

· 临床研究 ·

银杏叶提取物经门静脉预处理对肝脏手术中氧化应激的影响

曹建 邓美玲 梁应平 邓福谋 王忠 胡衍辉 徐国海

【摘要】 目的 探讨银杏叶提取物经门静脉预处理对肝脏手术中氧化应激的影响。**方法** 选择需肝门阻断行肝部分切除手术的患者 60 例,男 38 例,女 22 例,年龄 28~67 岁,ASA I 或 II 级,心功能 I 或 II 级,肝功能 Child-Pugh A 级。随机分为三组:门静脉注射组(P 组)、颈内静脉注射组(J 组)和对照组(C 组),每组 20 例。P 组在游离出门静脉后经门静脉缓慢注射银杏叶提取物注射液 5 ml, J 组游离出门静脉后经颈内静脉缓慢注射银杏叶提取物注射液 5 ml, C 组游离出门静脉后经颈内静脉缓慢注射生理盐水 5 ml。分别于肝门阻断前 10 min(T_0)、肝门开放后 1 h(T_1)、6 h(T_2)、24 h(T_3)经颈内静脉采血检测血清 ALT、AST、TNF- α 、丙二醛(MDA)浓度和超氧化物歧化酶(SOD)活性。**结果** 与 T_0 时比较, $T_1 \sim T_3$ 时三组血清 ALT、AST、TNF- α 和 MDA 浓度明显升高, SOD 活性明显降低($P < 0.05$)。与 C 组比较, $T_1 \sim T_3$ 时 J 组、P 组血清 ALT、AST、TNF- α 和 MDA 浓度明显下降, SOD 活性明显升高($P < 0.05$)。与 J 组比较, $T_1 \sim T_3$ 时 P 组血清 ALT、AST、TNF- α 和 MDA 浓度明显下降, SOD 活性明显升高($P < 0.05$)。**结论** 银杏叶提取物经门静脉预处理通过升高 SOD 活性,抑制库普弗细胞(Kupffer cells, KC)活化,减少 TNF- α 释放,增强体内抗氧化应激能力,有助于减轻肝脏缺血-再灌注损伤。

【关键词】 银杏叶提取物;门静脉;肝脏;氧化应激

Effect of pre-treatment of ginkgo biloba extract from portal vein on oxidative stress in liver surgery

CAO Jian, DENG Meiling, LIANG Yingping, DENG Fumou, WANG Zhong, HU Yanhui, XU Guohai. Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: HU Yanhui, Email: 1282254282@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of pre-treatment of ginkgo biloba extract from portal vein on oxidative stress in liver surgery. **Methods** Sixty cases of hepatic portal occlusion for hepatectomy surgery in patients (38 males, 22 females, ASA grade I or II, cardiac function I or II, Child-Pugh class A), were randomly divided into three groups ($n = 20$ each): portal vein injection group (group P), jugular vein injection group (group J) and control group (group C). Patients in group P were injected with ginkgo biloba extract injection 5 ml slowly from portal vein after freeing the portal vein, patients in group J were injected with ginkgo biloba extract injection 5 ml slowly from the jugular vein after freeing the portal vein, while patients in group C were injected with normal saline 5 ml slowly from the jugular vein after freeing the portal vein. Venous blood samples were drawn from jugular vein at the following time points: pre-occlusion ten minutes (T_0), 1 h (T_1), 6 h (T_2), 24 h (T_3) after reperfusion respectively, and then detected the levels of ALT, AST, tumor necrosis factor (TNF- α), malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD). **Results** Compared with T_0 , the serum levels of ALT, AST, TNF- α and MDA at $T_1 \sim T_3$ were significantly increased, the activity of SOD was significantly decreased in all groups ($P < 0.05$). Compared with group C, serum levels of ALT, AST, TNF- α and MDA at $T_1 \sim T_3$ were significantly decreased, the activity of SOD was significantly increased in groups J and P ($P < 0.05$). Compared with group J, serum levels of ALT, AST, TNF- α and MDA at $T_1 \sim T_3$ were significantly decreased, the activity of SOD was significantly increased in group P ($P < 0.05$). **Conclusion** The pre-treatment of ginkgo biloba extract from portal vein can increase the SOD activity, inhibit the activation of Kupffer cells, reduce the release of TNF- α , enhance the ability of anti-oxidative stress and produce significant protective effect on liver ischemia-reperfusion injury.

基金项目:江西省卫生计生委中医药科研计划课题(2016A103)

作者单位:330006 南昌大学第二附属医院麻醉科

通信作者:胡衍辉, Email: 1282254282@qq.com

【Key words】 Ginkgo biloba extract; Portal vein; Liver; Oxidative stress

肝脏缺血-再灌注损伤(hepatic ischemia-reperfusion injury, HIRI)是肝脏移植、肝脏肿瘤切除等手术共同经历的一个多因素参与的病理过程,是术后肝脏功能异常、肝功能衰竭的重要原因^[1]。银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE)是以银杏为原料,分离纯化提取的物质,其主要活性成分是黄酮类和萜内酯类^[2]。GBE 通过清除自由基、减轻脂质过氧化、升高抗氧化酶活性、降低缺血组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)浓度发挥抗氧化应激作用,对心肌缺血-再灌注损伤具有保护作用^[3],但对缺血-再灌注损伤的肝脏是否有抗氧化效应的报道较少。本研究拟探讨门静脉注射 GBE 对肝脏手术中氧化应激的影响。

资料与方法

一般资料 本研究经医院伦理委员会批准,患者或其家属签署知情同意书。选择本院肝胆外科需行肝门阻断行肝部分切除术的患者,性别不限,年龄 28~67 岁,ASA I 或 II 级,心功能 I 或 II 级,肝功能 Child-Pugh A 级,肾功能正常。其中,原发性肝癌患者 28 例,肝胆管结石患者 32 例。排除标准:既往或术中对银杏叶提取物过敏,既往有肝胆胰脾手术史或糖尿病史,术前使用抗凝药物,凝血功能异常,血小板减少,有心血管系统或血液系统等内科疾病。剔除标准:术中大出血(出血量>800 ml),术中两次及以上肝门阻断,术后需使用抗凝药物。采用随机数字表法将患者分为三组:门静脉注射组(P 组)、颈内静脉注射组(J 组)和对照组(C 组)。

麻醉方法 所有患者入室后常规监测 ECG、SpO₂、P_{ET}CO₂ 及 BIS。经颈内静脉置入中心静脉导管监测 CVP 并指导静脉输液,行桡动脉穿刺监测有创动脉血压。面罩纯氧通气 5 min,静脉注射咪达唑仑 0.05 mg/kg、舒芬太尼 0.5~1 μg/kg、罗库溴铵 0.6 mg/kg、依托咪酯 0.2~0.4 mg/kg。气管插管后接麻醉机行机械控制通气。麻醉维持采用持续静脉泵注丙泊酚 4~8 mg·kg⁻¹·h⁻¹、瑞芬太尼 0.1~0.3 μg·kg⁻¹·min⁻¹复合 1%~2% 七氟醚吸入麻醉,间断注射 1/3~1/5 诱导剂量的罗库溴铵维持肌松,术中根据 BIS 监测调整麻醉深度,维持 BIS 值在 40~50。所有患者手术由同一组手术医师完成,开腹后充分暴露肝组织,显露并解剖第一肝门,游离肝动脉、门静脉、胆总管。采用 Pringle 阻断法

(无创血管夹夹闭肝动脉、门静脉和胆总管)阻断肝脏血供,每次阻断时间≤20 min,一次阻断不能完成者解除阻断,恢复血流再灌注 5 min 后进行再次阻断。P 组在游离出门静脉后经门静脉缓慢注射银杏叶提取物注射液 5 ml, J 组游离出门静脉后经颈内静脉缓慢注射银杏叶提取物注射液 5 ml, C 组游离出门静脉后经颈内静脉缓慢注射生理盐水 5 ml。

观察指标 分别于肝门阻断前 10 min(T₀)、肝门开放后 1 h(T₁)、6 h(T₂)、24 h(T₃)经颈内静脉采血,采用全自动生化分析仪检测血清 ALT 和 AST 浓度,硫代巴比妥酸化学比色法检测 MDA 浓度,黄嘌呤氧化酶法检测超氧化物歧化酶(SOD)活性,ELISA 法检测血清 TNF-α 浓度。

统计分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行处理。正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量数据方差分析;计数资料比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

本研究共纳入患者 60 例,每组 20 例。三组患者性别、年龄、ASA 分级、病种、肝门阻断时间、手术时间、术中出血量差异均无统计学意义(表 1)。

与 T₀ 时比较, T₁~T₃ 时三组血清 ALT、AST、TNF-α 和 MDA 浓度明显升高, SOD 活性明显降低($P < 0.05$)。与 C 组比较, T₁~T₃ 时 J 组、P 组血清 ALT、AST、TNF-α 和 MDA 浓度明显下降, SOD 活性明显升高($P < 0.05$)。与 J 组比较, T₁~T₃ 时 P 组血清 ALT、AST、TNF-α 和 MDA 浓度明显下降, SOD 活性明显升高($P < 0.05$)(表 2)。

讨 论

目前,肝脏血流阻断是精准肝切除手术中控制肝脏断面出血的主要方法。肝脏血流阻断后,局部肝组织缺血,肝细胞发生缺血性损伤,恢复血液再灌注后,功能代谢障碍及结构破坏加重,造成缺血-再灌注损伤,严重影响患者的预后。因此,如何减轻 HIRI 是临床亟待解决的难题。

HIRI 是一个多因素参与、多途径共同作用的病理生理过程^[4]。有研究显示,氧自由基是导致肝细胞早期的损伤及后续的炎性应答反应的始动因素,使用自由基清除剂及抗氧化剂对 HIRI 有保护

表 1 三组患者一般情况的比较

组别	例数	男/女 (例)	年龄 (岁)	ASA I / II 级 (例)	病种原发性 肝癌/肝胆管 结石(例)	肝门阻断时间 (min)	手术时间 (min)	术中出血量 (ml)
P 组	20	12/8	45.3±8.1	11/9	9/11	13.5±1.8	135.7±6.3	562.3±23.4
J 组	20	14/6	42.8±6.3	10/10	9/11	14.2±2.5	147.3±5.4	571.2±17.9
C 组	20	12/8	44.2±5.5	12/8	10/10	13.8±1.3	143.7±8.2	558.5±18.3

表 2 三组患者各时间点血清 ALT、AST、TNF- α 、MDA 浓度及 SOD 活性的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	例数	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃
ALT (U/L)	P 组	20	85.3±4.7	103.7±5.4 ^{abc}	127.2±3.8 ^{abc}	154.7±8.2 ^{abc}
	J 组	20	81.7±3.9	118.9±4.3 ^{ab}	151.3±8.5 ^{ab}	189.9±6.4 ^{ab}
	C 组	20	87.4±4.1	125.4±6.5 ^a	225.6±5.9 ^a	275.4±5.1 ^a
AST (U/L)	P 组	20	65.3±8.5	95.4±3.8 ^{abc}	127.1±5.6 ^{abc}	145.3±4.6 ^{abc}
	J 组	20	69.1±5.7	119.3±7.2 ^{ab}	164.8±9.7 ^{ab}	194.2±10.1 ^{ab}
	C 组	20	71.3±4.9	146.7±11.3 ^a	195.3±4.3 ^a	269.3±9.5 ^a
TNF- α (pg/ml)	P 组	20	84.7±12.3	105.3±8.9 ^{abc}	124.7±14.3 ^{abc}	101.7±10.5 ^{abc}
	J 组	20	85.7±8.3	127.8±7.5 ^{ab}	145.4±12.1 ^{ab}	117.4±6.3 ^{ab}
	C 组	20	82.7±9.3	166.2±11.4 ^a	186.5±9.6 ^a	136.5±7.6 ^a
MDA (μ mol/L)	P 组	20	7.2±1.1	10.3±1.2 ^{abc}	11.6±1.7 ^{abc}	13.1±0.7 ^{abc}
	J 组	20	7.5±0.3	13.5±1.4 ^{ab}	15.8±1.9 ^{ab}	16.4±1.3 ^{ab}
	C 组	20	7.3±1.2	17.2±0.6 ^a	19.2±1.5 ^a	21.5±1.6 ^a
SOD (U/L)	P 组	20	142.7±13.5	121.6±9.2 ^{abc}	115.4±8.7 ^{abc}	104.7±14.5 ^{abc}
	J 组	20	140.3±10.7	114.3±12.5 ^{ab}	90.5±10.1 ^{ab}	86.9±11.8 ^{ab}
	C 组	20	144.9±11.2	100.7±8.9 ^a	76.6±11.8 ^a	67.8±9.3 ^a

注:与 T₀ 比较,^aP<0.05;与 C 组比较,^bP<0.05;与 J 组比较,^cP<0.05

作用^[5,6]。缺血-再灌注损伤存在两个阶段:缺血-再灌注始动阶段(再灌注后 1~3 h),主要与产生氧自由基和库弗细胞(Kupffer cells, KC)活化介导的氧化应激有关;缺血-再灌注晚期阶段(再灌注后 6~24 h),主要与大量的 KC、炎性因子、中性粒细胞聚集导致一系列细胞反应和组织损伤有关^[7~9]。氧自由基不仅通过生物膜多不饱和脂肪酸的过氧化产生细胞损伤,还通过脂质过氧化物的分解产物引起细胞损伤^[10,11]。此外, KC 经再灌注损伤后释放氧自由基和多种细胞因子,如 TNF- α 、IL-1、IL-6 等。其中, TNF- α 是重要的始动细胞因子之一^[12]。TNF- α 通过促使肝窦内皮细胞肿胀,阻碍肝细胞 DNA 复制,活化中性粒细胞从而释放氧自由基,诱

发 KC 生成过氧化物,介导脂类介质及其他多肽物质的产生等机制损伤肝细胞^[13]。

银杏是最古老的中生代植物之一,很早就被用作中药,其提取物近年来引起国际高度重视。银杏叶提取物的活性成分主要是黄酮类和萜内酯类。黄酮类化合物通过清除自由基、减轻脂质过氧化、升高 SOD 及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)等抗氧化酶活性,降低缺血组织中 MDA 浓度来发挥抗氧化应激作用。任明等^[14]研究显示, GBE 通过降低糖尿病大鼠体内的 MDA 和超氧阴离子水平,减轻氧化应激反应,具有抗氧化作用。周杰斌等^[15]研究显示, GBE 预处理组的大鼠血清 ALT、AST 浓度及肝组织 TNF- α 和 IL-1 浓度明显降低,表明 GBE

可通过抑制 KC 的激活减少炎症因子释放,降低肝组织 TNF- α 和 IL-1 浓度,减少脂质过氧化及氧自由基产生,从而减轻缺血-再灌注损伤。

本研究经颈内静脉及门静脉两种途径给予 GBE,以观察并比较两种途径给药对肝脏缺血-再灌注损伤的影响。研究结果显示,肝脏血流再灌注后三组患者血清 ALT、AST、TNF- α 和 MDA 浓度升高,表明体内出现了氧化应激,肝组织受损。SOD 作为体内第一道抗氧化酶反应体系,通过清除氧自由基对缺血-再灌注损伤产生保护作用,因此 SOD 活性是抗氧化应激力的体现^[16]。本研究中,GBE 预处理的患者 SOD 活性明显升高,表明 GBE 通过增加 SOD 活性或直接清除氧自由基,增强机体抗氧化应激力,减轻脂质过氧化,从而减轻肝组织损伤。同时,血清 TNF- α 浓度的下降表明 GBE 还可抑制 KC 的活化,减少 TNF- α 等炎症因子释放,从而进一步减少氧自由基的产生,这与周杰斌等^[15]的研究结果一致。本研究显示,经门静脉给予 GBE 的患者肝脏缺血-再灌注损伤的程度较经颈内静脉给药者明显减轻。经门静脉给予 GBE 可使其直接作用于肝窦内皮细胞和肝实质细胞,同时保持了肝脏组织内持久恒定的血药浓度,具有高选择性区域导向治疗的药代动力学特点,表明门静脉给药较周围静脉给药产生的肝保护作用更明显。

本研究不足之处在于尚未体现 GBE 经门静脉预处理对患者预后的影响,因此需要在今后的研究中进一步明确其有效性。

综上所述,银杏叶提取物经门静脉预处理是一种简单易行的高选择性区域导向治疗方法,通过升高 SOD 活性,抑制 KC 活化,减少 TNF- α 释放,增强体内抗氧化应激能力,有助于减轻肝脏缺血-再灌注损伤。

参 考 文 献

- [1] Kimura K, Shirabe K, Yoshizumi T, et al. Ischemia-reperfusion injury in fatty liver is mediated by activated NADPH oxidase 2 in rats. *Transplantation*, 2016, 100(4): 791-800.
- [2] 刘秀萍, 臧恒昌, 于洪利. 银杏叶提取物的研究进展与应用前景. *药学研究*, 2014, 33(12): 721-723.
- [3] 谢咪雪, 蒋琦, 陈冬儿, 等. 银杏叶提取物对心肌缺血再灌注损伤保护作用的研究进展. *浙江中医药大学学报*, 2012, 36(2): 230-232.
- [4] Liu X, Pan Z, Su D, et al. Remifentanyl ameliorates liver ischemia-reperfusion injury through inhibition of interleukin-18 signaling. *Transplantation*, 2015, 99(10): 2109-2117.
- [5] Zhang W, Wang M, Xie HY, et al. Role of reactive oxygen species in mediating hepatic ischemia-reperfusion injury and its therapeutic applications in liver transplantation. *Transplant Proc*, 2007, 39(5): 1332-1337.
- [6] Li J, Li RJ, Lv GY, et al. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(11): 2036-2047.
- [7] Shimada S, Fukai M, Wakayama K, et al. Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver. *Surg Today*, 2015, 45(7): 892-903.
- [8] Ji H, Liu Y, Zhang Y, et al. T-cell immunoglobulin and mucin domain 4 (TIM-4) signaling in innate immune-mediated liver ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*, 2014, 60(6): 2052-2064.
- [9] Upadhyay GA, Strasberg SM. Platelet-adherent isolated rat hepatic sinusoidal endothelial cells after cold preservation. *Transplantation*, 2002, 73(11): 1764-1770.
- [10] Schmidt R. Hepatic organ protection: from basic science to clinical practice. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(48): 6044-6045.
- [11] Kang C, Cho W, Park M, et al. H₂O₂-triggered bubble generating antioxidant polymeric nanoparticles as ischemia/reperfusion targeted nanotheranostics. *Biomaterials*, 2016, 85: 195-203.
- [12] 李霞, 龙小菊, 胡衍辉, 等. 肢体远隔缺血预处理对肝脏手术中血清 TNF- α 和 HMGB1 水平的影响. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(12): 1193-1195.
- [13] Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, et al. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology*, 2004, 39(4): 1110-1119.
- [14] 任明, 任淑萍, 杨淑娟, 等. 银杏叶提取物对糖尿病大鼠体内氧化应激的影响. *中国实验诊断学*, 2010, 14(2): 199-201.
- [15] 周杰斌, 杨学抗, 叶启发, 等. 银杏叶提取物在大鼠肝移植缺血再灌注损伤中的预处理效用. *中南大学学报(医学版)*, 2007, 32(1): 54-58.
- [16] 龙小菊, 梁应平, 胡衍辉, 等. 参附注射液预处理联合控制性低中心静脉压对肝脏缺血-再灌注损伤的影响. *临床麻醉学杂志*, 2014, 30(6): 536-539.

(收稿日期: 2016-09-13)