

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2025.01.004

银杏达莫对大鼠小肠缺血-再灌注损伤的保护作用及其机制

刘白露¹ 刘梓育² 李研思³ 聂瑜¹ 张璟玥¹ 刘志强¹

(¹ 济宁医学院药学院,日照 276826;² 烟台大学药学院,山东大学先进用药系统与生物技术药物协同创新中心,烟台 264005;³ 济宁医学院护理学院,济宁 272067)

摘要 **目的** 探究银杏达莫预处理对大鼠小肠缺血-再灌注损伤的影响及相关机制。**方法** 采用结扎肠系膜上动脉模拟大鼠小肠缺血-再灌注损伤模型,根据随机数字表法将 36 只 Wistar 大鼠随机分为假手术组(Sham 组),小肠缺血-再灌注模型组(I/R 组),银杏达莫干预组(Gin 组),每组 12 只。建模前 7d Gin 组按 3.6mL/kg 给药量进行腹腔注射,一天一次,连续 7d,Sham 组、I/R 组注射等剂量生理盐水。苏木素-伊红(HE)染色观察细胞状态,天狼星红染色和 Masson 染色观察胶原纤维;血液生化检测血清中超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量变化;免疫组化检测小肠组织中白介素 6(IL-6)、白介素 10(IL-10)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)的蛋白表达变化;聚合酶链式反应(PCR)检测 Bax、Bcl-2 的 mRNA 表达水平;免疫印迹法(Western blot)检测小肠组织中 Smad 蛋白(Smad)和 Bcl-2、Bax 的蛋白表达水平。**结果** 与 Sham 组相比,I/R 组小肠组织中 SOD 活性[(125.34±59.58)U/L]降低($P<0.05$),MDA 含量[(6.24±0.73)U/L]增加($P<0.05$);与 I/R 组相比,Gin 组小肠组织中 SOD 活性[(262.62±22.57)U/L]增强($P<0.05$),MDA 含量[(2.88±0.74)U/L]降低($P<0.05$)。Sham 组小肠黏膜结构正常,绒毛完整,I/R 组可见大量裸露绒毛,绒毛出现水肿,脱落受损严重,并且有炎性细胞浸润现象,Gin 组小肠绒毛结构破坏较轻,可见黏膜轻微水肿和轻微脱落,损伤较轻;天狼星红和 Masson 染色发现 I/R 组中胶原纤维较 Sham 组明显增多,Gin 组中的胶原纤维较 I/R 组有所减轻;免疫组化结果显示,I/R 组 IL-6、IL-10、Bax、Bcl-2 阳性面积占比[(32.24±7.07)%、(10.23±1.63)%、(40.35±7.07)%、(24.64±8.04)%]均高于 Sham 组[(4.24±1.31)%、(3.77±0.91)%、(2.35±0.87)%、(3.25±0.87)%]($P<0.05$),Gin 组 IL-6、Bax 阳性面积[(10.23±0.71)%、(6.71±1.41)%]低于 I/R 组($P<0.05$),IL-10、Bcl-2 阳性面积[(32.24±8.16)%、(48.40±7.07)%]均高于 I/R 组($P<0.05$);与 Sham 组相比,I/R 组大鼠小肠组织中 Bax、Bcl-2、Akt、Smad mRNA 表达水平均上调($P<0.05$),与 I/R 组比较,Gin 组 Bax 和 Smad mRNA 表达水平降低($P<0.05$),Bcl-2 和 Akt 蛋白相应的 mRNA 表达水平上调($P<0.05$);与 Sham 组相比,I/R 组大鼠小肠组织中 Akt、Smad、Bax、Bcl-2 蛋白表达水平上调($P<0.05$)。与 I/R 组比较,Gin 组大鼠小肠组织中 Akt 和 Bcl-2 蛋白表达水平显著上调($P<0.05$),Smad 和 Bax 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。**结论** 银杏达莫通过调节抗氧化酶活性、减轻炎症反应以及抑制细胞凋亡相关蛋白的表达对大鼠小肠缺血-再灌注损伤有保护作用。

关键词 银杏达莫;小肠缺血-再灌注;TGF-β/Smad;PI3K/Akt

中图分类号:D919.4 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2025)02-019-08

Protective effect of Ginkgodamol on small intestine ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism

LIU Bailu¹, LIU Ziyu², LI Yansi¹, NIE Yu², ZHANG Jingyue¹, LIU Zhiqiang¹

(¹ School of Pharmacy, Jining Medical University, Rizhao 276826, China; ² School of Pharmacy, Yantai University, Collaborative Innovation Center of Advanced Drug Delivery System and Biotech Drugs of Shandong Universities, Yantai 264005, China; ³ School of Nursing, Jining Medical University, Jining 272000, China)

[基金项目] cx2021134 济宁医学院大学生创新训练计划项目(2021-ZXJK-08 山东省人文社会科学课题)

[通信作者]刘志强, Email: liuzhiqiangjy@yeah.net

Abstract: Objective To explore the effect of Ginkgodamol preconditioning on small intestine ischemia-reperfusion injury in rats and its related mechanism. **Methods** A rat small intestine ischemia-reperfusion injury model was simulated by ligating superior mesenteric artery. According to the random number table, 36 Wistar rats were randomly divided into normal group (Sham group), small intestine ischemia-reperfusion model group (I/R group) and Ginkgodamol intervention group (Gin group), with 12 rats in each group. Seven days before modeling, the Ginkgodamol (Gin) group was injected intraperitoneally at a dosage of 3.6mL/1000g once a day for seven days, while the Sham group and I/R group were injected with the same dose of normal saline. HE, Masson and Sirius red staining were used to observe the cell state, while Sirius red staining and Masson staining were used to observe the collagen fibers. The contents of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in serum were detected by blood biochemistry. Immunohistochemistry was used to detect the protein expression changes of interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), Bcl-2 related X protein (Bax) and B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) in small intestine. The mRNA expression levels of Bax and Bcl-2 were detected by polymerase chain reaction (PCR). Western blot was used to detect the protein expression levels of Smad, Bcl-2 and Bax in small intestine. **Results** Compared with Sham group, the SOD activity (125.34 ± 59.58) u/L in I/R group decreased ($P < 0.05$), and the MDA content (6.24 ± 0.73) u/L increased ($P < 0.05$). Compared with I/R group, SOD activity (262.62 ± 22.57) u/L in small intestine of Gin group was increased ($P < 0.05$), while MDA content (2.88 ± 0.74) u/L was decreased ($P < 0.05$). The results of HE staining showed that the intestinal mucosal structure in Sham group was normal, and the villi were intact. In I/R group, a large number of exposed villi were seen, and the villi were edema, shedding and damaged seriously, and inflammatory cells infiltrated. In Gin group, the structural damage of intestinal villi was light, and the mucosal edema and shedding were slight, and the damage was light. Sirius red and Masson staining showed that collagen fibers in I/R group were significantly more than those in Sham group, and collagen fibers in Gin group were less than those in I/R group. Immunohistochemical results showed that the positive areas of IL-6, IL-10, Bax and Bcl-2 in I/R group [$(32.24 \pm 7.07)\%$, $(10.23 \pm 1.63)\%$, $(40.35 \pm 7.07)\%$ and $(24.64 \pm 8.04)\%$] were higher than those in Sham group [$(4.24 \pm 1.31)\%$, $(3.77 \pm 0.91)\%$, $(2.35 \pm 0.87)\%$, $(3.25 \pm 0.87)\%$] ($P < 0.05$). The positive areas of IL-6 and Bax in Gin group [$(10.23 \pm 0.71)\%$, $(6.71 \pm 1.41)\%$] were lower than those in I/R group. The results of PCR showed that compared with Sham group, the expression levels of Bax, Bcl-2, Akt and Smad mRNA in small intestine of rats in I/R group were all up-regulated ($P < 0.05$), while compared with I/R group, the expression levels of Bax and Smad mRNA in Gin group were down-regulated ($P < 0.05$), and the corresponding mRNA expression levels of Bcl-2 and Akt protein were up-regulated ($P < 0.05$). Western blot showed that the expression levels of Akt, Smad, Bax and Bcl-2 protein in small intestine of rats in I/R group were up-regulated compared with Sham group ($P < 0.05$). Compared with I/R group, the expression levels of Akt and Bcl-2 protein in small intestine of rats in Gin group were significantly increased ($P < 0.05$), while the expression levels of Smad and Bax protein were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginkgodamol has protective effect on ischemia-reperfusion injury of small intestine in rats by regulating antioxidant enzyme activity, reducing inflammatory responses, and inhibiting the expression of apoptosis-related proteins.

Keywords: Ginkgodamol; Small intestine I/R; TGF- β /Smad; PI3K/Akt

缺血-再灌注 (ischemia-reperfusion I/R) 是指组织处于缺血状态下, 恢复血流供应进行再次灌注, 使细胞结构受损和代谢功能出现障碍, 器官功能进一步受损的现象。小肠缺血-再灌注损伤 (intestine ischemia-reperfusion injury, IIRI) 是临床常见危重症之一, 常由急性肠系膜缺血、失血性休克等病理状态或者小肠移植术、心肺分流术等外科手术引发^[1-4], 这些情况都可能导致小肠血流中断, 恢复血流供应后, 往往导致缺血-再灌注损伤, 使细胞结构受损和代谢功能出现障碍^[5], 往往会引起更加严

重甚至是不可逆性的损伤。IIRI 时可引起一系列的病理生理情况改变, 包括氧自由基大量生成、细胞凋亡、钙超载、膜脂质过氧化等多种因素, 这些病理生理的改变导致小肠黏膜屏障受损, 细菌和内毒素通过破损的黏膜屏障由消化道入血, 引起血液中的中性粒细胞、巨噬细胞释放出大量的炎症因子和氧化因子, 进而形成炎症风暴, 引起全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 甚至会导致出现多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)。因

此临床表现可以观察到肠缺血-再灌注损伤发生后,黏膜上皮大量坏死,肠绒毛和隐窝脱落,导致肠屏障功能障碍及肠外并发症,最终死亡率高达 50%~90%。目前,临床对于 IIRI 的治疗存在一定的局限性,尚无针对 IIRI 损伤的特效药物和疗法,需要进一步的研究来探索更有效的治疗策略和药物。

银杏达莫注射液(Ginkgodamol injection, Gin)有效成分包括银杏总黄酮、双嘧达莫。银杏总黄酮具有扩张冠脉血管、脑血管的作用,双嘧达莫具有抑制血小板的作用。Gin 对脑、心、肾缺血-再灌注损伤有一定的保护作用,但其对 IIRI 作用未见报道。本实验旨在研究 Gin 对 IIRI 的抗炎、抗凋亡、减轻氧化应激和纤维化的作用,及对 PI3K/Akt 和 TGF- β /Smads 信号通路调控机制以探讨 Gin 对大鼠 IIRI 的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

Wistar 大鼠(200 \pm 20)g,雌雄均可,由济南朋悦实验动物有限公司提供(许可证号 SCXK(鲁)20190003)。本研究严格遵循动物实验伦理原则,实验方案经济宁医学院动物伦理委员会审批通过(JNMC-2023-DW-166)。

大鼠适应性饲养 7d 后,将 36 只大鼠随机分为 3 组,分别是 Sham 组、I/R 组、Gin 组,每组 12 只。建模前 7d Gin 组按 3.6mL/kg 给药量进行腹腔注射,一天一次,连续 7d,Sham 组、I/R 组注射等剂量生理盐水。I/R 组采用结扎肠系膜上动脉 45min,建立模型。Sham 组大鼠仅接受腹腔打开手术操作,不进行肠系膜上动脉结扎。

1.2 方法

1.2.1 大鼠 IIRI 模型的建立 术前大鼠禁食 12h,腹腔注射 5%异戊巴比妥钠(5mg/100g)麻醉。将大鼠固定在鼠台上,碘伏消毒,沿腹部正中线逐层打开皮肤、腹直肌及腹膜,暴露出肠组织,游离肠系膜上动脉,用无损伤动脉夹夹闭,待夹闭动脉远端搏动消失,肠壁逐渐苍白,说明成功阻断动脉血流,回纳肠组织并缝合。夹闭 45min 后移除无损伤动脉夹,血流恢复,肠管颜色逐渐变为红色,再灌注 1h 后采用颈椎脱臼法处死大鼠。

1.2.2 大鼠血清中超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量的测定 1)SOD 活性测定。眼

球取血,4000r/min,10min,24 $^{\circ}$ C 离心后按 1:9 比例稀释血清。根据 SOD 试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)说明书精确测定大鼠血清 SOD 的活性水平。2)MDA 含量测定。根据 MDA 试剂盒说明书测定大鼠血清 MDA。

1.2.3 小肠组织病理学检查 取小肠肠管 1cm 放入 4%多聚甲醛固定液中固定,24h 后进行梯度脱水,二甲苯浸润,浸蜡,石蜡包埋后切片(3 μ m),苏木素伊红(购自雷根生物技术有限公司)染色,进行组织病理学分析。

1.2.4 小肠组织纤维化程度检查 1)Masson 染色。石蜡切片(5 μ m)后将切片与室温浸泡 Masson A 液(购自塞维尔生物科技有限公司)24h。Masson B 液和 Masson C 等体积混合(现配现用),浸染 1min,去离子水洗后 1%盐酸酒精分化 1min,去离子水清洗,凉干,Masson D 液中浸染 6min,去离子水清洗,凉干,Masson E 液浸泡约 4min,分化至胶原纤维呈浅红色。凉干后直接入 Masson F 液 30s。三缸 1%冰醋酸漂洗分化,每缸 2s,二甲苯 3 次,每次 1~2min,二甲苯风干后,用中性树胶封片,显微镜观察并分析。2)天狼星红染色。切片进行天狼星红染色液(购自飞净生物科技有限公司)滴染 1h,去离子水冲洗,苏木素滴染,去离子水冲洗,二甲苯浸润,中性树胶封片。显微镜观察并分析。采用 Image 软件计算 Masson 染色和天狼星红染色的胶原容积分数。

1.2.5 免疫组化检测 各组大鼠 Bax、Bcl-2、IL-6、IL-10 蛋白表达情况 石蜡切片放入 3%的过氧化氢、PBS、EDTA 热修复,滴加 5%BSA 封闭液,37 $^{\circ}$ C 孵育,滴加一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,PBS 冲洗,滴加山羊抗兔 IgG,37 $^{\circ}$ C 孵育,PBS 冲洗,滴加 SABC(购自博士德生物工程有限公司),37 $^{\circ}$ C 孵育,PBS 冲洗,显色,苏木素复染,脱水。使用 Image J 软件计算小肠组织免疫组化 Bax、Bcl-2、IL-6、IL-10 蛋白表达阳性面积占比。

1.2.6 Western blot 检测 Akt、Smad、Bax、Bcl-2 蛋白表达 提取组织蛋白后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将蛋白转移到 PVDF 膜上,封闭液室温封闭 1.5h,PVDF 膜浸泡于一抗(Anti-Akt1 Rabbit、Anti-IL-10 Rabbit、Anti-Smad2+Smad3 Rabbit 购自塞维尔生物科技有限公司,IL-6、BCL-2 购自博士德生物工程有限公司)中 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 漂洗 3 次,羊抗兔 IgG 二抗(购自塞维尔生物科技有限公

司) 孵育 1.5h, 显色曝光。用 Image J 软件测定条带的灰度值。

1.2.7 PCR 检测 Bax、Bcl-2 的 mRNA 表达水平
提取 RNA, 离心 10min, 加入 75% 乙醇 700μL, 离心, 加入 EDPC 水 30μL, 溶解 RNA 样品。定性 RNA 浓度, 反转录后进行凝胶电泳, 最后荧光 PCR 仪测量浓度。PCR 引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

基因序列	
Bcl-2 上游	GGTGAAC TGGGGAGGATTG
下游	AGAGCGATGTTGCCACCAG
β-actin 上游	CCTCACTGTCCACCTTCCA
下游	GGGTGTA AAAACGCAGCTCA
Bax 上游	AGACACCTGAGCTGACCTTG
下游	AAGTTGCCATCAGCAAACAT
Akt 上游	AGTCCCCACTCAACAATTCT
下游	RGAAGGTGCGCTCAATGACTG
Smad2 上游	GTCTGCC TTCGGTATTCTGC
下游	GCTGCTCTTCTG GCTCAGTC
Smad3 上游	AACAACCAGGA GTTCGCTGC
下游	GGACCTTGTCAAGCC ACTGC
GAPDH 上游	AACGACCCCTTCATTGAC
下游	TCCACGACATACTCAGCAC

1.3 统计学方法

运用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。首先对各组数据进行正态性检验, 正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。对于多组间比较, 先进行方差分析, 若方差齐性, 则采用 LSD-*t* 检验进行两两比较; 若方差不齐, 则采用 T2 检验进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。使用 Graphpad Prism 8 软件作图。

2 结果

2.1 各组大鼠小肠组织 SOD 活性和 MDA 含量

与 Sham 组相比, I/R 组小肠组织中 SOD 活性降低 ($P < 0.05$), MDA 含量增加 ($P < 0.05$); 与 I/R 组相比, Gin 组小肠组织中 SOD 活性增强 ($P < 0.05$), MDA 含量降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.2 各组大鼠小肠黏膜结构

Sham 组小肠黏膜结构正常, 绒毛完整, I/R 组可见大量裸露绒毛, 绒毛出现水肿, 脱落受损严重, 并且有炎性细胞浸润现象, Gin 组小肠绒毛结构破坏较轻, 可见黏膜轻微水肿和轻微脱落, 损伤较轻。见图 1。

表 2 不同组别 SOD、MDA 含量比较 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD 活性/(U · L ⁻¹)	MDA 含量/(U · L ⁻¹)
Sham 组	309.73 ± 7.48	3.31 ± 1.11
I/R 组	125.34 ± 59.58 ^a	6.24 ± 0.73 ^a
Gin 组	262.62 ± 22.57 ^{a,b}	2.88 ± 0.74 ^{a,b}
<i>F</i>	26.756	17.333
<i>P</i>	< 0.001	< 0.001

注: 与 Sham 组相比, ^a $P < 0.05$; 与 I/R 组相比, ^b $P < 0.05$ 。SOD 为超氧化物歧化酶; MDA 为丙二醛。

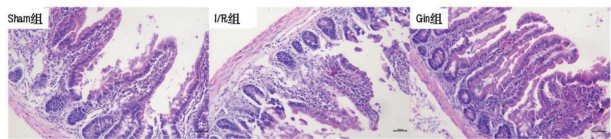
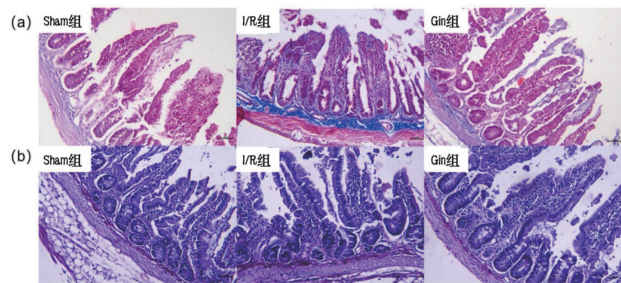


图 1 HE 染色形态观察 (×100)

Sham 组 Masson 染色小肠黏膜上皮细胞少量胶原纤维 (蓝色) 分布, 胶原容积分数为 9.36 ± 1.71 。I/R 组小肠黏膜上皮细胞有大量胶原纤维分布, 小肠绒毛出现破损, 纤维化严重, 胶原容积分数为 34.58 ± 4.07 。与 I/R 组相比, Gin 组小肠黏膜上皮细胞只有少量胶原纤维分布, 小肠绒毛结构相对比较完整, 纤维化程度较轻, 胶原容积分数为 13.56 ± 2.68 , 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2)。

Sham 组天狼猩红染色无明显红色胶原纤维沉积, 胶原容积分数为 12.69 ± 3.46 。I/R 组有大量红色胶原纤维沉积, 小肠绒毛出现脱落损伤现象, 严重纤维化, 胶原容积分数为 29.91 ± 2.95 。与 I/R 组相比, Gin 组有少量红色胶原纤维沉积, 小肠绒毛损伤程度较轻, 纤维化程度有所减轻, 胶原容积分数为 15.23 ± 1.59 , 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 3)。



注: (a) Masson 染色 (×100) 结果。 (b) 天狼猩红染色 (×100) 结果。

图 2 Gin 对 I/R 引起的小肠组织纤维化程度的影响

2.3 各组大鼠小肠 Bax、Bcl-2、IL-6、IL-10 表达水平

Sham 组无明显阳性结果, Bax 蛋白表达不明显, 阳性面积占比(2.35±0.87)%; 与 Sham 组相比, I/R 组呈现大面积棕黄色, Bax 蛋白表达明显($P<0.05$), 阳性面积占比(40.35±7.07)%; Gin 组中棕黄色面积较 I/R 组有所减少, Bax 蛋白表达显著降低($P<0.05$), 阳性面积占比(6.71±1.41)%。

Sham 组无明显阳性结果, Bcl-2 蛋白表达不明显, 阳性面积占比(3.25±0.87)%; I/R 组中棕黄色面积较 Sham 组有所增加, Bcl-2 蛋白有所表达($P<0.05$), 阳性面积占比(24.64±8.04)%; Gin 组的棕黄色面积较 I/R 组有所增加, Bcl-2 蛋白表达显著增加($P<0.05$), 阳性面积占比(48.40±7.07)%。

Sham 组无明显阳性结果, IL-6 蛋白表达不明显, 阳性面积占比(4.24±1.31)%; 与 Sham 组相比, I/R 组有大面积棕黄色, IL-6 蛋白显著表达($P<0.05$), 阳性面积占比(32.24±7.07)%; Gin 组棕黄色面积较 I/R 组显著降低, IL-6 蛋白表达显著降低($P<0.05$), 阳性面积占比(10.23±0.71)%。

Sham 组无明显阳性结果, IL-10 蛋白表达不明显, 阳性面积占比(3.77±0.91)%; 与 Sham 组相比, I/R 组中棕黄色面积增多, IL-10 蛋白表达($P<0.05$), 阳性面积占比(10.23±1.63)%; Gin 组棕黄色面积较 I/R 组显著增加, IL-10 蛋白表达水平显著升高($P<0.05$), 阳性面积占比(32.24±8.16)%。见图 3。

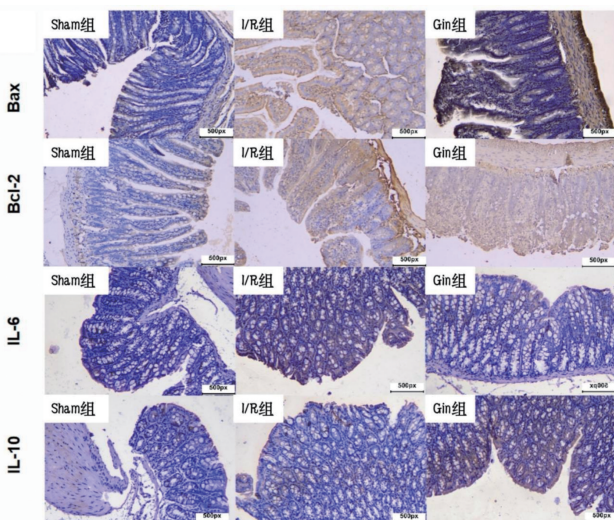


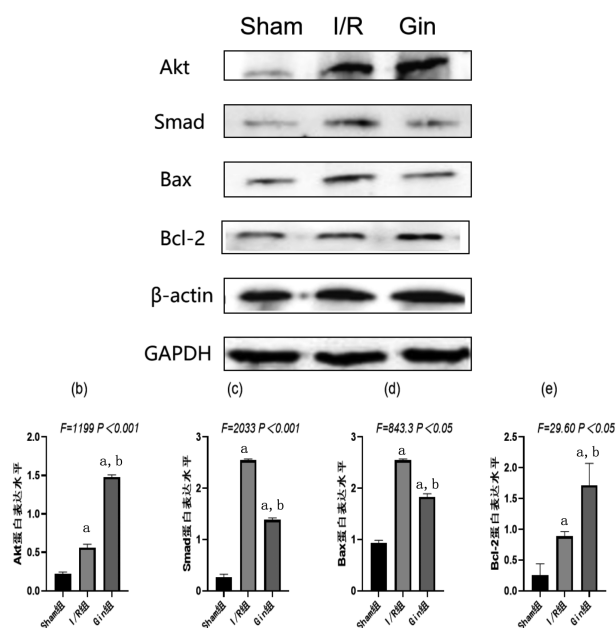
图 3 Gin 对 I/R 引起的小肠组织炎症因子 IL-6、IL-10 和凋亡因子 Bax Bcl-2 蛋白水平的影响(×100)。

2.4 各组大鼠小肠 Akt、Smad、Bax 和 Bcl-2 蛋白

表达水平

与 Sham 组相比, I/R 组大鼠小肠组织中 Akt 和 Smad 蛋白表达水平上调($P<0.05$)。与 I/R 组比较, Gin 组大鼠小肠组织中 Akt 蛋白表达水平显著上调($P<0.05$), Smad 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$)。

与 Sham 组相比, I/R 组大鼠小肠组织中 Bax 蛋白表达水平上调($P<0.05$), Bcl-2 蛋白表达水平上调($P<0.05$)。与 I/R 组比较, Gin 组大鼠小肠组织中 Bax 蛋白表达水平降低($P<0.05$), Bcl-2 蛋白表达水平上调($P<0.05$)。见图 4。

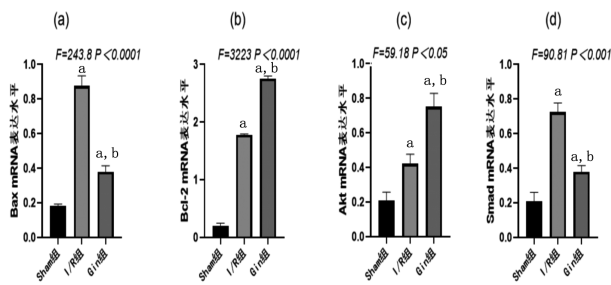


注:(a) 小肠组织 Western blot 结果。(b) 小肠 Akt。(c) 小肠 Smad。(d) 小肠 Bax。(e) 小肠 Bcl-2。与 Sham 组相比, ^a $P<0.05$, 与 I/R 组相比, ^b $P<0.05$ 。

图 4 Gin 对 I/R 引起的小肠组织 Akt Smad Bax Bcl-2 蛋白水平的影响

2.5 各组大鼠小肠 Akt、Smad、Bax 和 Bcl-2 mRNA 表达水平

与 Sham 组相比, I/R 组大鼠小肠组织中 Bax mRNA 表达水平上调($P<0.05$), Bcl-2 mRNA 表达水平上调($P<0.05$), Akt mRNA 表达水平上调($P<0.05$), Smad mRNA 表达水平上调($P<0.05$)。与 I/R 组比较, Gin 组 Bax mRNA 表达水平降低($P<0.05$), Bcl-2 mRNA 表达水平上调($P<0.05$), Akt mRNA 表达水平上调($P<0.05$), Smad mRNA 表达水平降低($P<0.05$)。见图 5。



注:(a)小肠 Bax。(b)小肠 Bcl-2。(c)小肠 Akt。(d)小肠 Smad。与 Sham 组相比,^a $P < 0.05$,与 I/R 组相比,^b $P < 0.05$ 。

图 5 Gin 对 I/R 引起的小肠组织 Bax Bcl-2 Akt Smad mRNA 水平的影响。

3 讨论

IIRI 的机制复杂,诱因较多,早期诊断较为困难,患者死亡率高。目前,临床治疗手段仍缺乏特效药物和疗法,主要以预防和对症处理为主,且缺乏理想的治疗方法和具体的临床标准。早期诊断和干预、治疗策略的选择以及新的治疗方法的研究都是提高患者生存率、改善患者预后的关键。因此,进一步开展研究以探索更为有效的治疗策略和药物,具有重要的临床意义。本实验基于前期预实验结果以及参考相关文献报道的剂量范围,选择 3.6mL/1000g 的银杏达莫剂量进行腹腔注射,该剂量在本实验中显示出良好的耐受性和潜在的保护效果。处理时间为建模前 7d,每天一次,连续 7d,这样的预处理时间设置旨在模拟临床中对患者进行预先干预的场景,以探究银杏达莫在 IIRI 发生前的预防性保护作用。此外,选择结扎肠系膜上动脉 45min,再灌注 1h 建立模型,是因为该模型能够较好地模拟临床上 IIRI 的病理过程,且在该时间参数下,损伤程度适中,便于观察银杏达莫的干预效果。

氧化应激是 IIRI 的关键影响因素^[6],大量产生的氧自由基可以引起肠道细胞发生脂质过氧化、DNA 损伤、蛋白质变性,进而影响到小肠细胞的生理功能,甚至造成小肠细胞坏死凋亡,因此其产生和清除的动态平衡对 IIRI 的发展和预后至关重要。本次实验中,检测的 MDA 是脂质分解和氧化应激的最终产物,被认为是自由基诱导的脂质过氧化的良好指标,其含量的增加反映了氧化应激的程度,MDA 含量升高往往反映了炎症反应的加剧和

炎症因子的释放水平升高^[7]。SOD 则是体内一种重要的抗氧化酶,能够清除动物体内的超氧阴离子自由基,减少氧化应激。在 IIRI 中,SOD 的活性下降意味着动物体内抗氧化损伤的防御能力减弱,反映了组织中自由基含量和脂质过氧化的程度^[8]。本实验结果显示,小肠缺血-再灌注后,小肠组织 MDA 含量增多,SOD 活性降低;而银杏达莫预处理可明显逆转这种变化,这提示银杏达莫对小肠 IIRI 的保护作用与减轻体内氧化应激水平有关。IIRI 的机制还包括炎症因子的释放。由于氧化应激反应、细菌和内毒素的作用,大量炎症因子被释放,这些炎症因子进一步参与并促进氧化应激。氧化应激和炎症反应在缺血-再灌注损伤中相互促进,共同导致肠道损伤,形成恶性循环。IL-6 作为重要的促炎因子参与炎症反应,IL-10 则是体内具有抗炎作用的炎症因子^[9]。本实验结果显示,IIRI 后 IL-6 含量增多,而银杏达莫预处理后 IL-6 含量减少,IL-10 含量增多,这结果表明银杏达莫预处理可抑制炎症反应,降低 IIRI 大鼠小肠组织中的促炎因子水平,抑制氧化应激反应,有利于小肠细胞的修复,进而达到减轻肠道黏膜损伤的作用。在小肠缺血-再灌注早期,由于组织缺氧,ATP 的产生减少,次黄嘌呤在小肠缺血部位蓄积,导致再灌注时,氧分子重新流入并于次黄嘌呤作用产生大量的超氧阴离子和过氧化氢,进而通过多种信号级联反应激活炎症反应、细胞凋亡等信号通路,导致细胞凋亡或坏死,进而加剧小肠的组织损伤^[10]。细胞凋亡是由基因控制的细胞死亡,促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 等在凋亡信号转导途径中发挥重要的作用^[11-14]。本实验结果显示,在小肠缺血-再灌注过程中,银杏达莫预处理可显著降低 Bax 蛋白表达,增加 Bcl-2 蛋白的表达,这表明银杏达莫预处理可抑制细胞凋亡,减轻小肠组织损伤,对小肠组织产生保护作用。

研究表明,PI3K/Akt 信号通路参与了炎症、凋亡和氧化应激等多种细胞活动^[15-16],对脑组织缺血-再灌注具有调节作用^[17]。然而,银杏达莫减轻小肠缺血-再灌注的作用是否通过 PI3K/Akt 通路发挥作用尚未见报道。PI3K 调节 Akt 活化并磷酸化产生 p-Akt,p-Akt 可抑制 NF- κ B 的活化,减少炎症因子的表达^[18]。PI3K 通过第二信使 Bax 和 Bax-2,在细胞的增殖、凋亡等过程中起重要的作用^[19]。本实验结果显示,在 IIR 过程中,银杏达莫

预处理可增加 Akt 蛋白表达,降低肠组织血清 MDA 含量及 IL-6、Bax 蛋白表达水平,升高 SOD 活性和 Bcl-2 蛋白表达水平,减轻小肠组织损伤。这提示银杏达莫能够改善 IIRI,其机制与通过 PI3K/Akt 通路调节细胞凋亡有关。银杏达莫对 PI3K/Akt 信号通路的调节作用可能是其发挥保护作用的关键机制之一。PI3K/Akt 信号通路在细胞的存活、增殖、凋亡等多种生命活动中发挥着重要作用。银杏达莫预处理能够增加 Akt 蛋白的表达,这可能通过促进 PI3K 的活化,进而使 Akt 磷酸化,激活下游一系列抗凋亡、抗氧化和抗炎的信号通路,如抑制 NF- κ B 的活化,减少炎症因子的表达,以及通过调节 Bax 和 Bcl-2 的表达来抑制细胞凋亡,从而减轻 IIRI。此外,银杏达莫还可能通过调节其他与 PI3K/Akt 信号通路相关的信号分子或通路来发挥更广泛的保护作用,这一点有待进一步深入研究。

TGF- β 1/Smads 信号通路是公认的与纤维化密切相关的信号通路^[20-23]。转化生长因子 β 1 (Transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是一种重要的促纤维化的信号转导分子^[24], Smad 是 TGF- β 1 信号通路的下游信号分子和重要靶点。纤维化的基本原理是细胞外基质 (ECM) 沉积和降解之间的不平衡,肌成纤维细胞大量产生 ECM 则可导致纤维化^[25]。TGF- β 1/Smads 通路可以诱导胶原 I 和纤连蛋白的合成,促进 ECM 的积累,并诱导胶原分泌及促进肌纤维母细胞分化和增殖,从而促进纤维化的形成^[23,26]。在该通路中 Smad2、Smad3 起着正向调控作用。本实验结果显示,银杏达莫预处理能显著降低 Smad2、Smad3 蛋白表达水平,即通过抑制 TGF- β 1/Smads 信号转导通路来抑制纤维化的形成,从而发挥其对小肠纤维化的保护作用。

然而,本研究也存在一些局限性。首先,实验仅在动物模型上开展,其结果是否能够完全适用于人类患者尚需进一步的临床研究验证。其次,虽然本研究探讨了银杏达莫在多个信号通路中的作用,但对于其具体的作用靶点和分子机制尚未完全阐明,需要后续更深入的分子生物学研究来进一步揭示。此外,实验中仅观察了银杏达莫预处理的保护作用,对于其在 IIRI 发生后的治疗效果以及与其他药物联合应用的潜在协同作用等也有待进一步探索。

综上所述,银杏达莫注射液通过调节 PI3K/Akt 信号通路降低大鼠血清 MDA 含量及小肠组织

中 IL-6、Bax 蛋白表达水平,升高血清 SOD 活性和小肠组织 Bcl-2 蛋白表达水平,从而对炎症、凋亡和氧化应激等多种细胞活动发挥调节作用。此外,银杏达莫注射液还可通过下调 Smad2、Smad3 蛋白表达水平,抑制 TGF- β /Smads 信号通路,进而抑制小肠纤维化。银杏达莫预处理作为一种有效的治疗手段,其对小肠缺血疾病的潜在作用机制有待进一步探索。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Liu XM, Chen QH, Hu Q, et al. Dexmedetomidine protects intestinal ischemia-reperfusion injury via inhibiting p38 MAPK cascades [J]. *Exp Mol Pathol*, 2020, 115: 104444. DOI: 10. 1016/j. yexmp. 2020. 104444.
- [2] Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, et al. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87 (2): 545-564. DOI: 10. 1152/physrev. 00012. 2006.
- [3] Colgan SP, Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7 (5): 281-287. DOI: 10. 1038/nrgastro. 2010. 39.
- [4] Hatoum OA, Binion DG, Otterson MF, et al. Acquired microvascular dysfunction in inflammatory bowel disease: loss of nitric oxide-mediated vasodilation [J]. *Gastroenterology*, 2003, 125 (1): 58-69. DOI: 10. 1016/s0016-5085(03)00699-1.
- [5] Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, et al. Acute mesenteric ischemia: a clinical review [J]. *Arch Intern Med*, 2004, 164 (10): 1054-1062. DOI: 10. 1001/archinte. 164. 10. 1054.
- [6] Wu HH, Huang CC, Chang CP, et al. Heat shock protein 70 (HSP70) reduces hepatic inflammatory and oxidative damage in a rat model of liver ischemia/reperfusion injury with hyperbaric oxygen preconditioning [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 8096-8104. DOI: 10. 12659/MSM. 911641.
- [7] Kimura M, Yokoyama A, Higuchi S. Aldehyde dehydrogenase-2 as a therapeutic target [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23 (11): 955-966. DOI: 10. 1080/14728222. 2019. 1690454.
- [8] Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia [J]. *Crit Care Med*, 1993, 21 (9): 1376-1386. DOI: 10. 1097/00003246-199309000-00023.
- [9] Takagi H, Mizuno Y, Yamamoto H, et al. Effects of telmisartan therapy on interleukin-6 and tumor necrosis factor- α levels: a meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *Hypertens Res*, 2013, 36 (4): 368-373. DOI: 10. 1038/hr. 2012. 196.
- [10] Kazi A, Sun J, Doi K, et al. The BH3 alpha-helical mimic BH3-M6 disrupts Bcl-X(L), Bcl-2, and MCL-1 protein-protein interactions with Bax, Bak, Bad, or Bim and induces apoptosis in a Bax- and Bim-dependent manner [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (11): 9382-9392. DOI: 10. 1074/jbc. M110. 203638.
- [11] Chen LH, Hsu CY, Weng CF. Involvement of P53 and Bax/Bad

- triggering apoptosis in thioacetamide-induced hepatic epithelial cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12 (32): 5175-5181. DOI:10.3748/wjg.v12.i32.5175.
- [12] Yan W, Samson M, Jégou B, et al. Bcl-w forms complexes with Bax and Bak, and elevated ratios of Bax/Bcl-w and Bak/Bcl-w correspond to spermatogonial and spermatocyte apoptosis in the testis [J]. *Mol Endocrinol*, 2000, 14 (5): 682-699. DOI: 10.1210/mend.14.5.0443.
- [13] Subbarayan S, Subramanian S, Senthil Kumar N. Recombinant puerarin-5 induces apoptosis and differential expression of Bcl-2, Bax, and p53 in human cancer cells [J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38 (8): 773-785. DOI:10.1089/dna.2018.4520.
- [14] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy [J]. *Oncogene*, 2007, 26(9) : 1324-1337. DOI: 10.1038/sj.onc.1210220.
- [15] Li X, Huang Q, Wang M, et al. Compound K inhibits autophagy-mediated apoptosis through activation of the PI3K-Akt signaling pathway thus protecting against ischemia/reperfusion injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(6): 2589-2601. DOI:10.1159/000491655.
- [16] Huang CY, Hsiao JK, Lu YZ, et al. Anti-apoptotic PI3K/Akt signaling by sodium/glucose transporter 1 reduces epithelial barrier damage and bacterial translocation in intestinal ischemia [J]. *Lab Invest*, 2011, 91 (2): 294-309. DOI: 10.1038/labinvest.2010.177.
- [17] Li TF, Ma J, Han XW, et al. Chrysin ameliorates cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats by regulating the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Neurochem Int*, 2019, 129: 104496. DOI:10.1016/j.neuint.2019.104496.
- [18] Feng C, Wan H, Zhang Y, et al. Neuroprotective effect of danhong injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats by activation of the PI3K-Akt pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 298. DOI:10.3389/fphar.2020.00298.
- [19] Qin W, Cao L, Massey IY. Role of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac fibrosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(11): 4045-4059. DOI:10.1007/s11010-021-04219-w.
- [20] Xiao Y, Ye J, Zhou Y, et al. Baicalin inhibits pressure overload-induced cardiac fibrosis through regulating AMPK/TGF- β /Smads signaling pathway [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2018, 640: 37-46. DOI:10.1016/j.abb.2018.01.006.
- [21] Meng XM, Nikolic-Paterson DJ, Lan HY. TGF- β : the master regulator of fibrosis [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12 (6): 325-338. DOI:10.1038/nrneph.2016.48.
- [22] Eickelberg O. Endless healing: TGF-beta, SMADs, and fibrosis [J]. *FEBS Lett*, 2001, 506 (1): 11-14. DOI: 10.1016/s0014-5793(01)02875-7.
- [23] Kawabata M, Imamura T, Inoue H, et al. Intracellular signaling of the TGF-beta superfamily by Smad proteins [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 886: 73-82. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb09402.x.
- [24] Kim KK, Sheppard D, Chapman HA. TGF- β 1 signaling and tissue fibrosis [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10 (4): a022293. DOI:10.1101/cshperspect.a022293.
- [25] Frangiannis NG. Cardiac fibrosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2021, 117(6): 1450-1488. DOI:10.1093/cvr/cvaa324.
- [26] Ong CH, Tham CL, Harith HH, et al. TGF- β -induced fibrosis: a review on the underlying mechanism and potential therapeutic strategies [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 911: 174510. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.174510.

(收稿日期 2023-05-29)

(本文编辑:石俊强)