

参附注射液对大鼠肠缺血/再灌注期间 肾保护作用机制的研究

何宇红, 陈 畅, 夏中元

(武汉大学人民医院麻醉科, 湖北 武汉 430060)

【摘要】 目的 观察参附注射液(SFI)对大鼠肠缺血/再灌注损伤(IRI)期间肾组织内血红素加氧酶-1(HO-1)、诱生型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响,探讨其肾保护作用机制。**方法** 采用钳闭大鼠肠系膜上动脉(SMA)诱导 IRI 模型。将 36 只雄性 Wistar 大鼠随机分为 IRI 模型组、SFI 预处理组和假手术组。SFI 预处理组:缺血前 30 min 静脉恒速泵入 SFI 10 ml/kg,阻断 SMA 造成肠缺血 1 h 后再开放;IRI 模型组:在缺血前 30 min 用微量泵持续注入等量生理盐水。应用免疫组化方法和图像分析系统检测肾组织中 HO-1 和 iNOS 的表达和分布,观察各组血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN),同时光镜下观察肾组织病理学改变。**结果** 与假手术组比较,IRI 模型组 HO-1 和 iNOS 表达均显著增强(P 均 <0.01),Scr、BUN 明显增加(P 均 <0.01);与 IRI 模型组比较,SFI 预处理组 HO-1 表达明显升高,而 iNOS 表达及 Scr、BUN 明显降低(P 均 <0.05)。病理学检查显示,SFI 能明显减轻肠 IRI 导致的肾组织病理损害。**结论** SFI 能明显减轻肠 IRI 所致的肾组织损伤,其分子机制为诱导肠 IRI 后肾组织中 HO-1 的表达,同时抑制 iNOS 的表达。

【关键词】 肾损伤; 缺血/再灌注损伤; 肠; 血红素加氧酶; 诱生型一氧化氮合酶; 参附注射液

中图分类号:R285.5;R256.5 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2008)02-0067-05

Mechanism of protective effect of Shen-Fu injection (参附注射液) on renal failure induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats HE Yu-hong, CHEN Chang, XIA Zhong-yuan. Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China

【Abstract】 Objective To explore the effect of Shen-Fu injection (SFI, 参附注射液) on expressions of heme oxygenase-1 (HO-1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in renal failure induced by intestinal ischemia-reperfusion injury (IRI) in rats and its possible mechanism in the protection of kidney. **Methods** The model of intestinal IRI was induced by clamping superior mesenteric artery (SMA) for 1 hour and then releasing the arterial clamp for 6 hours. Thirty-six male Wistar rats were randomly divided into three groups: IRI model group, SFI pretreatment group and sham operation group. In the SFI pretreatment group, 10 ml/kg of SFI was pumped in at constant rate 30 minutes before the ischemia, the SMA was clamped for 1 hour and then released, while in the IRI model group, an equal volume of normal saline was pumped in continuously 30 minutes before the ischemia. The serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen (BUN) were observed respectively. Expressions and distributions of HO-1 and iNOS in the rat kidney tissue were detected by immunohistochemistry and morphometry computer image analysis. The histological changes of kidney were observed under light microscope. **Results** The expressions of HO-1 and iNOS were markedly higher, and the levels of Scr and BUN were also significantly higher in intestinal IRI model group than those in the sham operation group (all $P < 0.01$). The expression of iNOS and the levels of Scr and BUN were significantly lower, while the expression of HO-1 was obviously higher in SFI pretreatment group than those in IRI model group (all $P < 0.05$). Under light microscope, SFI could significantly alleviate the pathologic lesion of kidney caused by intestinal IRI. **Conclusion** The data suggest that SFI markedly ameliorate renal failure induced by intestinal IRI, and the protective effect of SFI may be related to the inducement of HO-1 expression and the inhibition of iNOS expression in kidney tissue after intestinal IRI.

【Key words】 kidney injury; intestinal ischemia-reperfusion injury; heme oxygenase; inducible nitric oxide synthase; Shen-Fu injection

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30672033);湖北省教育厅重点科研项目(2003X125)

作者简介:何宇红(1970-),女(汉族),湖北省人,医学硕士,讲师,主要研究方向为围术期脏器保护基础研究,参与国家自然科学基金 1 项,省教育厅重点攻关项目 1 项,发表论文 10 篇,Email:heyuhong2005@yahoo.com.cn.

肠道缺血/再灌注损伤(IRI)是休克、创伤时造成远隔重要脏器(肺、肾、心)损伤的“中心枢纽”,且肺、肾等多器官功能衰竭(MOF)已成为创伤、休克后患者死亡的主要原因,其机制和防治措施尚待阐明。研究表明,诱生型一氧化氮合酶(iNOS)和血红素加氧酶-1(HO-1)在肠 IRI 导致远隔脏器损伤/抗损伤的病理生理过程中起重要作用^[1-2],其中,HO-1 作为血红素分解代谢的限速酶,发挥着重要的抗氧化、抗炎、抗凋亡和抗增生功能,备受关注。有研究报道,参附注射液(SFI)对肠道特别是肠黏膜及心、脑、肾等重要脏器 IRI 具有一定的保护作用^[3-5],但 SFI 对肠 IRI 所致的远隔肾损伤的影响如何尚未见文献报道。本研究中采用大鼠肠 IRI 模型,观察临床相关剂量的 SFI 对大鼠肾组织内 HO-1、iNOS 表达及肾功能的影响,探讨其肾保护作用及分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂:SFI(四川雅安三九药业有限公司),NOS₂ 多克隆抗体(多抗)及过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)试剂盒(北京中山生物技术有限公司),HO-1 多抗(武汉博士德生物工程公司),病理图像分析系统(同济科技集团千屏影像工程公司)。

1.2 实验动物及 IRI 模型建立:健康雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重 220~250 g,由武汉大学医学院动物实验中心提供。实验前禁食 12 h,自由饮水。实验大鼠按随机数字表法分为 3 组,每组 12 只:①IRI 模型组:缺血前 30 min 用微量泵持续注入生理盐水 10 ml/kg,阻断肠系膜上动脉(SMA)造成肠缺血 1 h 后再开放;②SFI 预处理组:缺血前 30 min 静脉恒速泵入 SFI 10 ml/kg,余操作同 IRI 模型组;③假手术组:穿线环绕 SMA 但不结扎,余操作同 IRI 模型组。用体积分数为 7%的水合氯醛 5 ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠。参照 Ito 等^[6]的方法复制肠 IRI 模型,经腹正中切口,分离 SMA,微动脉夹夹闭 SMA 根部,缝合切口,1 h 后经原切口进腹,松开动脉夹,恢复血供 6 h 后,颈动脉放血处死动物。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 免疫组化方法检测肾组织 HO-1 和 iNOS 表达:开腹取出肾组织,用体积分数为 4%的多聚甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋、切片,SP 法免疫组化染色按照 SP 试剂盒操作说明书进行。随机抽样取上述切片数张,以磷酸盐缓冲液(PBS)代替 HO-1 和 iNOS 多抗作为阴性对照(其余步骤不变)。全自动图像分析系统对阳性染色进行分析,测定 HO-1 和 iNOS 阳性表达的平均吸光度(A)值,随机测定 5 个

高倍视野后计算其均值作为该切片的代表值。

1.3.2 血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)的测定:采用美国 i-STAT 血气分析仪测定。

1.3.3 肾组织病理学检查:取肾组织,用 4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。

1.4 统计学分析:数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析和 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SFI 对肾组织 HO-1、iNOS 表达的影响(表 1;彩色插页图 1,图 2):与假手术组比较,IRI 模型组肾组织 HO-1 和 iNOS 强阳性表达(P 均 < 0.01),HO-1 主要表达部位在近曲小管、远曲小管上皮细胞及髓袢小管和集合管上皮细胞;iNOS 主要表达部位在近曲小管、远曲小管、髓袢小管及血管平滑肌细胞。与 IRI 模型组比较,SFI 预处理组 HO-1 表达明显升高,iNOS 表达则显著降低(P 均 < 0.05)。

表 1 SFI 对大鼠肾组织 HO-1、iNOS

蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

A 值

组别	动物数	HO-1 蛋白表达	iNOS 蛋白表达
假手术组	12	0.109 ± 0.025	0.096 ± 0.032
IRI 模型组	12	0.292 ± 0.023 ^b	0.278 ± 0.014 ^b
SFI 预处理组	12	0.338 ± 0.031 ^{bc}	0.199 ± 0.036 ^{ac}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 IRI 模型组比较,^c $P < 0.05$

2.2 SFI 对 Scr、BUN 的影响(表 2):IRI 模型组 Scr、BUN 均明显高于假手术组(P 均 < 0.01);与 IRI 模型组比较,SFI 预处理组 Scr、BUN 均显著降低,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。

表 2 SFI 对大鼠 Scr、BUN 的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	Scr(μmol/L)	BUN(mmol/L)
假手术组	12	62.1 ± 7.9	4.9 ± 1.3
IRI 模型组	12	210.7 ± 12.1 ^b	14.8 ± 2.2 ^b
SFI 预处理组	12	133.5 ± 18.5 ^{ac}	8.8 ± 1.6 ^{ac}

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 IRI 模型组比较,^c $P < 0.05$

2.3 SFI 对肠 IRI 后肾组织病理学变化的影响(彩色插页图 3):与假手术组比较,肠 IRI 后肾组织出现明显的病理改变,肾小管上皮及肾小球毛细血管内皮细胞肿胀加重,管腔变窄或闭合,肾小球及球后毛细血管内有破坏的红细胞及血红蛋白堆积;SFI 预处理组肾组织损伤则明显减轻。

3 讨论

肠黏膜作为肠道乃至整个机体代谢最活跃的部位,因其血管发夹状结构及逆流交换机制,使其在创伤、休克及严重感染时最易受缺血/再灌注(I/R)等病理因素影响,且复苏时恢复最迟,导致肠黏膜屏障功能受损,细菌移位和内毒素血症激发细胞因子和炎症介质的连锁反应,导致持续性炎症细胞因子风暴和全身炎症反应综合征(SIRS),其恶性循环的结果是导致远隔脏器损伤,出现多器官功能障碍综合征(MODS)。表明肠 IRI 是严重感染、创伤、休克后远隔主要脏器损伤的重要病因学基础和中心环节,其损伤机制及防治已成为相关学科的研究热点^[7]。

研究表明,炎症介质连锁反应是肠 IRI 后肾损伤的重要机制。Fink^[8]研究证实,肠 IRI 后主要通过细胞膜酶磷脂酶 A₂(PLA₂)激活免疫功能细胞产生大量的肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(ILs)及超氧化阴离子等细胞因子及炎症介质,形成炎症介质连锁反应,使肾组织细胞受损。本研究结果显示,肠 IRI 后 iNOS 大量表达,过量的一氧化氮(NO)直接或间接造成肾损伤。一系列研究发现,iNOS 过量产生的 NO 及其毒性代谢产物超氧化亚硝基阴离子(ONOO⁻)和羟自由基(-OH)等,是造成肾脏损伤的重要原因^[9]。iNOS 主要来源于组织中的巨噬细胞,参与并介导了巨噬细胞的细胞毒作用,在肾脏中与肾血管内皮损伤、肾小管功能障碍有密切正相关关系^[10]。Chatterjee 等^[11]研究证实,高选择性 iNOS 活性的抑制剂能有效改善 NO 介导的肠 IRI 所致的肾功能紊乱和损伤,在肠 IRI 及肾缺血性损伤时,内毒素脂多糖(LPS)、细胞内 Ca²⁺ 超载可激活和上调 iNOS 活性表达,过量的 NO 可激活白细胞释放 TNF、IL-1 等多种细胞因子,而细胞因子反过来又激活 iNOS 表达。iNOS 活性抑制剂可阻断该系列的炎症反应,起到抗肾损伤的作用,表明 iNOS/NO 系统参与了肠 IRI 致肾损伤机制。

HO-1 是机体应激状态下产生的应激蛋白,主要承担抗氧化应激时的细胞保护作用。HO-1 与其催化分解血红素生成的一氧化碳(CO)共同参与机体多种病理生理过程。Tamion 等^[12]研究发现,在炎症反应和非脓毒性休克引起的器官损伤中,肠 IRI 是主要的促发因素,而 HO-1/CO 在肠预处理的保护作用中扮演了重要角色。Moncure 等^[13]研究也证明,失血性休克复苏后机体各组织 HO-1 mRNA 表达均增加,并可减少白细胞黏附和微血管损伤,对机体起保护作用,阻断 HO-1 表达可加重肾脏的损害。

Otterbein 等^[14]发现,HO-1/CO 通过 p38 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导途径下调 LPS 诱导的前炎症细胞因子(TNF- α 、IL-1 β)表达,上调抗炎因子 IL-10,以及抗内皮细胞凋亡等机制在 HO-1 的细胞保护作用中起到重要作用。本研究结果提示,肠 IRI 后诱导了 HO-1 的表达,HO-1 的蛋白水平表达上调对 IRI 后受损的远隔器官起到了一定保护作用,但其确切分子机制尚待进一步探讨。

SFI 主要成分为人参皂苷和乌头碱,对 I/R 心、肺、肠、脑等损伤均有较好的保护作用。实验和临床研究发现,SFI 可通过抑制再灌注期间肠黏膜自由基产生、改善其低灌注和氧合、抑制上皮细胞凋亡,减轻肠黏膜损伤^[3]。朱正华等^[4]研究表明,SFI 对大鼠短暂性局灶性脑缺血损伤呈非剂量依赖性保护作用。罗巍等^[6]研究证实,SFI 通过直接对抗内毒素活性及抑制脂质过氧化反应和钙超载对内毒素休克肺有明显的保护作用。本研究表明:IRI 后肠黏膜内 iNOS 大量表达,过量的 NO 造成肠黏膜损伤。而用临床相关剂量 SFI 预处理后,对肠 IRI 后肾损伤具有明显的保护作用,其可能的作用机制为:①抑制肾组织 iNOS 异常表达。Dempse^[15]的研究显示,HO-1 激活是哺乳动物抵抗 NO 毒性反应的必要条件。SFI 诱导 HO-1 的表达可抑制 iNOS 的表达和活性,可能与 iNOS 的激活位点需要两个亚铁血红素分子,HO-1 的诱导可加速亚铁血红素的降解;内源性 CO 与 iNOS 的亚铁血红素亚基结合使其失活;iNOS 是 P450 蛋白,而细胞色素 P450 是 HO-1 的催化底物;亚铁离子可以抑制 iNOS 的核转录,进一步抑制 iNOS 的生成等有关^[16]。②诱导肠 IRI 时肾组织 HO-1 高表达。HO-1 表达除能抑制 iNOS 对肾组织损伤外,其抗肾组织细胞氧化损伤及抗炎作用可能是其重要机制^[17],但 SFI 是直接还是间接诱导 HO-1 mRNA 表达尚待进一步研究。③SFI 能清除氧自由基,抑制脂质过氧化物产生,抑制炎症因子及其连锁反应^[18],从而维护黏膜屏障作用,减轻肠 IRI 所致的肾组织损伤,使 SCr、BUN 较 IRI 模型组均显著降低,保护了其组织结构。

参考文献

- [1] Gueler F, Gwinner W, Schwarz A, et al. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury[J]. Kidney Int, 2004, 66(2): 523-527.
- [2] 刘慧敏, 夏中元, 陈畅, 等. 血红素加氧酶 1 与诱导型一氧化氮合酶在肠缺血再灌注损伤大鼠肾组织中的表达[J]. 中国临床康复, 2006, 10(40): 81-83.
- [3] Xia Z Y, Liu X Y, Zhan L Y, et al. Ginsenosides compound (shen-fu) attenuates gastrointestinal injury and inhibits

- inflammatory response after cardiopulmonary bypass in patients with congenital heart disease[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 130(2): 258-263.
- [4] 朱正华,熊利泽,董海龙,等. 参附注射液对大鼠短暂性局灶性脑缺血损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(2): 79-81.
- [5] 罗巍,万兰青,马超英,等. 参附注射液对兔内毒素休克肺损伤的保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 1995, 7(2): 68-70.
- [6] Ito K, Ozasa H, Kojima N, et al. Pharmacological preconditioning protects lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rat[J]. Shock, 2003, 19(5): 462-468.
- [7] Yao Y M, Yu Y, Wu Y, et al. The role of gut as a cytokine-generating organ in remote organ dysfunction after intestinal ischemia and reperfusion[J]. Chin Med J, 1998, 111(6): 514-518.
- [8] Fink M P. Ethyl pyruvate: a novel treatment for sepsis and shock[J]. Minerva Anestesiol, 2004, 70(5): 365-371.
- [9] Gabbai F B, Hammond T C, Thomson S C, et al. Effect of acute iNOS inhibition on glomerular function in tubulointerstitial nephritis[J]. Kidney Int, 2002, 61(3): 851-854.
- [10] Vos L H, Joles J A, Schurink M, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase improves graft function and reduces tubulointerstitial injury in renal allograft rejection[J]. Eur J Pharmacol, 2000, 391(1-2): 31-38.
- [11] Chatterjee P K, Patel N S, Kvale E O, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces renal ischemia/reperfusion injury[J]. Kidney Int, 2002, 61(3): 862-871.
- [12] Tamion F, Richard V, Lacoume Y, et al. Intestinal preconditioning prevents systemic inflammatory response in hemorrhagic shock, role of HO-1[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283(2): G408-414.
- [13] Moncure M, Chen L, Childs E W, et al. Heme-oxygenase-1 mRNA expression affects hemorrhagic shock-induced leukocyte adherence[J]. J Trauma, 2003, 55(1): 118-125.
- [14] Otterbein L E, Bach F H, Alam J, et al. Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway[J]. Nat Med, 2000, 6(4): 422-428.
- [15] Dimple B. Protection from the dark side of NO: signaling and cellular defenses against nitric oxide toxicity[J]. IUBMB Life, 2004, 56(2): 59-64.
- [16] Datta P K, Koukouritaki S B, Hopp K A, et al. Heme oxygenase-1 induction attenuates inducible nitric oxide synthase expression and proteinuria in glomerulonephritis[J]. J Am Soc Nephrol, 1999, 10(12): 2540-2550.
- [17] Nath K A, Vercellotti G M, Grande J P, et al. Heme protein-induced chronic renal inflammation: suppressive effect of induced heme oxygenase-1[J]. Kidney Int, 2001, 59(1): 106-117.
- [18] 王进,刘德宏,杨光田. 参附注射液对内毒素所致大鼠全身炎症反应综合征的作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13(1): 23-26.

(收稿日期: 2007-12-31 修回日期: 2008-02-25)

(本文编辑: 李银平)

• 消息 •

2006 年科技部《中国科技期刊引证报告》(核心版)中 各医药学类期刊影响因子较高的前 5 种期刊排序表

2007 年 10 月中国科技信息研究所公布了 2006 年度中国科技论文统计与分析结果,

其中医药学类影响因子较高的 5 种期刊分别如下。

学科	排序	期刊名称	影响因子	学科	排序	期刊名称	影响因子	学科	排序	期刊名称	影响因子
预防医学与卫生学类	1	中华流行病学杂志	1.299	基础医学类	1	中华医院管理杂志	1.459	中医学类	1	中国中西医结合急救杂志	0.874
	2	中华结核和呼吸杂志	1.171		2	中国危重病急救医学	1.285		2	中国中西医结合杂志	0.837
	3	中华预防医学杂志	0.947		3	中华医学杂志	0.938		3	中国中药杂志	0.634
	4	中国地方病学杂志	0.899		4	中国免疫和疫苗	0.852		4	中西医结合学报	0.598
	5	中华传染病杂志	0.889		5	中华麻醉学杂志	0.806		5	中草药	0.558
药理学类	1	药物不良反应杂志	0.935	临床医学类	1	中华医院感染学杂志	1.350	保健医学类	1	中国康复	1.242
	2	药学报	0.776		2	中华检验医学杂志	1.146		2	中国康复理论与实践	0.918
	3	ACTA PHARMACOLOGICA SINICA	0.743		3	中华感染与化疗杂志	0.875		3	中华物理医学与康复杂志	0.843
	4	中国药理学通报	0.721		4	中华急诊医学杂志	0.774		4	中华老年医学杂志	0.628
	5	药物流行病学杂志	0.667		5	中华皮肤科杂志	0.612		5	中国康复医学杂志	0.581
妇产科学、儿科学类	1	中华儿科杂志	1.652	护理学类	1	中华护理杂志	1.861	神经病学、精神病学类	1	中华神经外科杂志	1.372
	2	中华妇产科杂志	1.101		2	中国护理管理	1.050		2	中国临床心理学杂志	0.985
	3	实用儿科临床杂志	0.847		3	护理管理杂志	0.907		3	中华精神科杂志	0.956
	4	中华围产医学杂志	0.643		4	中国实用护理杂志	0.798		4	中国行为医学科学	0.876
	5	中国实用儿科杂志	0.630		5	护理学杂志	0.703		5	中华神经科杂志	0.798
口腔医学类	1	中华口腔医学杂志	0.973	内科学类	1	中华心血管病杂志	1.308	外科学类	1	中华骨科杂志	1.478
	2	华口腔颌面外科杂志	0.533		2	中华糖尿病杂志	1.283		2	中国修复重建外科杂志	1.120
	3	华西口腔医学杂志	0.416		3	中华肝病杂志	1.200		3	中华泌尿外科杂志	1.027
	4	上海口腔医学	0.408		4	中华肾脏病杂志	1.096		4	中国实用外科杂志	1.023
	5	口腔正畸学	0.396		5	中华内分泌代谢杂志	1.087		5	中华外科杂志	0.924
眼耳鼻咽喉学类	1	中华耳鼻咽喉头颈外科杂志	1.097	肿瘤学类	1	中华肿瘤杂志	1.217	军事与特种医学类	1	中华放射学杂志	1.174
	2	国际眼科杂志	0.993		2	中华放射肿瘤学杂志	1.047		2	中国超声影像学杂志	1.007
	3	中华眼科杂志	0.807		3	癌症	0.778		3	介入放射学杂志	0.743
	4	眼科新进展	0.579		4	中国肺癌杂志	0.410		4	中华核医学杂志	0.604
	5	中华眼底病杂志	0.520		5	肿瘤	0.429		5	中国超声医学杂志	0.594

