

文章编号:1005-6947(2008)10-0993-05

· 基础研究 ·

β-七叶皂苷钠对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用

张信来, 刘陶迪, 罗力, 李得溪, 侯明星

(内蒙古医学院第一附属医院 肿瘤外科, 内蒙古 呼和浩特 100059)

摘要:目的 研究β-七叶皂苷钠(β-aescin, β-A)对大鼠缺血再灌注(I/R)后肠黏膜的保护作用,并探讨其作用机制。方法 88只健康雄性Wistar大鼠,随机分为2组:I/R对照组和I/Rβ-A预处理组,每组按I/R不同时间(0, 1, 2 h),观察组织病理损害, Haglund评分, 肠含水率, 肠毛细血管通透性, 肠黏膜上皮细胞凋亡率, 血清TNF-α, IL-6含量变化及生存率。结果 与对照组比较, 预处理组的肠黏膜组织病理损害, 肠含水率, 毛细血管通透性, 血清TNF-α, IL-6水平($P < 0.01$)及肠黏膜细胞凋亡率均明显降低($P < 0.05$), 而且生存率明显提高($P < 0.05$)。结论 β-A对肠I/R后肠黏膜具有保护作用; 其机制可能与抑制炎症细胞因子, 降低I/R后毛细血管通透性及降低肠黏膜细胞凋亡率有关。
[中国普通外科杂志, 2008, 17(10): 993-997]

关键词: 缺血再灌注损伤; 肠; β-七叶皂苷钠; 肿瘤坏死因子α; 白细胞介素6; 毛细血管通透性; 细胞凋亡; 大鼠

中图分类号: R 656.7

文献标识码: A

The protection effect of β-aescin for ischemia reperfusion injury of intestine in rats

ZHANG Xinlai, LIU Taodi, LUO Li, LI Dexi, HOU Mingxing

(Department of Surgical Oncology, the First Affiliated Hospital, Inner Mongolian Medical College, Huhehaote 100059, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protection effect of β-aescin on rat intestine ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** Eighty-eight male wistar rats were randomly divided into two groups, then they were distinguished by different time point after occurrence of reperfusion at 0 h, 1 h, and 2 h. We observed the changes of the serum tumor necrosis factor-α, interleukine-6, the apoptosis of intestine mucosal epithelial cell, intestinal microvascular permeability, and the survival rate. **Results** The group with β-aescin pretreatment was observed to have reduction of intestinal histopathological damage, and significant decrease of Haglund scores, intestinal microvascular permeability, intestinal water content and the level of TNF-α and IL-6 ($P < 0.01$), and inhibition of intestinal mucosa cell apoptosis ($P < 0.05$) and mortality rate during 36 hours ($P < 0.01$) compared to controlled group with I/R after reperfusion. **Conclusions** The β-aescin pretreatment could protect the intestinal mucosa from I/R injury, and it might be related to suppression of proinflammatory factors, reduction of intestinal mucosa cell apoptosis and decreased intestinal microvascular permeability.
[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(10): 993-997]

Key words: Ischemia Reperfusion Injury, Intestinal; β-aescin; TNF-α; IL-6; Capillary Permeability; Apoptosis; Rats

CLC number: R 656.7

Document code: A

收稿日期: 2008-03-18; 修订日期: 2008-09-25。

作者简介: 张信来, 男, 内蒙古医学院第一附属医院副主任医师, 主要从事乳腺肿瘤、肠道肿瘤方面的研究。

通讯作者: 张信来 E-mail: xinlaizhang@sohu.com

肠道是缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, I/R, IRI) 最敏感的组织之一^[1-2], 在严重感染、创伤、休克、重要器官功能不全等疾病的病理演变过程中起着重要的作用。心、肝、脑、肾疾病中的 IRI 研究已取得了不少进展, 而有关肠 IRI 及其对多器官衰竭影响方面的研究报道较少, 因而近年来越来越受到重视, 其发生发展机理及防治措施的研究也成为外科领域的重点课题之一。娑罗子是药典收录的中药, 七叶皂甙钠系由娑罗子提取的一种皂甙制成。药理研究证明具有对抗炎性介质, 维持细胞膜稳定性、抗渗出、恢复毛细血管正常通透性、改善微循环的作用^[3]。本文旨在研究 β -七叶皂甙钠 (β -aescin) 对肠 I/R 后肠黏膜的保护作用, 并通过观察 IL-6 和 TNF- α 的变化及肠黏膜的细胞调亡率初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 药品、试剂和仪器

β -aescin 由山东绿叶制药有限公司提供粉剂, 用蒸馏水溶解配成 0.5 g/mL。甲酰胺分析纯由天津光复精细化工研究所提供。大鼠 IL-6, TNF- α , 免疫酶联吸附试验 (ELISA) 试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。伊文蓝 (Evan's blue) 粉剂购自上海国药集团化学试剂有限公司 (为进口分装)。Epics - XL II 型流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司生产。VICTOR3TM 1420 多功能检测仪购自美国 Perkin Elmer 公司。Beckman DU640 核酸蛋白分析仪购自美国 Beckman 公司。

1.2 动物分组

88 只健康雄性 Wistar 大鼠, 鼠龄 6~8 周, 体重 250~280g (内蒙古大学动物实验中心提供)。动物随机分为 2 组: 缺血再灌注 (I/R) 对照组和 I/R β 七叶皂甙钠 (β -A) 药物处理组 (β -A 组)。每组按缺血后再灌注不同时间分为 3 个亚组, 即 I/R 0, 1, 2 h 亚组, β -A 0, 1, 2 h 亚组, 各亚组 $n=8$; 另 20 只随机分为 2 组设为 I/R 和 β -A 组行生存率比较; (编者提示: 另 20 只应该在这里作交待, 否则总数不对)。

1.3 动物模型的制备

大鼠均置实验室适应性饲养 1 周, 实验前禁食 12h, 自由饮水。5% 氯胺酮 (100 mg/kg) 腹腔注射麻醉后无菌条件下取上腹部正中切口。采用无创血管夹夹闭肠系膜上动脉 (SMA) 根部, 见肠系膜血管搏动消失, 小肠缺血痉挛、变白; 暂时关腹前腹腔注射生理盐水 2 mL。两组均行肠缺血

90 min。90 min 后原切口开腹松夹, SMA 恢复搏动、肠系膜血管恢复搏动, 肠管变红, 示复制肠 I/R 模型^[4]成功, 关腹。2 组分别于松夹再灌注前 30 min 阴茎背静脉注射 1% 伊文思蓝溶液 2 mL/kg。 β -A 药物处理组: I/R 缺血前 30 min 及再灌注前 30 min 予 β -aescin 1.8 mg/kg, 阴茎背静脉注射, 对照组同前法给予等量生理盐水。两组分别在恢复血供 0, 1, 2 h 时进行组织采样备检。毛细血管通透性只观察 1 h 点 (并 $n=10$)。再灌注 1 h 后进行组织采样。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 光学显微镜检查 按实验要求于不同时间点活杀动物。取距 Treitz 韧带 10 cm 处小肠 6 cm, 剔除系膜及外膜脂肪组织, 肠腔灌洗干净, 分为 3, 2, 1 cm 3 段。取 3 cm 段置于 10% 甲醛中固定 24h, 再分 3 段每段常规石蜡包埋各作 1 切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 5 μ m 切片, 在 400 倍 (HP) 镜下观察 6 个视野/每张切片。采用 Haglund 法评分^[5], 以评价肠黏膜损伤程度。Haglund 评分标准: 0 分为正常绒毛和腺体; 1 分为部分绒毛顶部上皮轻度受损; 2 分为上皮下腺体轻度受损; 3 分为上皮下间隙扩大, 毛细血管充血; 4 分为上皮与固有层中度分离, 腺体受损; 5 分为部分绒毛顶部脱落; 6 分为绒毛脱落明显, 毛细血管扩张; 7 分为固有层绒毛脱落, 腺体受损明显; 8 分为固有层开始消化分解; 9 分为出血、溃疡。

1.4.2 肠黏膜细胞调亡率 取上述 2 cm 段小肠, 置于 70% 乙醇中固定 2 h; 剥取绿豆大小黏膜置 70% 乙醇中送河北医科大学肿瘤研究所采用 Beckman Coulter 公司生产的 Epics - XL II 型流式细胞仪检测肠黏膜细胞调亡率。

1.4.3 肠含水率检查 取上述 1 cm 段小肠, 分析天平称湿重, 然后置于 110 $^{\circ}$ C 烤箱烘烤 24 h 恒重后称量干重, 计算肠组织含水率 (IWC), 公式: 含水率 = (湿重 - 干重) / 湿重 \times 100%。

1.4.4 毛细血管通透性检查 参照 Lu 等^[6]的改良伊文思蓝渗出法进行测定, 先用蒸馏水溶解伊文思蓝制取 0.25 μ g/mL, 0.5 μ g/mL, 1.0 μ g/mL, 2.0 μ g/mL, 4.0 μ g/mL, 0.25 μ g/mL, 5.0 μ g/mL, 8.0 μ g/mL, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 各浓度标准溶液, 用 Beckman Du640 核酸蛋白分析仪 620 nm 处测各浓度的 OD 值 (光密度值) 并绘制标准曲线。取距回盲部 6 cm 小肠约 1 cm (先行 SMA 及肠腔生理盐水灌洗干净), 置于甲酰胺 3 mL 中 37 $^{\circ}$ C 萃取 48 h 后, 测萃取液 OD 值, 并根据标准曲线换算

出浓度,肠管浸洗后置 110 °C 电热鼓风干燥箱中烘烤 24h 至恒重后用分析天平称重,进一步计算肠干重含量,进行差异比较。含量 = 浓度 \times 3 mL/干重。

1.4.5 血清 IL-6 及 TNF- α 浓度测定 游离颈动脉采血 3 mL,4 °C 下静置 2 h,2 500 r/min 离心 15 min 后取血清置于 Eppendorf 管内,放入 -70 °C 冰箱冻存储用。取标本后严格按 IL-6 及 TNF- α ELISA 试剂盒操作规程说明书检测。经反应后酶标板用 Perkin Elmer 1420 多功能检测仪在 450 nm 测定标准品及样本 OD 值。根据标准品 OD 值经曲线专家 1.3 软件处理并绘制标准曲线,根据样品的 OD 值计算出对应的浓度。

1.4.6 生存率比较 两组大鼠行生存率比较。

1.5 统计学处理

采用 SPSS11.5 统计分析软件处理,计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单

因素方差分析 (one-way ANOVA); 生存率比较采用对数秩检验 (log-rank test)。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肠黏膜组织病理学变化

I/R 组各时段亚组肠黏膜均有损害;表现为绒毛肿胀、脱落明显,大量淋巴细胞和单核细胞浸润,上皮间隙扩大,上皮与固有层分离,毛细血管扩张,腺体受损明显,并出现固有层消化分解;1,2 h 组重于 0 h 组。 β -A 各时段组肠黏膜亦有损害;表现为部分绒毛顶部脱落、少量淋巴细胞和单核细胞浸润,毛细血管充血,腺体受损较 I/R 组明显减轻(图 1-2)。Haglund 评分 I/R 各亚组明显高于对应 β -A 各亚组 I/R 组,I/R 0 h 亚组评分低于 1 h 和 2 h 亚组 ($P < 0.05$),而 β -A3 个亚组间差异无统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

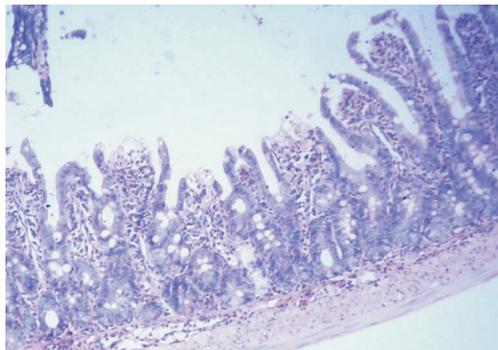


图 1 I/R 对照组肠组织 (HE \times 100)

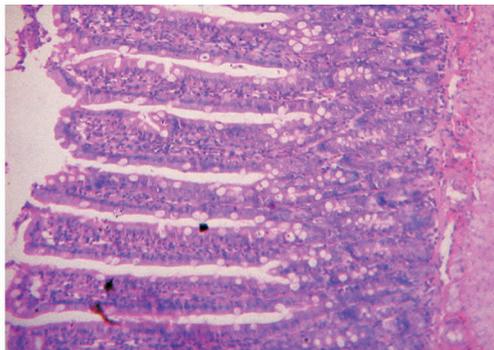


图 2 β -A 组肠组织 (HE \times 100)

表 1 再灌注各时间段大鼠肠黏膜损害 Haglund 法评分比较

组别	n	再灌注各时间段 Haglund 法评分		
		0 h	1 h	2 h
I/R (对照)	8	5.77 \pm 1.71	6.49 \pm 1.34 ¹⁾	6.24 \pm 1.71 ¹⁾
β -A (治疗)	8	3.90 \pm 1.63 ²⁾	4.14 \pm 1.58 ²⁾	3.89 \pm 1.53 ²⁾

注:1)与 I/R 0h 亚组比较, $P < 0.05$; 2)与同时点 I/R 组比较, $P < 0.05$

2.2 肠黏膜细胞凋亡率比较

3 个时段凋亡率 I/R 组分别为 (21.45 \pm 5.98)%, (25.89 \pm 3.52)% 和 (20.44 \pm 7.01)%, β -A 组分别为 (10.44 \pm 2.83)%, (11.11 \pm 2.95)% 和 (8.12 \pm 2.22)%, β -A 组各时段肠黏膜细胞凋亡率明显低于同时段 I/R 组 ($P < 0.01$),同时 I/R 组各时段细胞凋亡率 1,2

h 高于 0 h 组, β -A (治疗)组各时点肠黏膜细胞凋亡率,差异无统计学意义 (表 2)。

表 2 再灌注各时间点肠黏膜细胞凋亡率

组别	n	再灌注各时间点肠黏膜细胞凋亡率 (% , $\bar{x} \pm s$)		
		0 h	1 h	2 h
I/R (对照)	8	21.45 \pm 5.98	25.89 \pm 3.52 ¹⁾	20.44 \pm 7.01 ¹⁾
β -A (治疗)	8	10.44 \pm 2.83 ²⁾	11.11 \pm 2.95 ²⁾	8.12 \pm 2.22 ²⁾

注:1)与 I/R 0h 亚组比较, $P < 0.05$; 2)与同时点 I/R 组比较, $P < 0.05$

2.3 肠含水率比较

尽管同一组不同个体大鼠的肠含水率有一定差异;但 I/R 组大鼠各组含水量明显高于各对应 β -A 组, β -A 组各时点肠含水率明显降低

($P < 0.01$); 同时 I/R 组 1, 2 h 肠含水率高于 0 h 组(表 3)。

表 3 再灌注各时段肠含水率比较

组别	n	再灌注各时段肠含水率(%, $\bar{x} \pm s$)		
		0 h	1 h	2 h
I/R(对照)	8	84.8 ± 13.24	87.72 ± 17.78 ¹⁾	88.38 ± 29.82 ¹⁾
β-A(治疗)	8	82.4 ± 16.22 ²⁾	82.38 ± 28.78 ²⁾	82.70 ± 19.62 ²⁾

注:1)与 I/R 0 h 亚组比较, $P < 0.05$; 2)与同时点 I/R 组比较, $P < 0.05$

2.4 毛细血管通透性比较

小肠 I/R 后伊文氏蓝渗透于肠组织中呈阶段性分布,以近回盲部小肠明显。I/R 组肠组织伊文氏蓝含量为(451.47 ± 51.96) μg/g, β-A 组为(256.72 ± 21.90) μg/g ($P < 0.01$), 表明 β-A

能减轻损伤后毛细血管对伊文氏蓝通透性,减少组织渗透,减轻肠组织 I/R 损伤(表 4)。

表 4 β-A 对大鼠肠毛细血管通透性比较影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	肠组织伊文氏蓝含量(μg/g, $\bar{x} \pm s$)	P 值
I/R(对照)	10	451.47 ± 51.96	<0.01
β-A(治疗)	10	256.72 ± 21.90	

2.5 血清 IL-6 和 TNF-α 浓度的变化

各时点 β-A 组血清 IL-6, TNF-α 浓度低于对应时点 I/R 各组。I/R 各组血清 IL-6 和 TNF-α, 0 h 组低于 1 h 和 2 h 时点组, 差异有统计学意义。β-A 组血清 IL-6 和 TNF-α 水平, 0 h 组低于 1 h 和 2 h 时点组, 差异无统计学意义(表 5)。

表 5 血清 IL-6 和 TNF-α 浓度比较

组别	n	大鼠血清 IL-6 浓度($\bar{x} \pm s$)			大鼠血清 TNF-α 浓度($\bar{x} \pm s$)		
		0 h	1 h	2 h	0 h	1 h	2 h
I/R(对照)	8	152.64 ± 54.25	226.17 ± 57.54 ¹⁾	236.78 ± 51.06 ¹⁾	109.97 ± 10.94	179.99 ± 25.92 ¹⁾	182.86 ± 31.78 ¹⁾
β-A(治疗)	8	73.03 ± 35.92 ²⁾	88.70 ± 37.25 ²⁾	93.36 ± 41.58 ²⁾	67.47 ± 8.25 ²⁾	69.38 ± 7.41 ²⁾	75.24 ± 15.30 ²⁾

注:1)与 I/R 0h 亚组比较, $P < 0.05$; 2)与同时点 I/R 组比较, $P < 0.05$

2.6 生存率比较

绘制 Kaplan-Meier 生存曲线, 可见 I/R 组的曲线较 β-Aescin 组的陡峭, 说明 β-Aescin 组的生存率高于 I/R 组 ($P < 0.05$)。说明给予 β-Aescin 可以提高生存率(图 3)。

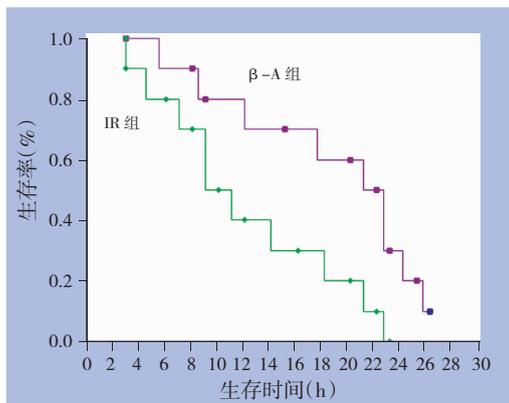


图 3 两组大鼠生存曲线

3 讨论

肠 IRI 是一个十分复杂的过程, I/R 损伤的病理生理机制尚未完全明了, 但多认同氧化应激损伤、钙超载、代谢障碍, 以及近年来研究较多的细胞因子和细胞凋亡等学说^[7]。新近研究证实, 肠上皮细胞异常凋亡是缺血再灌注期间肠粘膜损伤的主要机制^[8-9]。肠道的 I/R 不仅可引起肠局部组织损伤, 肠内细菌毒素移位等还可导致肠源性的炎症介质和细胞因子释放, 引起 SIRS 以及 MODS^[10-11]甚至死亡。因此肠 I/R 防护研究便成为创伤和休克的综合治疗以及小肠移植的热点内容。本研究试图采用具有广泛应用前景的 β-aescin 来处理 IRI。

IL-6 和 TNF-α 是一组单核巨噬细胞、内皮细胞产生的细胞因子, 具有激活诱导 T, B 细胞分化, 增强自然杀伤(NK)细胞杀伤靶细胞, 促进吞噬等功能。这些介质可出现"瀑布样"级联反应, 介质网络和免疫功能紊乱是机体炎症反应和一系列病理生理过程中的重要因素。生理浓度

下(含量极微),它们具有调节免疫应答、维持内环境稳定的作用;当创伤、感染等应激状态下IL-6和TNF- α 浓度异常增高时,可导致组织炎症。在I/R损伤反应中,活化的巨噬细胞是TNF的主要来源。近来认识到小肠黏膜固有层有大量的巨噬细胞存在,因而小肠有产生TNF的巨大潜力。本实验结果显示,肠I/R后IL-6和TNF- α 水平明显升高($P < 0.01$),与Lane^[12],王鹏程等^[13]的结果一致;而给予 β -A处理后,I/R后血清TNF α ,IL-6水平较I/R组明显降低(I/R组与 β -A组对应时点比较, $P < 0.01$)。提示 β -A可抑制小肠I/R TNF α ,IL-6的表达,抑制其促炎作用对组织器官的损害以及防止SIRS。

细胞凋亡又称细胞程序性死亡,是由基因控制的细胞主动死亡过程;它不同于细胞坏死的死亡方式。本实验证实小肠I/R后肠黏膜上皮细胞凋亡率明显增加($P < 0.05$),给予 β -A处理后,各时点凋亡率明显降低($P < 0.01$),表明 β -A可抑制小肠I/R所致的肠黏膜上皮细胞凋亡,而起到维护小肠功能、促进I/R后小肠修复的作用。TNF- α 是由单核巨噬细胞分泌的具有多种生物学活性的多肽调节因子,是目前已知能通过受体途径特异性地引起细胞凋亡的细胞因子^[14]。本实验结果发现, β -A可明显抑制TNF α 的水平($P < 0.01$)。但 β -A是否能影响凋亡基因的调控,还需进一步实验证明。

本实验还发现,给予 β -A可有效降低小肠I/R损伤。 β -A处理组各亚组肠组织病理损害、Haglund积分、肠含水率以及毛细血管通透性均显著低于相应IR组各时点亚组(均为 $P < 0.01$),而且TNF α ,IL-6水平也显著低于IR组($P < 0.01$)。提示 β -A有效地抑制了肠源性细胞因子以及其刺激肠外组织炎性细胞因子的表达,从而减轻其对小肠的损伤。其机制可能是由于 β -A减轻肠黏膜上皮细胞的异常凋亡,减轻小肠的进一步损伤,促进小肠功能恢复,有效地保护小肠粘膜屏障;改善微循环、降低毛细血管通透性,从而降低肠管的炎性水肿,减少内源性细菌易位以及细胞因子和其他炎症介质连锁反应及其引起的SIRS和MODS。因此改善肠道血流,减轻炎症反应,恢复肠道功能是防治肠I/R损伤及远隔器官损害的关键。本研究结果显示 β -A可提高肠I/R损伤大鼠生存率($P < 0.05$)。

本研究还发现, β -A虽具有对肠I/R损伤的预防作用($P < 0.05$),但尚不能说明 β -A抗I/R

与剂量、给药时间的关系。本实验提示其可作为小肠移植的预防性用药,但对此尚有待进一步实验证明。

参考文献:

- [1] Kuwabara Y, Kato T, Sato A, *et al.* Prolonged effect of leukocytosis on reperfusion injury rat intestine: real-time ATP change studied using 31 P MRS [J]. *J Surg Res*, 2000, 89 (1) 38-42.
- [2] 屠伟峰, 肖光夏. "休克肠"与多脏器功能障碍[J]. *中华麻醉学杂志*, 2002, 22(2): 125-128.
- [3] 张丽新, 李家泰. 娑罗子皂甙的药理研究[J]. *中国医院药学杂志*, 1997, 6(7): 337.
- [4] Koike K, Moore FA, Moore EE, *et al.* Endotoxin after gut ischemia/reperfusion causes irreversible lung injury. *J Surg Res* 1992, 52(6): 656-662.
- [5] Haglund U, Osterberg J. Local consequence of reperfusion in the gut [A]. In: Pierce A, Mathie RT. *Ischemia Reperfusion Injury* [M]. Oxford UK: Blackwell Science, 1999. 65-59.
- [6] Lu W, Chen YL, Xia ZF, *et al.* Modified Evans blue fluorimetry for determination of pulmonary vascular permeability in rats sustaining burns, and delayed fluid resuscitation of burns hock [J]. *Burns*, 1997, 23(6): 490-492.
- [7] Koike K, Moore FA, Moore EE, *et al.* Endotoxin after gut ischemia/reperfusion causes irreversible lung injury [J]. *J Surg Res*, 1992, 52(6): 656-662.
- [8] Azuara D, Sola A, Hotter G, *et al.* Apoptosis inhibition plays a greater role than necrosis inhibition in decreasing bacterial translocation in experimental intestinal transplantation [J]. *Surgery*, 2005, 137(1): 85-91.
- [9] Fishbein TM, Liu J, Wang L, Li Y, *et al.* Increased apoptosis is specific for acute rejection in rat small bowel transplant [J]. *Surg Res*, 2004, 119(1): 51-55.
- [10] Secchi A, Otanderl J M, Schmidt W, *et al.* Effect of endotoxemia on hepatic portal and sinusoidal blood flow in rats [J]. *J Surjres*, 2000, 89, (1): 26-30.
- [11] Mura M, Andrade CF, Han B, *et al.* Intestinal ischemia-reperfusion-induced acute lung injury and oncotic cell death in multiple organs [J]. *Shock*, 2007, 28(2): 227-238.
- [12] Lane JS, Todd KE. Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion [J]. *Surgery*, 1997, 122(2): 288-294.
- [13] 王鹏程, 陈道瑾, 李小荣, 等. TLR4表达在大鼠小肠缺血再灌注损伤中的改变及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 17(4) 360-364.
- [14] Jiang J, Goel R, Iftekhar MA, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha-induced accentuation in cryoinjury: mechanisms in vitro and in vivo [J]. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7(8): 2547-2555.