

生姜醇提取物对肝脏缺血再灌注大鼠氧化应激损伤的保护作用

李小梅¹ 张爱军² 熊 雄²

(1.十堰市中医医院肝病科,湖北十堰 442000; 2.武汉市武昌医院外一科,湖北武汉 430061)

摘 要 目的:研究生姜醇提取物对肝脏缺血再灌注大鼠氧化应激损伤的保护作用。方法:大鼠随机分为模型组、假手术组、金纳多(4mg/kg)组和生姜醇提取物低、中、高剂量(100、200、400mg/kg)组,分别灌胃给予生理盐水或相应药物(1次/d)2周后,除假手术组外,其余各组大鼠通过夹闭肝门静脉和肝动脉1h后松夹的方法建立肝脏缺血再灌注损伤大鼠模型,假手术组行手术通路但不阻断肝门静脉和肝动脉。比色法测定肝脏组织中抗氧化酶[超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)]活性和丙二醛(MDA)含量,测定血清中总抗氧化能力(T-AOC)水平和转氨酶[谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)]、乳酸脱氢酶(LDH)含量;HE染色法观察肝脏组织形态结构改变,TUNEL法观察肝细胞凋亡状况,Western blotting法检测肝组织中核因子- κ B(NF- κ B)表达。结果:经生姜醇提取物预处理能够有效改善肝缺血再灌注大鼠肝脏组织中SOD、GSH-Px、CAT活性,提高T-AOC水平,降低MDA含量和血清中ALT、AST、LDH水平,明显改善肝缺血再灌注大鼠肝脏组织形态结构和肝细胞凋亡状况,降低凋亡指数(Apoptosis Index, AI),下调NF- κ B蛋白表达。生姜醇提取物上述作用均具有一定的剂量依赖性。结论:生姜醇提取物能够有效改善肝脏组织中抗氧化酶活性,抑制肝脏组织病变,改善肝功能,抑制细胞凋亡,提示生姜醇提取物对肝脏缺血再灌注大鼠氧化应激损伤具有保护作用。

关键词 生姜醇提取物 肝脏 缺血再灌注 氧化应激 病理学 核因子- κ B 大鼠 实验研究

中图分类号 R282.710.5

文献标志码 A

文章编号 1672-397X(2016)12-0081-04

肝脏组织是血流量非常大的器官之一,因此肝脏手术过程中经常需要暂时阻断肝脏血流以减少出血,但恢复血流后所产生的再灌注损伤会进一步损伤肝细胞,影响肝功能^[1]。随着病理生理机制研究的深入,发现再灌注过程中所产生的大量氧自由基是造成再灌注损伤的重要因素^[2]。生姜为姜科植物姜的

新鲜根茎,味辛性温,具有解表散寒、温中止呕、行水解毒之功效,为我国临床广泛应用的传统中药。近年来研究发现,生姜具有良好的抗氧化活性^[3]。本实验通过夹闭肝门静脉和肝动脉1h后松夹的方法制备肝脏缺血再灌注大鼠模型,研究生姜醇提取物对肝缺血再灌注后氧化应激损伤的保护作用。

- [7] MA L, WANG W P, CHOW J Y, et al. The role of polyamines in gastric mucus synthesis inhibited by cigarette smoke or its extract[J]. Gut, 2000, 47(2): 170.
- [8] 曲怡, 才丽平, 郑洪新, 等. 中药消痈溃得康对乙酸胃溃疡模型大鼠 PGE₂ 及 EGF 含量的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10): 2255.
- [9] 冯国营, 刘桂香. 降钙素基因相关肽对胃肠作用的相关研究进展[J]. 滨州医学院学报, 2008, 31(4): 291.
- [10] 刘超群, 崔立红, 浦江, 等. 胃溃疡大鼠血浆胃泌素、胃动素和骨钙素的动态变化[J]. 医学综述, 2013, 19(10): 1861.
- [11] 胡莹莹, 王琦, 陈瑛. 表皮生长因子及其作用机制[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2013, 29(3): 91.
- [12] 江德龙, 燕善军. 表皮生长因子与胃肠道疾病[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2010, 19(3): 278.
- [13] 王婷, 苗明三, 苗艳艳. 小茴香的化学、药理及临床应用[J]. 中医学报, 2015, 30(6): 856.

- [14] MIŠAN A, MIMIĆA-DUKIČN, SAKACM, et al. Antioxidant activity of medicinal plant extracts in cookies[J]. Journal of Food Science, 2011, 76(9): C1239.
- [15] 宋宝辰, 李宁, 周培兰, 等. 得必泰联合奥美拉唑、奥硝唑治疗消化性溃疡临床观察[J]. 中国现代药物应用, 2007, 1(11): 16.
- [16] 刘兵团, 刘鹏飞, 赵福军. 复方铝酸铋颗粒联合雷贝拉唑、克拉霉素、阿莫西林治疗幽门螺旋杆菌相关性溃疡的临床观察[J]. 江苏医药, 2010, 36(23): 2821.

第一作者: 刘宇旻(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合治疗消化系统疾病。

通讯作者: 朱方石, 医学博士, 教授, 主任医师, 博士研究生导师。zhufangshi@126.com

收稿日期: 2016-07-13

编辑: 吴 宁

1 实验材料

1.1 药物与试剂 生姜醇提取物(陕西旭煌植物科技有限公司,批号:140728,以姜辣素计,纯度 $\geq 90\%$);金纳多(台湾济生化学制药厂股份有限公司,批号:20141209);超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、丙二醛(MDA)、总抗氧化能力(T-AOC)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;HE、TUNEL 试剂盒购自北京博奥森生物科技有限公司;核因子- κB (NF- κB)单克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 动物 清洁级 SD 大鼠(雄性,7 周龄,220~260g)购自河北省实验动物中心,许可证号:SCXK(冀)2013-1-003。

2 实验方法

2.1 分组与造模 取 120 只实验用大鼠随机分为 6 组:假手术组、模型组、金纳多(4mg/kg)组和生姜醇提取物低、中、高剂量(100、200、400mg/kg)组。术前 2 周开始灌胃给药,1 次/d,假手术组和模型组给予等体积生理盐水。参照李全辉等^[4]报道的方法制备大鼠肝脏缺血再灌注模型,使用无创动脉夹夹闭肝门静脉和肝动脉,1h 后松夹,恢复血流再灌注,假手术组行手术通路但不阻断肝门静脉和肝动脉。再灌注 2h 后各组大鼠经腹主动脉取血,同时取肝脏标本,-20℃保存待测。

2.2 氧化应激指标检测 大鼠肝脏组织研磨匀浆后 3000r/min 离心 10min 取上清液,严格按照试剂盒操作步骤测定肝脏组织中抗氧化酶(SOD、GSH-Px、CAT)活性和 MDA 含量。腹主动脉血 1500r/min 离心 10min 后取血清,按照各试剂盒操作步骤测定血清中 T-AOC 水平和 ALT、AST、LDH 含量。

2.3 肝脏组织形态结构改变、细胞凋亡状况的观察及凋亡指数(Apoptosis Index,AI)的计算 取肝脏组织标本,经 4%多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋、切片后,参照试剂盒步骤行 HE 染色,于光学显微镜下观察肝脏组织病理形态学改变。石蜡切片脱蜡水化,PBS 溶液洗涤,去离子水冲洗,滴加 100 μ L

TUNEL 反应混合液于 37℃暗湿盒中反应 1h 后终止反应,PBS 5min $\times$ 3 次,DAB 避光显色,随后通过光学显微镜观察细胞凋亡状况。AI 的计算:每张染色切片随机选取 6 个不重叠视野,分别计数细胞总数和阳性着色细胞数,按公式计算 AI,AI(%)=(阳性细胞数/细胞总数) $\times$ 100%。

2.4 肝组织中 NF- κB 表达的检测及半定量分析 取 2.2 项下制备的肝组织匀浆上清液,BCA 法测定蛋白含量后进行后续反应,蛋白变性(90℃水浴 10min),上样,10% SDS-PAGE 恒压电泳(4℃,电压 80V,30min)+分离胶(4℃,电压 120V,120min),转 NC 膜(转膜缓冲液中浸泡 30min),印迹电转移(4℃,100V,3.5h),春红溶液染色,室温下 5%脱脂奶粉封闭 2h,一抗(NF- κB , β -actin)4℃过夜,PBS 溶液洗膜,二抗室温孵育 1h 后,经 ECL 显色并用 Quantity One 软件进行分析。

2.5 统计学方法 运用统计学软件 SPSS 13.0 对实验数据进行统计分析,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,各组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验,计数资料采用卡方检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠肝脏组织中抗氧化酶活性和 MDA 含量比较 结果见表 1。

3.2 各组大鼠血清中 T-AOC 水平和 ALT、AST、LDH 含量比较 结果见表 2。

表 1 各组大鼠肝脏组织中 SOD、GSH-Px、CAT 活性和 MDA 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	SOD (U/mg prot)	GSH-Px (U/mg prot)	CAT (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
假手术组	10	13.2 $\pm$ 2.8	18.9 $\pm$ 3.5	4.0 $\pm$ 0.7	3.4 $\pm$ 0.8
模型组	10	6.4 $\pm$ 2.0 $\Delta\Delta$	9.7 $\pm$ 2.4 $\Delta\Delta$	2.3 $\pm$ 0.5 $\Delta\Delta$	9.3 $\pm$ 2.2 $\Delta\Delta$
生姜醇提取物低剂量组	10	7.0 $\pm$ 2.3	10.5 $\pm$ 2.7	2.8 $\pm$ 0.7	8.2 $\pm$ 2.5
生姜醇提取物中剂量组	10	8.5 $\pm$ 2.7*	11.8 $\pm$ 3.3	3.1 $\pm$ 0.8*	5.7 $\pm$ 1.9**☆
生姜醇提取物高剂量组	10	10.3 $\pm$ 3.1**☆☆	13.1 $\pm$ 3.7**☆#	3.5 $\pm$ 0.7**☆	4.8 $\pm$ 1.6**☆☆#
金纳多组	10	9.1 $\pm$ 2.9*	11.2 $\pm$ 3.1	3.0 $\pm$ 0.6*	6.1 $\pm$ 1.8*

注:与假手术组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与生姜醇提取物低剂量组比较,☆ $P<0.05$,☆☆ $P<0.01$;与金纳多组比较,# $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠血清中 T-AOC 水平和 ALT、AST、LDH 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数 (只)	T-AOC(U/L)	ALT(U/L)	AST(U/L)	LDH(U/L)
假手术组	10	11.8 $\pm$ 1.3	109.3 $\pm$ 12.4	51.6 $\pm$ 4.2	572.4 $\pm$ 76.3
模型组	10	6.2 $\pm$ 0.9 $\Delta\Delta$	1270.4 $\pm$ 142.5 $\Delta\Delta$	947.2 $\pm$ 125.3 $\Delta\Delta$	1193.5 $\pm$ 142.1 $\Delta\Delta$
生姜醇提取物低剂量组	10	7.1 $\pm$ 1.1	814.3 $\pm$ 153.7*	803.5 $\pm$ 120.9	967.0 $\pm$ 122.9
生姜醇提取物中剂量组	10	7.9 $\pm$ 1.4	596.2 $\pm$ 92.6**☆	562.8 $\pm$ 109.6**☆	822.9 $\pm$ 98.7*
生姜醇提取物高剂量组	10	8.6 $\pm$ 1.7**☆#	417.5 $\pm$ 80.1**☆☆#	397.4 $\pm$ 121.3**☆☆#	754.8 $\pm$ 81.6**☆☆
金纳多组	10	7.5 $\pm$ 1.5	604.9 $\pm$ 128.0**	580.3 $\pm$ 103.5*	816.5 $\pm$ 102.2*

注:与假手术组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与生姜醇提取物低剂量组比较,☆ $P<0.05$,☆☆ $P<0.01$;与金纳多组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

3.3 各组大鼠肝脏组织细胞病理形态学改变比较 假手术组大鼠肝脏组织结构及肝细胞形态均未见异常;模型组大鼠肝组织纹理不清,肝窦充血,部分肝小叶结构模糊,肝细胞呈空泡变性和坏死,胞核固缩并深染;生姜醇提取物各剂量组和金纳多组大鼠肝脏组织病理形态结构改变呈不同程度改善,以生姜醇提取物高剂量组效果最为显著。见图1。

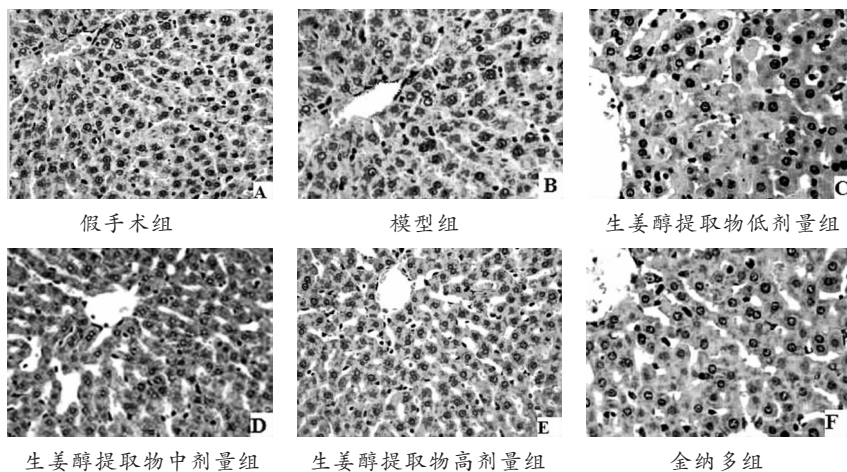


图1 各组大鼠肝脏组织病理形态学改变(HE,×400)

3.4 各组大鼠肝细胞凋亡状况及AI比较 假手术组大鼠肝脏组织仅存在极少量凋亡细胞;模型组凋亡细胞数量较假手术组明显增多;与模型组比较,生姜醇提取物各剂量组肝细胞凋亡状况明显好转,以高剂量组效果最为显著。见图2。各组AI比较结果见表3。

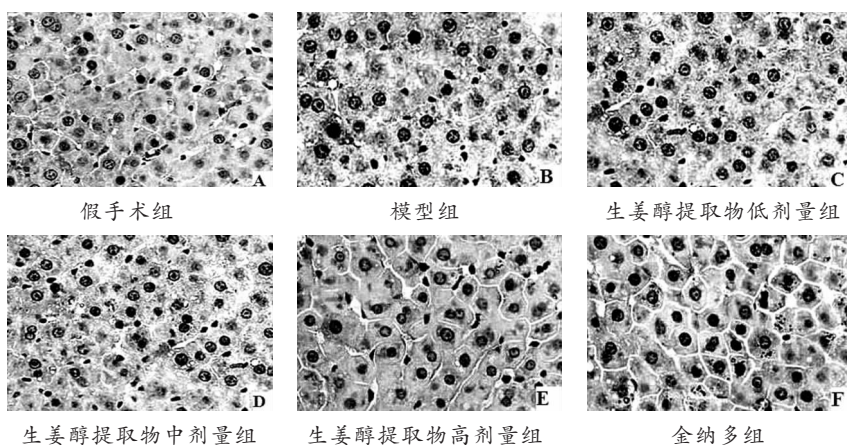


图2 各大鼠肝脏细胞凋亡状况(TUNEL,×400)

3.5 各组大鼠肝组织 NF-κB 蛋白表达 通过 Western blotting 检测并进行半定量分析,结果见图3、表3。



图3 各组大鼠肝组织 NF-κB 蛋白表达量的变化

(A.假手术组;B.模型组;C.生姜醇提取物低剂量组;D.生姜醇提取物中剂量组;E.生姜醇提取物高剂量组;F.金纳多组)

表3 各组大鼠肝组织细胞凋亡指数及 NF-κB 蛋白表达量($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	AI(%)	NF-κB/β-actin
假手术组	10	2.3±1.5	0.15±0.04
模型组	10	38.5±7.2 ^{△△}	0.42±0.13 ^{△△}
生姜醇提取物低剂量组	10	29.1±6.6	0.37±0.12
生姜醇提取物中剂量组	10	23.4±5.0 ^{**}	0.32±0.09 [*]
生姜醇提取物高剂量组	10	14.2±3.7 ^{**☆☆☆#}	0.26±0.08 ^{**☆}
金纳多组	10	25.1±5.4 ^{**}	0.30±0.10 [*]

注:与假手术组比较,△△ $P<0.01$;与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与生姜醇提取物低剂量组比较,☆ $P<0.05$,☆☆ $P<0.01$;与金纳多组比较,# $P<0.05$ 。

4 讨论

肝脏是对氧非常敏感的器官,低血容量性休克以及肝脏手术过程中暂时阻断肝脏血流,均会导致急性缺血再灌注损伤。随着病理生理机制研究的深入,研究者发现随着氧的涌入,氧自由基的大量生成和过剩,进而诱发的氧化应激损伤是导致肝脏缺血再灌注损伤非常重要的病理机制之一。

生姜为姜科植物姜的新鲜根茎,为我国传统中药之一,其提取物具有良好的抗氧化活性。金纳多的活性成分为银杏叶提取物,具有抗氧化、抑制细胞凋亡、降血脂等多种药理学作用^[5-6],临床上广泛应用于脑部、周围血液循环障碍性疾病。既往研究发现,银杏叶提取物能够通过降低氧化应激损伤,抑制肝细胞凋亡而对肝脏缺血再灌注损伤起到明显的保护作用^[7-8]。本研究结果表明,生姜醇提取物能够有效抑制肝脏组织病变,抑制肝细胞凋亡,提示生姜醇提取物对肝脏缺血再灌注损伤大鼠具有一定的保护作用。

氧自由基(ROS)过剩是导致机体氧化应激损伤的病理基础,正常状态下体内 ROS 能够在 SOD 催化作用下还原生成 H_2O_2 并在 GSH-Px 或 CAT 的

催化作用下进一步还原生成对人体无害的 H_2O 和 $O_2^{[9-10]}$,所以 SOD、GSH-Px、CAT 活性能够反映机体抗氧化能力。T-AOC 水平也能够反映机体整体抗氧化能力,脂质过氧化终产物 MDA 的含量水平则能

够间接反映机体氧化应激损伤程度。ALT、LDH 主要存在于肝细胞胞浆中,而 AST 主要存在于肝细胞线粒体中,它们在血清中的含量是反映肝功能最重要、最敏感的指标。正常生理状态下它们的含量都非常低,而当细胞膜系统受氧自由基攻击而受损后则迅速释放入血,导致血清中含量陡然增高,所以血清中 ALT、AST、LDH 含量水平能够非常敏感地反映肝脏组织受损伤程度。本研究发现,经生姜醇提取物预处理能够有效改善肝缺血再灌注损伤大鼠肝组织 SOD、GSH-Px、CAT 活性,提高血清 T-AOC 水平,降低血清 MDA、ALT、AST、LDH 含量,提示生姜醇提取物具有降低肝脏缺血再灌注损伤大鼠氧化应激损伤的作用。

细胞凋亡是一种继发性行为,而氧化应激损伤是其非常重要的诱发因素^[1],因此细胞凋亡状况也能间接反映机体氧化应激损伤程度。NF- κ B 为多效能核转录因子,常态下 NF- κ B 以无活性形式存在于胞质中,而当细胞受到外界因素刺激时,NF- κ B 将被激活并参与调控靶基因的转录和表达。张楷等^[12]通过动物实验研究发现,NF- κ B 激活在氧化应激诱导细胞凋亡过程中发挥着关键作用。本研究发现,经生姜醇提取物干预治疗能够有效下调肝缺血再灌注损伤大鼠肝组织 NF- κ B 表达,提示生姜醇提取物具有抑制肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝细胞凋亡的作用,也能间接反映其抑制氧化应激损伤的作用。

综上,生姜醇提取物能够通过抑制氧化应激损伤而对肝脏缺血再灌注损伤起到一定的保护作用,接下来我们将进一步研究生姜醇提取物对肝脏缺血再灌注损伤保护作用的其他作用通路和机制。

参考文献

- [1] ABU-AMARA M,YANG S Y,TAPURIA N,et al.Liver ischemia/reperfusion injury:processes in inflammatory networks—a review[J].Liver Transpl,2010,16(9):1016.
- [2] 李一宁,李涛,齐海智.米诺环素对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用[J].中南大学学报(医学版),2014,39(11):1137.
- [3] 曾高峰,张志勇,鲁力,等.生姜提取物对阿尔茨海默病大鼠动物模型的氧化应激因子的影响[J].天然产物研究与开发,2013,25(6):830.
- [4] 李全辉,纪志鹏,葛运飞,等.三七总皂苷对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用[J].浙江中西医结合杂志,2014,24(8):665.
- [5] 范崇桂,郭胜.银杏叶提取物对急性脑梗死大鼠凋亡基因的影响[J].中国医院药学杂志,2015,35(10):902.
- [6] 陈梅霞,苏洁,张玥莉,等.银杏叶提取物与银杏黄酮对高脂血症大鼠血脂水平影响的比较研究[J].中国新药杂志,2014,23(7):833.
- [7] 景生虹,王惠成,苏刚,等.银杏内酯对大鼠移植肝缺血再灌注损伤保护作用的研究[J].中国药房,2007,18(33):2566.
- [8] 刘花,高卉.银杏叶提取物对肝缺血再灌注 NF- κ B p65 表达的影响[J].时珍国医国药,2015,26(12):2865.
- [9] 徐伟,赵笑东.泄浊化瘀方对高脂血症大鼠抗氧化作用的实验研究[J].江苏中医药,2013(4):64.
- [10] OGUNRO P S,OLUJOMBO F A,AJALA M O,et al.The effect of a membrane dialyzer during hemodialysis on the antioxidant status and lipid peroxidation of patients with end-stage renal disease[J].Saudi J Kidney Dis Transpl,2014,25(6):1186.
- [11] 陈良金,石孟琼,贺海波,等.珠子参总皂苷对 H₂O₂ 诱导新生大鼠心肌细胞凋亡的抑制作用[J].中国临床药理学与治疗学,2012,17(8):860.
- [12] 张楷,吴浩荣.褪黑素对缺血再灌注后大鼠肝脏 NF- κ B 表达及肝细胞凋亡的影响[J].江苏医药,2006,32(10):957.

第一作者:李小梅(1980—),女,本科学历,主管护师,研究方向:肝脏疾病护理研究。

通讯作者:熊雄,硕士,主治医师。eyny121@163.com

收稿日期:2016-07-03

编辑:吴宁



编辑部现有《江苏中医药》1990—2015 年期间各年度的合订本,价格分别为 90 元/本(1990—2008 年)和 114 元/本(2009—2015 年),邮购另加邮资 23 元/本。欢迎选购。地址:江苏省南京市汉中路 282 号,邮编:210029,电话:025-86612950。

《江苏中医药》编辑部