

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.09.008

芍药苷预处理对肝缺血再灌注大鼠肝功能及线粒体损伤的影响^{*}

黄 松, 彭胜亮, 卢 强, 徐国海, 杜晓红[△]

南昌大学第二附属医院麻醉科, 江西南昌 330006

摘 要:目的 探讨芍药苷预处理对肝缺血再灌注大鼠肝功能及线粒体损伤的影响。方法 健康雄性 SD 大鼠 64 只, 按照随机区组设计法分为假手术组(S 组)、肝缺血再灌注组(I-R 组)、芍药苷组(PF 组)和生理盐水组(NS 组), 每组 16 只。I-R 组、PF 组和 NS 组采用肝脏缺血 60 min 进行再灌注的方法制备 70% 肝脏缺血再灌注损伤模型。PF 组于模型制备前 7 d 通过尾静脉连续注射芍药苷 30 mg/(kg·d), 共 7 d; NS 组于模型制备前 7 d 通过尾静脉连续注射 0.9% NaCl 注射液 30 mg/(kg·d), 共 7 d。于再灌注 6 h 后经心脏采集血液标本测定血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)水平; 取肝组织测定肝细胞凋亡情况, 计算肝细胞凋亡指数(AI); 制备肝细胞单细胞悬液, 测定线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$); 提取肝组织线粒体, 测定线粒体三态呼吸速率和四态呼吸速率(氧浓度降低值/实际时间), 计算呼吸控制率(三态呼吸速率/四态呼吸速率)和磷氧比。结果 与 S 组比较, I-R 组和 PF 组大鼠 AI、ALT、AST 和四态呼吸速率水平明显升高, 三态呼吸速率、呼吸控制率、磷氧比和 $\Delta\Psi_m$ 水平明显降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 I-R 组比较, PF 组大鼠 AI、ALT、AST 和四态呼吸速率水平明显降低, 三态呼吸速率、呼吸控制率、磷氧比和 $\Delta\Psi_m$ 水平明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 芍药苷预处理可减轻大鼠肝缺血再灌注损伤, 其机制可能与保护线粒体有关。

关键词: 芍药苷; 线粒体; 缺血再灌注

中图法分类号: R34

文章编号: 1672-9455(2020)09-1177-03

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Effect of paeoniflorin pretreatment on damage of hepatic function and mitochondrion induced by hepatic ischemia-reperfusion in rats^{*}

HUANG Song, PENG Shengliang, LU Qiang, XU Guohai, DU Xiaohong[△]

Department of Anesthesiology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China

Abstract: Objective To investigate the effects of paeoniflorin pretreatment on hepatic function and mitochondrion induced by hepatic ischemia-reperfusion in rats. **Methods** A total of 64 adult SD rats were randomized divided into 4 groups, 16 rats in each group, including sham operation group (group S), ischemia-reperfusion group (group I-R), paeoniflorin group (group PF) and normal saline group (group NS). The rats were anesthetized with intraperitoneal ketamine. A rat model of 70% hepatic ischemia-reperfusion injury was produced by occlusion of the liver for 60 min followed by 6 h reperfusion in group I-R, group PF and group NS. Group PF received resveratrol intravenously at 30 mg/(kg·d) for 7 days before modelling, while 0.9% NaCl 30 mg/(kg·d) was given in group NS. Blood samples were taken from the rat at 6 h of reperfusion for measurement of serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). The liver tissues were obtained to detect the liver cell apoptosis. Apoptotic index (AI) was calculated and the single liver cell suspension was prepared to determine $\Delta\Psi_m$, three state respiration rate, four state respiration rate of mitochondria, respiratory control rate and P/O ratio. **Results** Compared with group S, the level of ALT, AST, AI and four state respiration rate in the group I-R and group PF increased, the level of three state respiration rate, respiratory control rate, P/O ratio and $\Delta\Psi_m$ decreased ($P < 0.05$). Compared with group I-R, the level of ALT, AST, AI and four state respiration rate in the group PF decreased, the level of three state respiration rate, respiratory control rate, P/O ratio and $\Delta\Psi_m$ increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Paeoniflorin pretreatment could improve hepatic function induced by hepatic ischemia-reperfusion in rats, and protecting mitochondrion might be involved in the mechanism.

^{*} 基金项目: 江西省卫生和计划生育委员会中医药科研基金项目(B093)。

作者简介: 黄松, 男, 主治医师, 主要从事脏器缺血再灌注研究。 [△] 通信作者, E-mail: 244489686@qq.com。

Key words: paeoniflorin; mitochondrion; ischemia-reperfusion

肝缺血再灌注是肝移植、肝部分切除术等多种肝脏手术的必经程序。研究证明,肝脏手术围术期肝缺血再灌注容易诱发线粒体结构完整性的破坏,导致呼吸链、内外膜及基质蛋白功能和 ATP 合成的抑制,从而诱发肝细胞的凋亡^[1-2]。轻者致患者术后肝代谢、解毒功能降低,重者致肝衰竭乃至全身多脏器功能障碍,明显增加了手术并发症的发生率和病死率^[3]。芍药苷作为一类中药,可通过多种机制改善脑缺血再灌注损伤^[4],但其在肝脏缺血再灌注肝功能及线粒体损伤中的作用尚不清楚。因此,本研究拟评价芍药苷预处理对肝脏缺血再灌注大鼠肝功能及线粒体损伤的影响,为临床研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 SD 大鼠 64 只,6~8 周龄,体质量 250~300 g,由南昌大学动科部提供。采用随机区组设计法分为假手术组(S 组)、肝缺血再灌注组(I-R 组)、芍药苷组(PF 组)和生理盐水组(NS 组),每组 16 只。

1.2 方法 按照参考文献[5]采用 Nauta 法构建大鼠 70% 肝脏缺血再灌注模型。腹腔注射氯胺酮麻醉,由上腹正中线切开进腹,暴露肝脏,分离韧带和系膜,显露第一肝门。I-R 组用无创血管夹夹闭肝十二指肠韧带致肝缺血 60 min 后松开血管夹恢复血流。操作过程中,夹闭血管时肝叶很快由鲜红色转变为暗红色,松开血管夹后缺血的肝脏很快恢复成鲜红色,说明肝脏缺血再灌注制备成功,遂关闭腹腔。S 组仅解剖肝十二指肠韧带,遂关闭腹腔;PF 组于模型制备前 7 d 通过尾静脉连续注射芍药苷 30 mg/(kg·d),共 7 d,其余处理同 I-R 组;NS 组于模型制备前 7 d 通过尾静脉连续注射 0.9% NaCl 注射液 30 mg/(kg·d),共 7 d,其余处理同 I-R 组。

各组大鼠于再灌注 6 h 后再次麻醉,经心脏采血 5 mL,不加抗凝剂,静置 10 min,离心后取上层血清经日立全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)。取大鼠肝右叶组织,采用 DNA 断裂的原位末端标记(TUNEL)

法测定肝细胞凋亡数,操作步骤按照试剂盒说明书进行。光镜下进行观察,每张切片随机选取 5 个高倍镜视野(×400),计算总细胞和凋亡细胞,细胞凋亡指数(AI)=凋亡细胞计数/总细胞计数×100%,取其平均值。

另取部分肝组织,制备细胞悬浊液,过滤、洗涤、离心,制备单细胞悬液,利用荧光染料罗丹明 123(Rh123)作为线粒体膜电位(ΔΨ_m)的标记物,采用流式细胞仪测定ΔΨ_m。

余下部分肝组织提取肝组织线粒体后,采用 Clark 氧电极法检测线粒体呼吸功能(jieoulia 63),分别测算线粒体三态呼吸速率和四态呼吸速率(氧浓度降低值/实际时间),计算呼吸控制率(三态呼吸速率/四态呼吸速率)和磷氧比。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理及统计分析。呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,多组间中的两组比较采用 SNK-*q* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠肝 AI、AST 及 ALT 的比较 与 S 组比较,I-R 组、PF 组、NS 大鼠 AI、ALT 和 AST 水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);I-R 组与 NS 组大鼠 AI、ALT 和 AST 水平差异无统计学意义($P > 0.05$);与 I-R 组及 NS 组比较,PF 组大鼠 AI、ALT 和 AST 水平明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 4 组大鼠肝 AI、AST 及 ALT 的比较($\bar{x} \pm s$)				
组别	<i>n</i>	AI(%)	ALT(U/L)	AST(U/L)
S 组	16	3.2±0.7	73±12	148±26
I-R 组	16	9.6±2.1 [*]	356±68 [*]	812±109 [*]
PF 组	16	5.8±1.4 ^{*#△}	156±39 ^{*#△}	425±78 ^{*#△}
NS 组	16	9.3±2.4 [*]	347±82 [*]	776±125 [*]

注:与 S 组比较,^{*} $P < 0.05$;与 I-R 组比较,[#] $P < 0.05$;与 NS 组比较,[△] $P < 0.05$ 。

表 2 4 组大鼠线粒体呼吸速率、呼吸控制率、磷氧比及ΔΨ _m 的比较($\bar{x} \pm s$)						
组别	<i>n</i>	三态呼吸速率 [nmol/(min·mg)]	四态呼吸速率 [nmol/(min·mg)]	呼吸控制率	磷氧比	ΔΨ _m (%)
S 组	16	75±6	20.6±3.2	3.6±0.6	2.39±0.08	96±3
I-R 组	16	42±3 ^{*△}	32.7±7.2 ^{*△}	1.3±0.3 ^{*△}	1.48±0.07 ^{*△}	76±4 ^{*△}
PF 组	16	60±6 ^{*#△}	25.1±6.0 ^{*#△}	2.5±0.7 ^{*#△}	1.87±0.09 ^{*#△}	85±4 ^{*#△}
NS 组	16	76±8	19.8±8.5	3.8±0.7	2.44±0.09	97±4

注:与 S 组比较,^{*} $P < 0.05$;与 I-R 组比较,[#] $P < 0.05$;与 NS 组比较,[△] $P < 0.05$ 。

2.2 4 组大鼠线粒体呼吸速率、呼吸控制率、磷氧比及ΔΨ_m 的比较 与 S 组比较,I-R 组和 PF 组大鼠三

态呼吸速率、呼吸控制率、磷氧比和ΔΨ_m 水平明显降低,四态呼吸速率明显升高,差异有统计学意义(P

<0.05);与 S 组比较,NS 组大鼠三态呼吸速率、呼吸控制率、磷氧比、 $\Delta\Psi_m$ 和四态呼吸速率差异无统计学意义($P>0.05$);与 I-R 组比较,PF 组大鼠三态呼吸速率、呼吸控制率、磷氧比和 $\Delta\Psi_m$ 水平明显升高,四态呼吸速率明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 NS 组比较,I-R 组和 PF 组大鼠三态呼吸速率、呼吸控制率、磷氧比和 $\Delta\Psi_m$ 水平明显降低,四态呼吸速率明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

3 讨 论

肝脏缺血再灌注损伤是临床常见的病理过程之一,各种原因引起的休克、肝脏大手术时的肝门阻断、肝移植等均可以引起肝脏缺血再灌注损伤。肝脏缺血再灌注既可以引起肝细胞凋亡,也可以引起肝细胞坏死。本研究采用国内外广泛认可的 Nauta 法构建 70% 肝脏缺血再灌注模型^[6],结果显示,与 S 组比较,I-R 组血清 ALT 和 AST 的水平明显升高,光镜下肝组织病理学损伤明显,肝 AI 明显升高,提示肝脏缺血再灌注损伤模型制备成功。

ALT 主要存在于肝细胞质内,其细胞内水平高于血清中 1 000~3 000 倍,是反映肝脏细胞功能最敏感的指标^[7]。AST 主要存在于肝细胞线粒体内,当肝脏发生严重坏死或破坏时,肝细胞线粒体受到损伤时,AST 从线粒体中释放出来,才能引起 AST 在血清中水平偏高^[7]。肝 AI 是肝细胞凋亡数与肝细胞总数的比值,反映肝细胞的凋亡情况。本研究结果证明肝脏缺血再灌注会造成肝功能的下降及肝细胞的凋亡,而经芍药苷预处理后,肝功能的下降和肝细胞的凋亡明显得到好转。

线粒体通路在细胞凋亡中起着重要作用。线粒体呼吸速率是线粒体功能的一项指标,线粒体四态呼吸是当线粒体内 ADP 耗竭,电子传递线粒体的耗氧量下降的呼吸状态,若此时加入 ADP 后线粒体的电子传递得以顺利进行,耗氧量增加,即为三态呼吸,因此,可以通过这两个阶段线粒体呼吸状态的耗氧率的比值来描述线粒体呼吸功能的强弱^[8]。而磷氧比是线粒体在每消耗 1 g 原子氧的同时能够产生 ATP 的量,是表现线粒体氧化磷酸化耦联程度的指标,能够体现线粒体的能量转化效能。本研究结果证明肝缺血再灌注将造成肝细胞线粒体功能受损,而芍药苷预处理能改善此种情况。

$\Delta\Psi_m$ 是衡量线粒体功能的重要指标之一,能够最直接地反映线粒体的能量状态,和线粒体的 Ca^{2+} 摄取、ATP 生成、蛋白质和代谢物的转运及 ROS 的生成密切相关^[9]。 $\Delta\Psi_m$ 降低诱导肝细胞凋亡,近年来引起密切关注。当 PTP 开放时,相对分子质量 $<1.5\times 10^3$ 的物质即可通过,内膜两侧离子梯度消失, $\Delta\Psi_m$ 崩溃和电子传递脱耦联,线粒体膜通透性升

高,释放促凋亡因子,可通过激活 caspase-9 及 caspase-3 引起级联反应。核酸内切酶彻底破坏细胞生命活动所必需的全部基因,caspase 会导致细胞结构的全面解体,完成细胞凋亡^[10]。因此, $\Delta\Psi_m$ 的崩溃是细胞凋亡的早期事件。研究表明,与荧光分光光度法及激光共聚焦显微镜检测方法相比,流式细胞术可更准确地测定 $\Delta\Psi_m$,且操作简便^[2]。

综上所述,芍药苷预处理能在一定程度上改善肝缺血再灌注造成的肝功能及线粒体损伤,相关具体机制及信号通路本研究团队正在进行下一步的研究。

参考文献

- [1] CONSOLINI A E, RAGONE M I, BONAZZOLA P, et al. Mitochondrial bioenergetics during ischemia and reperfusion[J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 982: 141-167.
- [2] ZHANG S, JIANG S, WANG H, et al. SIRT6 protects against hepatic ischemia/reperfusion injury by inhibiting apoptosis and autophagy related cell death[J]. Free Radic Biol Med, 2018, 115: 18-30.
- [3] ELIAS-MIRO M, JIMENEZ-CASTRO M B, RODES J, et al. Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion[J]. Free Radic Res, 2013, 47 (8): 555-568.
- [4] LI C R, ZHOU Z, ZHU D, et al. Protective effect of paeoniflorin on irradiation-induced cell damage involved in modulation of reactive oxygen species and the mitogen-activated protein kinases[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(2): 426-438.
- [5] 赵鸽, 申新, 朱宇麟, 等. 异丙酚预处理对大鼠肝缺血再灌注后线粒体膜通透性转换孔的影响[J]. 中华肝胆外科杂志, 2017, 23(7): 468-473.
- [6] NAUTA R J, TSIMOYIANNIS E, URIBE M, et al. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat[J]. Surg Gynecol Obstet, 1990, 171 (2): 120-125.
- [7] 吴孟超. 肝胆外科学的进展与展望[J]. 广西医学, 2004, 26(9): 1239.
- [8] XUE Y, CHEN Q, SUN J. Hydroxyapatite nanoparticle-induced mitochondrial energy metabolism impairment in liver cells: in vitro and in vivo studies[J]. J Appl Toxicol, 2017, 37(8): 1004-1016.
- [9] PARDO-ANDREU G L, NUNEZ-FIGUEREDO Y, TUDEL-LA V G, et al. The anti-cancer agent nemorosone is a new potent protonophoric mitochondrial uncoupler[J]. Mitochondrion, 2011, 11(2): 255-263.
- [10] NAKAJIMA E, HAMMOND K B, HIRATA M, et al. Contribution of calpain and caspases to cell death in cultured monkey RPE cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2017, 58(12): 5412-5420.