文章编号:1000-5404(2013)24-2639-04

论著

黄芪预处理对大鼠小肠缺血再灌注损伤的保护作用

盛恒炜[1],沈晶晶[1],屠伟峰[1],甘小亮[2] (510010 广州,南方医科大学第一临床学院附属广州军区广州总医院麻醉科[1];510630 广州,中山大学附属第三医院麻醉科[2])

[摘要] **目的** 探讨黄芪预处理对大鼠小肠缺血再灌注损伤的影响及其抗氧化作用机制。**方法** 健康雄性清洁级Wistar大鼠32只(200~250 g),分成假手术组(SH组,仅开腹,$n=12$)、模型组(M组,缺血再灌注组,$n=8$)及黄芪预处理组(E组,黄芪+缺血再灌注损伤组,黄芪20 g/kg在实验前3 d经腹腔注入,每天1次,$n=12$)。在小肠缺血前即刻,SH组及E组分别选取4只大鼠,以小肠缺血60 min再灌注2 h后各组选取8只大鼠,观察各组动物肠黏膜病理学变化,测定小肠黏膜MDA、H_2O_2与TNF-α含量及SOD与MPO活性,检测小肠黏膜$gp91^{phox}$及ICAM-1蛋白表达。**结果** 在小肠缺血前即刻,E组的MDA、H_2O_2含量及$gp91^{phox}$表达较SH组明显降低($P<0.05$),SOD活性增加($P<0.05$)。小肠缺血再灌注导致M组Chiu's评分,IMDA、H_2O_2与TNF-α含量,MPO活性,$gp91^{phox}$与ICAM-1蛋白表达较SH组明显增加($P<0.05$);SOD活性较SH组显著降低($P<0.05$)。与M组比较:E组Chiu's评分,IMDA、H_2O_2与TNF-α含量,MPO活性,$gp91^{phox}$与ICAM-1蛋白表达明显降低($P<0.05$);SOD活性显著升高($P<0.05$)。**结论** 黄芪预处理能够减轻小肠缺血再灌注损伤,与其提高抗氧化能力有关。

[关键词] 再灌注损伤;小肠;氧化应激;肿瘤坏死因子-α;黄芪
[中图法分类号] R282.71;R322.45;R364.12 [文献标志码] A

Protective effects of astragalus membranaceus pretreatment in small intestinal ischemia reperfusion injury

Sheng Hengwei[1], Shen Jingjing[1], Tu Weifeng[1], Gan Xiaoliang[2] ([1]Department of Anesthesiology, General Hospital of Guangzhou Military Command, First Clinical College, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong Province, 510010; [2]Department of Anesthesiology, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong Province, 510630, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the protective role of pretreatment of astragalus membranaceus (AE) in rats with small intestinal ischemia reperfusion injury. **Methods** Thirty-two healthy male Wistar rats, weighing 200 to 250 g were divided into 3 groups, sham-operation group (group SH, open the abdomen, without ischemia reperfusion, $n=12$), model group (group M, 60 min intestinal ischemia followed by 120 min reperfusion, $n=8$), and AE pretreatment group (group E, intraperitoneally injected with 20 g/kg AE once per day for 3 consecutive days prior to ischemia reperfusion injury, $n=12$). The tissue samples of small intestinal mucosa were harvested for pathology evaluation from 4 rats just prior to ischemia from groups SH and E, and 8 rats after intestinal ischemia/reperfusion injury from groups SH, M, and E. The contents of MDA, H_2O_2 and TNF-α, and activities of MPO and SOD in the mucosa were measured. Protein expression levels of $gp91^{phox}$ and ICAM-1 in the mucosa were detected by Western blotting. **Results** At the time-point prior to ischemia, the contents of MDA and H_2O_2 and the protein level of $gp91^{phox}$ were significantly decreased in group E as compared with group SH ($P<0.05$), whereas, SOD activity was dramatically higher ($P<0.05$). At the time-point after ischemia reperfusion, Chiu's score, contents of MDA, H_2O_2, and TNF-α, activity of MPO, and protein expression of $gp91^{phox}$ and ICAM-1 were significantly increased, while activity of SOD was significantly decreased compared with those indexes in group SH ($P<0.05$). Furthermore, AE pretreatment resulted in

[基金项目] 国家自然科学基金(30901408);广东省医学科研基金(B2010256)
[通信作者] 盛恒炜,E-mail:novo1812@gmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131121.1717.006.html(2013-11-21)

significant decreases in above increased indexes, while obvious elevation in above decreased SOD activity ($P < 0.05$). **Conclusion** AE pretreatment protects small intestine mucosa against ischemia-reperfusion injury by enhancing anti-oxidative capacity.

[**Key words**] reperfusion injury; small intestine; oxidative stress; tumor necrosis factor-α; astragalus membranaceus

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30901480) and the Foundation of Medical Research of Guangdong Province (B2010256).
Corresponding author: Sheng Hengwei, E-mail: novo1812@gmail.com

小肠缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是在各种原因引起小肠缺血后再次恢复血流,出现小肠损伤加重的现象。小肠缺血再灌注除了会引起局部组织的损伤外,更会由于细菌和毒素的释放,诱发全身炎症反应综合征甚至多脏器功能衰竭[1-2]。小肠移植中缺血再灌注损伤机制目前有一系列学说,其中氧化应激在小肠缺血再灌注损伤进程中发挥了重要作用[3]。黄芪是一种传统中药,我们在既往研究中,通过复制大鼠重度失血性休克模型,并在大鼠复苏过程中使用黄芪,研究结果证实黄芪能够减轻失血性休克再灌注肠黏膜损伤并具有抗氧化损伤作用[4-5]。对于某些可以预知的小肠缺血再灌注损伤的病理生理过程如肝脏移植及体外循环等,黄芪预处理能否减轻小肠缺血再灌注损伤? 是否与其提高抗氧化能力有关? 目前尚少见文献报道。本实验将探讨黄芪预处理对大鼠小肠缺血再灌注损伤的作用,为临床应用提供合理依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Heidolph ×900 匀浆机(HEIDOLPH,德国),离心沉淀机(Beckman Auegra 64R, BECKMAN,美国),酶标仪(Bio-Rad Model 680,BIO-RAD,美国)。黄芪注射液(成都地奥九泓制药厂生产),MDA、H_2O_2、SOD、MPO 试剂盒(南京建城),大鼠 TNF-α 试剂盒(RapidBio Lab,美国),组织蛋白浓度测定试剂盒(上海申能博彩生物科技有限公司),$gp91^{phox}$ 与 ICAM-1(Santa Cruz,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备 健康清洁级雄性 Wistar 大鼠 32 只(广东省动物中心提供,合格证号:0011023),体质量200 ~ 250 g,分为3组:SH 组(假手术组,仅开腹,不行肠系膜上动脉夹闭,$n=12$)、M 组(缺血-再灌注组,肠系膜上动脉夹闭 60 min 开放 120 min,$n=8$)、E 组(黄芪+缺血-再灌注组,黄芪 20 g/kg,生理盐水稀释到 2.0 mL,于手术前 3 d 经腹腔注射,每天 1 次,连续 3 d,$n=12$)。腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 45 mg/kg 麻醉后,在小肠缺血前即刻 SH 组、E 组各取 4 只大鼠,并在小肠缺血 60 min再灌注 120 min 后 SH 组、M 组及 E 组各取 8 只大鼠的小肠黏膜待测。小肠黏膜收集的方法:取全部小肠组织,0 ℃冰生理盐水充分冲洗肠腔,滤纸充分吸干水分,沿小肠纵轴剖开,在冰面上刮取小肠黏膜组织放入 -80 ℃保存待测。小肠缺血再灌注损伤模型复制成功的标准: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。

1.2.2 小肠黏膜光镜观察 取小肠(距回肠末端 5 cm)标本,用 10% 的甲醛固定,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,0 分:正常;1 分:绒毛顶端上皮下间隙增宽;2 分:绒毛顶端上皮下间隙进一步扩大,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 MDA、H_2O_2 含量与 SOD 活性的测定 称取小肠黏膜质量后 4 ℃下制作成约 10% 小肠组织匀浆;4 ℃离心取上清液。用试管法测定组织总蛋白浓度,根据实验操作说明测定 MDA、H_2O_2 含量与 SOD 活性,小肠 MDA、H_2O_2 含量与 SOD 活性根据所测的量/总蛋白量计算而得。

1.2.4 小肠 TNF-α 含量的测定 取小肠组织匀浆,采用 ELISA 试剂盒测定小肠组织匀浆 TNF-α 含量,小肠组织 TNF-α 含量根据所测 TNF-α 量/总蛋白量计算而得。

1.2.5 小肠 MPO 活性的测定 称取小肠黏膜质量后,根据实验操作说明测定 MPO 活性,小肠 MPO 活性根据所测的量/总蛋白量计算而得。

1.2.6 $gp91^{phox}$ 及 ICAM-1 蛋白表达 取小肠黏膜组织,采用 Western blot 方法,100 μg 的样品加入 10% 的分离胶和 5% 的浓缩胶,进行电泳,转 PVDF 膜室温下用 TBST 洗膜 5 min ×3 次。加入一抗,大鼠抗 $gp91^{phox}$、ICAM-1 (1∶500) 及兔抗 β-actin (1∶3 000),4 ℃孵育过夜。分别以 HRP 标记的二抗兔和二抗大鼠(1∶1 000),其中 β-actin 二抗兔(1∶2 000)室温孵育膜 1 h。TBST 洗膜 10 min ×3 次,ECL 发光试剂盒显影,胶片曝光显影。

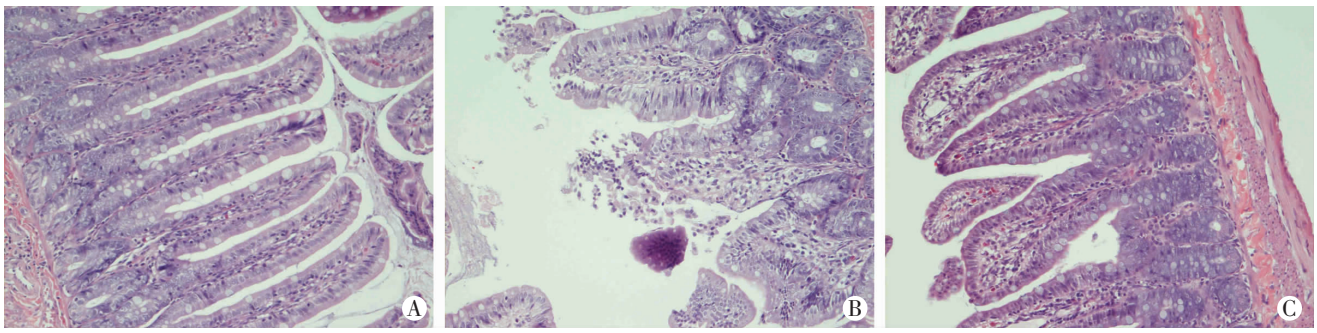
1.3 统计学处理

用 SPSS 12.0 软件系统进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较分别采用 t 检验或单因素方差分析。

2 结果

2.1 黄芪预处理对小肠黏膜氧化应激的影响

黄芪预处理 3 d 后能够明显降低 MDA 与 H_2O_2 含量及 $gp91^{phox}$ 表达,显著提高 SOD 活性($P<0.05$)。见表1。



A:SH 组;B:M 组;C:E 组

图 1　黄芪预处理对各组大鼠小肠缺血再灌注肠黏膜组织病理结构的影响（HE ×200）

表 1　黄芪预处理对各组大鼠小肠黏膜氧化应激与 Chiu's 评分及 MPO 活性的影响（$n=4$, $\bar{x}\pm s$）

组别	MDA (nmol/g)	H_2O_2 (mmol/g)	SOD (U/mg)	gp91^{phox} 表达	MPO (U/mg)	Chiu's 评分
SH 组	0.38 ±0.07	1.3 ±0.8	359.3 ±41.7	1.0 ±0.0	0.7 ±0.3	0.0 ±0.0
E 组	0.25 ±0.05[a]	0.9 ±0.6[a]	456.8 ±54.8[a]	0.7 ±0.2[a]	0.8 ±0.3	0.0 ±0.0

a: $P<0.05$,与 SH 组比较

2.2　黄芪预处理对小肠黏膜病理学及 MPO 活性的影响

E 组肠黏膜结构无明显损伤;Chiu's 评分与 MPO 活性同 SH 组比较无明显差别($P>0.05$)。见表 1。

2.3　黄芪预处理对小肠缺血再灌注后肠黏膜结构的影响

光镜下,SH 组肠黏膜结构无明显损伤;M 组肠黏膜绒毛水肿明显,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;E 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。SH 组 Chiu's 评分最低,M 组最高($P<0.01$),E 组评分低于 M 组($P<0.05$)。见图 1、表 2。

表 2　黄芪预处理对各组大鼠小肠缺血再灌注后 Chiu's 评分、MPO 活性及 ICAM-1 表达的影响（$n=8$, $\bar{x}\pm s$）

组别	Chiu's 评分	TNF-α(pg/mg)	MPO(U/mg)	ICAM-1 表达
SH 组	0.0 ±0.0	133 ±10	34.4 ±12.8	1.0 ±0.0
M 组	4.0 ±1.0[a]	298 ±32[a]	15.9 ±5.4[a]	2.2 ±0.5[a]
E 组	2.0 ±0.5[ab]	189 ±20[ab]	24.0 ±11.1	1.6 ±0.3[ab]

a: $P<0.05$,与 SH 组比较; b: $P<0.05$,与 M 组比较

2.4　黄芪预处理对小肠缺血再灌注后肠黏膜 TNF-α 含量的影响

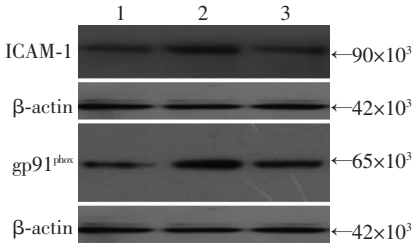
与 SH 组比较,M 组和 E 组 TNF-α 浓度明显升高($P<0.05$);与 M 组相比,E 组 TNF-α 浓度明显降低($P<0.05$)。见表 2。

2.5　黄芪预处理对小肠缺血再灌注后肠黏膜 MPO 活性及 ICAM-1 表达的影响

与 SH 组比较,M 组和 E 组 MPO 活性及 ICAM-1 表达显著升高($P<0.05$);与 M 组比较,黄芪预处理能够明显降低 MPO 活性及 ICAM-1 表达的升高($P<0.05$)。见表 2,图 2。

2.6　黄芪预处理对小肠缺血再灌注后肠黏膜氧化应激的影响

与 SH 组比较,M 组与 E 组 MDA、H_2O_2 含量及 gp91^{phox} 表达明显升高且 SOD 活性显著降低($P<0.05$);与 M 组比较,E 组上述变化明显减轻($P<0.05$)。见表 3。



1:SH 组;2:M 组;3:E 组

图 2　Western blot 检测黄芪预处理对各组大鼠小肠缺血再灌注后 ICAM-1、gp91^{phox} 表达的影响

表 3　黄芪预处理对各组大鼠小肠缺血再灌注后 MDA、H_2O_2 含量,SOD 活性及 gp91^{phox} 表达的影响（$n=8$, $\bar{x}\pm s$）

组别	MDA(nmol/g)	H_2O_2(mmol/g)	SOD(U/mg)	gp91^{phox}表达
SH 组	0.42 ±0.05	1.5 ±0.7	375.7 ±35.7	1.0 ±0.0
M 组	0.78 ±0.08[a]	4.1 ±0.9[a]	165.7 ±28.5[a]	2.5 ±0.4[a]
E 组	0.60 ±0.06[ab]	2.8 ±0.7[ab]	225.9 ±34.1[ab]	1.5 ±0.3[ab]

a: $P<0.05$,与 SH 组比较; b: $P<0.05$,与 M 组比较

3　讨论

黄芪是豆科植物膜荚黄芪或蒙古芪的根,是常用中药,具有扶正、补气、保肝、抗菌消炎等多种活性[6]。既往研究发现黄芪具有良好的抗氧化作用,表现为增加机体的 SOD 活性,降低组织的 MDA 浓度[7-8]。NADPH 氧化酶是氧化应激产生氧化产物的主要激活酶,它分为 Nox1、Nox2、Nox3、Nox4 及 Nox5 以及 Duox1、Duox2 等亚型,其中 Nox2 又称 gp91,广泛分布在黏膜上皮细胞膜表面[9]。本研究发现预处理黄芪能够明显降低小肠黏膜 MDA、H_2O_2 浓度及 gp91 表达,

且小肠黏膜SOD活性显著升高,与既往研究结果相符[2,8]。研究结果强烈提示20 g/kg的黄芪具有强烈的抗氧化作用,且其药物本身对小肠黏膜结构没有影响。

我们既往研究发现在再灌注前应用黄芪对失血性休克再灌注肠黏膜有一定的保护作用,表现为小肠绒毛受损程度较轻,脱落较少,说明黄芪对失血再灌注具有良好的保护作用;然而,预处理黄芪是否具有同样的作用效果,目前少有文献报道。本研究发现预处理黄芪后,大鼠抗小肠缺血再灌注的打击能力显著提高,表现为肠黏膜Chiu's评分较M组显著降低,同时小肠黏膜MDA、H_2O_2浓度及$gp91^{phox}$表达较M组明显降低,且小肠黏膜SOD活性较M组显著升高,这些研究证实预处理黄芪能够减少氧化产物的形成,是保护小肠免受缺血-再灌注损伤的一个重要机制。

中性粒细胞在损伤处聚集、浸润[10]及失控的炎症反应是小肠缺血再灌注损伤另一特征[11-13],本研究结果显示小肠缺血再灌注同样可导致中性粒细胞在小肠黏膜处浸润,小肠黏膜的MPO活性、ICAM-1蛋白表达以及TNF-α浓度明显升高,预处理黄芪后能够明显减轻中性粒细胞的浸润及激活,降低MPO活性、ICAM-1蛋白表达以及TNF-α浓度,与An等[14]报道应用抗TNF-α单克隆抗体能够显著减轻小肠缺血再灌注损伤的结果一致。

引起中性粒细胞在损伤处聚集的因素很多,Shin等[15]研究显示肥大细胞激活释放类胰蛋白酶引起中性粒细胞聚集的主要机制之一,Zhao等[16]发现使用肥大细胞膜稳定剂色甘酸钠能够显著降低急性胰腺炎诱发肺组织内ICAM-1的表达,抑制中性粒细胞在损伤处浸润,降低TNF-α等炎性因子的浓度。我们既往研究结果显示,黄芪能够明显抑制失血性休克肠黏膜肥大细胞活性,我们推测黄芪预处理可能部分通过抑制肥大细胞激活以抑制中性粒细胞聚集,具体机制有待进一步研究。

参考文献:

[1] Tascilar N, Irkorucu O, Tascilar O, *et al*. Bacterial translocation in experimental stroke: what happens to the gut barrier? [J]. Bratisl Lek Listy, 2010, 111(4): 194-199.

[2] Grootjans J, Lenaerts K, Derikx J P, *et al*. Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model[J]. Am J Pathol, 2010, 176(5): 2283-2291.

[3] Hei Z Q, Gan X L, Luo G J, *et al*. Pretreatment of cromolyn sodium prior to reperfusion attenuates early reperfusion injury after the small intestine ischemia in rats[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(38): 5139-5146.

[4] Chen R, Shao H, Lin S, *et al*. Treatment with Astragalus membranaceus produces antioxidative effects and attenuates intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats[J]. Am J Chin Med, 2011, 39(5): 879-887.

[5] 熊平, 蒋灵芝, 廖秀清. 黄芪甲苷保护大鼠肺缺血再灌注肺损伤的形态学研究[J]. 南方医科大学学报, 2010, 30(8): 1864-1867.

[6] Zhang G G, Yang Z B, Wang Y, *et al*. Effects of Astragalus membranaceus root processed to different particle sizes on growth performance, antioxidant status, and serum metabolites of broiler chickens[J]. Poult Sci, 2013, 92(1): 178-183.

[7] Weismann D, Hartvigsen K, Lauer N, *et al*. Complement factor H binds malondialdehyde epitopes and protects from oxidative stress[J]. Nature, 2011, 478(7367): 76-81.

[8] Ma X, Zhang K, Li H, *et al*. Extracts from Astragalus membranaceus limit myocardial cell death and improve cardiac function in a rat model of myocardial ischemia[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 149(3): 720-728.

[9] Ge M, Gan X, Liu D, *et al*. Time-course analysis of counts and degranulation of mast cells during early intestinal ischemia-reperfusion injury in mice[J]. Mol Med Rep, 2013, 8(2): 401-406.

[10] Paterniti I, Galuppo M, Mazzon E, *et al*. Protective effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase activity, in splanchnic artery occlusion and reperfusion[J]. J Leukoc Biol, 2010, 88(5): 993-1003.

[11] Zhao X, Town J R, Yang A, *et al*. A novel ELR-CXC chemokine antagonist reduces intestinal ischemia reperfusion-induced mortality, and local and remote organ injury[J]. J Surg Res, 2010, 162(2): 264-273.

[12] 黄莉萍, 余艳红, 盛超, 等. 限制性液体复苏产兔失血性休克对肠缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 南方医科大学学报, 2011, 31(9): 1530-1533.

[13] Di-Paola R, Impellizzeri D, Torre A, *et al*. Effects of palmitoylethanolamide on intestinal injury and inflammation caused by ischemia-reperfusion in mice[J]. J Leukoc Biol, 2012, 91(6): 911-920.

[14] An S, Hishikawa Y, Liu J, *et al*. Lung injury after ischemia-reperfusion of small intestine in rats involves apoptosis of type II alveolar epithelial cells mediated by TNF-alpha and activation of Bid pathway [J]. Apoptosis, 2007, 12(11): 1989-2001.

[15] Shin K, Nigrovic P A, Crish J, *et al*. Mast cells contribute to autoimmune inflammatory arthritis *via* their tryptase/heparin complexes[J]. J Immunol, 2009, 182(1): 647-656.

[16] Zhao X, Dib M, Wang X, *et al*. Influence of mast cells on the expression of adhesion molecules on circulating and migrating leukocytes in acute pancreatitis-associated lung injury[J]. Lung, 2005, 183(4): 253-264.

(**收稿**:2013-08-25;**修回**:2013-10-25)

(编辑 栾 嘉)