

人工远端肢体缺血再灌注对 APAP 诱导小鼠 肝损伤的保护作用研究

郑伟, 宋晓雪, 严翔, 张智勇, 常虎林 (陕西省人民医院肝胆外科, 西安 710068)

摘要: 目的 研究人工远端肢体缺血再灌注预处理 (R-IPC) 和缺血再灌注后处理 (R-IPOST) 对对乙酰氨基酚 (APAP) 诱导小鼠肝损伤的保护作用。方法 按随机数字表法将实验小鼠分为 5 组: 正常对照组 (不做任何处理)、假手术组 (缺血再灌注处理前后腹腔注射 1ml 生理盐水)、APAP 组 (腹腔注射 1ml APAP 溶液)、R-IPC+APAP 组 (缺血再灌注预处理后腹腔注射 1ml APAP 溶液)、R-IPOST+APAP 组 (腹腔注射 1ml APAP 溶液后实施缺血再灌注后处理)。观察各组肝脏病理形态变化; 检测各组血清丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 活性、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平、白细胞介素-6 (IL-6) 水平; 检测各组肝组织丙二醛 (MDA) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽酶 (GSH) 的水平和比较各指标组间差异。结果 光镜下 R-IPC+APAP 组和 R-IPOST+APAP 组肝小叶结构破坏程度及炎性细胞浸润程度较 APAP 组均明显减轻。R-IPC+APAP 组血清 ALT, AST, TNF- α , IL-6 和肝匀浆 MDA 含量均明显低于 APAP 组 [(3 742 \pm 519.7 U/L, 3 471 \pm 631.4U/L, 264.8 \pm 70.4pg/ml, 738.7 \pm 71.0 pg/ml, 8.9 \pm 1.2nmol/mg.prot) vs (5 564 \pm 621.7U/L, 4 647 \pm 813.9U/L, 351.7 \pm 52.3pg/ml, 929.7 \pm 140.6pg/ml, 13.1 \pm 1.7nmol/mg.prot)], 差异均有统计学意义 ($t=3.400\sim 7.032$, 均 $P<0.05$); R-IPC+APAP 组肝匀浆 SOD 活性明显高于 APAP 组 (11.0 \pm 1.9U/mg.prot vs 8.6 \pm 1.1U/mg.prot), 差异有统计学意义 ($t=3.043$, $P<0.05$); R-IPOST+APAP 组血清 ALT, AST, TNF- α , IL-6 和肝匀浆 MDA 含量均明显低于 APAP 组 [(3 410 \pm 588.6 U/L, 3 546 \pm 499.5U/L, 256.6 \pm 48.1pg/ml, 775.4 \pm 98.4pg/ml, 9.3 \pm 1.9nmol/mg.prot) vs (5 564 \pm 621.7U/L, 4 647 \pm 813.9U/L, 351.7 \pm 52.3pg/ml, 929.7 \pm 140.6pg/ml, 13.1 \pm 1.7nmol/mg.prot)], 差异均有统计学意义 ($t=2.196\sim 4.981$, 均 $P<0.05$); R-IPOST+APAP 组肝匀浆 GSH 活性明显高于 APAP 组 (10.3 \pm 1.2U/mg.prot vs 7.9 \pm 0.6U/mg.prot), 差异有统计学意义 ($t=3.702$, $P<0.05$)。结论 R-IPC 和 R-IPOST 能降低 APAP 诱导的药物的肝损伤氧化应激和炎症反应程度, 对肝功能具有保护作用。

关键词: 远端肢体缺血再灌注预处理; 远端肢体缺血再灌注后处理; 对乙酰氨基酚; 肝损伤; 小鼠

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2021) 04-060-05

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.04.013

Effect of Artificial Remote Ischemia-Reperfusion Conditioning on Acetaminophen-Induced Acute Liver Injury in Mice and Its Possible Mechanism

ZHENG Wei, SONG Xiao-xue, YAN Xiang, ZHANG Zhi-yong, CHANG Hu-lin

(Department of Hepatobiliary Surgery, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, China)

Abstract: Objective To study the effect of artificial remote ischemia-reperfusion preconditioning (R-IPC) and remote ischemia-reperfusion postconditioning (R-IPOST) on acetaminophen (APAP)-induced liver injury. **Methods** Five groups in this study: control group (mice remained untreated), sham operation group (mice subjected to remote ischemic conditioning manipulation and followed by an intraperitoneal injection of saline), APAP group (mice received intraperitoneal injection of 1 ml APAP), R-IPC+APAP group (mice subjected to R-IPC followed 5 min later by an injection of APAP), R-IPOST+APAP group (mice subjected to an injection of APAP followed 5 min later by R-IPOST). The pathological changes of liver were observed, Serum aminotransferase, alanine aminotransferase (ALT), Serum transaminase (AST) were detected. Malondialdehyde (MDA) content, superoxide dismutase (SOD) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) levels, glutathione s-transferase (GSH), levels in liver tissue of each group were detected. **Results** The histopathological abnormalities were attenuated in R-IPC+APAP and R-IPOST+APAP group. The level of ALT, AST, TNF- α , IL-6 and MDA in R-IPC+APAP group were significantly lower than in APAP group [(3 742 \pm 519.7 U/L, 3 471 \pm 631.4U/L, 264.8 \pm 70.4pg/ml, 738.7 \pm 71.0pg/ml, 8.9 \pm 1.2nmol/mg.prot) vs (5 564 \pm 621.7U/L, 4 647 \pm 813.9U/L, 351.7 \pm 52.3pg/ml, 929.7 \pm 140.6pg/ml, 13.1 \pm 1.7nmol/mg.prot)], the difference were statistically significant ($t=3.400\sim 7.032$, all $P<0.05$). The SOD level was increased in R-IPC+APAP group

基金项目: 西安市科技计划医学项目 (20YXYJ0010)。

作者简介: 郑伟 (1980-) 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 药物性肝损伤的诊治, E-mail: zhengwei_xa@163.com。

通讯作者: 常虎林, 男, 主治医师, 研究方向: 慢性肝病的诊治, E-mail: changhulin_spph@126.com。

than in APAP group (11.0 ± 1.9U/mg.prot vs 8.6 ± 1.1U/mg.prot), the difference was statistically significant($t = 3.043$, $P < 0.05$). The level of ALT, AST, TNF- α , IL-6 and MDA in R-IPOST+APAP group were significantly lower than in APAP group[(3 410 ± 588.6 U/L, 3 546 ± 499.5U/L, 256.6 ± 48.1pg/ml, 775.4 ± 98.4pg/ml, 9.3 ± 1.9nmol/mg.prot) vs (5564 ± 621.7U/L, 4647 ± 813.9U/L, 351.7 ± 52.3pg/ml, 929.7 ± 140.6pg/ml, 13.1 ± 1.7nmol/mg.prot)], the difference were statistically significant($t = 2.196-4.981$, all $P < 0.05$). The GSH level was higher in R-IPOST+APAP group than in APAP group(10.3 ± 1.2U/mg.prot vs 7.9 ± 0.6U/mg.prot), the difference were statistically significant($t = 3.702$, $P < 0.05$). **Conclusion** R-IPC and R-IPOST could reduce APAP-induced hepatic enzymatic activity and reduce inflammatory responses, which have protective effects on drug-induced liver injury.

Keywords: R-IPC; R-IPOST; APAP; liver injury; mice

对乙酰氨基酚 (acetaminophen, APAP) 诱导的急性肝损伤是药物诱导的肝损伤及肝衰竭的主要原因^[1]。目前对早期药物性肝损伤的治疗主要是服用解毒药 N-乙酰半胱氨酸 (NAC), 病人如果不及时接受 NAC 治疗则会导致严重的肝损伤, 从而进一步发展成肝衰竭远端肢体缺血再灌注处理是近年来研究发现的能有效抵抗缺血再灌注损伤从而对心脏和肝脏起到保护作用的一种方法^[3-4]。根据其在靶器官缺血前还是缺血后处理分为远端肢体缺血再灌注预处理 (R-IPC) 和远端肢体缺血再灌注后处理 (R-IPOST)。基于 R-IPC 和 R-IPOST 对远端器官缺血再灌注损伤具有一定的保护作用^[5], 本研究旨在探究 R-IPC 和 R-IPOST 在 APAP 诱导的药物性肝损伤中的作用研究, 拟为急性药物性肝损伤的治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 4~5 周龄、体重约 20~26 g 的雄性 C57BL/6 小鼠购买自陕西省人民医院实验动物中心 [许可证号: SYXK(陕)2016-006], 并在该中心饲养。小鼠的饲养及监管严格按照陕西省人民医院伦理委员会规则执行。

1.2 仪器及试剂 TNF- α 和 IL-6 检测试剂盒由深圳达科为生物技术有限公司提供。ALT 试剂盒、AST 试剂盒、GSH 试剂盒、SOD 试剂盒和 MDA 试剂盒均由南京建成生物工程研究所提供。RIPA 裂解液由上海碧云天生物技术有限公司提供。APAP 溶液的配制 (将 0.6g APAP 粉剂溶于 100ml 生理盐水中, 在 40℃ 水浴锅中晃动充分溶解、混匀, 按 300mg/kg 即 50ml/kg 的剂量给药准备, 每只小鼠约 20g 重, 平均给药剂量约 1ml)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组及模型制作: 实验分组: ①正常对照组: 小鼠不做任何处理; ②假手术组: 小鼠远端缺血预处理后腹腔注射 1ml 生理盐水; ③ APAP 组: 小鼠腹腔注射 1ml APAP 的生理盐水溶液; ④ R-IPC+APAP 组: 小鼠远端缺血处理后 5min 后腹腔注射 1ml APAP 的生理盐水溶液; ⑤ R-IPOST+APAP 组: 小鼠腹腔注射 1ml APAP 的

生理盐水溶液后, 进行远端缺血处理。各组小鼠均在 APAP 暴露 16 h 后处死, 及时采集血液样本和肝组织样本。

远端肢体缺血再灌注处理: 首先麻醉小鼠: 将 25 mg 的氯胺酮和 2.5 ml 甲苯噻嗪混合比例配制好麻药, 给每只小鼠注射麻药, 麻药的给药剂量为 3~5 ml/kg; 在双侧后肢股三角处剪毛, 沿血管走行方向逐层切开皮肤、皮下组织, 分离缝匠肌后部, 游离出双侧股动脉待用。R-IPC 组用无损伤小血管夹夹闭双侧股动脉 5 min 造成肢体缺血后, 再松开血管夹, 让血液再灌注 5min, 连续操作 4 个循环, 再腹腔注射 1ml 的 APAP 盐溶液 (300 mg/kg 溶解于 1ml 生理盐水中)。R-IPOST 是先腹腔注射 1ml 的 APAP 盐溶液后, 再进行 4 个周期的肢体远端缺血再灌注。可通过足部的颜色及双下肢股动脉搏动情况来显示血液流动情况进而评价远端局部缺血的效果。

1.3.2 血清 ALT, AST, TNF- α , IL-6 水平的测定: 根据检测试剂盒说明书指示, 测定血清 ALT, AST, TNF- α , IL-6 水平。

1.3.3 肝组织病理学检查: 取出分离后的肝脏组织利用甲醛溶液固定, 常规苏木精-伊红 (H & E) 染色, 观察肝组织病理学改变。

1.3.4 氧化应激程度的测定: 根据检测试剂盒说明书指示, 测定肝组织 MDA, GSH, SOD 含量。

1.4 统计学分析 GraphPad Prism6.0 对数据进行统计学分析, 正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 形式表示。多组的比较采用单因素方差分析, 进一步组间比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 R-IPC 和 R-IPOST 对 APAP 肝损伤小鼠肝组织病理变化的影响 见图 1。与对照组和假手术组比较, APAP 组炎性细胞浸润, 肝窦拥挤出血, 肝小叶中心广泛坏死, 肝小叶结构破坏明显; 与 APAP 组比较, 可见 R-IPC+APAP 组和 R-IPOST+APAP 组小鼠肝脏肝细胞坏死减少, 肝窦无明显拥挤现象, 肝小叶中心未出现广泛坏死。

2.2 R-IPC 和 R-IPOST 处理对 APAP 肝损伤小鼠肝功能、炎症水平和氧化应激程度的影响 见表1。与对照组和假手术组 ALT, AST 水平相比, APAP 组小鼠血清中 ALT, AST 水平明显升高, 差异均有统计学意义 ($t=12.520\sim 19.730$, 均 $P<0.05$), 提示小鼠药物性肝损伤造模成功。R-IPC+APAP 组血清

ALT, AST 水平明显低于 APAP 组, 差异有统计学意义 ($t = 7.032, 3.432$, 均 $P<0.05$)。R-IPOST+APAP 组血清 ALT, AST 明显低于 APAP 组, 差异均有统计学意义 ($t = 4.981, 3.470$, 均 $P<0.05$)。ALT, AST 在 R-IPC+APAP 组与 R-IPOST+APAP 组间差异无统计学意义 ($t = 0.860, 0.231, P > 0.05$)。

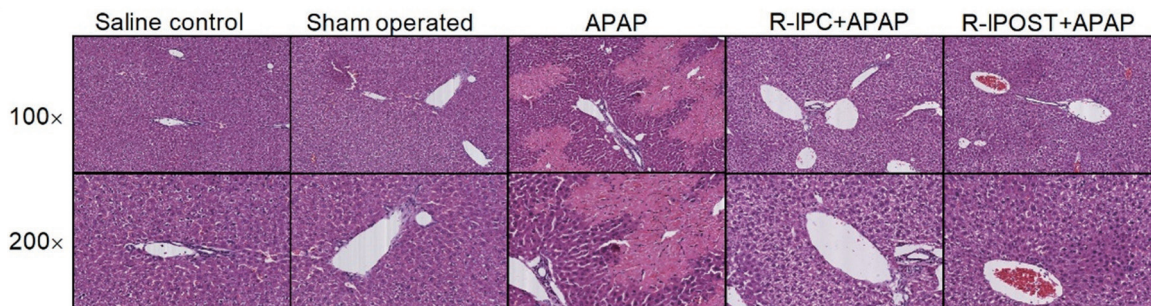


图1 R-IPC 和 R-IPOST 处理对 APAP 诱导的肝组织的病理学变化的影响 (HE 染色)

与对照组和假手术组比较, APAP 组小鼠血清 TNF- α , IL-6 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($t = 12.150\sim 14.310$, 均 $P<0.05$)。R-IPC+APAP 组血清 TNF- α , IL-6 水平明显低于 APAP 组, 差异均有统计学意义 ($t = 3.400, 3.602$, 均 $P<0.05$)。R-IPOST+APAP 组血清 TNF- α , IL-6 水平明显低于 APAP 组, 差异均有统计学意义 ($t = 2.924, 2.196$, 均 $P<0.05$)。TNF- α , IL-6 在 R-IPC+APAP 组与 R-IPOST+APAP 组间差异无统计学意义 ($t = 0.162$,

$0.660, P > 0.05$)。

与对照组和假手术组比较, APAP 组小鼠 MDA 含量明显增多, 差异有统计学意义 ($t = 16.090, 14.150, P<0.05$)。R-IPC+APAP 组和 R-IPOST+APAP 组肝组织 MDA 含量明显低于 APAP 组, 差异均有统计学意义 ($t = 3.483, 4.581$, 均 $P<0.05$)。MDA 在 R-IPC+APAP 组与 R-IPOST+APAP 组间差异无统计学意义 ($t = 0.347, P > 0.05$)。

表1 远端缺血再灌注对 APAP 诱导急性药物性肝损伤小鼠各指标的影响 ($\bar{x} \pm s$)

项目	正常对照组	假手术组	APAP 组	R-IPC+APAP 组	R-IPOST+APAP 组
ALT(U/L)	38.8 \pm 4.4	38.6 \pm 3.8	5 564 \pm 621.7	3 742 \pm 519.7	3 410 \pm 588.6
AST(U/L)	28.6 \pm 3.5	27.8 \pm 4.2	4 647 \pm 813.9	3 471 \pm 631.4	3 546 \pm 499.5
TNF- α (pg/ml)	45.0 \pm 5.2	47.2 \pm 4.2	351.7 \pm 52.3	264.8 \pm 70.4	256.6 \pm 48.1
IL-6(pg/ml)	72.0 \pm 6.9	76.0 \pm 7.1	929.7 \pm 140.6	738.7 \pm 71.0	775.4 \pm 98.4
MDA (nmol/mg.prot)	2.6 \pm 0.8	2.8 \pm 1.0	13.1 \pm 1.7	8.9 \pm 1.2	9.3 \pm 1.9
SOD(U/mg.prot)	18.1 \pm 1.5	18.4 \pm 1.2	8.6 \pm 1.1	11.0 \pm 1.9	10.3 \pm 1.6
GSH(U/mg.prot)	14.2 \pm 1.0	14.6 \pm 2.5	7.9 \pm 0.6	8.7 \pm 1.2	10.3 \pm 1.2

与对照组和假手术组比较, APAP 组小鼠 SOD 及 GSH 活性均明显下降, 差异均有统计学意义 ($t = 5.748\sim 12.460$, 均 $P<0.05$)。R-IPC+APAP 组 SOD 明显高于 APAP 组, 差异有统计学意义 ($t = 3.043, P<0.05$); GSH 活性高于 APAP 组, 但差异无统计学意义 ($t = 1.622, P=0.18$)。R-IPOST+APAP 组 SOD 高于 APAP 组, 但差异无统计学意义 ($t = 1.940, P=0.12$); GSH 活性明显高于 APAP 组, 差异有统计学意义 ($t = 3.702, P<0.05$)。SOD, GSH 在 R-IPC+APAP 组与 R-IPOST+APAP 组间差异无统计学意义 ($t = 0.488, 1.685$, 均 $P > 0.05$)。

3 讨论

肝脏是人体主要的代谢器官, 其主要参与体内糖原储存, 分解血液中的红细胞、蛋白合成以及解毒过程等功能^[6-7]。由于其多方面生理功能导致其是许多药物毒性作用的靶器官^[8]。APAP 在治疗剂量时是一种解热镇痛消炎药且具有安全性。但是过量时会使肝小叶中心的肝细胞发生坏死, 严重时可致命。

远端局部缺血因其使用便捷成为临床中最具潜力的一种治疗手段^[9]。组织的短暂缺血比如远端肢体缺血再灌注预处理和后处理, 能对靶器官产生保护作用, 使其免受缺血或其他损伤^[10]。而远端肢体

缺血再灌注预处理和后处理仅在干预时机上有差别,本次研究发现两种处理方式组间结果差异无统计学意义,都能降低 APAP 诱导的肝脏损伤程度,减少炎症反应和氧化应激程度,起到相近的保肝作用。

炎症反应在 APAP 诱导的肝毒性的机制中发挥着重要作用。既往研究发现 APAP 处理能刺激机体分泌炎症因子,比如 TNF- α , IL-1 β 和 IL-6 等,表明这些细胞因子在 APAP 诱导的毒性作用中发挥潜在作用^[11]。BLAZKA 等^[12]人证明小鼠经过 APAP 处理后 TNF- α 的血清水平明显增加,使用 TNF- α 抗体能够抵抗 APAP 诱导的毒性作用。以往的研究表明远端缺血后处理对肝缺血/再灌注损伤或脂多糖诱导的肝损伤产生的炎症反应具有降低的效应^[3-4]。本次研究结果表明 R-IPC 和 R-IPOST 能降低 APAP 诱导肝损伤 TNF- α 和 IL-6 水平,具有抗炎作用。

氧化应激是 APAP 诱导肝损伤的另一个重要原因。MDA 是脂质过氧化的代谢产物,其含量反映了机体的脂质过氧化程度^[13]。而 GSH, SOD 则是体内最重要的抗氧化物质,也是中和 APAP 所致毒性的关键^[14-15]。近年来,COSTA 等^[16]人发现远端缺血预处理能抵抗肝脏和肾脏细胞的氧化性损伤。XIN 等^[17]人也发现远端缺血后处理能降低非酒精性脂肪肝大鼠 MDA 和 SOD 的水平。本研究显示 R-IPC 和 R-IPOST 同样能够抑制 APAP 诱导的氧化应激、改善氧化损伤,改善 GSH 和 SOD 水平,降低 MDA 产生。

目前有报道称 R-IPC 能减轻非酒精性脂肪肝大鼠遭受缺血再灌注损伤,其机制可能与诱导合成热休克蛋白 70 (HSP70) 的表达有关^[18]。SHIN 等^[19]人发现 NF- κ B 是远端局部缺血条件作用的一个靶点,NF- κ B 的激活和核内转录可以被 HO-1 抑制,从而发挥对脂肪肝细胞的保护作用。尽管如此,对于远端缺血处理降低肝脏再灌注或炎症损伤的机制仍未完全明确。

综上所述,R-IPC 和 R-IPOST 能降低 APAP 诱导肝损伤的炎症反应及氧化应激程度,对药物性肝损伤具有保护作用。本研究仅对远端肢体缺血再灌注处理对 APAP 诱导肝损伤的保护作用进行初步观察,而涉及其中的分子机制仍有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] XIE Wenyan, JIANG Zhihui, WANG Jian, et al. Protective effect of hyperoside against acetaminophen (APAP) induced liver injury through enhancement of APAP clearance[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2016, 246: 11-19.
- [2] ALVAREZ-SOLA G, URIARTE I, LA TA-SA M U, et al. Engineered fibroblast growth factor 19 protects from

- acetaminophen-induced liver injury and stimulates aged liver regeneration in mice[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(10): e3083.
- [3] JUNG K W, KANG J, KWON H M, et al. Effect of remote ischemic preconditioning conducted in living liver donors on postoperative liver function in donors and recipients following liver transplantation: a randomized clinical trial[J]. *Annals of Surgery*, 2020, 271(4): 646-653.
- [4] REN Changhong, LI Sijie, WANG B, et al. Limb remote ischemic conditioning increases Notch signaling activity and promotes arteriogenesis in the ischemic rat brain[J]. *Behavioural Brain Research*, 2018, 340: 87-93.
- [5] CHEN Gangling, THAKKAR M, ROBINSON C, et al. Limb remote ischemic conditioning: mechanisms, anesthetics, and the potential for expanding therapeutic options[J]. *Frontiers in Neurology*, 2018, 9: 40.
- [6] SERNA-MÁRQUEZ N, RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ A, AYALA-REYES M, et al. Fibrillar collagen type I participates in the survival and aggregation of primary hepatocytes cultured on Soft hydrogels[J]. *Biomimetics (Basel, Switzerland)*, 2020, 5(2): 30.
- [7] KANDILIS A N, PAPADOPOULOU I P, KOSKINAS J, et al. Liver innervation and hepatic function: new insights[J]. *The Journal of Surgical Research*, 2015, 194(2): 511-519.
- [8] LIU Houfu, SAHI J. Role of hepatic drug transporters in drug development[J]. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2016, 56 (Suppl 7): S11-S22.
- [9] LEE W M. Acetaminophen (APAP) hepatotoxicity-Isn't it time for APAP to go away?[J]. *Journal of Hepatology*, 2017, 67(6): 1324-1331.
- [10] YANG Shuang, ABBOTT G W, GAO Weidong, et al. Involvement of glycogen synthase kinase-3 β in liver ischemic conditioning induced cardioprotection against myocardial ischemia and reperfusion injury in rats[J]. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md: 1985)*, 2017, 122(5): 1095-1105.
- [11] BIAN Xingbo, WANG Shijie, LIU Jinping, et al. Hepatoprotective effect of chiisanoside against acetaminophen-induced acute liver injury in mice[J]. *Natural Product Research*, 2019, 33(18): 2704-2707.
- [12] BLAZKA M E, WILMER J L, HOLLADAY S D, et al. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1995, 133(1): 43-52.
- [13] 伏彩霞, 马宝山, 鲁晓波. 缺血性卒中患者血清 SOD, NO, MDA 水平动态变化与焦虑症发生的相关性[J]. *现代检验医学杂志*, 2018, 33(6): 46-49.
- [14] FU Caixia, MA Baoshan, LU Xiaobo. Correlation of dynamic changes of serum SOD, NO and MDA in patients with ischemic stroke and anxiety [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2018, 33(6): 46-49.
- [15] CHEN L C, HU L H, YIN M C. Alleviative effects from boswellic acid on acetaminophen-induced hepatic injury[J]. *BioMedicine*, 2016, 6(2): 9.