

文章编号: 1005-6947(2013)01-0049-05

· 基础研究 ·

氨溴索对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用

蒋凯¹, 张靖岩¹, 劳华毅¹, 曹永刚², 佟立权¹, 张峰¹

(1. 哈尔滨医科大学附属五院 普通外科, 黑龙江 大庆 163319; 2. 哈尔滨医科大学大庆校区 基础医学系, 黑龙江 大庆 163316)

摘要

目的: 探讨氨溴索对大鼠肝脏缺血再灌注损伤(I/RI)的保护作用及其机制。

方法: 18只雄性Wistar大鼠被随机均分为假手术组、肝I/RI模型组(模型组)、氨溴索预处理+肝I/RI模型组(氨溴索预处理组)。肝I/RI模型采用阻断入肝血流30 min后再灌注方法诱导,氨溴索预处理组于缺血前20 min尾静脉注射氨溴索(100 mg/kg),而模型组给予等体积生理盐水。术后6 h处死大鼠,检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平和肝组织病理学改变,同时检测肝组织超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽(GSH),丙二醛(MDA)含量,caspase-3的活化水平。

结果: 与假手术组比较,模型组与氨溴索预处理组血清ALT和AST水平明显升高(均 $P<0.05$);肝组织出现明显的病理学改变;肝组织SOD和GSH含量明显下降,而MDA水平明显升高(均 $P<0.05$);肝组织caspase-3活化水平明显升高(均 $P<0.05$)。与模型组比较,氨溴索预处理组以上各项指标的变化均明显减弱(均 $P<0.05$)。

结论: 氨溴索预处理能减轻大鼠肝脏I/RI,机制可能与其调控抗氧化和抗凋亡信号通路有关。

关键词

再灌注损伤, 肝; 氨溴索; 脂质过氧化作用; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; 大鼠

中图分类号: R657.3 文献标志码: A



DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.01.012
<http://www.zpwz.net/Jweb-zgptwk/CN/abstract/abstract3359.shtml>

Protective effect of ambroxol on hepatic ischemia reperfusion injury in rats

JIANG Kai¹, ZHANG Jingyan¹, LAO Huayi¹, CAO Yonggang², TONG Liquan¹, ZHANG Feng¹

(1. Department of general Surgery, the Fifth affiliated hospital of Harbin Medical University, Daqing, Heilongjiang 163319, China;

2. Department of Basic Medical Sciences, Daqing Campus, Harbin Medical University, Daqing, Heilongjiang 163316, China)

Corresponding author: ZHANG Feng, Email: zhangfenghyd@gmail.com

ABSTRACT

Objective: To investigate the protective effect of ambroxol on hepatic ischemia reperfusion injury (I/RI) in rats and its mechanism.

Methods: Eighteen male Wistar rats were equally randomized into sham operation group, hepatic I/RI model group (model group) and ambroxol pretreatment+hepatic I/RI model group (ambroxol pretreatment group). Hepatic I/RI model was induced by 30-min hepatic inflow occlusion followed by reperfusion, and rats in

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目(D200927)。

收稿日期: 2012-10-08; 修订日期: 2012-12-26。

作者简介: 蒋凯, 哈尔滨医科大学附属五院硕士研究生, 主要从事肝脏缺血再灌注损伤方面的研究。

通信作者: 张峰, Email: zhangfenghyd@gmail.com

ambroxol pretreatment group were injected with ambroxol (100 mg/kg) 20 min prior to ischemia, while those in control group were treated with normal saline of the same volume instead. Rats were sacrificed 6 h after surgery, their serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured, and liver pathological changes were observed. Meanwhile, the superoxide dismutase (SOD) activity, and glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) contents as well as the caspase-3 activation in rat liver tissues were also measured.

Results: In either model or ambroxol pretreatment group compared with the sham operation group, the serum levels of ALT and AST were significantly increased (both $P < 0.05$); the liver tissues presented evident pathological changes; the liver SOD and GSH contents were significantly decreased while the MDA level was significantly increased (all $P < 0.05$); the caspase-3 activation in liver tissue was significantly increased (both $P < 0.05$). However, the amplitudes of all the above changes were significantly lower than those of model group (all $P < 0.05$).

Conclusion: Ambroxol pretreatment can reduce hepatic I/RI in rats, and the mechanism may probably be associated with the augmentation of the anti-oxidant and anti-apoptotic signaling pathway.

KEY WORDS

Reperfusion Injury, Liver; Ambroxol; Lipid Peroxidation; Caspases; Rats

CLC number: R657.3 **Document code:** A

DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.01.012

肝脏缺血再灌注损伤 (I/RI) 是肝脏外科常见的病理状态。由于肝脏的解剖结构复杂, 血供丰富, 在肝脏外科手术中为减少术中出血常需阻断肝脏血供。但是肝脏血流阻断后在减少出血的同时也会导致肝脏 I/RI。该损伤常发生于肝癌切除、肝移植、严重的创伤和感染等病理过程。肝脏 I/RI 可导致肝功能损伤, 严重者致肝衰竭, 甚至死亡。目前的研究表明肝脏 I/RI 的发病机制主要与氧化应激损伤、炎症细胞浸润、钙超载、肝细胞凋亡等多种因素相关。随着研究的深入在改善肝脏 I/RI 方面有了很大进展, 但效果仍不理想。本文探讨氨溴索对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及其机制, 报告如下。

1 材料与方法

1.1 试剂及动物

雄性 Wistar 大鼠 18 只, 体质量 (230 ± 30) g 由哈尔滨医科大学第二临床医院动物中心提供; 氨溴索 (ambroxol) 购于 Sigma 公司; 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 试剂盒购自南京建成生物试剂公司; caspase-3 抗体购于 Santa Cruz 试剂公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物模型与分组 实验动物被随机均分为假手术组、肝 I/RI 模型组 (模型组) 和氨溴索预处理 + 肝 I/RI 模型组 (氨溴索预处理组)。术前 12 h 禁食, 自由饮水。质量分数为 1% 的戊巴

比妥钠 (30 mg/kg) 溶液腹腔注射, 麻醉满意后取腹正中切口约 2 cm 入腹, 游离肝十二指肠韧带, 用无损伤动脉夹夹闭门静脉、肝动脉及胆总管 30 min 后再灌注 6 h 制作肝脏热缺血再灌注动物模型^[1]。假手术组游离肝十二指肠韧带而不阻断, 氨溴索预处理组术前 20 min 通过尾静脉注射氨溴索 (100 mg/kg), 模型组给予等量生理盐水。各组大鼠于术后 6 h 后从下腔静脉采血约 5 mL; 切取肝左叶, 一部分用于病理学检查, 另一部分置 -80°C 冻存, 待测肝组织生化指标及 caspase-3 的活化水平。

1.2.2 观察指标与检测方法 (1) 肝功能测定: 大鼠静脉血离心后取血清, 用全自动生化分析仪 (TOSHIBA TBA-120) 检测天冬氨酸转氨酶 (AST), 谷氨酸转氨酶 (ALT) 水平。(2) 肝组织病理学检测: 将大鼠肝脏置入质量分数 4% 的多聚甲醛溶液中 24 h, 然后转移至 30% 蔗糖 PB 溶液中 2 d, 待肝组织完全浸没后做冷冻切片 ($6\text{ }\mu\text{m}$) 苏木素-伊红 (HE) 染色后观察肝组织病理损伤情况。(3) 肝组织生化指标检测: 用各自试剂盒方法检测肝组织 SOD, GSH 及 MDA 水平。(4) 肝组织 caspase-3 的活化水平检测: 取大鼠肝脏组织约 100 mg, 提取蛋白, BCA 法蛋白定量, 50 μg 蛋白, 在 95°C 条件下 5 min 蛋白变性, 10% SDS-PAGE 电泳转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加入抗 caspase-3 或 GAPDH 抗体杂交, 漂洗后辣根过氧化物酶标记的二抗孵育, 化学发光法进行显色反应, 定量分析软件 (quantity one

software) 分析结果。

1.3 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS13.0 软件进行统计学分析。采用单因素方差分析(ANOVA)与 q 检验。 $P<0.05$ 认为具有统计学差异。

2 结 果

2.1 血清 ALT 和 AST 的水平检测结果

与假手术组比较,模型组与氨溴索预处理组大鼠血清 ALT 和 AST 水平显明显升高(均 $P<0.05$),而与模型组比较,氨溴索预处理组的血清 ALT 和 AST 水平明显减低(均 $P<0.05$)(表1)。

2.2 病理学观察结果

假手术组大鼠肝脏未见明显病理学改变;

模型组大鼠肝组织病理损伤明显,可见细胞质淡染,细胞核固缩或消失;氨溴索预处理组肝细胞损伤较模型组明显减轻,见少许充血,肝细胞轻度水肿,细胞核固缩或消失较少(图1)。

表 1 各组大鼠血清转氨酶水平比较
Table 1 Comparison of serum transaminase levels in rats among groups

组别	ALT (U/L)	AST (U/L)
假手术组	44.5 ± 16.0	90.1 ± 19.1
模型组	857.2 ± 64.1 ¹⁾	2342.3 ± 165.3 ¹⁾
氨溴索预处理组	2342.3 ± 165.3 ^{1), 2)}	1043.1 ± 117.4 ^{1), 2)}

注: 1) 与假手术组比较, $P<0.05$; 2) 与模型组比较, $P<0.05$

1) $P<0.05$ vs. sham operation group; 2) $P<0.05$ vs. model group

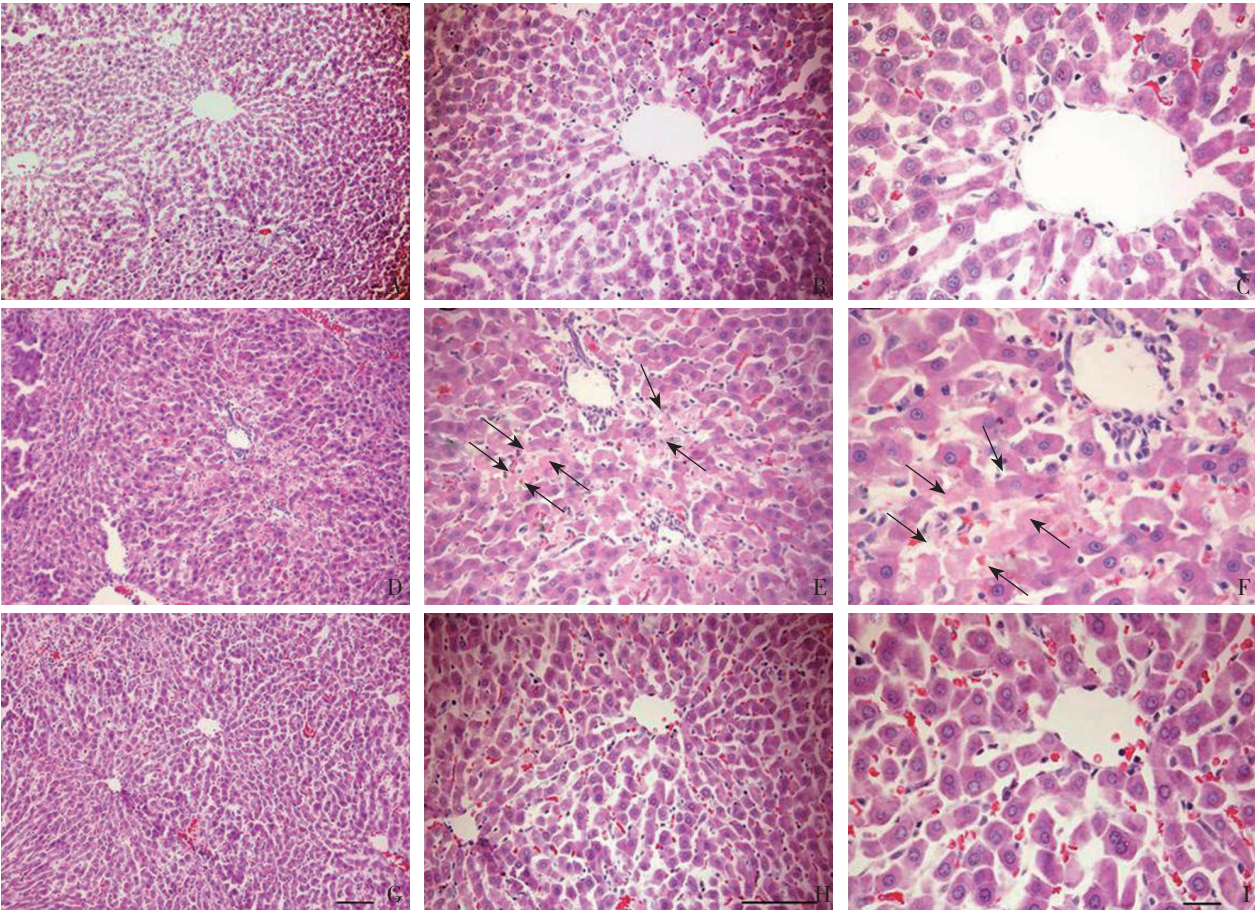


图1 各组大鼠肝组织 HE 染色结果 (A, D, G: ×100; B, E, H: ×200; C, F, I: ×400) A-C: 假手术组; D-F: 模型组; G-I: 氨溴索预处理组

Figure 1 HE staining of the rat's liver tissue of each group (A, D and G: ×100; B, E and H: ×200; C, F and I: ×400) A-C: Sham operation group; D-F: Model group; G-I: Ambroxol pretreatment group

2.3 生化指标检测结果

与假手术组比较,模型组与氨溴索预处理组肝组织中 SOD 和 GSH 水平明显降低

(均 $P<0.05$),而 MDA 水平明显升高(均 $P<0.05$)。与模型组比较,氨溴索预处理组肝组织中 SOD 和 GSH 水平的升高与 MDA 水平降低的

程度明显减弱 (均 $P < 0.05$) (表 2)。

表 2 各组大鼠血清生化指标的比较

组别	SOD	GSH	MDA
	(U/mg 蛋白)	(mg/mg 蛋白)	(nmol/mg 蛋白)
假手术组	305.1 ± 16.2	3.13 ± 0.2	4.98 ± 0.6
模型组	204.2 ± 34.5 ¹⁾	1.88 ± 0.15 ¹⁾	7.67 ± 0.51 ¹⁾
氨溴索预处理组	246.5 ± 15.2 ^{1), 2)}	2.34 ± 0.13 ^{1), 2)}	6.56 ± 0.43 ^{1), 2)}

注: 1) 与假手术组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

1) $P < 0.05$ vs. sham operation group; 2) $P < 0.05$ vs. model group

2.4 肝组织 caspase-3 的活化水平检测结果

与假手术组比较, 模型组与氨溴索预处理组肝组织 caspase-3 的活化水平明显升高 (均 $P < 0.05$), 但氨溴索预处理组 caspase-3 的活化水平低于模型组 (图 2)。

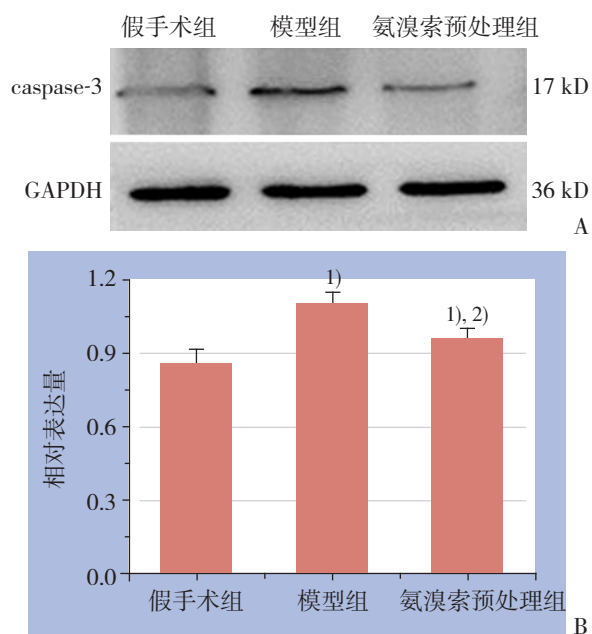


图 2 各组肝细胞 caspase-3 的活化水平 A: Western blot 条带图; B: 定量结果 1) 与假手术组比较, $P < 0.05$; 2) 与模型组比较, $P < 0.05$

Figure 2 Caspase-3 activation in the liver tissues of each group

A: Western blot band images, B: Results of quantitative analysis 1) $P < 0.05$ vs. sham operation group; 2) $P < 0.05$ vs. model group

3 讨论

氨溴索是临床常用的化痰药物, 可以溶解黏痰, 促进痰液排出的作用^[2]。但是越来越多的研究表明氨溴索具有抗炎^[3]、抗氧化^[4]的作用。而肝脏缺血再灌注损伤的机制与氧自由基的形成、

炎症细胞浸润、肝细胞凋亡等多种因素有关^[5]。本研究结果显示, 肝脏缺血 30 min, 再灌注 6 h 的大鼠缺血再灌注模型中, 给予氨溴索能明显降低血清 ALT 和 AST 水平 ($P < 0.05$), 减轻肝脏病理损伤。这些结果提示氨溴索预处理对肝脏 I/R 具有保护作用。

肝脏 I/R 时氧自由基大量形成, 它们可以破坏肝细胞模型结构, 增加肝细胞膜的通透性, 破坏线粒体膜, 促使线粒体中促凋亡成分的释放, 导致肝细胞凋亡^[6]。另外自由基可以直接破坏染色体, 导致染色体突变, 甚至断裂, 进而使肝细胞凋亡或坏死^[7]。在正常生理状态下氧自由基可以通过内源性抗氧化酶及抗氧化的小分子物质被清除, 从而保护氧自由基对机体的损伤。实验证实在肝脏 I/R 动物模型中过表达 SOD 或给予 GSH^[8-9], 或给予自由基清除剂, 如依达拉奉可以减轻肝脏 I/R^[10]。本实验结果显示, 给予氨溴索后缺血再灌注的肝组织中 SOD 和 GSH 水平明显升高; 同时作为氧化应激产物的 MDA 水平也明显降低, 表明氨溴索可以提高缺血再灌注肝脏组织的抗氧化能力。

在肝脏 I/R 中肝细胞凋亡是肝脏损伤的一个重要原因^[11], 而在细胞凋亡的过程中 caspase-3 的激活是最重要的环节, 其中 caspase-3 是最重要的凋亡执行者。caspase-3 的激活可直接作用于凋亡执行过程中关键蛋白的酶切^[12]。实验证实在肝脏 I/R 的动物模型中给予 caspase-3 抑制剂^[13]或者 RNA 干扰 caspase-3 基因表达^[14]可减轻肝脏 I/R。本实验结果也显示给予氨溴索后, I/R 的肝组织 caspase-3 的活化明显减轻, 提示氨溴索可以抑制缺血再灌注后肝细胞的凋亡。

总之, 氨溴索可通过抗氧化及抗凋亡信号通路在减轻肝脏 I/R 方面发挥重要作用, 但其抗炎作用在肝脏缺血再灌注损伤中是否也发挥作用尚待进一步的研究。

参考文献

- [1] 赵海峰, 孔瑞, 孙备, 等. 正丁酸钠对大鼠肝脏热缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(1):91-93.
- [2] Malerba M, Ragnoli B. Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2008, 4(8):1119-1129.
- [3] Beeh KM, Beier J, Esperester A, et al. Antiinflammatory properties of ambroxol [J]. Eur J Med Res, 2008, 13(12):557-562.
- [4] Nowak D, Antczak A, Król M, et al. Antioxidant properties of Ambroxol [J]. Free Radic Biol Med, 1994, 16(4):517-522.
- [5] Kang KJ. Mechanism of hepatic ischemia/reperfusion injury and protection against reperfusion injury [J]. Transplant Proc, 2002,

- 34(7):2659-2661.
- [6] Chandra J, Samali A, Orrenius S, et al. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress[J]. Free Radic Biol Med, 2000, 29(3-4):323-333.
- [7] Eguchi M, Miyazaki T, Masatsuji-Kato E, et al. Cytoprotection against ischemia-induced DNA cleavages and cell injuries in the rat liver by pro-vitamin C via hydrolytic conversion into ascorbate[J]. Mol Cell Biochem, 2003, 252(1-2):17-23.
- [8] He SQ, Zhang YH, Venugopal SK, et al. Delivery of antioxidative enzyme genes protects against ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice[J]. Liver Transpl, 2006, 12(12):1869-1879.
- [9] Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, et al. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia[J]. Ann Surg, 2004, 239(2):220-231.
- [10] 石磊, 秦华东, 石铁锋. 依达拉奉对大鼠肝 I/R 损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(1):28-31.
- [11] Kohli V, Selzner M, Madden JF, et al. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver[J]. Transplantation, 1999, 67(8):1099-1105.
- [12] Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis[J]. Cell Death Differ, 1999, 6(2):99-104.
- [13] Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, et al. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis[J]. FASEB J, 1999, 13(2):253-261.
- [14] 陈栋, 张艳, 朱珉. RNA 干扰 Caspase-3 基因抑制大鼠肝脏缺血再灌注损伤[J]. 中华肝胆外科杂志, 2008, 14(12):894-896.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 蒋凯, 张靖岩, 劳华毅, 等. 氨溴索对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2013, 22(1):49-53. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.01.012

Cite this article as: JIANG K, ZHANG JY, LAO HY, et al. Protective effect of ambroxol on hepatic ischemia reperfusion injury in rats[J]. Chin J Gen Surg, 2013, 22(1):49-53. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.01.012

本刊常用词汇英文缩写表

C-反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	心电图	ECG
Toll 样受体	TLRs	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心脏监护病房	CCU
氨基末端激酶	JNK	聚合酶链反应	PCR	血管紧张素 II	AngII
白细胞	WBC	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	ABC 法	血管内皮生长因子	VEGF
白细胞介素	IL	辣根过氧化物酶	HRP	血管性血友病因子	vWF
半数抑制浓度	IC ₅₀	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	SABC 法	血红蛋白	Hb
变异系数	CV	磷酸盐缓冲液	PBS	血肌酐	SCr
标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法	SP 法	绿色荧光蛋白	GFP	血尿素氮	BUN
表皮生长因子	EGF	酶联免疫吸附测定	ELISA	血小板	PLT
丙氨酸转氨酶	ALT	美国食品药品监督管理局	FDA	血压	BP
丙二醛	MDA	脑电图	EEG	血氧饱和度	SO ₂
丙型肝炎病毒	HCV	内毒素 / 脂多糖	LPS	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
超氧化物歧化酶	SOD	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	严重急性呼吸综合征	SARS
磁共振成像	MRI	内生肌酐清除率	CCr	一氧化氮	NO
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	尿素氮	BUN	一氧化氮合酶	NOS
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	凝血酶时间	TT	乙二胺四乙酸	EDTA
动脉血二氧化碳分压	PaCO ₂	凝血酶原时间	PT	乙酰胆碱	ACh
动脉血氧分压	PaO ₂	牛血清白蛋白	BSA	乙型肝炎病毒	HBV
二甲基亚砜	DMSO	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒 e 抗体	HBeAb
反转录-聚合酶链反应	RT-PCR	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒 e 抗原	HBeAg
辅助性 T 细胞	Th	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
肝细胞生长因子	HGF	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
干扰素	IFN	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒核心抗体	HBcAb
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	生理氯化钠溶液	NS	乙型肝炎病毒核心抗原	HBcAg
谷胱甘肽	GSH	世界卫生组织	WHO	异硫氰酸荧光素	FLTC
固相 pH 梯度	IPG	双蒸水	ddH ₂ O	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核糖核酸	RNA	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	原位末端标记法	TUNEL
核因子-κB	NF-κB	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	MTT	杂合性缺失	LOH
红细胞	RBC	苏木精-伊红染色	HE	增强化学发光法	ECL
红细胞沉降率	ESR	胎牛血清	FBS	肿瘤坏死因子	TNF
环氧化酶-2	COX-2	体质量指数	BMI	重症监护病房	ICU
活化部分凝血活酶时间	APTT	天冬氨酸氨基转移酶	AST	转化生长因子	TGF
活性氧	ROS	脱氧核糖核酸	DNA	自然杀伤细胞	NK 细胞
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	细胞间黏附分子	ICAM	直接胆红素	DBIL
肌酐	Cr	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	TBIL
计算机 X 线断层照相技术	CT	纤连蛋白	FN		