

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2017.03.013

## 芒果苷对小鼠肝缺血-再灌注损伤的保护作用\*

李晓璿 史才兴<sup>△</sup> 柳新平 徐旭东  
(济宁医学院基础医学院, 济宁 272067)

**摘要** 目的 探讨芒果苷对小鼠肝缺血-再灌注损伤的保护作用及其作用机制。方法 成年昆明小鼠 24 只, 体重 18 ~ 20g, 随机分成缺血-再灌注损伤组(I/R 组)、芒果苷组和假手术组(sham 组)。I/R 组采用夹闭肝蒂 30min、再灌注 6h 制作肝缺血-再灌注损伤模型。芒果苷组于缺血前 30min 时腹腔注射芒果苷 20mg/kg; sham 组和 I/R 组腹腔注射等容量生理盐水。再灌注 6h 时, 取材, HE 染色, 光学显微镜下观察肝细胞形态学变化; 比色法检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)的水平及肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性; Western blot 检测肝组织 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白表达。结果 经芒果苷处理后, 芒果苷组与 I/R 组相比肝细胞形态学异常明显减轻; 血清 ALT(133.73 ± 11.53)含量和肝组织 MDA(7.59 ± 0.97)含量较 I/R 组明显降低, 差异有统计学意义( $t = -7.22, P < 0.05$ ;  $t = -3.07, P < 0.05$ ); 肝组织 SOD(119.40 ± 13.95)和 GSH-Px(97.59 ± 14.07)含量较 I/R 组升高, 差异有统计学意义( $t = 3.34, P < 0.05$ ;  $t = 3.32, P < 0.05$ )。经芒果苷处理后, 芒果苷组与 I/R 组相比肝组织 Caspase-3 及 Bax 蛋白表达降低, 差异有统计学意义( $t = -3.18, P < 0.05$ ;  $t = -8.86, P < 0.05$ ); Bcl-2 蛋白表达升高, 差异有统计学意义( $t = 4.47, P < 0.05$ )。结论 芒果苷对小鼠肝缺血-再灌注损伤具有保护作用, 其保护机制可能与其抗氧化作用和抑制细胞凋亡有关。

**关键词** 芒果苷; 缺血-再灌注; 肝脏

中图分类号: R657.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-9760(2017)06-205-05

## Protective effects of mangiferin on hepatic ischemia-reperfusion injury in mice

LI Xiaojin, SHI Caixing<sup>△</sup>, LIU Xinping, XU Xudong

(School of Basic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

**Abstract: Objective** To investigate the protective effects of mangiferin on hepatic ischemia-reperfusion (I/R) injury in mice. **Methods** Twenty-four healthy Kunming mice, weighing 18 ~ 20g, were randomly divided into three groups: I/R, mangiferin and sham. The hepatic I/R injury model of I/R group was clamped the hepatic artery, portal vein, and common bile duct with a microvascular bulldog clamp for 30 min, and then removed the clamp and reperused for 6h. In mangiferin group, 20mg/kg mangiferin was injected intraperitoneally before 30min of ischemia. The equal volume of normal saline was given instead of mangiferin in sham and I/R groups. At 6h of reperfusion, blood samples were collected from the heart and then the hepatic tissue was taken out. Hepatic morphology of hematoxylin-eosin (HE) dying were observed by microscope. The activation of aspartate aminotransferase (AST), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and glutathione peroxidase (GSH-Px) was measured by the OD values. The expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax protein in the hepatic tissues were detected by Western blot. **Results** Mangiferin rescued hepatocyte damage by morphological observation. Mangiferin contents of ALT (135.59 ± 19.07) and MDA (7.59 ± 0.97) were lower than those in I/R group and the difference was statistically significant ( $t = -7.22, P < 0.01$ ;  $t = -3.07, P < 0.01$ ). The activities of SOD (119.40 ± 13.95) and GSH-Px (97.59 ± 14.07) in the hepatic tissues were higher than those in I/R group, and the difference was statistically significant ( $t = 3.34, P < 0.01$ ;  $t = 3.32, P < 0.01$ ). Mangiferin contents of Caspase-3 and Bax protein expression levels were lower than those in I/R

\* [基金项目] 济宁医学院科研计划项目(JY2015KJ008); 济宁医学院青年教师科研扶持基金(JY2016KJ021Y)

△ [通信作者] 史才兴, E-mail: shicaixing123@126.com

group, and the difference was statistically significant ( $t = -3.18, P < 0.01; t = -8.86, P < 0.01$ ). And the expression of Bcl-2 protein were increased than that in I/R group, and the difference was statistically significant ( $t = 4.47, P < 0.01$ ). **Conclusion** Mangiferin can significantly protect the hepatic tissue against the I/R induced injury. The mechanism may be related to the effect of anti-oxidant and inhibiting cell apoptosis.

**Keywords:** Mangiferin; Ischemia-reperfusion injury; Liver

在肝切除、肝移植、严重的肝外伤处理以及严重的休克等过程中都会造成肝缺血-再灌注损伤,直接影响手术的成功率和患者的存活率。其损伤机制与大量氧自由基的产生有关<sup>[1]</sup>。芒果苷又名芒果素,是一种多酚类化合物,具有止咳平喘、抗炎镇痛、保肝利胆的功效,近年来随着研究的深入,发现芒果苷还具有抗氧化、抗癌、抗病毒等作用<sup>[2-3]</sup>。本实验采用小鼠肝缺血-再灌注损伤模型观察芒果苷对小鼠肝缺血-再灌注损伤的保护作用,并探讨其作用机制,为芒果苷的临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康成年雄性昆明小鼠 24 只(由济宁医学院实验动物中心提供),随机分成 3 组:假手术组(sham 组)、缺血-再灌注损伤组(I/R 组)、芒果苷组,每组 8 只。

### 1.2 试剂

芒果苷购于广西百色市天星植物科技有限公司;丙氨酸氨基转移酶(ALT)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒购于南京建成试剂公司;兔抗 Caspase-3、Bcl-2、Bax 多克隆抗体购自 Signalway Antibody 公司;全蛋白抽提试剂盒、BCA 蛋白测定试剂盒购自南京凯基生物有限公司;化学发光液和硝酸纤维素膜购自密理博中国有限公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 模型制备及药物预处理** 小鼠称重,以 10% 水合氯醛 4ml/kg 腹腔注射麻醉,上腹部做正中切口,充分暴露第一肝门,游离肝门血管,用小号无创血管夹夹闭第一肝门。30min 后去除血管夹,恢复血流,再灌注 6h 制作肝缺血-再灌注损伤模型。芒果苷组在缺血前 30min 腹腔注射 20mg/kg 芒果苷,sham 组和 I/R 组腹腔注射等容量生理盐水。sham 组仅麻醉、开腹,分离肝血管,不阻断血供。实验过程中动物体温维持在 37℃。

**1.3.2 肝细胞形态观察** 再灌注结束后处死小鼠,取肝组织,置于 10% 中性福尔马林溶液固定 24h 以上,30% 蔗糖沉底过夜,冰冻切片(厚 9μm),苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察细胞形态的变化。

**1.3.3 ALT、MDA、SOD 和 GSH-Px 的含量检测** 再灌注 6h 时,心脏采血,室温静置 90min,4000r/min 离心 5min 后取血清,按试剂盒说明书操作,测血清中 ALT 水平;取肝组织用冰冷的生理盐水漂洗 3 次,滤纸拭干,称重后按重量(g):体积(ml) = 1:9 的比例加入生理盐水,用匀浆器研磨后,3000r/min 离心 10min,取上清,即为 10% 组织匀浆,按试剂盒说明书操作,测肝组织匀浆中 MDA、SOD 和 GSH-Px 的含量。

**1.3.4 肝组织中 Caspase-3、Bcl-2、Bax 蛋白的检测** 每组选取 4 只动物作为检测蛋白表达标本,按试剂盒说明提取总蛋白,BCA 试剂盒蛋白定量后,取 120μg 蛋白用 10% SDS-PAGE 进行电泳。90V 恒压将蛋白转至醋酸纤维膜(NC 膜),转膜时间 70min。室温下将 NC 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 2h,加兔抗鼠 Caspase-3、Bcl-2、Bax 一抗(1:1000)稀释液,4℃ 孵育过夜。洗液漂洗 3 次,每次 10min。加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(1:1000),室温孵育 2h。洗液漂洗 3 次,每次 10min。加 ECL 试剂显色后用全自动化学发光成像系统(Bio-Rad XRP+)成像检测。

### 1.4 统计学方法

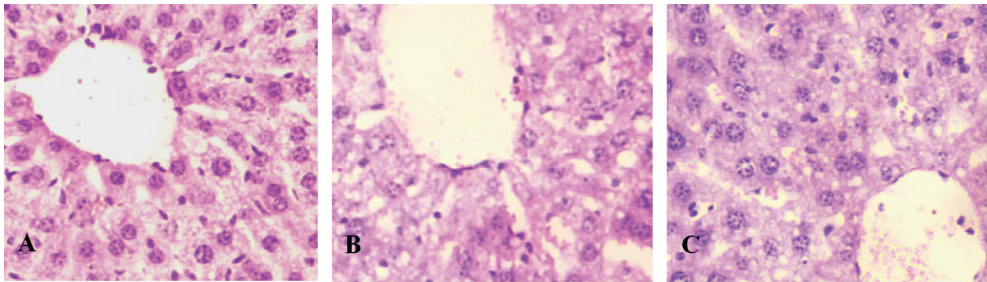
采用 SPSS18.0 统计软件对结果进行分析,所有数据均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$  则差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 芒果苷对缺血-再灌注后肝细胞形态和功能的影响

sham 组肝组织肝索排列清晰,肝细胞结构完整,未见变性坏死、炎细胞浸润等病理学变化。I/R 组可见局灶性坏死,肝细胞排列紊乱,部分肝索、

肝血窦分界不清,肝细胞呈空泡变性,门管区有大量炎细胞浸润。芒果苷组肝细胞水肿减轻,中央静脉、肝索结构清晰,病理损害明显较 I/R 组减轻。见图 1。



注: A. sham 组; B. I/R 组; C. 芒果苷组  
图 1 芒果苷可减轻肝缺血-再灌注损伤引起的肝细胞形态学改变 (HE × 400)

血清 ALT 水平可反映肝细胞损害和坏死的程度。结果显示,与 sham 组相比,I/R 组血清 ALT 水平明显升高,差异具有统计学意义( $t = 11.41, P < 0.05$ )。与 I/R 组相比,芒果苷组血清 ALT 水平明显降低,差异具有统计学意义( $t = -7.22, P < 0.05$ ),说明芒果苷预处理可减少缺血-再灌注后 ALT 的释放。见表 1。

| 表 1 芒果苷对缺血-再灌注后血清中 ALT 和肝组织中 MDA、SOD、GSH-Px 含量的影响( $\bar{x} \pm s$ ) |   |                              |                                 |                              |                                 |
|----------------------------------------------------------------------|---|------------------------------|---------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 组别                                                                   | n | ALT<br>/U · mg <sup>-1</sup> | MDA<br>/nmol · mg <sup>-1</sup> | SOD<br>/U · mg <sup>-1</sup> | GSH-PX<br>/U · mg <sup>-1</sup> |
| sham 组                                                               | 8 | 87.16 ± 8.46                 | 4.62 ± 0.37                     | 137.79 ± 16.83               | 152.36 ± 19.71                  |
| I/R 组                                                                | 8 | 212.64 ± 23.39 *             | 12.32 ± 1.71 *                  | 82.69 ± 9.83 *               | 62.32 ± 11.71 *                 |
| 芒果苷组                                                                 | 8 | 133.73 ± 11.53 <sup>#</sup>  | 7.59 ± 0.97 <sup>#</sup>        | 119.40 ± 13.95 <sup>#</sup>  | 97.59 ± 14.07 <sup>#</sup>      |
| F 值                                                                  | - | 66.67                        | 33.42                           | 17.05                        | 32.07                           |
| P                                                                    | - | 0.00                         | 0.00                            | 0.00                         | 0.00                            |

注:与 sham 组比较,\* $P < 0.01$ ;与 I/R 组比较,# $P < 0.01$

2.2 芒果苷对缺血-再灌注后肝组织 MDA、SOD、GSH-Px 含量的影响

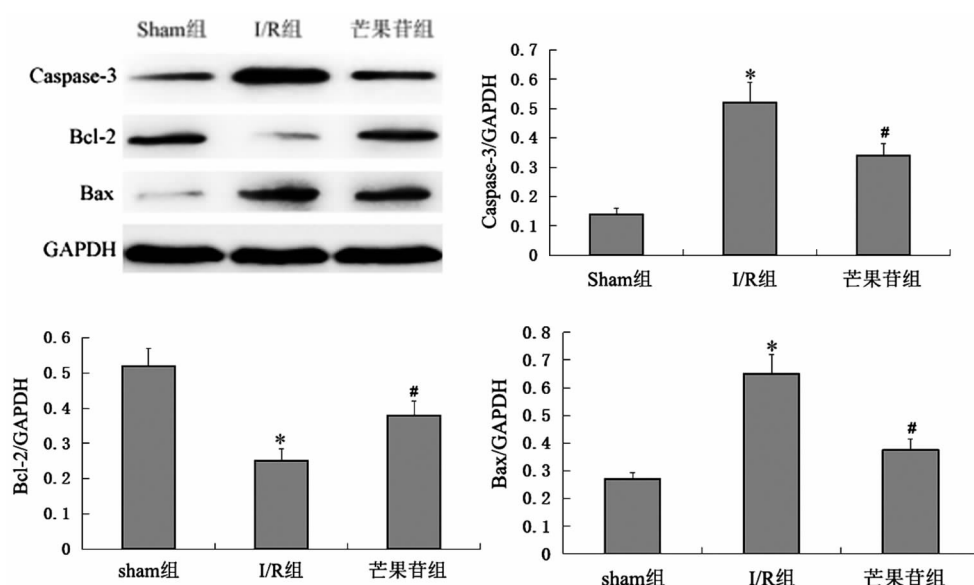
数据显示,与 sham 组相比,I/R 组 MDA 含量上升,差异有统计学意义( $t = 8.09, P < 0.05$ ),表明肝组织遭受严重的氧化损伤;芒果苷组 MDA 含量明显降低,与 I/R 组相比差异有统计学意义( $t = -3.07, P < 0.05$ )。与 sham 组相比,I/R 组 SOD 含量明显下降,差异有统计学意义( $t = -5.83, P < 0.05$ );芒果苷组 SOD 含量明显升高,与 I/R 组相比差异有统计学意义( $t = 3.34, P < 0.05$ )。与此同时,I/R 组 GSH-Px 含量明显下降,与 sham 组相比差异有统计学意义( $t = -7.96, P < 0.05$ );芒果

苷组 GSH-Px 含量明显升高,与 I/R 组相比差异有统计学意义( $t = 3.32, P < 0.05$ )。提示芒果苷可以减少缺血-再灌注后肝组织中脂质过氧化物的产生,并提高抗氧化酶的活性。见表 1。  
2.3 芒果苷对缺血-再灌注后肝组织中 Caspase-3、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响

数据显示,与 sham 组相比,I/R 组 Caspase-3 蛋白表达上升,差异有统计学意义( $t = 7.75, P < 0.05$ ),与 I/R 组相比,芒果苷组 Caspase-3 蛋白表达下降,差异有统计学意义( $t = -3.18, P < 0.05$ );与 sham 组相比,I/R 组 Bcl-2 蛋白表达下降,差异有统计学意义( $t = -8.41, P < 0.05$ ),与 I/R 组相比,芒果苷组 Bcl-2 蛋白表达升高,差异有统计学意义( $t = 4.47, P < 0.05$ );与 sham 组相比,I/R 组 Bax 蛋白表达升高,差异有统计学意义( $t = 11.69, P < 0.05$ ),与 I/R 组相比,芒果苷组 Bax 蛋白表达下降,差异有统计学意义( $t = -8.86, P < 0.05$ )。提示芒果苷可以降低缺血-再灌注后肝组织中凋亡蛋白的表达,减少肝细胞凋亡。见表 2、图 2。

| 表 2 芒果苷对缺血-再灌注后肝组织中 Caspase-3、Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ) |   |               |               |               |
|----------------------------------------------------------------------|---|---------------|---------------|---------------|
| 组别                                                                   | n | Caspase-3 蛋白  | Bcl-2 蛋白      | Bax 蛋白        |
| sham 组                                                               | 8 | 0.13 ± 0.02   | 0.51 ± 0.08   | 0.27 ± 0.02   |
| I/R 组                                                                | 8 | 0.52 ± 0.11 * | 0.22 ± 0.01 * | 0.64 ± 0.18 * |
| 芒果苷组                                                                 | 8 | 0.35 ± 0.03 # | 0.37 ± 0.04 # | 0.35 ± 0.04 # |
| F 值                                                                  |   | 30.37         | 35.41         | 74.46         |
| P                                                                    |   | 0.00          | 0.00          | 0.00          |

注:与 sham 组比较,\* $P < 0.05$ ;与 I/R 组比较,# $P < 0.05$



与 sham 组相比 \* $P < 0.01$ ; 与 I/R 组相比 # $P < 0.01$

图2 芒果苷对缺血-再灌注后肝组织中 Caspase-3, Bcl-2 及 Bax 蛋白表达的影响

### 3 讨论

缺血-再灌注损伤(I/R)是指缺血组织恢复血液供应后反而出现损伤加重的现象<sup>[4]</sup>。其发生机制十分复杂,其中氧自由基生成增加是引起缺血-再灌注损伤的重要原因。芒果苷及其衍生物具有很强的抗氧化作用,对脑、心脏和肾脏等氧化损伤有很好的保护作用<sup>[5-9]</sup>,因此,我们推测其对肝缺血-再灌注损伤具有保护作用。本实验通过复制小鼠肝缺血-再灌注损伤模型发现,缺血-再灌注后肝组织变性、坏死,肝索断裂、排列紊乱,血清中 ALT 水平上升,表明肝功能受损严重,造模成功。与缺血-再灌注组比较,芒果苷组 ALT 水平明显降低,说明芒果苷能改善肝功能,对肝缺血-再灌注损伤有显著的保护作用,但其机制尚不明确。进一步研究发现,缺血-再灌注后肝组织中 MDA 含量升高, SOD 和 GSH-Px 含量下降。说明再灌注后氧自由基产生过多,抗氧化酶耗尽,引起脂质过氧化损伤,使肝组织结构和功能受到破坏。与以往的研究结果一致<sup>[10]</sup>。经芒果苷处理后,肝组织中 MDA 含量下降, SOD 和 GSH-Px 含量升高,肝组织损伤减轻。说明芒果苷能够抑制缺血-再灌注后脂质过氧化,增加活性氧的清除,从而保护肝细胞。

细胞凋亡是引起缺血-再灌注损伤的另一重要原因<sup>[6]</sup>。Bcl-2 和 Bax 是一对调节细胞凋亡的基因, Bcl-2 表达上升,能抑制细胞凋亡; Bax 表达上

升,能促进细胞凋亡。Caspase-3 是最关键的凋亡蛋白酶,活化后可激活细胞凋亡通路引起细胞凋亡。本文结果显示,缺血-再灌注后肝组织中 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达上升, Bcl-2 蛋白表达下降,细胞凋亡通路激活;芒果苷能降低肝组织中 Caspase-3 及 Bax 蛋白的表达,上调 Bcl-2 蛋白表达,说明芒果苷可以通过抑制细胞凋亡来发挥对肝脏的保护作用。

综上所述,本研究表明芒果苷通过提高机体抗氧化系统的活性、减轻脂质过氧化损伤和抑制细胞凋亡对小鼠肝缺血-再灌注损伤产生保护作用,为芒果苷的临床应用提供了一定的理论依据,并为进一步开发利用我国中药材提供了重要线索。

### 参考文献:

- [1] Wu JX, Zhang LY, Chen YL, et al. Curcumin pretreatment and post-treatment both improve the antioxidative ability of neurons with oxygen-glucose deprivation[J]. Neural Regen Res, 2015, 10(3): 481-489. DOI: 10.4103/1673-5374.153700.
- [2] Rammohan A, Gunasekar D, Reddy NV, et al. Structure elucidation and antioxidant activity of the phenolic compounds from Rhynchosia suaveolens[J]. Nat Prod Commun, 2015, 10(4): 609-611.

(下转第 213 页)

- depressant After Nonresponse in Adults With Major Depression; A Systematic Literature Search and Meta-Analysis[J]. Journal of Clinical Psychiatry, 2016, 6. doi:10.4088/JCP.
- [9] Hofmann P. Watchful waiting when treating depression; Still our maxim? [J]. Journal Fur Neurologie Neurochirurgie Und Psychiatrie, 2014, 15(4): 220-223.
- [10] Antonio T, Rocco D F, Luca P. Pharmacologic approaches to treatment resistant depression; Evidences and personal experience [J]. World Journal of Psychiatry, 2015, 5(3): 330-41.
- [11] Montgomery S. Is there a role for switching antidepressants in treatment-resistant depression? [J]. Progress in Neurology and Psychiatry, 2013, 17(5): 39-40. DOI: 10.1002/pnp.304.
- [12] de Silva VA, Hanwella R. Efficacy and tolerability of venlafaxine versus specific serotonin reuptake inhibitors in treatment of major depressive disorder; a meta-analysis of published studies [J]. Int Clin Psychopharmacol, 2012, 27(1): 8-16. DOI: 10.1097/YIC.0b013e32834ce13f.
- [13] de Sousa R T, V. Zanetti M, R. Brunoni A, et al. Challenging Treatment-Resistant Major Depressive Disorder; A Roadmap for Improved Therapeutics [J]. Current Neuropsychopharmacology, 2015, 13(5): 616-635. DOI: 10.2174/1570159x13666150630173522.
- [14] Schosser A, Serretti A, Souery D, et al. European Group for the Study of Resistant Depression (GSRD)--where have we gone so far; review of clinical and genetic findings [J]. Eur Neuropsychopharmacol, 2012, 22(7): 453-468. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2012.02.006.
- [15] Rizvi SJ, Grima E, Tan M, et al. Treatment-resistant depression in primary care across Canada [J]. Can J Psychiatry, 2014, 59(7): 349-357. DOI: 10.1177/070674371405900702.
- [16] Malhi GS, Hitching R, Berk M, et al. Pharmacological management of unipolar depression [J]. Acta Psychiatr Scand Suppl, 2013(443): 6-23. DOI: 10.1111/acps.12122.
- [17] Taylor, David. The Maudsley prescribing guidelines in psychiatry / 12th edition [M]. John Wiley & Sons Inc, 2015.
- [18] Buckley NA, Dawson AH, Isbister GK. Serotonin syndrome [J]. BMJ, 2014, 348: g1626. DOI: 10.1136/bmj.g1626.
- (收稿日期 2017-03-03)  
(本文编辑:石俊强)

(上接第 208 页)

- [3] Abdel-Mageed WM, Bayoumi SA, Chen C, et al. Benzophenone C-glucosides and gallotannins from mango tree stem bark with broad-spectrum anti-viral activity [J]. Bioorg Med Chem, 2014, 22(7): 2236-2243. DOI: 10.1016/j.bmc.2014.02.014.
- [4] Yang Z, Weian C, Susu H, et al. Protective effects of mangiferin on cerebral ischemia-reperfusion injury and its mechanisms [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 771: 145-151. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.12.003.
- [5] Luo Y, Fu C, Wang Z, et al. Mangiferin attenuates contusive spinal cord injury in rats through the regulation of oxidative stress, inflammation and the Bcl-2 and Bax pathway [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(5): 7132-7138. DOI: 10.3892/mmr.2015.4274.
- [6] Sahoo BK, Zaidi AH, Gupta P, et al. A natural xanthone increases catalase activity but decreases NF-kappa B and lipid peroxidation in U-937 and HepG2 cell lines [J]. Eur J Pharmacol, 2015, 764: 520-528. DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.07.046.
- [7] He L, Peng X, Zhu J, et al. Mangiferin attenuate sepsis-induced acute kidney injury via antioxidant and anti-inflammatory effects [J]. Am J Nephrol, 2014, 40(5): 441-450. DOI: 10.1159/000369220.
- [8] Wang B, Wan J, Gong X, et al. Mangiferin attenuates renal ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammation and inducing adenosine production [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 25(1): 148-154. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.11.011.
- [9] Arozal W, Suyatna FD, Juniantito V, et al. The Effects of Mangiferin (Mangifera indica L.) in Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Rats [J]. Drug Res (Stuttg), 2015, 65(11): 574-580. DOI: 10.1055/s-0034-1394457.
- [10] 史才兴, 杜晓东, 姜政辰, 等. N-乙酰血清素对肝缺血-再灌注小鼠氧化应激损伤的保护作用 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2013, 22(1): 13-16. DOI: 10.3870/zgzzhx.2013.01.003.
- (收稿日期 2017-01-09)  
(本文编辑:石俊强)