

大黄对内毒素血症模型大鼠氧化应激损伤的保护作用初探

陈文, 张祎, 王沛明, 曾勇, 孟宪丽, 陈小睿*
(成都中医药大学药学院, 成都 611137)

[摘要] **目的:**观察大黄水提物对内毒素血症模型大鼠体内血清中超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)活力及丙二醛(MDA),过氧化氢(H_2O_2)含量的影响,初步探讨大黄水提物对内毒素血症模型大鼠氧化应激的保护作用。**方法:**将 50 只 SD 大鼠随机分为正常组,模型组,地塞米松阳性药组($7.5 \times 10^{-4} g \cdot kg^{-1}$),大黄高、低剂量组($3.0, 1.5 g \cdot kg^{-1}$)。每天早晚各给药 1 次,连续给药 7 次,末次给药 0.5 h 后尾静脉注射内毒素(LPS)($5 mg \cdot kg^{-1}$)复制模型,然后每间隔 0.5 h 测定一次动物肛温,于造模后 4 h 麻醉动物,剖取脾脏、胸腺、肾上腺等组织称取各脏器质量计算其脏器系数,股动脉取血制备血清,采用比色法试剂盒测定血清中 SOD, CAT 活力及 MDA, H_2O_2 的含量。**结果:**与模型组比较,大黄水提物 $1.5 g \cdot kg^{-1}$ 能显著降低模型大鼠的体温变化指数(TRI4)($P < 0.05$),明显降低血清中 MDA, H_2O_2 的含量($P < 0.05$),显著升高 SOD, CAT 的活力($P < 0.05$)。**结论:**氧化应激是 LPS 诱发内毒素血症的重要环节,大黄可以通过上调 SOD 及 CAT 的活性,清除体内过度累积的自由基,干预模型大鼠体内氧化应激损伤的信号传导,起到一定的保护作用。

[关键词] 大黄; 内毒素血症; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 过氧化氢酶; 过氧化氢; 保护作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0112-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150112

Preliminary Study on Protective Effect of Rhei Radix et Rhizoma Against Oxidative Stress Injury in Endotoxemia Rats Model

CHEN Wen, ZHANG Yi, WANG Pei-ming, ZENG Yong, MENG Xian-li, CHEN Xiao-rui*

(College of Pharmacy, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of the aqueous extract of Rhei Radix et Rhizoma on superoxide dismutase (SOD) activity, catalase (CAT) activity, the contents of malondialdehyde (MDA) and hydrogen peroxide (H_2O_2) in rats of endotoxemia, and to preliminarily explore its protective effect on oxidative stress in endotoxemia rats. **Method:** Totally 50 SD rats were randomly divided into the control group, the model group, the dexamethasone group ($7.5 \times 10^{-4} g \cdot kg^{-1}$), the high and low-dose Rhei Radix et Rhizoma groups ($3.0, 1.5 g \cdot kg^{-1}$). All animals were administered continuously twice daily for 7 times, once in the morning and the other in the evening. Then 0.5 h after the last administration, rats were received an intravenous injection of $5 mg \cdot kg^{-1}$ lipodysaccharide (LPS) to replicate the endotoxemia model. The rectal temperature of rats was tested once every 0.5 h. After 4 h, the animals were anesthetized, and the blood was collected from the femoral artery, then spleen, thymus, adrenal gland and other tissues were removed. The organ coefficient was calculated. The activities of SOD, CAT and the content of MDA, H_2O_2 in serum were measured by using a colorimetric indicator. **Result:** Compared with the model group, the aqueous extract of Rhei Radix et Rhizoma at dosage of $1.5 g \cdot kg^{-1}$ can notably reduce the index of temperature (TRI4) in endotoxemia rats ($P < 0.01, P < 0.05$), and apparently

[收稿日期] 20150925(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274111);四川省科技厅省青年科技创新研究团队专项计划项目(2014TD0007);四川省教育厅青年基金项目(10.ZB072)

[第一作者] 陈文,在读硕士,从事中药药理与毒理研究,Tel:028-87791296,E-mail:shirleywen6990@126.com

[通讯作者] *陈小睿,副教授,硕士生导师,从事中药药理与毒理研究,Tel:028-61800234,E-mail:aphroragabriel@163.com

decrease MDA, H_2O_2 levels in serum ($P < 0.05$), and significantly increased SOD, CAT vitality ($P < 0.05$).

Conclusion: Oxidative stress is an important link in the endotoxemia induced by LPS, Rhei Radix et Rhizoma play a certain protective effect on endotoxemia by increasing the activity of SOD and CAT to clear free radicals excessive accumulated in the body, and intervening the signal transduction of oxidative stress injury in endotoxemia rats.

[**Key words**] Rhei Radix et Rhizoma; endotoxemia; superoxide dismutase; malondialdehyde; catalase; hydrogen peroxide; protective effect

大黄具有攻积导滞、清热泻火解毒等功效,现代研究表明大黄临床应用于治疗急性感染性疾病与其抗内毒素作用密切相关^[1]。内毒素血症主要存在级联放大炎症反应^[2],伴随着机体内炎症损伤,中性粒细胞等炎性细胞活化并聚集,经呼吸爆发产生大量活性氧,引起体内自由基的累积,诱发氧化损伤^[3-4]。目前关于大黄中有效成分对炎症损伤的保护作用的研究较多,研究表明大黄酸能改善微循环和肝脏的能量代谢,减轻肝组织脂质过氧化,减少炎症细胞因子的产生^[5],大黄素可通过激活机体内重要的抗氧化应激的 Keap1/Nrf2 信号通路增加肺纤维化大鼠体内抗氧化酶的活性^[6],大黄蒽醌类提取物具有抑菌抗炎、抗氧化及清除氧自由基的作用^[7-8]。但在大量的相关研究中却少有大黄水提物对内毒素血症模型的动物体内氧化应激损伤保护作用的相关报道,本实验通过测定大黄水提物对内毒素血症模型大鼠体内血清中超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)活力及丙二醛(MDA),过氧化氢(H_2O_2)水平的影响,初步探讨大黄水提物对内毒素血症模型大鼠体内氧化应激的保护作用。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,雄性,体重 220 ~ 240 g,由成都达硕生物科技有限公司提供,实验动物合格证号 SCXK(川)2013-0024。饲养于成都中医药大学中医脏腑病症实验室动物房,SPF 级,合格证号 SCXK(川)2012-0179。

1.2 药物及试剂 细菌内毒素(LPS),Ecoli O127:B8,美国 Sigma 公司,用无热原生理盐水将 LPS 稀释成 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。所用中药大黄均经成都中医药大学药学院严铸云教授鉴定为蓼科植物掌叶大黄 *Rheum palmatum* 的干燥根及根茎。本实验剂量依据 2010 年版《中国药典》一部^[9],成人每日口服大黄的剂量以 $0.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (以原药材计)计算,换算大鼠剂量为 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,取大黄药材适量,剪成约 1 cm^3 的小块,加入 10 倍量浸泡 30 min,大火煮沸,文火煎煮 40 min,滤过,收集滤液浓缩,制备质量浓度为 $0.15 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 大黄水煎液。水煎液放置于 4

℃ 冰箱中保存。阳性药地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 131003,用蒸馏水配制,剂量为 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),大黄酸对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,批号 110757-200206),乙腈和甲醇(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,色谱纯,批号分别为 096318,111270),甲酸(成都市科龙化工试剂厂,色谱纯,批号 20100913);SOD,CAT,MDA 和 H_2O_2 (南京建成生物工程研究所,批号分别为 140927,141012,140923)。

1.3 仪器 1260 Infinity 型高效液相色谱仪(美国 Agilent Technologies 公司),MTN-2800W 型氮吹仪(天津奥特赛恩斯仪器有限公司),WH-3 型涡旋仪(上海沪西分析仪器有限公司),Varioskan 型全波长多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司),D-37520 型低温高速离心机(美国 Thermo Fisher 公司),XH-C 型漩涡混合器(金坛市医疗仪器厂),MC-342FL 型电子体温计(欧姆龙大连有限公司),BSA224S-CW 型电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药 取大鼠 60 只,适应性饲养 4 d 后,从第 5 天开始每日上午定时测量肛温 2 次(间隔约 1 h),连续 3 d,选择体温 $36 \sim 38 \text{ }^\circ\text{C}$,3 d 平均体温至少有 2 次的温差不超过 $0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 的合格动物 50 只,按体重和平均体温(基础体温)均衡分为 5 组,每组 10 只,分别为正常组、模型组、地塞米松组、大黄 $3.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组、大黄 $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。各组动物分别给予相应药物,每天早 8 点和晚 8 点各给药 1 次,给药体积为 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,连续给药 7 次,正常组和模型组分别给予等体积的纯水。

2.2 模型复制 实验前禁食不禁水 8 h 后,末次给药后,正常组注射等体积生理盐水,其余各组每只动物按 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的剂量尾静脉注射 LPS 生理盐水溶液 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$,全部操作均按无菌无热原要求控制。

2.3 血液及组织样本的采集和处理 各组动物给予 LPS 4 h 后分别以 20% 乌拉坦($1.0 \sim 1.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 麻醉,股动脉取血,剖取肝脏、胸腺、脾脏、肾上腺组

织,迅速称质量并记录,组织及分离的血清置于液氮中冷冻,然后转至 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

2.4 指标检测

2.4.1 各组动物体温变化情况 分别于给予 LPS 造模后 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4 h 各测定一次动物肛温,以体温变化值为指标分析各组动物的体温变化。以体温变化 $T(^{\circ}\text{C})$ 和 4 h 内体温随时间变化的体温反应指数 4 h 内大鼠体温变化曲线下面积 (TRI4) 分析各组动物的体温变化。

2.4.2 脾、胸腺、肾上腺等组织脏器系数的测定 计算各组动物肾上腺、脾脏及胸腺的脏器系数。

脏器系数 = 脏器湿重(g)/脑湿重(100 g)

2.4.3 血清中 SOD, MDA, CAT 和 H_2O_2 生化指标活性的测定 取大鼠血清适量,按试剂盒说明书运用化学比色法测定 SOD, CAT 活力及 MDA, H_2O_2 的含量。

2.5 统计学分析 采用统计软件 SPSS 17.0 软件处理数据,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对内毒素血症模型大鼠体温及 TRI4 的影响 造模后 0.5 h 模型大鼠体温应激性升高,1 ~ 1.5 h 体温降低,1.5 h ~ 4 h 体温在不断升高,大黄 3.0, 1.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能抑制模型大鼠体温的升高。大黄 1.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能明显降低模型大鼠体温反应指数 TRI4 ($P < 0.05$)。见图 1, 表 1。

3.2 对内毒素血症模型大鼠免疫系统脏器系数的影响 与正常组比较,造模 4 h 后,模型大鼠免疫系统脏器胸腺及脾脏系数均明显升高 ($P < 0.05$); 大

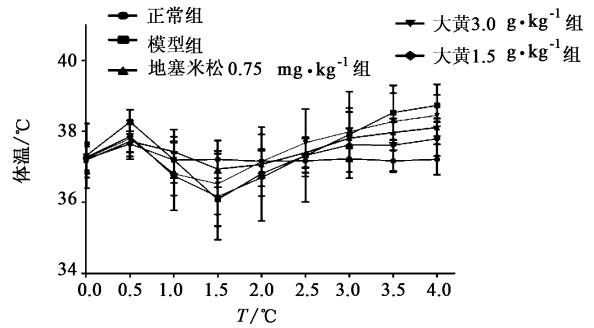


图 1 大黄对内毒素血症模型大鼠体温的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig.1 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on body temperature in endotoxemia rats model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

表 1 大黄对内毒素血症模型大鼠 4 h 内体温变化指数 TRI4 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on within 4 h index TRI4 temperature change in endotoxemia rats model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	TRI4	抑制率/%
正常	-	0.30	-
模型	-	2.62 ²⁾	771.71 ²⁾
大黄	3.0	2.16	17.47
	1.5	1.74 ²⁾	33.72 ³⁾
地塞米松	7.5×10^{-4}	1.51 ²⁾	42.43 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

黄 3.0, 1.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 均有一定的降低模型大鼠胸腺系数及脾脏系数的趋势,大黄 1.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 表现出一定的降低脾脏系数的趋势,各组大鼠肾上腺系数与模型组比较,均未见统计学差异。见表 2。初步推断模型大鼠免疫系统被激活,大黄仅表现出来一定的抑制作用。

表 2 大黄对内毒素血症模型大鼠免疫系统脏器系数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on immune system viscera coefficient in endotoxemia rats model ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	脾脏系数/ $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$	胸腺系数/ $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$	肾上腺系数/ $\text{mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$
正常	-	41.71 \pm 6.68	25.48 \pm 8.49	24.28 \pm 4.82
模型	-	54.15 \pm 9.63 ¹⁾	41.43 \pm 5.89 ¹⁾	28.83 \pm 3.90
大黄	3.0	54.42 \pm 8.47	23.52 \pm 1.92	32.25 \pm 5.19
	1.5	47.36 \pm 9.48	27.73 \pm 19.21	32.77 \pm 7.51
地塞米松	7.5×10^{-4}	35.15 \pm 4.28 ⁴⁾	13.47 \pm 5.26 ⁴⁾	28.30 \pm 7.18

3.3 对内毒素血症模型大鼠血清中 SOD, CAT 活力及 MDA, H_2O_2 含量的影响 与正常组比较,模型组大鼠血清 SOD 及 CAT 活性均明显降低 ($P < 0.01, P < 0.05$),且血清中 MDA 及 H_2O_2 的含量明

显增加 ($P < 0.05$),与模型组比较,大黄 1.5 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 能明显升高 SOD 及 CAT 活性 ($P < 0.05$),且能明显降低 MDA 含量 ($P < 0.05$),对 H_2O_2 含量仅表现出一定的降低趋势,但无统计学差异。见表 3。

表 3 大黄对内毒素血症模型大鼠血清中氧化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of Rhei Radix et Rhizoma on serum oxidation index in endotoxemia rats model ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	CAT/U·mg ⁻¹	H ₂ O ₂ /mmol·g ⁻¹	MDA/μmol·g ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹
正常	-	7.69 ± 1.04	7.26 ± 1.67	1.35 ± 0.44	18.58 ± 3.27
模型	-	1.36 ± 1.11 ²⁾	17.28 ± 3.52 ¹⁾	2.67 ± 0.76 ¹⁾	10.37 ± 2.23 ¹⁾
大黄	3.0	3.28 ± 2.61	15.34 ± 4.15	2.16 ± 1.02	13.28 ± 2.85
	1.5	5.67 ± 2.51 ³⁾	14.79 ± 3.98	1.54 ± 0.89 ³⁾	14.36 ± 2.52 ³⁾
地塞米松	7.5 × 10 ⁻⁴	6.85 ± 1.39 ³⁾	11.22 ± 4.31 ³⁾	1.48 ± 0.94 ³⁾	12.53 ± 4.24 ³⁾

4 讨论

氧化应激是指机体内自由基如活性氧产生过多,超出了机体的清除能力,导致氧化/抗氧化失衡的一种状态。LPS 是一些炎症介质和细胞因子的强诱导剂,可能通过与多种炎症细胞或效应细胞膜上的 TLR4 蛋白结合,激活细胞内 MAPKs-NF-κB 信号通路,致使下游大量合成炎症介质并释放,释放出的炎症介质反过来又会再次强烈刺激巨噬细胞系统并同时激活相关效应细胞,使它们再次大量释放炎症介质,激活补体、凝血和纤溶系统,从而产生炎症介质大爆发的瀑布效应,导致机体循环衰竭、白细胞浸润、肠道屏障功能损伤和自由基的产生^[12-13]。

过氧化氢是一种代谢过程中产生的废物,它能够对机体造成损害;超氧阴离子自由基·O²⁻是生物体多种生理反应中自然生成的中间产物,它是活性氧的一种,具有极强的氧化能力,是生物氧毒害的重要因素之一^[14]。SOD 为超氧化物歧化酶,可催化体内的超氧阴离子自由基·O²⁻发生歧化反应,机体 SOD 活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力;CAT 为过氧化氢酶,是以铁卟啉为辅基的结合酶,主要作用是促使 H₂O₂ 分解为分子氧和水,清除体内的过氧化氢,是生物防御体系的关键酶之一。

MDA 是生物膜上不饱和脂肪酸受自由基攻击发生脂质过氧化的产物,MDA 含量可以作为衡量机体内脂质过氧化程度和自由基水平的一项重要指标^[15],故测试血清 MDA 的含量可反映机体内脂质过氧化的严重程度,间接反应出机体细胞受自由基攻击的损伤严重程度。MDA 含量的测定经常与 SOD 活力的测定相互配合,评价机体内的氧化及抗氧化水平。

大黄药性苦寒、药力峻猛,临床常用于治疗急性感染性疾病。现代研究表明,在内毒素引发的疾病中,肠黏膜和肺是最易受内毒素攻击的 2 个靶器官,而大黄供善攻积导滞、通腑泻热,最能荡涤肠中之积滞,保护肠黏膜屏障功能,从而发挥抗内毒素损伤的

作用^[16-17]。研究表明,大黄中蒽醌类成分具有较强的抗氧化作用^[18-19]。

本实验发现,模型动物胸腺系数及脾脏系数显著增加,血清 SOD 及 CAT 活力下降,且 MDA 含量上升,表明动物体内存在一定程度的氧化损伤,对机体免疫系统也存在一定的影响。大黄水提物 1.5 g·kg⁻¹剂量能显著降低模型大鼠的胸腺及脾脏系数,降低模型大鼠血清中 MDA、H₂O₂ 的含量,升高 SOD、CAT 的活力,从而表现出一定的抗氧化作用。

综上所述,氧化应激损伤是内毒素致病的一个关键环节,其伴随着机体炎性损伤而发生,大黄可以通过上调 SOD 及 CAT 的活性,清除体内过度累积的自由基,干预模型大鼠体内氧化应激损伤的信号传导,发挥一定的保护作用。

[参考文献]

[1] 危北海. 中医药与多脏器功能障碍综合征 (MODS) [J]. 中国中医急症, 2004, 1(2): 61-63.

[2] Hufibal M, Kumar R, Cunningham M E, et al. Endothelin-stimulated mono-cyte supernatants enhance neutrophil superoxide production [J]. Shock, 1994, 1(3): 184-187.

[3] 黄晓军, 王选铤. 急性肺损伤抗氧化治疗的研究进展 [J]. 临床内科杂志, 2004, 10(21): 652-654.

[4] Bosma K J, Taneja R, Lewis J F. Pharmacotherapy for prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome: current and experimental approaches [J]. Drugs, 2010, 70(10): 1255-1282.

[5] 马超英, 彭春荣, 耿耘, 等. 大黄酸对内毒素血症小鼠保护作用的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(2): 288-289.

[6] 刘理静, 钱红, 张平. 大黄素对肺纤维化大鼠的保护作用及部分机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(2): 266-272.

[7] 王文俊, 吴咸中, 姚智, 等. 大黄素、丹参素对单核细胞分泌炎性细胞因子的调节 [J]. 中国免疫学杂志, 1995, 11(6): 370-372.

- [8] Chang C H, Lin C C, Yang J J, et al. Anti-inflammatory effects of emodin from *ventilago leiocarpa* [J]. *Am J Chin Med*, 1996, 24(2), 139-142.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部 [S]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:22.
- [10] 张艳. 大黄在肝肾功能异常大鼠体内的群体药物动力学研究 [D]. 成都:成都中医药大学, 2010.
- [11] 李红. 大黄抗炎、解热作用的 PK-PD 模型研究 [D]. 成都:成都中医药大学, 2014.
- [12] Roeksen D. Vitamin E reduces transendothelial migration of neutrophils and prevents lung injury in endotoxin induced airway inflammation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 28(2):199-207.
- [13] Sittipunt C, Steinberg K P, Ruzinski J T, et al. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 163(2):503-510.
- [14] Saugstad O D. Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease [J]. *Acta Paediatr*, 1996, 85(1):1-4.
- [15] Del Rio D, Stewart A J, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2005, 15(4):316-328.
- [16] 许峰, 金海燕, 卢仲毅, 等. 内毒素诱导急性肺损伤幼鼠血 NO、ET-1 含量和肺 NOS 活性 mRNA 表达的研究 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(8):806-807.
- [17] 丁连安, 黎介寿, 李幼生, 等. 创伤及内毒素对大鼠肠屏障功能的损害 [J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(6):58-60.
- [18] 刘建华, 韩立强, 苑丽, 等. 提取方法对大黄蒽醌类成分及抗氧化活性的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2008, 36(22):9484-9486, 9509.
- [19] 王陆军, 李仙义, 韩晋, 等. 日服用次数对大黄体外抗氧化效应的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(15):262-265.

[责任编辑 周冰冰]