

• 论著 •

干扰素调节因子 7 通过非经典细胞焦亡途径参与小鼠肝缺血再灌注损伤

陈涛¹ 侯净¹ 高宇哲¹ 邓德文² 张建军³ 沈中阳⁴¹ 贵州省人民医院乳腺外科, 贵阳 550002; ² 云南省第一人民医院普外科, 昆明 650032;³ 天津市第一中心医院器官移植中心, 天津 300192; ⁴ 南开大学移植医学研究院, 天津 300190

通信作者: 侯净, Email: hjhlingtong@163.com

【摘要】 目的 探索干扰素调节因子 7 (IRF7) 调控天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11 (caspase-11) 介导的非经典细胞焦亡对小鼠肝缺血再灌注损伤 (HIRI) 的作用及影响。**方法** ① 动物实验: 将 30 只雄性 4~6 周龄 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为假手术 (Sham) 组和再灌注 2、6、12、24 h 组, 每组 6 只。再灌注 2、6、12、24 h 组构建 70% 肝缺血再灌注 (IR) 模型, 即动脉夹夹闭肝中叶及左叶脉管 1.5 h, 松开动脉夹后分别以 2、6、12、24 h 时间梯度进行血流再灌注; Sham 组小鼠仅开腹, 不夹闭血管。分别于再灌注 2、6、12、24 h 收集小鼠肝组织及血清并处死。使用 Illumina 测序平台完成 Sham 组和再灌注 6 h 组肝组织转录组测序与数据分析; 免疫组织化学染色后光镜下观察各组 IRF7 的阳性表达; 透射电镜下观察各组肝组织细胞亚显微变化; 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组肝组织 IRF7、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11 (caspase-11)、消皮素 D (GSDMD)、GSDMD-N 末端结构域 (GSDMD-N)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 的蛋白表达。② 细胞实验: 小鼠 AML-12 肝细胞系分别转染 IRF7 过表达质粒、敲低 IRF7 质粒 (shIRF7)、对应空载质粒 (NC), 并分别进行缺氧/复氧 (H/R) 处理, 分组为 shIRF7 NC+H/R 组、shIRF7+H/R 组、IRF7 过表达 NC+H/R 组、IRF7 过表达+H/R 组。Western blotting 检测各组细胞 IRF7、caspase-11、GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 的蛋白表达; 免疫双荧光染色后倒置荧光显微镜下观察各组细胞 caspase-11 和 GSDMD 的共表达情况; 倒置显微镜下观察各组细胞存活情况; 检测各组细胞上清液中 IL-1 β 含量。**结果** ① 动物实验: 转录组测序结果初步显示, 再灌注 6 h 组的 IRF7 mRNA 表达均较 Sham 组显著上调。光镜下显示, IRF7 主要定位于细胞质和细胞核中; 再灌注各时间梯度内, 小鼠肝组织细胞 IRF7 表达均较 Sham 组上调, 以再灌注 6 h 表达最高 [IRF7 (A 值): 0.59 ± 0.04 比 0.04 ± 0.01 , $P < 0.05$]; 透射电镜下显示, 再灌注各时间梯度内, 小鼠肝细胞均发生不同程度的核膜损伤、破裂, 线粒体肿胀、胞质空泡化, 以再灌注 6 h 为著。与 Sham 组相比, 再灌注后各组小鼠肝组织 IRF7、caspase-11、GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 的蛋白表达均上调, 再灌注 6 h 组 IRF7、caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 蛋白表达上调最明显 [IRF7 蛋白 (IRF7/GAPDH): 0.59 ± 0.06 比 0.38 ± 0.02 , caspase-11 蛋白 (caspase-11/GAPDH): 0.42 ± 0.01 比 0.15 ± 0.01 , GSDMD 蛋白 (GSDMD/GAPDH): 0.60 ± 0.02 比 0.11 ± 0.01 , GSDMD-N 蛋白 (GSDMD-N/GAPDH): 0.66 ± 0.03 比 0.35 ± 0.03], 再灌注 12 h 组 IL-1 β 蛋白表达上调最明显 (IL-1 β /GAPDH: 0.64 ± 0.01 比 0.15 ± 0.01), 均 $P < 0.05$ 。② 细胞实验: 与 IRF7 过表达 NC+H/R 组相比, IRF7 过表达+H/R 组 caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1 β 的蛋白表达均上调 (均 $P < 0.05$)。与 shIRF7 NC+H/R 组相比, shIRF7+H/R 组 caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1 β 蛋白表达均下调 [caspase-11 蛋白 (caspase-11/GAPDH): 0.59 ± 0.05 比 1.02 ± 0.06 , GSDMD 蛋白 (GSDMD/GAPDH): 0.87 ± 0.04 比 1.09 ± 0.05 , GSDMD-N 蛋白 (GSDMD-N/GAPDH): 0.38 ± 0.05 比 0.80 ± 0.04 , IL-1 β 蛋白 (IL-1 β /GAPDH): 0.81 ± 0.03 比 1.02 ± 0.03], caspase-11/GSDMD 双荧光阳性细胞亦减少 (平均荧光强度: 45.50 ± 6.59 比 61.83 ± 8.93), 细胞存活数量增多 (个: $15\,549 \pm 1\,962$ 比 $9\,675 \pm 3\,460$), 细胞上清 IL-1 β 含量减少 (ng/L: 147.60 ± 19.36 比 253.70 ± 23.96), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论** IRF7 加重小鼠 HIRI, 可能与促进 caspase-11 介导的非经典细胞焦亡途径有关。

【关键词】 干扰素调节因子 7; 肝脏; 缺血再灌注损伤; 细胞焦亡; 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11**基金项目:** 贵州省科技厅青年引导项目 (QN-2025-291); 贵州省卫健委科学技术基金项目 (gzwjw2026-285); 贵州省人民医院博士基金 (2024-34)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20251029-00532

Interferon regulatory factor 7 participates in hepatic ischemia-reperfusion injury via modulating non-classical pyroptosis pathway in mice

Chen Tao¹, Hou Jing¹, Gao Yuzhe¹, Deng Dewen², Zhang Jianjun³, Shen Zhongyang⁴¹Department of Breast Surgery, Guizhou Province People's Hospital, Guiyang 550002, China; ²Department of General Surgery, the First People's Hospital of Yunnan Province, Kunming 650032, China; ³Organ Transplant Department, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China; ⁴Institute of Transplantation Medicine Nankai University, Tianjin 300190, China

Corresponding author: Hou Jing, Email: hjhlingtong@163.com

【Abstract】 Objective To explore the role and mechanism of interferon regulatory factor 7 (IRF7) in regulating caspase-11-mediated non-canonical pyroptosis in mice hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI). **Methods** (1) Animal experiments: Thirty male 4- to 6-week-old C57BL/6 mice were randomly divided into a sham operation (Sham) group and reperfusion 2, 6, 12, and 24 hours groups, with six mice in each group. The reperfusion 2, 6, 12, and 24 h groups underwent a 70% hepatic ischemia-reperfusion (IR) model, which involved clamping the middle and left hepatic lobes with an arterial clamp for 1.5 hours, followed by blood flow reperfusion at 2, 6, 12, and 24 hours time points after releasing the clamp. The Sham group mice underwent laparotomy without vessel clamping. Liver tissue and serum were collected at 2, 6, 12, and 24 hours of reperfusion, and the mice were sacrificed. Transcriptomic sequencing and data analysis of liver tissue from the Sham group and reperfusion 6 hours group were performed using the Illumina sequencing platform. Immunohistochemical staining was followed by light microscopy to observe the positive expression of IRF7 in each group. Transmission electron microscopy was used to observe the ultrastructural changes in liver tissue cells in each group. Western blotting was used to detect the protein expression of IRF7, caspase-11, gasdermin D (GSDMD), GSDMD-N terminal domain (GSDMD-N), and interleukin-1 β (IL-1 β) in liver tissue from each group. (2) Cell experiments: The mouse AML-12 hepatocyte cell line was transfected with IRF7 overexpression plasmid, knockdown IRF7 plasmid (shIRF7), and corresponding empty vector (NC), respectively. The cells were then subjected to hypoxia/reoxygenation (H/R) treatment, and divided into the following groups: shIRF7 NC+H/R group, shIRF7+H/R group, IRF7 overexpression NC+H/R group, and IRF7 overexpression+H/R group. Western blotting was used to detect the protein expression of IRF7, caspase-11, GSDMD, GSDMD-N, and IL-1 β in each group of cells. Immunofluorescence double staining was followed by inverted fluorescence microscopy to observe the co-expression of caspase-11 and GSDMD in each group of cells. Inverted microscopy was used to observe the survival of cells in each group; the content of IL-1 β in the supernatant of each group of cells was measured. **Results** (1) Animal experiments: Preliminary findings from transcriptomics sequencing revealed that the expression of IRF7 mRNA in the 6-hour reperfusion group was significantly upregulated compared to the Sham group. Light microscopy showed that IRF7 was mainly localized in the cytoplasm and nucleus; at various time points during reperfusion, the expression of IRF7 in mouse liver tissue cells was upregulated compared to the Sham group, with the highest expression at 6 hours of reperfusion [IRF7 (A value): 0.59 ± 0.04 vs. 0.04 ± 0.01 , $P < 0.05$]. Transmission electron microscopy revealed that at various time points during reperfusion, mouse liver cells exhibited varying degrees of nuclear membrane damage and rupture, mitochondrial swelling, and cytoplasmic vacuolization, with the most pronounced changes observed at 6 hours of reperfusion. Compared to the Sham group, the protein expression of IRF7, caspase-11, GSDMD, GSDMD-N, and IL-1 β in mouse liver tissue was upregulated after reperfusion in all groups. Among these, the upregulation of IRF7, caspase-11, GSDMD, and GSDMD-N proteins was most pronounced in the 6 h reperfusion group [IRF7 protein (IRF7/GAPDH): 0.59 ± 0.06 vs. 0.38 ± 0.02 , caspase-11 protein (caspase-11/GAPDH): 0.42 ± 0.01 vs. 0.15 ± 0.01 , GSDMD protein (GSDMD/GAPDH): 0.60 ± 0.02 vs. 0.11 ± 0.01 , GSDMD-N protein (GSDMD-N/GAPDH): 0.66 ± 0.03 vs. 0.35 ± 0.03], while IL-1 β protein expression was most markedly upregulated in the 12 h reperfusion group (IL-1 β /GAPDH: 0.64 ± 0.01 vs. 0.15 ± 0.01), all $P < 0.05$. (2) Cell experiments: Compared to the IRF7 overexpression NC+H/R group, the protein expression of caspase-11, GSDMD, GSDMD-N, and IL-1 β was upregulated in the IRF7 overexpression+H/R group (all $P < 0.05$). Compared with the shIRF7 NC+H/R group, the shIRF7+H/R group exhibited downregulation in the protein expression of pyroptosis-related proteins caspase-11, GSDMD, GSDMD-N, and IL-1 β [caspase-11 protein (caspase-11/GAPDH): 0.59 ± 0.05 vs. 1.02 ± 0.06 , GSDMD protein (GSDMD/GAPDH): 0.87 ± 0.04 vs. 1.09 ± 0.05 , GSDMD-N protein (GSDMD-N/GAPDH): 0.38 ± 0.05 vs. 0.80 ± 0.04 , IL-1 β protein (IL-1 β /GAPDH): 0.81 ± 0.03 vs. 1.02 ± 0.03]. Additionally, the number of caspase-11/GSDMD double-positive cells decreased (average fluorescence intensity: 45.50 ± 6.59 vs. 61.83 ± 8.93), while the number of viable cells increased ($15\,549 \pm 1\,962$ vs. $9\,675 \pm 3\,460$), and the IL-1 β content in the cell supernatant decreased (ng/L: 147.60 ± 19.36 vs. 253.70 ± 23.96). All differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** IRF7 aggravates HIRI in mice, which may be related to the non-classical pyroptosis promotion mediated by caspase-11.

【Key words】 Interferon regulatory factor 7; Liver; Ischemia-reperfusion injury; Pyroptosis; Caspase-11

Fund program: Youth Guidance Project of Guizhou Provincial Science and Technology Department (QN-2025-291); Guizhou Provincial Health Commission Science and Technology Fund Project (gzwjw2026 285); Doctoral Foundation of Guizhou Provincial People's Hospital (2024-34)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20251029-00532

肝缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia-reperfusion injury, HIRI) 是机体缺血再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 损伤中的重要亚型, 其病因与肝脏急性、慢性缺血后, 短时间内快速血液灌流有关, 尤其指临床上肝脏相关的外科手术、外伤致部分或完全性入肝血流减少后复灌, 引发的一系列机体多器官微循环障碍及内环境紊乱的综合征^[1]。干扰素调节因子 7 (interferon regulatory factor 7, IRF7) 作为 IRF 家族

的重要一员, 具有免疫调控、肿瘤发生、机体代谢、细胞分化等广泛生物学功能^[2]。一项关于低温创伤性脑损伤的动物模型及转录组学测序研究表明, 瞬时二氧化碳 (carbon dioxide, CO₂) 吸入通过下调 IRF7 的表达介导脑 IR 神经损伤保护^[3], 提示其可能参与调控组织 IR 损伤。细胞焦亡即在细胞稳态扰动、感染及组织损伤等不同状态下, 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 (caspase-1、caspase-4/5/11) 等

蛋白活化并介导质膜破裂所致的重要细胞死亡模式^[4]。其中, caspase-4/5/11 (人体为 caspase-4/5, 小鼠为 caspase-11) 介导的细胞焦亡为非经典细胞焦亡, 不依赖于经典细胞焦亡炎性小体激活, 而是直接与脂多糖(lipopolysaccharide, LPS) 结合诱发 caspase-4/5/11 寡聚化和自身蛋白水解, 形成非经典炎性小体, 诱发细胞焦亡^[5]。既往研究全面解析了 IRF1 在 HIRI 中的调控机制^[6-7]。然而, IRF7 在 HIRI 的病理进展中扮演了何种角色, 是否通过 caspase-11 介导的非经典细胞焦亡途径参与 HIRI 鲜见报道。基于此, 本文将探讨 IRF7 对 HIRI 的调控机制, 尤其通过转录组数据挖掘结合实验证据, 阐明 IRF7 对 caspase-11 介导的非经典细胞焦亡通路的调控作用及其对 HIRI 的影响。

1 材料与方法

1.1 动物和细胞系: 30 只雄性 C57BL/6 小鼠, 4~6 周龄, 体质量 22~24 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司(动物合格证号: 110324231107059058)。所有动物均由天津市第一中心医院饲养。该研究已通过南开大学伦理委员会审批(审批号: 2023-SYDWLL-000615), 贵州省人民医院伦理委员会从伦理角度批准了该方案(审批号: 2025-217), 所有动物实验均符合美国国家卫生研究所指南。小鼠正常肝细胞系 AML-12 [经短串联重复序列(short tandem repeat, STR)图谱鉴定] 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 主要试剂: DMEM 细胞培养基和 0.25% 胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(ethylenediaminetetra-acetic acid, EDTA) 购自美国 Gibco 公司; 胎牛血清购自武汉普诺赛生命科技有限公司; IRF7 和 caspase-11 一抗购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; 消皮素 D(gasdermin D, GSDMD)、GSDMD-N 末端结构域(GSDMD-N terminal domain, GSDMD-N)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 购自江苏亲科生物研究中心有限公司; 3-磷酸甘油醛脱氢(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 和山羊抗兔免疫球蛋白 G(immunoglobulin G, IgG) 购自北京中杉金桥生物科技有限公司。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP) 山羊抗兔 IgG 购自武汉赛维尔生物科技股份有限公司; IL-1 β 检测试剂盒购自杭州联科生物科技股份有限公司。

1.3 动物分组及 HIRI 处理: 将小鼠随机分为 5 组, 分别为 Sham 组和再灌注 2、6、12、24 h 组, 每组 6 只。

小鼠术前 12 h 禁食不禁水, 用水合氯醛(30 mg/kg) 麻醉。参考相关文献及本课题组团队前期相关研究方法^[8]建立小鼠 HIRI 模型。将小鼠腹部切开, 暴露肝脏, 用无创血管夹阻断肝左叶和中叶血流(阻断约 70% 的入肝血流), 缺血 90 min (1.5 h) 后取出血管夹进行再灌注, 再灌注时间分别设为 2、6、12、24 h; Sham 组仅开腹暴露肝脏, 不夹闭血管。分别于再灌注 2、6、12、24 h 采集肝组织及血清。由于本课题组既往研究显示再灌注 6 h 小鼠的肝组织损伤最重^[8], 故选取 Sham 组和再灌注 6 h 组的肝中叶(损伤最重区域) 标本, 在 Illumina 测序平台(上海欧易生物科技有限公司) 进行转录组测序。所有小鼠在采集肝组织作为标本后, 以颈椎脱臼法实施安乐死。

1.4 AML-12 细胞缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R) 模型及分组: 将 AML-12 细胞分为敲低 IRF7 质粒(shIRF7)空载对照(NC)+H/R 组、shIRF7+H/R 组、IRF7 过表达 NC+H/R 组、IRF7 过表达+H/R 组。IRF7 过表达质粒、敲低表达质粒及相应的空载质粒均购自上海艾博思生物科技有限公司。将细胞接种至 6 孔板, 待细胞融合度达 60%~70% 时, 每孔加入 5 μ L Lipo3000 和 5 μ g 相应质粒进行细胞转染; 将细胞在 37 $^{\circ}$ C 的 5% CO₂ 培养箱中培养 6~10 h 后, 更换新鲜完全培养基, 继续培养 36 h 后弃去上清液。向每孔加入 2 mL Hanks 液, 将细胞置于专用缺氧培养箱中模拟缺血(缺氧) 状态。1.5 h 后, 除去 Hanks 液并加入 2 mL 新鲜完全培养基, 将细胞再次置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中 6 h, 以模拟再灌注(复氧) 状态。

1.5 免疫组织化学染色: 将石蜡包埋的肝组织切成 4 μ m 切片, 65 $^{\circ}$ C 干燥 2 h, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇(100%、95%、80%) 复水, 并用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline with Tween-20, PBST) 洗涤。于 95 $^{\circ}$ C 水浴中用柠檬酸缓冲溶液(pH 值为 6.0) 进行抗原修复 20 min, PBST 洗涤。3% 过氧化氢抑制内源性过氧化物酶活性 20 min, 洗涤后 10% 山羊血清封闭 1 h, 随后加入 IRF7 一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日, 二抗 IgG(H+L) 室温孵育 1 h, 二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB) 染色, 10% 苏木素复染 4 min, 洗涤、脱水、透明、封片。光学显微镜下观察肝组织染色, 使用 Image J 1.48V 软件统计分析细胞阳性率。

1.6 肝组织电镜亚显微观察: 动物模型制备结束后, 快速剪取约 3 mm $\times$ 3 mm 的肝碎块样本, 置于 0.01 mol/L PBS 中轻微振荡清洗 2 次, 轻取放入 1% 锇酸固定液中室温固定 2 h, 充分脱水后包埋。将包

埋好的蜡块寄至武汉迈斯普生物公司进行超薄切片及透射电镜负染色观察(10 000 倍)。

1.7 蛋白质免疫印迹试验(Western blotting):取小鼠肝组织匀浆后离心提取组织总蛋白,体外培养细胞则用刮刀刮取后离心收集细胞沉淀。用 RIPA 裂解液裂解细胞 30 min, 4 °C 下以 12 000 r/min 离心 30 min(离心半径 8.5 cm),收集上清液。通过 BCA 试剂盒(北京索莱宝科技公司)测量蛋白浓度。将样品与蛋白上样缓冲液混合,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)处理。将凝胶蛋白转移至聚偏二氟乙烯膜上,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,并在 4 °C 下分别与抗 IRF7、抗 caspase-11、抗 GSDMD、抗 GSDMD-N、抗 IL-1 β 和抗 GAPDH 抗体孵育过夜。二抗孵育 1 h 后清洗,用增强型化学发光液显影。使用 ImageJ 1.48V 软件测定并分析,以 GAPDH 为内参,以目的蛋白与 GAPDH 的灰度值比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.8 免疫双荧光染色:细胞爬片完成后(细胞融合度达到 70%~80%),根据爬片大小依次滴加适量鼠抗小鼠 caspase-11 一抗和兔抗小鼠 GSDMD 一抗,4 °C 孵育过夜。次日,将爬片置于摇床上,用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤后,避光条件下加入绿色荧光标记的抗鼠二抗和红色荧光标记的抗兔二抗,室温孵育 20 min。再次洗涤后,加入 5 mg/L 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)溶液避光孵育 10 min,复染细胞核, PBS 洗去多余染料。最后滴加防荧光淬灭剂,封片后置于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

1.9 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA):各组细胞上清液恢复至室温后,加入适量培养基稀释。按 IL-1 β 检测试剂盒使用说明书操作,每孔加入 100 μ L 细胞上清样本及 50 μ L 检测抗体进行孵育并洗板,之后加入 HRP-链霉亲和素(HRP-Streptavidin, HRP-SA)进行孵育并再次洗板,最后加入 100 μ L 显色底物显色后,加入 100 μ L 终止液。使用酶标仪检测 450 nm 处吸光度(absorbance, A)值,并根据标准曲线计算各组 IL-1 β 含量。

1.10 倒置荧光显微镜观察:将各组处理后的细胞置于倒置光学显微镜下,于 100 倍镜下选取合适视野,观察细胞存活状态并拍照,随后进行细胞计数。

1.11 统计学分析:使用 Graphpad Prism 9.5 软件进行统计分析并作图。计量资料服从正态分布,以均

数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析或独立样本 t 检验,多组间比较采用 Dunnett's 检验。检验水准 α 值取双侧 0.05。

2 结果

2.1 Sham 组与再灌注 6 h 组小鼠肝组织转录组学测序(图 1):与 Sham 组相比,再灌注 6 h 组 IRF7 的 mRNA 表达显著上调,细胞焦亡相关基因如 IL-18、IL-1 β 等可见上调。转录组学测序结果并未观察到 caspase-1 基因在两组中的表达差异。

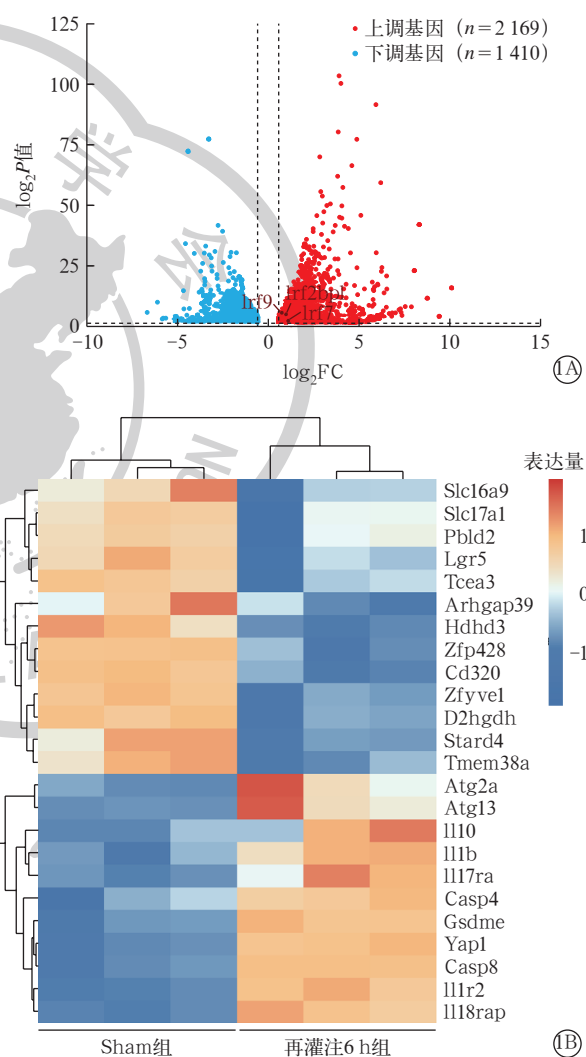


图 1 假手术(Sham 组)与再灌注 6 h 组小鼠肝脏的转录组测序火山图(A)和聚类图(B)

2.2 各组小鼠肝组织 IRF7 的表达(表 1;图 2):免疫组织化学染色提示 IRF7 主要定位于细胞质和细胞核中。再灌注各时间梯度内,IRF7 的表达均较 Sham 组上调(均 $P<0.05$)。再灌注 6 h 后,IRF7 的表达最显著,直至再灌注 24 h,IRF7 表达逐渐降低,呈现显著时间依赖性。

表 1 各组小鼠肝组织 IRF7 阳性表达水平比较(A 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	IRF7 阳性表达
Sham 组	6	0.04 ± 0.01
再灌注 2 h 组	6	0.14 ± 0.03 ^a
再灌注 6 h 组	6	0.59 ± 0.04 ^a
再灌注 12 h 组	6	0.39 ± 0.02 ^a
再灌注 24 h 组	6	0.17 ± 0.03 ^a
F 值		95.750
P 值		<0.001

注: Sham 为假手术, IRF7 为干扰素调节因子 7; ^a 与 Sham 组比较, $P < 0.05$

2.3 各组小鼠肝细胞焦亡变化情况(图 3): 透射电镜下显示, Sham 组肝细胞亚显微结构未见明显异常, 再灌注各组肝细胞均发生不同程度核膜损伤、破裂, 线粒体肿胀、胞质空泡化, 以再灌注 6 h 为著。

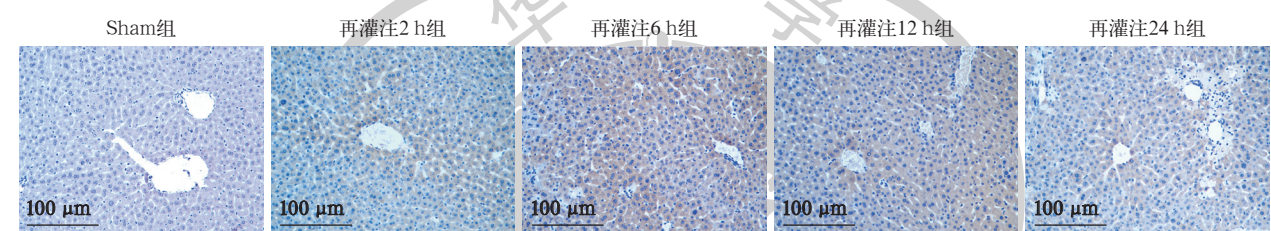


图 2 光镜下观察各组小鼠肝组织干扰素调节因子 7(IRF7) 表达 假手术(Sham) 组肝组织 IRF7 无明显表达; 再灌注 2、6、12、24 h 组 IRF7 表达均较 Sham 组显著增强, 以再灌注 6 h 表达最高; 再灌注 12 h 和 24 h 组随再灌注时间延长 IRF7 表达强度逐渐下降, 呈现时间依赖性 免疫组织化学染色 中倍放大

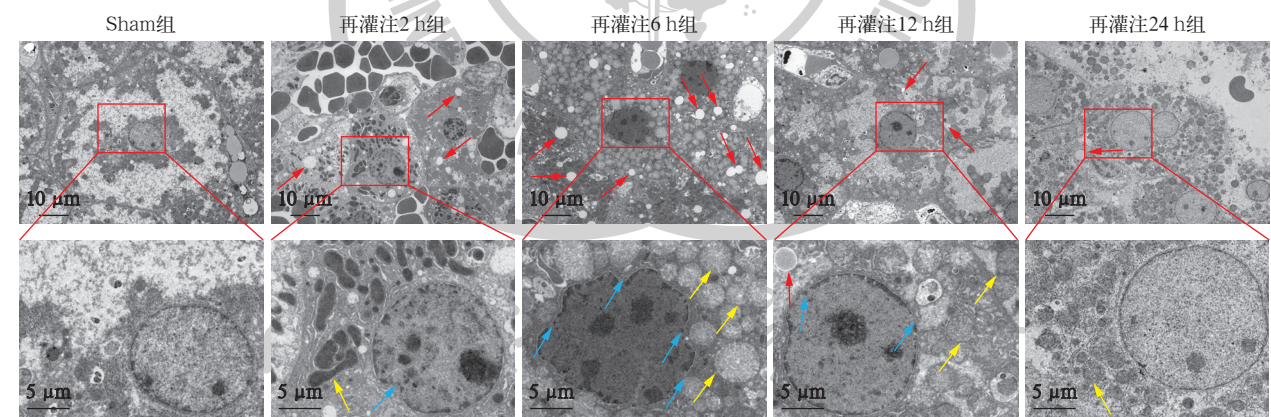


图 3 透射电镜下观察各组小鼠肝组织细胞焦亡变化 假手术(Sham) 组肝组织细胞的亚显微结构未见明显异常; 再灌注 2、6、12、24 h 组肝组织细胞内线粒体损伤逐渐加重, 可见线粒体肿胀、变形(黄色箭头所示), 核膜上破裂孔空隙逐渐增多(蓝色箭头所示), 胞质内因细胞破裂可见逐渐增多的空泡(红色箭头所示); 上述细胞焦亡性损伤改变以再灌注 6 h 为重, 直至再灌注 24 h 后逐渐减轻 钨酸盐染色 ×10 000

表 2 各组小鼠肝组织 IRF7、caspase-11、GSDMD、GSDMD-N、IL-1 β 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	IRF7 蛋白 (IRF7/GAPDH)	caspase-11 蛋白 (caspase-11/GAPDH)	GSDMD 蛋白 (GSDMD/GAPDH)	GSDMD-N 蛋白 (GSDMD-N/GAPDH)	IL-1 β 蛋白 (IL-1 β /GAPDH)
Sham 组	6	0.38 ± 0.02	0.15 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.35 ± 0.03	0.15 ± 0.01
再灌注 2 h 组	6	0.46 ± 0.02 ^a	0.37 ± 0.01 ^a	0.56 ± 0.02 ^a	0.33 ± 0.04	0.36 ± 0.02 ^a
再灌注 6 h 组	6	0.59 ± 0.06 ^a	0.42 ± 0.01 ^a	0.60 ± 0.02 ^a	0.66 ± 0.03 ^a	0.61 ± 0.03 ^a
再灌注 12 h 组	6	0.49 ± 0.02 ^a	0.25 ± 0.02 ^a	0.52 ± 0.01 ^a	0.52 ± 0.03 ^a	0.64 ± 0.01 ^a
再灌注 24 h 组	6	0.44 ± 0.06 ^a	0.38 ± 0.02 ^a	0.54 ± 0.01 ^a	0.58 ± 0.02 ^a	0.15 ± 0.00
F 值		28.100	180.100	660.600	97.200	826.900
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: Sham 为假手术, IRF7 为干扰素调节因子 7, caspase-11 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11, GSDMD 为消皮素 D, GSDMD-N 为 GSDMD-N 末端结构域, IL-1 β 为白细胞介素 -1 β , GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; ^a 与 Sham 组比较, $P < 0.05$

2.4 各组小鼠肝组织 IRF7、caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1 β 蛋白表达(表 2; 图 4): 与 Sham 组相比, 再灌注时间梯度内, IRF7、caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1 β 蛋白表达均升高(均 $P < 0.05$)。

2.5 IRF7 过表达+H/R 处理后 AML-12 细胞 caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1 β 蛋白表达(表 3; 图 5): 与 IRF7 过表达 NC+H/R 组相比, IRF7 过表达 +H/R 组 caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1 β 蛋白表达均上调(均 $P < 0.05$), 表明 IRF7 过表达可增强 caspase-11 介导的非经典细胞焦亡途径。

2.6 IRF7 敲低表达+H/R 处理后 AML-12 细胞 caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1 β 蛋白表达及 caspase-11/GSDMD 双荧光阳性细胞变化: 与 shIRF7

指标	Sham组	再灌注 2 h组	再灌注 6 h组	再灌注 12 h组	再灌注 24 h组	相对分 子质量
IRF7						55 000
caspase-11						45 000
GSDMD						53 000
GSDMD-N						30 000
IL-1β						30 000
GAPDH						37 000

注: Sham 为假手术, IRF7 为干扰素调节因子 7, caspase-11 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11, GSDMD 为消皮素 D, GSDMD-N 为 GSDMD-N 末端结构域, IL-1β 为白细胞介素-1β, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 4 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测各组小鼠肝组织 IRF7、caspase-11、GSDMD 和 IL-1β 蛋白表达

指标	IRF7过表达NC+ H/R组	IRF7过表达+ H/R组	相对分 子质量
caspase-11			43 000
GSDMD			53 000
GSDMD-N			30 000
IL-1β			30 000
GAPDH			37 000

注: IRF7 为干扰素调节因子 7, NC 为空载对照, H/R 为缺氧/复氧, caspase-11 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11, GSDMD 为消皮素 D, GSDMD-N 为 GSDMD-N 末端结构域, IL-1β 为白细胞介素-1β, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 5 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测 IRF7 过表达 NC+H/R 组与 IRF7 过表达+H/R 组 AML-12 细胞 caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1β 蛋白表达

NC+H/R 组相比, shIRF7+H/R 组 caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1β 蛋白表达均下调 (均 $P<0.05$; 表 4; 图 6), caspase-11/GSDMD 双荧光阳性细胞亦减少 ($P<0.05$; 表 5; 图 7)。表明抑制 IRF7 表达可减轻 caspase-11 介导的肝细胞焦亡。

指标	shIRF7 NC+ H/R组	shIRF7+ H/R组	相对分 子质量
caspase-11			43 000
GSDMD			53 000
GSDMD-N			30 000
IL-1β			30 000
GAPDH			37 000

注: shIRF7 为敲低干扰素调节因子 7, NC 为空载对照, H/R 为缺氧/复氧, caspase-11 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11, GSDMD 为消皮素 D, GSDMD-N 为 GSDMD-N 末端结构域, IL-1β 为白细胞介素-1β, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶

图 6 蛋白质免疫印迹试验 (Western blotting) 检测 shIRF7 NC+H/R 组与 shIRF7+H/R 组 AML-12 细胞 caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1β 蛋白表达

2.7 IRF7 敲低表达+H/R 处理后 AML-12 细胞存活情况 (表 5; 图 8): 倒置显微镜下显示, 与 Sham 组相比, 单独 H/R 处理后细胞存活数量减少, 细胞上清 IL-1β 含量增加 (均 $P<0.05$); 与 shIRF7 NC+H/R 组相比, shIRF7+H/R 组细胞存活数及存活率升高, 细胞上清 IL-1β 含量减少 (均 $P<0.05$)。表明抑制 IRF7 表达可有效改善肝细胞 H/R 所致的细胞损伤。

3 讨论

HIRI 是肝脏外科领域最常见且难以避免的手术相关并发症, 然而, 针对这一常见肝脏并发症的精准预防, 目前仍缺乏有效的干预手段。本课题组既往研究已证实, HIRI 在再灌注 6 h 时损伤最为严重, 且 IRF1 通过多重机制参与其病理进展^[7]。本研究通过对 HIRI 小鼠肝组织与未处理的正常肝组织进行配对转录组测序, 初步筛选发现 IRF 家族中的重要成员 IRF7 在 HIRI 组中显著上调, 其可能是诱导

表 3 各组 AML-12 细胞 caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1β 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (孔)	caspase-11 蛋白 (caspase-11/GAPDH)	GSDMD 蛋白 (GSDMD/GAPDH)	GSDMD-N 蛋白 (GSDMD-N/GAPDH)	IL-1β 蛋白 (IL-1β/GAPDH)
IRF7 过表达 NC+H/R 组	6	0.45 ± 0.03	0.60 ± 0.03	0.42 ± 0.02	0.55 ± 0.02
IRF7 过表达 +H/R 组	6	0.65 ± 0.05 ^a	0.79 ± 0.04 ^a	0.58 ± 0.04 ^a	0.72 ± 0.04 ^a

注: IRF7 为干扰素调节因子 7, NC 为空载对照, H/R 为缺氧/复氧, caspase-11 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11, GSDMD 为消皮素 D, GSDMD-N 为 GSDMD-N 末端结构域, IL-1β 为白细胞介素-1β, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; ^a 与 IRF7 过表达 NC+H/R 组比较, $P<0.001$

表 4 各组 AML-12 细胞 caspase-11、GSDMD、GSDMD-N 和 IL-1β 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数 (孔)	caspase-11 蛋白 (caspase-11/GAPDH)	GSDMD 蛋白 (GSDMD/GAPDH)	GSDMD-N 蛋白 (GSDMD-N/GAPDH)	IL-1β 蛋白 (IL-1β/GAPDH)
shIRF7 NC+H/R 组	6	1.02 ± 0.06	1.09 ± 0.05	0.80 ± 0.04	1.02 ± 0.03
shIRF7+H/R 组	6	0.59 ± 0.05 ^a	0.87 ± 0.04 ^a	0.38 ± 0.05 ^a	0.81 ± 0.03 ^a

注: shIRF7 为敲低干扰素调节因子 7, NC 为空载对照, H/R 为缺氧/复氧, caspase-11 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11, GSDMD 为消皮素 D, GSDMD-N 为 GSDMD-N 末端结构域, IL-1β 为白细胞介素-1β, GAPDH 为 3-磷酸甘油醛脱氢酶; ^a 与 shIRF7 NC+H/R 组比较, $P<0.001$

表 5 各组 AML-12 细胞 caspase-11/GSDMD 双阳性细胞数、细胞存活数和上清 IL-1 β 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	孔数(孔)	caspase-11/GSDMD 双阳性(平均荧光强度)	细胞存活数量(个)	IL-1 β (ng/L)
Sham 组	6	2.16 $\pm$ 1.72	45 438 $\pm$ 8 171	14.80 $\pm$ 2.15
H/R 组	6	66.50 $\pm$ 11.78 ^a	8 966 $\pm$ 3 573 ^a	262.40 $\pm$ 40.10 ^a
shIRF7 NC+H/R 组	6	61.83 $\pm$ 8.93	9 675 $\pm$ 3 460	253.70 $\pm$ 23.96
shIRF7+H/R 组	6	45.50 $\pm$ 6.59 ^b	15 549 $\pm$ 1 962 ^b	147.60 $\pm$ 19.36 ^b

注:Sham 为假手术, H/R 为缺氧/复氧, shIRF7 为敲低干扰素调节因子 7, NC 为空载对照, caspase-11 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11, GSDMD 为消皮素 D, IL-1 β 为白细胞介素-1 β ; ^a 与 Sham 组比较, $P<0.05$; ^b 与 shIRF7 NC+H/R 组比较, $P<0.05$

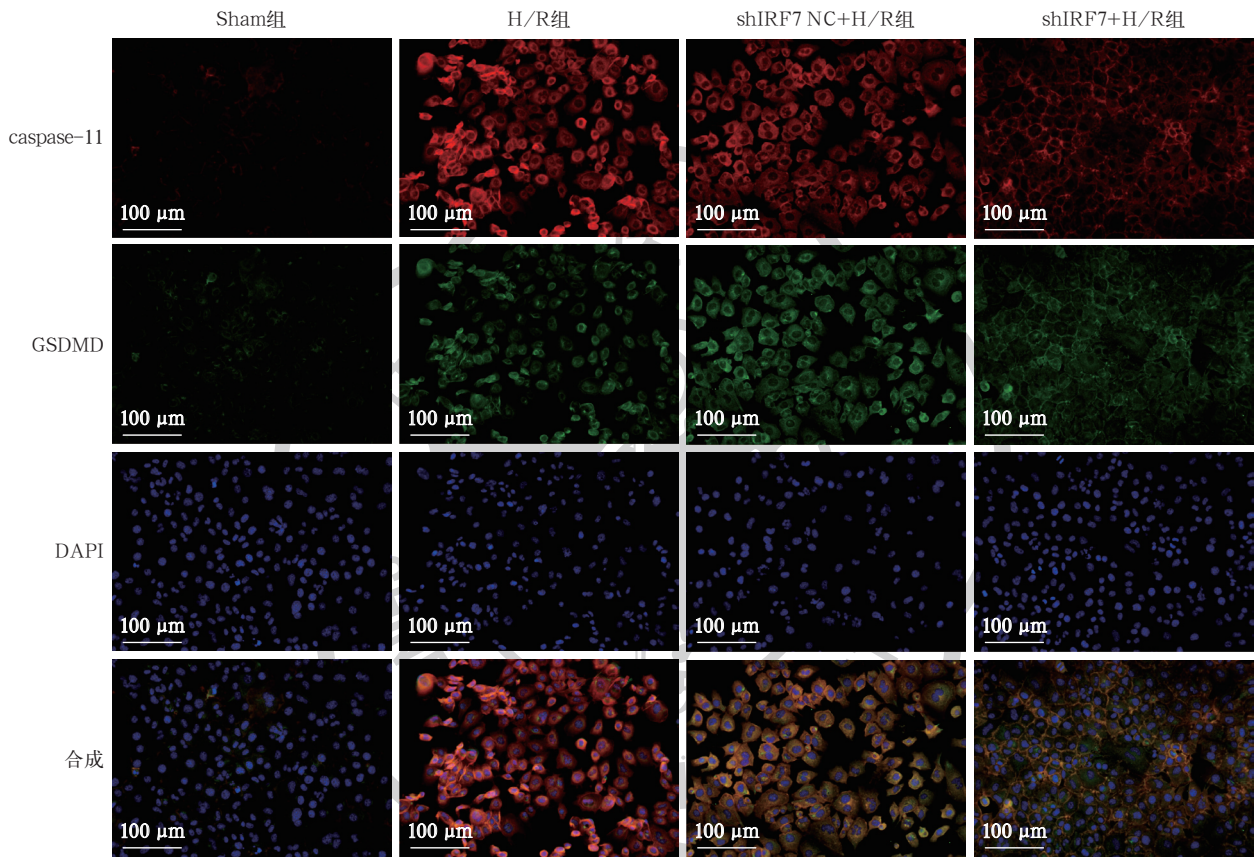


图 7 倒置荧光显微镜下观察各组 AML-12 细胞天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 11(caspase-11)/消皮素 D(GSDMD)双阳性表达 caspase-11 呈绿色荧光, GSDMD 呈红色荧光, 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染细胞核呈蓝色荧光;假手术(Sham)组 caspase-11 和 GSDMD 荧光强度弱, 呈显著低表达;缺氧/复氧(H/R)组 caspase-11 及 GSDMD 共定位, 免疫荧光双阳性染色强度显著增强;敲低干扰素调节因子 7(shIRF7)+H/R 组 caspase-11 及 GSDMD 共定位减少, 双荧光染色强度较 H/R 组显著减弱 免疫双荧光染色 中倍放大

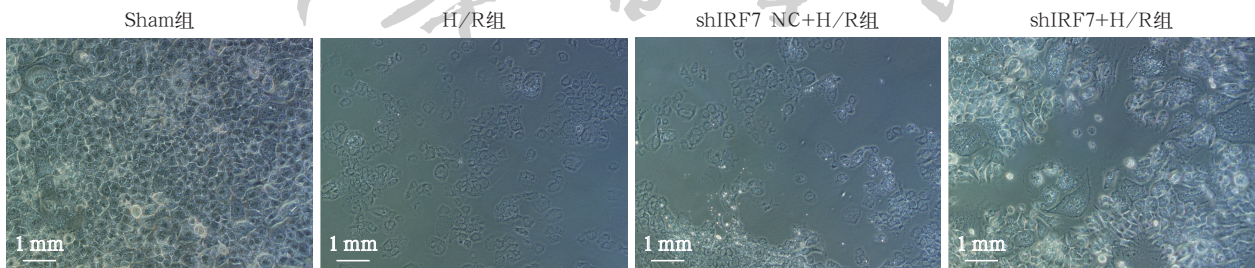


图 8 倒置显微镜下观察各组 AML-12 细胞存活情况 假手术(Sham)组细胞生长良好, 细胞肿胀死亡少见;缺氧/复氧(H/R)组细胞存活数量显著减少, 且细胞肿胀, 细胞焦亡形态显著增加;敲低干扰素调节因子 7(shIRF7)+H/R 组细胞存活数量较 H/R 组显著增加, 细胞焦亡显著改善 低倍放大

HIRI 的关键转录因子。IRF7 作为一种重要的干扰素调节因子, 在正常细胞中广泛低表达, 当细胞受到外界病原体刺激后, 其被激活以诱导干扰素释放并刺激干扰素调节基因激活, 发挥其免疫功能^[2]。

Chen 等^[8]通过生物信息学分析联合体内验证, 鉴定出包括 IRF7 在内介导肠 IR 损伤的 10 种基因, 提示 IRF7 可能在介导组织 IR 损伤中发挥关键作用。此外, 一项关于脐带间充质干细胞外泌体治疗肾 IR 损

伤的动物研究显示, IRF7 可能参与肾 IR 损伤的病理生理进展^[9]。本研究通过实验证实, IRF7 作为损伤性因子, 可通过促进肝细胞焦亡, 加重 HIRI。

非经典细胞焦亡途径并不依赖炎性小体刺激, 而是通过活化的 caspase-4/5/11 直接裂解 GSDMD 蛋白, 诱导细胞膜穿孔破裂, 进而反馈性激活 NLRP3 炎性小体, 诱发级联式炎性信号传导。有研究显示, 活化的 caspase-4/5/11 同样可切割加工前体 IL-18 和 IL-1 β , 促进二者释放并产生炎性反应, 提示 caspase-4/5/11 诱导的非经典细胞焦亡可能伴随更强烈的炎性反应^[10]。细胞焦亡途径激活是参与 HIRI 的重要机制, 以细胞焦亡机制为靶点的干预措施可能是临床治疗组织 IR 损伤的潜在途径^[11]。本研究显示, 在 HIRI 小鼠模型中, 细胞焦亡同样呈现时间依赖性, 于再灌注 6 h 达到峰值, 这一变化规律与 IRF7 表达趋势及既往 HIRI 相关研究结论一致, 提示 IRF7 可能参与调控 HIRI 过程中细胞焦亡表型的改变。

为进一步证实 IRF7 对细胞焦亡的调控作用, 本研究构建体外 AML-12 小鼠肝细胞 H/R 模型, 转染过表达 IRF7 质粒后, AML-12 细胞内细胞焦亡水平显著增强; 反之, 转染 shIRF7 质粒后, 细胞焦亡受到抑制, 细胞存活率升高。值得注意的是, 抑制 IRF7 表达后, caspase-11、GSDMD、IL-1 β 等非经典细胞焦亡基因表达显著减少, caspase-11/GSDMD 双荧光阳性细胞亦显著减少。提示在 HIRI 病理进展过程中, IRF7 对 caspase-11/GSDMD 细胞焦亡信号轴存在潜在调控作用, 然而究竟是通过何种靶基因调控仍有待进一步探索。除肝细胞焦亡外, 既往研究亦提示, 抑制巨噬细胞及 Kupffer 细胞等免疫细胞的焦亡, 可能是改善 HIRI 的重要手段^[12]。Li 等^[13]的研究则进一步说明, 骨髓源性细胞中 GSDMD 的敲除(而非肝细胞 GSDMD 敲除)是改善 HIRI 的关键, 提示免疫细胞焦亡的抑制策略可能是治疗 HIRI 的潜在途径。基于上述研究, IRF7 是否通过调控免疫细胞焦亡参与 HIRI, 值得进一步探讨。

综上所述, IRF7 可能是加重 HIRI 的损伤性因子, 其机制可能与促进 caspase-11 转录激活, 进而诱导 GSDMD 表达及 IL-1 β 等炎性因子释放, 促发过度细胞焦亡有关。本研究的发现为后续临床相关 HIRI 的防治措施的完善提供了新的干预靶点。然而, 本研究仍存在一定局限性, 首先, 本研究仅从肝细胞焦亡的角度分析了 IRF7 对非经典细胞焦亡通路的调控, 未能进一步阐明 IRF7 通过何种靶分子调

控 caspase-11/GSDMD 细胞焦亡轴, 且 IRF7 是否通过调控肝脏免疫细胞的细胞焦亡参与 HIRI 进展仍有待验证; 其次, 本研究仅在动物模型和动物细胞系中进行验证, 缺乏人体标本、人源肝细胞系、类器官模型的交叉验证; 最后, 本研究仅讨论了 IRF7 对 HIRI 的调控机制, 是否调控 HIRI 所致的全身多器官损伤及相关急重症疾病的演进, 仍有待进一步研究。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

作者贡献声明 陈涛: 酝酿和设计实验、实施研究、采集数据、分析/解释数据、起草文章、统计分析、获取研究经费; 侯净、高宇哲: 酝酿和设计实验, 分析/解释数据, 对文章的知识性内容作批评性审阅, 统计分析, 获取研究经费, 行政、技术或材料支持; 邓德文、张建军、沈中阳: 酝酿和设计实验、实施研究、起草文章、统计分析、获取研究经费

参考文献

- [1] 窦科峰, 张玄, 杨志鹏. 中国肝移植的发展与挑战[J]. 中华外科杂志, 2024, 62(1): 1-5. DOI: 10.3760/cma.j.cn112139-20231030-00202.
- [2] Ma W, Huang G, Wang Z, et al. IRF7: role and regulation in immunity and autoimmunity[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1236923. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1236923.
- [3] Fu SP, Yu ML, Xu HX, et al. Genome-wide transcription analysis of electroacupuncture precondition-induced ischemic tolerance on SD rat with ischemia-reperfusion injury[J]. Front Genet, 2021, 12: 719201. DOI: 10.3389/fgene.2021.719201.
- [4] Li SP, He JD, Xu HW, et al. Autophagic activation of IRF-1 aggravates hepatic ischemia-reperfusion injury via JNK signaling[J]. MedComm (2020), 2021, 2(1): 91-100. DOI: 10.1002/mco2.58. Erratum in: MedComm (2020), 2023, 4(3): e266. DOI: 10.1002/mco2.266.
- [5] Barnett KC, Li S, Liang K, et al. A 360° view of the inflammasome: Mechanisms of activation, cell death, and diseases[J]. Cell, 2023, 186(11): 2288-2312. DOI: 10.1016/j.cell.2023.04.025.
- [6] Yu Y, Li SP, Wang Z, et al. Interferon regulatory factor-1 activates autophagy to aggravate hepatic ischemia-reperfusion injury via the P38/P62 pathway in mice[J]. Sci Rep, 2017, 7: 43684. DOI: 10.1038/srep43684.
- [7] Chen T, Li SP, Deng DW, et al. Key role of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) in regulating liver disease: progress and outlook[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2024, 25(6): 451-470. DOI: 10.1631/jzus. B2300159.
- [8] Chen FS, Wang D, Li XQ, et al. Molecular mechanisms underlying intestinal ischemia/reperfusion injury: bioinformatics analysis and in vivo validation[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e927476. DOI: 10.12659/MSM.927476.
- [9] He JH, Yao YW, Wang RY, et al. Enhanced renal ischemia/reperfusion injury repair potential of exosomes derived from B7-H1high mesenchymal stem cells[J]. Front Genet, 2025, 16: 1516626. DOI: 10.3389/fgene.2025.1516626.
- [10] Devant P, Dong Y, Mintseris J, et al. Structural insights into cytokine cleavage by inflammatory caspase-4[J]. Nature, 2023, 624(7991): 451-459. DOI: 10.1038/s41586-023-06751-9. Erratum in: Nature, 2024, 625(7995): E17. DOI: 10.1038/s41586-023-06942-4.
- [11] Zheng Y, Xu XD, Chi FL, et al. Pyroptosis: a newly discovered therapeutic target for ischemia-reperfusion injury[J]. Biomolecules, 2022, 12(11): 1625. DOI: 10.3390/biom12111625.
- [12] Wu XY, Chen YJ, Liu CA, et al. STING induces liver ischemia-reperfusion injury by promoting calcium-dependent caspase 1-GSDMD processing in macrophages[J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 8123157. DOI: 10.1155/2022/8123157.
- [13] Li JC, Zhao J, Xu M, et al. Blocking GSDMD processing in innate immune cells but not in hepatocytes protects hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(4): 244. DOI: 10.1038/s41419-020-2437-9.

(收稿日期: 2025-10-29)

(本文编辑: 张耘菲)