

大黄素对肠缺血/再灌注损害保护作用的实验研究

刘瑞林, 张 嘉, 吴 薇, 刘牧林

(蚌埠医学院附属医院胃肠外科, 安徽 蚌埠 233004)

【摘要】 目的 探讨大鼠肠缺血/再灌注(I/R)损伤致肠黏膜损害的机制及大黄素的保护作用。方法 将 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分成假手术组、肠缺血 45 min 再灌注 6 h 模型组和大黄素预处理组。用无创伤动脉夹夹闭大鼠肠系膜上动脉制备肠 I/R 模型;假手术组仅开腹不钳夹血管。大黄素预处理组在术前 30 min 经股静脉注入大黄素(2.5 mg/kg),假手术组和模型组分别注入等量生理盐水。在缺血 45 min 再灌注 6 h 后,各组分别经下腔静脉采血,然后处死大鼠取肠系膜淋巴结及小肠组织标本。分别检测各组血清肠脂肪酸结合蛋白(IFABP)、一氧化氮(NO)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量;小肠组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)活性;血液及肠系膜淋巴结细菌移位率;并进行小肠组织病理学观察。结果 与模型组比较,大黄素预处理组 IFABP、NO、TNF- α 、MDA、MPO 水平均明显降低(P 均 <0.01),SOD 活性明显升高(P <0.01),肠系膜淋巴结细菌移位率显著降低(血液 2/10 只比 8/10 只,肠系膜淋巴结 3/10 只比 8/10 只, P 均 <0.05);病理损害明显减轻。结论 大黄素可减少 TNF- α 、NO 释放,抑制过度炎症反应,减轻中性粒细胞聚集及活化,减少大鼠氧自由基的生成,对大鼠肠 I/R 损伤具有保护作用。

【关键词】 缺血/再灌注损伤,肠;大黄素;炎症介质

中图分类号:R285.5;R259 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)01-0045-03

Protective effects of emodin (大黄素) on intestinal ischemia/reperfusion injury in rats LIU Rui-lin, ZHANG Jia, WU Wei, LIU Mu-lin. Department of Gastrointestinal Surgery, Affiliated Hospital of Medical College, Bengbu 233004, Anhui, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the protective mechanism of emodin (大黄素) on intestinal mucosal injury induced by intestinal ischemia/reperfusion (I/R) in rats. **Methods** Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups, namely sham operation group (Group A), group of ischemia 45 minutes followed by reperfusion 6 hours (Group B), emodin-pretreated group (Group C). The superior mesenteric artery was occluded and then released to produce the intestinal I/R model in rats. Group C was administrated emodin intravenously (2.5 mg/kg) before 30 minutes of the operation. In the sham operation group and model group, similar volume of normal saline was administered respectively. After 45 minutes of ischemia and 6 hours of reperfusion, the blood was collected from the inferior vena cava respectively in each group. Afterwards, the rats were sacrificed, and the mesenteric lymph node (MLN) and small intestinal tissues were taken for pathological analysis by light microscopy. The serum levels of intestinal fatty acid binding protein (IFABP), nitrogen monoxidum (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α), and the activities of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase (MPO) in the small intestinal tissues were measured, and the rates of bacterial translocation (BT) in blood and MLN were examined at 6 hours after reperfusion in each group. **Results** The contents of IFABP, NO, TNF- α , MDA and MPO were significantly lower (all P <0.01), SOD activity was significantly higher (P <0.01) in group C than in group B. There was significant difference in the rate of BT between the group C and B (blood: 2/10 vs. 8/10 rats; MLN: 3/10 vs. 8/10 rats, both P <0.05). Histological examination displayed that the damage of intestinal mucosa was less in group C than in group B. **Conclusion** Intestinal I/R may result in intestinal mucosal injury, the release of abnormal TNF- α , NO, reactive oxygen and activated polymorphonuclear leucocyte (PMN) may be involved in the mechanism. Emodin may protect intestinal mucosa against intestinal I/R injury, which may be associated with inhibiting the release of NO and TNF- α , ameliorating reactive oxygen damage, and alleviating the aggregation and activation of PMN.

【Key words】 intestinal ischemia/reperfusion; emodin; inflammatory mediators

基金项目:安徽省医药卫生科研基金资助课题(2002A013)

作者简介:刘瑞林(1952-),男(汉族),江苏省人,硕士生导师,主任医师。

肠缺血/再灌注(I/R)可造成肠黏膜屏障功能障碍、肠通透性增加、肠道内细菌和内毒素移位入血,引发失控的炎症反应和脓毒症,进一步可发展为多器官功能障碍综合征(MODS),甚至多器官功能衰竭(MOF)^[1]。本研究拟采用大鼠肠 I/R 模型,探讨大黄素对肠 I/R 损害的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型的制备和分组:健康雄性 Wistar 大鼠 30 只,按随机数字表法分成假手术组(A 组)、肠缺血 45 min 再灌注 6 h 模型组(B 组)、大黄素预处理组(C 组),每组 10 只。采用肠系膜上动脉(SMA)夹闭/松夹方式制备肠 I/R 模型。术前 30 min, C 组经右下股静脉注入大黄素 2.5 mg/kg, A 组和 B 组则分别注入等量生理盐水。用质量分数为 1% 的戊巴比妥(5 ml/kg)腹腔注射麻醉大鼠,上腹部正中切口进腹,钳夹 SMA 根部 2 min,待确定 SMA 血流被完全阻断后(肠壁色泽苍白,系膜血管无搏动)缝合伤口,45 min 后开腹,打开动脉夹,恢复 SMA 血流供应;B 组和 C 组分别于再灌注 6 h 后取标本。A 组仅开腹分离 SMA 但不钳夹。

1.2 标本采集及处理:再灌注 6 h 后,从下腔静脉取血 5~6 ml,1 ml 送细菌培养,剩余血立即离心 20 min 后分离血清,-80 °C 冰箱保存,用于生化指标含量的测定。处死大鼠后取距回盲部 5 cm 处小肠组织,用生理盐水清洗,冰箱中保存。称小肠组织制成体积分数为 10% 的匀浆,离心 10 min 后取上清液置冰箱中保存,用于测定丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)含量。

1.2.1 细菌培养:①血液细菌培养:按照常规进行。②肠系膜淋巴组织细菌培养:严格无菌条件下切取大鼠肠系膜淋巴组织,匀浆后置于营养肉汤内增菌,放置于 35 °C 温箱中培养 24~48 h,根据细菌生长的特点、菌落和生化反应鉴定各种细菌。

1.2.2 检测指标与方法:①血清肠脂肪酸结合蛋白(IFABP)测定:采用酶联免疫吸附实验,严格按试剂盒说明书操作,结果以 ng/L 表示,试剂盒购自美国 MERKET 公司。②血清肿瘤坏死因子-α(TNF-α)浓度测定:采用双抗体夹心酶联免疫吸附法(ELISA),结果以 ng/L 表示,试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司。③血清一氧化氮(NO)浓度测定:采用硝酸还原法测定 NO₂⁻/NO₃⁻,于波长 550 nm 处测吸光度(A)值,按公式计算 NO 浓度,结果以 μmol/L 表示,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。④小肠组织 MDA 测定:采用硫代巴比妥酸显色法,于波长

532 nm 处测 A 值,按公式计算,结果以每毫克蛋白组织中的含量(nmol/mg)表示,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。⑤小肠组织 SOD 活性测定:采用黄嘌呤氧化酶细胞色素 C 法测定,按照试剂盒说明书操作,于波长 550 nm 处测 A 值,结果以 U/mg 表示,试剂盒购自南京建成生物工程研究所。⑥小肠组织 MPO 测定:采用邻连茴香胺显色法测定,于波长 460 nm 处测 A 值,按公式计算每克湿组织 MPO 活性(U/g)。

1.2.3 病理学检查:用体积分数为 10% 的甲醛固定小肠组织,苏木素-伊红(HE)染色后光镜观察。

1.3 统计学处理:结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,统计学处理采用方差分析,细菌移位率用多个样本比较的秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 IFABP、TNF-α、NO 浓度(表 1):肠缺血 45 min 再灌注 6 h 后,血清 IFABP、TNF-α、NO 含量均较 A 组显著增加(P 均 < 0.01);C 组上述指标则均较 B 组显著降低(P 均 < 0.01)。

表 1 各组血清 IFABP、TNF-α、NO 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	IFABP(ng/L)	TNF-α(ng/L)	NO(μmol/L)
A 组	10	28.65 ± 6.18	11.72 ± 2.65	30.13 ± 7.52
B 组	10	1 683.45 ± 177.44 ^a	26.94 ± 6.25 ^a	99.46 ± 14.28 ^a
C 组	10	652.08 ± 98.30 ^{ab}	17.27 ± 3.31 ^{ab}	62.96 ± 12.20 ^{ab}

注:与 A 组比较,^a $P < 0.01$;与 B 组比较,^b $P < 0.01$

2.2 小肠组织 MDA、SOD、MPO 水平(表 2):肠缺血 45 min 再灌注 6 h 后,小肠组织 MDA 含量和 MPO 活性均显著增加(P 均 < 0.01),SOD 活性则显著降低($P < 0.01$);与 B 组比较,C 组小肠组织 MDA 含量和 MPO 活性均显著降低(P 均 < 0.01),而 SOD 活性则显著增加($P < 0.01$)。

表 2 各组小肠组织 MDA、SOD、MPO 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)	MPO(U/g)
A 组	10	1.48 ± 0.65	96.27 ± 14.73	1.37 ± 0.24
B 组	10	11.24 ± 3.59 ^a	51.26 ± 12.71 ^a	3.28 ± 0.69 ^a
C 组	10	5.37 ± 1.30 ^{ab}	74.94 ± 17.27 ^{ab}	1.87 ± 0.34 ^b

注:与 A 组比较,^a $P < 0.01$;与 B 组比较,^b $P < 0.01$

2.3 大鼠肠系膜淋巴组织及血液细菌培养阳性结果比较:各组大鼠血液及肠系膜淋巴组织培养出的细菌菌种包括大肠埃希菌、克雷伯杆菌、变形杆菌、表皮葡萄球菌、液化沙雷菌等,以大肠埃希菌、克雷伯杆菌、变形杆菌为主。各组大鼠细菌培养阳性结

果:血培养 A 组为 0, B 组为 8 只, C 组为 2 只, B、C 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 肠系膜淋巴组织 A 组为 1 只, B 组为 8 只, C 组为 3 只, C 组细菌移位率低于 B 组 ($P < 0.05$)。

2.4 病理学观察:①大体观察: A 组无腹水, 小肠无明显改变; B 组有较多的淡黄色腹水, 小肠充血水肿明显; C 组有少量淡黄色腹水, 小肠轻微充血水肿。②光镜观察: A 组肠壁形态结构正常, 黏膜层绒毛完整, 呈指状突起; 黏膜下层、肌层、浆膜层结构正常; B 组肠壁坏死较严重, 累及整个黏膜层, 有广泛充血、炎性细胞浸润; C 组肠壁坏死较轻, 只发生在绒毛顶端, 绒毛外形尚存, 黏膜下层有轻度充血、水肿。

3 讨论

目前认为, 肠黏膜低灌注、中性粒细胞聚集激活、氧自由基损伤及细胞因子过度释放为肠黏膜的主要致伤因素^[2-3]。胃肠道是单核/巨噬细胞产生 TNF- α 的最主要靶器官之一, 肠 I/R 可致小肠组织 TNF- α mRNA 表达明显增高^[4]。肠 I/R 损伤过程中, 机体单核/巨噬细胞系统被过度激活, 释放大量的 TNF- α , 作为始发因子诱导白细胞介素 (IL-1、IL-6、IL-8) 基因表达, 引起“级联反应”并造成炎症介质的失控性释放, 致使肠组织损伤, 与肝、肺组织相比, 小肠表达 TNF- α 最早, 幅度也最大^[5]。

NO 作为一种活性氧自由基, 不仅在细胞间和细胞内信号传递过程中起关键作用, 同时也是调节全身免疫防御反应的重要介质, 并且与器官功能损害密切相关。Banan 等^[6]研究发现, 肠 I/R 时, 肠组织诱生型一氧化氮合酶 (iNOS) 信使 RNA 表达增强, iNOS 活性增强, 血浆 NO 升高; NO 可使肠上皮细胞 ATP 耗竭及其紧密连接膨胀, 致肠黏膜屏障功能降低。MPO 存在于中性粒细胞溶酶体中, 组织 MPO 活性增高提示中性粒细胞在组织内聚集程度增加。当中性粒细胞过度激活时, 中性粒细胞在跨血管内皮细胞游走、浸润过程中释放大量的细胞毒性物质, 如弹性蛋白酶、胶原酶、蛋白水解酶等, 直接导致组织损伤。聚集的中性粒细胞机械堵塞毛细血管致微循环障碍, 使血流阻力增加, 血流减慢, 血黏度增加, 加重组织缺血、缺氧, 并导致微血栓形成, 加重肠组织损害。MDA 含量显著增高, 提示氧自由基对肠黏膜的损伤增加, 肠组织 SOD 活性降低可间接反映清除氧自由基能力下降。二者联合检测结果表明肠组织遭受氧自由基所致的严重损伤。

研究表明, 大黄的主要有效成分大黄素在治疗急性胰腺炎、多器官功能障碍以及肝、脑 I/R 损伤

中具有器官保护作用^[5,7-9]。李新宇等^[10]在大黄对肠 I/R 所致肺损伤的研究中发现, 大黄能保护肠道功能, 防治肠 I/R 损伤致肺损伤, 这种作用可能是通过抑制 TNF 和内源性 NO 等炎症介质的释放来实现的。中医认为大黄的功用为通里攻下、清热利胆; 现代医学研究发现, 大黄具有改善微循环、抗凝、抗血栓、抑酶、抑菌、导泻、解除奥迪括约肌痉挛等作用, 其机制与促进细胞凋亡、抑制核转录因子- κ B (NF- κ B) 活化, 降低细胞因子表达有关^[7-8]。本实验发现, C 组 TNF- α 、NO 和 MDA 含量较 B 组明显降低, MPO 和 SOD 活性明显升高, 故认为大黄素有保护肠黏膜损害的作用。其机制可能为: 抑制 TNF- α 的生成及大量 NO 释放, 减少氧自由基的生成及中性粒细胞聚集与活化。实验结果还显示, C 组早期肠黏膜屏障损伤预警指标 IFABP 明显降低, 肠系膜淋巴组织细菌移位率亦明显低于 B 组, 肠黏膜损伤病理改变减轻, 进一步表明了大黄对肠 I/R 所致肠黏膜损伤的保护作用。

参考文献

- [1] Söderholm J D, Perdue M H. Stress and gastrointestinal tract I, stress and intestinal barrier function[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280(1): G7-G13.
- [2] Oktar B K, Coskun T, Bozkurt A, et al. Endothelin-1-induced PMN infiltration and mucosal dysfunction in the rat small intestine[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 279(3): G483-G491.
- [3] Tsuboi H, Naito Y, Katada K, et al. Role of the thrombin/protease-activated receptor 1 pathway in intestinal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(2): G678-G683.
- [4] 胡森, 曹卫红, 孙丹, 等. 卡巴胆碱对肠部分缺血/再灌注损伤所致全身炎症反应和多器官功能障碍的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(1): 49-52.
- [5] 吕艺, 盛志勇, 侯晓霞, 等. 肠缺血-再灌注大鼠不同组织 TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达的规律及意义[J]. 解放军医学杂志, 1999, 24(2): 94-96.
- [6] Banan A, Fields J Z, Decker H, et al. Nitric oxide and its metabolites mediate ethanol-induced microtubule disruption and intestinal barrier dysfunction[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2000, 294(3): 997-1008.
- [7] 刘瑞林, 刘牧林, 马良龙. 大黄素对重症胰腺炎大鼠核转录因子- κ B 表达变化的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(4): 230-232.
- [8] 赵卫红, 张有成, 李徐生, 等. 大黄素对肝脏缺血-再灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(8): 594-597.
- [9] 张平, 苏立凯, 李会敏, 等. 大黄素甲醚对大鼠脑缺血再灌注损伤的拮抗作用[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(9): 1829-1833.
- [10] 李新宇, 景炳文, 陈德昌, 等. 大黄对大鼠肠缺血/再灌注所致肺损伤过程肿瘤坏死因子、一氧化氮和磷脂酶 A₂ 的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(2): 71-75.

(收稿日期: 2007-10-13)

(本文编辑: 李银平)