

羌活醇提取物对肝缺血再灌注损伤大鼠肝组织抗氧化酶的影响

俞科贤 李福安* 魏全嘉 李永平 王生兰 刘占厚

青海大学医学院, 青海省西宁市昆仑路 16 号, 810001)

基金项目: 青海省重大科技攻关项目 (2006-N-165-02)

* 通讯作者: liyongping1122@163.com, 18997097524

[摘要] 目的 探讨羌活醇提取物对肝缺血再灌注损伤(HIRI)大鼠模型抗氧化作用的影响及机制。方法 将 100 只大鼠随机分为空白组、模型组、丹参预处理组(DS 组)和羌活预处理组(QH 组)4 组,后 3 组组内再分为缺血 45min(I45)和缺血 45min 再灌注 30min(I45R30)、缺血 45min 再灌注 60min(I45R60)3 个时间点,DS 组、QH 组分别给予丹参醇提取物、羌活醇提取物灌胃,均 1ml/d,连续 7d。行 HIRI 造模后分别测定各组大鼠各时点即刻血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平和肝组织丙二醛(MDA)含量和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力水平。结果 模型组、QH 组和 DS 组内大鼠模型 I45R30、I45R60 时点的血清 ALT 水平、MDA 含量、GSH-Px 活力均较 I45 时点明显升高($P < 0.01$);DS 组 I45R60 时点大鼠肝组织中 MDA 含量较 QH 组明显降低($P < 0.05$);DS 组 I45R60 时点大鼠肝组织 GSH-Px 活力均较模型组和 QH 组低($P < 0.05$)。结论 羌活醇提取物可能是通过提高 HIRI 模型大鼠肝组织 GSH-Px 活力,增强对氧自由基的清除能力,减轻脂质过氧化损伤,从而起到保护肝脏的作用。

[关键词] 羌活;肝缺血再灌注损伤;丙二醛;谷胱甘肽过氧化物酶

Effect of Alcohol Extract of Qianghuo (*Notopterygium Root or Rhizome*) on the Antioxidase of Liver Tissues of Rats with Hepatic Ischemia Reperfusion Injury

YU Kexian, LI Fu'an, WEI Quanjia, LI Yongping, WANG Shenglan, LIU Zhanhou

(Medical College, Qinghai University, Xining 810001)

ABSTRACT Objective To study the effect of alcohol extract of Qianghuo (*Notopterygium root or rhizome*) on antioxidant of liver tissues of rats with hepatic ischemia reperfusion injury (HIRI) and its mechanism. **Methods** Totally 100 rats were randomized into four groups, i. e. blank group, model group, Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) pretreatment group (DS group), and Qianghuo (*Notopterygium root or rhizome*) pretreatment group (QH group). The latter three groups were subdivided into three groups respectively, namely, ischemia 45min subgroup (I45), ischemia 45min reperfusion 30min group (I45R30) and 60min subgroups (I45R60). The alcohol extract of Danshen or Qianghuo was given to DS group or QH group respectively by gastric perfusion 1ml/d for 7 days. The level of alanine transaminase (ALT) in serum, content of malondialdehyde (MDA), and activity of glutathione peroxidase (GSH-Px) of liver tissues of all rats in each time point were determined respectively and compared. **Results** In the I45R30 and I45R60 subgroups of model group, QH group, and DS group, the level of ALT in serum, the content of MDA, and the activity of GSH-Px were significantly higher than those of I45 subgroup ($P < 0.01$). In the I45R60 subgroup of DS group, the content of MDA of liver tissues was significantly lower than that QH group ($P < 0.05$). In the I45R60 subgroup of DS group, the activity of GSH-Px of liver tissues was lower than that of the model group and QH group ($P < 0.05$). **Conclusion** Qianghuo (*Notopterygium root or rhizome*) probably protects the liver through enhancing the GSH-Px activity, strengthening the ability of eliminating radical, and relieving the lipid peroxidation injury of liver tissue of HIRI model rats.

Key Words Qianghuo (*Notopterygium root or rhizome*); hepatic ischemia reperfusion injury (HIRI); malondialdehyde (MDA); glutathione peroxidase (GSH-Px)

肝缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI) 是导致肝叶切除、肝移植术后器官功能障碍和衰竭的重要因素。如何在有效控制入肝血流、减少术中出血的同时,提高肝脏对缺血的耐受性,减轻 HIRI,是肝脏外科研究的重要内容。对

HIRI 具有预处理效果的药物主要有钙通道阻滞剂、自由基清除剂、抗细胞凋亡剂以及具有改善微循环或细胞能量代谢等药物^[1]。西药具有较大的不良反应,因此,筛选具有安全范围广、毒副作用小、作用靶点多的中药成为相关研究的热点。本实验通过

观察用羌活醇提取物预处理过的 HIRI 模型大鼠不同时间血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平以及大鼠肝组织中丙二醛(MDA)含量和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活力水平的变化,探讨羌活醇提取物对 HIRI 模型大鼠的影响,以明确羌活是否具有保肝作用。

1 材料与方法

1.1 动物

8 周龄 Wistar 大鼠 100 只,雌雄各半,SPF 级,体重(180±20)g,由甘肃中医学院科研实验中心提供,实验动物许可证号:SCXK(甘)2004—2006。

1.2 药物、试剂与主要仪器

羌活、丹参(均由青海九康医药公司提供,经青海大学医学院药学系魏全嘉教授鉴定);MDA、GSH-Px 试剂盒均由南京建成生物工程研究所生产,批号 20080813;冰醋酸、无水乙醇。

MH—10000 型 10 000ml 可调式电热套(武汉格莱莫检测设备有限公司)、RE-52AA 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)、SHB-Ⅲ型循环水式多用真空泵(郑州长城科工贸有限公司)、752 型紫外分光光度计(上海精密科学仪器厂)、台式低温离心机(美国,Centrifuge 5417 型)、37℃ 恒温水浴箱。

1.3 羌活醇提取物及丹参醇提取物制备

选去杂、精选、干燥的羌活粉碎后,过 1 号筛,精密称取 1000g,置入 10 000ml 圆底烧瓶中,加入 5 000ml 75% 的乙醇溶液,浸泡 30min,用电热套加热回流 3 次,将 3 次滤液混合,在旋转蒸发器上回收乙醇,把最后得到的膏状物用蒸馏水溶解成浓度为 1g/ml 的溶液,4℃ 冰箱封存备用。丹参醇提取物制备同羌活。

1.4 动物分组、药物预处理及 HIRI 模型制备

将 100 只 Wistar 大鼠,按体重从小到大依次编号,然后依次每 10 个号应用抽签的方法随机分到 10 个小组中,每组 10 只(每组雌雄分笼后同条件、同饲料、同方法饲养),即空白组(开腹暴露肝脏)10

只,模型组 30 只[模型组内再分为缺血 45min(I45)、缺血 45min 后再灌注 30min(I45R30)、缺血 45min 后再灌注 60min(I45R60)3 个时间点,每个时间点各有大鼠 10 只,丹参预处理组(DS 组)和羌活预处理组(QH 组),各 30 只,组内时分点同模型组。

所有大鼠自购进后第 2 天开始行适应性饲养 1 周,从第 2 周第 1 天开始,每天按以下方法给予相应预处理药物,DS 组予大鼠丹参醇提取物灌胃 1ml/d,连续 7d;QH 组予大鼠羌活醇提取物灌胃 1ml/d,连续 7d。

HIRI 模型制备方法参照文献[3],大鼠以 200g/L 乌拉坦腹腔注射麻醉(1g/kg),固定于手术台,常规备皮,消毒,于剑突下 0.5cm 处纵向切约 1.5cm 长的切口,暴露肝脏,剥开被膜,分离肝左中叶使其游离,然后用无损动脉夹完全夹闭已分离的肝左中叶根部,造成大鼠肝左中叶完全性缺血,分别于 I45、I45R30 和 I45R60 即刻点行大鼠心脏采血、造模肝叶取材(−80℃ 封存)。

在药物预处理及 HIRI 模型制备的过程中,由于大鼠个体的耐药差异、灌胃、采血失败或造模对大鼠造成不良刺激等因素,致 40 只大鼠死亡,成功造模 60 只。

1.5 ALT、MDA 和 GSH-Px 测定

每组造模当天,送检大鼠血样,测定大鼠血清中 ALT 水平。准确制备各组大鼠 10% 肝脏组织匀浆,用低温离心机(3 000r/min)离心 10min,留上清液,弃去沉淀。按照试剂盒说明书准确测定肝组织匀浆中 MDA 含量和 GSH-Px 活力水平。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 15.0 软件进行统计学处理,计量数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,空白组与其他组比较的显著性检验采用 Dunnett 检验法,组内不同时间或组间同一时间比较采用 SNK 检验法。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 ALT 水平比较

表 1 示,模型组、DS 组和 QH 组 3 组大鼠血清

表 1 各组大鼠各时点血清 ALT 水平比较(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	I0	I45	I45R30	I45R60
空白组	51.40±8.14(10)	—	—	—
模型组	—	92.00±18.85*(8)	252.29±78.33△(7)	349.17±132.61△▲(5)
DS 组	—	143.25±93.67*(7)	429.67±123.55△(6)	717.00±333.12△▲★(5)
QH 组	—	78.80±25.39*(7)	390.75±340.61△(9)	363.80±172.61△▲(6)

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与本组 I45 比较,△ $P < 0.01$;与本组 I45R30 比较,▲ $P < 0.05$;与模型组同时点比较,★ $P < 0.05$;与 QH 组同时点比较,★ $P < 0.05$;括号内为鼠数。

表 2 各组大鼠各时点 MDA 含量比较(nmol/mg prot, $\bar{x}\pm s$)

组别	I0	I45	I45R30	I45R60
空白组	107.39±11.21(10)	—	—	—
模型组	—	22.72±14.05(8)	58.62±34.77 [△] (7)	93.67±26.62 [△] (5)
DS 组	—	137.27±39.80 [*] (7)	122.13±28.39 [△] [#] (6)	51.12±25.01 [△] [▲] (5)
QH 组	—	69.41±29.03(7)	129.26±28.19 [△] [#] (9)	71.80±20.31(6)

注:与本组 I45 比较, $\triangle P<0.01$;与模型组、QH 组同时点比较, $*P<0.01$;与模型组同时点比较, $\#P<0.01$;与 QH 组同时点比较, $\blacktriangle P<0.05$;括号内为鼠数

表 3 各组大鼠各个时点 GSH-Px 活力比较(U/mgprot, $\bar{x}\pm s$)

组别	I0	I45	I45R30	I45R60
空白组	17.32±2.72(10)	—	—	—
模型组	—	18.23±1.68(8)	14.52±2.10 [△] (7)	18.53±2.53 [△] (5)
DS 组	—	15.23±1.60 [*] (7)	20.69±2.10 [△] (6)	15.34±1.19 [△] [▲] (5)
QH 组	—	13.84±2.08 [*] (7)	15.56±2.85 [△] (9)	18.13±2.88 [△] (6)

注:与本组 I45 比较, $\triangle P<0.01$;与模型组同时点比较, $*P<0.05$;与模型组、QH 组同时点比较, $\blacktriangle P<0.05$;括号内为鼠数

ALT 水平在 I45 时点均比空白组升高($P<0.05$);模型组、QH 组和 DS 组大鼠 I45R30、I45R60 时点血清 ALT 水平均较 I45 时点明显升高($P<0.01$),I45R60 时点的血清 ALT 水平较 I45R30 时点明显升高($P<0.05$);DS 组 I45R60 与模型组和 QH 组相比血清 ALT 明显升高($P<0.05$)。

2.2 各组大鼠肝组织 MDA 含量比较

表 2 示,模型组、QH 组和 DS 组大鼠 I45R30、I45R60 时点 MDA 含量明显高于 I45 时点($P<0.01$);DS 组 I45 时点 MDA 含量分别与模型组、QH 组比较有统计学意义($P<0.01$);DS 组和 QH 组 I45R30 时点大鼠肝组织中 MDA 含量均比模型组明显升高($P<0.01$);DS 组 I45R60 时点大鼠肝组织中 MDA 含量较 QH 组明显降低($P<0.01$)。

2.3 各组大鼠肝组织中 GSH-Px 活力比较

表 3 示,I45R30、I45R60 时点各组大鼠肝组织 GSH-Px 活力均较 I45 时点高($P<0.01$);DS 组和 QH 组 I45 时点大鼠肝组织 GSH-Px 活力均较模型组低($P<0.05$);DS 组 I45R60 时点大鼠肝组织 GSH-Px 活力均较模型组和 QH 组低($P<0.05$)。

3 讨论

临床观察和动物实验证明,丹参水溶性和脂溶性成分含有多种药理活性成分,具有广泛而复杂的药理作用^[4],其中丹参对心、肝、肺、脑等多种组织器官的缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)具有明显改善作用,故此将丹参作为阳性对照组。

结果显示模型组和 DS 组 I45R30、I45R60 时点的大鼠血清 ALT 水平均比 I45 时点高,以及 QH 组

内 I45R30 和 I45R60 时点大鼠血清 ALT 水平均较 I45 时点高,呈现一定的递增趋势,这也符合 HIRI 的病理生理过程,即随着缺血再灌注时间的延长,肝组织损伤随之加重,其肝功能同样出现一定的损伤。模型组 I45R30、I45R60 时点大鼠肝组织 MDA 含量水平均高于 I45 时点($P<0.01$),即随缺血后再灌注时间的延长大鼠肝组织 MDA 含量水平呈递增趋势,反映由于随着缺血后再灌注时间的延长,肝细胞脂质过氧化损伤加重,其产物之一的 MDA 含量亦随之升高,这也暗合了 HIRI 的病理生理过程;DS 组内,I45R60 时点的 MDA 含量明显低于 I45 和 I45R30 时点的含量($P<0.01$),即随着缺血后再灌注时间的延长,DS 组大鼠肝组织 MDA 含量呈降低趋势,此结果与丹参能有效清除氧自由基(oxygenfreeradical, OFR),减轻肝组织的脂质过氧化损伤的结论相一致^[4]。QH 组内,I45R30 时点 MDA 含量明显高于 I45 时点($P<0.01$),说明再灌注初期,肝组织抗氧化酶尚未发挥作用,产生的大量氧自由基(OFR)加剧了肝组织的脂质过氧化反应。

在缺血再灌注后,模型组内,OFR 水平急剧上升,但机体会在一定的时间内发挥其积极代偿作用来抵御脂质过氧化损伤,因此 I45R60 时点大鼠肝组织 GSH-Px 活力较 I45R30 时点增强。DS 组内 I45R30 时点大鼠肝组织 GSH-Px 活力高于 I45 时点($P<0.05$),这一现象提示,随着再灌注时间延长,丹参可通过提高组织 GSH-Px 活力,以抵抗脂质过氧化损伤,从而发挥保护细胞膜结构和功能完

(下转第 1140 页)

糖皮质激素通过抑制膜磷类释放花生四烯酸而减少前列腺素与白三烯等炎性介质的合成;降低炎症部位中性粒细胞移动、聚积、黏附及其酶的释放和炎症介质的产生(如白介素系列);直接抑制成纤维细胞的增生与分泌功能,使结缔组织的基质合成抑制;稳定溶酶体膜减少其酶的释放等。糖皮质激素的免疫抑制作用有:使淋巴组织萎缩;干扰免疫过程的识别与增殖时相,明显抑制细胞免疫;阻断细胞间交通抑制免疫的连锁反应^[7]。在本研究中,模型组滑膜的 IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA 的基因表达在上调,提示 RA 早期 IL-1 β 、IL-6 转录增强,滑膜对 IL-1 β 、IL-6 反应的敏感性亦可能增强。IL-1 β mRNA、IL-6 mRNA 的表达水平具有协同性,推测 IL-1 β 、IL-6 在炎症部位具有相互促进作用,可能是 RA 部分发病机制。RA 早期病程中,IL-1 增加内皮细胞间黏附分子的表达;诱导中性细胞、单核细胞和淋巴细胞的趋化,诱导 IL-6 的合成参与免疫调节过程^[8],刺激成纤维样细胞的增生。RA 关节腔损伤机理中,IL-1 的局部生物效应发挥充分^[9],IL-1 进一步诱导成纤维细胞和软骨的前列腺素 E₂、胶原酶的产生,增强破骨细胞活性,促进关节软骨和骨破坏。

本研究结果提示,祛风方治疗 RA 的可能机制是:IL-1 β 、IL-6 的转录和表达受到抑制,使 IL-1 β 、IL-6 的基因表达下调,从而抑制 RA 滑膜炎以及阻断关节软骨基质的降解和破坏。其更深层次机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Gay S, Gay RE, Koopman WJ. Molecular and cellular

mechanisms of joint destruction in rheumatoid arthritis: two cellular mechanisms explain joint destruction? [J]. Ann Rheum Dis, 1993, 52(Suppl 1): 39-47.

[2] Kuryliszyn-Moskal A. Cytokines and soluble CD4 and CD8 molecules in rheumatoid arthritis: relationship to systematic vasculitis and microvascular capillaroscopic abnormalities [J]. Clin Rheumatol, 1998, 17(6): 489-493.

[3] Takeuchi E, Tomita T, Toyosaki-Maeda T. Establishment and characterization of nurse cell-like stromal cell lines from synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1999, 42(2): 221-228.

[4] Mangge H, Kenzian H, Callist JS, et al. Serum Cytokines in juvenile rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1995, 38(2): 211-223.

[5] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1991: 305-306.

[6] 施光其, 陈国会, 孙仁. 加减桂枝芍药知母汤合益肾除湿丸治疗类风湿性关节炎 38 例 [J]. 新中医, 2009, 41(4): 70-71.

[7] 刘嘉玲, 鲍春德. 风湿病疑难问题 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 458.

[8] Pelletier JP, McCollum R, Cloutier JM, et al. Synthesis of metalloproteases and interleukin 6 (IL-6) in human osteoarthritic synovial membrane is an IL-1 mediated process [J]. J Rheumatol, 1995, 43(Suppl): 109-114.

[9] Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis [J]. Arthritis Rheum, 1990, 33(3): 305-315.

(收稿日期: 2010-12-06; 修回日期: 2011-03-21)

[编辑: 崔京艳]

(上接第 1137 页)

整的作用。但随着再灌注时间的延长, 损伤继续加重, 大量产生的 OFR 引发 GSH-Px 的消耗增加。QH 组大鼠肝组织 GSH-Px 活力呈递增趋势, 表明羌活醇提取物可以提高 HIRI 模型大鼠肝组织的 GSH-Px 活力而保护肝脏。

值得注意的是, I45R60 时点 DS 组大鼠肝组织 GSH-Px 活力低于模型组, 而 QH 组大鼠肝组织 GSH-Px 活力高于 DS 组, 但不能说明羌活醇提取物比丹参更能提高大鼠肝组织 GSH-Px 活力, 表明羌活醇提取物可提高 HIRI 模型大鼠肝脏组织的 GSH-Px 活力。

总之, 本研究结果提示, 羌活醇提取物可提高 HIRI 模型大鼠肝组织 GSH-Px 活力, 增强对 OFR 的清除能力, 保护细胞膜的完整性, 抵抗脂质过氧化损伤, 从而发挥保肝作用, 亦即针对 HIRI 的瘀血、

湿阻、津停之病机, 发挥泄热散瘀、温通血脉、活血利水之功效, 使肝胆气机畅利达到抗御不良刺激损害的作用。从中医角度来看, 羌活可能在本实验中除发挥泄热祛湿功效之外, 尚奏其温通效应而温通血脉, 活血利水, 以对抗 HIRI。通过本研究可以初步确定, 羌活同样具有保肝作用, 但中药不同提取物的化学成分复杂, 其保肝效果的作用机制, 有待进一步研究。

参考文献

[1] 李秋, 雷正明. HIRI 的药物预处理 [J]. 国外医学外科学分册, 2004, 31(4): 231-234.

[2] 俞科贤, 魏全嘉, 任世存. 中药预处理对动物模型 HIRI 的防护作用 [J]. 青海医学院学报, 2008, 29(2): 126.

[3] 王生兰, 王丽华, 李先加, 等. 九味牛黄散对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响 [J]. 青海医学院学报, 2005, 26(2): 106.

[4] 谷雨, 谷巍, 于淑莲. 丹参药理作用的研究进展 [J]. 人参研究, 2007, 20(1): 25-27.

(收稿日期: 2010-11-17; 修回日期: 2011-03-10)

[编辑: 侯建春]