

银杏叶提取物在大鼠肝移植缺血再灌注损伤中的预处理效用

周杰斌^{1,2}, 杨学抗², 叶启发¹, 明英姿¹, 夏宗江¹

(1. 中南大学湘雅三医院湘雅移植医学研究院, 长沙 410013;

2. 长沙市中心医院普外科, 长沙 410001)

[摘要] 目的:探讨银杏叶提取物对大鼠移植肝缺血再灌注损伤模型的预处理效用。方法:采用 Kamada's 袖套法建立大鼠缺血再灌注原位肝移植模型。将大鼠随机分成假手术组(SO组)、生理盐水对照组(NS组)、银杏叶提取物预处理组(EGb组)。各组分别观察移植肝再灌注后2h、6h和24h肝组织中TNF- α 、IL-1含量及血清ALT和AST含量和肝组织学变化。结果:SO组与NS组血清ALT和AST含量,肝组织TNF- α 和IL-1活性明显升高($P < 0.01$),肝细胞形态学发生异常变化。EGb预处理组,上述指标的异常变化均明显减轻,与NS组比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。结论:银杏叶提取物可通过抑制Kuffer氏细胞激活减少释放TNF- α 和IL-1始动因子并调控缺血再灌注因子水平达到保护供肝作用。

[关键词] 缺血再灌注损伤; 肝移植; 银杏叶提取物; TNF- α ; IL-1

[中图分类号] R657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)01-0054-05

Effect of extract of ginkgo biloba leaves on the precondition of liver graft in rat liver transplantation

ZHOU Jie-bin¹, YANG Xue-kang², YE Qi-fa¹, MING Ying-zi¹, XIA Zong-jiang¹

(1. Institute of Organ Transplantation, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410013;

2. Department of General Surgery, Changsha Central Hospital, Changsha 410004, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of extract of ginkgo biloba leaves on the precondition of liver graft in rat liver transplantation. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were used as donors and recipients of orthotopic liver transplantation (OLT), and were randomly divided into extract of ginkgo biloba leaves group (Egb), NS control group (NS), and sham operation group (SO) according to whether the extract of ginkgo biloba leaves was injected by the venous (40 mg/kg) 1 h before the liver grafts harvesting. The rats were killed at 2 h, 6 h, and 24 h after the ischemia/reperfusion. The serum concentrations of ALT and AST were determined and the liver tissue were sampled to observe the expression of TNF- α and IL-1. **Results** After the ischemia/reperfusion the serum concentration of ALT and AST and expressions of TNF- α and IL-1 in the hepatic tissue in the NS group significantly increased ($P < 0.01$), and the hepatocytic morphologic change was obvious compared with the SO group. The treatment of ginkgo biloba extract significantly decreased the serum concentration of ALT and AST and the expressions of TNF- α and IL-1 in the hepatic tissue in Egb group compared with the NS group ($P < 0.01$), and relieved the hepatocyte swelling and necrosis.

①收稿日期(Date of reception) 2006-01-22

作者简介(Biography) 周杰斌(1976-),男,湖南邵阳人,医师,硕士,主要从事于肝移植的基础与临床研究。

通讯作者(Corresponding author) 周杰斌, E-mail:zhoujiebin2003@163.com

Conclusion Ginkgo bilobo extract may decrease the release of TNF- α and IL-1 by inhibiting activation of kuffer cells and regulate the cell factors to protect the live.

Key words: ischemia/reperfusion injury; liver transplantation; ginkgo bilobo extract; TNF- α ; IL-1

[*J Cent South Univ (Med Sci)*, 2007, 32(1):0054-05]

在肝脏移植和肝脏外科手术中,肝脏缺血再灌注(hepatic ischemia reperfusion, HIR)是引起肝脏损伤的一个重要因素。减轻肝脏缺血再灌注损伤的方法有药物预处理和缺血预处理。药物预处理方法简单,并能在短时间内产生保护效应,在肝移植的供肝保护方面具有重要意义。由于药物预处理效果优于缺血预处理,因而在肝脏缺血再灌注损伤中的实验中愈来愈多地采用药物预处理方法^[2]。银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, EGb)的主要有效成份为黄酮类和内酯类,具有广泛的药理作用。过去的几十年,国内外学者对EGb作用机制进行了大量研究,证实EGb具有多价的药理学作用^[3]。随着研究的进一步深入,有关EGb对缺血再灌注损伤的保护作用的研究日益受到关注。本研究观察银杏叶提取物对大鼠移植肝脏缺血再灌注后肝组织TNF- α 和IL-1活性、血清谷丙转氨酶(ALT)、血清谷草转氨酶(AST)含量的影响。同时观察肝细胞形态学的变化,进一步研究HIR损伤(HIR injury, HIRI)的发生机制,并探讨银杏叶提取物的预处理效用。

1 材料与方法

1.1 材料 雄性 Sprague Dawley 大鼠 90 只(购于中南大学实验动物中心),体质量 280 ~ 320 g。常规显微手术器械系上海医疗器械有限公司手术器械厂生产,EGb 注射液购自德国威玛舒培博士药厂,每支 5 mL 注射液含 17.5 mg EGb,标定含银杏黄酮甙 4.2 mg, 1 mL 注射液含 40 mg 山梨醇及 3.5% 体积比的乙醇,7-0 带线缝合针系上海医用缝合针厂生产。

1.2 TNF- α 和 IL-1 活性的测定方法 于物镜 40 倍视野下,每组随机选取 20 个视野,用 HPIAS-1000 型彩色图像分析系统测定细胞内棕黄色颗粒的平均吸光度(A)值,其结果以标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

1.3 模型制备 大鼠原位肝移植模型采用 Ka-

mada's 袖套法改良技术^[2],术前 12 h 禁食但不禁饮。供肝获取前,静脉注射含 100 U 肝素的生理盐水 1 mL,采用原位灌注切取术,经门静脉灌注 0 ~ 4 °C 生理盐水 20 mL(含肝素 100 U),灌注压力为 0.8 m H₂O 柱,肝脏中心温度为 0 °C。乙醚吸入麻醉,肝上下腔静脉用 7-0 带线缝合针连续缝合,肝下下腔静脉重建采用套管法(内经 0.3 cm 的聚乙烯管),门静脉重建采用套管法(内经 0.2 cm 的聚乙烯管),胆总管重建采用插管法(0.5 cm 长的硬膜外导管),肝动脉不予重建。供肝的热缺血时间 0 min,冷缺血时间 90 min,无肝期为 18 ~ 22(平均 19.67 \pm 1.63) min。EGb 组:于切取供肝前 1 h 经阴茎背静脉注射 EGb 40mg/kg + NS 共 2 mL。NS 组:于切取供肝前 1 h 经阴茎背静脉注射 NS 2 mL。SO 组:打开腹腔,充分游离肝脏、结扎左膈静脉、左肝至食管周围的静脉、右肾上腺静脉,然后关腹,SO 组不进行肝移植。

1.4 动物分组及取材 将成模大鼠随机分为:银杏叶提取物预处理组(简称 EGb 组),供体 18 只,受体 18 只;生理盐水对照组(NS 组)供体 18 只,受体 18 只;另设假手术组(SO 组),18 只。分别于大鼠肝移植供肝再灌注后或术后 2, 6, 24 h 处死动物,每个时间点每组 6 只。

1.5 血清 ALT, AST 含量,肝组织 TNF- α , IL-1 活性的检测 从下腔静脉采血 4 mL 测血清 ALT 与 AST 含量;肝组织用 10% 甲醛固定,石蜡包埋备用,采用放射免疫法测定肝组织 TNF- α , IL-1 活性,试剂盒购自武汉博士德生物有限公司。

1.6 肝组织病理学变化的观察 石蜡包埋的肝组织行 4 μ m 连续切片,HE 染色,普通光学显微镜下观察肝组织的情况。

1.7 统计学处理 实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS13.0 版统计软件进行统计,两样本均数间比较用 *t* 检验,多样本均数间比较用完全随机设计的单因素方差分析。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验水准。

2 结 果

2.1 EGb 对血清 ALT 和 AST 含量的影响 供肝再灌注后 2,6 及 24 h 各时点,血清 ALT 和 AST 水平,NS 组及 EGb 组均较 SO 组明显升高 ($P < 0.01$);EGb 组血清 ALT 水平在供肝再灌注后 2,6,24 h,AST 水平在供肝再灌注后 2 h 和 6 h 较 NS 组明显降低 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.2 EGb 对肝组织 TNF- α 和 IL-1 活性的影响

供肝再灌注后 2,6 及 24 h 各时点,肝组织 TNF- α 和 IL-1 活性水平,NS 组及 EGb 组均较 SO 组明显升高 ($P < 0.01$);但 NS 组升高最明显(表 2)。

2.3 肝脏病理学的变化 SO 组的肝组织结构未见明显异常改变;NS 组及 EGb 组的肝组织可见不同程度的肝窦充血和肝细胞肿胀及坏死;EGb 组的肝组织损害程度较 NS 组轻(图 1,2)。

表 1 大鼠移植肝再灌注后各时点血清 ALT 和 AST 水平(U/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT			AST		
		2 h	6 h	24 h	2 h	6 h	24 h
SO 组	6	55.33 \pm 8.04	60.50 \pm 8.28	59.33 \pm 7.26	147.83 \pm 21.71	148.50 \pm 16.34	143.67 \pm 17.58
NS 组	6	1116.17 \pm 196.69**	1488.50 \pm 197.67**	528.00 \pm 98.29**	1149.83 \pm 133.58**	1715.83 \pm 131.59**	633.33 \pm 126.68**
EGb 组	6	522.67 \pm 97.61##	1020.33 \pm 115.04##	174.50 \pm 60.70##	461.00 \pm 149.13##	1046.17 \pm 125.28##	181.67 \pm 38.65##

与 SO 组比较, ** $P < 0.01$;与 NS 组比较, ## $P < 0.01$

表 2 大鼠移植肝再灌注后各时点肝组织 TNF- α 和 IL-1 水平($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α			IL-1		
		2 h	6 h	24 h	2 h	6 h	24 h
SO 组	6	0.0470 \pm 0.0077	0.0510 \pm 0.0046	0.05001 \pm 0.0024	0.0242 \pm 0.0046	0.0244 \pm 0.0040	0.0264 \pm 0.0040
NS 组	6	0.1022 \pm 0.0047**	0.1292 \pm 0.0090**	0.1245 \pm 0.0068**	0.0778 \pm 0.0043**	0.0840 \pm 0.0148**	0.0819 \pm 0.0034**
EGb 组	6	0.0802 \pm 0.0051##	0.0920 \pm 0.0090##	0.0786 \pm 0.0056##	0.0559 \pm 0.0062##	0.0622 \pm 0.0052##	0.0560 \pm 0.0643##

与 SO 组比较, ** $P < 0.01$;与 NS 组比较, ## $P < 0.01$

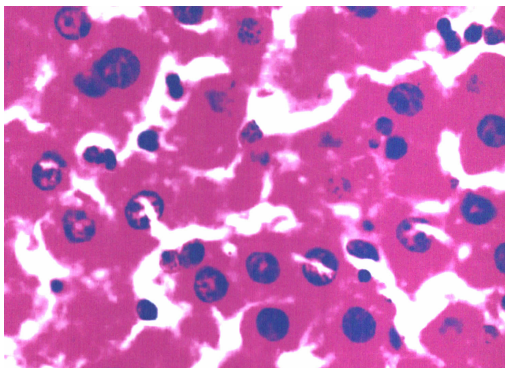


图 1 NS 组缺血再灌注损伤 6 h 肝组织超微结构变化(HE \times 400)

Fig. 1 Changes in hepatic tissues at 6 h after ischemia reperfusion injury in the NS group

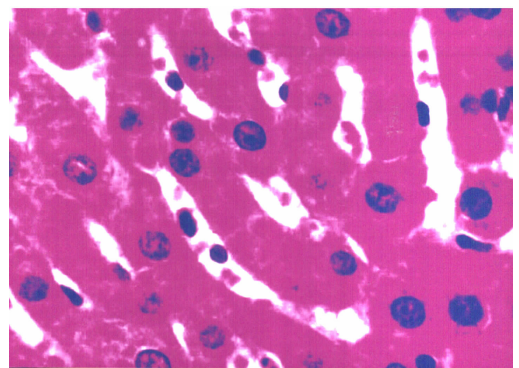


图 2 EGb 组缺血再灌注损伤 6 h 肝组织超微结构变化(HE \times 400)

Fig. 2 Changes in hepatic tissues at 6 h after ischemia reperfusion injury in the EGb group

3 讨 论

缺血再灌注损伤是肝脏外科棘手问题,诸如处理严重的肝外伤,施行广泛的肝切除术,原位肝脏移植以及自体肝切除移植和活体肝移植等。上述肝切除及供肝切取均有肝缺血再灌注过程,当肝脏复血供后不可避免地发生缺血再灌注损伤。缺血再灌注损伤更是肝移植早期原发性无功能的主要原因之一。缺血/再灌注损伤不可避免地存在于移植和常规肝手术过程中。缺血/再灌注损伤的确切机制目前尚未明了,其发生与钙超载、氧自由基及其引发的脂质过氧化反应等多种因素有关。多数学者认为,肝脏的缺血/再灌注损伤其核心仍然是炎症反应。主要由炎症细胞介导^[4-5],特别是 Kupffer 氏细胞(KC)。肝脏 KC 细胞是体内最大的巨噬细胞群,是肝脏的非实质细胞,当 KC 和内皮细胞遭受热缺血冷灌注保存及再灌注的损伤后,KC 群和内皮细胞释放出炎性介质及细胞因子^[4-5]。而这些介质和细胞因子均为再灌注损伤的始动因素,其中肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)是重要的始动细胞因子^[6],而 IL-1 亦是始动因子的重要成分之一。研究表明,缺血再灌注损伤存在两个重要阶段:缺血再灌注始动阶段(再灌注后 1~3 h),主要与产生氧自由基和激活 KC 的活化有关;缺血再灌注损伤晚期阶段(再灌注后 6~24 h),主要与中性粒细胞流入肝内有关。两个阶段中均有不同程度的肝细胞损伤,导致这种损伤的是以 TNF 为主,IL-1 为辅的协同作用^[7]。肝脏富含 TNF 受体,是 TNF 作用的主要靶器官,再灌注损伤可通过直接和间接机制诱导肝细胞自身一氧化氮的表达而使肝细胞坏死或凋亡,其产生的氧自由基和弹性酶也可以直接损伤肝细胞^[8]。除此之外,还通过以下机制导致损伤:(1)促进血管内皮对白细胞的黏附;TNF 能诱生或上调血管内皮细胞的两种黏附分子(细胞间黏附因子-1,内皮细胞白细胞黏附因子-1),并由此促进血管内皮对白细胞的黏附^[10]。(2)促进血管内皮细胞分泌血小板激活因子集落刺激因子等炎性介质激活白细胞^[10]。(3)促进中性粒细胞表达 C-反应蛋白(CR1)和 CR3,从而增强中性粒细胞对内皮细胞的黏附,也可以直接刺激中性粒细胞释放超氧阴离子、过氧化氢等。(4)TNF 可激活巨噬细胞释放白介素(IL)1,6,8 及前列腺素(PG)E₂等;IL-1 又能通过激活巨噬细胞分泌 IL-

1, IL-6, IL-8, PGE₂ 以及 TNF 等;而 TNF 又能以自分泌的形式激活单核巨噬细胞,并与其他细胞因子之间相互诱生和共同诱生,参与缺血再灌注损伤的各个环节^[6,11-12]。

预防和减轻肝脏缺血再灌注损伤是肝脏外科手术研究的重要课题,研究方法有药物预处理和缺血预处理(IPC)。IPC 是指组织在经过短暂缺血后,能够增加其对缺血的耐受现象。最近的许多实验研究描述了缺血预处理对肝脏损伤的保护效应,临床肝移植和肝切除实践中亦证实其对肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用^[13-14],但迄今 IPC 的机制尚未完全明了。多数作者研究认为 IPC 保护效应可能是机体内源性损伤机制,是机体对缺血损伤发生的主动性适应反应。药物预处理研究亦有相关报道^[15],所谓药物预处理即预先使用药物减少缺血再灌注损伤的程度。目前有许多药物或制剂可以减轻肝脏缺血再灌注损伤^[16-19]。本课题使用银杏叶提取物即是进行药物预处理。Minor 等^[20]研究发现,银杏内酯能改善肝缺血再灌注后的微循环紊乱,肝缺血再灌注损伤明显减轻。有研究人员采用银杏内酯 B 预防性给药,发现其能显著降低大鼠肝缺血再灌注损伤时血清 ALT, AST, AKP, r-GT 活性,提高 ATP 水平,肝细胞能量状态有所恢复,提示银杏内酯 B 对肝缺血再灌注损伤有保护作用^[21]。还有对豚鼠和 SD 大鼠非协调性异种肝移植缺血再灌注模型移植前给予金纳多(第 4 代银杏叶提取制剂),发现移植后供肝灌注充分,均匀,肝灌注障碍有所改善;超微结构观察显示肝细胞肿胀减轻,窦状隙血小板减少,内皮细胞较完整;表明金纳多对异种肝移植缺血再灌注损伤有保护作用^[22]。

本研究结果提示,缺血再灌注损伤时肝组织 TNF- α 和 IL-1 含量明显升高,伴 ALT 和 AST 显著增高,尤以 NS 再灌注组显著。使用银杏叶提取物后,实验大鼠血清 ALT 和 AST 含量均明显低于 NS 再灌注组($P < 0.05$);肝形态学异常变化明显轻于 NS 再灌注组,同时肝组织 TNF- α 和 IL-1 活性水平亦显著低于 NS 再灌注组($P < 0.01$)。表明银杏叶提取物对缺血再灌注损伤有积极的防治作用,其机制可能是通过抑制 KC 激活,减少 Kupffer 细胞释放炎性细胞因子,降低肝组织 TNF- α 及 IL-1 水平,从而减少氧自由基产生及减轻脂质过氧化反应,而减轻缺血再灌注损伤。缺血再灌注损伤另一重要始动因素是缺血再灌注后的肝细胞内

钙超载,本实验 Egb 的抗钙超载的缺血再灌注损伤预处理效应亦起着重要作用。其预处理作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Kamada N, Calne R Y. Orthotopic liver transplantation in the rat. techniques using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage [J]. *Transplantation*, 1979, 28: 47-50.
- [2] 宫念樵,叶启发,姜汉英,等. 药物预处理和缺血预处理对供肝保护作用的比较研究 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2000, 6(4): 282-285.
GONG Nian-qiao, YE Qi-fa, et al. Protection of grafts by medicine preconditioning and ischemia preconditioning in liver transplantation [J]. *Chin J Hepatobiliary Surg*, 2000, 6(4): 282-285.
- [3] 刘艳秋,游松,田代真一,等. 冬凌草甲素通过激活 ERK 途径诱导 U937 细胞凋亡 [J]. *中国中药杂志*, 2005, 30(23): 1856-1859.
LIU Yan-qiu, YOU Song, TASHIRO Shin-ichi, et al. Oridonin in induced U937 cell apoptosis through ERK pathway [J]. *China J Chin Materia Medica*, 2005, 30(23): 1856-1859.
- [4] Menger M D, Richter S, Yamauchi J, et al. Role of microcirculation in hepatic ischemial reperfusion injury [J]. *Hepato-gastroenterology*, 1999, 46 (suppl2): 1452-1457.
- [5] Jaeschke H, Farhood A, Bautista A P, et al. Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver [J]. *Hepatology*, 1993, 17(5): 915.
- [6] 夏仁品,武聚山,吴娟,等. 大鼠原位肝移植后肿瘤坏死因子- α 与供肝损伤的关系 [J]. *首都医科大学学报*, 2005, 26(4): 489-491.
XIA Ren-pin, WU Ju-shan, WU Juan, et al. Relationship between tumor necrosis factor and injuries of liver graft after orthotopic liver transplantation in rats [J]. *J Capital Univ Med Sci*, 2005, 26(4): 489-491.
- [7] Colletti L M, Kunkel S L, Walz A, et al. The role of cytokines in the local liver injury following hepatic ischemia reperfusion in the rat [J]. *Hepatology*, 1996, 23(3): 506-514.
- [8] Kurose L, Miura S, Higuchi H, et al. Increased nitric-oxide synthase activity as a cause of mitochondrial dysfunction in rat hepatocytes: roles for tumor necrosis factor alpha [J]. *Hepatology*, 1996, 24(5): 1185-1192.
- [9] Pohlman T H, Winn R K, Callahan K S, et al. A glycolipid precursor of bacterial lipopolysaccharide (LipidX) lacks activity against endothelial cells in vitro and is not toxic in vivo [J]. *J Surg Res*, 1998, 45(2): 228-237.
- [10] Bussolino F, Camussi G, Baglioni C, et al. Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 [J]. *J Biol Chem*, 1998, 263(24): 11856-11861.
- [11] Salyer J L, Bohnsack J F, Knape W A, et al. Mechanisms of tumor necrosis factor- α alteration of PMN adhesion and migration [J]. *Am J Pathol*, 1990, 136(4): 831-841.
- [12] Dinarello C A, Lkejima T, Warner S J, et al. Interleukin 1 induces interleukin 1 induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro [J]. *J Immunol*, 1987, (6): 1902-1910.
- [13] 肖建生,叶启发,蔡方刚. 缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注后即早基因 *c-fos*, *c-jun* 表达的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2005, 15(6): 843-846.
XIAO Jian-sheng, YE Qi-fa, CAI Fang-gang. Effects of ischemia preconditioning on *c-fos* and *c-jun* in live transplantation in rats [J]. *China J Modern Med*, 2005, 15(6): 843-846.
- [14] 张效杰,曹晖,焦哲,等. 缺血预处理对移植肝缺血再灌注损伤中细胞凋亡的影响 [J]. *中华肝脏病杂志*, 2000, 8(4): 221-223.
ZHANG Xiao-jie, CAO Hui, JIAO Zhe, et al. Effects of ischemia preconditioning on apoptosis of hepatocytes in live transplantation in rats [J]. *Chin J Hepatol*, 2000, 8(4): 221-223.
- [15] ZHANG Yi, YE Qi-fa, MING Ying-zi, et al. Impact of panax notoginseng saponins preconditioning on apoptosis and the expression of TNF- α , caspase-3 in rat live transplantation [J]. *China J Modern Med*, 2005, 15(2): 172-176.
- [16] Vegh A, Paratt J R. Prevention by dexamethasone of the marked antiarrhythmic effects of preconditioning induced 20 h after rapid cardiac pacing [J]. *Br J Pharmacol*, 1994, 113: 1081-1082.
- [17] Tanka M, Fujiwara H, Yamasaki K, et al. Ischemic preconditioning elevates cardiac stress protein but does not limit infarct size 24 or 48 h later in rabbits [J]. *Am J Physiol*, 1994, 267(4 Pt 2): H1476-1482.
- [18] Takada Y, Tanniguchi H, Fukunaga K, et al. Prolonged hepatic warm ischemia in non-heart-beating donors: protective effects of FK506 and platelet activating factor antagonist in porcine liver transplantation [J]. *Surg*, 1998, 123(6): 692.
- [19] Kim Y I, Hwang Y J, Song K E, et al. Hepatocyte protection by a protease inhibitor against ischemia-reperfusion injury of human liver [J]. *J Am Coll Surg*, 2002, 195(1): 41.
- [20] Minor T, Isselhard W, Yaguchi T. Involvement of platelet activating factor in microcirculatory disturbances after global hepatic ischemia [J]. *J Surg Res*, 1995, 58(5): 636-640.
- [21] 张中乐,刘金彪,赵建龙,等. 血小板活化因子拮抗剂 BN 52021 对缺血再灌注损伤大鼠肝脏的保护作用 [J]. *河南医学研究*, 1998, 7(1): 10-12.
ZHANG Zhong-le, LIU Jin-biao, ZHAO Jian-long, et al. Protection of BN52021 in live transplantation in rats [J]. *Henan Med Res*, 2005, 15(6): 843-846.
- [22] 张建华,芮晓晖,蔡端,等. 金纳多对非协调性异种大鼠肝移植缺血再灌注损伤的防治作用 [J]. *中华医学杂志*, 2000, 80(9): 706-708.
ZHANG Jian-hua, RUI Xiao-hui, CAI Duan, et al. Protective effect of ginkgolide on rat liver microcirculation disturbance following liver xenotransplantation [J]. *J Chin Med*, 2000, 80(9): 706-708.