

茶多酚对大鼠肠缺血再灌注肝损伤的保护作用

吕 莉¹, 王 利², 韩国柱^{1*}, 任洪灿¹, 金 越¹, 吕 勇¹, 李 楠³

(1. 大连医科大学 药理教研室, 辽宁 大连 116027; 2. 大连市友谊医院 普外科, 辽宁 大连 116001;

3. 大连理工大学 分析教研室, 辽宁 大连 116023)

摘要:目的 研究茶多酚 (TP) 对大鼠肠缺血再灌注 (I/R) 肝损伤的保护作用及其可能的作用机制, 为其临床新用途提供实验依据。方法 大鼠随机分为模型组、假手术组及 TP (100.0、50.0、25.0、12.5 mg/kg) 组, 通过夹闭肠系膜上动脉 60 min、再灌注 120 min, 建立肠 I/R 损伤模型。于缺血前 20 min 舌下 iv 药物, 假手术组仅分离不夹闭肠系膜上动脉。再灌 120 min 后, 各组取血及肝组织, 测定血清及肝组织中 SOD 活力、MDA 和 NO 水平, 光镜下观察肝组织形态学改变。结果 与假手术组相比, 肠 I/R 损伤后, 血清及肝组织中的 SOD 活力降低, MDA、NO 水平升高, 镜检发现肝有明显组织形态学损伤。与模型组相比, TP 呈剂量依赖性增强 SOD 活力, 降低 MDA 及 NO 水平, 减轻肝组织形态学损伤。结论 TP 对肠 I/R 所致肝损伤有显著的剂量依赖性的保护作用, 可能与其自由基清除作用、减轻中性粒细胞聚集及活化、抑制大量 NO 释放有关。

关键词:茶多酚; 肠缺血再灌注; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 一氧化氮

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)08-1203-04

Protective effects of tea polyphenols on liver injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats

LÜ Li¹, WANG Li², HAN Guo-zhu¹, REN Hong-can¹, JIN Yue¹, LÜ Yong¹, LI Nan³

(1. Department of Pharmacology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China; 2. Department of Surgery,

Dalian Friendship Hospital, Dalian 116001, China; 3. Department of Analytical Chemistry,

Dalian University of Technology, Dalian 116023, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effects of tea polyphenols (TP) on intestinal ischemia reperfusion (I/R) induced injury of liver in rats and possible action mechanism, so as to provide preclinical pharmacological basis for its new clinical uses. **Methods** Rats were randomly divided into six groups: Sham group, model group, and TP (100.0, 50.0, 25.0, and 12.5 mg/kg) groups. Intestinal I/R model was established by clamping superior mesenteric artery for 60 min and reperfusion for 120 min. TP was administered by sublingual vein at 20 min before ischemia. In Sham group, superior mesenteric artery was only isolated without clamping. Blood samples and liver tissue samples were collected after reperfusion lasting 120 min. SOD activity, MDA and NO levels in serum and liver tissue were determined. Histomorphology changes of liver tissue were observed with light microscope. **Results** Compared with Sham group, after intestinal I/R injury, activity of SOD was decreased, while the levels of MDA and NO was increased in serum and liver tissue. At the same time, histomorphology of liver was destroyed obviously, as seen by light microscope. In comparison with model group, TP could dose-dependently increase SOD activity, decrease MDA and NO levels in serum and liver tissue. Also, TP could dose-dependently attenuate liver tissue injury, as evidenced by microscopic examination of histomorphology. **Conclusion** TP can dose-dependently protect liver significantly and attenuate intestinal I/R injury. These protective effects are related to their anti-free-radical actions with diminishing the aggregation and activation of polymorphonuclear neutrophils (PMN) and inhibiting the release of NO.

Key words: tea polyphenols (TP); intestinal ischemia reperfusion (I/R); malondialdehyde (MDA); superoxide dismutase (SOD); NO

肠缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion, I/R) 是外科常见的组织器官损伤, 在严重感染、损伤、

收稿日期: 2005-12-28

作者简介: 吕 莉 (1972—), 女, 天津人, 讲师, 硕士, 主要从事药效学研究。

* 通讯作者 韩国柱 Tel: (0411) 84720229 E-mail: hgzhx2236@sina.com

休克、心肺功能不全等疾病的病理演变过程中起重要作用,其损伤产生的机制尚不清楚,目前认为主要与氧自由基以及 NO 大量生成导致组织器官脂质过氧化等因素有关^[1]。肠 I/R 不仅可以引起消化道局部的组织损害,而且可以导致肠内细菌和毒素移位到体循环,引起网状内皮系统发生系列反应,进而导致大量相关介质和细胞因子的释放,造成远隔器官损伤,甚至引发多系统器官功能不全综合征^[2]。

茶多酚 (tea polyphenols, TP) 是从茶叶中分离提取的多酚类化合物,具有强抗氧化作用和显著的自由基清除能力。有研究表明,TP iv 给药对 I/R 脑损伤和心肌损伤有保护作用^[3-6],但对肠 I/R 损伤的保护作用迄今未见报道。本实验以大鼠肠 I/R 所致肝损伤的模型,探讨 TP iv 给药对大鼠肠 I/R 肝损伤的保护作用及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂:茶多酚 (TP) 购自江西茶场茶多酚分厂,质量分数 >98%,批号 020613,实验时以生理盐水 (NS) 为溶剂配制所需浓度。考马斯亮蓝法定量蛋白、NO、丙二醛 (MDA) 及超氧化物歧化酶 (SOD) 测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物:SD 大鼠,雄性,180~220 g,由大连医科大学实验动物中心提供,一级,辽实动质字[2000]028 号。

1.3 仪器:UV-754 紫外可见分光光度计,上海精密科学仪器有限公司;TGL-16G 台式高速冷冻离心机,上海安廷科学仪器厂;显微镜,日本 Olympus 公司产品。

1.4 模型制备^[7,8]:采用肠系膜上动脉 (superior mesenteric artery, SMA) 夹闭-松夹方式复制肠 I/R 模型。受试大鼠术前禁食 12 h 后 ip 乌拉坦 1 g/kg 麻醉,取右侧卧位固定于手术板上,沿左肋缘弧形切口,取腹膜后入腹,暴露并在根部游离 SMA,以显微手术用无损伤动脉夹夹闭 SMA,关腹;60 min 后沿原切口入腹,松开动脉夹再灌,关腹;再灌 120 min 后,于腹主动脉取血及快速放血处死动物。手术期间,间断地 ip 约 30 mL/kg 温生理盐水 (含庆大霉素 32 万 U/L),以预防腹腔感染以及松夹后出现一过性低血容量反应。

1.5 动物分组及给药:SD 大鼠 60 只,随机分为 6 组 (每组 10 只):假手术组、肠 I/R 组 (模型组)、肠 I/R 并同时分别给予 TP 100.0、50.0、25.0、12.5 mg/kg 剂量组。大鼠舌下 iv 受试药物,模型组和假

手术组大鼠 iv 等容量生理盐水。20 min 后,模型组及不同剂量 TP 组大鼠夹闭 SMA,假手术组大鼠只分离 SMA,但不夹闭。

1.6 样本采集及处理:大鼠肠 I/R 后,于腹主动脉取血 5 mL,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液即得血清样本,于 -50 ℃ 冰箱保存备用。迅速取肝,经冰冷的 NS 轻柔冲洗后,用滤纸吸干,取部分置于 10% 甲醛 (福尔马林) 中固定,另一部分以 1 g 组织加 10 mL NS 的比例在冰水浴中用电动匀浆机制成均一混悬液,于低温离心机中 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液即得 10% 组织匀浆标本,以 NS 稀释后即得 1% 组织匀浆标本,于 -50 ℃ 冰箱保存备用。

1.7 测定指标和方法:血清及肝组织中 SOD 活力、MDA 和 NO 水平,分别采用黄嘌呤氧化酶法、硫代巴比妥酸法和化学法进行测定。以上指标的操作按试剂盒说明进行。并将结果按下式计算各给药组与模型组比较的 SOD 活力增加率、MDA 抑制率和 NO 抑制率。

$$\text{SOD 活力增加率} = \frac{(\text{SOD 活力}_{\text{给药组}} - \text{SOD 活力}_{\text{模型组}})}{\text{SOD 活力}_{\text{模型组}}} \times 100\%$$

$$\text{MDA 抑制率} = \frac{(\text{MDA 水平}_{\text{模型组}} - \text{MDA 水平}_{\text{给药组}})}{(\text{MDA 水平}_{\text{模型组}} - \text{MDA 水平}_{\text{假手术组}})} \times 100\%$$

$$\text{NO 抑制率} = \frac{(\text{NO 水平}_{\text{模型组}} - \text{NO 水平}_{\text{给药组}})}{(\text{NO 水平}_{\text{模型组}} - \text{NO 水平}_{\text{假手术组}})} \times 100\%$$

1.8 肝组织形态学观察:肝组织经福尔马林固定后,酒精梯度脱水、石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察组织形态学改变。

1.9 统计学分析:数据应用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计学处理分析,显著性检验方法采用方差分析,小 q 检验,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 TP 对肠 I/R 损伤大鼠血清 SOD 活力、MDA 及 NO 水平的影响:由表 1 可知,与假手术组相比,模型组血清中 SOD 活力显著降低,提示大鼠肠 I/R 损伤时,血液中清除氧自由基的能力下降;血清中 MDA 水平显著增加,提示大鼠肠 I/R 损伤时,血液中细胞发生了氧自由基所致的损伤;血清中 NO 水平显著增加,表明大鼠肠 I/R 损伤时生成了大量的 NO,外周血液中 NO 浓度明显增加,过多的 NO 具有细胞毒性,可造成组织损伤。与模型组相比,iv TP 可显著提高血清中 SOD 活力、降低血清中 MDA 和 NO 水平。TP 呈剂量依赖性提高血清中 SOD 活力,降低血清中 MDA 和 NO 水平,表明 TP 能有效

提高血中清除氧自由基的能力,减少血中脂质过氧化物产生,减轻细胞损伤,并能有效减轻过多的 NO 造成的细胞毒性和组织损伤。

2.2 TP 对肠 I/R 损伤大鼠肝组织 SOD 活力、MDA 及 NO 水平的影响:由表 2 可知,模型组与假手术组相比,肝组织中 SOD 活力显著降低,MDA 和 NO 水平显著增加,提示大鼠肠 I/R 损伤时,可

造成肝组织中氧自由基清除能力的下降、脂质过氧化和 NO 生成增加。与模型组相比,TP 呈剂量依赖性提高肝组织中 SOD 活力,表明其能有效提高肝组织清除氧自由基的能力。同时 TP 呈剂量依赖性降低肝组织中 MDA 和 NO 水平,表明 TP 能有效减少脂质过氧化物及过多的 NO 产生,减轻肝组织细胞损伤。

表 1 TP 对肠 I/R 损伤大鼠血清 SOD 活力、MDA 及 NO 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD		MDA		NO	
		活力/(U·mL ⁻¹)	增加率/%	水平/(nmol·L ⁻¹)	抑制率/%	水平/(μmol·L ⁻¹)	抑制率/%
假手术	—	79.48±6.32	—	3.53±0.85	—	42.41±5.28	—
模型	—	25.03±9.75 ^{△△}	—	10.39±1.52 ^{△△}	—	117.13±10.78 ^{△△}	—
TP	100.0	71.42±6.40 ^{**}	185.34	4.86±0.82 ^{**}	80.61	53.78±5.41 ^{**}	84.78
	50.0	70.48±7.50 ^{**}	181.58	5.30±0.85 ^{**}	74.20	84.82±6.11 ^{**}	43.24
	25.0	56.41±11.22 ^{**}	125.37	6.03±1.79 ^{**}	63.56	93.24±10.80 ^{**}	31.97
	12.5	34.68±8.93 [*]	38.55	6.56±1.76 ^{**}	55.83	108.42±9.99 [*]	11.66

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 2 TP 对肠 I/R 损伤大鼠肝组织 SOD 活力、MDA 及 NO 水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	SOD		MDA		NO	
		活力/(U·mg ⁻¹)	增加率/%	水平/(nmol·mg ⁻¹)	抑制率/%	水平/(μmol·L ⁻¹)	抑制率/%
假手术	—	105.90±14.48	—	1.04±0.28	—	9.73±5.69	—
模型	—	23.40±7.89 ^{△△}	—	3.51±1.09 ^{△△}	—	91.31±12.41 ^{△△}	—
TP	100.0	83.26±15.64 ^{**}	255.81	1.53±0.27 ^{**}	80.17	6.72±5.70 ^{**}	103.70
	50.0	70.37±6.03 ^{**}	200.73	1.66±0.39 ^{**}	74.90	13.17±7.77 ^{**}	95.78
	25.0	61.65±14.04 ^{**}	163.46	2.32±1.03 ^{**}	48.18	40.16±25.39 ^{**}	62.70
	12.5	38.38±13.68 [*]	64.02	2.87±1.23 ^{**}	25.91	63.10±25.37 [*]	34.58

与假手术组比较: ^{△△} $P<0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P<0.01$

^{△△} $P<0.01$ vs Sham group; ^{**} $P<0.01$ vs model group

2.3 TP 对肠 I/R 损伤大鼠肝组织形态学变化的影响:光镜下可见,假手术组肝小叶结构和肝细胞形态正常;模型组可见肝细胞索排列紊乱,中央静脉及汇管区小血管瘀血、大量炎性细胞浸润,肝窦扩张、瘀血,大量炎性细胞浸润,灶性肝细胞变性,肝细胞肿胀、排列紊乱,不成索状,肝小叶中央静脉瘀血,小静脉瘀血,说明肠 I/R 造成远隔器官肝脏严重受损;TP 给药组较模型组呈剂量依赖性减轻肝损害。

3 讨论

本研究表明肠 I/R 可引起肝的严重损伤。镜下可见肝细胞索排列紊乱,中央静脉及汇管区小血管瘀血,肝窦瘀血,大量炎性细胞浸润,灶性肝细胞变性,表明肠 I/R 引起肠屏障严重受损,致远隔器官肝组织结构、功能严重损伤。

普遍认为,组织器官脂质过氧化、中性粒细胞激活以及 NO 大量释放与肠 I/R 所致多器官损伤有关。本研究表明,肠缺血 60 min,再灌注 120 min 可

致血清及肝组织中 MDA 水平增高,而 SOD 活力降低。提示肠 I/R 使机体组织器官脂质过氧化、组织细胞受损,同时机体清除氧自由基的能力不足。

本研究中还发现,肠 I/R 后镜下可见大量中性粒细胞在肝浸润聚集。研究证实,在肠 I/R 过程中,介导肝损伤的中性粒细胞是在肠道启动和激活的。在肠 I/R 过程中,中性粒细胞在内毒素、细胞因子、氧自由基等刺激下激活^[9],促进中性粒细胞与内皮细胞表达众多黏附分子,导致中性粒细胞在组织中聚集。激活的中性粒细胞释放大量的自由基、溶酶体酶、血栓素和白三烯等炎性介质,进一步损伤血管壁,导致组织损伤,甚至发生多器官功能障碍综合征(MODS)。

本研究中,肠 I/R 后外周血中 NO 水平增高,提示肠 I/R 过程中生成大量 NO,具有细胞毒性,造成组织损伤。肠 I/R 后外周血中 NO 大量生成,可能与内毒素、肿瘤坏死因子、白介素等多种因子活化

iNOS 等有关,产生大量 NO 释放入血,从而产生毒性作用。

TP 是从绿茶中提取的多酚类化合物,主要成分为儿茶素类,具抗氧化、抗突变、抗癌及抗衰老等多种生理活性。本研究发现 iv TP 可呈剂量依赖性减轻肠 I/R 所致肝组织形态学改变,表明 TP 对肠 I/R 所致肝损伤具有保护作用。其机制可能为:①抑制自由基生成,防止脂质过氧化。TP 是多酚类化合物,具很强还原性,可使体内多种过氧化物所产生的自由基转化为惰性化合物而被清除,并防止脂质过氧化^[10],因而 TP 可降低肠 I/R 时 MDA 的水平。本研究结果证明了 TP 抗自由基并防止脂质过氧化的作用:TP 呈剂量依赖性降低肠 I/R 所致血清和肝组织中 MDA 水平的升高,即降低脂质过氧化程度;而同时呈剂量依赖性增强 SOD 活力,即提高机体清除和/或抑制氧自由基能力。②抑制中性粒细胞聚集。TP 呈剂量依赖性减少中性粒细胞在肝的浸润聚集,从而减轻中性粒细胞的损伤作用。③抑制过量 NO 的生成。TP 呈剂量依赖性降低外周血及肝中 NO 水平。推测,TP 对内毒素、肿瘤坏死因子、白介素等多种因子活化 iNOS 有抑制作用;TP 通过抑制 NO 与氧自由基相互作用,使 OONO⁻生成减少,从而对组织损伤有保护作用。

本研究表明,TP 通过保护肠道屏障,抑制自由基生成,防止脂质过氧化,抑制中性粒细胞聚集及抑制 NO 的过量生成,对肠 I/R 引起的肝损伤有保护

作用。TP 作为一种资源丰富、成本低廉的天然药物有着十分广阔的前景。本研究为其扩展临床新用途提供了有价值的实验依据。

References:

- [1] Hallenbeck J M. Background review and current concepts of reperfusion injury [J]. *Arch Neurol*, 1990, 47(11): 1245-1254.
- [2] Antosson J B, Fiddiss G R G. The role of the gut in shock and multiple system organ failure [J]. *Eur J Surg*, 1991, 157: 3-12.
- [3] Li L Z, Wu J L, Hu Z L, et al. Effect of tea polyphenols on myocardial ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 1997, 13(4): 21-23.
- [4] Yang L S, Zhou Q, Li W P. Neuroprotective effects of iv tea polyphenol on cerebral ischemia reperfusion injury in animal models [J]. *J Dalian Med Univ* (大连医科大学学报), 2004, 26(3): 170-173.
- [5] Fang R Y, Yu Y H, Shen G Y, et al. Protective effects of tea polyphenols on cerebral ischemia-reperfusion injury in gerbils [J]. *Acta Biophys Sin* (生物物理学报), 1997, 13(2): 309-314.
- [6] Chen W J, Wan S Q. Current status of pharmacodynamic research of tea polyphenols [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1993, 24(9): 493.
- [7] Xi W B, Tu W F, He J, et al. Studies on intestinal tissue and extra-intestinal organ injuries induced by whole intestinal ischemia-reperfusion [J]. *J Pract Med* (实用内科杂志), 2003, 19(2): 126-128.
- [8] Han X, Xiao F D, Yu M. Effect of pyruvate in intestinal ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin J Pediatr Surg* (中华小儿外科杂志), 2000, 21(2): 111-114.
- [9] Wang S J. Activation of neutrophils during acute period of burn [J]. *Foreign Med: Trauma Surg Basic Probl Sect* (国外医学:创伤与外科基本问题分册), 1998, 19(3): 151-155.
- [10] Buege T A, Aust S D. Microsomal lipid peroxidation methods [J]. *Enzymol*, 1978, 52: 302.

芍药苷对人骨髓基质细胞 HFCL 蛋白质表达的作用

郭 平¹,王升启²

(1. 山东中医药大学 生化教研室,山东 济南 250014; 2. 军事医学科学院放射医学研究所,北京 100800)

摘要:目的 检测芍药苷对人骨髓成纤维样基质细胞系 HFCL 增殖及蛋白质表达的影响,探讨芍药苷补血作用的分子机制。方法 采用流式细胞术和蛋白质组学方法测定芍药苷对 HFCL 细胞周期及蛋白质表达的影响。结果 芍药苷能促进 HFCL 由 G₀/G₁期进入 S 期,提高增殖指数,使 HFCL 的 9 种蛋白质表达上调,5 种下调。上调的蛋白质有 Ras 相关核蛋白、核纤层蛋白 A/C、异柠檬酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、ATP 合酶、核蛋白体蛋白质 P2 和 CCT;下调的蛋白质有人类 cc 趋化因子和 Bax。结论 芍药苷能促进 HFCL 增殖,作用于 HFCL 多个靶点,促进细胞结构蛋白质的合成和蛋白质分子伴侣的表达,促进 HFCL 的能量代谢,抑制 HFCL 凋亡,间接发挥补血作用。

关键词:芍药苷;骨髓基质细胞;细胞增殖;蛋白质组学

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2006)08-1206-05

收稿日期:2005-11-23

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271617);全军医药卫生科研基金资助项目(01Z019)

作者简介:郭 平(1960—),女,四川资中人,副教授,博士,主要从事中药作用分子机制的研究。

Tel: (0531) 86253861 E-mail: guop86@163.com

* 通讯作者 王升启 Tel: (010) 66932211 E-mail: sqwang@mic.bmi.ac.cn