

## 间苯三酚对肝缺血再灌注损伤的作用及机制研究

吴建波,杨建纲,殷莉波,倪沂江,周 照,程 宇,李 圆

(南京医科大学附属常州第二人民医院普外科,江苏 常州 213000)

**[摘要]** 目的:研究间苯三酚(phloroglucinol, Phlo)在肝脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)中的作用。方法:将40只C57BL/6小鼠随机分为假手术(sham)组、IR组、IR+Phlo组、IR+磷酸缓冲盐(phosphate buffer saline, PBS)组4组,每组10只。Sham组仅分离暴露门静脉,不夹闭。另3组建立小鼠部分肝缺血再灌注模型(70%)。利用小鼠正常巨噬细胞系RAW264.7,进行体外脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)刺激,建立体外模型。通过血清丙氨酸转氨酶(alanine transaminase, ALT)、天门冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase, AST)的水平和组织病理学评价肝脏损伤,利用实时荧光定量PCR检测肝内IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的mRNA水平变化,细胞培养上清液IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的水平由ELISA检测,RAW264.7细胞内p-p65蛋白表达情况经Western blot进行测定。结果:IR+Phlo组小鼠肝损伤情况明显低于IR组与IR+PBS组( $P < 0.01$ ),肝内IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 的mRNA水平均降低( $P < 0.05$ )。体外试验证实间苯三酚与RAW264.7共培养时,可减少其分泌的IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$  ( $P < 0.05$ ),细胞中NF- $\kappa$ B的活性也明显下降。结论:间苯三酚在小鼠肝脏缺血再灌注损伤中具有保护作用,该作用部分是通过间苯三酚抑制巨噬细胞内NF- $\kappa$ B的活性实现。

**[关键词]** 肝缺血再灌注损伤;间苯三酚;RAW264.7;NF- $\kappa$ B

**[中图分类号]** R757.3

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)02-196-05

doi:10.7655/NYDXBNS20150212

## Role and mechanism of phloroglucinol in hepatic ischemia reperfusion injury

Wu Jianbo, Yang Jianguang, Yin Libo, Ni Yijiang, Zhou Zhao, Chen Yu, Li Yuan\*

(Department of General Surgery, Changzhou Second People's Hospital Affiliated to NJMU, Changzhou 213000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role and mechanism of phloroglucinol in hepatic ischemia reperfusion injury. **Methods:** Forty C57BL/6 mice were randomly divided into four groups on average, named as sham group, IR group, IR+Phlo group, and IR+PBS group. The sham group only separated portal vein without clipping, while partial liver ischemia reperfusion model(70%) was established in other three groups. RAW264.7, a mouse normal macrophage cell line, was incubated with or without phloroglucinol followed by stimulation of LPS in vitro. We evaluated the degree of liver injury by examining the levels of serum ALT and AST and histopathology graded by Suzuki's score. Expressions of liver IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA were detected in real-time qPCR. ELISA was used to measure the levels of supernatant IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  of RAW264.7. The expression of phospho-p65 in RAW264.7 was assessed by western blot. **Results:** The degree of liver injury and the levels of liver IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA in IR+Phlo group decreased compared to those in IR and IR+PBS groups ( $P < 0.05$ ). Preincubation with phloroglucinol could significantly inhibit the ability of secretion of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by RAW264.7 ( $P < 0.05$ ), which involved the suppression of the activation of NF- $\kappa$ B. **Conclusion:** Phloroglucinol plays a protective role during hepatic ischemia reperfusion injury, which is partially related to the suppression of the activation of NF- $\kappa$ B in macrophage.

**[Key words]** hepatic ischemia reperfusion injury; phloroglucinol; RAW264.7; NF- $\kappa$ B

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02): 196-200]

肝缺血再灌注损伤是部分肝切除、肝移植或缺血性休克等常见的并发症<sup>[1]</sup>。该过程涉及到Kupffer细胞、中性粒细胞激活,活性氧释放,炎症介质产生等众多因素<sup>[2-5]</sup>。

间苯三酚(phloroglucinol, Phlo),又名1,3,5-三羟基苯,属于多酚类,主要存在于褐藻中。间苯三酚

作为一种亲肌性非阿托品非罂粟碱类纯平滑肌解痉药已应用于临床。现有的研究证实,间苯三酚具有抗炎、抗氧化、抗凋亡、抗血小板聚集等作用<sup>[6-9]</sup>。因此,本研究推测间苯三酚可能在肝脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)中具有保护作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

C57BL/6 小鼠,6-8 周龄,体重 20~25 g,雌雄不限,由南京医科大学实验动物中心提供。RAW264.7 细胞系由卫生部活体肝移植重点实验室提供。间苯三酚(Sigma 公司,美国)。BCA 蛋白浓度监测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),DMEM 培养液(Gibco 公司,美国),胎牛血清(杭州四季青生物公司),HRP 标记山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),反转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本),FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)试剂盒(罗氏公司,瑞士),IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒(R&D 公司,美国),兔抗小鼠 p-NF- $\kappa$ B p65、兔抗小鼠 NF- $\kappa$ B p65(CST 公司,美国)。全自动生化分析仪 ADVIA 2400(Bayer 公司,德国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠肝缺血再灌注损伤模型的制作

小鼠禁食 12 h,不禁水。5%水合氯醛麻醉成功后,取仰卧位,酒精消毒,正中中线剖腹,用无损伤血管夹夹闭左叶及中叶下方的门静脉,可见血管夹上方肝叶色泽转为灰白,造成约 70%肝叶缺血。60 min 后,松开血管夹,肝脏颜色逐渐转红,提示血流恢复,关腹。

#### 1.2.2 动物分组

按随机数字表法分 4 组:假手术(sham)组,缺血再灌注(ischemia reperfusion,IR)组,IR+Phlo 组和 IR+PBS 组。每组 10 只。sham 组仅暴露门静脉,不予夹闭。其余 3 组均建立缺血再灌注模型。IR+Phlo 组:于麻醉前 30 min 经口灌注溶解于 0.3 ml 磷酸盐缓冲液(Phosphate Buffered Saline,PBS)的间苯三酚,剂量为 30 mg/kg。IR+PBS 组:于麻醉前 30 min 经口灌注同等量的 PBS。4 组小鼠在复流后 6 h 处死,取全血后,切除缺血肝叶备用。一部分放入无菌冻存管冻存于液氮中,以备提取 RNA;另一部分置于 10%中性福尔马林溶液中,经石蜡包埋后切片行组织病理学观察。

#### 1.2.3 血丙氨酸转氨酶(alanine transaminase,ALT)、天门冬氨酸转氨酶(aspartate transaminase,AST)检测

取小鼠全血后,室温静置 30 min,以 3 000 r/min 离心 15 min,取上清,采用全自动生化分析仪检测血清 ALT、AST。

#### 1.2.4 HE 染色及肝损伤评估

取各肝叶组织标本制成 4  $\mu$ m 厚的石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精至水,苏木素染色 5 min,流

水冲洗 10 min,1%盐酸脱色,流水冲洗 10 min,伊红染色,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。在普通光学显微镜下观察各组小鼠肝叶组织病理变化。肝损伤的程度以 Suzuki 标准分级<sup>[10]</sup>:根据肝窦堵塞、肝细胞坏死、肿胀、变性等情况分 0~4 级。无坏死、堵塞或小叶中央肿胀为 0 级;>60%肝叶坏死、严重的堵塞和肿胀变性为 4 级。

#### 1.2.5 细胞培养与体外诱导

利用 RAW264.7 细胞系,在 37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>,95%空气的培养箱中培养,培养液为 DMEM,其中包含 10%胎牛血清,1%青霉素和链霉素双抗。细胞接种在 6 孔板中,每孔 2 ml 密度 5  $\times$  10<sup>5</sup> 个/ml,过夜贴壁。

体外试验分 4 组:sham 组,LPS 组,LPS+Phlo 组和 LPS+PBS 组。sham 组无 LPS 刺激,后 3 组均以 LPS 1  $\mu$ g/ml 刺激 24 h。其中 LPS+Phlo 组中,间苯三酚以 PBS 溶解,浓度 100  $\mu$ mol/L,于 LPS 刺激前 1 h 加入,与细胞共培养;LPS+PBS 组中,在 LPS 刺激前 1 h 加入 PBS,体积与加入 LPS+Phlo 组者相等。

#### 1.2.6 ELISA 检测

收集细胞培养上清液,按照 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的 ELISA 试剂盒说明书进行检测。即先分别加入标准液、对照及样本孵育,后再加联接辣根过氧化物酶标记抗体继续孵育,最后加入底物,显色,检测吸光度。根据标准液吸光度值与浓度的关系,计算得到样本浓度。

#### 1.2.7 实时荧光定量 PCR(real-time qPCR)

采用 TRIzol 抽提法提取总 RNA,按照反转录试剂盒(TaKaRa 公司)说明书合成 cDNA,反应体系为 20  $\mu$ l。5  $\times$  PCR 缓冲液 4  $\mu$ l,oligo dT 以及随机六聚体引物各 1  $\mu$ l,总 RNA 为 2  $\mu$ l,逆转录酶混合物 1  $\mu$ l,加双蒸水至 20  $\mu$ l。引物序列:IL-1 $\beta$ :5'-GAA-ATGCCACCTTTTGACAGTG-3'/5'-TGGATGCTCT-CATCAGGACAG-3',大小 116 bp;TNF- $\alpha$ :5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3'/5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3',大小 61 bp; $\beta$ -actin:5'-GGCTGTA-TTCCCCTCCATCG-3'/5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3',大小 154 bp。real-time qPCR 使用罗氏公司的 FastStart Universal SYBR Green Master(ROX)试剂盒,反应体系为 20  $\mu$ l,其中 2 $\times$ 赛柏格林(Sybergreen)预混液 10  $\mu$ l,互补链脱氧核糖核酸(cDNA) 1.0  $\mu$ l,上下游引物各 0.5  $\mu$ l,加水至 20  $\mu$ l。使用 ABI 公司 StepOne Real-time PCR 仪,反应条件为:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 15 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 15 S,共 40 个循环。扩增反应完成后又进行了溶解曲线的制作,确保扩增的特异性。

1.2.8 Western blot 检测

用 RIPA 裂解细胞,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白含量,加入蛋白上样缓冲液后,100℃干煮 5~10 min,10%SDS-PAGE 电泳分离蛋白。采用湿转法转至 PVDF 膜,5%BSA 室温封闭 1 h。一抗 4℃孵育过夜,TBS-T 摇床漂洗 3 次,每次 10 min,加 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,TBS-T 摇床漂洗 3 次,每次 10 min。ECL 化学发光试剂显影后于成像仪上读取。

1.3 统计学方法

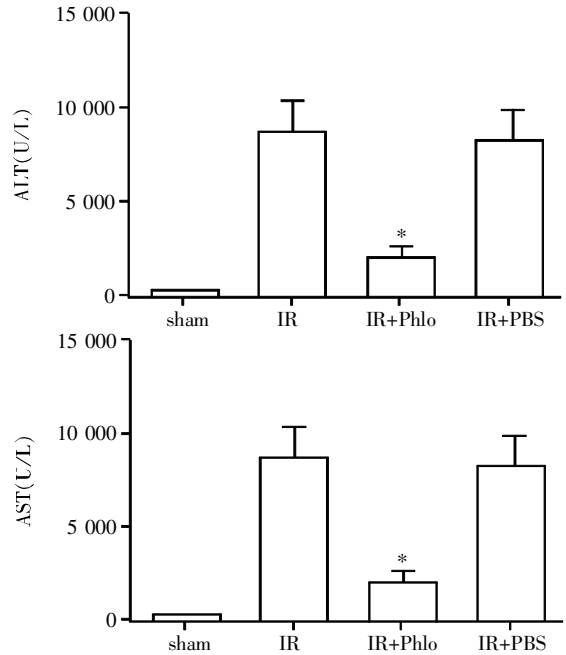
以 SPSS 13.0 统计学软件进行统计分析。结果以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )示。用单因素方差分析进行统计学处理,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用 One-way ANOVA 和 Newman-Kelus-test 多重比较 *t* 检验分析。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 间苯三酚可减轻缺血再灌注造成的肝损伤

血清 ALT、AST 水平是反映肝功能的有效指标。sham 组小鼠肝功能无损害,IR 组、IR+PBS 组和 IR+Phlo 组的 ALT、AST 水平均较 sham 组升高,但 IR+Phlo 组的 ALT、AST 明显比 IR 组和 IR+PBS 组低( $P < 0.01$ ,图 1),说明间苯三酚可以减轻 IR 造成的肝功能损伤。

HE 染色可见 IR 组肝叶组织结构较 sham 组出

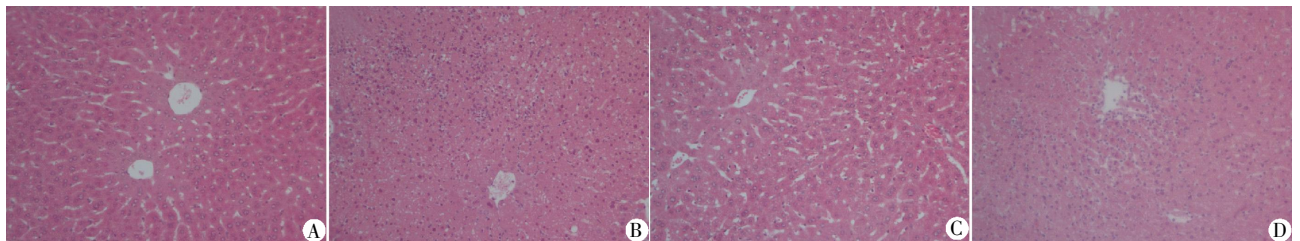


与 IR 组比较, \* $P < 0.01$ 。

图 1 血清 ALT、AST 水平

Figure 1 Serum levels of ALT,AST

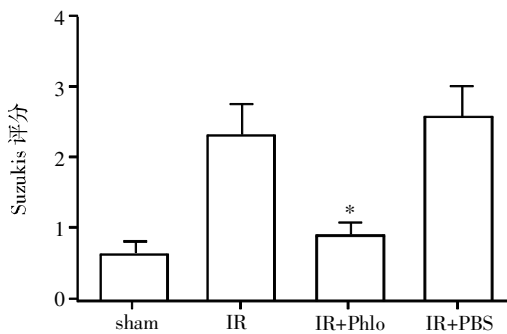
现明显改变,表现为肝窦堵塞,肝细胞肿胀、变性、坏死,炎症细胞浸润。IR+Phlo 组较 IR 组肝叶结构改变较小,肝细胞肿胀、变性程度较轻,炎症细胞浸润较少。IR+PBS 组与 IR 组改变相似(图 2)。Suzuki's 评分同样提示 IR 组与 IR+PBS 组肝损伤较重,IR+Phlo 组损伤较 IR 组明显减轻( $P < 0.01$ ,图 3)。



A: sham 组; B: IR 组; C: IR+Phlo 组; D: IR+PBS 组。

图 2 肝组织 HE 染色(x200)

Figure 2 Histopathological analysis of livers(x200)



与 IR 组比较, \* $P < 0.01$ 。

图 3 Suzuki's 评分

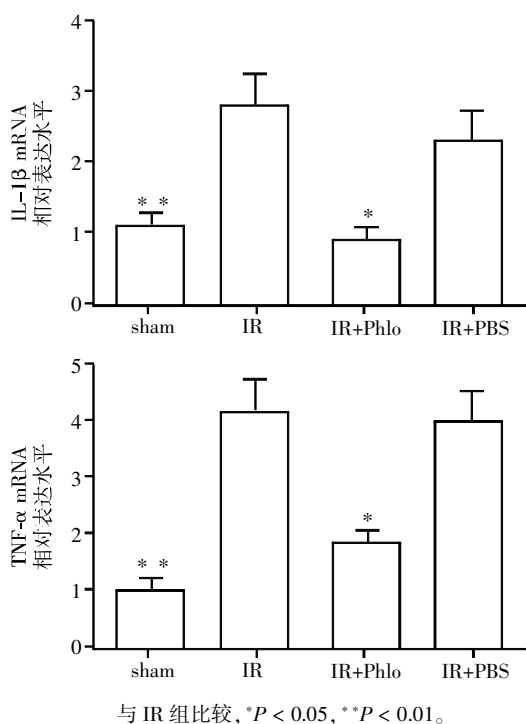
Figure 3 Suzuki's score

2.2 间苯三酚可减少肝内 IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 水平

肝内炎症介质 IL-1β 和 TNF-α 的 mRNA 水平显示(图 4):IR 组较 sham 组均明显上升( $P < 0.01$ ),而 IR+Phlo 组的水平较 IR 组明显下降( $P < 0.05$ ),IR+PBS 组水平较 IR 组几乎不变。

2.3 间苯三酚可减少 RAW264.7 分泌 IL-1β 和 TNF-α 的水平

RAW264.7 细胞受 LPS 刺激后 (LPS 组),IL-1β 和 TNF-α 的分泌量较 sham 组明显上升 ( $P < 0.01$ ),

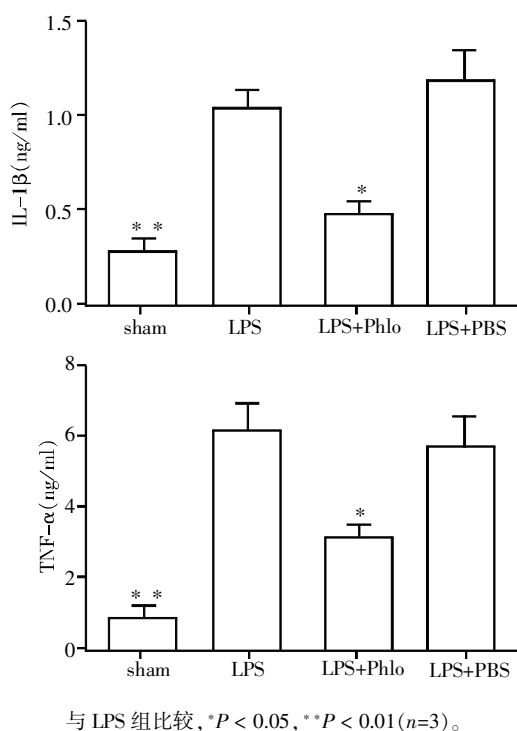


与 IR 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

图 4 肝内 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ mRNA 表达

Figure 4 Expressions of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA in livers

而间苯三酚预处理后(LPS+Phlo 组),分泌量明显减少 ( $P < 0.05$ )。同等量的 PBS 预处理后(LPS+PBS 组),IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的分泌量较 LPS 组未见明显变化(图 5)。



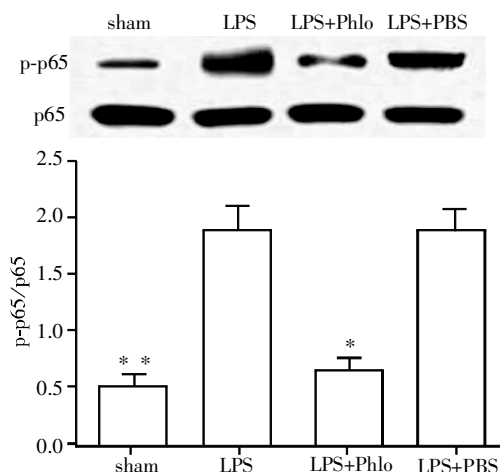
与 LPS 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图 5 RAW264.7 分泌 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  的情况

Figure 5 Production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  by RAW264.7

#### 2.4 间苯三酚可降低 RAW264.7 细胞内磷酸化 NF- $\kappa$ B p65(p-p65)的表达

LPS 组中,RAW264.7 细胞在 LPS 刺激下,胞内 p-p65 的表达量较 sham 组明显增加,提示 NF- $\kappa$ B 活性增强。LPS+Phlo 组中,在间苯三酚预处理后,p-p65 的表达量明显降低,而在 LPS+PBS 组中,PBS 预处理时,p-p65 的表达量与 LPS 组相似。提示间苯三酚可抑制 NF- $\kappa$ B 的活性。



与 LPS 组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  ( $n=3$ )。

图 6 Western blot 检测 RAW264.7 中磷酸化 NF- $\kappa$ B p65(p-p65)的表达

Figure 6 Western blot analysis for phspho-NF- $\kappa$ B p65 (p-p65) in RAW264.7

### 3 讨论

本研究中,发现间苯三酚可以明显改善小鼠肝 IRI。肝 IRI 可导致小鼠血清 ALT、AST 的水平明显升高,但在 IR 之前经口灌注间苯三酚后,血清 ALT、AST 的水平则明显下降,且组织病理学显示,肝细胞变性、肿胀、坏死以及炎症细胞浸润的程度均较未用间苯三酚时明显减轻。评价肝组织损伤程度的 Suzuki's 评分也同样支持病理学观察结果。

肝 IRI 是一个涉及多阶段、多因素的复杂的病理生理过程,过度的炎症反应被认为是其中一个重要的损伤因素<sup>[11]</sup>。一些旨在降低炎症因子水平的研究,已取得了比较理想的效果<sup>[12-14]</sup>。IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  是参与肝 IRI 的 2 个重要的炎症因子<sup>[15-16]</sup>。肝 IRI 后,小鼠肝内 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的 mRNA 水平均明显上升,而使用间苯三酚可明显降低这两种炎症因子在小鼠肝内的表达。提示间苯三酚在肝 IRI 中具有抗炎的作用。这与 Kim 等<sup>[6]</sup>学者的报告相符。

肝 IRI 时,巨噬细胞被激活,分泌大量的炎症因子,其中包括 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$ 。本研究体外试验证

实,小鼠正常巨噬细胞系 RAW264.7 在体外接受 LPS 刺激时,其分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的水平明显升高。在间苯三酚预处理后,这种分泌能力受到了抑制。NF- $\kappa$ B 是参与肝 IRI 的重要转录因子<sup>[17]</sup>,众多的炎症因子受到 NF- $\kappa$ B 调控。巨噬细胞分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  的功能也受到 NF- $\kappa$ B 调控,p65 是其主要的功能亚单位,磷酸化后的 p65(p-p65)具有转录活性<sup>[18]</sup>。本研究中,Western blot 显示,LPS 刺激 RAW264.7 后,p-p65 表达明显增强,但间苯三酚预处理后,该表达明显受到抑制。提示此条件下间苯三酚可以抑制 NF- $\kappa$ B 的活性。

本研究证实,间苯三酚在肝 IRI 中具有保护作用,其机制是通过抑制巨噬细胞 NF- $\kappa$ B 的活性,从而减少其分泌 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  实现的。肝 IRI 涉及的机制很多,间苯三酚也可能在其中具有其他作用,比如抗氧化<sup>[19]</sup>、抗凋亡<sup>[20]</sup>等,对此,还将在今后研究中继续探索。但间苯三酚具有保护性作用的发现,至少可以为肝 IRI 的治疗提供了一条新线索。

#### [参考文献]

- [1] Clarke CN,Kuboki S,Tevar A,et al. CXC chemokines play a critical role in liver injury,recovery,and regeneration[J]. *Am J Surg*,2009,198(3):415-419
- [2] Ogawa K,Kondo T,Tamura T,et al. Influence of Kupffer cells and platelets on ischemia-reperfusion injury in mild steatotic liver[J]. *World J Gastroenterol*,2013,19(9):1396-1404
- [3] Fujimura N,Obare H,Suda K,et al. Neutrophil elastase inhibitor improves survival rate after ischemia reperfusion injury caused by supravisceral aortic clamping in rats[J]. *J Surg Res*,2013,180(1):e31-36
- [4] Fang J,Qin H,Seki T,et al. Therapeutic potential of pegylated hemin for reactive oxygen species-related diseases via induction of heme oxygenase-1:results from a rat hepatic ischemia/reperfusion injury model[J]. *J Pharmacol Exp Ther*,2011,339(3):779-789
- [5] Eltzschig HK,Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation[J]. *Nat Med*,2011,17(11):1391-1401
- [6] Kim MM,Kim SK. Effect of phloroglucinol on oxidative stress and inflammation[J]. *Food Chem Toxicol*,2010,48(10):2925-2933
- [7] Kang KA,Lee KH,Chae S,et al. Cytoprotective effect of phloroglucinol on oxidative stress induced cell damage via catalase activation[J]. *J Cell Biochem*,2006,97(3):609-620
- [8] Kang KA,Zhang R,Chae S,et al. Phloroglucinol(1,3,5-trihydroxybenzene)protects against ionizing radiation-induced cell damage through inhibition of oxidative stress *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chem Biol Interact*,2010,185(3):215-226
- [9] Chang MC,Chang HH,Chan CP,et al. Antiplatelet effect of phloroglucinol is related to inhibition of cyclooxygenase,reactive oxygen species,ERK/p38 signaling and thromboxane A2 production[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2012,263(3):287-295
- [10] Suzuki S,Toledo-Pereyra LH,Rodriguez FJ,et al. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine[J]. *Transplantation*,1993,55(6):1265-1272
- [11] Chen GY,Nunez G. Sterile inflammation:sensing and reacting to damage [J]. *Nat Rev Immunol*,2010,10(12):826-837
- [12] Kamo N,Ghaffari AA,Shen XD,et al. ASC/caspase-1/IL-1beta signaling triggers inflammatory responses by promoting HMGB1 induction in liver ischemia/reperfusion injury[J]. *Hepatology*,2013,58(1):351-362
- [13] Cui LZ,Wang B,Chen LY,et al. The effect of ischemic precondition to IL-6 on rat liver ischemia-reperfusion injury in transplantation[J]. *Asian Pac J Trop Med*,2013,6(5):395-399
- [14] Dibazar F,Hajipour B,Hosseini MM,et al. Simvastatin decreases hepatic ischaemia/reperfusion-induced liver and lung injury in rats[J]. *Folia Morphol (Warsz)*,2008,67(4):231-235
- [15] Suzuki S,Toledo-Pereyra LH. Interleukin 1 and tumor necrosis factor production as the initial stimulants of liver ischemia and reperfusion injury [J]. *J Surg Res*,1994,57(2):253-258
- [16] Shuh M,Bohorquez H,Loss GE,et al. Tumor necrosis factor-alpha:life and death of hepatocytes during liver ischemia/reperfusion injury[J]. *Ochsner J*,2013,13(1):119-130
- [17] Eltzschig HK,Carmeliet P. Hypoxia and inflammation[J]. *N Engl J Med*,2011,364(7):656-665
- [18] DeAngelis RA,Kovalovich K,Cressman DE,et al. Normal liver regeneration in p50/nuclear factor kappaB1 knockout mice[J]. *Hepatology*,2001,33(4):915-924
- [19] Li TT,Zhang YS,He L,et al. Protective effect of phloroglucinol against myocardial ischaemia-reperfusion injury is related to inhibition of myeloperoxidase activity and inflammatory cell infiltration[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*,2011,38(1):27-33
- [20] Piao MJ,Zhang R,Lee NH,et al. Phloroglucinol attenuates ultraviolet B radiation-induced matrix metalloproteinase-1 production in human keratinocytes via inhibitory actions against mitogen-activated protein kinases and activator protein-1 [J]. *Photochem Photobiol*,2012,88(2):381-388