding author: ZHANG Leida, E-mail: 2518569931@qq.com

肝脏缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)是涉及多种常见临床疾病的重要病理生理过程。越来越多的证据表明,除了众所周知的钙离子(Ca^{2+})超载,内皮细胞受损,一氧化氮和中性粒细胞方面的作用机制外,其还与膜离子通道的功能调节有关[1-2]。由于肝脏外科手术经常需要阻断肝门血流,不可避免地会造成缺血再灌注损伤,从而影响肝脏功能恢复。

研究发现缺血缺氧损伤会导致氯离子(chloride, Cl^-)通道的过度开放,影响细胞的正常生理活动[3]。其中氯离子通道2型(type 2 chloride channel, ClC2)主要参与细胞容积和渗透压调节,尤其在细胞损伤早期常与凋亡性细胞皱缩(apoptosis-induced volume decreases, AVD)的发生密切相关,对早期凋亡的启动和发展有重要影响[4]。ClC2发挥其生理调节功能主要是通过调控激酶、转录因子及通道阻滞剂等来实现[5-7]。4,4-二异硫氰基芪-2,2'-二磺酸(4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid, DIDS)是一种非选择性氯离子通道阻滞剂,可以减轻Cl^-通道的开放程度,抑制心肌细胞被诱导的AVD,保护缺血再灌注后受损的心脏功能[8-10]。由于氧自由基能诱导缺血再灌注肝组织炎性反应和肝细胞凋亡,同时肝脏作为机体的生化代谢中心也是对过氧化损伤最敏感的器官之一。本文旨在探讨DIDS在肝缺血再灌注损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物与模型建立

清洁级标准健康成年SD大鼠75只雌雄不限,体质量220~250 g,购自陆军军医大学实验动物中心。动物模型采用肝脏热缺血再灌注模型[11],健康成年SD大鼠称量备皮后消毒腹部皮肤,采用戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,待达到麻醉要求后,取上腹正中切口开腹,充分游离肝脏左、中叶肝蒂,用无创血管夹夹闭肝左、中叶门静脉和肝动脉,使约70%的肝脏缺血,关腹,90 min后重新开腹去除血管夹,恢复肝血流180 min。

1.2 实验动物分组

共分为5组(15只/组):假手术组、缺血再灌注组、缺血再灌注后即时DIDS治疗组、缺血再灌注后8 h DIDS治疗组、预用DIDS 1 h后缺血再灌注组。DIDS(Sigma公司)采用腹腔注射,用量为50 mg/kg体质量。

1.3 取材

分别于缺血再灌注手术后即时、1 d、5 d时处死动物,行下腔静脉取血,并切取肝左叶。将血液保存于4 ℃待测生化指标,将获取的肝左叶用预冷生理盐水冲洗后,保存于-80 ℃待测氧化指标等。

1.4 q-PCR技术检测RNA表达量

按总RNA提取试剂盒的说明提取RNA,核酸浓度测量仪检测各样本总RNA浓度。逆转录反应后置混合液于热循环仪中:37 ℃ 15 min、85 ℃ 5 s、4 ℃保存。荧光定量后上机行40个循环(95 ℃ 1 min、95 ℃ 10 s、60 ℃ 30 s),最后绘制融解曲线。引物序列如下:ClC2:5′-AGACAATCCCTACACCCTTCAA-3′,5′-TGTCGGTAGAACACCTTGTCAC-3′;β-actin:5′-GAGACCTTCAACACCCCAGCC-3′,5′-TCGGGGGATCGGAACCGCTCA-3′。

1.5 活性氧浓度检测

取1 mL组织蛋白提取液,依据活性氧检测试剂盒说明加入DCFH-DA 1 μL,37 ℃避光孵育30 min,加入1 μL Rosup阳性对照刺激细胞,25 min后分光光度计在525 nm激发波长下读数。

1.6 炎性细胞因子检测

按ELISA试剂盒说明书配制蛋白标准品,梯度稀释,取标准品及待测上清100 μL加入待测孔中,并分别设置复孔。室温孵育2 h后倒掉孔内液,洗板,每孔加入400 μL洗涤液,洗涤4次后在滤纸上印干。每孔加入200 μL酶标检测抗体,室温孵育2 h后倒掉孔内液,洗板,每孔加入400 μL洗涤液,洗涤4次后在滤纸上印干。每孔加入200 μL显色底物,室温避光孵育30 min。每孔加入终止液50 μL,于酶标仪450 nm波

长处测量吸光度值。

1.7 流式细胞术检测细胞周期

分离的组织细胞离心沉淀后用 300 μL 含 10%小牛血清的 PBS 悬浮,移入 1.5 mL EP 管中,加入 700 μL 无水乙醇,置-20 ℃固定细胞 24 h,3 000 r/min 离心细胞 30 s,弃上清,1 mL PBS 重悬细胞,再次离心洗涤细胞,弃上清。沉淀细胞用 100 μL 1 mg/mL RNase A 悬浮,37 ℃孵育 30 min 后加入 400 μL 50 μg/mL PI,置暗处 10 min 后上机检测。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。计量资料均进行正态性检验,两组间样本均数的比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。均以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脏缺血再灌注对 ClC2 mRNA 表达的影响

缺血再灌注 1 h 后,ClC2 mRNA 表达较假手术组明显增强($P<0.05$),且在损伤后 1 d 达到高峰($P<0.05$),5 d 后仍然保持较高水平($P<0.05$,图 1A)。术后 1 d 时间点时,结果显示缺血再灌注手术后即时和手术后 8 h 应用 DIDS 治疗组的 ClC2 mRNA 表达水平均较缺血再灌注组明显降低,其中术后即时应用 DIDS 组降低更为显著($P<0.05$)。预用 DIDS 1 h 后缺血再灌注组 ClC2 mRNA 表达与缺血再灌注组未见统计学差异(图 1B)。

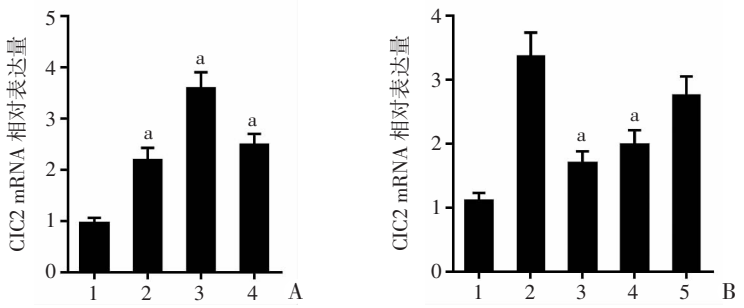
2.2 DIDS 在肝缺血再灌注损伤中对肝功能的影响

肝功能血生化分析结果显示缺血再灌注组的转氨酶指标较假手术组显著升高($P<0.05$),且谷丙转氨酶(ALT)升高幅度较谷草转氨酶(AST)更加明显。术后应用 DIDS 治疗组转氨酶指标较手术组有较大幅度回落($P<0.05$),且这一现象在术后即时应用 DIDS 治疗组中更加显著。取材时间节点方面,术后 1 日取材时各组转氨酶指标差异较术后即时及术后 5 日更加明显。碱性磷酸酶(ALP)指标总体均在正常范围内,各组间无显著差异。

2.3 DIDS 在肝脏缺血再灌注损伤中对活性氧及炎性细胞因子的影响

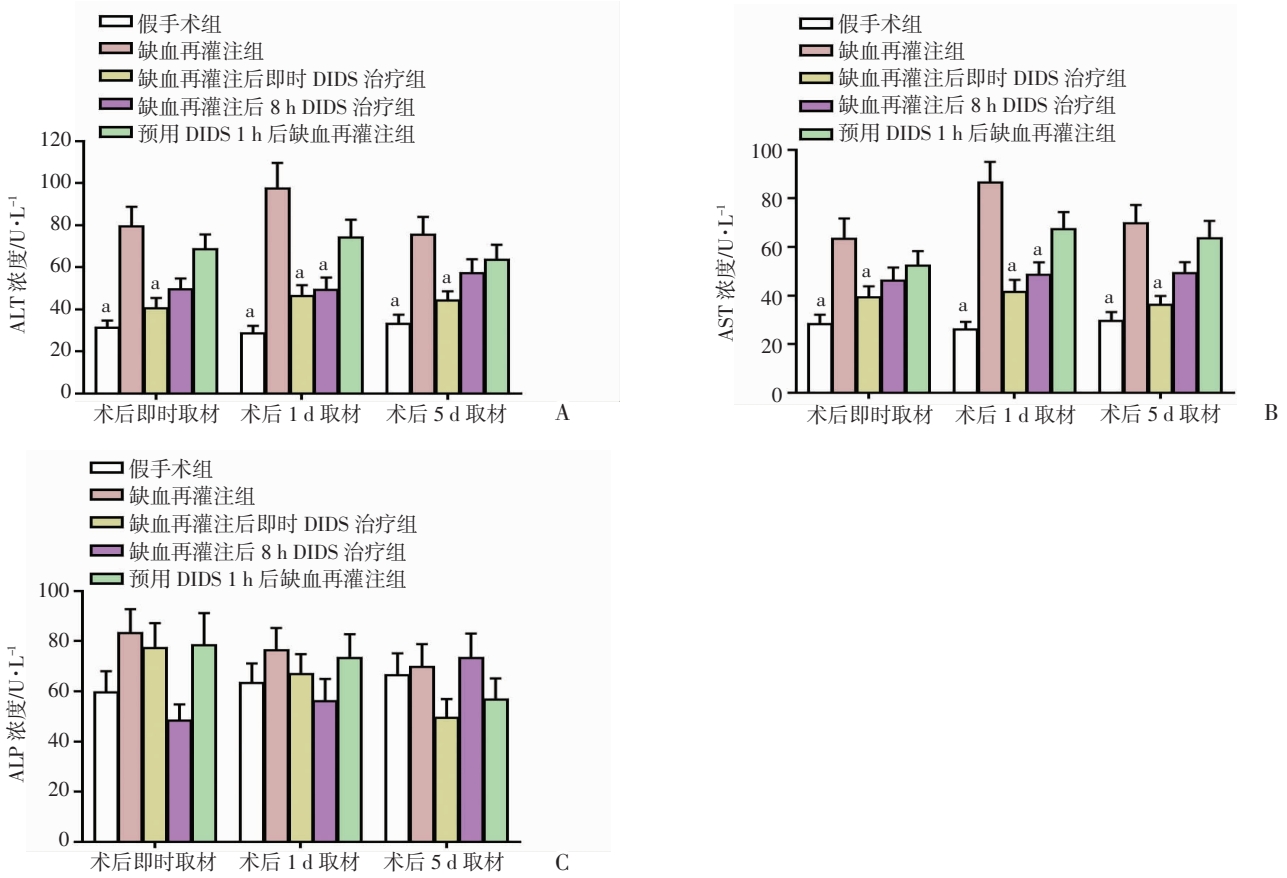
我们使用分光光度法对各样本进行了活性氧(reactive oxygen species, ROS)浓度测定。结果显示术后即时取材的各组中,缺血再灌注后 8 h 应用 DIDS 治疗组的活性氧浓度较其余 4 组明显升高($P<0.05$),其余 4 组间活性氧浓度无统计学差异。术后 1 d 取材时,缺血再灌注组较对照组活性氧浓度显著升高($P<0.05$),术后即时应用 DIDS 处理可以有效减轻活性氧升高的程度($P<0.05$),但术后 8 h 应用 DIDS 处理组相较缺血再灌注组则无明显差异。术后 5 天取材时,缺血再灌注组较对照组活性氧浓度仍然明显升高($P<0.05$),但其余各组已无明显差异(图 3A)。

我们采用 ELISA 法对术后 1 d 取材的各样本进行 iNOS、TNF-α 表达水平检测。结果显示缺血再灌注组较对照组炎性细胞因子浓度显著升高($P<0.05$),尤其以 iNOS 升高幅度更为明显。应用 DIDS 后可以有效减轻炎性细胞因子升高的程度($P<0.05$),其中以术后即时使用 DIDS 效果最为明显,预用 DIDS 组与缺血再灌注组相较无统计学差异。值得注意的是术后 8 h 应用 DIDS 组与缺血再灌注损伤组相比,在 iNOS 表达上有统计学差异($P<0.05$),而在 TNF-α 表达上无统计学差异(图 3B、C)。



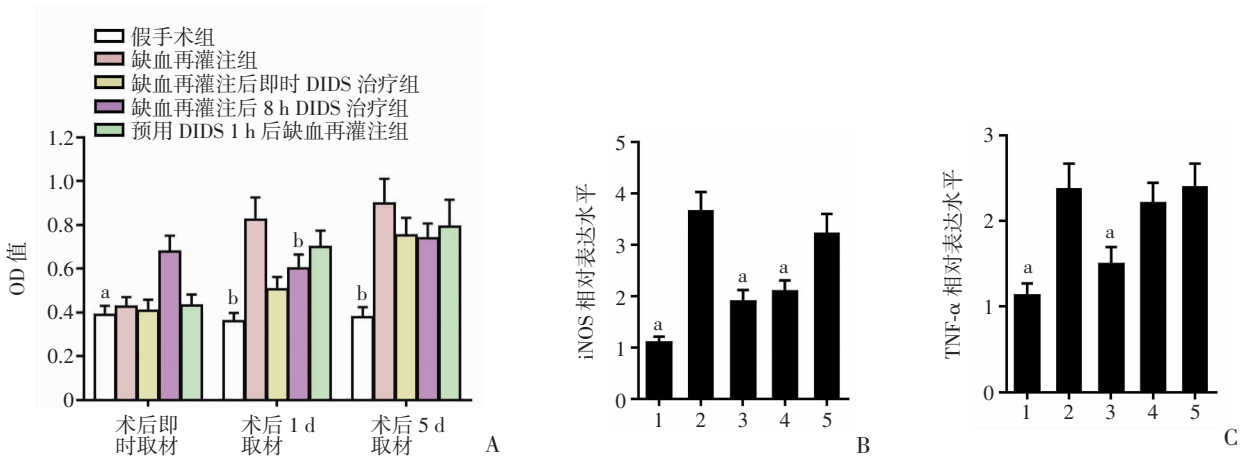
A:缺血再灌注不同时间的肝组织中 ClC2 mRNA 表达情况,1:假手术组,2:缺血再灌注术后即时组,3:缺血再灌注术后 1 d 组,4:缺血再灌注术后 5 d 组,a:$P<0.05$,与假手术组比较;B:缺血再灌注及不同时间 DIDS 治疗的肝组织在术后 1 d 取材时的 ClC2 mRNA 表达情况,1:假手术组,2:缺血再灌注组,3:缺血再灌注后即时 DIDS 治疗组,4:缺血再灌注后 8 h DIDS 治疗组,5:预用 DIDS 1 h 后缺血再灌注组,a:$P<0.05$,与缺血再灌注组比较

图 1 缺血再灌注术后肝组织中 ClC2 mRNA 表达变化



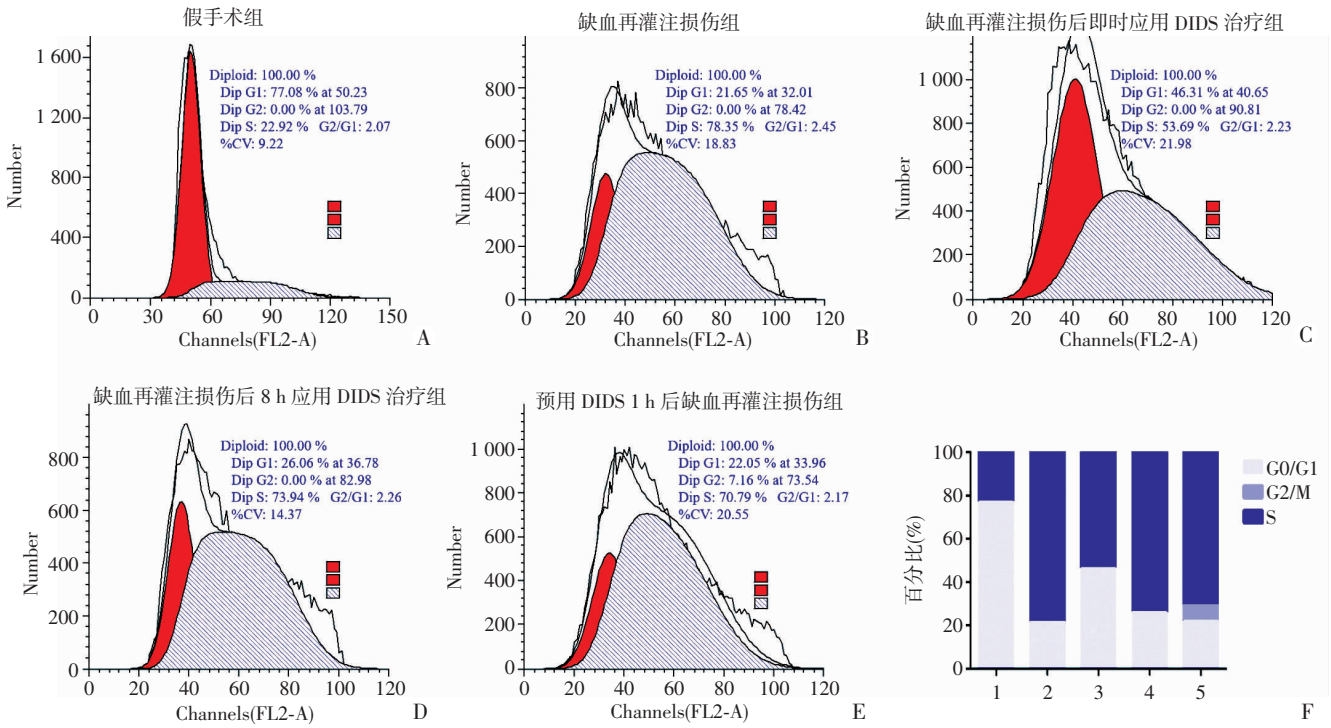
A:假手术组、缺血再灌注组、缺血再灌注后即时 DIDS 治疗组、缺血再灌注后 8 h DIDS 治疗组及预用 DIDS 1 h 后缺血再灌注组在术后即时、1 d、5 d 时的 ALT 浓度结果,a:$P<0.05$,与缺血再灌注组比较;B:上述各组在术后即时、1 d、5 d 时的 AST 浓度结果,a:$P<0.05$,与缺血再灌注组比较;C:上述各组在术后即时、1 d、5 d 时的 ALP 浓度结果

图 2 缺血再灌注术后大鼠肝功能指标的变化



A:假手术组、缺血再灌注组、缺血再灌注后即时 DIDS 治疗组、缺血再灌注后 8 h DIDS 治疗组及预用 DIDS 1 h 后缺血再灌注组在术后即时、1 d、5 d 时的 ROS 浓度结果,a:$P<0.05$,与缺血再灌注后 8 h DIDS 治疗组比较,b:$P<0.05$,与缺血再灌注组比较;B:上述各组在术后 1 d 取材时的肝组织中 iNOS 表达水平结果;C:上述各组在术后 1 d 取材时的肝组织中 TNF-α 表达水平结果,a:$P<0.05$,与缺血再灌注组比较;1:假手术组,2:缺血再灌注组;3:缺血再灌注后即时 DIDS 治疗组,4:缺血再灌注 8 h DIDS 治疗组,5:预用 DIDS 1 h 后缺血再灌注组。

图 3 DIDS 在肝脏缺血再灌注损伤中对活性氧及炎性细胞因子的影响



A~E:假手术组、缺血再灌注组、缺血再灌注后即时 DIDS 治疗组、缺血再灌注后 8 h DIDS 治疗组及预用 DIDS 1 h 后缺血再灌注组在术后 1 d 取材时的流式细胞周期检测结果。F:上述各组的流式细胞周期检测百分比,1:假手术组,2:缺血再灌注组,3:缺血再灌注后即时 DIDS 治疗组,4:缺血再灌注后 8 h DIDS 治疗组,5:预用 DIDS 1 h 后缺血再灌注组

图 4 DIDS 在肝缺血再灌注中对肝细胞周期的影响

2.4 DIDS 在肝缺血再灌注中对肝细胞周期的影响

流式细胞检测结果显示缺血再灌注组中 G0/G1 期细胞比例为 21.65%,明显低于假手术组的 77.08%($P<0.05$)。术后即时使用 DIDS 组 G0/G1 期细胞比例为 46.31%,较缺血再灌注组明显升高($P<0.05$),但仍低于假手术组。提示缺血再灌注损伤后应用 DIDS 阻断 ClC2 异常高表达可以稳定肝脏细胞正常细胞周期,同时也提示缺血再灌注后的肝脏细胞将更多地被刺激进入细胞周期循环。然而,缺血再灌注损伤后 8 h 应用 DIDS 治疗组以及预用 DIDS1 h 后缺血再灌注组的 G0/G1 期细胞比例较缺血再灌注组无明显差异,提示 DIDS 是时间敏感型药物,如无法在恰当的时间进入体循环将影响其功能(图 4)。

3 讨论

在本研究中我们分析了肝缺血再灌注对 ClC2 的表达影响以及损伤后应用 DIDS 后对肝脏的多方面影响。本研究表明肝缺血再灌注损伤将刺激 ClC2 的过表达,损伤后早期使用 DIDS 能够明显抑制 ClC2 过表达,降低炎性因子浓度、活性氧水平,并维护正常的细胞增殖分化周期,降低肝细胞受损程度。提示肝缺血再灌注后早期应用 DIDS 能够对肝组织起保护作用。

氯离子通道(ClCs)是细胞膜上氯离子或少数其他阴离子的一种渗透性通道蛋白,是最重要的阴离子转运通道[12]。ClC2 是一种双孔均聚、电压门控的氯离子通道[13]。其可被超极化、细胞肿胀、细胞外低张性和细胞外酸化所激活。因此,ClC2 具备调节细胞容积、控制肿胀反应、调节突触后反应等重要生理功能[4]。最新的研究结果表明氯离子通道在心肌缺血再灌注中扮演了重要角色,缺血再灌注损伤所导致的缺血缺氧环境刺激了氯离子通道的大量开放,从而成为心肌细胞受损的重要环节之一[14]。DIDS 可通过抑制红细胞中超氧化物阴离子的产生来保护氧化性肺损伤,保护应激引起的胃部病变[15],纠正大鼠心肌缺血再灌注引起的心律失常[16],并在缺氧刺激下挽救神经元细胞的早期死亡[17]。关于调控 ClC2 表达的分子机制,既往有文献报道刺激条件下应激产生的糖皮质激素诱导激酶(SGK)可明显促进 ClC2 的表达[18],也有文献认为 Janus 激酶 2 和 3 可以下调 ClC2 的活化并抵消氯离子的过度外流[19]。转录因子方面,Sp1 和 Sp3

能够调控基因的转录速率,减少 Sp1 或 Sp3 与 ClC2 启动子之间的相互作用可导致肺上皮细胞中 ClC2 表达的降低[20]。但缺血再灌注导致的 ClC2 过表达具体机制仍需进一步研究。

肝脏作为人体生化代谢中心,本身存在着复杂的抗氧化系统,但高强度的缺血再灌注损伤势必会影响氧化-抗氧化系统的平衡。动物实验和临床研究均证实了严重氧化应激导致的氧自由基过度产生可引起脂质过氧化和肝细胞膜损伤,进而加重缺血再灌注肝功能损伤程度[21-22]。活性氧浓度的升高是抗氧化系统失衡的重要标志之一[23]。我们发现缺血再灌注后肝组织中活性氧浓度显著升高,提示肝脏抗氧化能力在短期内无法有效代偿,肝细胞暴露在高浓度的活性氧中,这将带来一系列不良后果,诸如氯离子通道过度开放、细胞膜通透性增加、促凋亡蛋白的释放等。同时,我们也在术后 1 d 时观察到了术后即时使用 DIDS 组的活性氧浓度较单纯缺血再灌注组有明显的下降,提示 DIDS 有维护氧化-抗氧化系统平衡的作用。在术后即时取材时,仅术后 8h 应用 DIDS 组表现出明显的活性氧浓度升高,其余各组均无显著差异,考虑主要是由于其余各组的取材时间距离缺血再灌注时间过短,活性氧物质尚未充分形成所导致。然而在术后 5 d 时,包括术后即时使用 DIDS 组在内的所有使用了 DIDS 的各组相较于缺血再灌注组的活性氧浓度均无明显差异,这表明课题中 DIDS 使用量偏低或者单次注射无法维护中长期有效药物浓度。

除此之外,既往文献证据表明 DIDS 可通过调控炎性细胞因子的产生来维护抗氧化系统平衡[24]。炎症或感染刺激将导致肝细胞产生一连串病理生理改变,其所释放的炎性细胞因子被认为是破坏抗氧化系统平衡的又一关键因素[25]。在本课题中,我们对典型的炎性细胞因子诸如 TNF-α、iNOS 进行了研究,实验结果与既往 DIDS 在心肌缺血再灌注中作用研究的结果相符合,再次证明了 DIDS 通过抑制阴离子通道的过度开放可以抑制炎性细胞因子的释放,从而维护其抗氧化活性。

细胞周期的改变也是抗氧化系统失衡的一个重要表现[26]。肝细胞正常情况下属于稳定细胞,仅在一定条件刺激下才进入细胞周期成为分裂细胞。我们的研究发现缺血再灌注损伤将大大降低 G0/G1 期细胞比例,提示更多的肝细胞进入了细胞周期中,而术后即时使用 DIDS 可以显著逆转这种改变。值得注意的是术后 8 h 及术前 1 h 预用药时无法明确观察到这种保护作用,提示 DIDS 是时间敏感性药物,但仍需要更多更深入的药代动力学基础研究。

综上所述,缺血再灌注对肝脏的损伤以及 DIDS 对其的保护作用能够从 ClC2 mRNA 表达、活性氧浓度、转氨酶水平、炎性细胞因子释放及细胞周期改变等多方面得到验证。本课题从氯离子通道入手进行研究,展示了其可能的肝脏缺血再灌注损伤干预靶点,并初步探索了 DIDS 的保护作用。但未来仍需更深入的研究来进一步阐明氯离子通道在肝缺血再灌注中的作用机制。

参考文献:

[1] CHEN S Y, ZHANG H P, LI J, *et al*. Tripartite motif-containing 27 attenuates liver ischemia/reperfusion injury by suppressing TAK1 via TAB2/3 degradation[J]. Hepatology, 2020,(4): 1-38. DOI: 10.1002/hep.31295.

[2] ZHANG T, GUO J, GU J, *et al*. Protective role of mTOR in liver ischemia/reperfusion injury: involvement of inflammation and autophagy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 13: 1-17. DOI: 10.1155/2019/7861290.

[3] ZHAO B X, QUAN H Y, MA T, *et al*. 4, 4'-diisothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonic acid (DIDS) ameliorates ischemia-hypoxia-induced white matter damage in neonatal rats through inhibition of the voltage-gated chloride channel ClC-2[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(5): 10457-10469. DOI: 10.3390/ijms160510457.

[4] WANG H, XU M, KONG Q, *et al*. Research and progress on ClC-2[J]. Mol Med Rep, 2017,16(1): 11-22. DOI: info:doi/10.3892/mmr.2017.6600.

[5] HOSSEINZADEH Z, BHAVSAR S K, LANG F. Downregulation of ClC-2 by JAK2[J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 29(5/6): 737-742. DOI: 10.1159/000178560.

[6] VIJ N, ZEITLIN P L. Regulation of the ClC-2 lung epithelial chloride channel by glycosylation of SP1[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 34(6): 754-759. DOI: 10.1165/rcmb.2005-0442OC.

[7] CUPPOLETTI J, CHAKRABARTI J, TEWARI K P, *et al*. Differentiation between human ClC-2 and CFTR Cl-channels with pharmacological agents[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2014, 307(5): C479-C492. DOI: 10.1152/ajpcell.00077.2014.

[8] WANG X M, CAO Y N, SHEN M Z, *et al*. DIDS reduces ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in rats[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(2): 676-688. DOI: 10.1159/000369728.

[9] BOLLMANN E, SCHREIBER J A, RITTER N, *et al*. 4, 4'-

diisothiocyanato-2, 2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) modulates the activity of KCNQ1/KCNE1 channels by an interaction with the central pore region[J]. Cell Physiol Biochem, 2020, 54(2): 321-332. DOI: 10.33594/000000222.

[10] XIE S Q, WANG K, YU W J, *et al*. DIDS blocks a chloride-dependent current that is mediated by the 2B protein of Enterovirus 71[J]. Cell Res, 2011, 21(8): 1271-1275. DOI: 10.1038/cr.2011.112.

[11] HEUSCH G. Remote ischemic conditioning: the enigmatic transfer of protection[J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(1): 1-2. DOI: 10.1093/cvr/cvw240.

[12] LAGOSTENA L, ZIFARELLI G, PICOLLO A. New insights into the mechanism of NO3- selectivity in the human kidney chloride channelClC-ka and the CLC protein family[J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(2): 293-302. DOI: 10.1681/ASN.2018060593.

[13] SCHEWE J, SEIDEL E, FORSLUND S, *et al*. Elevated aldosterone and blood pressure in a mouse model of familial hyperaldosteronism with ClC-2 mutation[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 5155. DOI: 10.1038/s41467-019-13033-4.

[14] QIU L Y, CHEN H P, YAN Y F, *et al*. Sasanquasaponin promotes cellular chloride efflux and elicits cardioprotection via the PKCε pathway[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(4): 3597-3603. DOI: 10.3892/mmr.2016.4984.

[15] NOZIK-GRAYCK E, PIANTADOSI C A, VAN ADELSBERG J, *et al*. Protection of perfused lung from oxidant injury by inhibitors of anion exchange[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1997, 273(2): L296-L304. DOI: 10.1152/ajplung.1997.273.2.l296.

[16] ZHU B M, MIYAMOTO S, NAGASAWA Y, *et al*. Does Cl-/HCO3- exchange play an important role in reperfusion arrhythmias in rats? [J]. Eur J Pharmacol, 2003, 460(1): 43-50. DOI: 10.1016/s0014-2999(02)02928-x.

[17] XUE J, ZHOU D, YAO H, *et al*. Role of transporters and Ion channels in neuronal injury under hypoxia[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2008, 294(2): R451-R457. DOI: 10.1152/ajpregu.00528.2007.

[18] PALMADA M, DIETER M, BOEHMER C, *et al*. Serum and glucocorticoid inducible kinases functionally regulate ClC-2 channels[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 321(4): 1001-1006. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.07.064.

[19] WARSI J, ELVIRA B, HOSSEINZADEH Z, *et al*. Down-regulation of chloride channel ClC-2 by Janus kinase 3[J]. J Membr Biol, 2014, 247(5): 387-393. DOI: 10.1007/s00232-014-9645-0.

[20] HOLMES K W, HALES R, CHU S J, *et al*. Modulation of Sp1 and Sp3 in lung epithelial cells regulates ClC-2 chloride channel expression[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 29(4): 499-505. DOI: 10.1165/rcmb.2003-0030oc.

[21] KHANDOGA A, BIBERTHALER P, ENDERS G, *et al*. P-selectin mediates platelet-endothelial cell interactions and reperfusion injury in the mouse liver in vivo[J]. Shock, 2002, 18(6): 529-535. DOI: 10.1097/00024382-200212000-00008.

[22] RENTSCH M, POST S, PALMA P, *et al*. Anti-ICAM-1 blockade reducespostsinusoidal WBC adherence following cold ischemia and reperfusion, but does not improve early graft function in rat liver transplantation[J]. J Hepatol, 2000, 32(5): 821-828. DOI: 10.1016/s0168-8278(00)80252-4.

[23] HARRIS I S, DENICOLA G M. The complex interplay between antioxidants and ROS in cancer[J]. Trends Cell Biol, 2020, 30(6): 440-451. DOI: 10.1016/j.tcb.2020.03.002.

[24] ZHAO G Y, FU C, WANG L, *et al*. Down-regulation of nuclear HMGB1 reduces ischemia-induced HMGB1 translocation and release and protects against liver ischemia-reperfusion injury[J]. Sci Rep, 2017, 7: 46272. DOI: 10.1038/srep46272.

[25] XIANG B, ZHONG P, FANG L, *et al*. miR-183 inhibits microglia activation and expression of inflammatory factors in rats with cerebral ischemia reperfusion via NF-κB signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2019, 18(4): 2540-2546. DOI: 10.3892/etm.2019.7827.

[26] NING X J, YAN X, WANG Y F, *et al*. Parkin deficiency elevates hepatic ischemia/reperfusion injury accompanying decreased mitochondrial autophagy, increased apoptosis, impaired DNA damage repair and altered cell cycle distribution [J]. Mol Med Rep, 2018, 18(6): 5663-5668. DOI: 10.3892/mmr.2018.9606.

(**收稿**:2020-07-15;**修回**:2020-09-11)

(编辑 邓强庭)