

栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠炎症反应、氧化应激和 PI3K/Akt 信号通路的影响

马晓飞¹, 焦彦如², 张俊杰^{1*}

1. 郑州人民医院 普外三科, 河南 郑州 450053

2. 河南医学高等专科学校 医学技术系, 河南 郑州 451191

摘要:目的 探讨栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠炎症反应、氧化应激和 PI3K/Akt 信号通路的影响。方法 将 SD 大鼠分为对照组、模型组和栀子苷 5、10 mg/kg 组, 每组各 10 只。对照组、模型组大鼠 ip 溶剂橄榄油 10 mg/kg, 栀子苷 5、10 mg/kg 组大鼠 ip 栀子苷 5、10 mg/kg, 连续 7 d, 最后一次注射药物后进行肝缺血再灌注损伤建模处理。检测血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素、直接胆红素以及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素 (IL)-6、IL-1 β 水平; 测定肝组织丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、超氧化物歧化酶 (SOD) 水平; 观察肝组织病理学变化和细胞凋亡; 检测肝组织凋亡相关因子 Bcl-2、Bax mRNA 表达及 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、Caspase-3 蛋白表达。**结果** 与模型组相比, 栀子苷 5、10 mg/kg 组血清 ALT、AST、总胆红素、直接胆红素水平、TNF- α 、TGF- β 、IL-6、IL-1 β 、MDA 和 iNOS 水平、肝组织凋亡细胞比例、Bax mRNA、蛋白表达和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 显著降低 ($P < 0.05$), GSH、SOD 水平、Bcl-2 mRNA 和蛋白表达、p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 显著升高 ($P < 0.05$), 且栀子苷 10 mg/kg 组作用效果更明显 ($P < 0.05$)。**结论** 栀子苷能够改善大鼠肝功能, 减轻氧化应激、炎症反应和细胞凋亡, 其作用机制可能是通过激活 PI3K/Akt 信号通路实现的。

关键词: 栀子苷; 肝脏缺血再灌注损伤; 炎症反应; 氧化应激; PI3K/Akt

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)01-0029-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.01.005

Effects of geniposide on inflammatory response, oxidative stress, and PI3K/Akt signal pathway in rats with hepatic ischemia-reperfusion injury

MA Xiao-fei¹, JIAO Yan-ru², ZHANG Jun-jie¹

1. Department of General Surgery, Zhengzhou People's Hospital, Zhengzhou 450053, China

2. Department of Medical Technology, Henan Medical College, Zhengzhou 451191, China

Abstract: Objective To investigate the effects of geniposide on inflammatory response, oxidative stress, and PI3K/Akt signaling pathway in rats with hepatic ischemia-reperfusion injury. **Methods** All SD rats were divided into control group, model group, and geniposide (5 and 10 mg/kg) groups, and each group had 10 rats. The rats in the control group and model group were given ip solvent olive oil 10 mg/kg, and the rats in the geniposide (5 and 10 mg/kg) groups were ip administered with geniposide 5 and 10 mg/kg. All rats were treated for 7 d after the last drug injection, and were treated to model liver ischemia-reperfusion injury. The levels of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin, direct bilirubin and tumor necrosis factor- α (TNF- α), transforming growth factor- β (TGF- β), interleukin (IL)-6, and IL-1 β were detected. The levels of malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and superoxide dismutase (SOD) were detected. The pathological changes and apoptosis of rat liver tissue were observed. The expression of Bcl-2, Bax mRNA, and p-PI3K, PI3K, p-Akt, p-PI3K, PI3K, p-Akt, Akt, Bcl-2, Bax, cleaved Caspase-3, and Caspase-3 protein were detected. **Results** Compared with model group, the serum levels of ALT, AST, total bilirubin, direct bilirubin, TNF- α , TGF- β , IL-6, IL-1 β , MDA, and iNOS, the proportion of apoptotic cells in liver tissue, the expression of Bax mRNA, protein, and cleaved Caspase-3/Caspase-3 in geniposide (5, 10 mg/kg) groups were significantly

收稿日期: 2022-09-14

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建立项项目 (LHG202000475)

作者简介: 马晓飞 (1980—), 男, 山西大同人, 主治医师, 硕士, 研究方向为肝胆、胃肠外科。E-mail: maxiaofei2259@163.com

*通信作者: 张俊杰 (1963—), 男, 河南长葛人, 主任医师, 研究方向为普通外科疾病。E-mail: zjjsy19631220@163.com

decreased ($P < 0.05$). The levels of GSH and SOD, the expression of Bcl-2 mRNA and protein, and p-PI3K/PI3K and p-Akt/Akt were significantly increased ($P < 0.05$). And the effect of 10 mg/kg geniposide had a more significant effect ($P < 0.05$). **Conclusion** Geniposide can improve rat liver function, reduce oxidative stress, inflammatory response, and apoptosis, and its mechanism may be achieved by activating PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: geniposide; hepatic ischemia-reperfusion injury; inflammatory response; oxidative stress; PI3K/Akt

肝脏缺血再灌注损伤是指肝组织的血流或氧供中断再恢复后导致肝组织损伤的过程, 主要由肝切除、移植等手术中造成的器官功能损害引起^[1]。缺血再灌注的损伤不仅会对肝细胞造成直接损害, 还可影响肝细胞的再生能力, 是影响肝脏手术成功率和术后生存率的重要因素, 因此采取有效的治疗措施是非常必要的^[2]。有研究表明, 肝脏缺血再灌注损伤的发生机制是钙离子超载、活性氧、无氧代谢、氧自由基生成过多、炎症因子和微循环功能障碍等多种因素共同作用的结果^[3]。炎性损伤和氧化应激损伤是肝脏缺血再灌注损伤发生的两个主要原因, 两者相互作用, 共同介导了肝脏缺血再灌注损伤的无菌炎症反应过程^[4]。药物预处理是指利用外源性生物活性物质对肝脏缺血再灌注损伤进行预先保护, 研究显示褐藻素、虾青素等均具有保护作用^[5-6]。栀子苷是从栀子的成熟果实中分离出的活性成分, 具有抗炎、抗氧化、抗组织损伤的作用^[7]。基于此, 本研究通过探讨栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠炎症反应、氧化应激和 PI3K/Akt 信号通路的影响, 旨在为肝脏缺血再灌注损伤的预防和治疗提供一定参考。

1 材料

RM2245 组织切片机购于德国徕卡公司; MultiskanFC 酶标仪、37 °C、CO₂ 培养箱购于美国 Thermo 公司; Olympus BX50 光学显微镜购于日本奥林巴斯公司; Cobas6000 全自动生化分析仪购于德国罗氏诊断公司; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪购于美国 Bio-Rad 公司。

栀子苷 (批号 24512-63-8, 质量分数 > 98%) 购于上海源叶生物科技有限公司; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β) 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 试剂盒 (货号分别为 EY-00R1680、EY-00R1688、EY-00R1571) 购于上海一研生物科技有限公司; 转化生长因子 β (TGF- β)、丙二醛 (MDA)、谷胱甘肽 (GSH)、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、超氧化物歧化酶 (SOD) ELISA 检测试剂盒 (货号分别为 JL13643、JL13297、JL21015、JL21441、JL11065) 购于上海江莱生物科

技有限公司; 苏木素-伊红 (HE) 染色试剂盒 (货号 G1120-100) 购于北京索莱宝科技有限公司; TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (显色法, 货号 C1091) 购于上海碧云天生物技术有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号 69-27148) 购于武汉默沙克生物科技有限公司; p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、Bcl-2、Bax、Caspase-3 一抗 (货号为 ab182651、ab154598、ab38449、ab8805、ab196495、ab182733、ab184787) 以及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记羊抗兔二抗 (货号 ab6721) 购于英国 Abcam 公司; cleaved Caspase-3 一抗 (货号 9661) 购于美国 CST 公司。

SD 雄性大鼠 40 只, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, SPF 级, 生产许可证号为 SCXK (湘) 2020-0005, 6~8 周龄, 体质量 200~250 g。大鼠分笼饲养适应 1 周, 控制温度为 22~24 °C, 湿度在 50% 左右, 光照和黑暗各 12 h 循环。本研究经过医院动物实验伦理委员会审批同意 (批准号为 DWLL-20200211)。

2 方法

2.1 动物分组

将 SD 大鼠分为对照组、模型组和栀子苷 5、10 mg/kg 组, 每组各 10 只。对照组、模型组大鼠 ip 溶剂橄榄油 10 mg/kg, 栀子苷 5、10 mg/kg 组大鼠 ip 栀子苷 5、10 mg/kg, 连续 7 d, 最后一次注射药物后进行建模处理。

2.2 肝缺血再灌注损伤动物模型构建

参照文献方法^[8], 术前 12 h 所有大鼠禁食, 充足饮水, 按照 10 g 体质量给予 0.1 mL 4% 水合氯醛的标准 ip 麻醉大鼠。大鼠失去意识后, 上腹中间位置剖开, 分离第一肝门附近的韧带, 看到第一肝门时, 采用夹钳将肝左、中叶门静脉和肝动脉分支夹闭, 形成 70% 的缺血, 检查肝叶颜色, 从红色转变为苍白色, 证明肝脏缺血成功。60 min 后松开血管夹恢复血流, 肝脏恢复鲜红色, 提示模型成功构建。对动物进行缝合。对照组切开腹部后, 仅游离第一肝门, 不对血流造成任何影响。再灌注 6 h 后采集大鼠下腔静脉血液样本 3~4 mL, 置于促凝管中, 离心分离血清, 在 -80 °C 保存。所有大鼠以乙醚麻

醉后处死,取一部分左、中叶肝组织,放入液氮中速冻,另取一部分置于 4% 中性甲醛固定进行病理检查。

2.3 大鼠血清肝功能指标检测

采用全自动生化分析仪检测大鼠血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST) 水平,采用比色法测定血清总胆红素、直接胆红素。

2.4 大鼠血清炎症因子检测

采用 ELISA 测定大鼠血清 TNF- α 、TGF- β 、IL-6 和 IL-1 β 水平,严格按照试剂盒的使用说明进行各项指标检测。

2.5 大鼠肝组织氧化应激指标检测

取暂存于-80 °C 冰箱的左、中叶肝组织,碾磨为匀浆液,离心分离上清液,采用 BCA 法定量分析蛋白质浓度。然后参照 ELISA 检测试剂盒说明操作,使用酶标仪检测标准品、待检样品于 450 nm 处的吸光度 (A) 值。根据 A 值绘制标准曲线,以标准品的 A 值为纵坐标,质量浓度为横坐标,计算回归方程,根据回归方程、待检样品 A 值计算 MDA、GSH、iNOS、SOD 水平。

2.6 大鼠肝组织病理学变化检测

经 4% 中性甲醛固定的肝组织经脱水、透明后进行石蜡包埋,制备 5 μ m 厚的石蜡切片。将石蜡切片进行脱蜡、水合后,参照 HE 染色试剂盒说明书,依次添加苏木素、伊红染色液,然后进行脱水、透明、中性树脂封片,置于普通光学显微镜下观察肝组织病理学变化,并拍摄图像。

2.7 大鼠肝组织细胞凋亡检测

将石蜡切片进行脱蜡、水合后,参照 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒说明书,依次添加生物素 (Biotin) 标记的 dUTP、HRP 标记的 Streptavidin, DAB 显色,苏木素衬染,封片后置于普通光学显微镜下观察肝组织凋亡细胞 (凋亡细胞显示为棕褐色),并拍摄图像,计算凋亡细胞比例。

凋亡细胞比例 = 凋亡细胞 / 总细胞

2.8 大鼠凋亡相关因子 Bcl-2、Bax mRNA 表达检测

取左、中叶肝组织 80 mg 左右,液氮研磨,使用 Trizol 试剂提取各组肝组织中总 RNA,逆转录合成 cDNA,SYBR-Green PCR Master Mix Kit 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪检测 mRNA 表达。以 GAPDH 作为内参基因,Bcl-2 上游为 5'-CTGGTGG ACAACATCGCTCT-3',下游为 5'-CATCCAGCCT CCGTTATCC-3'; Bax 上游为 5'-CCAAGAAGCTGA

GCGAGTGTC-3',下游为 5'-TGAGGACTCCAGCC ACAAAGA-3',GAPDH 上游为 5'-CACTATTCGTG TTAATA-3',下游为 5'-CTTAGCTACTGACCTGGT C-3'。qRT-PCR 反应体系为 20 μ L,qRT-PCR 反应条件为 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 变性 40 s、60 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 30 s,40 个循环,用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算肝组织中 Bcl-2、Bax mRNA 水平。

2.9 大鼠 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、Caspase-3 蛋白水平检测

取左、中叶肝组织剪碎,加入液态氮中研磨,放入离心管,充分裂解,进行离心处理,BCA 法定量并提取总蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜,再放入封闭液,室温封闭 2 h,一抗孵育,按照 1 : 1 000 比例稀释一抗 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3 和 Caspase-3,孵育一夜后加入洗涤液,洗 3 次。加入 HRP 标记的二抗 (1 : 20 000),室温下孵育 2 h,ECL 发光试剂盒显色,按照说明检测蛋白质水平,采用 Image J 软件分析灰度值。

2.10 统计学处理

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。经检验符合正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 LSD-*t* 检验、单因素方差分析。

3 结果

3.1 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠血清中肝功能指标的影响

与对照组相比,模型组血清 ALT、AST、总胆红素和直接胆红素水平显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比,栀子苷 5、10 mg/kg 组血清 ALT、AST、总胆红素和直接胆红素水平显著降低 ($P < 0.05$),其中栀子苷 10 mg/kg 组血清 ALT、AST、总胆红素和直接胆红素水平降低更明显 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠血清中炎症因子水平的影响

与对照组相比,模型组血清 TNF- α 、TGF- β 、IL-6、IL-1 β 水平明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比,栀子苷 5、10 mg/kg 组血清 TNF- α 、TGF- β 、IL-6、IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$),其中栀子苷 10 mg/kg 组血清 TNF- α 、TGF- β 、IL-6、IL-1 β 水平降低更明显 ($P < 0.05$)。见表 2。

3.3 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织中氧化应激指标的影响

与对照组相比,模型组 MDA 和 iNOS 水平明

显升高, GSH 和 SOD 水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 栀子苷 5、10 mg/kg 组 MDA 和 iNOS 水平显著降低, GSH 和 SOD 水平显著升高 ($P < 0.05$), 其中栀子苷 10 mg/kg 组 MDA 和 iNOS 水平降低更明显, GSH 和 SOD 水平升高更明显 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 1 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠血清中肝功能指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of geniposide on serum liver function indexes of rats with hepatic ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	总胆红素/(mg·dL ⁻¹)	直接胆红素/(mg·dL ⁻¹)
对照	—	27.61 ± 5.37	61.27 ± 6.84	1.23 ± 0.28	0.26 ± 0.08
模型	—	127.83 ± 11.49*	109.56 ± 13.57*	3.79 ± 0.94*	0.98 ± 0.17*
栀子苷	5	64.72 ± 8.03 [#]	87.28 ± 9.46 [#]	2.11 ± 0.56 [#]	0.52 ± 0.13 [#]
	10	39.95 ± 7.18 ^{#Δ}	66.31 ± 6.83 ^{#Δ}	1.32 ± 0.32 ^{#Δ}	0.35 ± 0.10 ^{#Δ}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与栀子苷 5 mg·kg⁻¹ 组比较: ^Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs geniposide 5 mg·kg⁻¹ group

表 2 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠血清中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of geniposide on serum inflammatory factors of rats with hepatic ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg· μ L ⁻¹)	TGF- β /(pg· μ L ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)
对照	—	13.19 ± 0.87	6.29 ± 0.31	5.67 ± 1.32	3.93 ± 1.36
模型	—	40.83 ± 6.62*	13.71 ± 1.53*	9.57 ± 1.64*	7.85 ± 2.01*
栀子苷	5	25.69 ± 4.96 [#]	9.33 ± 1.15 [#]	7.36 ± 1.57 [#]	5.64 ± 1.53 [#]
	10	18.73 ± 3.11 ^{#Δ}	7.48 ± 1.02 ^{#Δ}	6.19 ± 1.46 ^{#Δ}	4.68 ± 1.25 ^{#Δ}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与栀子苷 5 mg·kg⁻¹ 组比较: ^Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs geniposide 5 mg·kg⁻¹ group

表 3 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织中氧化应激指标水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of geniposide on oxidative stress levels in liver tissues of rats with hepatic ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol· μ g ⁻¹)	GSH/(mmol· μ g ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	iNOS/(pg·mg ⁻¹)
对照	—	1.54 ± 0.21	11.67 ± 0.75	0.72 ± 0.17	23.76 ± 5.81
模型	—	2.76 ± 0.09*	6.69 ± 0.41*	0.37 ± 0.06*	137.64 ± 21.53*
栀子苷	5	1.94 ± 0.20 [#]	8.64 ± 0.82 [#]	0.56 ± 0.11 [#]	89.44 ± 15.71 [#]
	10	1.68 ± 0.17 ^{#Δ}	10.18 ± 1.37 ^{#Δ}	0.63 ± 0.14 ^{#Δ}	49.37 ± 11.26 ^{#Δ}

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与栀子苷 5 mg·kg⁻¹ 组比较: ^Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs geniposide 5 mg·kg⁻¹ group

3.4 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织病理学影响

HE 染色结果显示, 对照组大鼠的肝组织细胞形态正常, 无明显的炎性细胞浸润现象、充血肿胀现象; 模型组大鼠的肝组织细胞呈空泡状, 大量细胞核固缩, 有大量的炎性细胞浸润、肝细胞坏死, 局部有充血、肿胀现象; 栀子苷 5、10 mg/kg 组仅观察到有少量的细胞核固缩, 少量的炎性细胞浸润、肝细胞坏死, 局部充血肿胀得到了缓解, 其中栀子苷 10 mg/kg 组大鼠的肝组织损伤改善更加明显, 见图 1。

3.5 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织凋亡细胞比例的影响

与对照组相比, 模型组肝组织凋亡细胞比例明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 栀子苷 5、10 mg/kg 组肝组织凋亡细胞比例显著降低 ($P < 0.05$), 其中栀子苷 10 mg/kg 组肝组织凋亡细胞比例降低更明显 ($P < 0.05$), 见图 2、表 4。

3.6 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织凋亡相关因子 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响

与对照组相比, 模型组 Bcl-2 mRNA 表达明显降低, Bax mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$); 与模

型组相比, 栀子苷 5、10 mg/kg 组 Bcl-2 mRNA 表达显著升高, Bax mRNA 表达显著降低 ($P < 0.05$), 其中栀子苷 10 mg/kg 组 Bcl-2 mRNA 表达升高更明显, Bax mRNA 表达降低更明显 ($P < 0.05$), 见表 5。

3.7 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织凋亡相关因子 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、Caspase-3 蛋白表达的影响

与对照组相比, 模型组 Bcl-2 蛋白表达明显降低, Bax 蛋白表达和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 栀子苷 5、10 mg/kg 组 Bcl-2 蛋白表达显著升高, Bax 蛋白表达和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 显著降低 ($P < 0.05$), 其中栀子苷 10 mg/kg 组 Bcl-2 蛋白表达升高更明显, Bax 蛋白表达和 cleaved Caspase-3/Caspase-3 降低更明显 ($P < 0.05$)。见图 3、表 6。

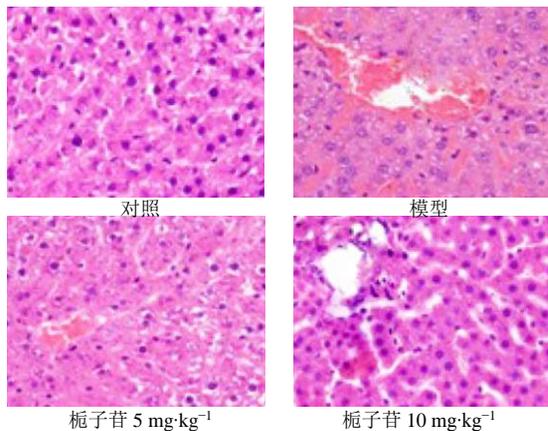


图 1 各组大鼠肝组织病理学变化 (HE, ×400)

Fig. 1 Liver histopathological changes of rats in each group (HE, ×400)

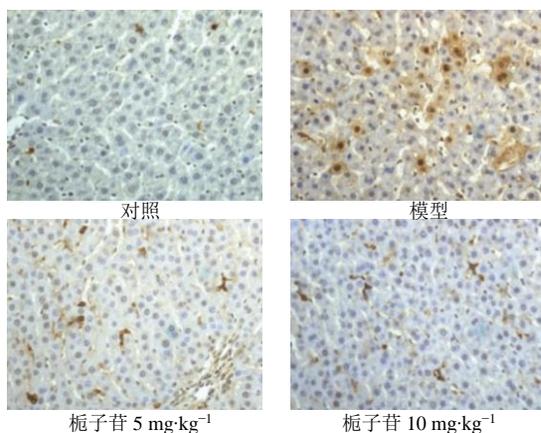


图 2 各组大鼠肝组织细胞凋亡情况 (TUNEL, ×400)

Fig. 2 Hepatocyte apoptosis of rats (TUNEL, ×400)

表 4 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织凋亡细胞比例的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of geniposide on apoptotic cells in liver tissue of rats with hepatic ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	凋亡细胞比例/%
对照	—	4.58 ± 0.86
模型	—	20.69 ± 4.21*
栀子苷	5	12.39 ± 3.15#
	10	7.83 ± 1.29# [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与栀子苷 5 mg·kg⁻¹ 组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs geniposide 5 mg·kg⁻¹ group

表 5 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织凋亡相关因子 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of geniposide on Bcl-2 and Bax mRNA expression in liver tissue of rats with hepatic ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Bcl-2 mRNA	Bax mRNA
对照	—	0.98 ± 0.07	0.93 ± 0.05
模型	—	0.26 ± 0.01*	2.87 ± 0.19*
栀子苷	5	0.65 ± 0.05#	1.64 ± 0.13#
	10	0.83 ± 0.09# [△]	1.13 ± 0.16# [△]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$; 与栀子苷 5 mg·kg⁻¹ 组比较: [△] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs model group; [△] $P < 0.05$ vs geniposide 5 mg·kg⁻¹ group

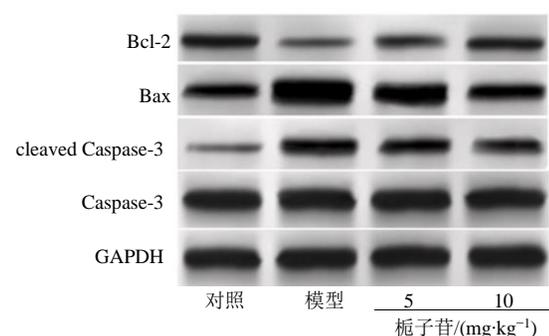


图 3 各组大鼠肝组织 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、Caspase-3 蛋白表达

Fig. 3 Protein expression of Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, and Caspase-3 in liver tissue of rats in each group

表 6 栀子苷对肝组织凋亡相关因子 Bcl-2、Bax、cleaved Caspase-3、Caspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Table 6 Effects of geniposide on protein expression of apoptosis related factors Bcl-2, Bax, cleaved caspase-3, and Caspase-3 in liver tissue of rats with hepatic ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Bcl-2	Bax	cleaved Caspase-3/Caspase-3
对照	—	0.76 ± 0.07	0.61 ± 0.06	0.19 ± 0.05
模型	—	0.21 ± 0.04*	1.52 ± 0.14*	0.87 ± 0.10*
栀子苷	5	0.45 ± 0.05 [#]	1.17 ± 0.12 [#]	0.52 ± 0.08 [#]
	10	0.68 ± 0.06 ^{#△}	0.82 ± 0.10 ^{#△}	0.35 ± 0.07 ^{#△}

与对照组比较: **P* < 0.05; 与模型组比较: [#]*P* < 0.05; 与栀子苷 5 mg·kg⁻¹ 组比较: [△]*P* < 0.05
^{*}*P* < 0.05 vs control group; [#]*P* < 0.05 vs model group; [△]*P* < 0.05 vs geniposide 5 mg·kg⁻¹ group

3.8 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织中 PI3K/Akt 信号通路磷酸化水平的影响

与对照组相比, 模型组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 明显降低 (*P* < 0.05); 与模型组相比, 栀子苷 5、10 mg/kg 组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 均显著升高 (*P* < 0.05), 其中栀子苷 10 mg/kg 组 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 升高更明显 (*P* < 0.05)。见图 4、表 7。

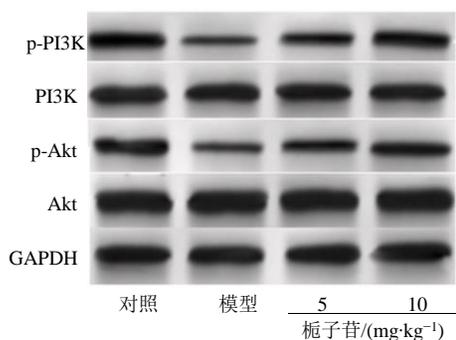


图 4 各组大鼠肝组织 p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 蛋白表达
 Fig. 4 Protein expression of p-PI3K, PI3K, p-Akt, and Akt in liver tissue of rats in each group

表 7 栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织中 PI3K/Akt 信号通路磷酸化水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Table 7 Effects of geniposide on phosphorylation level of PI3K/Akt signal pathway in liver tissue of rats with hepatic ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
对照	—	0.81 ± 0.15	0.60 ± 0.14
模型	—	0.24 ± 0.06*	0.22 ± 0.05*
栀子苷	5	0.41 ± 0.08 [#]	0.38 ± 0.07 [#]
	10	0.77 ± 0.12 ^{#△}	0.51 ± 0.10 ^{#△}

与对照组比较: **P* < 0.05; 与模型组比较: [#]*P* < 0.05; 与栀子苷 5 mg·kg⁻¹ 组比较: [△]*P* < 0.05
^{*}*P* < 0.05 vs control group; [#]*P* < 0.05 vs model group; [△]*P* < 0.05 vs geniposide 5 mg·kg⁻¹ group

4 讨论

缺血再灌注损伤是在多种因素的作用下, 经过一段时间内所导致的组织器官无法获得血供和氧气, 引起的一定程度上的功能性损伤, 再恢复血液供应会使相应损伤进一步加重^[9-11]。肝脏是人体最大的内脏, 是常发生缺血再灌注损伤的重要器官之一^[12-14]。多数患者在接受肝脏手术治疗后, 都会出现肝脏缺血再灌注损伤这一并发症, 该损伤会对肝脏功能造成直接的影响, 导致患者肝脏衰竭甚至是死亡, 所以寻找一种可有效减轻肝脏缺血再灌注损伤的方法对于临床具有重要意义^[15-17]。

栀子苷是从栀子中提取的环烯醚萜苷类化合物, 具有抗炎、抗氧化、保肝利胆、神经保护等多种药理活性, 对自身免疫性疾病、抑郁症、糖尿病肝脏损伤具有一定的防治作用^[18-20]。栀子苷在肝脏疾病治疗中发挥着重要的作用, 但是由于栀子苷具有肝脏毒性, 使栀子苷在临床应用上受到了一定的限制^[21]。因此本研究探讨栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠炎症反应、氧化应激和 PI3K/Akt 信号通路的影响, 为栀子苷在临床上的应用提供参考。本研究结果显示, 肝脏缺血再灌注损伤大鼠出现肝细胞坏死、炎性细胞浸润等病理损伤, 同时 ALT、AST、总胆红素和直接胆红素水平明显升高, 而 5、10 mg/kg 栀子苷干预后, 大鼠肝组织病理损伤逐渐改善, 且 ALT、AST、总胆红素和直接胆红素水平明显降低, 其中 10 mg/kg 栀子苷作用效果更明显, 提示栀子苷对肝脏缺血再灌注损伤大鼠具有一定保护作用, 减轻肝脏损伤, 改善肝功能。

在肝脏缺血再灌注损伤发生时, 氧自由基诱发的细胞损伤最严重, 其中 GSH 是氧自由基清除过程的关键酶^[22]; SOD 对超氧阴离子具有明显的清除作用^[23-24]; MDA 是脂类过氧化反应的稳定的代谢

物,对氧自由基所引起的氧化损伤最敏感^[25-26]。iNOS 表达上调与氧化应激反应密切相关,共同参与肝脏缺血再灌注损伤^[27]。此外,炎症的浸润在肝脏损伤中也起着重要的作用,肝脏缺血、缺氧和再灌注均可激活炎症细胞释放 TNF- α 、TGF- β 、IL-6、IL-1 β 等细胞因子,使其表达升高,而细胞因子不断产生可以进一步促进炎症反应的发生发展^[28-29]。本研究发现,肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织中 MDA、iNOS 水平及血清中 TNF- α 、TGF- β 、IL-6、IL-1 β 水平明显升高,肝组织中 GSH、SOD 水平降低,而 5、10 mg/kg 栀子苷干预后,大鼠的上述指标变化均得到不同程度的改善,其中 10 mg/kg 栀子苷改善效果更明显,提示栀子苷能够改善肝脏缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和炎症反应,对肝脏发挥保护作用。

肝脏组织中细胞凋亡也是肝脏缺血再灌注损伤的重要表现,其受氧化应激和炎症反应等因素影响^[5,8]。本研究中,肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织凋亡细胞比例、凋亡相关因子 Bax mRNA 和蛋白表达及 cleaved Caspase-3/Caspase-3 表达升高,Bcl-2 mRNA 和蛋白表达降低,而经 5、10 mg/kg 栀子苷干预的大鼠的上述指标变化均逐渐改善,提示栀子苷能够缓解肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝细胞凋亡,减轻肝脏损伤。

PI3K/Akt 信号通路具有多种生物学性能,广泛存在于细胞内,能够通过降低炎症反应、改善能量代谢和氧化应激等途径来减轻心肌缺血再灌注损伤^[30]。在缺血再灌注损伤的发生、发展中,可以通过激活 PI3K/Akt 信号通路调节下游 Bcl-2 家族蛋白表达发挥抗凋亡效应,其中 Akt 是 PI3K 下游最重要的中心调节分子^[31]。PI3K/Akt 信号通路激活可改善炎症因子水平,抑制细胞凋亡,改善肾缺血再灌注损伤^[32]。本研究结果显示,肝脏缺血再灌注损伤大鼠肝组织 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 明显降低,而经 5、10 mg/kg 栀子苷干预的大鼠肝组织 p-PI3K/PI3K 和 p-Akt/Akt 明显升高,提示栀子苷可能通过作用于 PI3K/Akt 信号通路改善氧化应激和降低炎症因子水平,减少细胞凋亡,改善肝功能。

综上所述,栀子苷能够改善大鼠肝功能,减轻氧化应激、炎症反应和细胞凋亡,其作用机制可能是通过激活 PI3K/Akt 信号通路实现的。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 谭思由,陈文雁,苏颖颖,等.肝脏缺血-再灌注损伤防治策略研究进展[J].临床麻醉学杂志,2021,37(10):1106-1110.
- [2] 李中宇,王超群,麻勇.肝脏缺血/再灌注损伤药物预处理的研究进展[J].中国药理学通报,2021,37(12):1634-1637.
- [3] 龚建华,袁观斗,何松青.肝脏缺血再灌注损伤机制研究进展[J].中华实验外科杂志,2018,35(1):179-181.
- [4] 李欢,熊静,杨树龙,等.线粒体通路、氧化应激在肝脏缺血再灌注损伤细胞凋亡中作用机制的研究进展[J].山东医药,2018,58(40):99-102.
- [5] 廖政邦,李明,谢松强.褐藻素诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬的机制[J].中国实验方剂学杂志,2014,20(15):181-184.
- [6] 张子琪,吴旻,兰海楠,等.虾青素缓解脂多糖诱导的小鼠急性肝损伤[J].华南农业大学学报,2019,40(1):40-45.
- [7] 王恩力,董方,姚景春.栀子苷药理学和毒理学研究进展[J].中国药房,2015,26(19):2730-2733.
- [8] 王利江,庄立琨,杨通旺,等.海藻糖对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J].中华器官移植杂志,2021,42(2):109-115.
- [9] Jacob A, Wang Z, Yen H T, et al. Human adrenomedullin and its binding protein attenuate tissue injury and inflammation following hepatic ischemia reperfusion in rabbits[J]. *Heliyon*, 2021, 7(8): e07845.
- [10] Liu H, Man K. New insights in mechanisms and therapeutics for short- and long-term impacts of hepatic ischemia reperfusion injury post liver transplantation[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(15): 8210.
- [11] 孔祥云,杨红芳,王镜源,等.不同剂量乳化异氟醚预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J].现代生物医学进展,2020,20(23):4422-4426.
- [12] Wang H, Guo L, Wang Y, et al. Isoflurane upregulates microRNA-9-3p to protect rats from hepatic ischemia-reperfusion injury through inhibiting fibronectin type III domain containing 3B[J]. *Cell Cycle*, 2021, 20(16): 1527-1539.
- [13] Clarke G, Mergental H, Hann A, et al. How machine perfusion ameliorates hepatic ischaemia reperfusion injury[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(14): 7523.
- [14] Li Q, Zhang W, Xiao E. SOD2 overexpression in bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorates hepatic ischemia/reperfusion injury[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(3): 671.
- [15] 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):403-406.

- [16] 吴勤荣, 时军, 王永刚. 细胞凋亡与肝移植缺血再灌注损伤 [J]. 中国组织工程研究, 2011, 15(18): 3371-3375.
- [17] Suakıtıcı S, Güven B B, Tanoglu A, *et al.* A combination of levosimendan and *N*-acetylcysteine shows significant favorable efficacy on experimental liver ischemia/reperfusion injury [J]. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*, 2021, 27(4): 381-388.
- [18] 刘益华, 李晶, 林曼婷, 等. 栀子有效成分栀子苷的现代研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(6): 406-409.
- [19] 杨明, 陈晓燕, 张海燕, 等. 栀子苷 4 种不同给药途径的药理学研究 [J]. 中国新药杂志, 2010, 11(9): 746-749.
- [20] 吴先昊, 邓绍勇, 王小青, 等. 栀子果实性状、化学成分与其消炎利胆作用的关系研究 [J]. 中草药, 2021, 52(23): 7229-7235.
- [21] 王荣慧, 吴虹, 王梦蝶, 等. 栀子苷保肝利胆和肝毒性双重作用的研究进展 [J]. 安徽中医药大学学报, 2020, 39(3): 90-93.
- [22] Elias-Mir ó M, Jim énez-Castro M B, Rod é s J, *et al.* Current knowledge on oxidative stress in hepatic ischemia/reperfusion [J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(8): 555-568.
- [23] 董辉, 王素玲, 李易明, 等. PrxVI、SOD、CAT 在肝脏缺血再灌注损伤大鼠模型脑内的表达 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(16): 3904-3906.
- [24] Kaminski K A, Bonda T A, Korecki J, *et al.* Oxidative stress and neutrophil activation-The two keystones of ischemia/reperfusion injury [J]. *Int J Cardiol*, 2002, 86(1): 41-59.
- [25] Kleikers P, Wingler K, Hermans J, *et al.* NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2012, 90(12): 1391-1406.
- [26] Aktaş H S, Ozel Y, Ahmad S, *et al.* Protective effects of resveratrol on hepatic ischemia reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 460(1-2): 217-224.
- [27] Hassan M I, Ali F E, Shalkami A. Role of TLR-4/IL-6/TNF- α , COX-II and eNOS/iNOS pathways in the impact of carvedilol against hepatic ischemia reperfusion injury [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, 40(8): 1362-1373.
- [28] 郑伟, 海军, 宋晓雪, 等. 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 [J]. 中国药房, 2018, 29(15): 2068-2072.
- [29] 张志斌, 朱志军. 炎症反应在肝脏缺血再灌注损伤中的作用研究进展 [J]. 山东医药, 2014, 54(15): 101-103.
- [30] Su S, Luo D, Liu X, *et al.* miR-494 up-regulates the PI3K/Akt pathway via targeting PTEN and attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury in a rat model [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(5): BSR20170798.
- [31] Xu M C, Shi H M, Gao X F, *et al.* Salidroside attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via PI3K/Akt signaling pathway [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2013, 15(3): 244-252.
- [32] Chao H, Long L, Ding P, *et al.* Complement inhibitor CRIg/FH ameliorates renal ischemia reperfusion injury via activation of PI3K/AKT signaling [J]. *J Immunol*, 2018, 201(12): 3717-3730.

[责任编辑 解学星]