

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2018.07.002

急性肝损伤小鼠中线粒体解耦联蛋白 2 的表达变化及意义 *

拜云虎¹ 王圣明² 王东辉² 王亚云² 杨雁灵^{1Δ}

(1 第四军医大学西京医院肝胆外科 陕西 西安 710032;

2 第四军医大学人体解剖与组织胚胎学教研室暨梁鈺璐脑研究中心 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察 C57 小鼠急性肝损伤(acute liver injury, ALI)中解耦联蛋白 2(Uncouple Protein2, UCP2)的表达,探讨 ALI 与 UCP2 表达变化的意义。**方法:**领取 36 只小鼠,随机分为对照组、ALI 1 d 组、ALI 4 d 组、ALI 7 d 组。分别检测血清谷氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的变化;肝组织病理变化用 HE 染色观察;利用 Western Blot 方法分别检测全肝组织蛋白和肝细胞线粒体提纯蛋白中的 UCP2 蛋白水平的变化;Real Time quality PCR 检测 UCP2 在 mRNA 水平的表达变化。**结果:**ALI 组 1 d、4 d 组与对照组相比,ALT(160.69 ± 22.11 vs 34.43 ± 5.19 ; 96.37 ± 15.39 vs 34.43 ± 5.19)、AST(306.54 ± 68.09 vs 97.74 ± 14.49 ; 173.94 ± 26.74 vs 97.74 ± 14.49)表达差异具有统计学意义($P < 0.05$);肝组织病理学检查 ALI 组 1 d 和 4 d 组中肝细胞出现大面积坏死,7 d 组肝细胞坏死缓解;蛋白水平检测 UCP2 在 ALI 1 d 和 4 d 时全肝组织分别增加 2.84 倍和 2.25 倍,在肝线粒体中 1 d、4 d 和 7 d 时分别增加 2.19 倍、1.68 倍和 1.56 倍,差异具有统计学意义($P < 0.05$);mRNA 水平检测 UCP2 在 ALI 1 d 和 4 d 与对照组相比明显升高,相对增加 3.79 倍和 1.46 倍($P < 0.05$)。**结论:**急性肝损伤状态下 UCP2 在蛋白和 mRNA 水平高表达,UCP2 可能对于治疗急性肝损伤具有重要意义。

关键词:急性肝损伤;线粒体;解耦联蛋白 2;小鼠

中图分类号:R-33;R657.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2018)07-1207-05

Expression of Uncoupling Protein 2 in Mice with Acute Liver Injury and its Significance*

BAI Yun-hu¹, WANG Sheng-ming², WANG Dong-hu², WANG Ya-yun², YANG Yan-ling^{1Δ}

(1 Department of Hepatobiliary Surgery, Xi-Jing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of Anatomy and K.K. Leung Brain Research Centre, the Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To observe the change of uncoupling protein 2 (UCP2) and its correlation with liver injury in the C57/BL mice with thioacetamide (TAA) induced acute liver injury (ALI). **Methods:** C57/BL mice were randomly divided into four groups: control group, ALI 1 d, ALI 4 d and ALI 7 d. Mice received intra-abdominal injection of TAA ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 3 days) in the ALI groups, and the control group was injected equal volume of 0.9 % NaCl. The level of serum aspartate amino transferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) in serum was detected by Elisa. The samples of liver tissue were harvested and pathomorphological changes of samples were examined by hematoxylin-eosin (HE) staining. Western Blot was used to detect the expression of UCP2 protein. Real time quality PCR was used to evaluate the expression of UCP2 in the mRNA level. **Results:** The level of ALT (160.69 ± 22.11 vs 34.43 ± 5.19 ; 96.37 ± 15.39 vs 34.43 ± 5.19) and AST (306.54 ± 68.09 vs 97.74 ± 14.49 ; 173.94 ± 26.74 vs 97.74 ± 14.49) in ALI groups were significantly higher than those in the control group at 1 d and 4 d ($P < 0.05$), and peaked at 1d; HE staining showed that a mass of inflammatory cells infiltration and cells degeneration were observed in ALI groups, and the damage was evident at 1 d and 4 d; Western Blot detected that the expression of UCP2 in the extracted protein of liver tissue and liver mitochondria increased significantly at 1 d (2.84 and 2.19 - fold, respectively) and 4 d (2.25 and 1.68 - fold, respectively) compared with control group ($P < 0.05$); The result of real time quality-PCR indicated that the level of UCP2 enhanced significantly at 1 d (3.79 - fold) and 4 d (1.46 - fold) in ALI groups compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** UCP2 was highly expressed in protein and mRNA levels in acute liver injury, and UCP2 could be important for the treatment of acute liver injury.

Key word: Acute liver injury; Mitochondria; Uncoupling protein 2; Mice

Chinese Library Classification(CLC): R657.3; R657.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2018)07-1207-05

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81470843)

作者简介:拜云虎(1991-),硕士研究生,研究方向:肝性脑病运动迟缓机制研究, E-mail: byunhu@163.com

Δ 通讯作者:杨雁灵,副教授、博士、硕士生导师,研究方向:代谢性脑病机制研究, E-mail: yangylfmmu@163.com

(收稿日期:2017-10-11 接受日期:2017-10-31)

前言

急性肝损伤(Acute liver injury, ALI)是由于感染病毒、药物服用不当、酒精过量、食入有毒物质等原因造成的短时间内出现的肝损伤。目前研究发现,体内的氧化及抗氧化系统、能量代谢障碍、炎症介质等在急性肝损伤中的病理机制中发挥着重要的作用^[1]。如氧化应激反应(Oxidative Stress Reactive, ROS)^[2]、谷胱甘肽 S 转移酶(Glutathione Stransferase, GSH)^[3]、超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)^[4]、三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)^[5]等的改变。线粒体被称之为细胞的发电厂(即是能量产生的主要场所),还是细胞进行有氧呼吸的主要场所。目前研究发现急性肝损伤时,线粒体发生形态和功能上的改变,对于急性肝损伤的发生发展具有重要意义^[6]。线粒体解耦联蛋白 2(Uncoupling protein, UCP2)是位于线粒体内膜中阴离子载体家族成员之一。当前对于 UCP2 的研究认识主要是参与活性氧的生成、能量代谢、维持线粒体膜电位的稳定、细胞凋亡等过程^[7]。在急性肝损伤状态下,肝脏线粒体功能障碍和肝组织内氧化应激反应,导致 UCP2 发生改变,从而对肝细胞内能量代谢以及氧化应激进行调控^[8,9]。因此探讨急性肝损伤中 UCP2 在蛋白和 mRNA 水平的表达变化对于进一步研究急性肝损伤的机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

取 6~8 周的健康雄性 C57/BL 小鼠,体重 18~24 g (由第四军医大学实验动物中心提供),TAA (Sigma, USA),UCP2 抗体(CST, USA); β -actin (中杉金桥公司,中国)、GAPDH (中杉金桥公司,中国)、HRP (中杉金桥,中国)、丙氨酸转氨酶试剂盒、天冬氨酸转氨酶试剂盒(南京建成,中国),线粒体提取试剂盒(QIAGEN, French),显微镜(Olympus, Japan)。

1.2 方法

1.2.1 急性肝损伤模型的制备 将 C57/BL 小鼠随机分为四组:对照组、急性肝损伤 1 d 组、4 d 组和 7 d 组。模型制备参照^[10,11],简言之,实验组给予 300 mg/Kg TAA(溶于 0.9 % NaCl, 0.3 mL)腹腔内注射,每隔 24 h 注射一次,连续注射三日。对照组注射等剂量的 NaCl。为防止出现低血钾、低血糖、肾衰及电解质的紊乱等症状,首次注射 TAA 12 h 后则皮下注射给予 0.45 % NaCl+0.2 % KCl+5 % 葡萄糖。

1.2.2 肝功能指标的检测 戊二醛麻醉后,眼球取血。4℃过夜后离心(3500 r/min, 15 min),吸取上层血清(-20℃保存)。测定 ALT 和 AST 含量,均按照南京建成试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 肝组织 HE 染色 取肝组织用石蜡块包埋,切片厚度为 5 μ m,HE 染色,显微镜下观察肝细胞病理学变化。

1.2.4 肝组织线粒体的提取 操作按照 QIAGEN 试剂盒说明书操作。简述为,取新鲜的肝组织称取约 20 mg 置于冰上,将肝组织切为约 1-2 mm³ 的小块,加入裂解液离心 1000 $\times$ g, 4℃, 10 min;去除上清,在沉淀中加入冰浴的裂解缓冲液 1.5 mL,之后再离心 1000 $\times$ g, 4℃ 10 min,去除上清后继续离心 6000 $\times$ g, 4℃, 10 min;用线粒体储存液再离心 6000 $\times$ g, 4℃, 20 min 清洗沉淀,最后向沉淀中加入线粒体储存液,吹打至悬液进行蛋白定量。

1.2.5 Western Blot 检测 UCP2 蛋白的表达 分别提取肝脏全组织和线粒体中的蛋白,使用 BCA 法进行蛋白定量。经 SDS PAGE 电泳后,转移至 PVDF 膜上,用 5 % 脱脂牛奶室温封闭 2 h,用兔抗 UCP2(1:1000)、鼠抗 β -actin (1:5000)、兔抗 GAPDH (1:5000),4℃过夜,PBST 洗 3 次每次 10 min,加入二抗 HRP (1:5000),室温 2 h,PBST 洗 3 次每次 10 min。显色剂显色,使用 Image J 软件计算蛋白相对灰度值。

1.2.6 肝脏 UCP2 mRNA 的表达检测 取肝组织,利用 Trizol 试剂提取肝脏组织总 RNA,紫外分光光度计测定 RNA 浓度。以提取的 RNA 为模板合成相应的 cDNA,进行 qRT-PCR 检测。UCP2 引物序列,Forward:5' - TGG GAG GTA GCA GGA AAT CA - 3';Reverse:5' - GCG GTA TCC AGA GGG AAA GT - 3'。对照内参为 GAPDH(生工,北京)。反应条件:设定程序为两步法 Real-Time 定量,预变性 95℃, 15 s,之后每一步变性 95℃, 5 s,退火,延伸 60℃ 30 s,共进行 40 个循环。扩增后做溶解曲线以检测产物的均一性。计算相对含量采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法进行统计分析。

1.3 统计学方法

数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{X}\pm$ SD)表示,定量数据采用 SPSS13.0 软件统计分析。小鼠生存率使用 Log-rank 方法分析,其余各组间数据比较用 t 检验进行分析,P<0.05 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 急性肝损伤后小鼠体重和生存率均降低

对照组小鼠体重略有增加,而急性肝损伤组小鼠体重显著降低。肝损伤组 1 d、4 d 组小鼠体重由造模前的 20.04 $\pm$ 0.71 g 分别将至 17.80 $\pm$ 0.96 g 和 17.12 $\pm$ 1.54 g,与对照组相比差异具有统计学意义(P<0.05),见图 1, a。观察小鼠生存率发现在注射 TAA 之后第 3 天和第 4 天分别死亡 1 只,共计 2 只。急性肝损伤组小鼠生存率为 80%,与对照组相比有明显的统计学差异(P<0.01),见图 1, b。

2.2 急性肝损伤后肝功水平明显升高

对照组、急性肝损伤 1 d、4 d、7 d 组血清 ALT、AST 水平的变化。肝损伤组 1 d、4 d 组肝脏 ALT(160.69 $\pm$ 22.11 VS 34.43 $\pm$ 5.19; 96.37 $\pm$ 15.39 VS 34.43 $\pm$ 5.19)、AST (306.54 $\pm$ 68.09 VS 97.74 $\pm$ 14.49; 173.94 $\pm$ 26.74 VS 97.74 $\pm$ 14.49)水平与对照组相比均显著升高(P<0.001),并且在肝损伤第 1 d 时 ALT (160.69 $\pm$ 22.11)、AST (306.54 $\pm$ 68.09)水平达到高峰(P<0.001),提示肝损伤造模成功;在 7 d 时,肝损伤组 ALT(73.26 $\pm$ 10.73 VS 97.74 $\pm$ 14.49)、AST(144.77 $\pm$ 22.45 VS 97.74 $\pm$ 14.49)水平有所下降,与对照组相比无明显的统计学差异(P>0.05),见图 2。

2.3 肝组织病理学

HE 染色检测组织病理结果提示,对照组的肝小叶排列整齐,结构正常;而肝损伤组第 1 d、4 d 时肝小叶结构排列混乱,肝细胞发生大片状坏死,而肝损伤第 7 d 肝脏较第 1 d、4 d 明显恢复,见图 3。

2.4 急性肝损伤后 UCP2 蛋白水平明显升高

肝脏全蛋白提取后检测 UCP2 蛋白表达水平与对照组相

比在肝损伤 1 d(2.84 倍)、4 d(2.25 倍)明显升高($P<0.001$),而肝损伤 7 d 组基本恢复正常水平($P>0.05$),见图 4.a, b。在提取的肝脏线粒体中 UCP2 蛋白在第 1 d(2.19 倍)和 4 d(1.68 倍)

均明显升高($P<0.001$),而肝损伤 7 d(1.56 倍)肝脏线粒体中 UCP2 蛋白水平却未回到正常水平($P<0.05$),见图 4.c, d。急性肝损伤后肝脏全组织和提纯线粒体水平 UCP2 表达均明显升高。

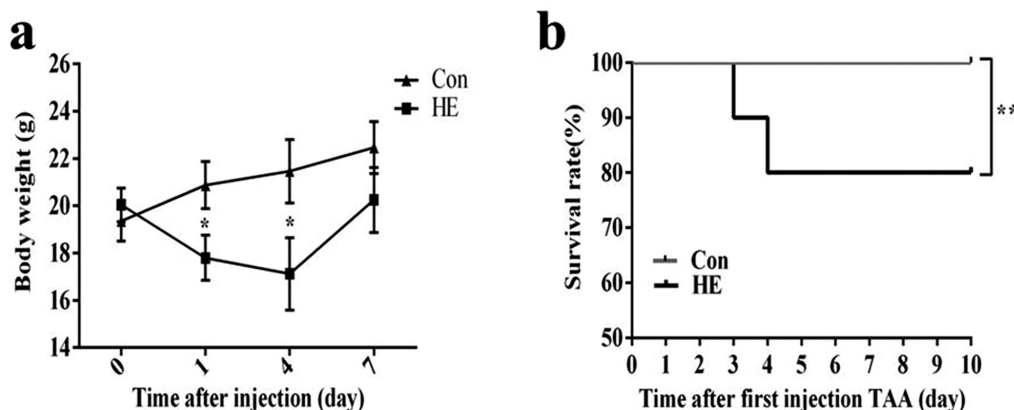


图 1 肝损伤不同时间内小鼠体重和生存率变化

Fig.1 The effect of different time of ALI on the body weight and survival rate levels

Note: Data were expressed as MEAN $\pm$ SD, n=10. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with the control group.

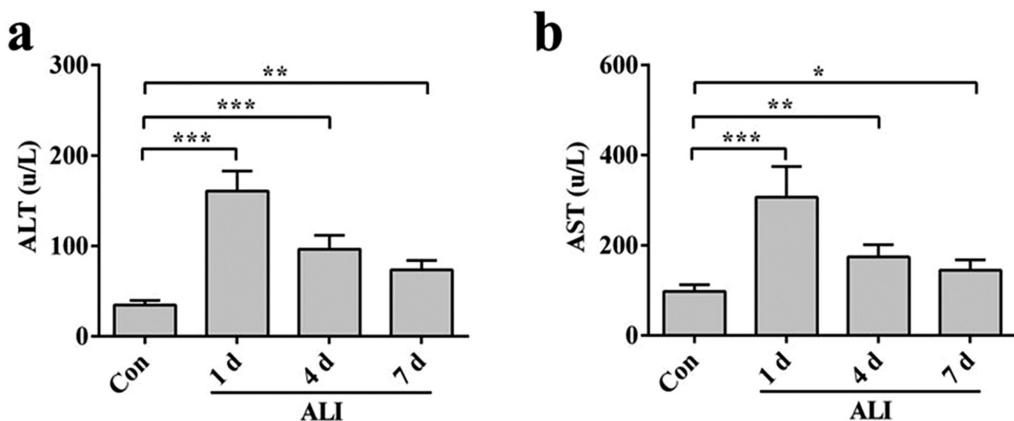


图 2 肝损伤不同时间血清 ALT 和 AST 水平变化

Fig.2 Effect of different time of ALI on the ALT and AST levels

Note: Data were expressed as MEAN $\pm$ SD, n=8-9. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, compared with the control group.

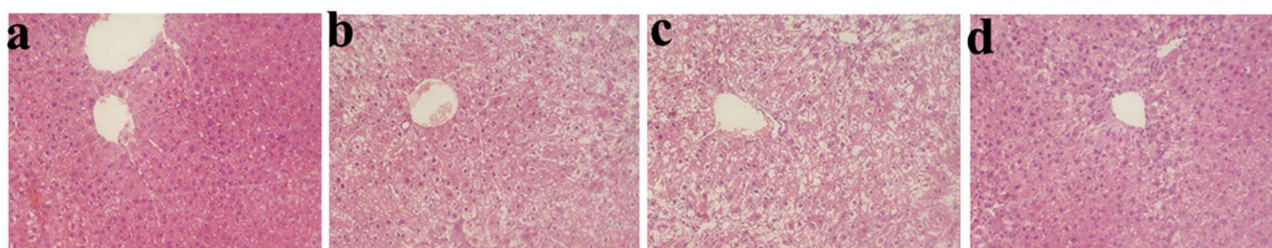


图 3 急性肝损伤小鼠肝脏病理切片(HE 200 $\times$)

Fig.3 HE dyed paraffin section of liver tissue in optical microscope

a represents the control group; a, b, c and d represent the ALI 1 d, 4 d and 7 d groups, respectively.

2.5 急性肝损伤后 UCP2 在 mRNA 水平明显升高

mRNA 水平检测 UCP2 在肝损伤第 1 d (3.79 倍)、4 d (1.46 $\pm$ 0.19 倍)表达明显增高($P<0.01$, $P<0.05$),而肝损伤第 7 d (0.91 $\pm$ 0.20 倍)无明显变化($P>0.05$),见图 5。

3 讨论

肝损伤一般是由各种肝病原因所导致的肝脏细胞的损伤的结果。肝损伤的原因主要包括病毒性、酒精性、药源性以及误

服有毒食物等。肝损伤的机制非常的复杂,目前对于机制的研究认识主要包括免疫性的以及化学性的两种机制学说。前者主要是则通过一氧化氮、细胞因子和免疫变态反应等产生损伤;而后者与细胞色素 P450 发生反应进而产生有损害的中间代谢产物^[12],其中就包含线粒体功能的失调和自由基的产生等。目前研究发现 UCP2 对保护肝细胞再生、维持线粒体膜电位和线粒体内钙离子的稳定以及 ATP 的产生和降低氧自由基产生具有十分重要的作用。降低 ROS 与炎症反应的协同作用,从而对肝组织细胞起到保护作用。

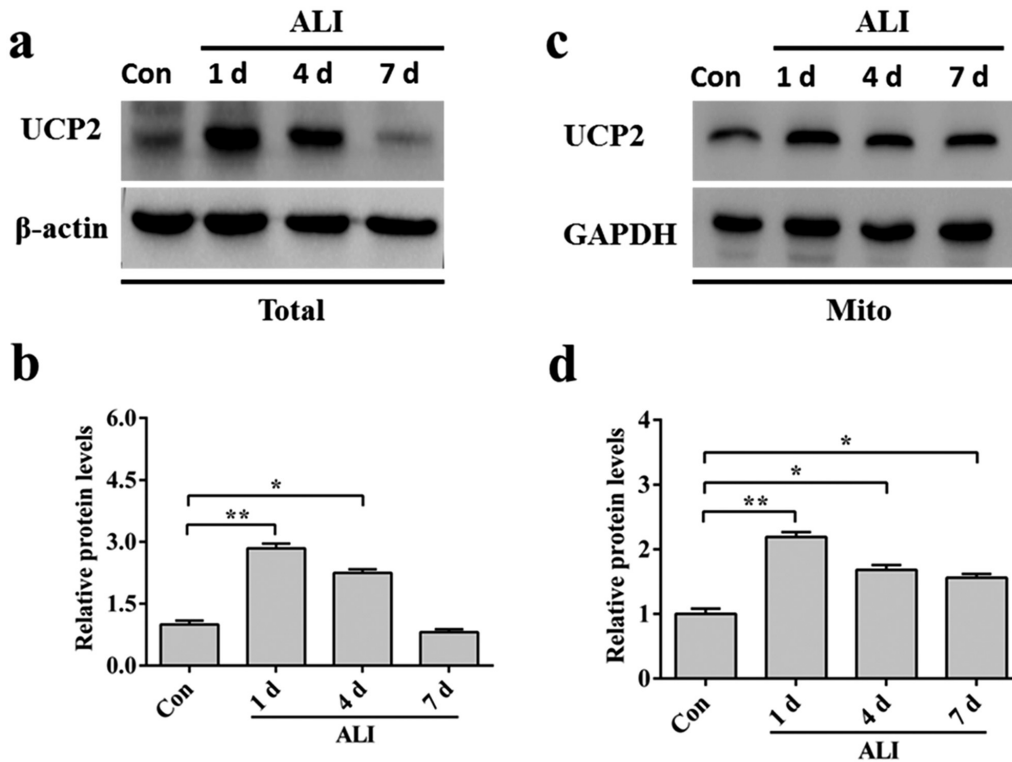


图 4 急性肝损伤后 UCP2 蛋白表达水平

Fig.4 The western blot results of UCP2 after acute liver injury

Note: The protein level of UCP2 was presented in total liver (a) and purified mitochondria (c), quantity analyze represent with (b) and (d), respectively.

Data were expressed as MEAN± SD, n=3. *P<0.05, **P<0.01, compared with the control group.

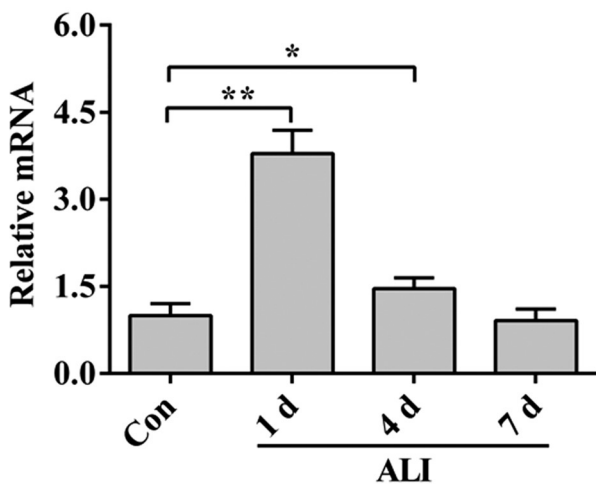


图 5 急性肝损伤后 UCP2 在 mRNA 水平升高。

Fig.5 The Real Time quality PCR results of UCP2 after acute liver injury

Note: Data were expressed as MEAN± SD, n=3. *P<0.05, **P<0.01, compared with the control group.

UCP2 是线粒体解偶联蛋白家族成员之一, 目前研究发现的线粒体解偶联蛋白家族共有 5 种, 即 UCP1、UCP2、UCP3、UCP4 以及 UCP5。1984 年, Aquila 和 Link 等人第一次发现确定了 UCP1 的 DNA 序列和氨基酸顺序, 并发现主要在棕色脂肪组织中表达; 1997 年 Fleury 等在人类 11 号染色体(11q13)上发现了 UCP2, 其在体内广泛表达^[13]; 随后陆续在神经系统中发现 UCP4/5^[14,15]。线粒体被称之为人体内的“能量工厂”, 而解偶联蛋白是一种位于线粒体内膜中的载体蛋白即质子转运体, 导致膜间隙内的质子不参与线粒体合成 ATP, 而是直接通过解

偶联蛋白被转运到线粒体基质中, 导致线粒体膜两侧的电化学势能中的自由能被消耗, 使得线粒体中的氧化和磷酸化被解偶联, 发生质子漏。此过程在减少 ATP 合成的同时, 也减少了氧自由基(O_2^-)的产生, 降低体内的氧化应激反应。

UCP2 是一种位于线粒体内膜中的质子通道, 可将膜间隙内的质子直接通过解偶联蛋白渗漏回线粒体基质中, 形成质子漏, 从而降低线粒体的膜电位, 减少 ATP 的生成。目前研究发现 UCP2 广泛表达于哺乳动物各个器官组织内^[16]。在正常生理状态下, 肝组织中 UCP2 表达较低。但也有研究发现其只表达于肝脏的 Kupffer 细胞中, 而在正常的肝细胞中不表达或低表达^[17]。然而在一些代谢刺激状态下, 肝组织中 UCP2 表达则会增多。例如在饥饿、高脂饮食和肥胖状态下 UCP2 则会表达增多^[18,19]。急性肝损伤中 ROS 的产生及随后接踵而至的氧化应激反应是引起肝脏损伤重要的机制之一^[20]。在肝切除模型中, UCP2 表达明显增高, 提示 UCP2 可能与肝脏再生也有一定的关系^[21]。目前研究发现, 很多因素可以改变肝脏的生理状态, 从而使肝细胞中的 UCP2 mRNA 改变, 进而使的 UCP2 蛋白发生进一步的变化。例如, 在培养的正常大鼠肝细胞中, TNF- α 可使肝细胞中 UCP2 mRNA 增多^[22]。在部分肝切除^[21,23]、非酒精性脂肪肝^[24]、胎鼠的肝脏^[25]、肥胖小鼠肝脏^[26]中 UCP2 表达均增多。急性肝损伤时, 使得肝细胞内氧化及抗氧化失衡, 在线粒体中表现为呼吸功能以及电子传递链酶的活性受到不同程度的损伤^[27]。因此, 深入研究急性肝损伤时 UCP2 的表达变化, 将有利于探明肝损伤的发生机理, 并为临床干预提供重要的线索。

本研究结果显示, 小鼠给予 TAA 可诱导典型的肝脏损伤, HE 病理学显示肝损伤在 1 d 和 4 d 时较为严重。此研究分别用

Western blot 和 Real Time quality PCR 验证急性肝损伤中 UCP2 在蛋白和 mRNA 水平明显升高,且随着肝损伤程度的降低,其表达降低。这表明肝损伤状态下,肝组织内的氧化应激系统以及各种炎症介质导致肝细胞内 Kupffer 细胞增加,导致 UCP2 在蛋白和 mRNA 水平表达上调。随着肝损伤程度的降低,UCP2 在蛋白和 mRNA 水平均降低。既往研究显示,UCP2 过表达可使线粒体呼吸链中氧化与磷酸化过程分离,使得 ADP 不能转化为 ATP,产生的能量以热量的形式散失,导致线粒体产生 ATP 减少^[28]。在急性肝损伤状态下,线粒体功能受损和肝组织内 Kupffer 细胞增多,不能有效进行氧化磷酸化,使得能量以热量的形式散失,UCP2 在蛋白和 mRNA 水平的增多可能是急性肝损伤能量代谢紊乱的原因之一。Huo, Y 等研究表明,急性肝损伤时机体处于氧化应激状态,肝组织氧化应激状态下 ROS 生成增多,可调节 UCP2 过表达,而 UCP2 的过表达可以增加质子漏,从而使线粒体产生的 ROS 降低,缓解肝细胞内氧化应激反应^[29],因此 ROS 与 UCP2 之间存在着反馈调节的通路^[30]。

机体内 ROS 信号通路十分复杂,虽然在急性肝损伤状态下 UCP2 表达增多,但其未能缓解肝细胞内的氧化应激反应。那么,UCP2 在急性肝损伤的肝组织中扮演者什么样的角色?有趣的是,在 2015 年 Mohammad H Jamal 等人在急性肝损伤动物模型中研究表明,在诱导急性肝损伤之前给予 epigallocatechin gallate (EGCG)可以降低 UCP2 基因表达,并且 EGCG 摄入后的保护作用不仅与其抗氧化性质有关,而且还与降低 UCP2 表达具有密不可分的联系,降低 UCP2 表达使得促炎症标志物的显著降低,从而降低硫代乙酰胺诱导的肝损伤的量值^[31]。Shang Y 等人在 2009 年的研究结果清楚地表明,UCP2 可以降低 ATP 的产生,从而激活 AMPK 和下游的 c-Jun 通路,从而增加肝脏对脂多糖等肝损伤物质的敏感性^[23]。

本研究成功的造成急性肝损伤模型。而 UCP2 在蛋白和 mRNA 水平在肝损伤越严重时表达越高。本研究在基因水平再一次验证 UCP2 在急性肝损伤的发生发展中具有重要的意义。但是,如果能在肝组织中特异性调控 UCP2 的表达,对于急性肝损伤中 UCP2 的功能研究具有更重要的作用。因此 UCP2 在急性肝损伤中对于能量代谢和 ROS 的调节机制仍需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Abdelmegeed M A, Jang S, Banerjee A, et al. Robust protein nitration contributes to acetaminophen-induced mitochondrial dysfunction and acute liver injury[J]. *Free Radic Biol Med*, 2013, 60: 211-222
- [2] Yu W, Zhang X, Liu J, et al. Cyclosporine A Suppressed Glucose Oxidase Induced P53 Mitochondrial Translocation and Hepatic Cell Apoptosis through Blocking Mitochondrial Permeability Transition [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12(2): 198-209
- [3] 马欣, 芳萍, 常铁聪, 等. 小鼠急性肝损伤中谷胱甘肽 S 转移酶 A1 的表达分析[J]. *中国兽医杂志*, 2016, (12): 102-104
Ma Xin, Liu Fang-ping, Chang Yi-cong, et al. Expression of glutathione S-transferase A1 in acute hepatic injury on mice [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2016, (12): 102-104
- [4] Coleman M C, Olivier A K, Jacobus J A, et al. Superoxide mediates acute liver injury in irradiated mice lacking sirtuin 3[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2014, 20(9): 1423-1435
- [5] Cui T X, Iwai M, Hamai M, et al. Aggravation of chemically-induced injury in perfused rat liver by extracellular ATP[J]. *Life Sci*, 2000, 66 (26): 2593-2601
- [6] Lin Z, Wu F, Lin S, et al. Adiponectin protects against acetaminophen-induced mitochondrial dysfunction and acute liver injury by promoting autophagy in mice[J]. *J Hepatol*, 2014, 61(4): 825-831
- [7] Jin X, Chen D, Zheng R, et al. miRNA-133a-UCP2 pathway regulates inflammatory bowel disease progress by influencing inflammation, oxidative stress and energy metabolism [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2017, 23(1): 76
- [8] Huo Y, Win S, Than T A, et al. Antcin H Protects Against Acute Liver Injury Through Disruption of the Interaction of c-Jun-N-Terminal Kinase with Mitochondria [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2017, 26 (5): 207-220
- [9] Xie R F, Li Z C, Chen P P, et al. Bufothionine induced the mitochondria-mediated apoptosis in H22 liver tumor and acute liver injury [J]. *Chin Med*, 2015, 10: 5
- [10] Yang Y L, Li J J, Ji R, et al. Abnormal chloride homeostasis in the substantia nigra pars reticulata contributes to locomotor deficiency in a model of acute liver injury[J]. *PLoS One*, 2013, 8(5): e65194
- [11] Butterworth R F, Norenberg M D, Felipe V, et al. Experimental models of hepatic encephalopathy: ISHEN guidelines [J]. *Liver Int*, 2009, 29(6): 783-788
- [12] Li S Q, Zhu S, Han H M, et al. IL-6 trans-signaling plays important protective roles in acute liver injury induced by acetaminophen in mice[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2015, 29(6): 288-297
- [13] Fleury C, Neverova M, Collins S, et al. Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia [J]. *Nat Genet*, 1997, 15 (3): 269-272
- [14] Mao W, Yu X X, Zhong A, et al. UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells[J]. *FEBS Lett*, 1999, 443(3): 326-330
- [15] Yu X X, Mao W, Zhong A, et al. Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation [J]. *FASEB J*, 2000, 14(11): 1611-1618
- [16] Pecqueur C, Alves-Guerra M C, Gelly C, et al. Uncoupling Protein 2, in Vivo Distribution, Induction upon Oxidative Stress, and Evidence for Translational Regulation [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(12): 8705-8712
- [17] Knook D L, Blansjaar N, Sleyster E C. Isolation and characterization of Kupffer and endothelial cells from the rat liver [J]. *Exp Cell Res*, 1977, 109(2): 317-329
- [18] Taghaddomi M Z, Eshraghian M R, Hedayati M, et al. Association between uncoupling protein 2, adiponectin and resting energy expenditure in obese women with normal and low resting energy expenditure [J]. *Gynecol Endocrinol*, 2017: 1-5
- [19] Huriyati E, Luglio H F, Ratrikaningtyas P D, et al. Dyslipidemia, insulin resistance and dietary fat intake in obese and normal weight adolescents: the role of uncoupling protein 2 -866G/A gene polymorphism[J]. *Int J Mol Epidemiol Genet*, 2016, 7(1): 67-73

流量下降相关。

综上所述,抑制 TIGAR 表达能明显抑制非小细胞肺癌细胞的增殖速率和克隆形成能力,导致细胞周期阻滞,其可能是通过调控 P27、CDK4 蛋白表达和代谢流量分布实现的。因此, TIGAR 作为一种促癌基因,可为非小细胞肺癌的分子治疗提供新的靶点,为靶向代谢酶的药物治疗提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] RL Siegel, KD Miller, A Jemal, et al. Cancer Statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67: 7-30
- [2] L Wang, C Yu, Y Liu, et al. Lung Cancer Mortality Trends in China from 1988 to 2013: New Challenges and Opportunities for the Government[J]. Int J Environ Res Public Health, 2016, 13(11): 1052-1063
- [3] M Julian R Molina, Ping Yang, Stephen D Cassivi, et al. Non-small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Risk Factors, Treatment, and Survivorship[J]. Mayo Clin Proc, 2008, 83(5): 584-594
- [4] K Bensaad, A Tsuruta, MA Selak, et al. TIGAR, a P53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis[J]. Cell, 2006, 126(1): 107-120
- [5] DR Green, JE ChiPuk. P53 and metabolism: Inside the TIGAR[J]. Cell, 2006, 126 (1) 30-32
- [6] P Lee, KH Vousden, EC Cheung. TIGAR, TIGAR, burning bright[J]. Cancer Metab, 2014, 2(1):
- [7] MA Dickson. Molecular Pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20 (13) 3379-3383
- [8] MK Yoon, DM Mitrea, L Ou, et al. Cell cycle regulation by the intrinsically disordered proteins P21 and P27[J]. Biochem Soc Trans, 2012, 40(5): 981-988
- [9] Z Yang, JJ Goronzaya, CM Weyanda. The glycolytic enzyme PFKFB3 phosphofructokinase regulates autophagy [J]. Autophagy, 2014, 10 (2) 382-383
- [10] J Cui, M Quan, W Jiang, et al. Suppressed expression of LDHB promotes pancreatic cancer progression via inducing glycolytic phenotype[J]. Med Oncol, 2015, 32 (5): 143
- [11] AP HalestraP. The monocarboxylate transporter family Structure and functional characterization[J]. IUBMB Life, 2012, 64(1): 1-9
- [12] V Fritz, L Fajas. Metabolism and proliferation share common regulatory pathways in cancer cells[J]. Oncogene, 2010, 29(31): 4369-4377
- [13] EY Wong, SC Wong, CM Chan, et al. TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator promotes proliferation and invasiveness of nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Oncol Lett, 2015, 9(2): 569-574
- [14] K Al-Khayal, M Abdulla, O Al-Obeed, et al. Identification of the TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator in various stages of colorectal cancer patients[J]. Oncol Rep, 2016, 35 (3): 1281-1286
- [15] M Hong, Y Xia, Y Zhu, et al. TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator protects from spontaneous apoptosis and predicts poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia[J]. Leuk Res, 2016, 50: 72-77
- [16] HP Yu, JM Xie, B Li, et al. TIGAR regulates DNA damage and repair through pentosephosphate Pathway and Cdk5-ATM pathway[J]. Sci Rep, 2015, 5: 9853
- [17] EC Cheung, D Athineos, P Lee, et al. TIGAR is required for efficient intestinal regeneration and tumorigenesis [J]. Dev Cell, 2013, 25 (5) 463-477
- [18] E Madan, R Gogna, P Kuppusamy, et al. TIGAR induces P53-mediated cell-cycle arrest by regulation of RB-E2F1 complex[J]. Br J Cancer, 2012, 107(3): 516-526
- [19] D Anastasiou, G Poulogiannis, JM Asara, et al. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses[J]. Science, 2011, 334(6060): 1278-1283
- [20] H Ying, AC Kimmelman, CA Lyssiotis, et al. Oncogenic Kras maintains pancreatic tumors through regulation of anabolic glucose metabolism[J]. Cell, 2012, 149(3): 656-670
- [20] Choi J, Ou J H. Mechanisms of liver injury. III. Oxidative stress in the pathogenesis of hepatitis C virus [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2006, 290(5): G847-G851
- [21] Horimoto M, Fülöp P, Derdák Z, et al. Uncoupling protein-2 deficiency promotes oxidant stress and delays liver regeneration in mice [J]. Hepatology, 2004, 39(2): 386-392
- [22] Cortez-Pinto H, Yang S Q, Lin H Z, et al. Bacterial lipopolysaccharide induces uncoupling protein-2 expression in hepatocytes by a tumor necrosis factor- α -dependent mechanism[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 251(1): 313-319
- [23] Shang Y, Liu Y, Du L, et al. Targeted expression of uncoupling protein 2 to mouse liver increases the susceptibility to lipopolysaccharide/galactosamine-induced acute liver injury [J]. Hepatology, 2009, 50(4): 1204-1216
- [24] Baffy G. Uncoupling protein-2 and non-alcoholic fatty liver disease [J]. Front Biosci, 2005, 10: 2082-2096
- [25] Hodny Z, Kolarova P, Rossmeisl M, et al. High expression of uncoupling protein 2 in foetal liver[J]. FEBS Lett, 1998, 425(2): 185-190
- [26] Chavin K D, Yang S, Lin H Z, et al. Obesity induces expression of uncoupling protein-2 in hepatocytes and promotes liver ATP depletion[J]. J Biol Chem, 1999, 274(9): 5692-5700
- [27] 刘均艳,赵海红,朱敏,等.性肝衰竭大鼠肝组织解偶联蛋白 2 的表达及其与氧化损伤的关系[J].中华肝脏病杂志, 2011, 19(1): 55-57
- [28] Liu Jun-yan, Zhao Hai-hong, Zhu Min, et al. Relationship between the expression of uncoupling protein 2 and the damage by oxygen free radicals in acute liver failure rats [J]. Journal of Clinical Hepatology, 2011, 19(1): 55- 57
- [29] Choi C H, Spooner R, DeGuzman J, et al. Porphyromonas gingivalis-nucleoside-diphosphate-kinase inhibits ATP-induced reactive-oxygen-species via P2X7 receptor/NADPH-oxidase signalling and contributes to persistence [J]. Cellular Microbiology, 2013, 15 (6): 961-976
- [30] 温暖,朱以祥,吕仁更,等.肝组织解偶联蛋白 2 在梗阻性黄疸及胆道再通实验大鼠模型中的表达及意义 [J]. 临床肝胆病杂志, 2015 (01): 88- 92
- [31] Wen Nuan, Zhu Yi-xiang, Lv Ren-geng, et al. Expression and significance of UCP-2 in rats with obstructive jaundice and bile flow restoration[J]. Journal of Clinical Hepatology, 2015(01): 88-92
- [32] Jamal M H, Ali H, Dashti A, et al. Effect of epigallocatechin gallate on uncoupling protein 2 in acute liver injury [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(1): 649-654

(上接第 1211 页)