

· 基础研究 ·

大黄素对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用

秦春妮, 黑飞龙, 吴 蓓, 王世磊, 陈蒙蒙, 龙 村

[摘要]:目的 探讨大黄素对大鼠肠缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用。方法 36 只雄性 SD 大鼠随机分成假手术组(A 组)、缺血再灌注组(B 组)、大黄素灌胃预处理组(C 组)三组。A 组仅开腹不夹闭血管,在术前 2 h 给予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液按 1 ml/100g(大鼠体重)灌胃。B 组术前处理同 A 组,术中用无创动脉夹夹闭大鼠肠系膜上动脉(SMA)制备肠缺血再灌注模型。C 组在术前 2 h 按 20 mg/kg 的大黄素溶于等量 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,其余同 B 组。分别于灌胃前、缺血 1 h 时经股静脉取血,再灌注 1 h 后经下腔静脉采取血样。检测各组血清肠脂肪酸结合蛋白(IFABP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、内毒素的含量。结果 血清中 IFABP 的含量在小肠缺血 1 h 及再灌注 1 h 后,B 组和 C 组的含量明显高于 A 组,但 C 组与 A 组相比没有显著差异。血清中 TNF- α 的水平在小肠缺血 1 h 时,B 组和 C 组高于 A 组,而在再灌注 1 h 后,C 组与 B 组相比明显下降。血清中内毒素水平在小肠缺血 1 h 及再灌注 1 h 后 B 组与 A 和 C 组相比升高,而 C 组与 B 组相比,C 组明显低于 B 组。结论 肠缺血再灌注损伤可致血 IFABP、TNF- α 、内毒素升高,大黄素对小肠缺血再灌注损伤有保护作用。

[关键词]: 缺血再灌注损伤;小肠;大黄素;保护

[中图分类号]:R654.1 **[文献标识码]:** A **[文章编号]:**1672-1403(2012)01-0054-03

The protective effect of emodin against intestinal ischemia – reperfusion injury in rats' intestines

Qin Chun – ni, Hei Fei – long, Wu Bei, Wang Shi – lei, Chen Meng – meng, Long Cun

Department of Cardiopulmonary Bypass, Cardiovascular Institute and Fuwai Hospital, Peking Union Medical College & Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100037, P. R. China, Beijing 100037, China

Corresponding author: Hei Fei – long, heifeilong@yahoo.com

[Abstract]: Objective To investigate the protection of emodin on intestinal mucosa injury produced by intestinal ischemia – reperfusion (I/R) in rats. **Methods** Thirty six male SD rats were randomly divided into three groups: sham – operated controls (Group A), ischemia – reperfusion group (Group B) and emodin pretreated group (Group C). The superior mesenteric artery (SMA) was occluded for an hour then released for one hour to produce the intestinal I/R model in group B and group C. Group C was given emodin (20 mg/kg) according to 1 ml/100 g (rats' weight) by oral administration before 2 hours of the operation. In the group A and B, similar volume of 0.5% sodium carboxy methyl cellulose solution was administrated respectively. Blood samples were collected from femoral vein in each group before medicine administration and an hour after ischemia. After one hour of ischemia – reperfusion, blood samples were got from inferior vena cava. The serum levels of intestinal fatty acid binding protein (IFABP), tumor necrosis factor – α (TNF – α) and endotoxin were measured in each group. **Results** After an hour of ischemia and another hour of I/R, the levels of IFABP in group B and C were higher than that in group A, and there were no significant difference between group A and group C. The levels of TNF – α in group B and C were higher than that in group A at the time of intestinal ischemia, while after I/R, the concentration in group C decreased significantly compared with group B. After ischemia and I/R, the level of endotoxin in group B was obviously higher than that in group A and C, and the level of group C was significantly lower than that in group B. **Conclusion** The levels of IFABP, TNF – α and endotoxin in serum are increased after intestinal IR. Emodin can protect the intestinal structure and function against IR injury.

[Key words]: Ischemia – reperfusion; Intestines; Emodin; Protection

大黄素的化学名称为 1,3,8 – 三羟基 – 6 – 甲

基蒽醌,主要来源于蓼科植物掌叶大黄根茎,是中药大黄的主要有效单体之一。现代药理学研究表明大黄素有抗菌消炎、抗肿瘤、免疫抑制、抗病毒、保护肝肾、改善微循环等作用^[1]。本研究采用大鼠肠缺血

作者单位: 100037 北京,北京协和医学院 中国医学科学院
阜外心血管病医院体外循环科

通讯作者: 黑飞龙. heifeilong@yahoo.com

再灌注 (ischemia - reperfusion, I/R) 模型, 了解大黄素对肠 I/R 损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选用清洁级雄性 SD 大鼠 36 只, 由阜外心血管病医院动物实验中心提供, 适应性喂养 5 天后用于实验, 实验前 12 h 禁食, 术前 4 h 禁饮。

1.2 药品与试剂 大黄素化学对照品购于中国药品生物制品检定所 (批号 110756 - 200110); 大鼠 TNF - α 、内毒素、IFABP 酶联免疫试剂盒由美国 RD 公司提供; 羧甲基纤维素钠由北京索莱宝科技有限公司提供。

1.3 仪器 全自动多功能酶标仪, 电热恒温培养箱, 半自动洗板机, 减压干燥箱, 低温离心机, -70℃ 低温冰箱。

1.4 动物模型制备与分组 将 36 只 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 12 只, 分为假手术组 (A 组), 缺血再灌注组 (B 组) 和大黄素灌胃预处理组 (C 组)。用质量分数为 10% 的水合氯醛 (3 ml/kg) 腹腔注射麻醉大鼠, 上腹部正中切口入腹, 钝性分离肠系膜上动脉 (superior mesenteric artery, SMA) 根部, A 组术前 2 h 给予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液按 10 ml/kg 灌胃, 只分离 SMA, 然后缝合腹部伤口, B 组术前及术中处理同 A 组, 分离 SMA, 用无创动脉夹夹闭 SMA 根部, 待确定 SMA 血流被完全阻断后 (肠壁色泽灰白, 系膜血管无搏动), 缝合伤口, 夹闭 1 h 后松开动脉夹, 恢复 SMA 血流灌注 1 h。C 组给予大鼠浓度为 20 mg/kg 的大黄素灌胃, 手术操作同 B 组。

1.5 标本采集与处理 在灌胃前和缺血 1 h 时各取股静脉血 1 ml, 再灌注 1 h 后取下腔静脉血 1 ml, A 组在对应各时点取血。采集的血样立刻离心分离血清分装后置于 -70℃ 冰箱中保存, 用于生化指标

的检测。

1.6 检测指标与方法 大鼠血清肠脂肪酸结合蛋白 (IFABP)、肿瘤坏死因子 α (TNF - α) 和内毒素的测定采用双抗夹心酶联免疫法 (ELISA) 测定, 严格按试剂盒说明书操作, 加样孵育后经过洗板、加二抗、洗板、加浓缩酶联物 (HRP)、洗板、加显色液避光反应后加终止液完成反应, 用紫外分光光度计在 450 nm 处进行测量。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 16.0 软件, 结果以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计学处理采用单因素方差分析, 组内比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

血清中 IFABP 的含量在小肠缺血 1 h 及再灌注 1 h 后, B 组和 C 组的含量均高于 A 组 ($P < 0.05$), 但 C 组与 A 组相比没有显著差异。血清中 TNF - α 的水平在小肠缺血 1 h 和再灌注 1 h 后, B 组高于 A 组 ($P < 0.05$), C 组与 A 组相比没有统计学意义, 而在再灌注 1 h 后, C 组水平与 B 组相比明显下降 ($P < 0.05$)。

血清中内毒素水平在小肠缺血 1 h 及再灌注 1 h 后, B 组与 A 和 C 组相比升高 ($P < 0.05$), 而 C 组与 B 组相比, C 组血清中内毒素水平明显低于 B 组 ($P < 0.05$)。各组大鼠各时点血清 IFABP、TNF - α 、内毒素浓度测定结果见表 1。

3 讨论

体外循环心脏手术后胃肠并发症的发生率约为 0.5% ~ 4.0%, 但病死率却高达 26% ~ 75%, 常见表现为胃肠道出血、消化性溃疡、缺血性肠炎和胰腺炎等^[2-4]。发生的

表 1 各组大鼠各时点血清 IFABP、TNF - α 、内毒素浓度变化 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

项目	组别	术前	缺血 1 h 后	再灌注 1 h 后
IFABP (ng/L)	A 组	17.54 \pm 3.35	22.99 \pm 5.07	26.78 \pm 10.32
	B 组	16.27 \pm 4.32	41.85 \pm 15.89*	48.65 \pm 7.12*
	C 组	16.00 \pm 3.58	27.28 \pm 8.04#	29.81 \pm 4.34#
TNF - α (ng/L)	A 组	34.93 \pm 9.14	38.76 \pm 6.33	40.89 \pm 7.71
	B 组	34.44 \pm 12.27	49.77 \pm 10.28*	64.00 \pm 11.52*
	C 组	34.62 \pm 4.91	44.68 \pm 16.59	50.79 \pm 13.35#
内毒素 (Eu/ml)	A 组	0.052 \pm 0.011	0.048 \pm 0.022	0.059 \pm 0.017
	B 组	0.050 \pm 0.014	0.071 \pm 0.012*	0.073 \pm 0.017*
	C 组	0.049 \pm 0.011	0.057 \pm 0.013#	0.062 \pm 0.015#

注: 与 A 组比较 * $P < 0.05$; 与 B 组比较 # $P < 0.05$

主要原因包括体外循环期间消化道低血流灌注、炎性介质的释放以及栓塞等,这些因素导致胃肠道缺血缺氧、组织水肿进而造成胃肠组织损伤。因此寻找有效的胃肠保护方法尤显重要。

IFABP 存在于小肠成熟肠上皮细胞胞液中,通常情况下 IFABP 血清中的含量极低,当遭受缺氧、缺血、再灌注损害时细胞膜通透性增大,IFABP 分子通过毛细血管和毛细淋巴管进入血液,目前研究认为 IFABP 是早期诊断肠缺血的一个敏感指标,其含量的变化与创伤、严重程度和肠道功能障碍程度呈正相关^[5-7]。临床研究表明小肠缺血早期,血清和尿液中 IFABP 即升高,切除缺血坏死肠段后,IFABP 可以恢复正常,通过 IFABP 诊断小肠缺血性损害敏感度接近 100%,Boord^[8]也研究认为血清 IFABP 对小肠缺血性损害有重要提示和鉴别诊断作用。本研究中 B 组和 C 组血清中 IFABP 的含量在缺血 1 h 时和再灌注 1 h 后明显高于 A 组,说明肠 I/R 可引起 IFABP 升高,但 C 组与 A 组相比没有显著差异,提示大黄素具有一定的肠损伤保护作用,大鼠肠缺血再灌注后引发了肠通透性的改变,大黄素可在一定程度上阻止这个损伤效应。

肠 I/R 损伤的过程中,机体单核、巨噬细胞系统被激活,释放大量的 TNF- α ,然后诱导白细胞介素(IL)生成,引起级联反应,并造成炎性介质的大量释放,致使肠损伤,而胃肠道是 TNF- α 的最主要靶器官,肠 I/R 可致肠组织 TNF- α mRNA 表达明显增高^[9]。本研究中 B 和 C 组血清中 TNF- α 的含量在缺血 1 h 时明显高于 A 组,说明 I/R 使 TNF- α 释放增多,而再灌注 1 h 后 C 组 TNF- α 水平与 B 组相比存在显著差异,而与 A 组差异不明显,提示大黄素对 TNF- α 分泌可能有抑制作用,表明大黄素具有胃肠保护效应。体外实验证实^[10],大黄素对在脂多糖刺激下引起的单个核细胞释放因子有明显抑制作用,而且还可以抑制由内毒素诱导的 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 等炎性因子的分泌,从而进一步影响免疫激活的后续反应环节。刘瑞林等^[11]研究也发现大黄素预处理后缺血再灌注的大鼠血清中 TNF- α 水平明显降低,肠系膜淋巴组织细菌移位率也显著下降,认为大黄素对于大鼠肠缺血再灌注损伤具有保护作用,与本研究结果一致。内毒素是革兰氏阴性细菌细胞壁中脂多糖成分,以肠杆菌属的细胞壁多见,肠道是体内最大的内毒素库,但由于肠屏障功能完整,内毒素很难进入血循环,当肠屏障功能受损时,内毒素就会穿过肠黏膜进入血循环,形成内毒素

血症。内毒素可引起黏膜水肿,肠绒毛顶部细胞坏死。本研究发现 B 组和 C 组大鼠血清中内毒素的含量在缺血和缺血再灌注后均比 A 组高,说明肠 I/R 存在黏膜屏障损害,而 C 组与 B 组相比,C 组血清中内毒素水平明显低于 B 组,提示大黄素对肠 I/R 损伤有一定的保护作用,可能是通过减少内毒素的生成和释放入血来发挥保护作用。

大黄素主要的药理作用包括抗炎、抗病毒、免疫调节、抗氧化、促进胃肠蠕动、改善微循环等。本研究表明缺血再灌注损伤可造成肠黏膜的损伤,如术前使用大黄素则可通过改善组织微循环、抑制炎症反应而对肠黏膜产生较好的保护作用。

参考文献:

- [1] 丁艳,黄志华. 大黄素药理作用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5):236-238.
- [2] Mangi AA, Christison-Lagay ER, Torchiana DF, et al. Gastrointestinal complications in patients undergoing heart operation: An analysis of 8709 consecutive cardiac surgical patients [J]. Ann Surg, 2005, 241(6):895-901.
- [3] Andersson B, Nilsson J, Brandt J, et al. Gastrointestinal complications after cardiac surgery [J]. Br J Surg, 2005, 92(3):326-333.
- [4] Vohra HA, Farid S, Bahrami T, et al. Predictors of survival after gastrointestinal complications in bypass grafting [J]. Asian Cardiovasc Thorac Ann 2011, 19(1):27-32.
- [5] 赵海东,田晓峰,郭健,等. 肠型脂肪酸结合蛋白对肠缺血早期诊断的意义[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(7):513-516.
- [6] 彭明生,黄显凯,聂海,等. 严重多发伤患者血浆肠脂肪酸结合蛋白水平变化及其与胃肠功能障碍的关系[J]. 中国急救医学, 2007, 27(10):878-880.
- [7] 刘牧林,张嘉,刘瑞林,等. 肠脂肪酸结合蛋白和 D-乳酸早期诊断肠缺血-再灌注损伤的实验研究[J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(10):767-770.
- [8] Boord JB, Fazio S, Linton MF. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: emerging roles in metabolism and atherosclerosis [J]. Curr Opin Lipidol, 2002, 13(2):141-147.
- [9] 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.
- [10] Liu C, Liu Y X, Lu Y. Inhibitory effects of emodin on proliferation of human lymphocytes in vitro [J]. J Fourth Mil Med Univ, 2006, 27(24):2251-2252.
- [11] 刘瑞林,张嘉,吴薇,等. 大黄素对肠缺血/再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(1):45-46.

(收稿日期: 2011-12-31)

(修订日期: 2012-01-04)