

川芎嗪促进大鼠部分肝切除后修复性再生机制的研究*

吴昊 王欣 柏桦 胡军霞 张涛 廖霁 海春旭[△]

(第四军医大学军事预防医学院毒理学教研室, 特殊作业环境危害评估与防治教育部重点实验室, 陕西省自由基生物学与医学重点实验室 陕西 西安 710032)

摘要 目的 探讨大鼠部分肝切除后肝功能的变化及川芎嗪对肝修复性再生能力的影响。方法 在相同月龄的动物中按体重均衡的原则随机分组。实验动物共分为 5 组: 设正常对照组(对照组)、青年假手术对照组(假术组)、青年肝切除组(青切组)、中年肝切除组(中切组)和中年肝切除治疗组(切治组), 每组动物 10 只, 常规饲养, 自由饮水。参照 Higgins and Aderson 给大鼠施行肝脏 70% 切除手术, 中切组大鼠术前以川芎嗪(200 mg/kg/d)腹腔注射 7 d, 其余组注射生理盐水。假术组大鼠以同样的手术程序打开腹腔但不施行肝部分切除术。各组施行手术动物在切除术后 24 h 沿腹中线切开动物腹腔, 于腹主动脉两髂分支处取血分离血清, 切取所有肝脏, 待测。采用试剂盒法分别测定各组血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)含量, 肝脏匀浆后, 采用八木国夫法检测肝组织中丙二醛(MDA)含量, 采用 western blot 法测定肝组织中核增殖抗原(PCNA)和铜锌超氧化物歧化酶(SOD1)、锰超氧化物歧化酶(SOD2)的蛋白表达。结果 与中切组相比手术动物相比, 切治组大鼠血清中 ALT、AST 水平显著降低($P < 0.05$), 肝细胞中 PCNA 表达显著升高($P < 0.05$), 肝组织中 MDA 含量显著降低($P < 0.05$), 肝组织中 SOD1、SOD2 表达显著增加。结论 肝脏切除 70% 后, 肝功受损, 氧化应激增加, 但核增殖能力增强。川芎嗪可以抑制肝切手术导致的氧化应激损伤, 促进 SOD 的表达, 抑制 MDA 的升高, 降低 ALT、AST 水平, 提高 PCNA 的表达。提示中年大鼠肝切除后肝功能受损与氧化应激相关, 给予抗氧化药物能够促进肝再生修复能力, 青年肝切除手术大鼠肝的修复能力强于中年动物。

关键词 川芎嗪 肝切除术 抗氧化作用 核增殖抗原

中图分类号 Q95-33, R339.37, R575 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)11-2041-05

Study of the Facilitative Effect of Tetramethylpyrazine on Liver Repairing Regeneration of Rats after Partially Hepatectomy*

WU Hao, WANG Xin, BAI Hua, HU Jun-xia, ZHANG Tao, LIAO Nai, HAI Chun-xu[△]

(Department of Toxicology, the Ministry of Education Key Lab of Hazard Assessment and Control in Special Operational Environment, Shaanxi Provincial Key Lab of Free radical biology and medicine, School of Public Health, The Fourth Military Medical University, Shaanxi, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the effect of tetramethylpyrazine on liver function and repairing regeneration after hepatectomy in middle-aged rats. **Methods:** 70 % lobe of liver was excised to establish animal model of hepatectomy in SD rats. 50 SD rats were divided into 5 groups: including control group (A), sham operated group (B), hepatectomy in Young rats (C), hepatectomy in middle-aged rats (D) and treatment group of hepatectomy in middle-aged rats (E). Rats were subjected to 70 % partial hepatectomy (Higgins and Anderson, 1931). In E group, the animals were intraperitoneally injected with 200 mg/kg/d tetramethylpyrazine for a week before the operation, and animals in the other groups were injected with normal saline. 24 h after the operation, the rats were sacrificed and serum and livers were collected. The content of Alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum was assayed. Western blot was used to detect the protein expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in livers. The content of malondialdehyde (MDA) and the protein expression of superoxide dismutase 1 (SOD1) and superoxide dismutase 2 (SOD2) were also measured in livers. **Results:** Compared with that of M group, serum ALT and AST in T group were significantly decreased ($P < 0.05$); PCNA expression was evidently increased ($P < 0.05$); the concentration of MDA in liver was markedly reduced ($P < 0.05$); the expression of SOD1 and SOD2 were significantly increased. **Conclusion:** Tetramethylpyrazine could improve liver function and the capability of liver regeneration after hepatectomy in middle-aged rats, and the protective effect of tetramethylpyrazine may be due to the enhancement of antioxidant activity through the increase of SOD expression and the increased expression of PCNA.

Key words: Tetramethylpyrazine; Hepatectomy; Antioxidant activity; PCNA

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33, R339.37, R575 **Document code:** A

Article ID 1673-6273(2012)11-2041-05

前言

肝脏是机体的重要代谢器官, 许多疾病可以导致肝损伤, 因此研究肝损伤修复再生机制。随着肝脏疾病的增多, 越来越

* 基金资助 国家自然科学基金资助 (30872135)

作者简介 吴昊 (1984), 男, 硕士研究生, 研究方向: 自由基生物学。E-mail: robot0422@sina.com

△通讯作者 海春旭, E-mail: hx-hai@fmmu.edu.cn

(收稿日期: 2012-01-09 接受日期: 2012-02-05)

多的患者需要接受肝切除术或肝移植术,而肝切除术或移植术的安全性依赖于余肝组织的再生能力^[1,2]。有研究表明,随着年龄的增加,余肝的再生能力随之下降^[3]。而氧化还原调节在肝脏再生过程中起了至关重要的作用^[4]。川芎嗪为传统中药川芎中提取的单一化学成分药物,该药物具有明显的高效低毒特点,在体内有较强的抗氧化作用^[5]。本实验利用中年大鼠肝切除模型,通过检测转氨酶、MDA 含量变化、肝细胞增生核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA) 表达及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD) 表达变化,初步探讨川芎嗪对中年大鼠肝切除后肝再生的促进作用及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及设备

SPF 级 SD 雄性大鼠 50 只,其中青年雄性大鼠(2 个月龄)

30 只,体重 257.4 ± 17.2 g,中年雄性大鼠(12 个月龄) 20 只,体重 495 ± 47.8 g,均由第四军医大学实验动物中心提供;川芎嗪为湖北省远达制药集团股份有限公司产品;全自动生化分析仪为瑞士罗氏公司产品;MDA 标准品为德国 Merck 公司产品;牛血清白蛋白为江苏华美试剂公司产品;7200 型光栅分光光度计为尤尼柯产品;过氧化氢、三羟甲基氨基甲烷(trisaminomethane,Tris)、抗坏血酸、磷酸盐溶液等均为国产分析纯试剂;Mini-PROTEAN 电泳系统、蛋白半干转装置均为 BIO-RAD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 分组 将青年雄性大鼠 30 只随机分成 3 组:青年肝切除组(A)、正常对照组(B)及假手术组(C),中年雄性大鼠 20 只随机分成 2 组:中年肝切除组(D)和中年肝切除治疗组(E)。用药时间均为 7 d(表 1)。

表 1 大鼠分组情况

Table 1 Groups of rats

Groups	n	Percentage of hepatectomy	Tetramethylpyrazine (mg/kg/d)	Saline (ml/kg/d)	Days of treatment(d)
Group A	10	0%	-	100	7
Group B	10	0%	-	100	7
Group C	10	70%	-	100	7
Group D	10	70%	-	100	7
Group E	10	70%	200	-	7

1.2.2 造模 大鼠经 10 g/L 戊巴比妥钠按体重 30 mg/kg 腹腔注射麻醉,假切组大鼠于腹部正中施加 3cm 切口暴露腹腔,轻轻摆动肝脏左叶与中叶后,关闭腹腔;清切组、中切组和切治组大鼠参考 Higgins and Aderson 的大鼠肝切除模型^[6]施行肝部分(70%)手术切除(Partial Hepatectomy PH)。

1.2.3 取材 手术后 24h 腹主动脉抽取大鼠全血并处死全部大鼠,取出肝脏。

1.3 检测指标

(1) 血清中 ALT、AST 的含量采用全自动生化仪法测定;(2) 血清和肝组织 MDA 含量采用用八木固夫法测定^[7];(3) PCNA、SOD1、SOD2 蛋白表达量采用 Western blot 法检测,样品处理方法为:取冻存的肝组织,按每 10 ml/g 加入蛋白裂解液[50 mmol.L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5),20 mmol.L⁻¹ NaCl,5 mmol.L⁻¹ EDTA,0.1% SDS],匀浆后置于 20 000 g 离心。吸上清,用 Lowry's 法测定蛋白。在上清液中加入等体积的 2× SDS 上样缓冲液,再加入 5 mol.L⁻¹ DTT。煮沸 5 min 后,10 000 g 离心 10 min,取上清,-20℃保存。从各组样品中取 20 g 总蛋白进行电泳(10%SDS-PAGE1,蛋白质转膜和 Western blot 杂交。用 10%脱脂牛奶封闭 NC 膜 1 h,TBST 漂洗,分别滴加β-actin、PCNA、SOD1 和 SOD2 一抗在 4℃下过夜。TBST 漂洗 4 次。分别滴加相应的二抗 37℃孵育 1 h,TBST 漂洗 4 次。用化学发光液对 NC 膜曝光,利用 Quantity One 图像分析系统(Bio-Rad,Richmond,CA,USA)扫描,处理。

1.4 统计学处理

全部数据用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS 10.0 软件

进行统计学处理,采用单因素方差分析和差异显著性 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 川芎嗪对大鼠肝切除后肝功指标的影响

对照组相比,施行手术的各组动物的 SLT、AST 活性均明显升高($P < 0.05$),其中肝切除组高于假切组($P < 0.05$),在肝切除组的两组动物中,中切组大鼠均明显高于清切组大鼠的 SLT、AST 活性($P < 0.05$);在中年大鼠肝脏切除的中切组和切治组中,经药物预处理 7d 后的肝脏切除组动物的 ALT、AST 活性下降($P < 0.05$),但仍高于清切组($P < 0.05$),表明川芎嗪可以有程度的抑制中年大鼠肝切除后的 ALT、AST 活性,结果见表 2。

2.2 川芎嗪对大鼠肝切除后肝组织中 PCNA 蛋白表达的影响

肝组织中 PCNA 蛋白表达检测结果显示,与对照组和假切组大鼠相比,青切组的肝组织中 PCNA 的表达量增加($P < 0.05$);与对照组和假切组大鼠相比,中切组大鼠肝 PCNA 表达增加不明显($P > 0.05$),提示修复能力不足,但给予抗氧化药物后,切治组 PCNA 的表达量明显增加($P < 0.05$),表明抗氧化药物川芎嗪具有促进中年动物肝脏部分切除后肝修复再生作用,结果见图 1。

2.3 川芎嗪对大鼠肝切除后肝组织 MDA 含量的影响

与对照组大鼠相比,手术后各组 MDA 含量均有增高趋势,但假切组和青切组未达到显著水平($P > 0.05$)。与青切组(116.4 ± 19.4)大鼠相比,中切组(310.2 ± 31.7)大鼠肝部分切除后剩余肝组织中的 MDA 含量升高($P < 0.05$),表明氧化应激损

伤加重,而经川芎嗪预处理 7d 后,与 M 组相比,川芎嗪可以显著抑制中年大鼠肝切除后血清中 MDA 含量的升高 ($220.2 \pm 41.6, P < 0.05$),结果见图 2。

表 2 不同处理组大鼠血清 ALT、AST 测定结果(U/L)

Table 2 AST and ALT determination results of serum with diferent treatments (U/L)

Groups	ALT	AST
Group A	32.6 $\pm$ 7.6	132.1 $\pm$ 21.9
Group B	195.3 $\pm$ 14.8	297.6 $\pm$ 29.9
Group C	233.6 $\pm$ 30.2	427.7 $\pm$ 36.0
Group D	1453.0 $\pm$ 159.7*	1571.3 $\pm$ 172.0*
Group E	527.3 $\pm$ 89.9#	703.3 $\pm$ 97.2#

注 * 与 C 组相比, $P < 0.05$, # 与 D 组相比 $P < 0.05$

Note: * Comparison with Group C, $P < 0.05$; # Comparison with Group D, $P < 0.05$

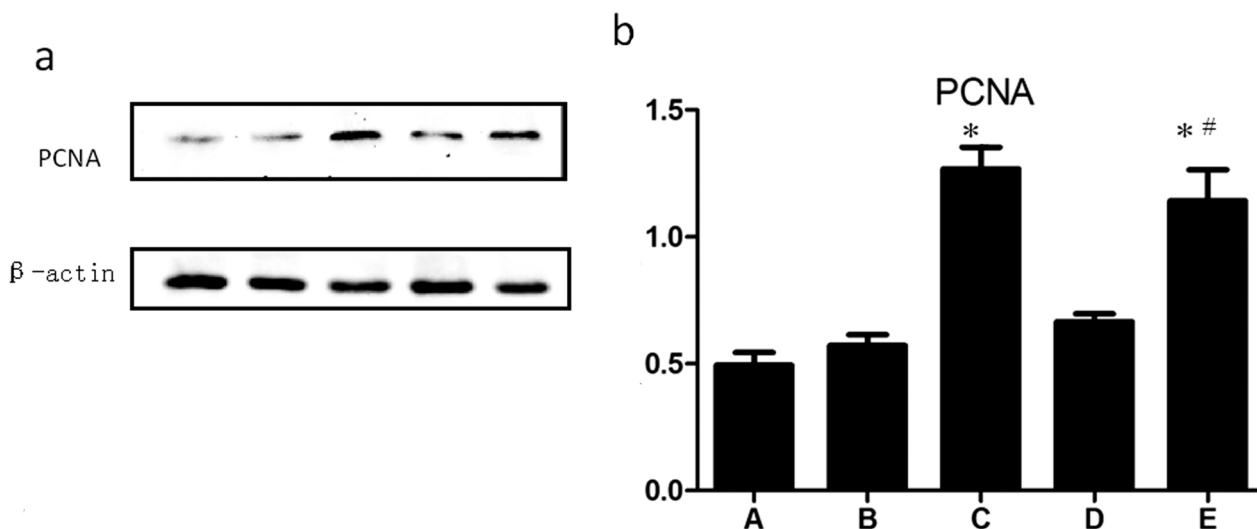


图 1 川芎嗪对中年大鼠肝切除后肝组织中 PCNA 蛋白表达的影响 注 a,b 分别为 PCNA/β-actin 的 Western blot 结果及灰度值

注 :A 对照组,B 假切组,C 青切组,D 中切组,E 中切组 ; * 表示 A 组、B 组相比 $P < 0.05$, # 与 D 组相比 $P < 0.05$

Fig.1 Effect of tetramethylpyrazine injection on PCNA expression in liver in all groups note: a: Activation of PCNA/β-actin was determined by Western blot analysis, b: Quantification of PCNA/β-actin expression

Note :A control group, B sham operated group, C hepatectomy in Young rats, D hepatectomy in middle-aged rats, E treatment group of hepatectomy in middle-aged rats ; * Comparison with Group A,B $P < 0.05$; # Comparison with Group D $P < 0.05$

2.4 川芎嗪对大鼠肝切除后肝组织中 SOD1、SOD2 蛋白表达的影响

Western Blot 检测结果表明,与青切组组大鼠相比,中切组大鼠肝组织中 SOD1、SOD2 的表达量显著降低,川芎嗪治疗有促进中年大鼠肝部分切除后 SOD1、SOD2 的表达作用。

3 讨论

肝细胞为终末分化细胞,在生理条件下多数为静息状态,仅 0.1% 左右的细胞通过分裂补偿凋亡的肝细胞^[8]。同其他实质性器官不同,肝脏有极强再生能力,啮齿类动物在进行肝脏受损或部分肝切除后,残留的肝细胞会立即启动有丝分裂,使肝实质能在很短的时间内完全恢复细胞总数和功能,这个过程是肝切除术和肝移植术的基础^[1,9]。但年龄的增加和病理性改变都可以降低肝细胞再生的速度,因此,如何更快更有效得促进肝细胞再生以代偿受损肝功能仍是临床上急需解决的难题^[10-12]。

对肝细胞再生及调控机制的研究也一直是研究的热点,相关研究表明,肝再生的能力受到多种因素的影响,其再生的速度同脂质过氧化损伤程度成负相关^[13]。

血清 ALT、AST 水平是反映肝功能是否正常的重要指标^[14]。MDA 是自由基作用于脂质发生过氧化反应的氧化终产物,是反映脂质过氧化损伤最简单最可靠的指标^[15]。PCNA 是与细胞增殖密切相关的核内酸性蛋白质,静止的细胞中 PCNA 的含量很少,增殖细胞和转化细胞中其含量则会发生明显变化^[16]。G0~G1 期细胞无明显的 PCNA 表达,G1 晚期其表达度开始增加,S 期达到高峰,G2~M 期表达下降,其含量和表达强弱的变化与 DNA 合成及 DNA 复制的活跃程度相一致^[17]。PCNA 是评价肝脏再生的重要指标^[18]。本研究发现同青年肝切除组 (C 组) 相比,中年肝切除组 (D 组) 血清 ALT、AST 水平升高,肝组织 MDA 含量升高,肝细胞中 PCNA 蛋白表达量降低。说明随着年龄增大,肝切除引起的脂质过氧化损伤更严重,肝功能受

损程度加剧,肝细胞再生增殖受限。同中年肝切除组(D组)相比,中年肝切除治疗组(E组)在肝切除术前预防性给予川芎嗪,可以有效降低ALT、AST水平改善肝功能,降低MDA含量减少肝脏脂质过氧化损伤,增加肝细胞中PCNA的蛋白表达,改善肝脏再生环境,促进肝细胞增殖。

SOD是生物体内重要的抗氧化酶,具有特殊的生理活性,是生物体内清除自由基的首要物质^[19]。它可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害,并及时修复受损细胞,复原因自由基造成的细胞伤害^[20]。在抗氧化损伤的过程中发挥着至关重要的作用。本研究的Western Blot结果表明,SOD1、SOD2蛋白表达与PCNA蛋白表达变化趋势相同,提示川芎嗪可能通过增加SOD的表达,提高肝组织中抗氧化水平,降低脂质过氧化损伤,改善肝细胞生存环境,从而促进肝脏再生。

综上所述,川芎嗪可以改善中年大鼠肝切除后肝功能并提高肝再生能力,其机制可能是通过促进SOD的表达,提高抗氧化能力,降低氧化损伤,促进PCNA的表达。

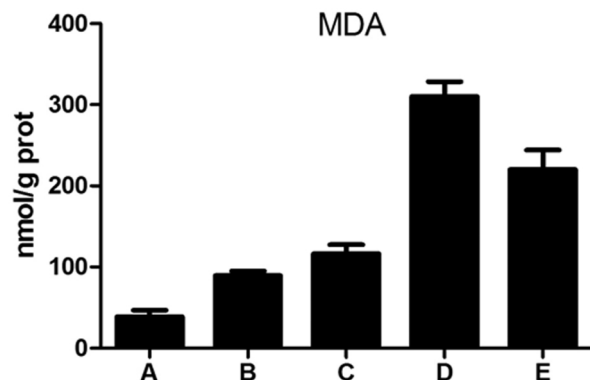


图2 川芎嗪对中年大鼠肝切除后肝组织MDA的影响
注:A对照组,B假切组,C青切组,D中切组,E中切治组;*与青切组相比, $P<0.05$,#与中切组相比 $P<0.05$

Fig.2 Effect of tetramethylpyrazine injection on MDA in liver in all groups
Note: A control group, B sham operated group, C hepatectomy in Young rats, D hepatectomy in middle-aged rats, E treatment group of hepatectomy in middle-aged rats; * Comparison with Group C $P<0.05$; # Comparison with Group D $P<0.05$

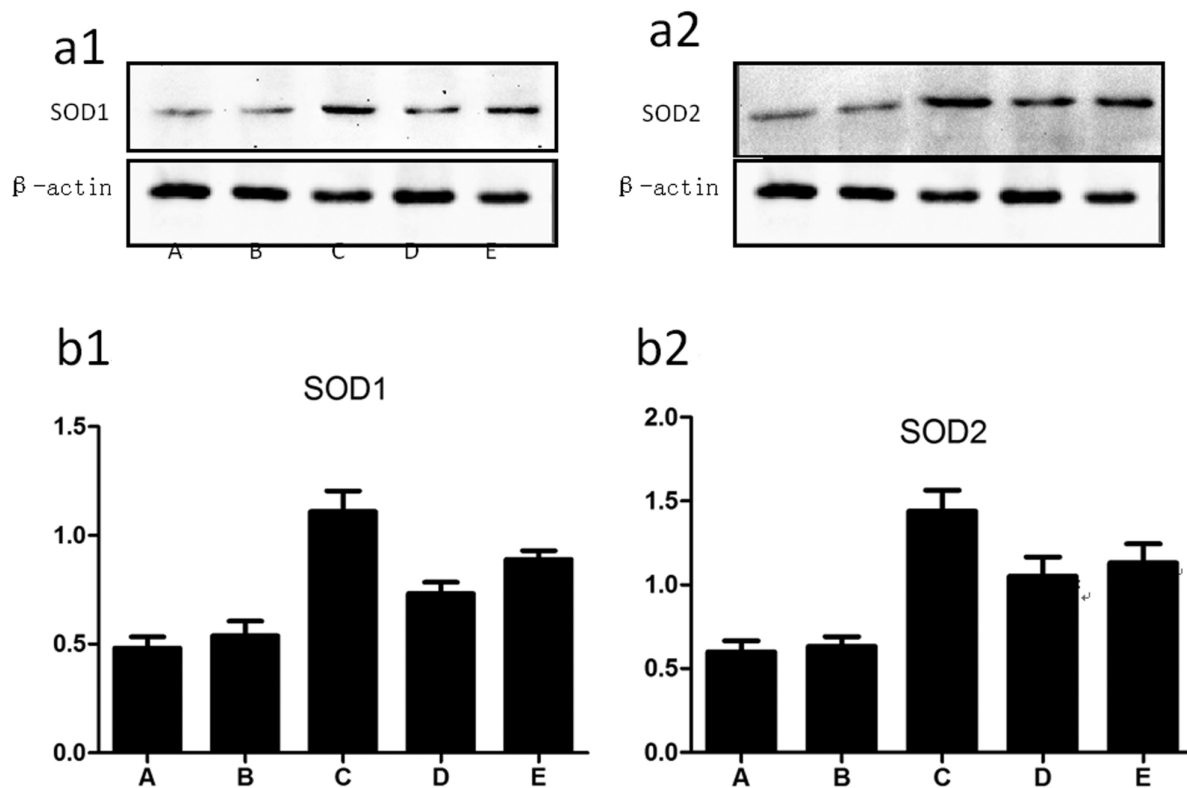


图3 川芎嗪对中年大鼠肝切除后肝组织中SOD1、SOD2蛋白表达的影响 注:a、b分别为SOD/β-actin的Western blot结果及灰度值(半定量)
注:A对照组,B假切组,C青切组,D中切组,E中切治组;*与C组相比 $P<0.05$,#表与D组相比 $P<0.05$

Fig. 3 Effect of tetramethylpyrazine injection on SOD expression in liver in all groups note: a: Activation of SOD/β-actin was determined by Western blot analysis, b: Quantification of SOD/β-actin expression

Note: A control group, B sham operated group, C hepatectomy in Young rats, D hepatectomy in middle-aged rats, E treatment group of hepatectomy in middle-aged rats; * Comparison with Group C $P<0.05$; # Comparison with Group D $P<0.05$

参考文献 (References)

- [1] Jia C. Advances in the regulation of liver regeneration [J]. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2011, 5(1): 105-121
- [2] Ono Y, Kawachi S, Hayashida T, et al. The influence of donor age on liver regeneration and hepatic progenitor cell populations. [J]. Surgery, 2011, 150(2): 154-161
- [3] Timchenko NA. Aging and liver regeneration. [J]. Trends Endocrinol Metab, 2009, 20(4): 171-176

- [4] Haga S, Morita N, Irani K, et al. p66(Shc) has a pivotal function in impaired liver regeneration in aged mice by a redox-dependent mechanism. [J]. Laboratory Investigation, 2010, 90(12): 1718-1726
- [5] **王丽, 吕圭源, 陈素红. 川芎嗪药理作用的研究进展** [J]. 医学信息: 下旬刊, 2011, 24(3): 1116-1118
Wang Li, Lv Gui-yuan, Chen Su-hong. Research Progression in the Pharmacological of Ligusticum W allichii [J]. Medical Information, 2011, 24(3): 1116-1118
- [6] Jiang Y, Zhang LX, Chang CF, et al. The number of the genes in a functional category matters during rat liver regeneration after partial hepatectomy [J]. Journal Of Cellular Biochemistry, 2011, 112(11): 3194-3205
- [7] **李玉亮, 彭洁, 梁欣. 等. 川芎提取物的多模型体系抗氧化活性测定** [J]. 癌变、畸变、突变, 2011, 23(2): 87-92
Li Yu-liang, Peng Jie, Liang Xin, et al. Antioxidation of Szechwan Lovage Rhizome extracts in vivo and in vitro lipid peroxidation models [J]. Carcinogenesis Teratogenesis & Mutagenesis, 2011, 23(2): 87-92
- [8] Michalopoulos GK, DeFrances MC. Liver regeneration [J]. Science, 1997, 276(5309): 60-66
- [9] Shimada H. Hepatic regeneration and liver failure after hepatectomy and living-donor liver transplantation--basic and clinical review [J]. Nihon Geka Gakkai Zasshi, 2004, 105(10): 649
- [10] Schmucker DL, Sanchez H. Liver regeneration and aging: a current perspective [J]. Curr Gerontol Geriatr Res, 2011, 2011: 526379
- [11] Uzun MA, Koksall N, Aktas S, et al. The effect of ursodeoxycholic acid on liver regeneration after partial hepatectomy in rats with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Hepatology Research, 2009, 39(8): 814-821
- [12] Uzun MA, Koksall N, Kadioglu H, et al. Effects of N-acetylcysteine on regeneration following partial hepatectomy in rats with nonalcoholic fatty liver disease [J]. Surgery Today, 2009, 39(7): 592-597
- [13] Grypioti AD, Mykoniatis M, Demopoulos CA, et al. Recombinant platelet-activating factor-acetylhydrolase attenuates paracetamol-induced liver oxidative stress, injury, and regeneration [J]. Dig Dis Sci, 2007, 52(1): 192-199
- [14] Giannini E, Botta F, Fasoli A, et al. Progressive liver functional impairment is associated with an increase in AST/ALT ratio [J]. Dig Dis Sci, 1999, 44(6): 1249-1253
- [15] Gawel S, Wardas M, Niedworok E, et al. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker [J]. Wiad Lek, 2004, 57(9-10): 453-455
- [16] Dietrich DR, Candrian R, Marsman DS, et al. Retrospective assessment of liver cell proliferation via PCNA: a comparison with tritiated thymidine [J]. Cancer Letters, 1994, 79(1): 45-51
- [17] Teixeira-Clerc F, Belot MP, Manin S, et al. Beneficial paracrine effects of cannabinoid receptor 2 on liver injury and regeneration [J]. Hepatology, 2010, 52(3): 1046-1059
- [18] Castro-e-Silva T, Castro-e-Silva O, Kurachi C, et al. The use of light-emitting diodes to stimulate mitochondrial function and liver regeneration of partially hepatectomized rats [J]. Brazilian Journal Of Medical And Biological Research, 2007, 40(8): 1065-1069
- [19] McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2005, 59(4): 139-142
- [20] Muth CM, Glenz Y, Klaus M, et al. Influence of an orally effective SOD on hyperbaric oxygen-related cell damage [J]. Free Radic Res, 2004, 38(9): 927-932