

番茄红素对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用研究

李雪¹, 赵明智^{2*}, 张安易³, 郭瑞霞¹

1. 邯郸市第一医院 呼吸二科, 河北 邯郸 056002

2. 河北大学附属医院 肿瘤科, 河北 保定 071000

3. 河北大学, 河北 保定 071000

摘要: **目的** 研究番茄红素对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用, 并考察其作用机制。**方法** 取120只SD大鼠随机分为假手术组、模型组、舒血宁注射液(4 mg/kg)组以及番茄红素5、10、20 mg/kg组, 每组20只。除假手术组外采用夹闭左肺门45 min后松夹的方法制备大鼠肺缺血再灌注损伤模型。再灌注2 h后, 分别测定各组大鼠肺组织湿质量/干质量比值; 通过苏木精-尹红(HE)染色观察肺组织病理学改变; 原位末端标记(TUNEL)法观察肺组织细胞凋亡并计算凋亡指数(AI); 检测血清中丙二醛(MDA)含量和髓过氧化物酶(MPO)活性; 测定肺组织中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)活性。**结果** 与模型组比较, 番茄红素10、20 mg/kg组肺组织湿质量/干质量比值显著降低($P < 0.05, 0.01$), 肺组织病变显著改善, 肺组织细胞凋亡状况明显改善; 血清中MDA含量和MPO活性显著降低($P < 0.05, 0.01$), 肺组织中SOD、CAT活性显著升高($P < 0.05, 0.01$)。其中番茄红素20 mg/kg组对肺缺血再灌注损伤大鼠肺组织病变改善最为显著、细胞凋亡状况改善以及凋亡指数降低效果最为显著, 对血清中MDA含量和MPO活性显著降低效果更加显著、肺组织中GSH-Px活性显著升高($P < 0.01$)。**结论** 番茄红素能够有效降低肺组织湿质量/干质量比值, 改善肺组织病变, 抑制肺组织细胞凋亡、降低凋亡指数, 提示番茄红素对大鼠肺缺血再灌注损伤具有剂量相关性的保护作用, 其作用机制可能与番茄红素能够有效改善机体抗氧化酶活性、抑制氧化应激损伤有关。

关键词: 番茄红素; 肺组织; 缺血再灌注; 保护

中图分类号: R965; R972

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2015)06-0637-05

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2015.06.007

Protection of lycopene on pulmonary ischemia-reperfusion injury in rats

LI Xue¹, ZHAO Ming-zhi², ZHANG An-yi³, GUO Rui-xia¹

1. Second Department of Respiratory Medicine, Handan First Hospital, Handan 056002, China

2. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China

3. Hebei University, Baoding 071000, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects of lycopene on pulmonary ischemia-reperfusion injury in rats and to explore its mechanism. **Methods** A total of 120 SD rats were randomly divided into Sham group, model group, Shuxuening Injection (4 mg/kg) group, and lycopene (5, 10, and 20 mg/kg) groups, and each group had 20 rats. Pulmonary ischemia-reperfusion injury models in rats except Sham group were clipped the hilum of left lung, and after 45 min release of the clip. Two hours after reperfusion, wet weight/dry weight ratios of lung tissue were determined, the histopathological changes of lung tissue were observed by HE method, myocardial apoptosis of lung tissue was observed by TUNEL method, and the apoptosis index (AI) was analyzed. At the same times, the contents of Malondialdehyde (MDA) and activity of myeloperoxidase (MPO) in serum were determined, the activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase (CAT) in lung tissue were determined. **Results** Compared with the model group, indexes of lycopene (10, 20 mg/kg) groups such as wet weight/dry weight ratios were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), histopathological changes and cells apoptosis of lung tissues were significantly improved, the content of MDA and activity of MPO in serum were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and the activity of SOD and CAT in lung tissue were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$). Especially lycopene (20 mg/kg) group had better effects in improvement of histopathological

收稿日期: 2015-02-05

作者简介: 李雪, 女, 主治医师, 本科, 研究方向为呼吸内科。Tel: 13784228027 E-mail: 3166425349@qq.com

*通信作者 赵明智, 男, 主治医师, 硕士, 研究方向为肿瘤学。Tel: 18931212718 E-mail: zzm2008lx@163.com

changes, cells apoptosis, and AI, decrease of the content of MDA and activity of MPO in serum, and rise of activity of GSH-Px in lung tissues ($P < 0.01$). **Conclusion** Lycopene could effectively lower wet weight/dry weight ratio, improve the histopathological changes, inhibit lung tissue apoptosis, and lower the AI. It is suggested that lycopene has dose-dependent protective effects on pulmonary ischemia-reperfusion injury in rats, which perhaps related to its effects of improving antioxidant ability and inhibiting the oxidative stress.

Key words: lycopene; lung tissue; ischemia-reperfusion; protection

肺缺血再灌注损伤是临床上开展肺移植、体外循环心脏手术以及机体大出血时常发生的肺损伤现象,其发病机制尚不完全清楚,目前认为恢复血流供应后,自由基的大量生成和过剩诱发肺组织氧化应激损伤以及细胞凋亡是造成肺缺血再灌注损伤的关键因素。番茄红素是广泛存在于番茄、胡萝卜、西瓜、草莓等红色蔬菜和水果中的一种胡萝卜素,经现代药理学研究发现,番茄红素具有良好的抗氧化、抗肿瘤、增强机体免疫力等活性^[1-3]。舒血宁注射液具有扩张血管、改善微循环的作用,闫莉等^[4]研究发现舒血宁注射液能够显著改善慢性阻塞性肺病患者抗氧化酶活性、降低氧化应激损伤。本实验通过夹闭左肺门 45 min 后松夹的方法制备肺缺血再灌注损伤大鼠模型,研究番茄红素对肺缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠,220~260 g,购于河北省实验动物中心,动物许可证号 SCXK(冀)2008-1-003。

1.2 试验药物与试剂

番茄红素(南京泽朗生物科技有限公司,质量分数 $\geq 96\%$,批号 20140205);舒血宁注射液(神威药业有限公司,规格 5 mL/支,批号 20131126);丙二醛(MDA)试剂盒(批号 20131227)、髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(批号 20140208)由南京建成生物工程研究所提供;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号 20131019)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(批号 20140410)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(批号 20140323)由北京博奥森生物技术有限公司提供;TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒(美国密理博公司,批号 20130911);乌拉坦(化学纯,北京化学试剂公司,批号 20120718)。

1.3 主要仪器

HX-300S 型动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);UV 759 紫外-可见分光光度计(上海圣科仪器设备有限公司);RM-2135 型石蜡切片机(德国 Leica 公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司);

FA-25 匀浆机(上海洽姆仪器科技有限公司);24D 高速离心机(深圳市赛泰克生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药

取 120 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、舒血宁注射液(4 mg/kg)组以及番茄红素 5、10、20 mg/kg 组,每组 20 只。番茄红素和舒血宁注射液组分别于术前 30 min 通过尾静脉给药,假手术组和模型组给予等体积的生理盐水。称量番茄红素,溶于适量 K-H 液制备 20 mg/mL 番茄红素溶液,然后依次稀释制备 10、5 mg/mL 番茄红素溶液,根据体质量计算给药容积,给药容积与体质量呈正比。

2.2 模型的制备^[5]

除假手术组外,其余各组大鼠经腹腔注射乌拉坦实施麻醉后,行气管插管,连接动物呼吸机(设置频率为 50 次/min,呼吸比例为 1:1,潮气量为 10 mL/kg),于左胸第 4 肋和第 5 肋间开胸,游离左肺门后,用无创血管夹闭左肺门,45 min 后松夹以恢复血流,整个过程辅助机械通气;假手术组行手术通路,除不夹闭左肺门外,其余操作同手术组。

2.3 肺组织湿质量/干质量比值的测定

再灌注 2 h 后,实施麻醉后开胸取左肺下叶组织,用生理盐水冲洗干净、滤纸吸干,称定质量,作为湿质量;于 60 °C 烘干箱 24 h 后称定质量,作为干质量,计算各组大鼠肺湿质量/干质量比值。

2.4 肺组织病理学改变的观察

再灌注 2 h 后,腹腔注射乌拉坦实施麻醉,开胸取左肺下叶组织,10%甲醛固定,石蜡包埋、切片(厚度为 5 μm),行常规苏木精-尹红(HE)染色,然后通过光学显微镜平行观察各组大鼠肺组织病变。

2.5 肺组织细胞凋亡的观察及凋亡指数的计算

取肺组织石蜡切片,按试剂盒操作步骤进行原位末端标记(TUNEL)染色,然后通过光学显微镜平行观察肺组织细胞凋亡状况;每张切片随机选取 6 个视野,计数每个视野中肺细胞总数以及阳性凋亡细胞数,计算各组大鼠肺组织细胞凋亡指数

(apoptosis index, AI)。

AI=凋亡细胞数/肺总细胞数

2.6 血清中MDA含量和MPO活性的检测

再灌注2 h后,腹腔注射乌拉坦实施麻醉,经腹主动脉取血,2 000 r/min离心10 min后,取上层血清,按照试剂盒操作步骤,紫外-可见分光光度计测定各组大鼠血清中MDA含量和MPO活性。

2.7 肺组织中SOD、GSH-Px、CAT活性的检测

再灌注2 h后实施麻醉,开胸取各组大鼠1.0 g左肺下叶组织,用冷生理盐水冲洗干净后,加入适量冷裂解液,剪碎后用组织匀浆器研磨匀浆,紫外-可见分光光度计测定各组大鼠肺组织中SOD、GSH-Px、CAT活性。

2.8 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用SPSS 15.0进行统计分析,组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD检验。

3 结果

3.1 各组大鼠肺组织湿质量/干质量比值的变化

模型组大鼠肺组织湿质量/干质量比值较假手术组显著升高($P < 0.01$),经番茄红素10、20 mg/kg预处理后,肺缺血再灌注损伤大鼠肺组织湿质量/干质量比值显著降低($P < 0.05$ 、 0.01),结果见表1。

3.2 各组大鼠肺组织病理学改变

通过HE染色并在光学显微镜下观察发现,假手术组大鼠肺组织未见异常:肺泡结构清晰、上皮结构完整、未见液体渗出和炎症细胞浸润;模型组

大鼠肺组织呈现明显的病理学改变:肺泡结构紊乱,上皮细胞变性、坏死,肺泡内有大量的液体渗出,炎症细胞浸润;经番茄红素10、20 mg/kg预处理后,肺缺血再灌注损伤大鼠肺组织病变显著改善,其中以番茄红素20 mg/kg预处理组效果最为显著,见图1。

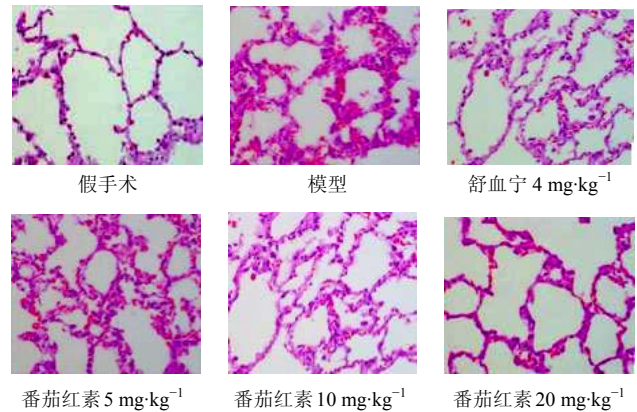


图1 番茄红素对肺缺血再灌注大鼠肺组织病变的影响
Fig. 1 Effects of lycopene on histopathological changes of lung tissues in rats of pulmonary ischemia-reperfusion injury

3.3 各组大鼠肺组织细胞凋亡状况及凋亡指数

通过TUNEL染色并在光学显微镜下观察,黄染者为凋亡细胞,发现假手术组大鼠肺组织可见极少凋亡细胞;模型组大鼠肺组织凋亡状况明显加重;经番茄红素预处理后,细胞凋亡状况明显改善,其中以番茄红素20 mg/kg预处理组效果最为显著,结果见图2。

表1 番茄红素对肺缺血再灌注大鼠肺组织湿质量/干质量比值和细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 1 Effects of lycopene on wet weight/dry weight and apoptosis of lung tissue in rats of pulmonary ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	湿质量/干质 量比值/%	AI/%
假手术	—	5.02±0.23	2.07±0.86
模型	—	6.36±0.51**	30.15±2.14**
舒血宁	4	5.85±0.37 [△]	21.04±1.82 [△]
番茄红素	5	6.14±0.46	26.38±2.07
	10	5.87±0.40 ^{△△}	20.29±1.74 [△]
	20	5.65±0.28 ^{△△}	14.43±1.50 ^{△△}

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$
** $P < 0.01$ vs Sham group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

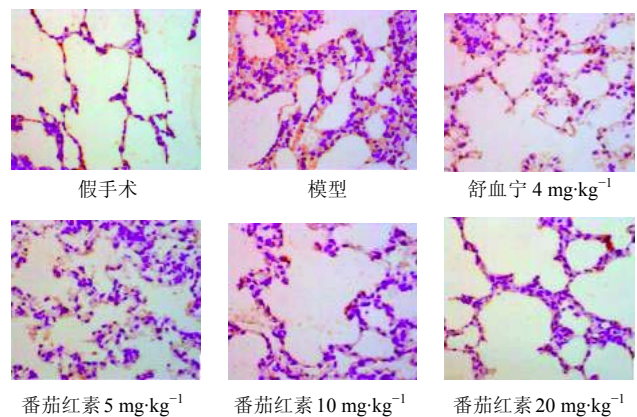


图2 番茄红素对肺缺血再灌注大鼠肺组织肺细胞凋亡的影响
Fig. 2 Effects of lycopene on lung tissue cells apoptosis in rats of pulmonary ischemia-reperfusion injury

模型组大鼠肺组织细胞凋亡指数较假手术组明显增高,经番茄红素 10、20 mg/kg 预处理后,凋亡指数显著降低,差异具有统计学意义($P < 0.05、0.01$),其中以番茄红素 20 mg/kg 预处理组效果最为显著,结果见表 1。

3.4 各组大鼠血清中 MDA 含量和 MPO 活性的变化

模型组大鼠血清中 MDA 含量显著升高、MPO 活性显著降低 ($P < 0.01$),经番茄红素 10、20 mg/kg 预处理后,MDA 含量和 MPO 活性显著降低 ($P < 0.05、0.01$),其中番茄红素 20 mg/kg 预处理组效果更加显著,结果见表 2。

3.5 各组大鼠肺组织中 SOD、GSH-Px、CAT 活性的变化

模型组大鼠肺组织中 SOD、GSH-Px、CAT 活性较假手术组显著降低 ($P < 0.01$),经番茄红素 10、20 mg/kg 预处理后,SOD、CAT 活性显著升高 ($P <$

0.05、0.01),其中番茄红素 20 mg/kg 预处理组 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$),结果见表 3。

表 2 番茄红素对肺缺血再灌注大鼠血清中 MDA 含量和 MPO 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 2 Effects of lycopene on content of MDA and activity of MPO in serum in rats of pulmonary ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	MDA/ (nmol·L ⁻¹)	MPO/(U·L ⁻¹)
假手术	—	2.48 ± 0.21	3.37 ± 0.61
模型	—	8.27 ± 0.59**	9.24 ± 2.05**
舒血宁	4	5.86 ± 0.53 [△]	5.59 ± 1.36 [△]
番茄红素	5	7.35 ± 0.61	7.62 ± 1.83
	10	5.63 ± 0.52 ^{△△}	5.46 ± 1.67 [△]
	20	4.19 ± 0.48 ^{△△}	4.25 ± 1.48 ^{△△}

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$
^{**} $P < 0.01$ vs Sham group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

表 3 番茄红素对肺缺血再灌注大鼠肺组织中 SOD、GSH-Px、CAT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=20$)

Table 3 Effects of lycopene on activity of SOD, GSH-Px, and CAT in lung tissue in rats of pulmonary ischemia-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD/(U·mg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)
假手术	—	16.5 ± 1.3	109.5 ± 14.2	1.92 ± 0.34
模型	—	11.8 ± 1.4**	81.4 ± 2.2**	0.87 ± 0.21**
舒血宁	4	12.3 ± 1.2	87.3 ± 10.4	1.41 ± 0.26
番茄红素	5	12.4 ± 1.3	86.1 ± 11.2	1.08 ± 0.25
	10	13.8 ± 1.4 [△]	92.7 ± 13.5	1.19 ± 0.24 [△]
	20	14.6 ± 1.5 ^{△△}	101.9 ± 12.9 ^{△△}	1.64 ± 0.28 ^{△△}

与假手术组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$
^{**} $P < 0.01$ vs Sham group; [△] $P < 0.05$ ^{△△} $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

随着肺移植、体外循环以及单侧肺循环阻断技术应用的逐渐广泛,肺缺血再灌注损伤成为临床上越来越常见的问题,是引起早期肺功能障碍的重要原因。随着近年来对肺缺血再灌注损伤发病机制研究的深入,发现氧自由基过剩所引发的氧化应激损伤以及肺组织细胞凋亡是造成肺缺血再灌注损伤的重要病理生理机制。程键等^[6]通过药物干预肺缺血再灌注大鼠模型,能够抑制氧化应激损伤,进而对大鼠肺缺血再灌注损伤起到保护作用。

番茄红素是一种胡萝卜素,具有良好的抗氧化、抗肿瘤、增强机体免疫力等活性,本实验采用夹闭

左肺门 45 min 后松夹的方法制备肺缺血再灌注损伤大鼠模型进行研究,发现经番茄红素 10、20 mg/kg 预处理后能够显著降低肺缺血再灌注损伤大鼠湿质量/干质量、改善肺组织病理学改变、抑制肺组织细胞凋亡并降低细胞凋亡率,其中番茄红素 20 mg/kg 预处理组效果最为显著,提示番茄红素对肺缺血再灌注大鼠具有剂量相关性的保护作用。

MPO 是中性粒细胞特有的酶,其活性能够反映中性粒细胞激活和浸润,也能间接反映组织氧化应激损伤程度^[7]。SOD 能够催化还原氧自由基生成 H₂O₂^[8],并进一步在 GSH-Px 和 CAT 的作用下还原生成对人体无害的 H₂O 和 O₂^[9],因此 SOD、

GSH-Px、CAT 的活性能够反映机体抗氧化能力；MDA 水平能够间接机体氧化应激损伤程度。本实验研究发现，番茄红素 10、20 mg/kg 预处理后能够有效改善 SOD、CAT 活性，降低 MDA 含量及 MPO 活性，其中番茄红素 20 mg/kg 预处理能够显著改善 GSH-Px 活性，提示番茄红素对肺缺血再灌注大鼠氧化应激损伤具有剂量相关性的抑制作用。

综上所述，番茄红素对肺缺血再灌注大鼠具有剂量相关性的保护作用，其作用机制可能与番茄红素能够有效改善机体抗氧化酶活性、抑制肺组织氧化应激损伤有关。

参考文献

- [1] 魏延, 沈新南, 麦嘉仪, 等. 番茄红素对脑缺血再灌注大鼠活性氧及缺氧损伤的影响 [J]. 中华预防医学杂志, 2010, 44(1): 34-38.
- [2] De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, *et al.* Plant foods and risk of laryngeal cancer: A case-control study in Uruguay [J]. *Int J Cancer*, 2000, 87(1): 129-132.
- [3] 张建武, 闵冬雨, 周云, 等. 番茄红素对 H₂O₂ 致乳鼠心肌细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 160-164.
- [4] 闫莉, 平芬, 韩晓雯. 舒血宁对慢性阻塞性肺病急性加重期患者氧化/抗氧化失衡的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(12): 1499-1501.
- [5] Xia Z Y, Gao J, Ancharaz A K. Protective effect of ischemic postconditioning on lung ischemia-reperfusion injury in rats and the role of heme oxygenase-1 [J]. *Chin J Traumatol*, 2009, 12(3): 162-166.
- [6] 程键, 程青, 杨剑虹, 等. 丹参对大鼠肺缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 海南医学院学报, 2009, 15(11): 1349-1352.
- [7] 段若望, 李明星, 宋炯. 不同血液 pH 值对大鼠肺移植时缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2010, 30(6): 685-687.
- [8] Patel S B, Santani D, Patel V, *et al.* Anti-diabetic effects of ethanol extract of Bryonia laciniosa seeds and its saponins rich fraction in neonatally streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Pharmacognosy Res*, 2015, 7(1): 92-99.
- [9] Bacanl M, Aydın S, Taner G, *et al.* The protective role of ferulic acid on sepsis-induced oxidative damage in Wistar albino rats [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2014, 38(3): 774-782.