

再灌注前干预肥大细胞功能对肠缺血再灌注氧化损伤的影响

高婉菱, 何玉莲, 黄品婕, 李晓芸, 刘德昭*

(中山大学附属第三医院麻醉科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨再灌注前干预肥大细胞功能对肠缺血再灌注氧化损伤的影响。【方法】48只SD大鼠随机分为6组:S组(假手术组)、M组(缺血再灌注模型组)、C组(缺血再灌注+色甘酸钠)、CP组(缺血再灌注+Compound 48/80)、P组(缺血再灌注+鱼精蛋白)、K组(缺血再灌注+酮替芬)。复制大鼠肠缺血再灌注损伤模型,CS、CP、P、K组在再灌注前5 min分别经尾静脉给予色甘酸钠 25 mg/kg、Compound 48/80 0.75 mg/kg、鱼精蛋白 2.5 mg/kg、酮替芬 1 mg/kg,S、M组分别给予等量的生理盐水。再灌注4 h后处死大鼠取小肠组织。观察各组肠黏膜病理变化及Chiu's评分;免疫组化计算IMMC数量;测定小肠MDA含量、SOD活性和NO含量。【结果】与S组相比,M组和CP组的Chiu's评分和IMMC计数均明显增高($P < 0.05$);与M组相比,C、P、K组的Chiu's评分和IMMC计数明显降低($P < 0.05$),而CP组的Chiu's评分明显增高($P < 0.05$)。【结论】再灌注前通过抑制肥大细胞功能明显减轻氧化应激,对肠缺血再灌注损伤具有良好的保护作用。

关键词: 肥大细胞功能;肠缺血再灌注损伤;氧化应激

中图分类号:R574

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2012)06-0756-05

Effect of Intervention with Mast Cell Function before Reperfusion on Intestinal Ischemia-reperfusion Injury and Oxidative Stress

GAO Wan-ling, HE Yu-lian, HUANG Pin-jie, LI Xiao-yun, LIU De-zhao*

(Department of Anesthesiology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the effect of intervention with mast cell function before reperfusion on intestinal ischemia-reperfusion and oxidative stress. 【Methods】 A total of 48 SD rats were randomly divided into 6 groups with 8 rats each: Sham operated group (S group), Intestinal ischemia reperfusion group (M group), and Cromolyn Sodium group (CS group, 25 mg/kg), Protamine group (P group, 2.5 mg/kg), Ketotifen group (K group, 1 mg/kg), Compound 48/80 group (CP group, 0.75 mg/kg). Model group (M group) was induced by clamping the superior mesenteric artery for 75 min followed by reperfusion for 3 hours. The above agents were, respectively, intravenously administrated 5 min before reperfusion. Rats were then sacrificed and intestinal tissues were harvested for histologic assessment. The mast cell count were analyzed by immunohistochemical detection, and the contents of MDA, SOD, and NO were detected. 【Results】 The Chiu's score and mast cell counts of group M and CP were significantly more than the group (both $P < 0.05$). Compared with M group, the Chiu's score and mast cell counts were less than in group C, P, and K, while the Chiu's score and mast cell counts were more in CP group (all $P < 0.05$). 【Conclusion】 Intervention with mast cell function before reperfusion may reduce intestinal ischemia-reperfusion injury and oxidative stress.

Key words: mast cell function; intestinal ischemia-reperfusion; oxidative stress

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(6): 756-760]

肠缺血-再灌注(intestinal ischemia-reperfusion, IIR)损伤是严重创伤、休克、心肺功能不全等救治过程中共有的病理过程,可导致肠道组织损伤,并对远隔器官的结构和功能产生广泛的影响,甚至

发生多器官功能障碍综合征(MODS)^[1]。目前的研究证明^[2],氧化应激引起的脂质过氧化损伤是肠缺血再灌注损伤的重要机制之一。肥大细胞的异常激活与肠黏膜屏障功能的受损息息相关^[3]。而

收稿日期:2012-07-14

基金项目:广东省科技计划项目(2011B031800058);广东省医学科研基金(B2011104)

作者简介:高婉菱,主治医师,E-mail:wmgwl@21cn.com; *通信作者:刘德昭,E-mail:sumsldz@163.com

肥大细胞的活化可能与氧化应激有关。目前再灌注前干预肥大细胞功能对肠缺血再灌注损伤和氧化应激的影响尚不清楚。本研究拟在利用大鼠肠缺血再灌注模型,观察再灌注前干预肥大细胞功能对肠缺血再灌注损伤及对丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和一氧化氮(NO)的影响。

1 材料和方法

1.1 研究对象及分组

选用广东省中山大学实验动物中心提供的清洁级SD大鼠48只,体质量为180~270 g,雌雄各半。随机分为6组($n=8$):S组(假手术组)、M组(模型组)、C组(模型+色甘酸钠25 mg/kg,肥大细胞膜稳定剂)、CP组(模型+Compound 48/80 0.75 mg/kg,Compound 48/80促进肥大细胞脱颗粒)、P组(类胰蛋白酶抑制剂组,模型+鱼精蛋白2.5 mg/kg,鱼精蛋白结合类胰蛋白酶形成无活性四聚体)、K组(模型+酮替芬1 mg/kg,肥大细胞膜稳定剂和抗组胺药)。色甘酸钠、Compound 48/800和酮替芬剂量参照我们既往的研究^[4],溶剂均采用无菌生理盐水。

1.2 研究方法

1.2.1 动物模型的建立 6组大鼠均于术前16 h禁食,自由饮水。腹腔注射10%水合氯醛3.5 mL/kg麻醉后,仰卧位固定,消毒铺巾,腹部正中切口进腹,分离肠系膜上动脉。S组只分离肠系膜上动脉,不阻断;M、C、CP、P、K组用无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉根部,75 min后松开动脉夹,模型复制成功的标准为缺血处肠系膜微动脉搏动消失;且再灌注前肠道淤黑、肿胀;动脉夹松开后缺血处肠系膜微动脉恢复搏动。C、CP、P和K组分别在再灌注前5 min经尾静脉注射色甘酸钠25 mg/kg、Compound 48/80 0.75 mg/kg、鱼精蛋白2.5 mg/kg和酮替芬1 mg/kg;S、M组分别给予等量生理盐水。然后缝合腹膜、肌肉和皮肤,放于37℃恒温箱保温,自由饮水。各组分别在再灌注4 h时断头处死各亚组存活大鼠。

1.2.2 小肠组织病理学检查 分别在再灌注后4 h取1 cm小肠(距回肠末端5 cm)标本,用100 mL/L的甲醛溶液固定,采用苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察肠黏膜病理变化,肠黏膜病理变化采用Chiu's评分法^[5]进行评分:0分,正常;1分:

绒毛顶端上皮间隙增宽;2分:绒毛顶端上皮间隙进一步扩大;绒毛尖端上皮抬高与固有膜剥离;3分:绒毛上皮成块脱落;4分:上皮完全脱落,仅有固有膜;5分:固有膜层崩裂,出现出血与溃疡。

1.2.3 小肠组织匀浆及总蛋白测定 取大鼠小肠20 cm(距回肠末端5 cm开始),以冷生理盐水冲洗肠腔,滤纸吸干后置于-70℃冰箱中储存。检测各介质表达时将大鼠小肠标本由-70℃冰箱中取出,置于冰上解融。冷生理盐水冲洗肠腔后,以滤纸吸干后取小肠组织150 mg,制作小肠组织匀浆。以4 000 r/min($r=15$ cm),离心15 min。取上清液以BCA法测定组织总蛋白浓度。

1.2.4 小肠MDA含量、SOD活性和NO含量的测定 组织匀浆采用硫代巴比妥酸反应法测定MDA含量。采用黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性。采用硝酸还原法测定NO含量(MDA、SOD试剂盒:南京建成公司)。

1.2.5 IMMC测定 采用免疫组化SP染色法,石蜡切片脱蜡至水后蒸馏水清洗,用pH 9.0 EDTA高压修复2 min后自然冷却,蒸馏水清洗后,3%双氧水浸泡10 min后再用蒸馏水清洗,PBS清洗5 min×3次,加一抗37℃水浴1 h,再用PBS清洗5 min×3次,加二抗37℃水浴30 min,PBS清洗5 min×3次,1:1:1 DAB显色,苏木素复染2 min,0.1%盐酸酒精分化,用水冲洗10 min后用95%酒精脱水;烤箱烤干后中性树胶封片。以胞浆显棕黄色为阳性细胞,于每张切片中用400倍光镜随机选取5个肠黏膜部位进行观察。运用Image-Pro Plus 5.0图像分析软件(美国)计算IMMC数量。

1.3 统计学处理

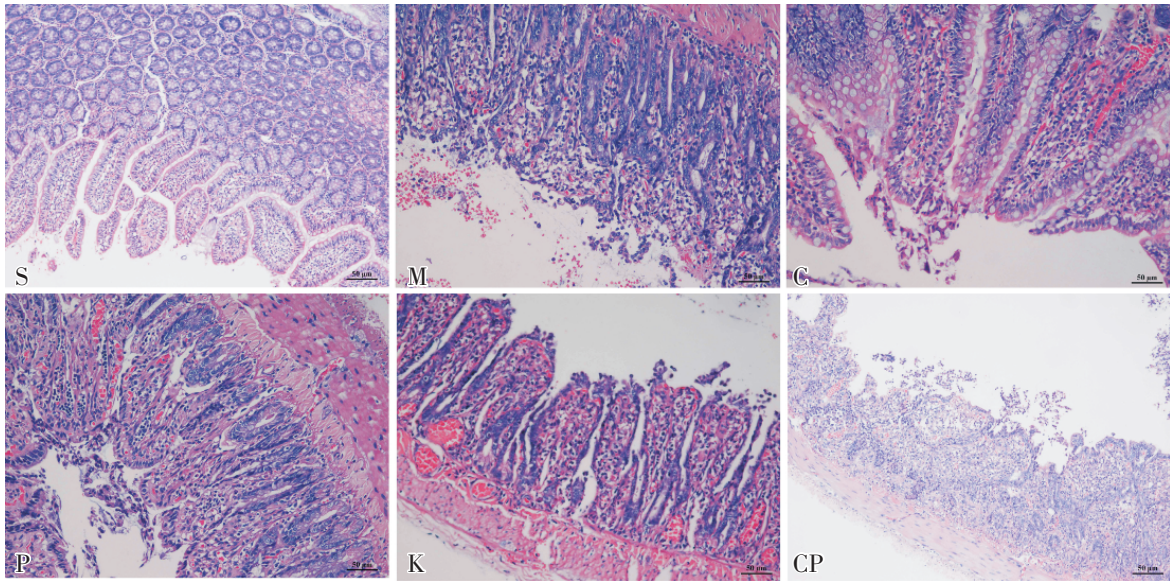
用SPSS 12.0软件系统进行统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,小肠MDA含量、SOD活性、NO含量与Chiu's评分的关系采用Pearson相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

各组大鼠的体质量、体表面积等一般情况类似,无显著差别($P > 0.05$)。

2.2 肠黏膜病理及Chiu's评分



1

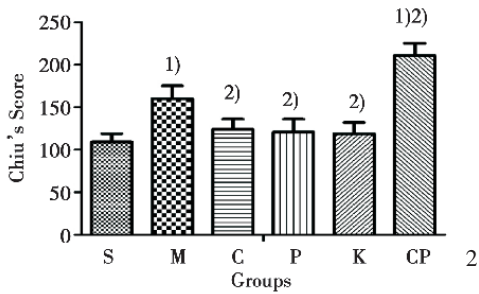
图 1 小肠黏膜组织光镜病理变化

Fig.1 Pathological changes of small intestinal mucosa by light microscopy Bar=50 μm, HE staining

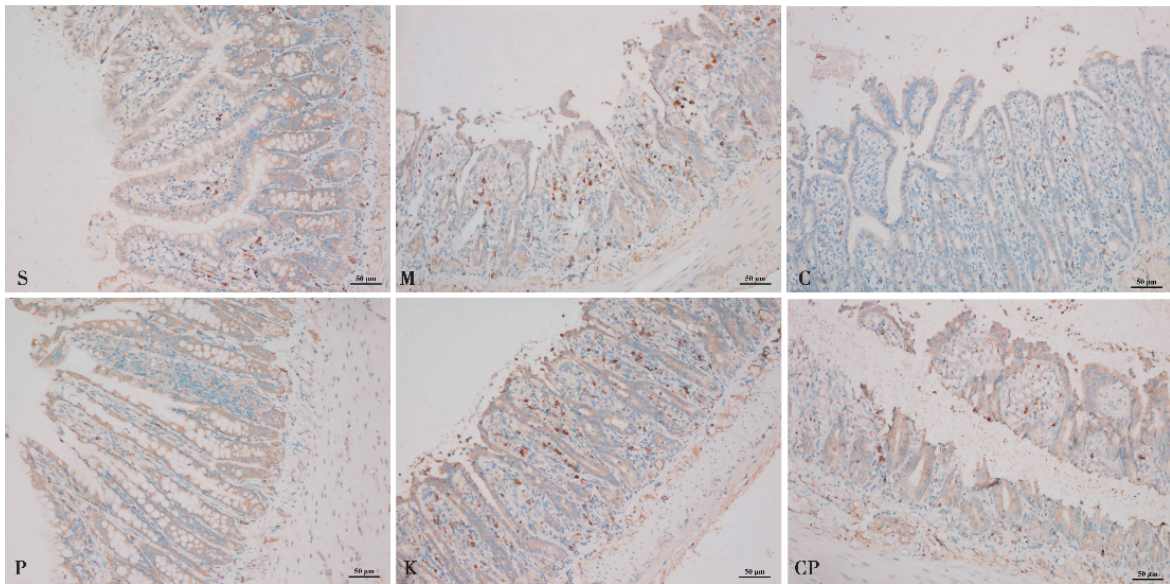
图 2 小肠黏膜 Chiu's 评分

Fig.2 Chiu's score for small intestinal mucosa

Compared with group S, 1) $P < 0.05$; Compared with group M, 2) $P < 0.05$



2



3

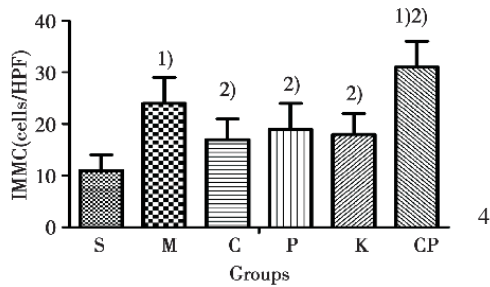
图 3 各组小肠组织肥大细胞 (IMMC) 染色结果

Fig.3 Intestinal tissue mast cells (IMMC) staining SP staining, $\times 400$

图 4 各组小肠组织肥大细胞 (IMMC) 计数

Fig.4 Intestinal tissue mast cells (IMMC) count

Compared with group S, 1) $P < 0.05$; Compared with group M, 2) $P < 0.05$; Bar = 50 μm



4

光镜显示(图 1),S 组黏膜上皮细胞结构完整,排列整齐;M 组、CP 组表现为上皮间隙的扩大,绒毛上皮和固有层的中度分离,部分绒毛顶端上皮层的破损及绒毛顶端出血;K 组、C 组及 P 组表现为肠黏膜改变以绒毛顶端的部分破坏为主,伴有部分上皮层同固有层分离。与 S 组相比,M 组和 CP 组的 Chiu's 评分均明显增高($P < 0.05$,图 2);与 M 组相比,S、C、P、K 组的 Chiu's 评分明显降低($P < 0.05$),而 CP 组的 Chiu's 评分明显增高($P < 0.05$)。

2.3 IMMC 计数

图像分析(图 3)显示,IMMC 数量:①与 S 组相比,其余各组的 IMMC 数量明显增加($P < 0.05$);②与 M 组相比,S、C、P、K 组的 IMMC 数量明显减少($P < 0.05$),而 CP 组的 IMMC 数量则明显增高($P < 0.05$,图 4)。

2.4 小肠组织 MDA 含量、SOD 活性和 NO 含量的变化

与 S 组相比,M 和 CP 组的小肠组织 MDA 浓度明显升高($P < 0.05$);与 M 组相比,CP 组的小肠组织 MDA 浓度明显升高($P < 0.05$),而 S、C、P、K 组的小肠组织 MDA 浓度明显降低($P < 0.05$)。与 S 组相比,各组的小肠组织 SOD、NO 浓度均明显降低($P < 0.05$);与 M 组相比,CP 组的小肠组织 SOD、NO 浓度均明显降低($P < 0.05$),而 S、K、C、P 的小肠组织 SOD、NO 浓度均明显升高($P < 0.05$);C、P 和 K 三组之间比较无明显差异($P > 0.05$;表 1)。

表 1 小肠组织 MDA、SOD 和 NO 浓度
Table 1 Concentration of MDA, SOD, and NO
in intestinal tissue ($\bar{x} \pm s$)

Group	MDA/(nmol/mg)	SOD/(U/mg)	NO/(μmol/mg)
S	2.73 ± 0.39 ²⁾	170.98 ± 22.67 ²⁾	7.40 ± 1.86 ²⁾
M	4.18 ± 0.89 ¹⁾	127.22 ± 11.47 ¹⁾	5.18 ± 0.80 ¹⁾
C	3.36 ± 0.33 ²⁾	146.52 ± 12.59 ¹⁾²⁾	6.43 ± 1.02 ¹⁾²⁾
P	3.32 ± 0.38 ²⁾	145.48 ± 23.45 ¹⁾²⁾	6.47 ± 1.31 ¹⁾²⁾
K	3.19 ± 0.88 ²⁾	146.30 ± 20.55 ¹⁾²⁾	6.86 ± 0.89 ¹⁾²⁾
CP	5.24 ± 1.06 ¹⁾²⁾	108.50 ± 12.22 ¹⁾²⁾	3.95 ± 0.89 ¹⁾²⁾

Compared with group S, 1) $P < 0.05$; Compared with group M, 2) $P < 0.05$

2.5 Chiu's 评分与 MDA、SOD、NO 的相关分析
Chiu's 评分与 MDA 含量呈正相关($r=0.686$, P

< 0.001),与 SOD 活性呈负相关($r = -0.670$, $P < 0.001$),与 NO 活性呈负相关($r = -0.587$, $P < 0.001$)。

3 讨 论

近年来,国内外不少学者对肥大细胞与肠损伤中关系进行了研究。Gan 等^[6]则发现缺血再灌注后肠黏膜处肥大细胞大量增加;免疫组化发现,肠缺血再灌注后,肠黏膜肥大细胞大量脱颗粒。我们的研究结果显示肠缺血再灌注早期 IMMC 数量明显增加;应用色甘酸钠、酮替芬或鱼精蛋白后,IMMC 数量明显减少,肠道损伤减轻;应用 Compound 48/80 后肠黏膜损伤加重,IMMC 数量则明显增高。这些结果进一步证明肥大细胞参与了肠缺血再灌注损伤,以肥大细胞及其释放介质为靶点的治疗是一种有前景方法。

氧化应激引起的脂质过氧化损伤是肠缺血再灌注损伤的重要机制之一。在缺血再灌注过程中,自由基产生过多或酶性保护系统等活性低下、抗氧化作用下降,即可引发脂质过氧化损伤。脂质过氧化是氧自由基引起损伤的主要病理机理,MDA 是脂质过氧化反应的终产物,因此,MDA 不仅反映脂质过氧化程度,也间接反映氧自由基生成量^[7]。SOD 是组织清除氧自由基的最重要的酶之一,它的活性是反映机体组织清除氧自由基能力的重要指标。有研究证明,肥大细胞的活化可能与氧化应激有关。Kanwar 等^[8]在肠缺血再灌注损伤模型中发现氧化产物能够活化肥大细胞,并可加重肠缺血再灌注损伤情况。而与此相对应,在缺血再灌注损伤动物实验模型中进行抗氧化损伤治疗也取得了一定的疗效。如 Gokhan 等^[9]在小肠缺血再灌注损伤实验中使用抗氧化剂天冬氨酸锌能够明显减轻组织损伤,证实抗氧化损伤是重要的治疗手段。本研究发现,模型组在缺血再灌注后 MDA 上升,SOD 活性下降,肠黏膜 Chiu's 评分明显增高,证实肠缺血再灌注后确实存在氧化损伤。相关分析结果显示:Chiu's 评分、MC 类胰蛋白酶表达均与 MDA 含量呈正相关,与 SOD 活性呈负相关;这些都说明肥大细胞活化和氧化损伤之间的关系密切,然而本研究未能回答是肥大细胞激活氧化损伤还是氧化应激激活肥大细胞等问题,具体仍有待今后进一步研究。

近年来,许多研究表明一氧化氮(NO)与缺血再灌注损伤有很密切的关系。有研究报道^[10]:大鼠小肠缺血-再灌注后血浆 NO 下降,小肠损伤严重;在再灌注前予 L-精氨酸(NO 前体物质)再灌注后小肠损伤减轻,表明 NO 增加具有保护作用。然而, Hassoun 等^[11]发现小肠在严重的缺血再灌注后 iNOS 大量激活,导致小肠损伤加重,表明 NO 大量增加的有害作用。本研究结果显示:与模型组比较,抑制肥大细胞脱颗粒(使用色甘酸钠、鱼精蛋白、酮替芬)后,肠黏膜 Chiu's 评分明显降低,但 NO 浓度明显升高;反之,促进肥大细胞脱颗粒(使用 Compound 48/80)后,肠黏膜 Chiu's 评分明显升高,而 NO 浓度明显降低。相关分析则显示,NO 活性与肠黏膜 Chiu's 评分、类胰蛋白酶表达均呈明显负相关,分析原因,可能与 NO 负反馈下调 MC 的功能有关。我们的结果与 Coleman 等^[12]基本一致,后者认为 NO 可通过抑制 MC 脱颗粒进而抑制 MC 介导的炎症反应。因此,效仿或靶向 NO 途径,提高 NO 含量,可能是治疗 MC 相关疾病及防治小肠再灌注损伤有效的方法。

由此可见,再灌注前通过抑制肥大细胞功能能减轻氧化应激,对肠缺血再灌注损伤具有保护作用。

参考文献:

- [1] 张劲军,徐康清,罗文颖,等. 黄芪注射液对大鼠缺血再灌注小肠黏膜氧化损伤的影响[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2008, 29(6): 716-723.
- [2] 郗文斌,屠伟峰,戴建强,等. 氧化-抗氧化失衡对大鼠肠缺血再灌注后肺脏器损伤的影响[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(10): 1556-1558.
- [3] Gan X, Liu D, Huang P, et al. Mast-cell-releasing tryptase triggers acute lung injury induced by small intestinal ischemia-reperfusion by activating PAR-2 in rats[J]. *Inflammation*, 2012, 35(3): 1144-1153.
- [4] Hei ZQ, Gan XL, Huang PJ, et al. Influence of Ketotifen, Cromolyn Sodium, and Compound 48/80 on the survival rates after intestinal ischemia reperfusion injury in rats[J]. *BMC Gastroenterol*, 2008, 8:42-52.
- [5] Oltean M, Olausson M. The Chiu/Park scale for grading intestinal ischemia-reperfusion: if it ain't broke don't fix it[J]. *Intensive Care Med*, 2010, 36 (6): 1095.
- [6] Gan X, Liu D, Huang P, et al. Mast-cell-releasing tryptase triggers acute lung injury induced by small intestinal ischemia-reperfusion by activating PAR-2 in rats[J]. *Inflammation*, 2011, 35(3): 1144-1153.
- [7] 朱伟,刘华章,杨光宇,等. 二叻啉甲烷诱导荷鼻咽癌裸鼠肿瘤转归及对 MDA、SOD 和 GSH-Px 的影响[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2009, 30(S2): 61-63.
- [8] Kanwar S, Kubes P. Mast cells contribute to ischemia-reperfusion-induced granulocyte infiltration and intestinal dysfunction [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 1994, 267(2): G316-G321.
- [9] Gokhan O, Fatma I. Zinc may protect remote ocular injury caused by intestinal ischemia reperfusion in rats [J]. *Tohoku J Exp Med*, 2005, 206(3): 247-251.
- [10] Ward DT, Lawson SA, Gallagher CM, et al. Sustained nitric oxide production via l-arginine administration ameliorates effects of intestinal ischemia-reperfusion[J]. *J Surg Res*, 2000, 89(1): 13-19.
- [11] Hassoun HT, Weisbrodt NW, Mercer DW, et al. Inducible nitric oxide synthase mediates gut ischemia/reperfusion-induced ileus only after severe insults[J]. *J Surg Res*, 2001, 97(2): 150-154.
- [12] Coleman JW. Nitric oxide: a regulator of mast cell activation and mast cell-mediated inflammation[J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 129(1): 4-10.

(编辑 徐杰)