

大黄素对小鼠缺血再灌注肠黏膜肥大细胞活性的影响

韦志军¹, 吴先平^{1*}, 甘小亮², 黑子清²

(1. 广东省佛山市顺德区中医院麻醉科, 广东 佛山 528333;

2. 中山大学附属第三医院麻醉科, 广州 510630)

[摘要] **目的:**研究大黄素对小鼠肠缺血再灌注肠黏膜肥大细胞活性的影响。**方法:**28 只昆明种小鼠随机均分为 4 组, 假手术组(A 组)、模型组(B 组)、模型+大黄素 60 mg·kg⁻¹组(D1 组)及模型+大黄素 120 mg·kg⁻¹组(D2 组)。采用肠系膜上动脉夹闭法建立小肠缺血再灌注模型, 观察肠黏膜病理结构变化、肠黏膜肥大细胞超微结构变化及类胰蛋白酶表达、比较计算肥大细胞数量, 测定小肠组织组胺、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度。**结果:**与假手术组比较, 模型组 Chiu's 评分、肥大细胞数量、组胺及 TNF- α 浓度显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较, 大黄素 60, 120 mg·kg⁻¹组的肥大细胞数量明显减少($P < 0.05$), 大黄素 120 mg·kg⁻¹组的小肠组织 TNF- α 浓度明显降低($P < 0.05$)。假手术组肥大细胞超微结构正常, 模型组肥大细胞颗粒包膜相互融合形成细胞内空泡等脱颗粒现象, 大黄素 60, 120 mg·kg⁻¹组肥大细胞形成空泡较少。**结论:**大黄素能减少小鼠小肠黏膜结构破坏, 抑制小肠肥大细胞活化及脱颗粒, 从而起到防治肠缺血再灌注损伤的作用。

[关键词] 大黄素; 肠黏膜肥大细胞; 缺血再灌注; 小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0167-04

Effect of Emodin on Intestinalmucosa Mast Cells in Mice with Intestine Ischemia-Reperfusion

WEI Zhi-jun¹, WU Xian-ping^{1*}, GAN Xiao-liang², HEI Zi-qing²

(1. Department of Anesthesiology, Shunde Hospital of Traditional Chinese Medicine of

Foshan City, Foshan 528333, China; 2. Department of Anesthesiology, Third Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of emodin on intestinalmucosa mast cells (IMMC) in mice with intestine ischemia-reperfusion (I/R). **Method:** Twenty-eight mice were randomly divided into four groups ($n = 7$ each): group A (sham operation group), group B (superior mesenteric artery was clamped for 30 minutes followed by reperfusion), group D1 and D2 (in which emodin 60 or 120 mg·kg⁻¹ was given via gastric tube every day for 3 days before I/R). Intestinalmucosa pathology structure, the ultramicrostructure of IMMC were observed under electron microscope, and tryptase expression was compared for IMMC counting, histamine and tumor necrosis factor (TNF- α) were determined. **Result:** Compared with that of group A, Chiu's score and IMMC number, histamine, TNF- α in group B were increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with that of group B, IMMC number of group D1, D2 and TNF- α of group D2 were decreased markedly ($P < 0.05$). IMMC ultrastructure in group A was normal, and there was some degranulation phenomenon in group B, such as mast cell envelope coalition and intracellular vacuoles. There was more less intracellular vacuoles in group D1 and D2. **Conclusion:** Emodin can decrease intestinalmucosa disorganization in mice by inhibiting IMMC activation and degranulation.

[收稿日期] 20110218(007)

[基金项目] 广东省中医药管理局立项资助项目(2008264)

[第一作者] 韦志军, 在读硕士, 主治医师, Tel:13929113656, E-mail: wzjanesthe@sina.com

[通讯作者] * 吴先平, 硕士, 主任医师, 从事围手术期器官保护研究, Tel:13509969196, E-mail: sdwxp@163.com

[Key words] emodin; intestinalmucosa mast cells; ischemia-reperfusion; mice

肠缺血再灌注损伤是严重创伤、烧伤、休克过程中可能发生的一个共同的病理生理阶段,研究表明肥大细胞活化是肠缺血再灌注损伤机制之一^[1]。近年来有许多研究表明大黄素对肠道具有保护作用^[2-5]。本研究旨在观察大黄素对小鼠缺血再灌注肠黏膜肥大细胞(intestinalmucosa mast cells,IMMC)活性的影响,探讨大黄素肠道保护机制,为寻求肠缺血再灌注损伤防治手段提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器及试剂 Heidolph × 900 匀浆机(德国),离心沉淀机(Beckman Auegra 64R,美国),透射电镜(HitachiH-600),酶标仪(Bio-Rad Model 680,美国)。大鼠抗人类胰蛋白酶多克隆抗体(福州迈新生物工程有限公司),山羊抗鼠 IgG 抗体(ProteinTech Group, Inc, 美国)。大黄素为虎杖提取物,由广州科佳生物科技有限公司提供,纯度 > 98%,批号 A0044。

1.2 动物 中山医学院实验动物中心提供的 28 只健康清洁级昆明种雄性小鼠(合格证号 0075284),体重为 18 ~ 24 g。按基础饲料饲养 1 周,室温 25 ~ 27 °C,适应环境。

2 方法

2.1 动物模型建立 28 只小鼠随机均分为 4 组,每组 7 只。A 组:假手术组;B 组:模型组;D1 组:模型 + 大黄素 60 mg·kg⁻¹组;D2 组:模型 + 大黄素 120 mg·kg⁻¹组。D1, D2 组分别在手术前 3 d 开始,给予大黄素 60, 120 mg·kg⁻¹·d⁻¹ig^[6], A, B 组每天给予生理盐水 20 mL·kg⁻¹ig。4 组昆明小鼠均于术前 12 h 禁食,自由饮水。ip 10% 水合氯醛 3.5 mL·kg⁻¹麻醉后,仰卧位固定,消毒铺巾,腹部正中切口进腹,分离肠系膜上动脉。A 组只分离肠系膜上动脉,不阻断;B, D1, D2 组用无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉根部,30 min 后松开动脉夹。模型复制成功的标准为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。

2.2 标本处理及指标检测

2.2.1 小肠组织病理观察 分别在再灌注后 3 h 取 0.5 cm 小肠(距回肠末端 1 cm)标本,用 10% 的甲醛固定,苏木精-伊红(HE)染色,光镜观察小肠黏

膜病理变化。肠黏膜病理变化采用 Chiu's 等^[7]评分法进行评分。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。

2.2.2 小肠黏膜透射电镜观察 取小肠(距回肠末端 2 cm)标本,小肠组织标本用质量分数为 4% 戊二醛固定 2 h, 1% 锇酸后固定 1 h,包埋,超薄切片,双重染色,透射电镜观察肥大细胞的超微结构。

2.2.3 肥大细胞计数^[8] 采用免疫组化链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)染色法,石蜡切片脱蜡水化后蒸馏水清洗,用 pH 9.0 EDTA 高压修复 2 min 后自然冷却,蒸馏水清洗后,3% 双氧水浸泡 10 min 后再用蒸馏水清洗,PBS 清洗 5 min × 3 次,加一抗(大鼠抗人类胰蛋白酶多克隆抗体)37 °C 水浴 1 h,再用 PBS 清洗 5 min × 3 次,加二抗(山羊抗鼠 IgG 抗体)37 °C 水浴 30 min,PBS 清洗 5 min × 3 次,1:1:1 3,3'-二甲基联苯胺(DAB)显色,苏木素复染 2 min,0.1% 盐酸乙醇分化,用水冲洗 10 min 后用 95% 乙醇脱水;烤箱烤干后中性树胶封片。以胞浆显棕黄色为阳性细胞,于每张切片中用 400 倍光镜随机选取 5 个肠黏膜部位进行观察,运用 Image-Pro Plus 5.0 图像分析软件(美国),观察类胰蛋白酶染色阳性细胞计算肥大细胞数量。

2.2.4 小肠组织匀浆组胺及 TNF-α 浓度测定 取小鼠 10 cm 小肠(距回肠末端 3 cm 开始),以生理盐水冲洗肠腔,制作小肠组织匀浆液。用试管法测定组织总蛋白浓度,采用小鼠酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒测定小肠组织匀浆组胺、TNF-α 浓度。小肠组织组胺、TNF-α 浓度根据组胺量/总蛋白量、TNF-α/总蛋白量计算而得。

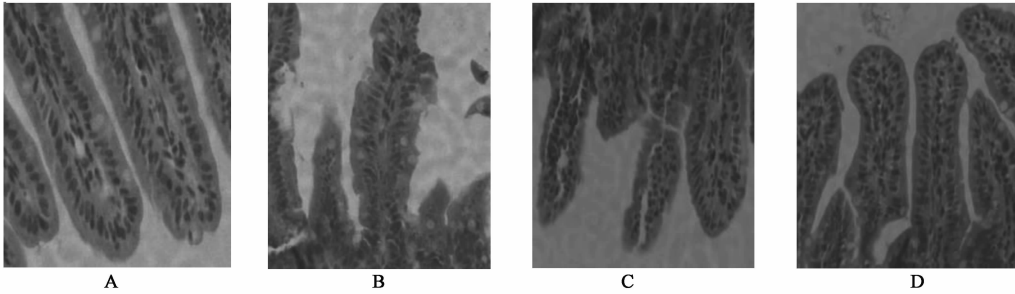
2.3 统计学处理 用 SPSS 13.0 软件系统进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用单因素方差分析,各组均数不全相等,则行两两比较, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 肠黏膜病理变化 A 组黏膜上皮细胞结构完整,排列整齐;B 组表现为上皮脱落,部分固有膜层崩裂,出现出血与溃疡;D1 组的肠黏膜改变以绒毛

顶端的部分破坏为主,部分绒毛上皮脱落;D2组表现为绒毛顶端上皮间质增宽,伴有部分上皮层同固有层分离。见图1。B组 Chiu's 评分明显高于 A

组($P < 0.01$);D1、D2组 Chiu's 评分明显低于B组($P < 0.01$);D2组 Chiu's 评分低于D1组($P < 0.05$)。见表1。



A. 假手术组;B. 模型组;C. 大黄素 60 mg·kg⁻¹组;D. 大黄素 120 mg·kg⁻¹组(图2同)

图1 各组肠黏膜病理变化(HE染色,×200)

表1 小肠 Chiu's 评分,IMMC 计数,组胺及 TNF-α 浓度变化($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Chiu's 评分	IMMC 数/个/视野	组胺/μg·g ⁻¹	TNF-α/ng·g ⁻¹
假手术	-	0.43 ± 0.53	10 ± 2	13.01 ± 1.09	201.64 ± 66.68
模型	-	4.43 ± 0.79 ²⁾	25 ± 8 ²⁾	16.86 ± 3.41 ¹⁾	343.75 ± 88.09 ²⁾
大黄素	60	3.00 ± 0.82 ⁴⁾	19 ± 8 ³⁾	17.10 ± 2.23	291.28 ± 45.53
	120	2.14 ± 0.69 ^{4,5)}	17 ± 3 ⁴⁾	14.20 ± 4.96	265.97 ± 72.13 ³⁾

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与模型+大黄素 60 mg·kg⁻¹组比较⁵⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 肥大细胞超微结构变化 A组肥大细胞超微结构正常,B组肥大细胞胞浆颗粒明显减少,颗粒包

膜相互融合形成细胞内空泡等脱颗粒现象,D1、D2组肥大细胞超微结构形成空泡较少。见图2。

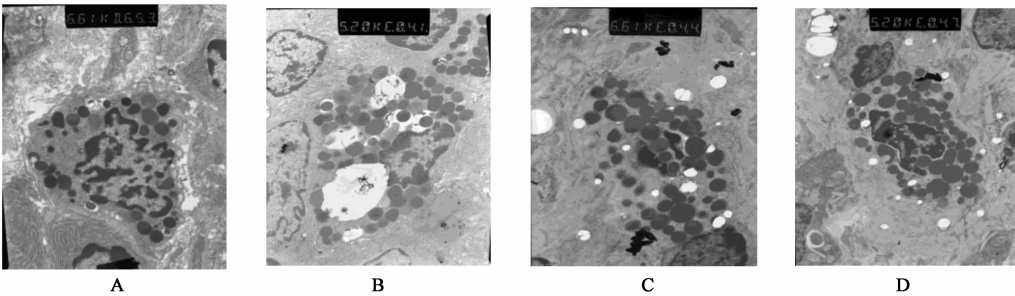


图2 各组肥大细胞超微结构变化(×10 000)

3.3 肥大细胞数量,组胺、TNF-α 浓度变化 与A组比较,B组肥大细胞数量、组胺及 TNF-α 浓度显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与B组比较,D1、D2组的肥大细胞数量明显减少($P < 0.05$),D2组的小肠组织 TNF-α 浓度明显降低($P < 0.05$)。见表1。

质释放等有关^[10]。黑子清等^[1]研究发现大鼠肠缺血再灌注后,肥大细胞大量增加,电镜下见肥大细胞大量脱颗粒。同时甘小亮等^[11]采用了肥大细胞膜稳定剂如色甘酸钠,发现能明显减轻肠缺血再灌注损伤。这些结果表明肥大细胞活化也可能是肠缺血再灌注损伤机制之一。针对上述因素,目前许多学者采用了相应的防治手段,如中药(四逆汤、银杏叶提取物)、缺血预处理及缺血后处理等,这些方法均有一定的保护效果。其中中药越来越受到重视。

3 讨论

肠缺血再灌注损伤是严重创伤、烧伤、休克过程中可能发生的一个共同病理生理阶段,占机体器官缺血再灌注损伤中的1/3,严重时可引起多器官功能不全,死亡率高^[9]。肠缺血再灌注损伤的病理生理机制尚不清楚,其可能与氧化损伤、钙超载、白细胞黏附、能量衰竭、白细胞黏附与内皮细胞损伤、介

近年来,中药大黄在危急重病特别是胃肠道功能衰竭方面得到广泛关注^[12]。大黄的主要成分是蒽醌类化合物,包括大黄素、大黄酚、大黄酸、芦荟大

黄素等。在本研究中,经大黄素处理后肠黏膜损伤明显减轻,并且大剂量大黄素比小剂量损伤减轻更明显,说明大黄素对肠道的保护作用。缺血再灌注损伤后模型组肥大细胞超微结构显示大量脱颗粒后空泡形成,大黄素组肥大细胞超微结构形成空泡较少,正常组未见空泡形成;这说明大黄素能减少肠缺血再灌注后肥大细胞脱颗粒。

肥大细胞是组胺的主要来源,肥大细胞受刺激后脱颗粒释放组胺^[13]。组胺被释放后数分钟内在局部迅速被肠黏膜分解,小肠组织匀浆组胺主要是肥大细胞内的组胺。本研究各组间组胺浓度差别不明显,大黄素大剂量组及假手术组组胺浓度反而低于小剂量组及模型组,这种现象与以前的报道有些差异^[11],这可能与本研究取标本的时间有关。在再灌注后 3 h,肠黏膜处于恢复期,处于恢复期的肠组织匀浆组胺浓度较正常时差别不大或稍有增加^[14],这可能跟再灌注后小肠组织处肥大细胞数大量增加有关。而这种肥大细胞数大量增加的原因不明,推测 3 h 内因肥大细胞增殖或凋亡减少的可能性不大,可能为小肠灌注后体内其他地方的肥大细胞转移至小肠处。经大黄素处理后,D1 组 D2 组肥大细胞数量小于模型组,推测大黄素能抑制肥大细胞在肠道的累积。

TNF- α 是肥大细胞释放的重要细胞因子之一,肥大细胞是肠道 TNF- α 的重要细胞来源^[15],TNF- α 可以反映肥大细胞活化、脱颗粒及相关细胞因子的合成和分泌强度,是肥大细胞活化及脱颗粒的重要标志^[16]。本研究发现,肠缺血再灌注后 TNF- α 浓度显著升高,但大黄素组的 TNF- α 浓度较模型组低,并且大剂量大黄素处理 TNF- α 浓度降低更多;这说明大黄素减少肥大细胞活化脱颗粒释放 TNF- α 。

综上所述,大黄素能减少小鼠小肠黏膜结构破坏,抑制小肠肥大细胞活化及脱颗粒,从而起到防治肠缺血再灌注损伤的作用。

[参考文献]

[1] Hei Z Q, Huang H Q, Zhang J J, et al. Protective effect of *Astragalus membranaceus* on intestinal mucosa reperfusion injury after hemorrhagic shock in rats [J]. *World J Gastro-enterol*, 2005, 11 (32): 4986.

[2] 赵钢,江伟,徐惠芳. 大黄对肠缺血再灌注致大鼠炎症反应的防治作用[J]. *南京铁道医学院学报*, 2000, 19 (4): 246.

[3] 陈德昌,杨兴易,姜兴禄,等. 大黄对胃肠道血流灌注影响的临床与实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2000, 20(7): 515.

[4] 宋路线,徐迎新,宋旭华,等. 大黄对小肠上皮细胞 ICE 基因 mRNA 表达水平的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2000, 12(7): 387.

[5] 刘瑞林,张嘉,吴薇,等. 大黄素对肠缺血/再灌注损害保护作用的实验研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 15(1): 45.

[6] 雷湘,陈刚,陈科力,等. 大黄素对小鼠的急性毒性研究[J]. *中药药理与临床杂志*, 2008, 24(1): 29.

[7] Chiu C J, Mcardle A H, Brown R, et al. Intestinal mucosal lesion in low flow states [J]. *Arch Surg*, 1970, 101(4): 478.

[8] 黄品婕,黑子清,甘小亮,等. 肠缺血再灌注后应用抗组胺药对大鼠生存率的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(9): 1821.

[9] 梁存河,蒋朱明. 胃肠屏障研究的几个热点问题[J]. *中国危重病急救医学*, 2001, 13(4): 202.

[10] 李云胜,刘克玄,黄文起. 缺血预处理在肠缺血再灌注损伤中的研究进展[J]. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2009, 30(2): 166.

[11] 甘小亮,黑子清,罗刚健,等. 肥大细胞膜稳定剂对肠缺血再灌注小肠组胺、MDA 和 SOD 的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2008, 24(1): 153.

[12] 阎兆平,陈晓理,张正. 大黄与肠屏障[J]. *中西医结合外科杂志*, 2001, 12(7): 411.

[13] 唐宇,马洪升. 肥大细胞在应激性肠屏障损伤中的作用[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2008, 17(4): 270.

[14] 唐承薇,蓝程. 多器官衰竭时肠黏膜肥大细胞活性的变化研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(1): 7.

[15] Bischoff S C, Lorentz A, Schwengberg S, et al. Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor- α in human intestinal tissue [J]. *Gut*, 1999, 44: 643.

[16] 王沁芳,赵龙凤,郝彦琴,等. 内毒素对大鼠肥大细胞脱颗粒释放肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. *中华实验和临床感染病杂志(电子版)*, 2007, 1(2): 92.

[责任编辑 聂淑琴]