

大鼠自体原位肝移植 24 h 后肝内硫氧还蛋白-2 的表达和抗氧化能力的变化

王艳玲¹, 朱琼芳², 高婉菱¹, 葛 緬¹, 张瑗兰¹, 池信锦¹, 黑子清^{1*}

(中山大学 1. 附属第三医院麻醉科, 广东 广州 510630; 2. 附属第一医院麻醉科恢复室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨线粒体硫氧还蛋白(Trx2)和抗氧化能力在原位自体原位肝移植(AOLT)大鼠后 24 h 内肝脏组织动态变化。【方法】将 40 只雄性 SD 大鼠随机均分为假手术组(Group S, $n = 8$)、肝移植后 4 h 组(LTR 4h group, $n = 8$)、肝移植后 8 h 组(LTR 8h group, $n = 8$)、肝移植后 16 h 组(LTR 16h group, $n = 8$)和肝移植后 24 h 组(LTR 24h group, $n = 8$)。S 组只进行开腹和血管的分离,各肝移植组接受自体原位肝移植(AOLT),光镜下观察各组大鼠肝脏病理学改变,Suzuki 病理学评分改变,实验室检测活性氧水平、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽(GSH)活性、总抗氧化能力(TOC)变化、及 Western Blot 法检测 Trx-2 的蛋白表达的变化。【结果】自体肝移植引起了大鼠明显的肝脏损伤,组织病理评分在移植后 4 h 明显升高并达峰值,持续到移植后 24 h ($P < 0.05$, vs. group S),但 24 h 较 4 h 有明显改善 ($P < 0.05$ vs. group LTR4h); $O_2 \cdot$ 、 $\cdot OH$ 和 MDA 的生成在 4 h 到 16 h 增加明显(1.6 ~ 2.0 倍),MDA 水平发生与之一致的时间变化 ($P < 0.05$ vs. group S);抗氧化酶活性在肝移植后 4 h 和 8 h 下降明显,SOD、CAT 和 GSH 活性下降达 30% ($P < 0.05$ vs. group S),TOC 活性下降达 70% ($P < 0.01$ vs. group S)。而相对氧化/抗氧化指标来讲,移植后肝脏组织内 Trx-2 蛋白表达增高的速度较慢,4 h 开始表达增加 ($P < 0.05$ vs. group S),而直到 24 h 才达到蛋白表达峰值(~ 2.0 倍)。【结论】移植后肝脏发生损伤,并逐渐加重而后逐渐恢复,损伤程度与活性氧水平和抗氧化酶活性变化趋势相一致;Trx-2 的表达上调有利于抗氧化酶合成和提高抗氧化能力。

关键词: 肝移植; 硫氧还蛋白-2; 抗氧化酶

中图分类号: R657.3

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)06-0775-06

Patterns of Alteration to Thioredoxin-2 Expression and Antioxidant Capacity during 24 h in Liver Tissue Subjected to Autologous Orthotopic Liver Transplantation in Rats

WANG Yan-ling¹, ZHU Qiong-fang², GAO Wan-ling¹, GE Mian¹, ZHANG Ai-lan¹, CHI Xin-jin¹, HEI Zi-qing^{1*}

(1. Department of Anesthesiology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;

2. PACU, Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 Mitochondria thioredoxin (thioredoxin 2) and its modulated antioxidant enzymes compose the critical endogenous antioxidant system in human body to scavenge reactive oxygen species (ROS). We aimed to investigate the patterns of alteration to thioredoxin2 expression and antioxidants capacity in liver tissue during 24 h after liver transplantation in rats. 【Methods】 Forty Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into sham group, and 4, 8, 16, and 24 h after autologous orthotopic liver transplantation (AOLT) group. Rats in sham group only suffered from the process of laparotomy and vascular separation, while in other groups all subjected to AOLT. Liver tissues were collected for detection of pathological changes by light microscope, Trx2 expressions by Western blot, and changes of ROS levels and activities of antioxidants. 【Results】 AOLT resulted in severe liver injury in rats during 24 hours after reperfusion manifested as significant elevations in liver pathological scores as early as 4 hours after AOLT. There was also obvious oxidative damage that was evidenced with 1.6 to 2.0 fold increases of $O_2 \cdot$ or $\cdot OH$ and MDA levels, accompanied with significant decreases (~30%) in the activity of SOD or catalase and a dramatic (~70%) decrease in level of TOC at 4 h and 8 h ($P < 0.01$ vs. Sham group). All the parameters restored gradually at 16 and 24 hours after AOLT. The expression of Trx2 in liver increased significantly as early as 4 hours and peaked at 24 hours after AOLT (~2.0 fold) ($P < 0.05$ vs. Sham group). 【Conclusion】 AOLT could result in severe liver injury, the extent of which coincidence with the oxidant/antioxidant system state

收稿日期: 2012-07-31

基金项目: 广州市科技计划项目(2011J4300056)

作者简介: 王艳玲, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 肝移植围术期器官保护, E-mail: wyl-5120@163.com; * 通信作者: 黑子清, 教授, 博士研究生导师, E-mail: heiziqing@sina.com

manifested as exacerbating first and then alleviating gradually. Up-regulation of Trx2 expression was beneficial to synthesizing antioxidants and further enhancing the antioxidant capacity of liver tissue subjected to ischemia/reperfusion injury during AOLT.

Key words: liver transplantation; thioredoxin 2; antioxidant

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(6): 775-780]

肝移植手术中, 供体肝脏经历了明显的缺血再灌注过程, 研究证实氧化应激最早参与这一损伤过程^[1]。活性氧(reactive oxygen species, ROS)引起氧化损伤, 而抗氧化酶可以清除活性氧以减轻氧化损伤^[2-4]。并且研究证实, 活性氧引起的氧化损伤主要发生在损伤早期, 其中 24 h 内是活性氧作用的主要时期^[5-6]。然而, 到目前为止, 供肝氧化损伤过程中 ROS 和抗氧化酶活性在移植后 24 h 内的动态变化尚无系统性研究。线粒体型硫氧还蛋白(mitochondria thioredoxin, Trx2)是线粒体内重要的抗氧化调节蛋白, 通过分子内巯基/二硫键的相互转换来实现其氧化还原的调节功能, 调控机体的内源性抗氧化能力^[7]。目前尚不明确 Trx2 在肝移植后肝组织内的变化而不利于损伤的防治。本研究旨在探讨 Trx2 及其所调节的抗氧化酶活性在自体原位肝移植 (autologous orthotopic liver transplantation, AOLT) 大鼠模型移植后 24 h 内肝组织中的变化, 有助于制定预防移植后肝损伤的策略。

1 材料与方 法

1.1 材 料

健康 SPF 级 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠 40 只, 质量 220 ~ 280 g, 购自广东省实验动物中心。兔抗小鼠 Trx2 多克隆抗体 (Santa Cruz, 美国); 羊抗兔 IgG 抗体 (Biotium, 美国); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、还原型谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、总抗氧化能力 (total antioxidative capacity, TOC) 活性测定试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司), 羟自由基 (hydroxy radical, $\cdot\text{OH}$) 和超氧阴离子 (superoxide anion, $\text{O}_2\cdot$) 及丙二醛 (malonaldehyde, MDA) 测定试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司), BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (南京凯基生物科技发展有限公司)。

1.2 实验分组和动物模型的建立

SD 大鼠随机分为假手术组 (Sham operated

group, S group)、肝移植后 4 h 组 (LTR4h group)、肝移植后 8 h 组 (LTR8h group)、肝移植后 16 h 组 (LTR16h group) 和肝移植后 24 h 组 (LTR24h group)。假手术组的大鼠在麻醉后只进行开腹和血管的分离, 各移植组的动物接受大鼠 AOLT 术。

1.3 自体原位肝移植动物模型的建立

大鼠常规禁食 12 h, 自由饮水; 给予乙醚吸入麻醉后, 将大鼠固定在自制的手术台上; 腹部备皮、消毒, 采用腹部正中切口入腹, 暴露胸骨柄及剑突后, 用自制拉钩拉开腹壁; 进入腹腔后逆时针方向游离肝脏, 先切断左三角韧带, 结扎、切断左膈静脉; 然后向左翻转肝脏, 并使用大小合适的湿纱布保护肝脏; 进一步打开右侧后腹膜, 在下腔静脉深面游离肝裸区, 解剖出肝上下腔静脉; 游离出右肾上腺静脉, 予以结扎; 在恢复肝脏解剖位置后进一步游离肝下腔静脉; 暴露第一肝门后, 剪开肝十二指肠韧带, 从脾静脉和肠系膜下静脉汇合处向上游离门静脉到肝门部, 并将门静脉壁鞘膜分离干净; 因为肝动脉和胆管关系紧密, 将两者一起进行游离。在进行阻断前, 经尾静脉注射肝素生理盐水 1 mL, 然后在肝动脉、脾静脉和肠系膜上静脉汇合处夹上微血管夹, 使用 4 号针头刺入门静脉, 推注肝素盐水 (25 U/mL) 3 mL, 从而使肝内血液进入体循环, 固定针头。开始冷灌注前, 分别在肝上下腔静脉和肝下下腔静脉上微血管夹; 并且在肝下下腔静脉血管夹稍上方的静脉壁剪开大约 1 mm, 作为灌注液的流出道, 热缺血约 2 min。使用静脉输液泵以 2 mL/min 的速度经门静脉穿刺处缓慢持续灌注 (0~4)°C 肝素醋酸林格液 (12.5 U/mL) 20 mL, 灌注的同时给予冰生理盐水浇注肝脏表面以降温, 当肝脏颜色全部变为土黄色表示灌注完成。在灌注完毕后拔出穿刺针, 分别使用 9-0 Prolene 线及 8-0 Prolene 线修补门静脉穿刺点和肝下下腔静脉流出道, 在检查确认修补成功后, 分别松开各处微血管夹, 结束无肝期 [(20±1) min], 此时代表自体原位肝移植完成^[8-9]。之后给予温热生理盐水浇注肝脏进行快速复温。仔细止血后, 腹腔内使用庆大霉素生理盐水 (800 U/mL) 1

mL,最后行连续全层缝合腹壁切口。使用台灯照射至大鼠苏醒,自由饮水。

1.4 肝脏组织病理检查

自体肝移植后将大鼠处死,观察肝脏大体形态后取部分肝组织作为标本。甲醛溶液固定,常规石蜡包埋、切片和HE染色,光镜下观察肝脏病理结构变化。肝脏组织病理变化采用Suzuki法^[10]进行评分:评分标准根据肝窦状隙的水肿、淤血、阻塞,肝细胞的坏死、空泡样变的程度分为5级。

1.5 肝脏组织匀浆和蛋白浓度测定

取出肝脏,用生理盐水冲洗3次,除去血液,剥掉表面的结缔组织和脂肪,剪碎后用生理盐水反复洗涤至无血色,然后再加生理盐水少许,用组织捣碎机以15 000 r/min速度研磨成10%组织匀浆。将肝组织匀浆装入离心管内(1/3左右),-20℃冰箱保存。以BCA法测定组织总蛋白浓度。

1.6 检测指标

1.6.1 $\cdot\text{OH}$ 、 $\text{O}_2\cdot$ 和MDA水平 Fenton反应是常用的产生羟自由基的化学反应, H_2O_2 的量和Fenton反应产生的 $\cdot\text{OH}$ 量成正比,当给予电子受体后,通过gross试剂显色,生成红色物质或紫红色,测定其吸光度可计算出 $\cdot\text{OH}$ 或 $\text{O}_2\cdot$ 的含量。使用南京凯基生物科技发展有限公司的试剂盒,操作按说明书要求进行。用硫代巴比妥酸比色法测定MDA水平。

1.6.2 SOD、CAT、GSH活性和TOC测定 GSH活性测定采用二硫代二硝基苯甲酸法,SOD活性测定采用黄嘌呤氧化酶法,CAT活性测定采用钼酸铵法,TOC测定采用化学比色法。按照试剂盒说明进行。

1.6.3 肝脏组织Trx-2蛋白表达 聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、5 mL/L脱脂奶粉封闭后,加入1:200兔抗小鼠Trx-2抗体,脱色摇床上4℃过夜,弃去一抗。加入1:2 000羊抗兔IgG抗体,室温下1 h,显色。用BIO-RAD公司的Quantity one软件对Western blot结果进行图像分析,并量化了Western blot的结果。

1.7 统计学处理

所有数据使用SPSS 16.0软件处理。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)进行统计描述,组间均数的比较使用单因素方差分析;组间比较用方差分析法。等级资料采用秩和分析, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 移植后各时点肝脏病理变化

S组肝脏组织形态基本正常(图1A);LTR4h组可见明显的肝细胞肿胀,肝窦变窄,肝窦状隙的水肿淤血阻塞,嗜中性粒细胞浸润和片状坏死区域,肝细胞空泡样变明显,肝脏组织结构遭到破坏(图1B);LTR8h和LTR16h组多数肝细胞发生肿胀,肝窦状隙淤血,部分肝细胞坏死及空泡样变,少量中性粒细胞聚集(图1C,D);LTR24h组肝脏组织损伤明显减轻,仅表现为肝窦状隙轻度的淤血肿胀,少量肝细胞坏死和空泡样变(图1E)。

自体肝移植后各时点肝损伤评分增高($P<0.05$ vs. S group),4 h时达高峰,后逐渐下降,24 h肝损伤低于4 h和8 h($P<0.05$,图1F)。

2.2 移植后肝脏组织内 $\cdot\text{OH}$ 和 $\text{O}_2\cdot$ 水平的变化

自体肝移植后大鼠肝组织各时点羟自由基($\cdot\text{OH}$)和超氧阴离子($\text{O}_2\cdot$)水平增加,移植后4、8、16 h时点显著高于假手术组水平(1.6~2.0倍; $P<0.05$ vs. group S;图2A,B)。

2.3 肝脏组织MDA水平的变化

与假手术组相比,MDA水平在移植后各时点均升高,其中4、8和16 h有统计差异($P<0.05$ vs. group S),4 h时为最高值(~1.4倍;图3)。

2.4 肝脏组织抗氧化酶活性变化

自体肝移植后各时点大鼠肝脏内抗氧化酶SOD、CAT、GSH活性和TOC均下降,其中4和8 h差异有意义,SOD、CAT活性最低下降达30%,GSH最低达50%($P<0.05$ vs. group S),TOC活性下降达70%($P<0.01$ vs. group S);SOD活性在肝移植后16 h明显高于8 h($P<0.05$ vs. group LTR8h);CAT活性到24 h时明显高于8 h($P<0.05$ vs. group LTR8h);自体肝移植后16和24 h TOC活性高于自体肝移植后4和8 h($P<0.05$);自体肝移植后16、24 h GSH活性高于自体肝移植后4和8 h($P<0.05$;图4A-D)。

2.5 肝脏组织Trx-2蛋白表达

自体原位肝移植后4 h开始各点Trx2的表达均明显上调($P<0.05$ vs. group S),到移植后24 h Trx2蛋白表达至峰值(~2.0倍; $P<0.01$, each group vs. Group LTR24h;图5)。

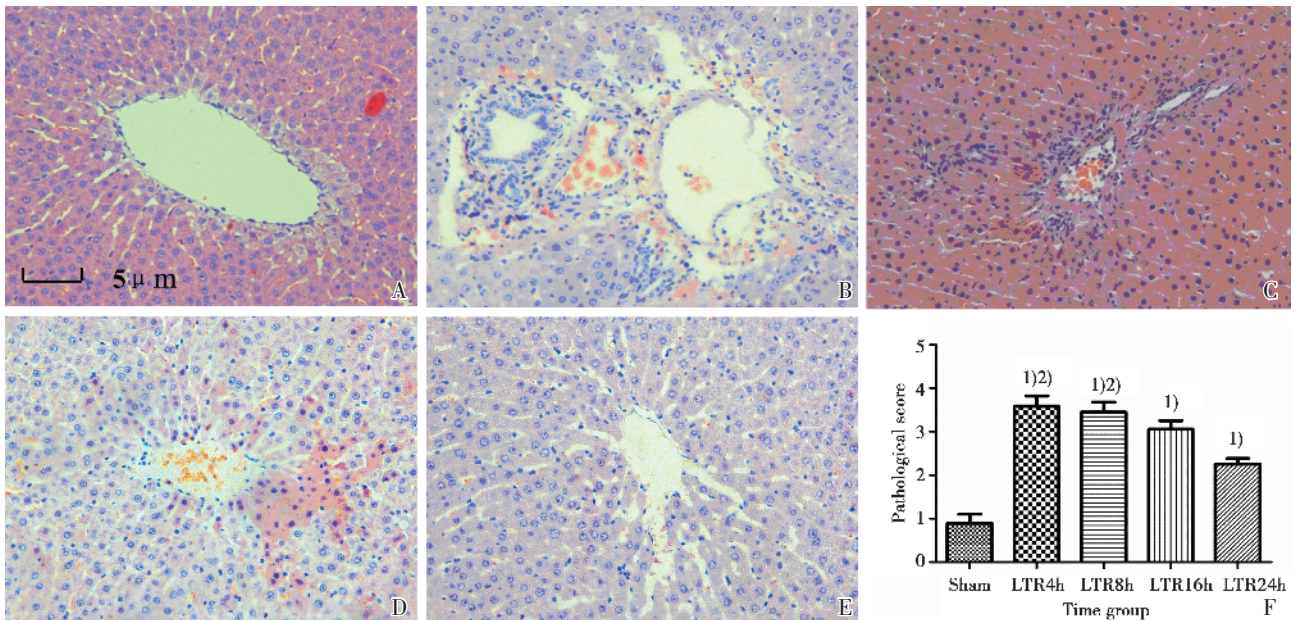


图 1 大鼠自体原位肝移植后不同时间点肝脏组织病理学改变与评分图

Fig.1 Changes of pathology and its score at different time points in liver tissue

A: the pathological figure of rat liver in sham group; B: the pathological figure of rat liver at 4h after AOLT; C: the pathological figure of rat liver at 8 h after AOLT; D: the pathological figure of rat liver at 16 h after AOLT; E: the pathological figure of rat liver at 24 h after AOLT; F: the pathological score of rat liver at different times after AOLT; data represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 8$, 1) $P < 0.05$, vs. Group Sham, 2) $P < 0.05$, vs. Group LTR4h.

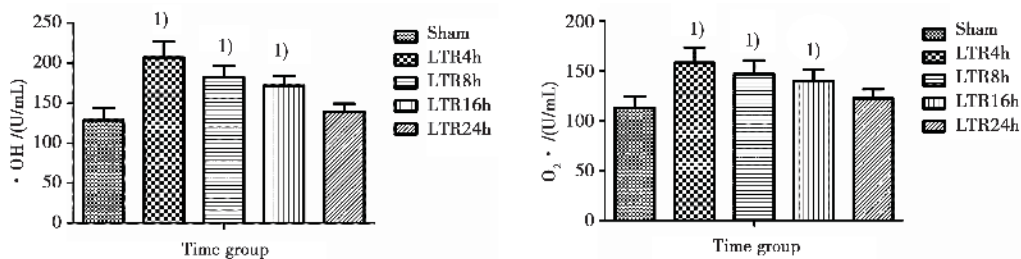


图 2 大鼠自体原位肝移植后不同时期肝脏组织内·OH 和 O₂·水平的变化图

Fig.2 Changes of the level of ·OH and O₂· in liver tissue at different time points after liver transplantation

A and B were for hydroxylradicals and superoxide anion respectively. Data represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 8$, 1) $P < 0.05$ vs. Group Sham.

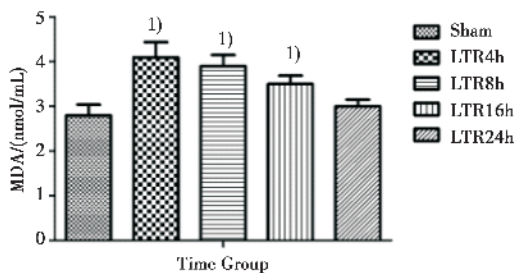


图 3 大鼠自体原位肝移植后不同时期肝脏组织内 MDA 水平的变化

Fig.3 Changes of the level of MDA in liver tissue at different time points after liver transplantation

Data represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 8$, 1) $P < 0.05$ vs. Group Sham.

3 讨论

缺血再灌注损伤是导致移植后肝脏功能受损的主要原因之一，目前研究认为缺血再灌注损伤的机制主要包括氧化应激、炎症介质过度释放、细胞凋亡、微循环障碍等^[11]，其中 ROS 介导的氧化损伤主要发生在缺血再灌注后的早期，在再灌注 4 ~ 6 h 达到高峰，并持续作用于后期，进而加重后期的炎症反应，导致炎症瀑布发生。本研究观察了 24 h 内肝脏氧化损伤的情况，结果显示，AOLT 后的肝脏组织存在明显病理损伤，伴随活性氧水平

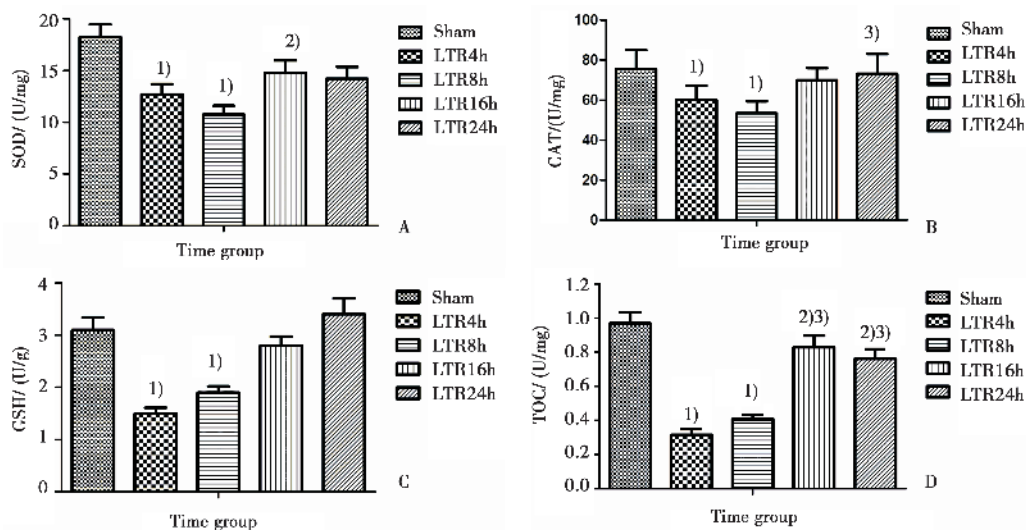


图 4 大鼠自体原位肝移植后不同时期肝脏组织内抗氧化酶活性的变化图

Fig.4 Changes of the activities of antioxidant enzymes in liver after transplantation

Data represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 8$, 1) $P < 0.05$ vs Group Sham; 2) $P < 0.05$, vs Group LTR4h, 3) $P < 0.05$, vs Group LTR8h.

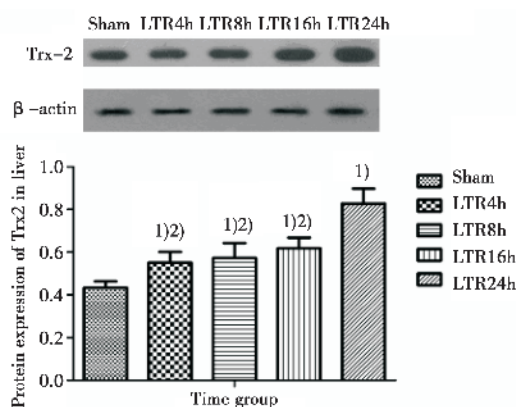


图 5 大鼠自体原位肝移植后不同时期肝脏组织内 Trx2 表达的变化

Fig.5 Protein expression of Trx2 in liver tissue at different time points

Data represented as $\bar{x} \pm s$, $n = 8$, 1) $P < 0.05$ vs Group Sham; 2) $P < 0.01$, vs Group LTR24h.

的增高、抗氧化酶活力的降低及 Trx2 表达的上调,变化过程呈动态变化。各氧化/抗氧化酶指标与肝脏组织病理学表现为一致性的变化。

羟自由基和超氧阴离子在器官缺血再灌注后大量生成,是引起器官氧化损伤的主要氧自由基^[12]。MDA 是脂质过氧化产物,可以反映氧化损伤的程度^[13]。本研究采用 AOLT 模型,供体肝脏经历了约 2 min 热缺血和 19 min 冷缺血过程后再灌注;移植后 24 h 内,羟自由基、超氧阴离子和

MDA 水平明显增高,这些指标在移植后 4 h 达到峰值,此后能逐步恢复,甚至接近假手术组水平;这些结果说明 AOLT 引起肝脏明显的氧化损伤,主要发生于供肝缺血再灌注早期,后期自由基生成减少和 MDA 水平降低,显示肝脏氧化损伤逐步减轻。

抗氧化酶能清除氧自由基,对抗氧化损伤,是机体重要的防御机制^[2-4],SOD、CAT、和 GSH 是体内重要的内源性抗氧化酶^[3],构成机体重要的自我保护因子。本研究结果显示 SOD、CAT、GSH 活性和总抗氧化能力在移植后 4 h 和 8 h 显著降低,降幅达 30%~70%;在移植后 16 h 和 24 h,SOD、CAT、和 GSH 活性,及总抗氧化能力迅速恢复,基本接近假手术组的水平。我们推测,在缺血再灌注后,机体为了清除大量生成的氧自由基,使 SOD、CAT、和 GSH 大量消耗,或供肝损伤使抗氧化酶合成能力降低,是早期抗氧化酶活力和总抗氧化能力降低的主要原因;后期随着肝脏功能的修复,抗氧化酶合成能力增强,抗氧化能力增强,有利于促进肝脏功能的修复。这些结果的临床意义在于:提示我们可以通过适当的干预,提高肝缺血再灌注早期的抗氧化能力以对抗氧化损伤,防止过度的氧化损伤而增加肝功能衰竭的发生率。

线粒体是呼吸链及氧化过程的重要部位,也是生理和病理状态下 ROS 的主要来源,Trx2 是一种特异存在于线粒体内的小分子蛋白,通过其分

子内巯基/二硫键的相互转换,实现氧化还原状态的转化,对维持抗氧化酶(如 SOD、CAT 和 GSH)的还原能力起着关键性作用,从而保证机体的抗氧化能力^[7,14]。Trx2 在活性氧的刺激下生成增多,通过还原抗氧化酶活性,产生内源性抗氧化损伤作用^[3,15]。Hwang 等^[16]人在短暂脑缺血的长爪沙鼠模型中研究发现,Trx2 在锥体神经元的免疫反应性于脑缺血/再灌注后 30 min 及 1 d 后显著升高,认为表达上调的 Trx2 可以通过降低脂质过氧化反应及线粒体介导的细胞凋亡,对缺血脑细胞发挥神经保护作用。Tsuda 等^[17]研究显示,Trx2 突变体的果蝇其平均寿命及运动活性均明显降低,由于线粒体氧化过程中 ROS 的产生与衰老息息相关,推测 Trx2 缺失可能通过激活氧化应激反应导致动物的寿命缩短。在本研究中,我们发现 Trx2 蛋白表达虽从 4 h 开始升高,而到 24 h 才达到最高值,这一结果表明在活性氧作用下,Trx2 表达进行性增高,结合移植 16 h 后抗氧化酶活性和总抗氧化能力的迅速增加,说明机体启动了 Trx2 等内源性保护机制来对抗活性氧的作用。其意义在于提示我们可以以 Trx2 作为干预靶点,提高机体的内源性抗氧化能力,以减轻过度的氧化损伤。

SD 大鼠自体原位肝移植后存在明显的肝损伤,损伤程度与氧化/抗氧化能力变化一致;Trx2 的表达增强有利于移植后肝脏功能的自我修复。

参考文献:

- [1] Czubkowski P, Socha P, Pawlowska J. Oxidative stress in liver transplant recipients[J]. *Ann Transplant*, 2011, 16(1): 99-108.
- [2] Jaeschke H, Woolbright BL. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species [J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2012, 26(2): 103-114.
- [3] Wu J, Hecker JG, Chiamvimonvat N. Antioxidant enzyme gene transfer for ischemic diseases[J]. *Ad Drug Deliv Rev*, 2009, 61(4): 351-363.
- [4] Sánchez-Valle V, Chávez-Tapia NC, Uribe M, et al. Role of Oxidative Stress and Molecular Changes in Liver Fibrosis: A Review[J]. *Curr Med Chem*, 2012, Jun 18. [Epub ahead of print] PMID: 22709007
- [5] Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, et al. The importance of redox state in liver damage [J]. *Ann Hepatol*, 2004, 3(3): 86-92.
- [6] Zhang W, Wang M, Xie HY, et al. Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2007, 39(5): 1332-1337.
- [7] Stanley BA, Sivakumaran V, Shi S, et al. Thioredoxin reductase-2 is essential for keeping low levels of H(2)O(2) emission from isolated heart mitochondria[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(38): 33669-33677.
- [8] Yang Li, Yong Chen, Yang Li, et al. Protective effect of glutamine-enriched early enteral nutrition on intestinal mucosal barrier injury after liver transplantation in rats [J]. *Am J Surg*, 2010, 199(1): 35-42.
- [9] Jin C, Zhang PJ, Wu XM, et al. Impact of hypoxic preconditioning on apoptosis and its possible mechanism in orthotopic liver autotransplantation in rats [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(1): 40-45.
- [10] Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, et al. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury [J]. *Transplantation*, 1993, 55(6): 1265-1272.
- [11] Eltzhig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion: from mechanism to translation[J]. *Nat Med*, 2011, 17(11): 1391-1401.
- [12] Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(6): 749-762.
- [13] Bela P, Bahl R, Sane AS, et al. Oxidative stress status: possible guideline for clinical management of critically ill patients[J]. *Panminerva Med*, 2001, 43(1): 27-31.
- [14] Kudin AP, Augustynek B, Lehmann AK, et al. The contribution of thioredoxin-2 reductase and glutathione peroxidase to H₂O₂ detoxification of rat brain mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1817(10): 1901-1906.
- [15] Zhou J, Chng WJ. Roles of thioredoxin binding protein (TXNIP) in oxidative stress, apoptosis and cancer[J]. *Mitochondrion*, 2012 Jun 27. [Epub ahead of print] PMID: 22750447
- [16] Hwang IK, Yoo KY, Kim DW, et al. Changes in the expression of mitochondrial peroxiredoxin and thioredoxin in neurons and glia and their protective effects in experimental cerebral ischemic damage [J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 48(9): 1242-1251.
- [17] Tsuda M, Ootaka R, Ohkura C, et al. Loss of Trx-2 enhances oxidative stress-dependent phenotypes in *Drosophila* [J]. *FEBS Lett*, 2010, 584(15): 3398-3401.