

# 甲基莲心碱对肝缺血再灌注损伤模型小鼠氧化应激和炎症反应的影响

郑伟\*, 海军, 宋晓雪, 常虎林, 杜立学<sup>#</sup>(陕西省人民医院肝胆外科, 西安 710068)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)15-2068-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.15.12

**摘要** 目的:考察甲基莲心碱对小鼠肝缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用及机制。方法:将40只小鼠随机分为假手术组(生理盐水)、模型组(生理盐水)和甲基莲心碱低、中、高剂量组(10、30、60 mg/kg),每组8只。每天灌胃给药1次,连续给药7 d。给药结束后,除假手术组外,其余各组小鼠均采用夹闭肝蒂60 min后再灌注6 h复制肝I/R损伤模型。造模结束后,检测各组小鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和白细胞介素6(IL-6)水平,苏木精-伊红染色后观察肝组织病理学变化并进行炎症评分,检测肝组织中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、TNF- $\alpha$  mRNA、IL-6 mRNA及核转录因子 $\kappa$ B p65(NF- $\kappa$ B p65)蛋白表达情况。结果:与假手术组比较,模型组小鼠血清中ALT、AST、TNF- $\alpha$ 、IL-6以及肝组织中MDA、SOD、TNF- $\alpha$  mRNA、IL-6 mRNA和NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.05$ );肝组织间质有大量炎症细胞浸润、肝细胞坏死,炎症评分显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,除甲基莲心碱低剂量组小鼠血清中ALT、TNF- $\alpha$ 和肝组织中TNF- $\alpha$  mRNA、MDA、NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平以及肝组织炎症评分降低不显著外,其余各组小鼠上述指标水平均显著降低( $P < 0.05$ );甲基莲心碱中、高剂量组小鼠肝小叶结构完整,肝细胞形态基本正常,病理损伤得到显著改善。结论:甲基莲心碱对肝I/R损伤模型小鼠具有保护作用,且呈剂量相关性;其作用机制可能与减轻氧化应激、抑制炎症反应和降低肝组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达有关。

**关键词** 甲基莲心碱;肝缺血再灌注损伤;小鼠;炎症反应;氧化应激;核转录因子 $\kappa$ B p65

## Effects of Neferine on Oxidative Stress and Inflammatory Reaction in Hepatic Ischemia-reperfusion Injury Model Mice

ZHENG Wei, HAI Jun, SONG Xiaoxue, CHANG Hulin, DU Lixue (Dept. of Hepatobiliary Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the protective effect and mechanism of neferine on hepatic ischemia/reperfusion (I/R) injury in mice. METHODS: Totally 40 mice were randomly divided into sham operation group (normal saline), model group (normal saline), and neferine low-dose, middle-dose and high-dose groups (10, 30, 60 mg/kg), with 8 mice in each group. They were given relevant medicine intragastrically once a day for consecutive 7 d. After medication, except for sham operation group, mice in other groups were given occlusion of liver pedicle 60 min and then given perfusion for 6 h to induce hepatic I/R injury model. After modeling, the levels of ALT, AST, TNF- $\alpha$  and IL-6 were detected. The pathological change of hepatic tissue was observed after HE staining and the inflammation was scored. The levels of MDA, SOD, TNF- $\alpha$  mRNA and IL-6 mRNA, and the protein expression level of NF- $\kappa$ B p65 in hepatic tissue were determined. RESULTS: Compared with sham operation group, serum levels of ALT, AST, TNF- $\alpha$  and IL-6, levels of MDA, SOD, TNF- $\alpha$  mRNA and IL-6 mRNA and the protein expression level of NF- $\kappa$ B p65 in hepatic tissue were increased significantly in model group ( $P < 0.05$ ). There was a large number of inflammatory cells infiltration and hepatic cells necrosis, and the inflammation score increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, except that serum levels of ALT and TNF- $\alpha$ , levels of TNF- $\alpha$  mRNA and MDA, protein expression level of NF- $\kappa$ B p65 and inflammation score of hepatic tissue were not significantly reduced in neferine low-dose group, above indexes of other groups were decreased significantly ( $P < 0.05$ ). In neferine middle-dose and high-dose groups, the structure of hepatic lobules was complete, the morphology of hepatocytes was normal, and pathological injury had been significantly improved. CONCLUSIONS: Neferine shows protective effect on hepatic I/R injury model mice in dose-dependent manner, the mechanism of which may be associated with reducing oxidative stress, inhibiting inflammatory reaction and reducing the protein expression of NF- $\kappa$ B p65 in hepatic tissue.

**KEYWORDS** Neferine; Hepatic ischemia/reperfusion injury; Mice; Inflammation; Oxidative stress; NF- $\kappa$ B p65

肝缺血再灌注损伤[Hepatic ischemia/reperfusion(I/R)

\* 主治医师,硕士。研究方向:肝癌诊治。E-mail: 44120801@qq.com

<sup>#</sup> 通信作者:主任医师,教授,硕士生导师。研究方向:肝癌诊治。E-mail:lixuedu\_xa@163.com

injury]是肝移植和肝叶切除手术中不可避免的病理过程,也是诱发术后肝功能恢复延迟、受损甚至是肝衰竭的重要危险因素<sup>[1-2]</sup>。过度的氧化应激和炎症反应在肝I/R损伤进展中具有非常重要的作用<sup>[3]</sup>。甲基莲心碱是从睡莲科植物莲成熟种子的绿色胚芽中提取出的一种

生物碱成分,其在扩血管、抗血小板聚集、降低血糖、调节血脂、抗氧化应激、抗炎症反应、化疗增敏、抗有机磷中毒及抗肝纤维化等方面均具有积极作用<sup>[4]</sup>。在肝脏疾病方面,甲基莲心碱可以减轻肝I/R损伤及肝纤维化,但是其具体机制及使用剂量尚不清楚<sup>[5-6]</sup>。因此,笔者思考甲基莲心碱是否可通过抗炎、抗氧化来减轻肝I/R损伤?为回答此问题,本研究采用小鼠肝I/R损伤模型,探讨甲基莲心碱对肝I/R损伤小鼠氧化应激和炎症反应的影响,为阐明甲基莲心碱减轻肝I/R损伤的作用机制及其进一步开发利用提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

BX-51型显微镜(日本Olympus公司);5415D型高速台式离心机(德国Eppendorf公司);垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司);9700型聚合酶链式反应(PCR)扩增仪(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

### 1.2 药品与试剂

甲基莲心碱标准品(大连美伦医药科技发展有限公司,批号:MB6707,纯度:98%,使用生理盐水配成相应浓度);丙氨酸转氨酶(ALT,货号:CC009-2)、天冬氨酸转氨酶(AST,货号:C010-2)、丙二醛(MDA,货号:A003-1)和超氧化物歧化酶(SOD,货号:A001-1-1)测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ,货号:1802261)、白细胞介素6(IL-6,货号:1803251)酶联免疫吸附(ELISA)测定试剂盒均购于深圳达科为生物技术有限公司;反转录试剂盒及逆转录-PCR(RT-PCR)扩增试剂盒均购自大连Takara公司;兔抗小鼠核转录因子 $\kappa$ B p65(NF- $\kappa$ B p65)一抗(北京博奥森生物技术有限公司);辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔二抗(北京中杉金桥生物技术有限公司);RT-PCR试验中引物由上海生工生物技术公司合成;其余试剂均为分析纯。

### 1.3 动物

SPF级健康C57BL/6小鼠40只,♂,6~8周龄,体重22~26 g,购自西安交通大学医学部动物实验中心,动物使用合格证号:SYXK(陕)2015-002。小鼠购入后饲养于温度为22℃、相对湿度为50%、12 h/12 h明暗交替的动物房中,饲养期间自由饮食。

## 2 方法

### 2.1 小鼠肝I/R损伤模型的建立

小鼠术前禁食不禁水12 h,以戊巴比妥钠腹腔注射(40 mg/kg)麻醉,取上腹部中线正中切口开腹,游离出肝蒂,用无损伤血管夹夹闭肝蒂60 min后,撤离血管夹以恢复血流制成肝I/R损伤(可见缺血肝叶颜色由暗灰色变为暗红色)<sup>[7]</sup>,并逐层关腹。

### 2.2 分组、给药与造模

将小鼠适应性饲养1周后随机分为假手术组、模型组和甲基莲心碱低、中、高剂量组,每组8只。甲基莲心碱低、中、高剂量组小鼠灌胃甲基莲心碱10、30、60 mg/kg<sup>[8]</sup>,假手术组和模型组小鼠给予等体积生理盐水,

每天给药1次,连续给药7 d。给药结束后,模型组和甲基莲心碱低、中、高剂量组小鼠按“2.1”项下方法制备肝I/R损伤模型,假手术组小鼠行假手术(仅麻醉后行开腹和关腹处理,不阻断肝脏血流)。再灌注6 h后,收集各组小鼠的血液、肝左叶及肝中叶标本。将血液在4℃条件下以1 500×g离心10 min,收集血清,将血清标本于一80℃条件下冻存;组织标本经液氮迅速冷冻后,同样于一80℃条件下冻存。

### 2.3 血清中ALT、AST、TNF- $\alpha$ 和IL-6水平测定

取血清,分别按照相应试剂盒说明书操作,检测各组小鼠血清中ALT、AST、TNF- $\alpha$ 和IL-6水平。

### 2.4 肝组织病理形态学观察

取肝组织,常规石蜡包埋处理后行4  $\mu$ m切片,脱蜡、透明后行苏木精-伊红(HE)染色,在显微镜下观察肝组织的病理形态学变化并进行炎症评分。评分标准如下<sup>[9]</sup>:没有炎症细胞,0分;血管周围少量炎性细胞浸润,1分;炎症细胞形成环状,层厚约1个细胞,2分;炎性细胞形成环状,层厚约2~4个细胞,3分;炎症细胞形成环状,层厚约4~5个细胞,4分。

### 2.5 肝组织中MDA、SOD水平测定

取新鲜肝组织0.1 g,用4℃生理盐水洗净淤血,滤纸吸干水分,称质量。将其放入玻璃匀浆管口剪碎,加入9倍体积(mL)的冷生理盐水进行匀浆,制成10%的匀浆液,然后在4℃条件下以6 000×g离心10 min,收集上清液,按照相应试剂盒说明书操作,检测上清液中MDA、SOD水平。

### 2.6 肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA表达水平测定

采用RT-PCR法进行测定。取各组小鼠冻存的肝组织100 mg,按Trizol法抽提总RNA,反转录合成cDNA,然后按照RT-PCR扩增试剂盒说明书操作扩增目的基因。TNF- $\alpha$ 引物序列:上游引物序列为5'-ACGTCGTAGCAAACCACCAA-3',下游引物序列为5'-GAGAACCTGGGAGTAGACAAGG-3',扩增片段长度为146 bp;IL-6上游引物序列为5'-CAACGGGTGGAACAT-TACC-3',下游引物序列为5'-GGGTTTTCGTTTGTGA-3',扩增片段长度为422 bp;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)上游引物序列为5'-CGTCCCCTAGACAAAATGGT-3',下游引物序列为5'-TTGATGGCAACAATCTCCAC-3',扩增片段长度为452 bp。反应体系:荧光染料SYBR mix 11  $\mu$ L,灭菌蒸馏水9  $\mu$ L,2  $\mu$ mol/L的上、下游引物各0.5  $\mu$ L,cDNA模板1  $\mu$ L,体系总计22  $\mu$ L。扩增条件:95℃预变性2 min;95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸1 min,共40个循环;以37℃再延伸5 min结束反应。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达水平(式中 $c_t$ 值表示目标基因达到设定阈值所需的循环次数)。

### 2.7 肝组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平测定

采用免疫组化法进行测定。按照链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结(SP)法将包埋的蜡块切成4  $\mu$ m薄

片,使用100 g/L牛血清白蛋白封闭1 h,加入兔抗小鼠NF- $\kappa$ B p65一抗(1:400),4℃孵育过夜,2%过氧化氢孵育10 min,清除内源性过氧化物酶。加入辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔二抗(1:200),并加入底物二喹啉甲酸显色。最终将免疫组化的切片在显微镜下进行观察并拍照。镜下选取免疫组化切片的中心位置,在20倍物镜下统计每个视野中约200个细胞,对组织标本中的阳性细胞染色程度与数目进行计分,通过上述两项计分的乘积判定表达强度<sup>[10]</sup>。阳性细胞染色程度评分的判定:细胞没有明显染色,计0分;细胞出现浅黄色染色,计1分;细胞出现棕黄色染色,计2分;细胞出现棕褐色染色,计3分。阳性细胞数目计分的判定:无阳性细胞或阳性细胞率不足10%,计为0分;阳性细胞率10%~25%,计为1分;阳性细胞率25%~50%,计为2分;阳性细胞率50%~75%,计为3分;阳性细胞率>75%,计为4分。染色深浅应与背景着色对比,排除非特异性染色。最终免疫组化半定量得分=阳性细胞数目计分×染色程度评分。

## 2.8 统计学方法

采用GraphPad Prism software 6.0对实验数据进行处理。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组样本间比较采用单因素方差分析,各组样本间的两两比较用SNK- $q$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 甲基莲心碱对肝I/R损伤小鼠血清中ALT、AST水平的影响

与假手术组比较,其余各组小鼠血清中ALT、AST水平显著升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,甲基莲心碱各剂量组小鼠血清中ALT、AST水平均不同程度降低,其中甲基莲心碱中、高剂量组差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与甲基莲心碱低剂量组比较,甲基莲心碱高剂量组小鼠血清中ALT水平和甲基莲心碱中、高剂量组小鼠血清中AST水平显著降低( $P < 0.05$ )。各组小鼠血清中ALT、AST水平测定结果见表1。

表1 各组小鼠血清中ALT、AST水平测定结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Tab 1 Serum levels of ALT and AST in mice of each group( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

指标	假手术组	模型组	甲基莲心碱低剂量组	甲基莲心碱中剂量组	甲基莲心碱高剂量组
ALT, U/L	51.6 ± 31.1	591.2 ± 81.2*	508.4 ± 78.4*	385.2 ± 118.3**	307.7 ± 75.2*** <sup>a</sup>
AST, U/L	57.4 ± 14.1	869.3 ± 122.8*	843.9 ± 111.0*	580.7 ± 200.2*** <sup>a</sup>	529.1 ± 184.0*** <sup>a</sup>

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;与甲基莲心碱低剂量组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; vs. neferine low-dose group, <sup>a</sup> $P < 0.05$

### 3.2 甲基莲心碱对肝I/R损伤小鼠肝组织病理形态学的影响

小鼠肝I/R后整体成充血水肿状,表面暗黑淤血面

积增大,红润面积减少;HE染色后显示,模型组小鼠肝组织内可见大量出血,间质组织大量炎性细胞浸润,大量片状的肝细胞坏死。甲基莲心碱低剂量组小鼠肝细胞内可见大量脂滴形成,炎性细胞浸润及细胞空泡化。而甲基莲心碱中、高剂量组小鼠肝组织小叶结构基本完整,肝细胞形态基本正常,少量炎性细胞浸润。各组小鼠肝组织病理形态观察结果见图1。

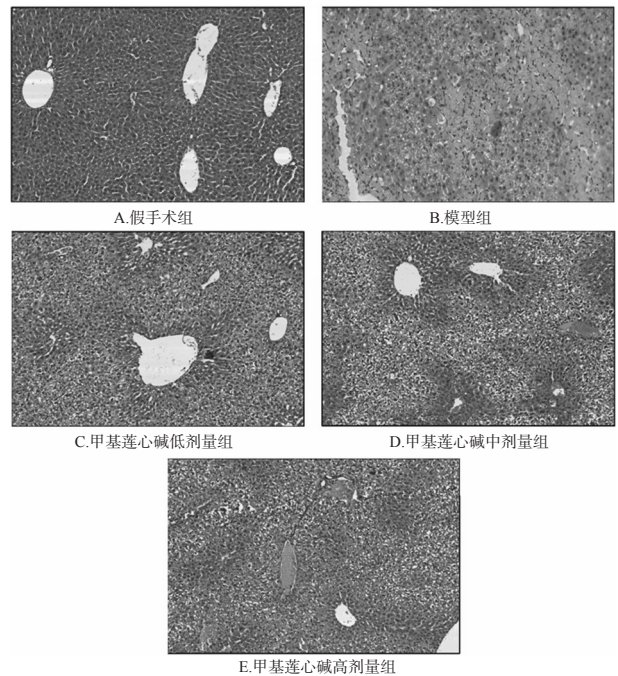


图1 各组小鼠肝组织病理形态观察结果(HE染色,×200)

Fig 1 Pathological morphological observation of hepatic tissue of mice in each group (HE staining, ×200)

根据肝组织病理结果对炎症进行评分。与假手术组比较,其余各组小鼠炎症评分显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,甲基莲心碱各剂量组小鼠炎症评分均不同程度降低;其中,甲基莲心碱中、高剂量组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),且显著低于甲基莲心碱低剂量组( $P < 0.05$ )。假手术组、模型组和甲基莲心碱低、中、高剂量小鼠肝组织炎症评分依次为0、(3.3 ± 0.7)、(3.1 ± 0.6)、(2.3 ± 0.7)、(2.2 ± 0.9)分( $n=8$ )。

### 3.3 甲基莲心碱对肝I/R损伤小鼠局部及全身炎症反应的影响

3.3.1 血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平 与假手术组比较,其余各组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,甲基莲心碱各剂量组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平均不同程度降低,其中甲基莲心碱中、高剂量组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与甲基莲心碱低剂量组比较,甲基莲心碱高剂量组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 水平显著降低( $P < 0.05$ )。各组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平测定结果见表2。

表2 各组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=8, \text{pg/mL}$ )

Tab 2 Serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in mice of each group( $\bar{x} \pm s, n=8, \text{pg/mL}$ )

指标	假手术组	模型组	甲基莲心碱低剂量组	甲基莲心碱中剂量组	甲基莲心碱高剂量组
TNF- $\alpha$	31.3 $\pm$ 7.6	183.3 $\pm$ 25.6*	174.4 $\pm$ 33.6*	141.3 $\pm$ 25.1**	112.5 $\pm$ 26.4***
IL-6	23.0 $\pm$ 7.3	229.2 $\pm$ 33.9*	201.1 $\pm$ 31.0*	174.5 $\pm$ 29.2**	168.5 $\pm$ 37.4**

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,\*\* $P<0.05$ ;与甲基莲心碱低剂量组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, \* $P<0.05$ ; vs. model group, \*\* $P<0.05$ ; vs. neferine low-dose group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$

3.3.2 肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA表达水平 与假手术组比较,其余各组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA表达水平显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,甲基莲心碱各剂量组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA表达水平不同程度降低,其中甲基莲心碱中、高剂量组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与甲基莲心碱低剂量组比较,甲基莲心碱高剂量组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$  mRNA表达水平显著降低( $P<0.05$ )。各组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA表达水平测定结果见表3。

表3 各组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA表达水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 3 mRNA expressions of TNF- $\alpha$  and IL-6 in hepatic tissue of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

组别	$2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值	
	TNF- $\alpha$ mRNA	IL-6 mRNA
假手术组	1.0 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.1
模型组	4.8 $\pm$ 0.8*	3.1 $\pm$ 0.4*
甲基莲心碱低剂量组	4.2 $\pm$ 0.6*	2.7 $\pm$ 0.5*
甲基莲心碱中剂量组	3.3 $\pm$ 1.0**	2.3 $\pm$ 0.4**
甲基莲心碱高剂量组	2.8 $\pm$ 0.7*** <sup>Δ</sup>	2.2 $\pm$ 0.4**

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,\*\* $P<0.05$ ;与甲基莲心碱低剂量组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, \* $P<0.05$ ; vs. model group, \*\* $P<0.05$ ; vs. neferine low-dose group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$

### 3.4 甲基莲心碱对肝I/R损伤小鼠氧化应激的影响

与假手术组比较,其余各组小鼠肝组织中MDA水平显著升高、SOD水平显著降低( $P<0.05$ )。与模型组比较,甲基莲心碱各剂量组小鼠肝组织中MDA水平不同程度降低、SOD水平不同程度升高,其中甲基莲心碱中、高剂量组差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与甲基莲心碱低剂量组比较,甲基莲心碱中、高剂量组小鼠肝组织中MDA水平显著降低、SOD水平显著升高( $P<0.05$ )。各组小鼠肝组织中MDA、SOD水平测定结果见表4。

### 3.5 甲基莲心碱对肝I/R损伤小鼠肝组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的影响

与假手术组比较,其余各组小鼠肝组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较,甲基莲心碱各剂量组小鼠肝组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平不同程度降低,其中甲基莲心碱中、高剂量组差异有统计学意义( $P<0.05$ ),并且甲基莲心碱高剂量组小

表4 各组小鼠肝组织中MDA、SOD水平测定结果( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Tab 4 Levels of MDA and SOD in hepatic tissue of mice in each group( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

指标	假手术组	模型组	甲基莲心碱低剂量组	甲基莲心碱中剂量组	甲基莲心碱高剂量组
MDA, nmol/mg prot	4.1 $\pm$ 1.1	11.2 $\pm$ 2.1*	11.1 $\pm$ 1.2*	8.3 $\pm$ 1.1*** <sup>Δ</sup>	7.5 $\pm$ 1.3*** <sup>Δ</sup>
SOD, U/mg prot	16.3 $\pm$ 2.1	7.9 $\pm$ 1.8*	8.3 $\pm$ 0.6*	11.5 $\pm$ 1.9*** <sup>Δ</sup>	12.5 $\pm$ 2.2*** <sup>Δ</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,\*\* $P<0.05$ ;与甲基莲心碱低剂量组比较,<sup>Δ</sup> $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, \* $P<0.05$ ; vs. model group, \*\* $P<0.05$ ; vs. neferine low-dose group, <sup>Δ</sup> $P<0.05$

鼠肝组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达水平显著低于甲基莲心碱低剂量组( $P<0.05$ )。假手术组、模型组和甲基莲心碱低、中、高剂量组小鼠肝组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达评分依次为0、(9.5 $\pm$ 1.2)、(9.0 $\pm$ 1.3)、(7.2 $\pm$ 1.3)、(5.7 $\pm$ 1.5)分( $n=8$ ),免疫组化图见图2。

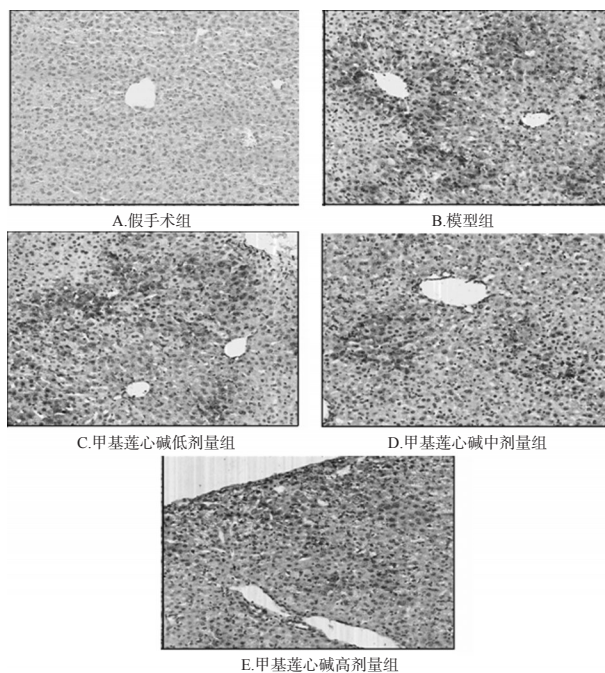


图2 各组小鼠肝组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白表达的免疫组化图( $\times 200$ )

Fig 2 Immunohistochemistry pictures of NF- $\kappa$ B p65 protein expression in hepatic tissue of mice in each group( $\times 200$ )

## 4 讨论

肝I/R损伤在肝外科手术中不可避免,这一过程对肝细胞形态及功能均会产生损伤作用,是引起术后早期肝功能不全或肝功能衰竭的主要原因<sup>[11]</sup>。肝I/R损伤的机制复杂,包括肝实质细胞及间质细胞之间的相互作用,过度的炎症反应及氧自由基生成等<sup>[12-14]</sup>。因目前针对I/R损伤尚无规范、统一的治疗方法,故在本研究中暂未设置阳性对照。

通过病理学观察可以发现,肝I/R损伤后小鼠肝组织发生肝细胞大量变性坏死、血窦区充血及出血、管区

炎性细胞浸润等现象,并且肝细胞受损时释放大量ALT、AST入血,而导致血清中ALT、AST水平急剧升高。本研究发现,甲基莲心碱可以明显减轻肝I/R损伤后小鼠肝组织的病理改变,肝细胞变性坏死区域明显减少,同时血清中ALT、AST水平也显著降低,提示甲基莲心碱对小鼠肝I/R损伤具有一定的保护作用。

过度的炎症反应在肝I/R损伤的进展中具有重要作用。肝缺血时炎症反应被广泛激活,大量的中性粒细胞、巨噬细胞等效应细胞活化并浸润至损伤部位,同时产生并分泌大量的炎症介质,引起局部及全身的器官损伤<sup>[15]</sup>。NF- $\kappa$ B是体内广泛分布的一种真核细胞转录因子,可以被多种因素激活,参与细胞凋亡、炎症等生理病理过程,可调控炎症因子及趋化因子的表达。p65亚单位是NF- $\kappa$ B的重要活性组分,笔者对肝组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达部位及水平进行了检测,证实了甲基莲心碱能够显著降低肝I/R损伤小鼠肝组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达。缺血刺激可诱发机体内的NF- $\kappa$ B激活,而激活的NF- $\kappa$ B可诱发肝脏炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6的表达和释放,同时这些炎症细胞因子又可以促进NF- $\kappa$ B的活化,形成恶性循环,扩大炎症反应<sup>[16-17]</sup>。本研究通过ELISA法检测各组小鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6水平和免疫组化法检测各组小鼠肝组织中TNF- $\alpha$ 、IL-6 mRNA水平,从全身及局部炎症反应角度证实了甲基莲心碱不仅可以抑制NF- $\kappa$ B表达,而且可以降低其下游炎症细胞因子TNF- $\alpha$ 、IL-6的水平,从而发挥对肝I/R损伤的保护作用。

体内氧化应激失衡也是肝I/R损伤的重要病理机制。氧自由基是机体氧分子不完全代谢的产物,在肝I/R损伤时,氧自由基产生增多且清除系统的功能发生障碍不能将自由基清除,过多的自由基可与线粒体膜上的多价不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,导致细胞凋亡和坏死。MDA是非饱和脂质过氧化反应的终产物,是氧化应激水平的“正向指标”;而SOD反应了机体抗氧化能力,是氧化应激水平的“反向指标”<sup>[18]</sup>。本结果显示,小鼠肝IR损伤后肝组织中MDA水平显著升高、SOD水平显著降低,而甲基莲心碱可明显降低肝IR损伤小鼠肝组织中MDA水平,并升高肝组织中SOD水平,表明甲基莲心碱能够明显抑制肝IR损伤后的氧化应激反应。

综上所述,甲基莲心碱对小鼠肝IR损伤具有明显的保护作用,且以中、高剂量效果较好,其作用机制可能与降低肝脂质过氧化应激反应损伤,加强机体的抗氧化应激能力,抑制炎症反应及肝组织中NF- $\kappa$ B p65蛋白的表达有关。

## 参考文献

[1] KONISHI T, LENTSCH AB. Hepatic ischemia/reperfusion: mechanisms of tissue injury, repair, and regeneration[J]. *Gene Expr*, 2017, 17(4):277-287.  
[2] 王清卿,赵鑫,陈玉超,等.肝脏缺血再灌注损伤机制及干预的研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2016, 32(6):1225-

1229.  
[3] 关连越,付佩尧,李巍.肝脏缺血再灌注损伤机制的研究进展[J]. *中国实验诊断学*, 2015, 19(9):1602-1605.  
[4] MARTHANDAM AS, MARIAPPAN R, MUTHUSAMY S, et al. Pharmacological benefits of neferine-A comprehensive review[J]. *Life Sci*, 2018, 15(199):60-70.  
[5] CHEN MS, ZHANG JH, WANG JL, et al. Anti-fibrotic effects of neferine on carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in mice[J]. *Am J Chin Med*, 2015, 43(2):231-240.  
[6] WANG J, KAN Q, LI J, et al. Effect of neferine on liver ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Transplant Proc*, 2011, 43(7):2536-2539.  
[7] LINARES I, FARROKHI K, ECHEVERRI J, et al. PPAR-gamma activation is associated with reduced liver ischemia-reperfusion injury and altered tissue-resident macrophages polarization in a mouse model[J]. *PLoS One*, 2018, 13(4):e0195212.  
[8] 施京红,闫文慧,朱雅男,等.甲基莲心碱对肝纤维化大鼠肝脏的保护作用[J]. *中药材*, 2014, 37(10):1845-1848.  
[9] 张羽飞,徐红纳,黄伟,等.川贝母对哮喘模型小鼠气道炎症及ERK/MAPK信号通路的影响[J]. *中国药房*, 2018, 29(3):343-348.  
[10] WU W, LIU F, WU K, et al. Lon peptidase 2, peroxisomal (LONP2) contributes to cervical carcinogenesis via oxidative stress[J]. *Med Sci Monit*, 2018. DOI:10.2659/BSM.908966.  
[11] 李尧,张宝,麻勇.肝脏缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *国际外科学杂志*, 2017, 44(4):277-280.  
[12] GUO Z, YU S, CHEN X, et al. NLRP3 is involved in ischemia/reperfusion injury[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2016, 15(6):699-712.  
[13] 吴刚,郑洁,胡国信,等.肝脏非实质细胞在肝脏缺血再灌注损伤中的作用[J]. *临床肝胆病杂志*, 2014, 30(12):1366-1369.  
[14] MA Z, XIN Z, DI W, et al. Melatonin and mitochondrial function during ischemia/reperfusion injury[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(21):3989-3998.  
[15] 梁先春,王伟,谢俊,等.门冬氨酸鸟氨酸对肝部分切除术后缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国药房*, 2015, 26(26):3717-3719.  
[16] LI Z, ZHANG J, MULHOLLAND M, et al. mTOR activation protects liver from ischemia/reperfusion-induced injury through NF- $\kappa$ B pathway[J]. *FASEB J*, 2017, 31(7):3018-3026.  
[17] 郭伟,毕旭东.肿瘤坏死因子- $\alpha$ 与肝脏缺血再灌注损伤[J]. *国外医学(外科学分册)*, 2005, 32(3):197-200.  
[18] ZHANG T, ZHAO Q, YE F, et al. Alda-1, an ALDH2 activator, protects against hepatic ischemia/reperfusion injury in rats via inhibition of oxidative stress[J]. *Free Radic Res*, 2018, 52(6):629-638.

(收稿日期:2018-03-06 修回日期:2018-05-28)

(编辑:林静)