

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01429

落新妇苷通过促进 IL-10 表达保护小鼠缺血再灌注损伤肝脏

慕宁¹,王海梁¹,傅宏¹,林峰¹,施晓敏¹,邹绍武¹,王全兴²,傅志仁^{1*}

1. 第二军医大学长征医院全军器官移植研究所,上海 200003

2. 第二军医大学基础部免疫学教研室,免疫学研究所,上海 200433

[摘要] **目的:**观察落新妇苷对肝脏热缺血再灌注损伤的保护作用,对其机制进行初步探讨。**方法:**C57BL/6 小鼠随机分为 4 组:假手术组(Sham)、模型组(I/R)、落新妇苷小剂量(10 mg/kg)干预组和落新妇苷大剂量(40 mg/kg)干预组。缺血前 24 h 和 1 h 干预组小鼠腹腔注射分别给予 10 或 40 mg/kg 的落新妇苷,建立肝左、中叶 70% 部分肝缺血再灌注模型,模型组和假手术组给予同样体积的生理盐水。小鼠肝脏左叶缺血 90 min,再灌注 6 h 后各实验组采集血液和肝脏组织样本。检测血清中丙氨酸转氨酶(ALT)的活性作为肝功能损伤的指标,同时用 ELISA 检测肝组织中 MPO 含量。观察肝脏组织病理学改变。Western 印迹检测肝组织中 IL-10 蛋白含量,半定量 RT-PCR 检测 IL-10 mRNA 表达情况。**结果:**落新妇苷干预能有效降低部分肝脏热缺血再灌注小鼠血清 ALT 水平,能有效降低缺血肝脏中 MPO 含量,改善肝组织病理表现。干预组肝组织中 IL-10 蛋白表达与 I/R 模型对照组比较均渐次升高,与半定量 RT-PCR 结果相符(小剂量干预组 $P < 0.05$;大剂量干预组 $P < 0.01$)。**结论:**落新妇苷干预能减轻小鼠肝脏热缺血再灌注损伤后的炎症反应,有效改善肝功能和肝脏病理损害;机制可能在于其能促进缺血再灌注损伤肝组织中 IL-10 的高表达。

[关键词] 肝;再灌注损伤;落新妇苷;丙氨酸转氨酶;髓过氧化物酶;白细胞介素-10

[中图分类号] R 657.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)12-1429-04

Protective effect of astilbin on ischemia/reperfusion-induced liver injury through increasing IL-10 expression

MU Ning¹, WANG Hai-liang¹, FU Hong¹, LIN Feng¹, SHI Xiao-min¹, ZOU Shao-wu¹, WANG Quan-xing², FU Zhi-ren^{1*}

1. PLA Institute of Organ Transplantation, Chengzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Department Immunology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the protective effect of astilbin on warm ischemia/reperfusion-induced liver injury and to study the related mechanism. **Methods:** C57BL/6 mice were randomly divided into four groups ($n=8$): sham-operated group (Sham), model control group (I/R), low dose astilbin treatment group (10 mg/kg) and high dose astilbin (40 mg/kg) treatment group. Mice in the two treatment groups were intraperitoneally injected with astilbin 24 hours and one hour before ischemia. Then 70% hepatic ischemia/reperfusion model (the left and middle hepatic lobe) was established. Mice in the I/R model control group and the sham operation group were administered with the same volume of normal saline. The blood sample and liver tissue samples were collected 90 min after ischemia and 6 h after reperfusion. Serum ALT activity was detected as an indicator of liver function damage and the content of MPO in liver tissues were detected by ELISA. The pathological changes of the liver were observed. The expression of IL-10 in liver tissues was detected by Western blotting and the expression of IL-10 mRNA was detected by semi-quantitative RT-PCR. **Results:** Astilbin treatment can effectively lower the serum ALT level and MPO level in the liver tissues in some I/R mice. It could also improve the pathological manifestations of the liver. Compared with the I/R model control group, IL-10 protein levels gradually increased in the two treatment groups, which was consistent with the result of RT-PCR (low dose group $P < 0.05$; high dose group, $P < 0.01$). **Conclusion:** Astilbin can effectively reduce the inflammatory response after liver warm ischemia-reperfusion induced injury, effectively improve the mouse liver function and pathological damage, which might be related to the upregulation of IL-10 expression in the liver tissues.

[KEY WORDS] liver; reperfusion injuries; astilbin; alanine transaminase; myeloperoxidase; interleukin-10

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(12):1429-1432]

肝脏是对缺血再灌注损伤最敏感的器官之一。肝窦内皮细胞、Kupfer 细胞和中性粒细胞的活化以及

氧自由基的产生在缺血再灌注损伤的病理过程中具有重要作用^[1]。在肝脏缺血再灌注损伤的早期,白细

[收稿日期] 2008-06-06 **[接受日期]** 2008-09-02

[作者简介] 慕宁, 博士生. E-mail: mnwsq@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-63610109-73303, E-mail: zhirenf@sh163.net

胞的聚集、活化和黏附进一步促进活性氧簇生成,分泌前炎症细胞/化学因子,补体激活,血管细胞黏附分子激活等过程^[2-3],并最终导致肝细胞的进一步损伤^[4-6]。IL-10是已知较强的抑炎症细胞因子,研究者在包括肝脏^[6]的许多缺血再灌注损伤模型中都能观察到IL-10的抑制炎症、保护组织的作用^[7-9]。落新妇苷(astilbin)是从土茯苓的乙醇提取液中分离得到的3种二氢黄酮醇苷之一。其具有利尿、镇痛、抗炎^[8]及减轻心肌细胞缺血再灌注损伤^[9]的作用。本研究采用小鼠部分肝脏热缺血再灌注损伤模型,观察落新妇苷在肝脏热缺血再灌注损伤中的保护效果,并通过观察落新妇苷对IL-10蛋白和mRNA表达的影响,初步探讨落新妇苷肝脏IRI保护作用的机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 分析纯落新妇苷粉剂由杭州华东医药有限责任公司提供。实验中落新妇苷粉剂首先用二甲亚砜溶解(40 mg/ml),使用时用生理盐水稀释至所需浓度。戊巴比妥钠(上海国药集团化学试剂有限公司);髓过氧化物酶(MPO)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);抗小鼠IL-10单抗(SBA);抗 β -actin抗体(Santa Cruz);羊抗鼠IgG二抗(KPL);SuperSignal West Femto超敏底物(Pierce);BCA法蛋白浓度检测试剂盒(凯基公司);TRIzol Reagent(Invitrogen);RNA PCR kit(AMV) Ver3.0试剂盒(TaKaRa);DNA Marker(大连宝生物工程有限公司)。

1.2 动物分组及处理 清洁级雄性C57BL/6小鼠,体质量22~25 g(第二军医大学实验动物中心提供)。动物分笼饲养于第二军医大学基础部免疫学教研室,提供标准饮食。动物实验遵守学校及实验室相应的动物实验有关规定。随机分为4组(每组8只):假手术组(Sham)、模型组(I/R),落新妇苷小剂量(10 mg/kg)干预组、落新妇苷大剂量(40 mg/kg)干预组。于缺血前24 h和1 h,分别给落新妇苷干预组小鼠腹腔注射10或40 mg/kg的落新妇苷,模型组和假手术组给予同样体积生理盐水。再灌注时干预组经尾静脉注射第3次给药,模型组和假手术组给予同样体积生理盐水。

1.3 动物模型建立 采用70%部分肝脏缺血再灌注损伤模型,按Zhai等^[10]报道的方法操作。小鼠经戊巴比妥钠(60 mg/kg,腹腔注射)麻醉后,沿腹部中线切开,游离肝脏,剪除韧带或系膜,在肝蒂中小心分离出进入左叶、中叶的管道,用小血管夹钳夹后造成左、中叶肝脏缺血,钳夹90 min后松开血管夹

使血液复流进行再灌注,松开血管夹后观察1 min,观察肝脏颜色是否发生变化,若复流不畅则终止实验。假手术组(Sham)按同样步骤游离肝脏,只是不错夹阻断血流。手术后每只鼠腹腔内补充生理盐水0.8 ml,用4-0线分两层缝合腹部切口。

1.4 肝功检测 缺血90 min,再灌注6 h后,采集小鼠血液0.3~0.5 ml于1.5 ml EP管中,3 000×g离心5 min,小心吸取上层血清装于干净EP管中,送长海医院临床检验科检测丙氨酸转氨酶(ALT)的活性。

1.5 肝脏组织样品准备及检测 缺血90 min,再灌注6 h后各实验组小鼠左叶肝组织取样,分为3部分。一部分固定于4%多聚甲醛溶液,切片用于组织病理学检测(H-E染色);另一部分肝组织制成匀浆,按试剂盒说明检测MPO;第三部分肝组织于液氮中保存,用于Western印迹及RT-PCR分析。

1.6 Western印迹检测肝组织IL-10表达 取各组冻存肝组织100 mg,用研钵粉碎组织块,按照3 ml/g加入RIPA缓冲液及苯甲基磺酰氟,以12 000×g,4℃高速离心30 min,小心收集上清,按照凯基公司BCA法蛋白浓度检测试剂盒说明书进行蛋白定量,空白对照采用RIPA。调整各组样品蛋白浓度至一致,常规电泳、转膜、封闭。按说明书要求加入一抗、二抗,将Western印迹发光检测试剂中的A液和B液等体积混匀,室温孵育5 min,于凝胶成像分析检测仪上进行检测。

1.7 半定量RT-PCR检测肝组织IL-10 mRNA表达 取各组冻存的小鼠肝脏组织100 mg,按TRIzol试剂说明书抽提mRNA,应用TaKaRa公司RT-PCR扩增试剂盒扩增目的基因。各基因引物序列:IL-10正义5'-GCT CTT ACT GAC TGG CAT GAG -3',反义5'-GGC CTT GTA GAC ACC TTG GT -3'; β -actin正义5'-AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT -3',反义5'-GCA GCT CAG TAA CAG TCC GC -3';引物由上海生工生物技术公司合成。反应条件:94℃预变性2 min后,94℃变性30 s、56℃退火30 s、72℃延伸1 min,共35个循环,最后72℃延伸10 min。IL-10扩增片段442 bp。PCR产物用Gel-Pro IMAGER 60-2517型成像分析系统进行分析,测定各条带D值,计算各产物与 β -actin的D值比值,即为目的RNA的相对表达量。

1.8 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SSPS 10.0软件进行所有数据的统计学处理。多组间比较采用完全随机方差分析,SNK法分析组间差异,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 落新妇苷对血清中 ALT 的影响 假手术组 (Sham) 小鼠血清中 ALT 含量为 (142 ± 25) U/L, 经过 90 min 热缺血和 6 h 再灌注, 模型组未干预小鼠血清中 ALT 含量急剧上升, 达到 $(3\ 521 \pm 270)$ U/L。10、40 mg/kg 落新妇苷干预组血清 ALT 含量分别为 $(1\ 766 \pm 179)$ 、 $(1\ 067 \pm 101)$ U/L, 与模型组相比均明显下降 ($P < 0.01$), 大剂量干预组 (40

mg/kg) 较小剂量组更明显 ($P < 0.01$)。

2.2 落新妇苷对肝脏形态学的影响 Sham 组肝脏组织结构正常, 脉管系统形态结构正常, 血管内皮完整, 肝细胞形态结构正常, 肝窦内皮完整 (图 1A)。缺血 90 min, 再灌注 6 h 后, 肝脏组织结构明显异常: 肝细胞水肿, 形态结构异常, 血管和胆管周围淋巴细胞浸润加重, 血管腔内可见淤血 (图 1B)。落新妇苷大剂量干预后 (40 mg/kg), 血管和胆管周围淋巴细胞浸润减轻, 肝细胞形态结构相对正常 (图 1C)。

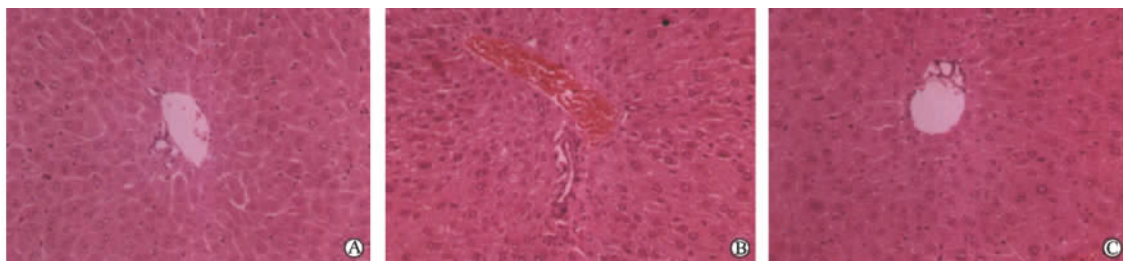


图 1 落新妇苷对肝组织形态学的影响

Fig 1 Effects of astilbin(A) on liver histology (H-E)

A: Hepatic histology of sham group; B: Hepatic histology of I/R control group; C: Hepatic histology of astilbin-treated group (40 mg/kg). Original magnification: $\times 400$

2.3 落新妇苷对肝组织 MPO 表达的影响 Sham 组肝组织匀浆中 MPO 活性为 (0.5 ± 0.1) U/mg prot, 与 Sham 组相比, 肝脏缺血再灌注导致 MPO 活性明显上升, 达到 (1.2 ± 0.2) U/mg prot。10、40 mg/kg 干预组 MPO 活性分别为 (0.7 ± 0.1) 、 (0.4 ± 0.1) U/mg prot, 与模型组比较均明显下降 ($P < 0.01$), 大剂量干预组 (40 mg/kg) 较小剂量组更明显 ($P = 0.002$)。

2.4 落新妇苷对肝组织 IL-10 蛋白表达的影响 结果显示: 与 I/R 对照组比较, 落新妇苷小、大剂量干预后, IL-10 表达渐次增强 (图 2)。

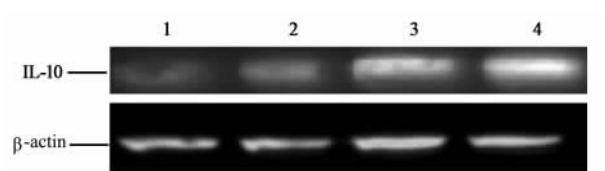


图 2 落新妇苷对肝组织 IL-10 蛋白的影响

Fig 2 Effects of astilbin on IL-10 protein expression in liver tissues

1: Sham; 2: I/R; 3: I/R + astilbin (10 mg/kg); 4: I/R + astilbin (40 mg/kg)

2.5 落新妇苷对肝组织 IL-10 mRNA 表达的影响 半定量结果显示, Sham 组 IL-10 mRNA 表达较低 (0.43 ± 0.07) , 与 I/R 模型组比较 $(0.96 \pm$

$0.08)$, 落新妇苷小剂量干预能上调 IL-10 mRNA 表达 $(1.11 \pm 0.17, P < 0.05)$, 大剂量则明显增强 IL-10 mRNA 表达 $(1.47 \pm 0.08, P < 0.01)$, 图 3)。

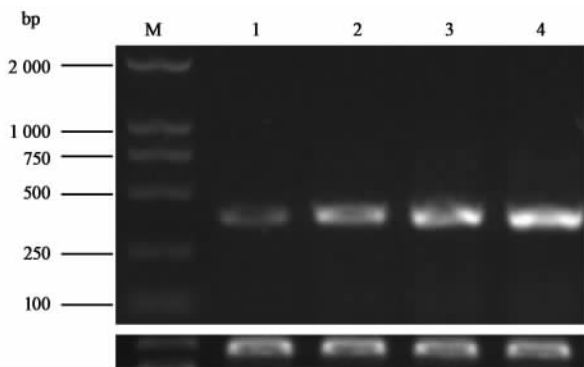


图 3 落新妇苷对肝组织 IL-10 mRNA 表达的影响

Fig 3 Effects of astilbin on IL-10 mRNA level in liver tissues

M: Marker; 1: Sham; 2: I/R; 3: I/R + astilbin (10 mg/kg); 4: I/R + astilbin (40 mg/kg)

3 讨论

缺血再灌注损伤是肝移植不可避免的过程, 可导致急性炎症反应并由此引起器官的严重损伤和功能丧失。最大限度地减轻 IRI 不但可以增加适当的供体, 也可以使更多的患者从肝移植手术中康复。落新妇苷具有利尿、镇痛、抗炎^[8]及减轻心肌细胞缺

血再灌注损伤^[9]的作用。本课题进一步研究落新妇苷在肝脏热缺血再灌注损伤中预期的保护作用及机制。模型对照组缺血 90 min 再灌注 6 h 后,血清 ALT 水平较假手术组显著升高,病理切片显示肝细胞水肿,形态结构异常,血管和胆管周围淋巴细胞浸润加重,血管腔内可见淤血,说明该模型能反映出较明显的缺血再灌注损伤。落新妇苷干预组 ALT 水平较模型对照组显著下降。病理切片也可看出相同趋势。以上结果说明落新妇苷对缺血再灌注损伤后的肝功能和组织形态学具有较明显的保护作用。

缺血直接导致组织缺氧、再灌注时中性粒细胞活化、血小板与血管内皮的黏附,导致肝窦充血和微循环失调。非实质细胞如肝窦内皮细胞(EC)、Kupffer 细胞等对缺血再灌注损伤比肝细胞更为敏感。Kupffer 细胞活化后可产生多种细胞因子,如 IL-1、TNF- α 、IL-6、IFN- γ 以及氧自由基,直接损伤血管内皮细胞和肝细胞,导致血管内皮细胞、肝细胞和中性粒细胞膜受体的改变,产生趋化因子,活化其他的 Kupffer 细胞和中性粒细胞。活化的中性粒细胞又可释放出氧自由基而导致肝细胞损伤。MPO 与中性粒细胞激活程度之间存在极显著的相关性,可作为中性粒细胞的活化标志物^[11]。本课题中,落新妇苷干预可显著降低肝脏缺血再灌注导致的 MPO 活性上升。这说明落新妇苷能够减轻肝缺血再灌注损伤后中性粒细胞的聚集和活化,从而减轻炎症反应。

IL-10 是公认的抑炎症细胞因子,可抑制单核细胞依赖性 Th 细胞增生,并抑制 Th1 类细胞因子的合成及其活性。尤其抑制 IFN- γ 的产生,对 IL-2、TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、细胞黏附分子的产生也有不同程度的抑制作用。在许多缺血再灌注损伤模型中都能观察到 IL-10 的抑制炎症、保护组织的作用^[12-13],Dinant 等^[14]用重组大鼠 IL-10 在大鼠肝缺血再灌注损伤模型中观察到明显的保护作用,同时发现 IL-10 能促进部分肝切除后的肝再生;Ke 等^[15]利用腺病毒转染病毒 IL-10 基因,干扰 TLR4 和 HO-1 信号通路,在小鼠 IRI 模型观察到损伤明显减轻,TLR4 和 NF- κ B 表达明显受抑制,抗氧化剂 HO-1 和抗凋亡的 Bcl-2/Bcl-xL 表达得到加强。受到上述研究成果的启示,本课题研究中观察到落新妇苷干预能够明显上调小鼠部分热缺血再灌注损伤肝脏组织中 IL-10 在蛋白和 mRNA 水平的表达,说明落新妇苷可能通过上调 IL-10 表达产生抑制炎症反应的作用。

综上所述,本研究发​​现落新妇苷干预能有效改善小鼠肝脏热缺血再灌注损伤引起的肝功能和肝脏

病理损害,其机制可能是落新妇苷干预能够减轻小鼠肝脏热缺血再灌注损伤后中性粒细胞的聚集、浸润和活化,促进缺血再灌注损伤肝组织中 IL-10 蛋白及 mRNA 的高表达,从而起到抑制炎症的作用。

[参考文献]

- [1] Farmer D G, Amersi F, Kupiec-Weglinski J W, Busuttill R W. Current status of ischemia and reperfusion injury in the liver [J]. *Transplant Rev*, 2000, 14: 106-126.
- [2] Fondevila C, Busuttill R W, Kupiec-Weglinski J W. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look [J]. *Exp Mol Pathol*, 2003, 74: 86.
- [3] Teoh N C, Farrell G C. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18: 891.
- [4] Farhood A, McGuire G M, Manning A M, Miyasaka M, Smith C W, Jaeschke H. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression and its role in neutrophil-induced ischemia-reperfusion injury in rat liver [J]. *J Leukoc Biol*, 1995, 57: 368-374.
- [5] Gong J P, Wu C X, Liu C A, Li S W, Shi Y J, Li X H, et al. Liver sinusoidal endothelial cell injury by neutrophils in rats with acute obstructive cholangitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8: 342-348.
- [6] Nicholas L T, Ronald D G. Effects of initial ischemia/reperfusion injury on the transplanted kidney [J]. *Transplantation*, 1997, 64: 945-947.
- [7] Eiatarr T M, Virji A S. Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation [J]. *Anti-cancer Drugs*, 1999, 10: 187-193.
- [8] 吴丽明, 张敏. 土茯苓中落新妇苷的利尿和镇痛作用 [J]. *中药材*, 1995, 18: 627-630.
- [9] 高思海, 潘铁成. 落新妇苷的提取及对心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究 [J]. *中华实用中西医杂志*, 2003, 3: 1693-1694.
- [10] Zhai Y, Shen X D, O'Connell R, Gao F, Lassman C, Busuttill R W, et al. Cutting Edge: TLR-4 activation mediates liver ischemia/reperfusion inflammatory response via IFN regulatory factor 3-dependent MyD88-independent pathway [J]. *J Immunol*, 2004, 173: 7115.
- [11] Tosi M F, Stark J M, Wane C. Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effect on neutrophil-epithelial adhesion [J]. *AMJ Respir*, 1992, 7: 214-221.
- [12] Le Moine O, Louis H, Demols A, Desalle F, Demoor F, Quertinmont E, et al. Cold liver ischemia-reperfusion injury critically depends on liver T cells and is improved by donor pretreatment with interleukin 10 in mice [J]. *Hepatology*, 2000, 31: 1266-1274.
- [13] Hayward R, Nossuli T O, Scalia R, Lefer A M. Cardioprotective effect of interleukin-10 in murine myocardial ischemia-reperfusion [J]. *Eur J Pharmacol*, 1997, 334 (2-3): 157-163.
- [14] Dinant S, Veteläinen R L, Florquin S, van Vliet A K, van Gulik T M. IL-10 attenuates hepatic i/r injury and promotes hepatocyte proliferation [J]. *J Surg Res*, 2007, 141: 176-182.
- [15] Ke B, Shen X D, Tsuchihashi S, Gao F, Araujo J A, Busuttill R W, et al. Viral interleukin-10 gene transfer prevents liver ischemia-reperfusion injury: toll-like receptor-4 and heme oxygenase-1 signaling in innate and adaptive immunity [J]. *Hum Gene Ther*, 2007, 18: 355-366.