

黄芪注射液对大鼠缺血再灌注小肠黏膜氧化损伤的影响

张劲军¹, 徐康清¹, 罗文颖¹, 黑子清², 陈秉学¹

(1. 中山大学附属第一医院麻醉科, 广东 广州 510080;

2. 中山大学附属第三医院麻醉科, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】研究黄芪注射液抗大鼠小肠黏膜缺血再灌注损伤的作用并对其抗氧化损伤机制进行探讨。【方法】雄性SD大鼠24只,随机分成正常组、模型组和黄芪组。正常组行假手术,不流血。模型组和黄芪组制备大鼠重度失血性休克及复苏的动物模型,分别予生理盐水和黄芪注射液于再灌注前静脉注入,复苏1h后处死动物,取距回肠末端5cm肠段行蜡块包埋,光镜观察各组肠黏膜病理学变化,并按改良Chiu's方法评分量化损伤程度;刮取相邻10cm小肠的黏膜,检测各组肠黏膜组织丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性。【结果】病理学改变:正常组肠黏膜正常,模型组肠黏膜损伤最重,黄芪组次之,各组间Chiu's评分比较皆有统计学意义($P < 0.05$)。小肠黏膜组织MDA含量以模型组最高,与黄芪组和正常组比较,皆有统计学意义($P < 0.05$)。黄芪组略高于正常组,但两者间无统计学意义($P > 0.05$)。小肠黏膜组织SOD、GSH-PX活性黄芪组最高,模型组最低,两者间极有统计学意义($P < 0.01$)。正常组高于模型组,低于黄芪组,有统计学意义($P < 0.05$)。【结论】黄芪能减轻大鼠小肠黏膜缺血再灌注的氧化损伤,其机制与其提高抗氧化损伤的酶的活性有关。

关键词: 黄芪; 小肠; 黏膜; 氧化损伤; 缺血再灌注损伤

中图分类号: R6

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2008)06-0716-04

Anti-Oxidate Effect of Astragalus Membranaceus on Intestinal Mucosa Ischemical Reperfusion Injury in Rats with Hemorrhage Shock

ZHANG Jin-jun, XU Kang-qing, LUO Wen-ying, HEI Zi-qing, CHEN Bing-xue

(Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the protective effect of Astragalus membranaceus on intestinal mucosa ischemic reperfusion injury and its mechanism on anti-oxidate effect. 【Method】 Twenty-four health S-D white male rats were divided into three groups: Group A, normal contrast group, no shock and reperfusion; Group B, model group, treated with saline after hemorrhage shock and resuscitation; D: Astragalus membranaceus group, treated with Astragalus membranaceus after hemorrhage shock and resuscitation. One hour later, the slides were made in 5 cm to ileum distal end and the injury degree of small intestinal villi was scored according to improved Chiu's method through light microscopy after hematoxylin-eosin stain. The next 10 cm intestinal mucous membrane was collected, then the concentration of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) and the activity of glutathione peroxidase (GSH-PX) were measured. 【Result】 Chiu's score in group B and C were significantly higher than that in group A ($P < 0.05$), and the score in group C was lower than that in group B, there are significant difference between them ($P < 0.05$). The concentration of MDA in group B is significantly higher than those of the group A and D ($P < 0.05$). The concentration of MDA in group D is gently higher than that in group A, but there was no significant difference between them ($P > 0.05$). The activity of SOD and GSH-PX in group D is significantly higher than that in group B ($P < 0.01$). The activity of SOD and GSH-PX in group A was significantly higher than that in group B and significantly lower than that in group D ($P < 0.05$).

收稿日期: 2008-06-26

基金项目: 广东省中医药管理局基金资助项目(102061)

作者简介: 张劲军(1973-),男,广东广州人,硕士, E-mail: zhangjingjun1991@163.com; 徐康清,通讯作者

[Conclusions] Astragalus membranaceus could reduce in oxidate injury in small intestine mucosa after ischemia/reperfusion. The protect effect was worked by raising the the activity of GSH-PX and SOD.

Key words: astragalus membranaceus; intestinal mucosa; oxidate injury, ischemical reperfusion injury

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008, 29(6): 716-719, 723]

肠屏障功能损害是多器官衰竭的发源地,小肠黏膜在失血性休克及复苏经历缺血再灌注损伤^[1]。在以往研究中,黄芪能够减轻失血性休克再灌注肠黏膜损伤,但其机制不清^[2]。研究表明,失血再灌注后产生大量氧自由基导致组织氧化损伤是肠黏膜损伤的重要机制。丙二醛(malonaldehyde, MDA)是组织氧化损伤的重要标志物。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)是组织清除氧自由基的两个最重要的酶,是抗氧化损伤的关键因素。本实验通过观察黄芪注射液对鼠失血再灌注后小肠黏膜局部的MDA含量和SOD、GSH-PX活性的影响以探讨黄芪抗失血再灌注损伤中的作用及机制,为黄芪防治失血再灌注肠黏膜损伤提供依据。

1 材料和方法

1.1 动物分组

健康清洁级雄性SD大鼠24只,体质量250~300 g,鼠龄3~4个月,均由中山大学动物中心提供。动物随机分成3组,假手术组,不进行休克处理;模型组,复苏前输入生理盐水3.0 mL;黄芪组:黄芪注射液按20 g/kg,用生理盐水稀释到3.0 mL,复苏前静脉输入。

1.2 动物模型建立

各组动物术前禁食24 h,200 g/L乌拉坦5.0 mL/kg腹腔注射麻醉动物,气管切开,插入气管导管,以保持呼吸道通畅,保留自主呼吸。分离左颈动脉并置管用于动脉血压监测;分离右颈静脉置管,用于给药、回输血液;分离股动脉,置管备放血用。静脉使用肝素(250 U/kg)抗凝,在10 min内放血,使动脉平均血压下降至5.3 kPa,造成大鼠重度失血性休克,并通过放血/回输血液使血压稳定5.3 kPa并持续60 min,然后经颈静脉输入治疗用药物或溶液3.0 mL,并在30 min内缓慢间断回输全部所放血液,完成失血性休克及复苏的动物模型^[3],再观察90 min后取标本。

1.3 标本制备和测定

1.3.1 小肠黏膜光镜观察 模型成功后迅速开腹,回肠末端5 cm处取1.0 cm肠段一份,随即置入多聚甲醛液中固定,进行蜡块包埋、切片及苏木精-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^[3]评分法进行评分,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。

1.3.2 MDA含量、SOD、GSH-PX活性测定 取相邻10 cm小肠,用冰冻生理盐水清洗,在冰盘刮取肠黏膜组织,吸水纸吸干水分浑匀后保存于-70℃待测。称取肠黏膜组织100 mg,溶于1 mL生理盐水,制备成10%的组织匀浆,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,用酶促法测定GSH-PX活性(试剂盒由南京建成生物工程研究所提供)。

1.4 统计学处理

所有计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较使用方差分析的方法,独立样本均数多重比较采用LSD-t(least significant difference-t)检验,数据经SPSS 10.0软件包处理, $P < 0.05$ 为有显著性意义。

2 结果

2.1 一般情况

各组动物的体质量、实验时的体温、放血总量的比较差异无显著性($P > 0.05$,表1)。休克期和再灌注期的循环变化:与放血前血压相比,各组大鼠的血压在放血后明显降低($P < 0.05$),表明动物处于重度失血性休克状态;放血后和灌注后同一观察时间点组间血压值比较差异无显著性($P > 0.05$,表2)。各组动物均无死亡。这些统计结果说明各组实验条件基本均衡。

2.2 小肠组织病理学改变和Chiu's评分值

光镜下,正常组小肠黏膜结构无明显损伤;模

表 1 各组实验动物情况

Table 1 Basic conditions of different groups of rats

($\bar{x} \pm s$)

Group	Cases	Mass(g)	Body temperature (°C)	Blood withdrawal (mL)
Controlled	8	265 ± 18	26.38 ± 1.06	-
Model	8	281 ± 20	26.67 ± 0.52	5.10 ± 1.80
Astragalus	8	269 ± 14	25.88 ± 1.13	5.20 ± 1.60

表 2 三组大鼠实验时平均动脉血压变化

Table 2 The mean arterial press during experiment of the three groups

(kPa, $\bar{x} \pm s$)

Groups	Prior to shock	30 min after shock	10 min after perfusion	30 min after perfusion	60 min after perfusion	90 min after perfusion
Controlled	12.66 ± 1.28	-	-	-	-	-
Model	12.68 ± 0.82	5.33 ± 0.25 ¹⁾	12.66 ± 1.35	12.83 ± 1.60	11.65 ± 0.68	11.60 ± 1.82
Astragalus	13.00 ± 1.36	5.30 ± 0.20 ¹⁾	12.16 ± 1.35	12.90 ± 1.60	12.05 ± 0.82	11.82 ± 1.42

1) Compared with group before shock, $P < 0.01$

型组绒毛水肿明显,大量黏膜上皮细胞脱落,绒毛和腺体明显受损,有的出现溃疡,黄芪组绒毛轻度

水肿,少量黏膜上皮细胞脱落,绒毛受损轻度,腺体基本正常,部分轻度受损,见图 1A-C。

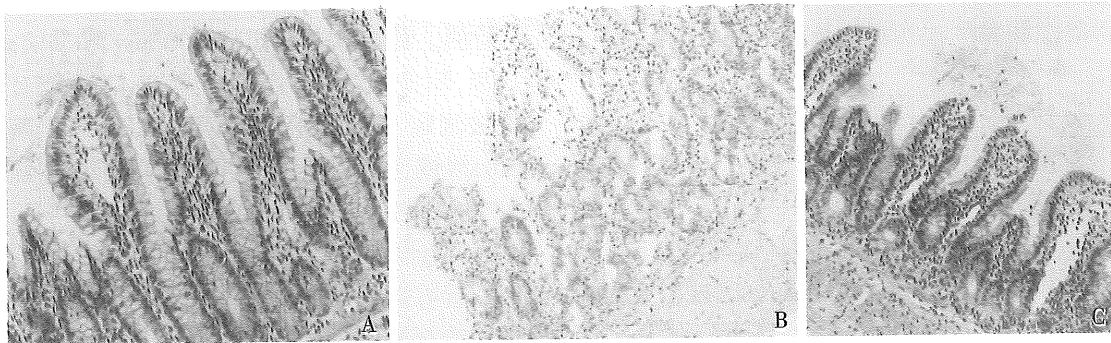


图 1 小肠黏膜病理学

Fig.1 Microscopic observation on small intestinal mucosa pathology

A: Normal group, Villus and gland are normal, no inflammatory cell infiltration in mucosa; B: Model group, Villus edema and gland damaged is obvious and mass mucosa epithelial cell are abscission. There are much inflammatory cell infiltration in mucosa; C: Astragalus membranaceus group, Villus edema is gently. The abscission of mucosa epithelial cell is little. Gland are nearly normal. There are little inflammatory cell infiltration in mucosa; $\times 200$

Chiu's 评分值以模型组最高,正常组最低,两者间极有统计学差异($P < 0.01$)。黄芪组 Chiu's 评分值低于模型组,但要高于正常组,皆有统计学差异($P < 0.05$;表 3)。

2.3 小肠黏膜组织 MDA 含量、SOD、GSH-PX 活性的变化

小肠黏膜组织丙二醛的含量以模型组最高,与黄芪组和正常组比较,皆有统计学意义($P < 0.05$)。黄芪组略高于正常组,但两者差异无统计学意义($P > 0.05$)。小肠黏膜组织 SOD 活性黄芪

组最高,模型组最低,两者间差异有统计学意义($P < 0.05$)。正常组 SOD 活性高于模型组,低于黄芪组,皆有统计学意义($P < 0.05$)。GSH-PX 活性黄芪组最高,与正常组和模型组比较都有统计学意义($P < 0.05$);模型组低于正常组,有统计学意义($P < 0.05$;表 3)。

3 讨论

小肠是机体最大的细菌储存库,休克后小肠

表3 小肠黏膜组织 Chiu's 评分及每 100 mg 组织中的 MDA 含量、SOD、GSH-PX 活性

Table 3 The Chiu's score and the concentration of MDA and the activity of SOD, GSH-PX of 100 mg small intestine mucous ($\bar{x} \pm s$)

Group	Chiu's Score	Concentration of MDA(nmol)	Activity of SOD(U)	Activity of GSH-PX(U)
Controlled	0.90 ± 0.86	28.89 ± 4.90 ¹⁾	42.42 ± 4.37 ¹⁾	58.04 ± 7.18 ¹⁾
Model	6.25 ± 2.75 ²⁾	62.70 ± 15.37	27.85 ± 10.75	52.92 ± 10.62
Astragalus	4.05 ± 1.96 ^{2),3)}	36.80 ± 9.35 ¹⁾	54.38 ± 6.84 ^{2),3)}	77.78 ± 13.56 ^{2),3)}

1) compared with model group, $P < 0.05$; 2) compared with model group, $P < 0.01$; 3) compared with controlled group, $P < 0.05$

经历了缺血再灌注损伤。肠道黏膜屏障破坏、肠道内细菌易位、内毒素吸收入血^[4],诱发肠源性全身炎症反应综合征,引起机体损害的进一步加重。肠道是休克后多器官功能衰竭(MODS)的中心器官,起着“扳机”作用。因此,研究休克后肠黏膜缺血再灌注损伤的保护尤为重要^[1]。

在中医失血治疗的方药中,黄芪具有温阳、益气、固脱和护卫营阴之功效。在中医胃肠道疾病治疗中的应用,黄芪作为益气润肠液的主要成分,能健脾益气,润肠通便,这些提示黄芪可能对失血性休克肠粘膜损伤有保护作用。

通过肠黏膜的病理变化和 Chiu's 评分值的比较,我们实验再次证明,黄芪对大鼠的小肠黏膜缺血再灌注损伤同样有保护作用,与以往的研究结果吻合^[2]。

休克后复苏组织的再灌注损伤与组织发生脂质过氧化作用而产生大量氧自由基导致的氧化损伤有关。在生理情况下,氧自由基可通过相互碰撞而猝灭,也可与生物体内一些天然自由基清除剂或抗氧化剂作用,从而终止连锁反应。当机体缺血再灌注过程中,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^[5]。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^[6-7]。SOD 和 GSH-PX 是组织清除氧自由基的两个最重要的酶,它们的活性是反映机体组织清除氧自由基能力的重要指标^[8]。

体外实验表明黄芪具有清除氧自由基的作用。利用电子自旋共振技术直接观察二甲基亚砷体系发生氧自由基的反应过程以及黄芪的清除作用。在上述体系中加入黄芪,对氧自由基信号有抑制作用,黄芪提取液对氧自由基的清除率可达 90%,说明黄芪是氧自由基的良好清除剂^[9]。

动物实验也表明,黄芪具有很强的抗氧化损

伤作用^[10]。高卫真等^[11]实验研究发现,大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌组织 SOD 和 GSH-PX 活性显著降低,MDA 含量升高,心功能受损明显。使用黄芪能提高心肌组织 SOD 和 GSH-PX 活性,降低心肌组织 MDA 含量,心功能受损减轻。在黄芪对脑和肾的缺血再灌注损伤的保护作用的动物实验研究也表明黄芪对有很强的抗氧化损伤作用^[12-13]。

我们的实验结果也显示,模型组的黏膜 MDA 含量最高,明显高于正常组,提示在小肠失血再灌注中氧自由基的确大量生成,小肠黏膜失血再灌注损伤与大量的氧自由基导致的严重脂质过氧化有关。模型组的黏膜 SOD 和 GSH-PX 的活性比正常组要低,表明失血再灌注后肠黏膜组织清除自由基的抗氧化损伤能力下降。黄芪组的黏膜 MDA 含量较低,接近与正常组黏膜 MDA 含量,明显低于模型组,表明使用黄芪后,肠黏膜的氧化损伤明显减轻。黄芪组肠黏膜组织的 SOD 和 GSH-PX 的活性都明显高于模型组,而且也高于正常,表明通过黄芪的治疗,肠黏膜组织清除氧自由基的能力得到加强。

综上所述,黄芪能减轻小肠黏膜失血再灌注的氧化损伤,其机制与黄芪的提高组织中具有抗氧化损伤能力的 SOD 和 GSH-PX 活性有关。

参考文献:

- [1] Deitch EA. Role of the gut in multiple system organ failure[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2001, 7 (2):92-98.
- [2] 黑子清,林世清,刘卫峰,等. 黄芪对兔失血性休克肠黏膜的保护作用及机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2003, 19(12): 1401-1406.
- [3] Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low flow states[J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 478-483.
- [4] 陈宇,黄文起,黑子清,等. 猪门静脉回流阻断模型内毒素的移位 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*,

(下转第 723 页 to page 723)