DOI:10.16016/j.1000-5404.201606076

番茄红素对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用

谭杨波[1],李 通[2],甘嘉亮[2] (545005 广西 柳州,广西科技大学医学院外科护理学教研室[1];530021 南宁,广西医科大学第一附属医院结直肠肛门外科[2])

[摘要] **目的** 探讨番茄红素对肠缺血再灌注大鼠肠黏膜的保护作用及机制。**方法** 健康清洁级SD大鼠48只按随机数字表法分为番茄红素组、缺血再灌注组、假手术组,每组16只。番茄红素组予以番茄红素10 mg/kg连续灌胃5 d,缺血再灌注组和假手术组灌胃相同剂量生理盐水。各组大鼠分离肠系膜上动脉,番茄红素组和缺血再灌注组以血管夹夹闭肠系膜上动脉1 h,再灌注4 h后,各组大鼠采集腹主动脉血和回肠标本,测定血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)、二胺氧化酶(diamine oxidase,DAO)活性和丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量,小肠组织髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)活性及肿瘤坏死因子α(tumor necrosis factor-alpha,TNF-α)与白细胞介素6(interleukin-6,IL-6)的含量,以及小肠组织病理学Chiu's评分。**结果** 番茄红素组小肠组织病理学Chiu's评分明显低于缺血再灌注组($P<0.01$),但与假手术组相比差异仍有统计学意义($P<0.01$)。番茄红素组小肠组织TNF-α、IL-6、MPO及血清SOD、DAO和MDA明显优于缺血再灌组($P<0.01$),而小肠组织TNF-α、IL-6、MPO及血清DAO、SOD、MDA与假手术组比较差异仍有统计学意义($P<0.01$)。**结论** 番茄红素预处理能有效抑制肠缺血再灌注后的氧化应激反应及炎症反应,减轻小肠缺血再灌注损伤。

[关键词] 番茄红素;肠缺血再灌注;氧化应激;肿瘤坏死因子-α;白细胞介素-6

[中图法分类号] R364.12;R574;R977.21 [文献标志码] A

Protective effects of lycopene on intestinal ischemia-reperfusion injury in rats

Tan Yangbo[1], Li Tong[2], Gan Jialiang[2] ([1]Department of Surgery Nursing, Medical College of Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 545005; [2]Department of Colorectal and Anal Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region, 530021, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the protective role of lycopene in the rats with intestinal ischemia-reperfusion injury and investigate the underlying mechanism. **Methods** Forty-eight clean and healthy SD rats were divided into 3 groups ($n=16$ for each group), that is, lycopene group, ischemia-reperfusion group, and sham-operation group. Lycopene group was gavaged with 10 mg/kg lycopene for 5 consecutive days before model establishment. Ischemia-reperfusion and sham-operation groups were given saline for the same duration. The rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury were induced by clamping the superior mesenteric artery for 1 h, and then followed by reperfusion for 4 h. The serum activities of superoxide dismutase (SOD) and diamine oxidase (DAO) and contents of malondialdehyde (MDA), and the activity of myeloperoxidase (MPO) and contents of TNF-α and IL-6 in the intestinal tissues were detected. The intestinal morphology was graded by Chiu's scale. **Results** The lycopene group had significantly lower Chiu's score in intestinal histopathology than the ischemia-reperfusion group ($P<0.01$), but the score was still significant different compared with that of sham-operation group ($P<0.01$). The contents and activities of TNF-α, IL-6 and MPO in intestinal tissue, and those of SOD, DAO and MDA in the serum were significantly better in the lycopene group than the ischemia-reperfusion group ($P<0.01$), though these indicators being obviously different with the sham-operation group ($P<0.01$). **Conclusion** Lycopene pretreatment effectively inhibits

[基金项目] 广西自然科学基金(2013GXNSFAA019153)

[通信作者] 谭杨波, E-mail: kylw2014@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160926.0917.003.html

oxidation stress and inflammation, and relieves the injury after intestinal ischemia reperfusion.

[**Key words**] lycopene; intestinal ischemia-reperfusion; oxidative stress; tumor necrosis factor-α; interleukin-6

Supported by the Natural Science Foundation of Guangxi Zhuang Autonomous Region (2013GXNSFAA019153). Corresponding author: Tan Yangbo, E-mail: kylw2014@163.com

小肠缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion,I/R)指在各种原因致使小肠缺血的基础上恢复血流后肠道损伤反而加重,甚至发生不可逆损伤的现象。肠 I/R 后由于氧化应激反应、细菌和毒素的移位,释放大量炎症因子,进而诱发全身炎症反应综合征[1-2]。临床中严重的感染、休克、烧伤、小肠移植、肠梗阻、肠系膜血管疾病等的病理生理过程中都存在不同程度的肠 I/R[3-4]。番茄红素是植物中所含的一种天然色素,主要存在于番茄的成熟果实中,具有强抗氧化作用,是目前自然界中被发现的最强抗氧化剂之一,其抗氧化能力远胜于其他类胡萝卜素和维生素 E,是维生素 E 的 100 倍。番茄红素能有效清除氧化自由基,提高抗氧化酶活性,从而阻断自由基的损伤[5]。研究发现番茄红素能提高脑缺血再灌注后脑组织中超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性,降低丙二醛(malondialdehyde,MDA)含量,抑制氧化应激反应[6]。本研究采用肠系膜上动脉夹闭-松夹方式复制大鼠 I/R 模型,探讨番茄红素对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor-alpha,TNF-α)、白细胞介素 6(interleukin-6,IL-6) ELISA 试剂盒(RapidBio Lab,美国),二胺氧化酶(diamine oxidase,DAO)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、SOD 试剂盒(南京建成生物工程公司),680 酶标仪、洗板机(Bio-Rad 公司,美国),TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器厂),番茄红素(南京泽朗生物科技有限公司),戊巴比妥钠(成都市制药厂),二甲苯(北京化学试剂公司),苏木精、伊红染液(武汉博士德生物工程公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 健康清洁级 SD 大鼠 48 只,月龄(1.9±0.2),雌雄不拘,体质量(230±20)g,由广西医科大学实验动物中心提供,按随机数字表法分为 3 组:番茄红素组、缺血再灌注组、假手术组,每组 16 只。番茄红素组大鼠制备模型前 5 d 连续每天灌胃 10 mg/kg 番茄红素,肠缺血组和假手术组灌胃等量生理盐水。

1.2.2 动物模型制备 所有大鼠造模前禁食 12 h,自由饮水,最后一次灌胃 2 h 后称取体质量,以 1.5% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,腹部备皮后常规消毒、铺巾,做腹正中切口 3 cm 打开腹腔,逐步分离、暴露肠系膜上动脉。暴露肠系膜上动脉后,以无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉 1 h 后打开,再灌注 4 h,制备肠缺血再灌注动物模型。假手术组进行相同操作,但不夹闭肠系膜上动脉。

1.2.3 肠组织病理学观察 再灌注 4 h 后,取距回盲部 5 cm 以上肠段 2 cm,以生理盐水冲洗干净后,装入 10% 甲醛溶液中固定,脱水,石蜡包埋切片,常规进行 HE 染色,树胶封片。每张切片在光学显微镜下选取 2 个非重叠视野根据 Chiu's 6 分法[7]进行病理学评分。0 分:正常小肠绒毛上皮;1 分:肠黏膜上皮下的 Gruenhagen's 间隙,毛细血管有充血现象;2 分:肠黏膜上皮下间隙出现扩张;3 分:肠黏膜上皮大片状抬高,绒毛倒伏,顶端脱落,炎症细胞局部聚集,固有层弥漫出血;4 分:固有层毛细血管暴露,炎症细胞多见,绒毛破损,内皮下可见出血;5 分:内皮下出血,溃疡形成。取其平均值。

1.2.4 血清 MDA、SOD 及 DAO 检测 再灌注 4 h 后,分离腹主动脉采血 3 mL,室温下静置 20 min,离心机 3 000 r/min 离心 15 min,取上层血清,按照试剂盒操作检测血清 SOD、DAO 活性和 MDA 含量。

1.2.5 小肠组织匀浆检测 再灌注 4 h,取一段小肠称量后,制备 10% 小肠组织匀浆,分别以 IL-6、TNF-α ELISA 试剂盒检测小肠组织 IL-6 和 TNF-α 含量,以 MPO 试剂盒检测小肠组织 MPO 活性。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha = 0.05$。

2 结果

2.1 番茄红素对肠缺血再灌注氧化应激的影响

与假手术组比较,缺血再灌注后番茄红素组和肠缺血组 SOD 活性明显降低($P < 0.01$,表 1),MDA 含量明显增加($P < 0.01$);而番茄红素组 SOD 活性明显高于缺血再灌注组($P < 0.01$),MDA 含量明显低于缺血再灌注组($P < 0.01$),表明番茄红素能有效抑制肠缺血再灌注后氧化应激反应。

表 1　各组大鼠血清 SOD 活性和 MDA 含量($n=16$, $\bar{x}\pm s$)

组别	SOD 活性(U/mL)	MDA 含量(nmol/mL)
番茄红素组	84.92±10.03[ab]	5.01±1.28[ab]
缺血再灌注组	72.75±9.39[b]	8.49±1.22[b]
假手术组	133.75±2.93	3.09±0.19

a:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较;b:$P<0.01$,与假手术组比较

2.2　番茄红素对小肠组织 TNF-α 和 IL-6 的影响

缺血再灌注 4 h 后,番茄红素组和缺血再灌注组小肠组织中 TNF-α 和 IL-6 明显升高,明显高于假手术组($P<0.01$,表 2);而番茄红素组小肠组织中 TNF-α 和 IL-6 明显低于缺血再灌注组($P<0.01$),提示番茄红素能减少肠缺血再灌注后小肠组织 IL-6 和 TNF-α 的表达。

表 2　各组大鼠小肠组织 IL-6 和 TNF-α 含量
(pg/mL, $n=16$, $\bar{x}\pm s$)

组别	IL-6	TNF-α
番茄红素组	36.17±5.54[ab]	46.73±4.65[ab]
缺血再灌注组	58.55±6.22[b]	67.10±8.91[b]
假手术组	13.48±1.23	13.55±1.61

a:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较;b:$P<0.01$,与假手术组比较

2.3　番茄红素对小肠组织 MPO 活性的影响

与假手术组比较,缺血再灌注 4 h 后,缺血再灌注组大鼠小肠组织中 MPO 活性明显增高,差异有统计学意义($P<0.01$,表 3);番茄红素组大鼠小肠组织中 MPO 活性有所降低,与缺血再灌注组比较,小肠组织 MPO 活性低于缺血再灌注组($P<0.01$),但仍明显高于假手术组($P<0.01$),说明番茄红素可以降低肠缺血再灌注后小肠组织中 MPO 活性。

2.4　番茄红素对血清 DAO 活性的影响

缺血再灌注 4 h 后,缺血再灌注组血清中 DAO 活性明显升高,与假手术组相比差异有统计学意义($P<0.01$,表 3),番茄红素预处理后,番茄红素组血清中 DAO 活性有所下降,且明显低于缺血再灌注组($P<0.01$),但仍明显高于假手术组($P<0.01$),表明番茄红素可以降低肠缺血再灌注后血清中 DAO 活性。

2.5　番茄红素对小肠组织病理学变化的影响

假手术组呈现正常小肠绒毛改变,绒毛整齐,腺体正常,间隙正常,固有层无出血、水肿。番茄红素组小肠绒毛结构基本整齐,绒毛轻度水肿,上皮下间隙轻微扩张,可见少量炎性细胞,腺体基本正常。缺血再灌注组小肠绒毛结构明显破坏,黏膜充血明显,较多炎性细胞浸润,腺体明显水肿,部分出现溃疡(图 1)。与假手术组比较,缺血再灌注 4 h 后,番茄红素组和缺血再灌注组 Chiu's 评分明显升高($P<0.01$,表 3),但番茄红素组 Chiu's 评分低于缺血再灌注组($P<0.01$)。

表 3　各组大鼠 DAO、MPO 活性及 Chiu's 评分
($n=16$, $\bar{x}\pm s$)

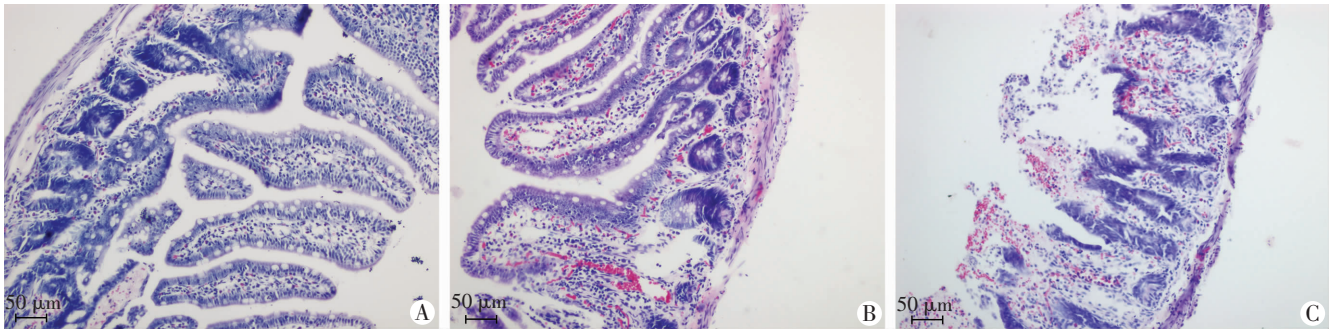
组别	DAO(U/mg)	MPO(U/L)	Chiu's 评分
番茄红素组	47.53±3.50[ab]	12.62±1.49[ab]	2.17±1.19[ab]
缺血再灌注组	31.08±3.29[b]	17.59±1.76[b]	3.92±1.00[b]
假手术组	83.44±2.70	8.47±0.55	0

a:$P<0.01$,与缺血再灌注组比较;b:$P<0.01$,与假手术组比较

3　讨论

肠缺血再灌注损伤后大量氧自由基的释放是导致肠黏膜屏障损伤的重要因素,氧自由基能够攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,从而引发脂质过氧化作用,形成 MDA、羟自由基(OH^-)及过氧化氢(H_2O_2)等过氧化物[8-10]。由此可见,MDA 是脂质过氧化反应的产物,可以反映自由基对组织损伤的程度。SOD 是一种含有金属元素的活性蛋白酶,是生物体内天然的氧自由基清除剂,对组织起到很好的保护作用,可见 SOD 活性能够间接反映清除自由基的能力。本研究结果显示番茄红素组 SOD 活性明显高于缺血再灌注组,MDA 含量明显低于缺血再灌注组,表明番茄红素能有效抑制肠缺血再灌注后氧化应激反应。

肠上皮细胞 DAO 是人类和哺乳动物小肠黏膜上层绒毛中具有高度活性的细胞内酶,在组胺和多种多胺代谢中起作用,其活性与黏膜细胞的核酸和蛋白合成密切相关,能够反映肠道机械屏障的完整性和受损



A:假手术组;B:番茄红素组;C:缺血再灌注组

图 1　HE 染色观察肠缺血再灌注 4 h 后各组小肠组织病理学改变

伤程度[11]。本研究结果显示肠缺血再灌注后缺血再灌注组血清中 DAO 活性明显升高,而番茄红素组血清中 DAO 活性明显低于缺血再灌注组。光镜下可见肠缺血再灌组小肠绒毛结构明显破坏,黏膜充血明显,较多炎性细胞浸润,腺体明显水肿,部分出现溃疡。而番茄红素组小肠绒毛结构基本整齐,绒毛轻度水肿,上皮下间隙轻微扩张,可见少量炎性细胞,腺体基本正常。番茄红素组 Chiu's 评分明显低于缺血再灌组($P<0.01$)。由此可见,番茄红素预处理可以有效降低肠缺血再灌注后血清中 DAO 活性,减轻小肠绒毛结构破坏,降低 Chiu's 评分,能够有效缓解肠缺血再灌注造成的肠道损伤。

TNF-α 是一种重要的炎性因子,在缺血再灌注损伤炎症反应中具有重要作用,出现在炎症反应最初阶段[12]。肠缺血再灌注损伤后,TNF-α 通过激活中性粒细胞和单核巨细胞释放,刺激 IL-1、IL-6 等炎症因子产生,并且诱导白三烯类、血栓素 A2、前列腺素等炎症介质的生成,致使细胞凋亡、血管通透性增加,引发过度炎症反应,加重组织器官的损伤[13]。IL-6 是一种多细胞源性的细胞因子,肠缺血再灌注后缺氧酸中毒等因素能够使 IL-6 合成增加,刺激细胞间黏附分子-1 产生,使炎性细胞大量侵入病变组织,引起大量中性粒细胞黏附活化,释放大量的自由基,与 TNF-α 等炎症细胞因子协同发挥细胞毒作用[14]。缺血再灌注损伤后活化的中性粒细胞可合成释放 MPO,并且储存在嗜天青颗粒中,因此组织中 MPO 水平可反映中性粒细胞浸润和激活的程度[15]。本研究结果显示:缺血再灌注 4 h 后,小肠组织中 TNF-α、IL-6 及 MPO 明显升高,番茄红素预处理后,小肠组织中 TNF-α、IL-6 及 MPO 明显降低,说明番茄红素可以有效抑制肠缺血再灌注损伤后小肠组织中 TNF-α 及 IL-6 的表达,降低 MPO 活性,从而减轻炎症反应。

综上所述,番茄红素能有效抑制肠缺血再灌注损伤后氧化应激反应,降低小肠组织中 TNF-α 和 IL-6 的表达,减少中性粒细胞浸润,减轻炎症反应,对肠缺血再灌注损伤具有很好的保护作用。

参考文献:

[1] Guan Y, Worrell R T, Pritts T A, *et al*. Intestinal ischemia reperfusion injury: reversible and irreversible damage imaged *in vivo*[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 297(1): G187 - G196. DOI: 10.1152/ajpgi.90595.2008

[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. DOI: 10.2353/ajpath.2010.091069

[3] Patai A V, Molnár B, Tulassay Z, *et al*. Serrated pathway: alternative route to colorectal cancer [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(5): 607 - 615. DOI: 10.3748/wjg.v19.i5.607

[4] Kassahun W T, Schulz T, Richter O, *et al*. Unchanged high mortality rates from acute occlusive intestinal ischemia: six year review[J]. Langenbecks Arch Surg, 2008, 393(2): 163 - 171. DOI: 10.1007/s00423-007-0263-5

[5] Stahl W, Sies H. Bioactivity and Protective effects of natural carotenoids[J]. Bioehim Biophys Acta, 2005, 1740(2): 101 - 107. DOI: 10.1016/j.bbadis.2004.12.006

[6] 魏延, 沈新南, 沈慧, 等. 番茄红素对大鼠脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 卫生研究, 2010, 39(2): 201 - 204.

[7] Chiu C, McArdle A H, Brown R, *et al*. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478 - 483.

[8] Niissler N C, Miiler A R, Weidenbach H, *et al*. IL-10 increases tissue injury after selective intestine ischemia/reperfusion[J]. Ann Surg, 2003, 238(1): 49 - 58. DOI: 10.1097/01.sla.0000074962.26074.d3

[9] Salehi P, Madsen K, Zhu J, *et al*. Alleviating ischemia-reperfusion injury in small bowel[J]. Am J Transplant, 2004, 4(5): 728 - 737. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2004.00430.x

[10] Antal-Szalmas P, Poppelier M J, Sumegi A, *et al*. Spare CD14 molecules on human monocytes enhance the sensitivity for low LPS concentrations[J]. Imunol Lett, 2004, 93(1): 11 - 15. DOI: 10.1016/j.imlet.2004.01.007

[11] Moriyama K, Kouchi Y, Morinaga H , *et al*. D Diamine oxidase, a plasma biomarker in rats to GI tract toxicity of oral fluorouracil anti-cancer drugs[J]. Toxicology, 2006, 217(2/3): 233 - 239. DOI: 10.1016/j.tox.2005.09.017

[12] de Arruda M J, Poggetti R S, Fontes B, *et al*. Intestinal ischemia/reperfusion induces bronchial hyperreactivity and increases serum TNF-α in rats[J]. Clinics (Sao Paulo), 2006, 61(1): 21 - 28. DOI: /S1807-59322006000100005

[13] 盛恒炜, 沈晶晶, 屠伟峰, 等. 黄芪预处理对大鼠小肠缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(24): 2639 - 2642.

[14] 杨洁, 张海霞, 赵东伟, 等. 参附注射液对肠缺血再灌注大鼠肝肾功能及 TNF-α、IL-6 水平的影响[J]. 山东医药, 2012, 52(19): 27 - 28.

[15] Liu K X, Li Y S, Huang W Q, *et al*. Immediatc postconditioning during reperfusion attenuates intestinal injury[J]. Intensive Care Med, 2009, 35(5): 933 - 942. DOI: 10.1007/s00134-009-1428-1

(**收稿**:2016-06-15;**修回**:2016-07-08)

(编辑 龙 亮)