

# 川芎嗪对脓毒症致急性肝损伤大鼠肝细胞线粒体膜转运功能保护作用的实验研究

盛悦 王锦权 陶小根 张霖 方翔 倪恒祥 Li Wei

230036 安徽合肥,安徽医科大学附属省立医院(南区)重症医学科(盛悦、王锦权、陶小根、张霖、方翔、倪恒祥); WC1E 6BT London, UCL School of Pharmacy, University College London (Li Wei)

通讯作者:王锦权, Email: jqwang604@163.com

DOI: 10.3760/ema.j.issn.2095-4352.2018.10.019

**【摘要】目的** 探讨川芎嗪对脓毒症致急性肝损伤(SALI)大鼠肝细胞线粒体膜转运功能的保护作用。**方法** 按随机数字表法将SD大鼠分为假手术组、SALI模型组[采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制模]、川芎嗪治疗组(CLP术后经尾静脉注入盐酸川芎嗪60 mg/kg)和川芎嗪预防组(CLP术前7 d,每日经尾静脉注射盐酸川芎嗪60 mg/kg),每组12只。各组于术后10 h取腹主动脉血和肝脏,用酶耦联速率法测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)和线粒体天冬氨酸转氨酶(m-AST)水平;用比色法和化学荧光素法检测肝细胞三磷酸腺苷(ATP)含量;用磷定量方法检测肝细胞线粒体ATP酶活性;用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肝细胞线粒体膜水通道蛋白8(AQP8)、肉毒碱棕榈酰基转移酶(CPT)的表达。**结果** 与假手术组相比,SALI模型组、川芎嗪治疗组和川芎嗪预防组血清ALT、AST和m-AST水平显著升高,肝细胞ATP含量显著降低,肝细胞线粒体膜ATP酶活性、AQP8和CPT-1A的表达量明显下降。与SALI模型组相比,川芎嗪治疗组和川芎嗪预防组血清ALT、AST和m-AST水平显著降低[ALT(U/L):123.8±32.8、105.0±44.5比233.0±110.1,AST(U/L):427.0±117.9、303.9±110.3比742.6±441.4,m-AST(U/L):239.6±64.9、168.2±60.0比412.8±252.6,均 $P<0.01$ ],肝细胞ATP含量均显著升高(nmol/mg:29.5±10.3、34.6±11.2比19.3±8.8,均 $P<0.01$ ),线粒体膜ATP酶活性也均显著升高[Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP酶(U/mg):3.91±0.30、3.97±0.35比2.87±0.82,Mg<sup>2+</sup>-ATP酶(U/mg):3.75±0.38、3.88±0.35比2.64±1.06,Ca<sup>2+</sup>-ATP酶(U/mg):3.15±0.58、2.98±0.31比1.75±1.25,Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP酶(U/mg):3.82±0.31、3.91±0.42比2.57±1.01,均 $P<0.01$ ],线粒体膜AQP8和CPT-1A的表达量明显升高[以假手术组(100%)为参照,AQP8/COX-IV:(79.12±7.79)%、(88.40±9.22)%比(62.08±11.91)%,CPT-1A/COX-IV:(87.92±10.06)%、(84.91±17.48)%比(72.11±7.82)%,均 $P<0.01$ ],其中川芎嗪预防组较川芎嗪治疗组血清AST、m-AST水平降低更为显著[AST(U/L):303.9±110.3比427.0±117.9,m-AST(U/L):168.2±60.0比239.6±64.9,均 $P<0.05$ ]。4组间肝细胞线粒体膜CPT-2表达量差异无统计学意义。**结论** 川芎嗪可以保护SALI大鼠肝细胞线粒体膜转运水、离子和脂肪的功能;川芎嗪对脓毒症的预防作用要优于治疗作用。

**【关键词】** 川芎嗪; 脓毒症; 线粒体; 水通道蛋白8; 肉毒碱棕榈酰基转移酶

**基金项目:**安徽省国际科技合作项目(1403062022)

**Study on the protective effect of ligustrazine on the transporting function of hepatocellular mitochondria membrane in the septic rats** Sheng Yue, Wang Jinqun, Tao Xiaogen, Zhang Lin, Fang Xiang, Ni Hengxiang, Li Wei  
Department of ICU, Anhui Provincial Hospital Affiliated to Anhui Medical University, Hefei 230036, Anhui, China (Sheng Y, Wang JQ, Tao XG, Zhang L, Fang X, Ni HX); UCL School of Pharmacy, University College London, London WC1E 6BT, England (Li W)

Corresponding author: Wang Jinqun, Email: jqwang604@163.com

**【Abstract】Objective** To investigate the protective effect of ligustrazine on the transporting function of hepatocellular mitochondria membrane in the rats with sepsis-induced acute liver injury (SALI). **Methods** The Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham operation group, SALI group [established by cecal ligation and puncture (CLP)], ligustrazine treatment group (injection of ligustrazine 60 mg/kg through tail vein after CLP) and ligustrazine preventive group (7 days before CLP, ligustrazine was injected daily through tail vein for 60 mg/kg), and there were 12 rats in each group. Abdominal aorta blood and liver were harvested at 10 hours after operation. The content of serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and mitochondrial aspartate aminotransferase (m-AST) were determined by enzyme coupling rate method. The content of ATP was detected by colorimetric and chemical fluorescein method. The activity of mitochondrial ATPase was detected by phosphorus quantification. The expressions of mitochondrial membrane aquaporin 8 (AQP8) and carnitine palmitoyl transferase (CPT) were detected by Western Blot. **Results** Compared with sham operation group, the levels of serum ALT, AST and m-AST were significantly increased in SALI group, ligustrazine treatment group and ligustrazine preventive group, and the content of ATP was reduced, the activity of mitochondrial membrane ATPase, the expressions of AQP8 and CPT-1A were significantly decreased. Compared with SALI group, the levels of serum ALT, AST and m-AST were significantly decreased in ligustrazine

treatment and ligustrazine preventive groups [ALT (U/L):  $123.8 \pm 32.8$ ,  $105.0 \pm 44.5$  vs.  $233.0 \pm 110.1$ ; AST (U/L):  $427.0 \pm 117.9$ ,  $303.9 \pm 110.3$  vs.  $742.6 \pm 441.4$ ; m-AST (U/L):  $239.6 \pm 64.9$ ,  $168.2 \pm 60.0$  vs.  $412.8 \pm 252.6$ ; all  $P < 0.01$ ], the content of ATP were significantly increased (nmol/mg):  $29.5 \pm 10.3$ ,  $34.6 \pm 11.2$  vs.  $19.3 \pm 8.8$ , both  $P < 0.01$ ], the activity of ATPase in hepatocellular mitochondrial membrane were significantly increased [ $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATPase (U/mg):  $3.91 \pm 0.30$ ,  $3.97 \pm 0.35$  vs.  $2.87 \pm 0.82$ ;  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (U/mg):  $3.75 \pm 0.38$ ,  $3.88 \pm 0.35$  vs.  $2.64 \pm 1.06$ ;  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (U/mg):  $3.15 \pm 0.58$ ,  $2.98 \pm 0.31$  vs.  $1.75 \pm 1.25$ ;  $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ -ATPase (U/mg):  $3.82 \pm 0.31$ ,  $3.91 \pm 0.42$  vs.  $2.57 \pm 1.01$ , all  $P < 0.01$ ], the expressions of AQP8 and CPT-1A were significantly increased [percentage increase from sham operation group (100%), AQP8/COX-IV : ( $79.12 \pm 7.79$ )%, ( $88.40 \pm 9.22$ )% vs. ( $62.08 \pm 11.91$ )%; CPT-1A/COX-IV : ( $87.92 \pm 10.06$ )%, ( $84.91 \pm 17.48$ )% vs. ( $72.11 \pm 7.82$ )%, all  $P < 0.01$ ]. The levels of serum AST and m-AST in ligustrazine preventive group were significant lower than those in ligustrazine treatment group [AST (U/L):  $303.9 \pm 110.3$  vs.  $427.0 \pm 117.9$ ; m-AST (U/L):  $168.2 \pm 60.0$  vs.  $239.6 \pm 64.9$ , both  $P < 0.05$ ]. There was no significant difference in the expression of CPT-2 in mitochondrial membrane between the four groups. **Conclusions** Ligustrazine could play a protective role on the mitochondrial membrane function of transporting water, ion and fat in the rats with SALI. The preventive function of ligustrazine is better than the treatment effect of the rats with sepsis.

**【Key words】** Ligustrazine; Sepsis; Mitochondria; Aquaporin 8; Carnitine palmitoyl transferase

**Fund program:** International Cooperation Program of Anhui Province (1403062022)

线粒体损伤是脓毒症介导急性肝损伤(SALI)的主要机制之一,而线粒体膜的转运功能正常是维持线粒体功能的基本条件。线粒体膜通过调节离子、水以及脂肪酸等物质转运,维持线粒体内环境稳定并调控肝细胞的合成和代谢功能。川芎嗪是从中药川芎中提取出的活性生物碱,因具有清除氧自由基、改善微循环以及减轻再灌注损伤等功能,被广泛应用于心血管及神经系统等领域<sup>[1]</sup>。研究证明川芎嗪具有维持肝细胞线粒体结构稳定的作用,可保护肝细胞功能<sup>[2]</sup>。本研究旨在探讨川芎嗪对脓毒症大鼠肝脏线粒体膜转运功能的影响,以期为川芎嗪用于临床治疗 SALI 提供有力证据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物及分组:** 48 只 8 周龄 SD 大鼠,雌雄各半,体重( $280 \pm 20$ )g,由安徽医科大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(皖)2015-0001。按照随机数字表法将大鼠分为假手术组、SALI 模型组、川芎嗪治疗组和川芎嗪预防组 4 组,每组 12 只。大鼠术前 12 h 禁食、不禁水。

**1.2 SALI 模型建立及分组处理:** 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制备 SALI 大鼠模型<sup>[3]</sup>;假手术组仅开腹、分离盲肠,不结扎、穿孔。川芎嗪治疗组于 CLP 术后立即从尾静脉注射盐酸川芎嗪(无锡市第七制药有限公司生产)60 mg/kg;川芎嗪预防组于 CLP 术前 7 d,每日从大鼠尾静脉注射盐酸川芎嗪 60 mg/kg,术后经皮下注射生理盐水 30 mL/kg;假手术组和 SALI 模型组术后注射等体积生理盐水。

**1.3 伦理学:** 本实验符合动物伦理学标准,并经安徽医科大学实验动物伦理委员会审批(审批号:201404-006),且在实验过程中严格执行安徽省实验动物管理条例。

**1.4 检测指标及方法:** 术后 10 h,用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠后处死,取腹主动脉血,分离血清待检;开腹取肝脏,置于液氮中冻存备检。

**1.4.1 肝脏酶学检测:** 采用酶耦联速率法测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)和线粒体型天冬氨酸转氨酶(m-AST)水平。

**1.4.2 肝细胞三磷酸腺苷(ATP)含量测定:** 按照 ATP 检测试剂盒(S0026,碧云天生物技术有限公司)说明书步骤,采用比色和化学荧光素法检测肝细胞 ATP 含量,使用 BioTek Synergy 4 多功能酶标仪检测标本的相对光单元(RLU)值,并根据标准曲线计算 ATP 水平。

**1.4.3 肝脏线粒体提取:** 采用差速离心法提取大鼠肝脏组织线粒体。称取新鲜肝组织 2 g,剪碎,置于冰上充分研磨,加入 10 mL 线粒体分离试剂(0.07 mol/L 蔗糖、0.22 mol/L 甘露醇、0.001 mol/L 乙二胺四乙酸、0.005 mol/L 乙二醇双四乙酸、0.02 mol/L Tris 缓冲液)在冰浴上匀浆;将匀浆液高速离心 5 min,收取上清再离心 10 min,去除上清将沉渣重悬于 1.5 mL 预冷的线粒体分离介质中,离心 10 min 后弃上清,将得到的线粒体(即沉淀物)重悬于预冷的线粒体冻存液中置于  $-80^\circ\text{C}$  储存,全部过程在  $0 \sim 4^\circ\text{C}$  条件下进行。线粒体浓度用 BCA 法测定。

**1.4.4 线粒体膜 ATP 酶活性测定:** 从液氮中取出线粒体纯化样本复温解冻,随后加入线粒体稀释液,将其制成 2 mL 混悬液,迅速置于  $0^\circ\text{C}$  生理盐水中,超声破碎线粒体膜,按照 ATP 酶检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书步骤,采用磷定量方法检测  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -ATP 酶、 $\text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶、 $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$ -ATP 酶活性。

**1.4.5 线粒体内膜水通道蛋白 8(AQP8)表达测定:**

用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肝细胞线粒体膜上 AQP8 表达量。取 80 μg 线粒体蛋白上样量,一抗为兔抗大鼠 AQP8 多克隆抗体和内参细胞色素 C 氧化酶 IV (COX-IV)抗体(美国 Abcam 公司),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司)。用电化学发光法在 Bioshine Chemi Q4600 荧光及化学发光成像系统中获得图像;使用 Image-proPlus 6.0 软件分析蛋白条带灰度,以目的蛋白与内参的灰度值比值表示蛋白表达量,然后以假手术组 AQP8 表达量为参照,计算其他 3 组的相对表达量。

**1.4.6 线粒体肉毒碱棕榈酰基转移酶(CPT)表达测定:**用 Western Blot 检测肝细胞线粒体外膜 CPT-1A 和内膜 CPT-2 表达量。变性后,分别取 80 μg 线粒体蛋白;一抗为兔 CPT-1A 单克隆抗体、兔 CPT-2 单克隆抗体和内参 COX-IV 抗体(均为美国 Abcam 公司),二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG。在 Bioshine Chemi Q4600 荧光及化学发光成像系统中曝光显影,用 Image-proPlus 6.0 软件分析各蛋白条带灰度,计算 CPT-1A、CPT-2 与内参的灰度值比值,并以假手术组为参照,计算其他 3 组的相对表达量。

**1.5 统计学方法:**采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。实验数据以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,4 组间比较采用 Wilcoxon 秩和检验,组间两两比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 肝脏酶学(表 1):**与假手术组比较, SALI 模型组血清 ALT、AST 和 m-AST 水平显著升高,肝细胞 ATP 含量明显下降(均 *P* < 0.01)。与 SALI 模型组比较,川芎嗪治疗组和川芎嗪预防组血清 ALT、AST 和 m-AST 水平明显下降,肝细胞 ATP 含量明显升高(均 *P* < 0.01)。川芎嗪预防组 AST、m-AST 较川芎嗪治疗组进一步降低(均 *P* < 0.05)。

**2.2 线粒体膜 ATP 酶活性(表 2):**SALI 模型组肝细胞线粒体膜 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶、Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶、Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶及 Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性均较假手术组显著下降(均 *P* < 0.01)。川芎嗪治疗组和川芎嗪预防组线粒体膜 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶、Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶、Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶及

**表 1 川芎嗪对脓毒症致急性肝损伤(SALI)大鼠肝功能及肝细胞环磷酸腺苷(ATP)含量的影响( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数(只)	血 ALT (U/L)	血 AST (U/L)	血 m-AST (U/L)	肝 ATP (nmol/mg)
假手术组	12	33.3 ± 9.6	99.8 ± 41.7	46.2 ± 24.2	94.6 ± 18.0
SALI 模型组	12	233.0 ± 110.1 <sup>a</sup>	742.6 ± 441.4 <sup>a</sup>	412.8 ± 252.6 <sup>a</sup>	19.3 ± 8.8 <sup>a</sup>
川芎嗪治疗组	12	123.8 ± 32.8 <sup>ab</sup>	427.0 ± 117.9 <sup>ab</sup>	239.6 ± 64.9 <sup>ab</sup>	29.5 ± 10.3 <sup>ab</sup>
川芎嗪预防组	12	105.0 ± 44.5 <sup>ab</sup>	303.9 ± 110.3 <sup>abc</sup>	168.2 ± 60.0 <sup>abc</sup>	34.6 ± 11.2 <sup>ab</sup>

注:ALT 为丙氨酸转氨酶,AST 为天冬氨酸转氨酶,m-AST 为线粒体型天冬氨酸转氨酶;与假手术组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.01;与 SALI 模型组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.01;与川芎嗪治疗组比较,<sup>c</sup>*P* < 0.05

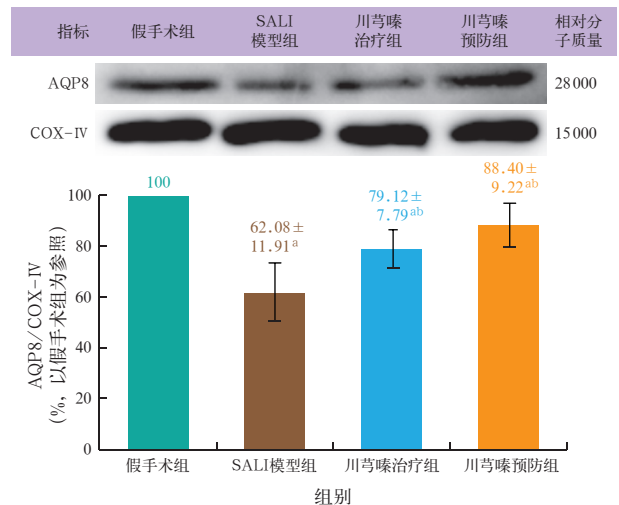
**表 2 川芎嗪对脓毒症致急性肝损伤(SALI)大鼠肝细胞线粒体膜环磷酸腺苷(ATP)酶活性的影响( $\bar{x} \pm s$ )**

组别	动物数(只)	线粒体膜 ATP 酶活性(U/mg)			
		Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP 酶	Mg <sup>2+</sup> -ATP 酶	Ca <sup>2+</sup> -ATP 酶	Ca <sup>2+</sup> -Mg <sup>2+</sup> -ATP 酶
假手术组	12	4.71 ± 0.86	4.46 ± 0.75	3.51 ± 0.44	4.64 ± 0.85
SALI 模型组	12	2.87 ± 0.82 <sup>a</sup>	2.64 ± 1.06 <sup>a</sup>	1.75 ± 1.25 <sup>a</sup>	2.57 ± 1.01 <sup>a</sup>
川芎嗪治疗组	12	3.91 ± 0.30 <sup>ab</sup>	3.75 ± 0.38 <sup>ab</sup>	3.15 ± 0.58 <sup>ab</sup>	3.82 ± 0.31 <sup>ab</sup>
川芎嗪预防组	12	3.97 ± 0.35 <sup>ab</sup>	3.88 ± 0.35 <sup>ab</sup>	2.98 ± 0.31 <sup>ab</sup>	3.91 ± 0.42 <sup>ab</sup>

注:与假手术组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.01;与 SALI 模型组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.01

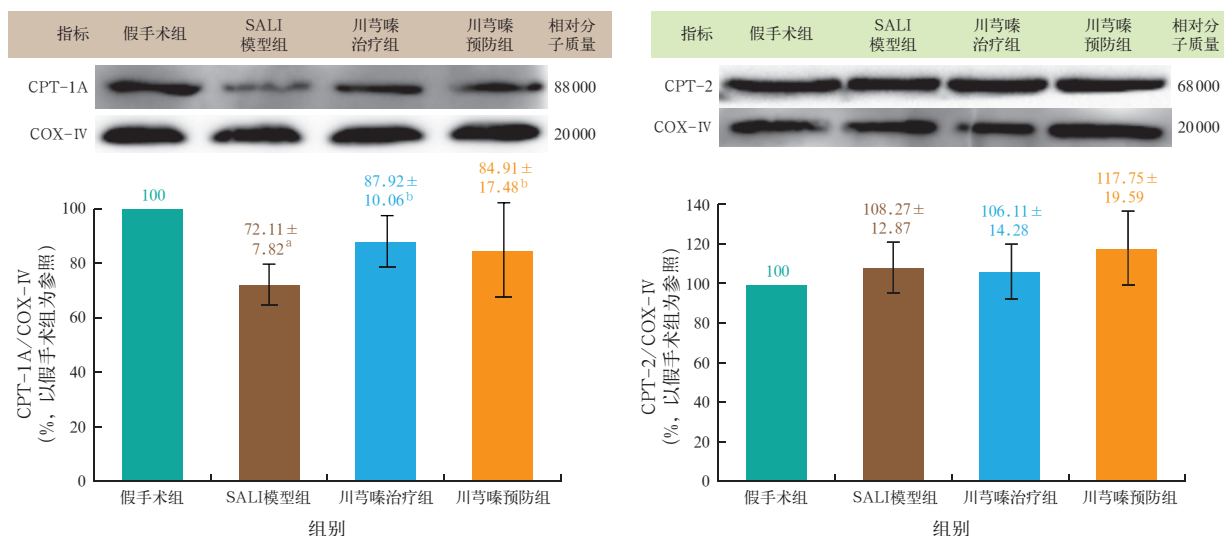
Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>-ATP 酶活性均较 SALI 模型组显著升高(均 *P* < 0.01),但仍显著低于假手术组(均 *P* < 0.01)。川芎嗪预防组与川芎嗪治疗组间线粒体膜 ATP 酶活性差异均无统计学意义(均 *P* > 0.05)。

**2.3 线粒体内膜 AQP8 表达(图 1):**SALI 模型组、川芎嗪治疗组和川芎嗪预防组肝细胞线粒体内膜 AQP8 表达量均较假手术组明显下降(均 *P* < 0.01)。但川芎嗪治疗组和川芎嗪预防组线粒体内膜 AQP8 表达量显著高于 SALI 模型组(均 *P* < 0.01),而川芎嗪治疗组与川芎嗪预防组间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。



AQP8 为水通道蛋白 8, COX-IV 为细胞色素 C 氧化酶 IV; 与假手术组比较,<sup>a</sup>*P* < 0.01;与脓毒症致急性肝损伤(SALI)模型组比较,<sup>b</sup>*P* < 0.01

**图 1 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠肝细胞线粒体内膜 AQP8 蛋白表达**



注: CPT为肉毒碱棕榈酰基转移酶, COX-IV为细胞色素C氧化酶IV; 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与脓毒症致急性肝损伤(SALI)模型组比较, <sup>b</sup> $P < 0.01$

图2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠肝细胞线粒体膜CPT表达

**2.4 线粒体膜CPT表达(图2):** SALI模型组肝细胞线粒体外膜CPT-1A表达量较假手术组明显降低( $P < 0.01$ ); 川芎嗪治疗组和川芎嗪预防组线粒体外膜CPT-1A表达量较SALI模型组明显升高(均 $P < 0.01$ ), 而川芎嗪治疗组与川芎嗪预防组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。各组间肝细胞线粒体内膜CPT-2表达量差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3 讨论

肝脏担负着三大营养物质代谢和能量合成的重要任务, 同时也是进行机体乳酸循环、丙氨酸-葡萄糖循环、鸟氨酸循环的唯一场所。在脓毒症状态下, 肝细胞线粒体损伤可引起肝脏能量代谢和解毒功能障碍, 导致肝功能不全甚至发生肝功能衰竭。有专家提出“代谢复苏”概念, 即通过线粒体靶向治疗达到对脓毒症治疗的目的, 早期恢复线粒体功能可减轻多器官功能障碍综合征(MODS)的严重程度及降低病死率<sup>[4]</sup>。有研究显示, 川芎嗪可通过减轻炎症反应、改善心功能, 从而缩短心肌损伤患者的重症医学科(ICU)住院时间<sup>[5]</sup>, 这为肝脏功能保护和MODS的治疗提供了一种新理念。

**3.1 SALI模型建立:** 本研究显示, 与假手术组比较, SALI模型组血清ALT、AST和m-AST水平显著升高, 肝细胞ATP含量明显下降, 提示SALI大鼠模型制备成功。AST可分为胞质内的胞质型AST(c-AST)和线粒体内的m-AST两种同工酶, 二者都是肝细胞坏死指示酶<sup>[6]</sup>。ATP的生成量可直接反映线粒体功能, 肝细胞ATP含量明显下降提示线粒体功能损伤严重<sup>[7-10]</sup>。本实验中, 川芎嗪治疗组和川芎嗪预

防组血ALT、AST和m-AST水平明显高于假手术组, 但均显著低于SALI模型组; 而ATP含量则相反。表明川芎嗪对SALI肝细胞线粒体功能具有保护作用。川芎嗪预防组AST和m-AST水平明显低于川芎嗪治疗组, 表明川芎嗪对SALI的预防作用优于出现脓毒症后的治疗作用。

**3.2 对线粒体膜离子转运功能的影响:** 线粒体膜上存在着调节离子跨膜电位, 改善膜通透性的离子泵, 它们通过稳定钠钾、钙镁平衡, 维持线粒体渗透压和超微结构<sup>[8-9]</sup>。在SALI时期, 离子泵功能减退, 线粒体离子调节功能受到抑制。线粒体通透性转换孔(mPTP)持续开放, 导致 $Ca^{2+}$ 内流形成钙超载, 从而激活线粒体膜mPTP蛋白构象, 结合腺嘌呤核苷酸转位酶和亲环蛋白D造成线粒体损伤<sup>[10-11]</sup>。本研究结果显示, SALI模型组肝细胞线粒体膜 $Na^+-K^+-ATP$ 酶、 $Mg^{2+}-ATP$ 酶、 $Ca^{2+}-ATP$ 酶以及 $Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP$ 酶活性均较假手术组明显降低, 表明脓毒症状态下, 线粒体内易出现离子分布及渗透压严重失衡, 损伤线粒体。而预防性或治疗性给予川芎嗪后线粒体膜4种ATP酶活性均明显升高, 表明川芎嗪通过恢复ATP酶活性, 对线粒体的功能和结构起到保护作用。李学农<sup>[12]</sup>的研究也表明, 川芎嗪可以恢复 $Na^+-K^+-ATP$ 酶及 $Ca^{2+}-ATP$ 酶的活性, 增加线粒体膜的流动性。但川芎嗪预防组与川芎嗪治疗组ATP酶活性差异无统计学意义, 故认为预防性使用川芎嗪对线粒体膜离子转运功能的保护作用与治疗性使用相似。

**3.3 对线粒体内膜水转运功能的影响:** AQP8是

一种多功能膜通道蛋白,不仅参与调控线粒体内外水分子的跨膜转运,还可以促进氨的吸收和尿素代谢<sup>[13]</sup>。本研究显示, SALI 模型组、川芎嗪治疗组和川芎嗪预防组线粒体内膜 AQP8 表达量均较假手术组明显减少,引起线粒体肿胀,导致肝细胞能量代谢障碍。李坤等<sup>[14]</sup>研究证实, AQP8 表达下调可引起线粒体膜电位下降,使线粒体发生肿胀、空泡化和破裂等,进而导致线粒体结构破坏。本研究还显示,川芎嗪治疗组和川芎嗪预防组肝细胞线粒体内膜 AQP8 表达量明显高于 SALI 模型组,提示治疗性或预防性使用川芎嗪可以提高 AQP8 的表达水平,从而维持线粒体的水转运功能正常。川芎嗪预防组与川芎嗪治疗组肝细胞线粒体内膜 AQP8 表达差异无统计学意义,表明预防性或治疗性使用川芎嗪对线粒体内膜水转运功能相似。

**3.4 对脂肪酸转运的影响:**线粒体是脂肪酸代谢的主要场所,调控肝脏脂代谢,而 CPT-1A 和 CPT-2 是调节脂肪酸转运进入线粒体的关键酶<sup>[15]</sup>。有研究表明 CPT-1A 表达量增高可明显降低肝脏中三酰甘油含量,减少脂质堆积<sup>[16]</sup>。本研究显示, SALI 模型组肝细胞线粒体膜 CPT-1A 表达量较假手术组明显减低,而 CPT-2 表达水平差异无统计学意义。提示 CPT-1A 是 SALI 的主要损伤靶点,可导致脂肪酸无法从肝细胞进入线粒体进行代谢,出现肝细胞脂肪变性,而不是由于线粒体内膜 CPT-2 表达减少导致肝脏脂肪酸氧化功能障碍。川芎嗪治疗组和川芎嗪预防组肝细胞线粒体膜 CPT-1A 表达量明显高于 SALI 模型组,表明川芎嗪对肝细胞线粒体的保护作用可能是通过恢复 CPT-1A 的表达量,促进脂肪酸进入线粒体,保护脂肪酸代谢。而川芎嗪预防组与川芎嗪治疗组间 CPT 表达量差异无统计学意义,提示预防性使用川芎嗪对线粒体膜的脂肪酸转运功能较治疗性使用川芎嗪无显著优势。

综上,脓毒症时易发生急性肝损伤,线粒体膜对离子、水和脂肪酸的转运功能均可发生障碍。川芎嗪通过改善脓毒症状态下肝细胞线粒体膜对离子、水及脂肪酸等物质的转运功能,维持线粒体的结构和功能相对稳定性,对 SALI 起着保护作用。

#### 参考文献

[1] Wang JQ, Zhang L, Tao XG, et al. Tetramethylpyrazine upregulates the aquaporin 8 expression of hepatocellular mitochondria in septic rats [J]. *J Surg Res*, 2013, 185 (1): 286-293. DOI: 10.1016/j.jss.2013.05.106.

[2] 王世龙, 林原, 唐泽耀. 川芎嗪在各类神经系统损伤中的保护作用及其机制研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2010, 26 (4): 438-442.

Wang SL, Lin Y, Tang ZY. Research progress on the protection of tetramethylpyrazine in different kinds of damage of nervous system and its mechanisms [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2010, 26 (4): 438-442.

[3] Benli E, Ayyildiz SN, Cirrik S, et al. The effect of tadalafil therapy on kidney damage caused by sepsis in a polymicrobial septic model induced in rats: a biochemical and histopathological study [J]. *Int Braz J Urol*, 2017, 43 (2): 345-355. DOI: 10.1590/S1677-5538.

[4] Leite HP, de Lima LF. Metabolic resuscitation in sepsis: a necessary step beyond the hemodynamic? [J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8 (7): E552-557. DOI: 10.21037/jtd.2016.05.37.

[5] 刘炳炜, 刘长文, 胡炜, 等. 川芎嗪对脓毒症心肌损伤患者血清细胞因子及心功能的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2017, 24 (1): 17-20. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.006.

[6] Liu BW, Liu CW, Hu W, et al. Effect of tetramethylpyrazine injection on serum cytokines and cardiac function in patients with sepsis myocardial damage [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2017, 24 (1): 17-20. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.01.006.

[7] Wang C, Chen H, Ying W. Cytosolic aspartate aminotransferase mediates the mitochondrial membrane potential and cell survival by maintaining the calcium homeostasis of BV2 microglia [J]. *Neuroreport*, 2018, 29 (2): 99-105. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000914.

[8] McBride HM, Neuspil M, Wasiak S. Mitochondria: more than just a powerhouse [J]. *Curr Biol*, 2006, 16 (14): R551-560. DOI: 10.1016/j.cub.2006.06.054.

[9] Simão F, Mattê A, Mattê C, et al. Resveratrol prevents oxidative stress and inhibition of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup>-ATPase activity induced by transient global cerebral ischemia in rats [J]. *J Nutr Biochem*, 2011, 22 (10): 921-928. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.07.013.

[10] 陶珮, 尹海燕, 马永辉, 姜黄素对脓毒症大鼠肝细胞线粒体膜通透性转换的作用机制研究 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (9): 666-670. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.09.012.

[11] 金善子, 王胜. 线粒体通透性转换孔在脓毒症心肌抑制发生过程中的作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (8): 747-751. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.08.018.

[12] Jin SZ, Wang S. The role of mitochondrial permeability transition pore in the occurrence of septic myocardial depression [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 28 (8): 747-751. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.08.018.

[13] 李学农. 川芎嗪对肝纤维化大鼠肝细胞线粒体脂质过氧化的保护作用 [J]. *中国民族民间医药*, 2012, 21 (5): 31-32. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8517.2012.05.023.

[14] Li XN. Protective effect of tetramethylpyrazine on hepatic mitochondrial lipid peroxidation in rats with hepatic fibrosis [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharm*, 2012, 21 (5): 31-32. DOI: 10.3969/j.issn.1007-8517.2012.05.023.

[15] Ishibashi K, Hara S, Kondo S. Aquaporin water channels in mammals [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2009, 13 (2): 107-117. DOI: 10.1007/s10157-008-0118-6.

[16] 李坤, 王锦权, 陶晓根, 等. 脓毒症大鼠肝细胞线粒体功能损伤机制的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33 (5): 1222-1225. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2016.05.016.

[17] Li K, Wang JQ, Tao XG, et al. Study on functional damage mechanism of the hepatocellular mitochondria in the rats with sepsis [J]. *Chin J Exp Surg*, 2016, 33 (5): 1222-1225. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2016.05.016.

[18] Sharma S, Sun X, Rafikov R, et al. PPAR- $\gamma$  regulates carnitine homeostasis and mitochondrial function in a lamb model of increased pulmonary blood flow [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (9): e41555. DOI: 10.1371/journal.pone.0041555.

[19] Stefanovic-Racic M, Perdomo G, Mantell BS, et al. A moderate increase in carnitine palmitoyltransferase 1a activity is sufficient to substantially reduce hepatic triglyceride levels [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2008, 294 (5): E969-977. DOI: 10.1152/ajpendo.00497.2007.