

盐酸川芎嗪注射液通过 Nrf2/HO-1 通路对肝脏缺血再灌注损伤的影响

冯磊, 赵杰

邯郸市中心医院 血管介入一科, 河北 邯郸 056001

摘要:目的 探讨盐酸川芎嗪注射液对大鼠肝脏缺血再灌注损伤及 E2 相关因子 2 (Nrf2)/血红素加氧酶 1 (HO-1) 通路的影响。方法 按随机数字表法将 100 只大鼠分为假手术组、模型组、丹参注射液 (2 mL/kg) 组、盐酸川芎嗪注射液 (30 mg/kg) 组和盐酸川芎嗪注射液 (30 mg/kg) + 鸦胆子苦醇 (Nrf2 抑制剂, 2 mg/kg) 组。除假手术组外, 各组大鼠采用阻断肝门静脉和肝动脉 1 h 的方法制备肝脏缺血再灌注损伤大鼠模型, 造模前 30 min ip 相应药物。造模 6 h 后, 采用生化分析法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)、总胆红素 (TBIL) 水平; 苏木精 - 伊红 (HE) 染色法检测肝组织病理学改变; 比色法检测肝组织超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性和丙二醛 (MDA) 含量, ELISA 法检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6 含量, Western blotting 法检测核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶 1 (Nrf2/HO-1) 通路相关蛋白表达水平。**结果** 与模型组比较, 丹参注射液组和盐酸川芎嗪注射液组血清 ALT、AST、TBIL 水平显著降低 ($P < 0.05$), 肝组织病理学改变明显改善, 病理评分显著降低 ($P < 0.05$); 肝组织 SOD、GSH-Px 活性显著升高, 且 MDA、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量显著降低 ($P < 0.05$), Nrf2、HO-1 表达量显著升高 ($P < 0.05$), 胞核核因子- κ B (NF- κ B) p65 表达量及胞核 NF- κ B p65/胞浆 NF- κ B p65 比值降低 ($P < 0.05$)。Nrf2 抑制剂鸦胆子苦醇能够明显逆转盐酸川芎嗪注射液对 Nrf2/HO-1 通路的激活作用以及对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用。**结论** 盐酸川芎嗪注射液可能通过激活 Nrf2/HO-1 通路、抑制 NF- κ B 核转位减轻肝脏缺血再灌注损伤大鼠氧化应激和炎症损伤, 对肝脏缺血再灌注损伤起到保护作用。

关键词: 盐酸川芎嗪注射液; 肝缺血再灌注; 核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶 1; 核因子- κ B; 氧化应激; 炎症

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)01-0022-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.01.004

Effects of Ligustrazine Hydrochloride Injection on hepatic ischemia-reperfusion injury through Nrf2/HO-1 pathway

FENG Lei, ZHAO Jie

Department of Vascular Intervention, Handan Central Hospital, Handan 056001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of Ligustrazine Hydrochloride Injection on hepatic ischemia-reperfusion injury and E2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase 1 (HO-1) pathway in rats. **Methods** According to the random number table method, 100 rats were equally divided into sham operation group, model group, Salvia Miltiorrhiza Injection (2 mL/kg) group, Ligustrazine Hydrochloride Injection (30 mg/kg) group, and Ligustrazine Hydrochloride Injection (30 mg/kg) + brusatol (Nrf2 inhibitor, 2 mg/kg) group. Except for the sham operation group, rats in each group were treated with blocking the hepatic portal vein and hepatic artery for 1 h to prepare the rat model of hepatic ischemia reperfusion injury, and corresponding drugs were used 30 min before the model. 6 h after hepatic ischemia-reperfusion injury, the level of ALT, AST, TBIL in serum were detected by biochemical analysis method, the pathological changes of hepatic tissue were detected by HE staining method. The activity of SOD, GSH-Px, and the content of MDA in hepatic tissue was detected by colorimetry. The content of TNF- α , IL-1 β , IL-6 were detected by ELISA method, the expression of Nrf2/HO-1 pathway related proteins were detected by Western blotting method. **Results** Compared with the model group, the level of ALT, AST, and TBIL of Salvia Miltiorrhiza Injection group and Ligustrazine Hydrochloride Injection group were decreased ($P < 0.05$). The hepatic pathological changes was improved, and the pathological score was decreased ($P < 0.05$). The activity of SOD, GSH-Px in hepatic tissue were increased, and the content of MDA, TNF- α , IL-1 β , and IL-6 were decreased ($P < 0.05$), but the

收稿日期: 2022-10-27

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划 (20201142)

作者简介: 冯磊, 男, 主治医师, 硕士, 从事血管介入治疗研究。E-mail: fengl0310@163.com

expression of Nrf2, HO-1 were increased ($P < 0.05$), and the expression of nuclear NF- κ B p65 and the ratio of nuclear NF- κ B p65/cytoplasmic NF- κ B p65 were decreased ($P < 0.05$). The Nrf2 inhibitor brusatol could obviously reverse the activation effect of ligustrazine hydrochloride injection on the Nrf2/HO-1 pathway and the protective effect on hepatic ischemia-reperfusion injury in rats.

Conclusion Ligustrazine Hydrochloride Injection can reduce oxidative stress and inflammatory injury in hepatic ischemia-reperfusion injury rats by activating the Nrf2/HO-1 pathway, and inhibiting NF- κ B nuclear translocation, which play a protective role against hepatic ischemia-reperfusion injury.

Key words: Ligustrazine Hydrochloride Injection; hepatic ischemia-reperfusion; Nrf2/HO-1 pathway; NF- κ B; oxidative stress; inflammation

肝缺血再灌注损伤是影响肝脏手术患者预后的重要因素^[1]。病理生理学研究发现,氧化应激和炎症在肝缺血再灌注初期即出现,是肝缺血再灌注损伤发生发展的重要机制^[2-3]。核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶 1 (Nrf2/HO-1) 是调控氧化应激和炎症反应的重要信号通路^[4-5]。有文献报道,通过药物干预肝缺血再灌注大鼠或小鼠动物模型,激活 Nrf2/HO-1 通路而提高抗氧化和抗炎能力,能够有效降低肝缺血再灌注损伤^[6-8]。因此, Nrf2/HO-1 通路可作为抗肝缺血再灌注损伤新药研究的潜在靶点。川芎是主产于我国四川省的一味中药,《日华子本草》记载“川芎上行可达巅顶、下行可达血海,适宜瘀血阻滞各种病症”。著名医家王好古提出“川芎具有搜肝气、补肝血、润肝燥、补风虚之功效”。川芎嗪是中药川芎的主要有效成分,具有良好的抗炎、抗氧化活性^[9],且研究证实,川芎嗪可通过激活 Nrf2/HO-1 通路提高脑缺血再灌注大鼠和哮喘小鼠抗氧化和抗炎能力^[10-11]。盐酸川芎嗪注射液是以川芎嗪为有效成分制成的中药注射剂,目前临床上主要用于缺血性脑血管病及其他缺血性血管疾病的治疗。有研究发现,盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注损伤大鼠能量代谢具有保护作用^[12],但盐酸川芎嗪注射液是否对肝缺血再灌注损伤大鼠肝功能及肝组织损伤具有影响且作用机制尚不清楚。本研究旨在探讨盐酸川芎嗪注射液对大鼠肝缺血再灌注损伤的影响及相关机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

100 只清洁级雄性 SD 大鼠购自河北医科大学实验动物公共服务平台[实验动物生产许可证号 SCXK(冀) 2020-001], 7 周龄, 体质量 (230 $\pm$ 15) g, 清洁环境分笼饲养于邯郸康业制药有限公司[实验动物使用许可证号 SYXK(冀) 2019-003]。本实验方案通过邯郸市中心医院医学伦理委员会审批[伦理批准号 HDZXLL(K)字 2021017], 实验过程中所

有大鼠均按照 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 实验药物与试剂

盐酸川芎嗪注射液(规格 2 mL:40 mg, 批号 JY210317)购自天津金耀药业有限公司; 丹参注射液(规格 10 mL/支, 批号 2021A01014)购自成都天台山制药有限公司; Nrf2 抑制剂鸦胆子苦醇购自美国 MCE 公司(批号 HY-19742); 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TBIL)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6) 试剂盒和苏木精-伊红 (HE) 染色试剂盒购自南京建成生物工程有限公司(批号 200417、200325、191206、200409、200102、191127、200413); 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙二醛 (MDA) 购自北京索莱宝生物科技有限公司(货号分别为 BC0170、BC1190、BC0020); 胞浆核蛋白制备试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司(批号 0924A07); Nrf2、HO-1、核因子- κ B p65 (NF- κ B p65)、 β -actin、组蛋白 3 (H3) 抗体和 IgG 二抗、DAB 显色试剂盒购自北京博奥森生物科技有限公司(货号分别为 bs-1074R、bs-23397R、bs-3485R、bs-0061R、bs-3776R、bs-0294P、C-0003)。

1.3 主要仪器

BK200 型生化分析仪(山东博科生物产业有限公司); RM2015 型切片机(德国 Leica 公司); Nano-100 型分光光度计(杭州奥盛仪器有限公司); SpectraFluor 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); 164-5050 型电泳槽、Trans-Blot 型转膜槽(美国 Bio-Rad 公司); BX51 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.4 实验方法

1.4.1 分组、造模与给药 将 100 只大鼠按随机数字表法随机平均分为假手术组、模型组、丹参注射液组、盐酸川芎嗪注射液组、盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇组。除假手术组外, 各组大鼠均参照袁芳等^[13]报道的方法, 通过阻断肝门静脉和肝动脉 1 h

复制肝缺血再灌注大鼠模型；假手术组行手术通路，暴露肝门静脉和肝动脉但不夹闭。造模前 30 min，丹参注射液组以 2 mL/kg 剂量 ip 给药^[14]，盐酸川芎嗪注射液组以 30 mg/kg 剂量 ip 给药（根据人临床剂量换算），盐酸川芎嗪注射液+鸭胆子苦醇组以盐酸川芎嗪注射液 30 mg/kg、鸭胆子苦醇 2 mg/kg ip 给药^[15]，假手术组和模型组 ip 给予 0.9% 氯化钠溶液。

1.4.2 血清 ALT、AST、TBIL 水平检测 再灌注 6 h 后，随机取各组大鼠 10 只，麻醉后经腹主动脉取血，静置 30 min 后 3 500 r/min 离心（离心半径为 8 cm）10 min 后分离血清，通过全自动生化分析仪检测血清 ALT、AST、TBIL 水平。

1.4.3 HE 染色法检测肝组织病理学改变及病理评分 取血完成后，颈椎脱臼处死、取肝脏，0.9% 氯化钠溶液冲洗后置于 10% 中性甲醛中固定 72 h，经石蜡包埋和切片后，行常规 HE 染色，通过显微镜观察肝组织病理学改变。病理评分^[16]：光学显微镜下，分别从胞体固缩、胞质染色消失、空泡变性、胞核消失、红细胞淤积、炎性细胞浸润 6 个方面进行评分，视野内未见病变记 0 分，病变占视野 < 10% 记 1 分、10%~50% 记 2 分、50%~100% 记 3 分，6 个方面评分总和即为病理评分。

1.4.4 肝脏组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA、TNF-α、IL-1β、IL-6 含量检测 再灌注 6 h 后，取各组剩余的 10 只大鼠，麻醉后颈椎脱臼处死，开腹取肝脏组织，剪碎后加入 5 倍量裂解液、研磨匀浆，取部分匀浆液经 3 500 r/min 离心（离心半径 8 cm）10 min 后取上清液，然后按照试剂盒操作说明进行处理后，分光光度法检测 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量，ELISA 法检测 TNF-α、IL-1β、IL-6 含量。

1.4.5 肝组织 Nrf2、HO-1、胞浆 NF-κB p65、胞核 NF-κB p65 蛋白表达检测 取部分肝脏组织匀浆液，按照胞浆胞核蛋白提取试剂盒操作说明制备胞浆胞核蛋白，BCA 法检测总蛋白含量后，行 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、5% 脱脂奶粉溶液 37 °C 封闭 1 h，滴加目标蛋白抗体、β-actin、H3 抗体 4 °C 孵育过夜，滴加二抗 37 °C 孵育 1 h，滴加 DAB 溶液显色，以 β-actin 或 H3 为内参半定量目标蛋白表达量。

1.5 统计学方法

运用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差齐两两比较采用 LSD-*t* 检验，方差不齐经校正后采用 Dunnett's T3 检验；不符合正态分布的以中位数（四分位数间距）[M(P25~P75)] 表示，采用 Wilcoxon 秩和检验。

2 结果

2.1 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平的影响

与假手术组相比，模型组 ALT、AST、TBIL 水平显著升高 ($P < 0.05$)；与模型组相比，丹参注射液组、盐酸川芎嗪注射液组、盐酸川芎嗪注射液+鸭胆子苦醇组 ALT、AST、TBIL 水平均显著降低 ($P < 0.05$)；与丹参注射液组相比，盐酸川芎嗪注射液组 ALT、AST 水平降低；与盐酸川芎嗪注射液组相比，盐酸川芎嗪注射液+鸭胆子苦醇组 ALT、AST、TBIL 水平显著升高 ($P < 0.05$)，见表 1。

2.2 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠肝组织病理学改变及病理评分的影响

假手术组大鼠肝索排列整齐，肝细胞结构完整、形态正常；模型组呈现肝索排列紊乱，肝细胞

表 1 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Effects of Ligustrazine Hydrochloride Injection on the levels of ALT, AST, TBIL in serum of hepatic ischemia-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量	ALT/(U·L ⁻¹)	AST/(U·L ⁻¹)	TBIL/(μmol·L ⁻¹)
假手术	—	47.62 ± 8.71	65.93 ± 13.29	0.58 ± 0.14
模型	—	285.16 ± 54.93*	407.28 ± 71.46*	3.72 ± 0.63*
丹参注射液	2 mL·kg ⁻¹	136.08 ± 23.17 [#]	184.52 ± 19.25 [#]	1.25 ± 0.24 [#]
盐酸川芎嗪注射液	30 mg·kg ⁻¹	96.57 ± 17.32 ^{#Δ}	135.04 ± 19.25 ^{#Δ}	1.06 ± 0.21 [#]
盐酸川芎嗪注射液+鸭胆子苦醇	30 mg·kg ⁻¹ +2 mg·kg ⁻¹	204.08 ± 49.56 ^{#▲}	289.41 ± 68.73 ^{#▲}	2.55 ± 0.52 ^{#▲}

与假手术组比较：* $P < 0.05$ ；与模型组比较：[#] $P < 0.05$ ；与丹参注射液组比较：^Δ $P < 0.05$ ；与盐酸川芎嗪注射液组比较：[▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; [#] $P < 0.05$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs Salvia Miltiorrhiza Injection group; [▲] $P < 0.05$ vs Ligustrazine Hydrochloride Injection group

肿胀、空泡变性、坏死,肝血窦受压变窄,炎细胞浸润等病理学改变;与模型组相比,丹参注射液和盐酸川芎嗪注射液组病理学改变均明显改善,而盐酸川芎嗪注射液组改善效果优于丹参注射液组;与盐酸川芎嗪注射液组相比,盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇组肝索排列紊乱,肝细胞肿胀、坏死,炎细胞浸润等病理学改变明显加重。与假手术组相

比,模型组病理评分显著升高 ($P<0.05$);与模型组相比,丹参注射液组、盐酸川芎嗪注射液组、盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇组病理评分显著降低 ($P<0.05$);与丹参注射液组相比,盐酸川芎嗪注射液组病理评分显著降低 ($P<0.05$);与盐酸川芎嗪注射液组相比,盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇组病理评分显著升高 ($P<0.05$)。见图 1、表 2。

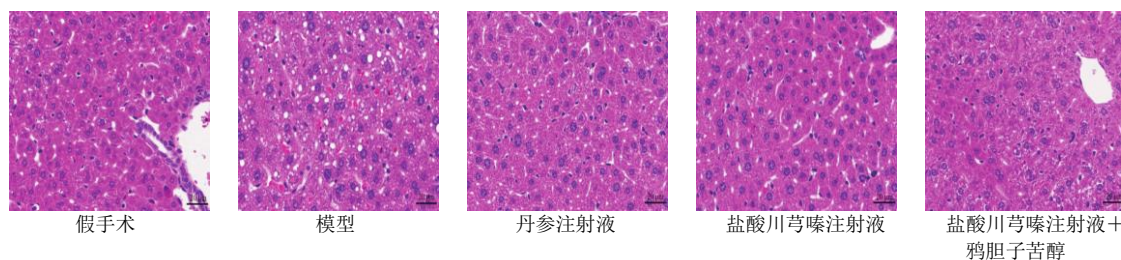


图 1 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠肝组织病理学改变的影响 ($\times 400$)

Fig. 1 Effects of Ligustrazine Hydrochloride Injection on hepatic tissue histopathological changes in hepatic ischemia-reperfusion injury rats ($\times 400$)

表 2 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠肝组织病理评分的影响[M(P25~P75), $n=10$]

Table 2 Effects of Ligustrazine Hydrochloride Injection on the pathological score of hepatic tissue in hepatic ischemia-reperfusion injury rats [M(P25~P75), $n=10$]

组别	剂量	病理评分
假手术	—	1.00 (0.00~2.00)
模型	—	12.00 (8.00~14.00)*
丹参注射液	2 mL·kg ⁻¹	6.00 (5.00~8.00)#
盐酸川芎嗪注射液	30 mg·kg ⁻¹	4.00 (3.00~6.00)# [△]
盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇	30 mg·kg ⁻¹ +2 mg·kg ⁻¹	9.00 (7.00~10.00)# [▲]

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与丹参注射液组比较: [△] $P<0.05$; 与盐酸川芎嗪注射液组比较: [▲] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs sham operation group; # $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs Salvia Miltiorrhiza Injection group; [▲] $P<0.05$ vs Ligustrazine Hydrochloride Injection group

表 3 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠肝组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

Table 3 Effects of Ligustrazine Hydrochloride Injection on the activity of SOD, GSH-Px and the content of MDA in hepatic tissue of hepatic ischemia-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	剂量	SOD/(U·mg ⁻¹)	GSH-Px/(U·mg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)
假手术	—	134.28±15.06	171.93±20.14	1.65±0.22
模型	—	65.72±9.14*	74.65±11.28*	5.83±0.90*
丹参注射液	2 mL·kg ⁻¹	100.26±13.38#	106.49±12.71#	2.87±0.34#
盐酸川芎嗪注射液	30 mg·kg ⁻¹	113.05±14.62#	138.26±17.40# [△]	2.17±0.26# [△]
盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇	30 mg·kg ⁻¹ +2 mg·kg ⁻¹	78.39±10.57# [▲]	86.75±12.91 [▲]	5.02±0.78 [▲]

与假手术组比较: * $P<0.05$; 与模型组比较: # $P<0.05$; 与丹参注射液组比较: [△] $P<0.05$; 与盐酸川芎嗪注射液组比较: [▲] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs sham operation group; # $P<0.05$ vs model group; [△] $P<0.05$ vs Salvia Miltiorrhiza Injection group; [▲] $P<0.05$ vs Ligustrazine Hydrochloride Injection group

2.3 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠肝组织 SOD、GSH-Px 活性和 MDA 含量的影响

与假手术组相比,模型组 SOD、GSH-Px 活性显著降低,MDA 含量显著升高 ($P<0.05$);与模型组相比,丹参注射液组、盐酸川芎嗪注射液组、盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇组 SOD 活性显著升高,丹参注射液组和盐酸川芎嗪注射液组 GSH-Px 活性显著升高、MDA 含量显著降低 ($P<0.05$);与丹参注射液组相比,盐酸川芎嗪注射液组 GSH-Px 活性显著升高、MDA 含量降低 ($P<0.05$);与盐酸川芎嗪注射液组相比,盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇组 SOD、GSH-Px 活性显著降低,MDA 含量显著升高 ($P<0.05$),见表 3。

2.4 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠肝组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量的影响

与假手术组相比,模型组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 显著升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,丹参注射液组、盐酸川芎嗪注射液组、盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇组

苦醇组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 显著降低 ($P < 0.05$);与丹参注射液组相比,盐酸川芎嗪注射液组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 显著降低 ($P < 0.05$);与盐酸川芎嗪注射液组相比,盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 显著升高 ($P < 0.05$),见表 4。

表 4 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠肝组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 4 Effects of Ligustrazine Hydrochloride Injection on the contents of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in hepatic tissue of hepatic ischemia-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
假手术	—	40.15 $\pm$ 6.72	36.83 $\pm$ 5.41	19.41 $\pm$ 3.28
模型	—	268.29 $\pm$ 55.08*	179.40 $\pm$ 35.28*	103.75 $\pm$ 16.12*
丹参注射液	2 mL·kg ⁻¹	106.74 $\pm$ 15.92 [#]	81.36 $\pm$ 12.75 [#]	43.86 $\pm$ 7.01 [#]
盐酸川芎嗪注射液	30 mg·kg ⁻¹	81.35 $\pm$ 13.64 ^{#Δ}	68.57 $\pm$ 9.34 ^{#Δ}	32.40 $\pm$ 5.83 ^{#Δ}
盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇	30 mg·kg ⁻¹ +2 mg·kg ⁻¹	197.06 $\pm$ 48.13 ^{#$\blacktriangle$}	115.38 $\pm$ 24.19 ^{#$\blacktriangle$}	87.19 $\pm$ 14.52 ^{#$\blacktriangle$}

与假手术组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: [#] $P < 0.05$;与丹参注射液组比较: ^{Δ} $P < 0.05$;与盐酸川芎嗪注射液组比较: ^{$\blacktriangle$} $P < 0.05$

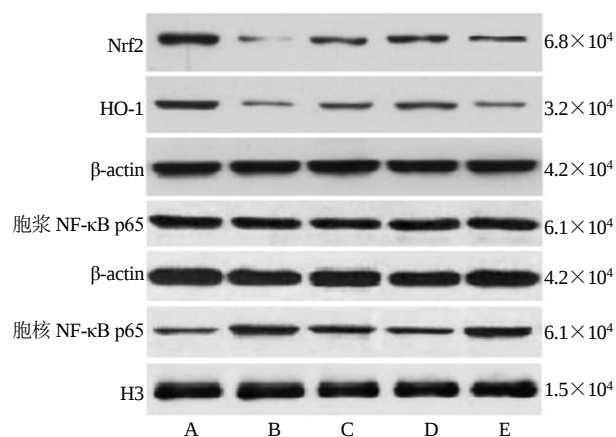
* $P < 0.05$ vs sham operation group; [#] $P < 0.05$ vs model group; ^{Δ} $P < 0.05$ vs Salvia Miltiorrhiza Injection group; ^{$\blacktriangle$} $P < 0.05$ vs Ligustrazine Hydrochloride Injection group

2.5 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠肝组织 Nrf2、HO-1、胞浆 NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白表达及胞核 NF- κ B p65/胞浆 NF- κ B p65 比值的影响

与假手术组相比,模型组 Nrf2、HO-1 表达量降低,胞核 NF- κ B p65 表达量和胞核 NF- κ B p65/胞浆 NF- κ B p65 比值升高 ($P < 0.05$);与模型组相比,丹参注射液组、盐酸川芎嗪注射液组和盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇组 Nrf2、HO-1 表达量显著升高 ($P < 0.05$),丹参注射液组和盐酸川芎嗪注射液组胞核 NF- κ B p65 表达量和胞核 NF- κ B p65/胞浆 NF- κ B p65 比值显著降低 ($P < 0.05$);与丹参注射液组相比,盐酸川芎嗪注射液组 Nrf2、HO-1 表达量显著升高,胞核 NF- κ B p65 表达量和胞核 NF- κ B p65/胞浆 NF- κ B p65 比值显著降低 ($P < 0.05$);与盐酸川芎嗪注射液组相比,盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇组 Nrf2、HO-1 表达量显著降低,胞核 NF- κ B p65 表达量和胞核 NF- κ B p65/胞浆 NF- κ B p65 比值升高 ($P < 0.05$),见图 2、表 5。

3 讨论

肝缺血再灌注损伤是导致肝脏外科手术后肝功能异常、影响患者预后的重要因素,是医药相关研究关注的热点。川芎是我国药典收录的一味中药,其主要活性成分川芎嗪是一种活性生物碱,具有抗炎、抗氧化等多种药理学作用,盐酸川芎嗪注射液是以川芎嗪为有效成分制成的中药注射剂。丹



A-假手术 B-模型 C-丹参注射液 D-盐酸川芎嗪注射液 E-盐酸川芎嗪注射液+鸦胆子苦醇

A-sham operation B-model C-Salvia Miltiorrhiza Injection D-Ligustrazine Hydrochloride Injection E-Ligustrazine Hydrochloride Injection + brusatol

图 2 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠肝组织 Nrf2、HO-1、胞浆 NF- κ B p65、胞核 NF- κ B p65 蛋白表达的影响 ($n = 10$)

Fig. 2 Effects of Ligustrazine Hydrochloride Injection on the expression of Nrf2, HO-1, cytoplasmic NF- κ B p65, nuclear NF- κ B p65 protein in hepatic tissue of hepatic ischemia-reperfusion injury rats ($n = 10$)

参注射液具有活血化瘀等功效,是临床防治肝缺血再灌注损伤的常用药物,常作为阳性对照药物用于肝缺血再灌注损伤相关实验研究^[14,17];并且有研究报道丹参注射液具有促进 Nrf2/HO-1 通路相关蛋白

表 5 盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠肝组织 Nrf2、HO-1、胞浆 NF-κB p65、胞核 NF-κB p65 蛋白表达及胞核 NF-κB p65/胞浆 NF-κB p65 比值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Effects of Ligustrazine Hydrochloride Injection on the expression of Nrf2, HO-1, cytoplasmic NF-κB p65, nuclear NF-κB p65 protein and the ratio of nuclear NF-κB p65/cytoplasmic NF-κB p65 in hepatic tissue of hepatic ischemia-reperfusion injury rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量	Nrf2/β-actin	HO-1/β-actin	胞浆 NF-κB p65/ β-actin	胞核 NF-κB p65/H3	胞核 NF-κB p65/ 胞浆 NF-κB p65
假手术 模型	—	0.91 ± 0.12	0.72 ± 0.10	0.88 ± 0.14	0.18 ± 0.03	0.20 ± 0.04
丹参注射液	2 mL·kg ⁻¹	0.05 ± 0.01*	0.08 ± 0.02*	0.85 ± 0.13	0.73 ± 0.12*	0.86 ± 0.15*
盐酸川芎嗪注射液	30 mg·kg ⁻¹	0.28 ± 0.04 [#]	0.17 ± 0.03 [#]	0.85 ± 0.14	0.38 ± 0.06 [#]	0.45 ± 0.08 [#]
盐酸川芎嗪注射液 + 鸦胆子苦醇	30 mg·kg ⁻¹ + 2 mg·kg ⁻¹	0.46 ± 0.08 ^{#Δ}	0.38 ± 0.07 ^{#Δ}	0.91 ± 0.16	0.24 ± 0.04 ^{#Δ}	0.26 ± 0.05 ^{#Δ}
		0.25 ± 0.04 ^{#▲}	0.14 ± 0.03 ^{#▲}	0.89 ± 0.15	0.66 ± 0.12 [▲]	0.74 ± 0.13 [▲]

与假手术组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; 与丹参注射液组比较: ^Δ $P < 0.05$; 与盐酸川芎嗪注射液组比较: [▲] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs sham operation group; [#] $P < 0.05$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs Salvia Miltiorrhiza Injection group; [▲] $P < 0.05$ vs Ligustrazine Hydrochloride Injection group

表达的作用^[18]。通过阻断肝门静脉和肝动脉 1 h 制备肝缺血再灌注大鼠模型是肝缺血再灌注相关动物实验研究常用的造模方法,该方法操作简单、一致性好且接近临床肝缺血再灌注病理生理特点。本实验结果显示,肝缺血再灌注模型大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平明显升高(说明肝功能明显受损),肝脏组织可见肝索排列紊乱,肝细胞肿胀、空泡变性、坏死,肝血窦受压变窄,炎细胞浸润等病理学改变,与黄蕾等^[19]研究报道一致。盐酸川芎嗪注射液或丹参注射液预处理可显著降低肝缺血再灌注模型大鼠血清 ALT、AST、TBIL 水平(说明肝功能明显改善),明显减轻肝脏组织病理性变化、降低病理评分;盐酸川芎嗪注射液组上述效应优于丹参注射液组。而 Nrf2 抑制剂鸦胆子苦醇能够明显逆转盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注模型大鼠的影响。说明盐酸川芎嗪注射液对大鼠肝缺血再灌注损伤有抑制作用,作用机制可能与 Nrf2 信号通路有关。

氧化应激和炎症反应在肝缺血再灌注损伤进展过程中发挥着重要作用。徐嘉元等^[20]研究发现在肝缺血再灌注初期即出现活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)和 TNF-α、IL-1β、IL-6 大量分泌,进而导致氧化应激损伤和炎症损伤。维持 SOD、GSH-Px 活性是机体清除 ROS 而免受氧化应激损伤的基础,但肝缺血再灌注导致 ROS 大量分泌而过度消耗 SOD 和 GSH-Px,致使 ROS 不能被完全清除,ROS 将攻击生物膜脂质双分子层、蛋白质、核酸等大分子并生成具有生物毒性的 MDA,导致细胞死亡^[21]。TNF-α、IL-1β、IL-6 等炎症因子分泌将引发炎症反应。TNF-α 还能够趋化胶质细胞等释放其它炎症因子而加重炎症损伤,IL-1β 则能够

诱导黏附分子表达上调而促进炎细胞浸润^[22-23]。

Nrf2 在哺乳动物细胞中普遍存在,其结构包含 7 个同源结构域,其中环氧氯丙烷相关蛋白同源结构域中含有 1 个碱基拉链结构位点,该位点能够与抗氧化反应元件结合而诱导 SOD、GSH-Px 等抗氧化酶转录与表达,从而降低氧化应激损伤^[24]。HO-1 表达受 Nrf2 调控,能够促进血红素降解,降解产物中胆绿素为内源性抗氧化剂,在抑制机体氧化应激损伤中发挥着重要作用^[25]。NF-κB 核转位后 p65 亚基能够诱导 TNF-α、IL-1β、IL-6 转录与表达而加重炎症损伤^[26]。有文献报道,HO-1 对 NF-κB 核转位具有抑制作用^[27]。本实验结果显示,盐酸川芎嗪注射液或丹参注射液预处理可显著提高肝缺血再灌注大鼠肝脏组织 SOD、GSH-Px 活性,显著降低肝脏组织 MDA、TNF-α、IL-1β、IL-6 含量,上调肝脏组织 Nrf2、HO-1 表达,抑制 NF-κB 核转位;盐酸川芎嗪注射液组对上述指标的调控作用优于丹参注射液组。而 Nrf2 抑制剂鸦胆子苦醇能够明显逆转盐酸川芎嗪注射液对肝缺血再灌注大鼠肝脏组织 Nrf2、HO-1 表达及 NF-κB 核转位的影响。说明盐酸川芎嗪注射液能够抑制肝缺血再灌注大鼠氧化应激反应和炎症,该作用可能与活化 Nrf2/HO-1 通路、抑制 NF-κB 核转位有关。

综上所述,盐酸川芎嗪注射液可抑制肝缺血再灌注大鼠氧化应激和炎症损伤,作用机制可能与盐酸川芎嗪注射液激活 Nrf2/HO-1 通路、抑制 NF-κB 核转位有关。本研究结果为盐酸川芎嗪注射液作为肝缺血再灌注损伤防治备选药物提供了理论支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Konishi T, Lentsch A B. Hepatic ischemia/reperfusion: mechanisms of tissue injury, repair, and regeneration [J]. *Gene Expr*, 2017, 17(4): 277-287.
- [2] 邵亮, 徐旭仲. 丙泊酚对小鼠肝脏缺血再灌注损伤后氧化应激和炎症的影响 [J]. *肝胆胰外科杂志*, 2017, 29(5): 398-402.
- [3] Chen Z, Wang J, Yang W, *et al.* FAM3A mediates PPAR γ 's protection in liver ischemia-reperfusion injury by activating Akt survival pathway and repressing inflammation and oxidative stress [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49882-49896.
- [4] 任辉邦, 张斌, 尹启超, 等. 山姜素通过 PI3K/Nrf2/HO-1 通路减少炎症和氧化应激反应改善盲肠结扎和穿孔诱导的脓毒症大鼠的急性肺损伤 [J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(7): 575-583.
- [5] Li H, LÜ L, Wu C, *et al.* Methyl jasmonate protects microglial cells against β -amyloid-induced oxidative stress and inflammation via Nrf2-dependent HO-1 pathway [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2020, 16: 1399-1410.
- [6] Yuan B, Huang H, Qu S, *et al.* Gastrodin pretreatment protects liver against ischemia-reperfusion injury via activation of the Nrf2/HO-1 pathway [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(5): 1159-1178.
- [7] Ibrahim S G, El-Emam S Z, Mohamed E A, *et al.* Dimethyl fumarate and curcumin attenuate hepatic ischemia/ reperfusion injury via Nrf2/HO-1 activation and anti-inflammatory properties [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 80: 106131.
- [8] Chen Y, Li T, Tan P, *et al.* Kaempferol from penthorum chinense pursh attenuates hepatic ischemia/reperfusion injury by suppressing oxidative stress and inflammation through activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 857015.
- [9] AlKreathy H M, Alghamdi M K, Esmat A. Tetramethylpyrazine ameliorates indomethacin-induced gastric ulcer in rats: Impact on oxidative, inflammatory, and angiogenic machineries [J]. *Saudi Pharm J*, 2020, 28(8): 916-926.
- [10] Chang C Y, Kao T K, Chen W Y, *et al.* Tetramethylpyrazine inhibits neutrophil activation following permanent cerebral ischemia in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 463(3): 421-427.
- [11] 徐畅, 宋艺兰, 姜京植, 等. 川芎嗪通过 AMPK/NF- κ B 和 Nrf-2/HO-1 途径减轻过敏性气道炎症和氧化应激的实验研究 [J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(2): 100-106.
- [12] 骆助林, 田伏洲, 汤礼军, 等. 川芎嗪预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤能量代谢的保护作用 [J]. *四川大学学报: 医学版*, 2012, 43(4): 540-542.
- [13] 袁芳, 杨智承. 苦参碱对大鼠肝缺血再灌注损伤后肝功能及 MAPK 通路的影响 [J]. *广东药科大学学报*, 2020, 36(5): 657-661.
- [14] 钟敬波, 徐成. 促红细胞生成素对大鼠肝缺血再灌注损伤氧自由基、细胞间黏附分子-1 的表达及中性粒细胞浸润的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2019, 35(4): 358-360.
- [15] 岳亚光, 檀薇薇, 王文川, 等. 二甲双胍经 Nrf2-Gpx4 通路抑制铁死亡并减轻非酒精性脂肪性肝病大鼠的肝损伤 [J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(10): 1848-1857.
- [16] 蓝升, 李金泰, 刘毅. 自噬在血红素氧合酶 1 抑制大鼠肝缺血/再灌注损伤中的作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2017, 29(3): 233-238.
- [17] 姜言红, 田颖, 练佳颖, 等. 丹参川芎嗪注射液辅助治疗 72 h 内急性缺血性卒中的系统评价 [J]. *中草药*, 2021, 52(18): 5663-5675.
- [18] 罗晓梅, 吴玉珠, 黄培渝, 等. 丹参注射液抑制炎症和氧化应激水平保护脓毒症大鼠免受心肌损伤 [J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(7): 585-591.
- [19] 黄蕾, 杨全伟, 夏俊峰, 等. 鼠鞠草醇提取物对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中国药师*, 2020, 23(11): 2114-2117.
- [20] 徐嘉元, 张千振, 朴晨曦, 等. 大鼠 70%肝缺血再灌注 (IRI)合并部分肝切除对机体氧化应激和炎症反应的影响 [J]. *中国兽医学报*, 2021, 41(8): 1583-1588.
- [21] 张沥元, 葛优, 王轩. 参芪扶正注射液对肝缺血-再灌注损伤后氧化应激的影响研究 [J]. *海南医学院学报*, 2021, 27(5): 344-348.
- [22] 李萍, 王静, 戴成祥, 等. 移植前输注间充质干细胞对脑死亡供鼠移植肾炎症细胞浸润及 TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响 [J]. *成都医学院学报*, 2020, 15(1): 40-45.
- [23] Shen Y, Malik S A, Amir M, *et al.* Decreased hepatocyte autophagy leads to synergistic IL-1 β and TNF mouse liver injury and inflammation [J]. *Hepatology*, 2020, 72(2): 595-608.
- [24] Chen J, Sun Y, Huang S, *et al.* Grub polypeptide extracts protect against oxidative stress through the NRF2-ARE signaling pathway [J]. *Anim Cells Syst (Seoul)*, 2021, 25(6): 405-415.
- [25] 唐赫鹏, 车楠, 刘函晔, 等. 连翘酯苷 A 通过抑制 PI3K/Akt 通路并激活 Nrf2/HO-1 通路抑制 LPS 诱导的炎症及氧化应激 [J]. *免疫学杂志*, 2021, 37(5): 390-396.
- [26] 朱海泉, 刘子敏, 孟祥圣, 等. 川芎嗪抑制 NF- κ B P65 磷酸化对 LPS 诱导的骨关节炎软骨细胞凋亡和炎症反应的调节作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(2): 181-185.
- [27] Dang X, He B, Ning Q, *et al.* Alantolactone suppresses inflammation, apoptosis and oxidative stress in cigarette smoke-induced human bronchial epithelial cells through activation of Nrf2/HO-1 and inhibition of the NF- κ B pathways [J]. *Respir Res*, 2020, 21(1): 95.

[责任编辑 高源]