

# 黄芪对肠缺血再灌损伤时肠外器官的保护作用

## Protective Effect of *Astragalus membranaceus* on Remote Organs During Intestinal Ischemia Reperfusion

浣 晖

Huan Hui

(广西医科大学病理生理教研室 南宁市滨湖路6号 530021)

(Dept. of Pathophysiology, Guangxi Medical Univ., 6 Binhulu, Nanning, Guangxi, 530021, China)

**摘要** 为了观察黄芪对肠缺血再灌注引起肠外多器官损伤的保护作用,用无创伤动脉夹夹闭大鼠肠系膜上动脉60 min后松夹再灌注,建立肠缺血再灌注损伤模型,于再灌注前30 min股静脉注射黄芪(AM)。试验用大鼠126只,体重200~260g,雌雄各半,随机分为假手术对照组(Con)、肠缺血再灌注手术组(I/R)、生理盐水(NS)处理组、黄芪(AM)处理组和血清TNF测定组。血清中的谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、尿素(Urea)、肌酐(Cr)、尿酸(UA)含量作为肝、肾功能测定指标。结果I/R组大鼠肝、肾功能的生化指标升高,与Con组比较有显著性差异( $P < 0.01$ );I/R组大鼠肝、肺、肾组织中的丙二醛(MDA)含量比Con组显著升高( $P < 0.01$ ),超氧化物歧化酶(SOD)活性比Con组显著降低( $P < 0.01$ ),外周血肿瘤坏死因子(TNF)浓度随着灌注时间延长而增加。AM可缓解肠I/R对器官的损伤,减少MDA的生成,增强SOD的清除能力,抑制TNF生成。提示AM对肠I/R引起的多器官损伤有保护作用。

**关键词** 黄芪 肠缺血再灌注 多器官功能障碍综合征

中图分类号 R285.5

**Abstract** To observe the protective effect of *Astragalus membranaceus* (AM) during intestinal ischemia reperfusion injury, the model rats of intestinal ischemia reperfusion (I/R) were induced by clamping superior mesenteric artery for 60 min period and then releasing the arterial clamp. AM was administered intravenously 30 min before reperfusion. The rats used total 126 with body weight of 200 to 260 g, with female and male in half proportion. All rats are divided randomly into five groups: the control (Con), the intestinal ischemia reperfusion (I/R), the saline (NS), the AM and the plasma TNF (TNF). The contents of glutamic oxalacetic transaminase (AST), glutamic-pyruvic transaminase (ALT), urea, creatinine (Cr), uric acid (UA) in the liver and kidney are examined as indicators. Compared with the control groups at 6 h after reperfusion, all indicators in I/R group are higher at  $P < 0.01$ . The content of malondialdehyde (MDA) in the liver, lung and kidney is higher at  $P < 0.01$ , while superoxide dismutase (SOD) activity is lower at  $P < 0.01$ . The level of TNF increases with the increasing of reperfusion time in the examination. These results indicated that AM could improve intestinal ischemia reperfusion injury.

**Key words** *Astragalus membranaceus*, intestinal ischemia reperfusion, multiple organ dysfunction syndrome

全身炎症反应综合征(SIRS)和多器官功能障碍综合征(MODS)是非感染性疾病及脓毒症等感染性疾病所出现的多器官损伤。肠道是MODS发病的敏感器官,许多因素所造成的肠缺血再灌注可不同程度地引起肠粘膜屏障损害,大量细菌和内毒素入血及自

身缺血再灌注产生大量氧代谢产物,过量的炎症介质,启动多损伤环节,对肠外多器官造成损伤,甚至出现MODS<sup>[1]</sup>。黄芪(*Astragalus membranaceus*)对大鼠心肌缺血再灌注损伤有防治作用<sup>[2]</sup>,因此,本研究用大鼠肠缺血再灌注致肠外多器官损伤模型,观察黄芪对肠缺血再灌注引起肠外多器官损伤的保护作用,为临床合理应用黄芪提供实验依据。

# 1 实验材料和方法

## 1.1 实验材料

### 1.1.1 药品与试剂

黄芪注射液为黄色澄清液体,每毫升含黄芪相当于生药 500 mg,由广西医科大学第一附属医院药剂科提供(批号 001008) 超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供;T 肿瘤坏死因子(TNF)试剂盒由第四军医大学免疫学教研室提供;谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、尿素(Urea)、肌酐(Cr)、尿酸(UA)试剂盒为日本第一化学药品株式会社产品;硫代巴比妥酸-四乙氧基丙烷(TEP)为 Sigma 公司产品;小牛血清、聚乙二醇(MW6000)、BSA 为南京 TBD 生物技术公司产品;试剂均为分析纯。

### 1.1.2 动物与仪器

健康 Wistar 大鼠 126 只,体重 200~260 g,雌雄各半,由广西医科大学实验动物中心提供。126 只大鼠随机分成 5 组:(1)假手术对照组(Con):16 只大鼠;(2)肠缺血再灌注手术组(I/R):大鼠缺血 60 min 再灌注 6 h,18 只大鼠;(3)生理盐水(NS)处理组:大鼠于再灌注前 30 min 股静脉注射生理盐水 20 ml/kg,12 只大鼠;(4)黄芪(AM)处理组:大鼠于再灌注前 30 min 股静脉注射 AM 50 mg/kg,20 只大鼠。(5)血清 TNF 测定组:另取 6 只大鼠分为假手术组(1 只大鼠)和 I/R 组(45 只大鼠);I/R 组再分为分为 3 个组,即同样为 60 min 缺血时间,给予不同灌注时间的 3 个组:灌注 2 h 组(15 只大鼠),灌注 4 h 组(15 只大鼠),灌注 6 h 组(15 只大鼠)。

用 717 全自动生化仪(日本日立公司)及自动酶标仪(Model 1450,美国 Bio-Rad)分别进行肝、肾生化指标与 TNF 测定。

## 1.2 方法

### 1.2.1 肠缺血再灌注模型制作

将大鼠于实验前禁食 12 h,自由饮水。用 1% 戊巴

比妥钠(0.5 ml/100 g,腹腔注射)麻醉后仰卧于大白鼠固定台,于上腹部正中作长约 3 cm 的切口,用温生理盐水(37°C)无菌纱布将内脏轻轻推向左下腹,暴露出脊柱腹膜后组织,以及位于右肾上腺右上方的肠系膜上动脉,分离血管周围组织后穿线备用。在肠系膜上动脉穿线处用一个套硅胶管小动脉夹钳夹,观察 2 min,待确定肠系膜上动脉血流被阻断(肠壁苍白,血管无搏动)后缝合伤口<sup>[3]</sup>,60 min(或按所需时间)后开腹,打开动脉夹,恢复肠系膜上动脉血流供应(肠壁变红润,出现血管搏动),再关腹后观察 6 h。整个手术过程中,于腹腔内滴加温热生理盐水(37°C)维持体内环境平衡。假手术对照组同样开腹,但不钳夹血管,仅轻扰腹腔后关腹。

### 1.2.2 标本采集与测定

实验动物于再灌注后 6 h,用 1% 戊巴比妥钠麻醉(0.5 ml/100 g,腹腔注射)后开腹,从腹主动脉抽取 6 ml 不抗凝血,静置 30 min 后离心分离血清,进行肝、肾、肺功能的生化检测及做 TNF 测定。

TNF 测定时,用血清 TNF 测定组的 6 只鼠于肠缺血 60 min,灌注 4 组大鼠,测定血清 TNF 浓度后,再灌注 6 h 组大鼠,并于再灌注前 30 min 分别静注 NS 与 AM,测定外周血 TNF 浓度。

将取过血的大鼠的肝、肾、肺,用生理盐水洗清残血并用滤纸吸干,各取组织 0.5 g,加 4°C PBS 5 ml,用匀浆机匀浆。将匀浆液离心(3 000 r/min,10 min),取上清液制备 10% 肝、肾、肺匀浆,检测丙二醛(MDA)及 SOD 含量。

### 1.2.3 数据处理

实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,显著性检验方法采用 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 肝、肾功能生化指标变化

肝、肾功能生化指标变化结果见表 1 从表可

表 1 肝、肾功能生化指标变化

Table 1 Changes of functionally biochemical parameters in the liver and kidney

组别 Group	n	谷草转氨酶 AST(u/L)	谷丙转氨酶 ALT(u/L)	尿素 Urea(mmol/L)	肝酐 Cr( $\mu$ mol/L)	尿酸 UA( $\mu$ mol/L)
Con	16	169.00 $\pm$ 48.90	39.68 $\pm$ 9.76	7.17 $\pm$ 1.78	45.6 $\pm$ 16.82	60.8 $\pm$ 29.62
I/R	18	232.09 $\pm$ 86.88*	88.70 $\pm$ 18.47*	18.99 $\pm$ 4.23*	66.33 $\pm$ 15.76*	103.78 $\pm$ 29.61*
NS	12	259.17 $\pm$ 71.25	85.67 $\pm$ 19.03	18.68 $\pm$ 4.98	55.56 $\pm$ 19.80	135.04 $\pm$ 21.85
AM	20	169.63 $\pm$ 39.89▲	56.63 $\pm$ 14.25▲▲	7.3 $\pm$ 2.07▲▲	39.22 $\pm$ 10.16▲	58.6 $\pm$ 14.51▲▲

与 Con 组比较 Compared with Con group, \* :  $P < 0.01$ ; 与 I/R 组比较 Compared with I/R group, ▲:  $P < 0.05$ , ▲▲:  $P < 0.01$

见, I/R组的 AST ALT Urea Cr UA均高于假手术对照组 (Con),提示肝、肾功能受损。AM组的 AST Cr比 I/R组低 ( $P < 0.01$ ), ALT Urea和 UA与 I/R组比较,有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),显示 AM有保护作用。

### 2.2 肝、肾、肺组织 MDA SOD含量变化

从表 2可见,肠缺血再灌注时,肝、肾、肺组织的 MDA含量显著高于假手术对照组 ( $P < 0.01$ ),提示这些器官的细胞受到了损伤。给予 AM后,组织中 MDA含量比 I/R组明显降低 ( $P < 0.01$ )。

从表 3可见, I/R组 SOD的活力显著低于假手术对照组,给予 AM后, SOD活力显著高于 I/R组 ( $P < 0.01$ )。

以上结果说明黄芪可减少脂质过氧化物的产生。

表 2 组织中 MDA含量的变化

Table 2 Changes of MDA in tissues

组别 Group	n	MDA含量 ( $10^4$ mol/L)		
		肝 Liver	肾 Kidney	肺 Lung
Con	16	15.62±3.08	18.78±3.85	53.8±1.50
I/R	18	32.75±4.64*	40.78±3.85*	71.62±2.67*
NS	12	24.83±9.73	33.72±7.66	72.93±3.27
AM	20	15.23±2.86▲▲	24.09±4.71▲▲	46.35±1.95▲▲

与 Con组比较 Compared with Con group, \*\* :  $P < 0.01$ ; 与 I/R组比较 Compared with I/R group, ▲▲:  $P < 0.01$

表 3 肠外器官 SOD活力变化

Table 3 Changes of SOD in tissues

组别 Group	n	SOD活力 (nu/ml)		
		肝 Liver	肾 Kidney	肺 Lung
Con	16	118.97±27.28	139.03±25.56	100.32±17.97
I/R	18	53.97±17.46*	39.95±12.17*	35.44±9.32*
NS	12	42.27±9.32	44.10±11.60	38.35±4.86
AM	20	78.35±23.16▲▲	77.73±17.16▲▲	67.13±15.06▲▲

与 Con组对照 Compared with Con group, \*\* :  $P < 0.01$ ; 与 I/R组比较 Compared with I/R group, ▲▲:  $P < 0.01$

### 2.3 血清 TNF的改变

从表 4可见,随灌注时间增加, TNF浓度增加,并与假手术组比较有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), AM处理组外周血 TNF浓度较 I/R组低 ( $P < 0.01$ ),而 NS组无显著性差异 ( $P > 0.05$ ),说明黄芪可减轻肠 I/R机体内 TNF生成。

表 4 血浆 TNF浓度变化

Table 4 Changes of TNF in plasma

组别 Group	TNF含量 TNF level (ng/ml)	
	NS (n = 15)	AM (n = 15)
Con (n = 15)	0.184±0.052	
I/R (n = 15)	2 h	0.305±0.057*
	4 h	0.408±0.062*
	6 h	0.358±0.038* 0.370±0.082 0.199±0.067▲▲

2 h, 4 h, 6 h 分别为再灌注时间 2 h, 4 h, 6 h are time of reperfusion; 与 Con组比较 Compared with Con group, \* :  $P < 0.01$ ; 与 I/R组的 6 h组比较 Compared with 6 h reperfusion I/R group, ▲▲:  $P < 0.01$

### 3 讨论

黄芪(又名黄耆、北芪)具有免疫调节、抗炎、镇痛等多方面的药理作用及抗氧化的保护作用<sup>[4]</sup>,黄芪可升高再灌注心肌组织中 SOD及 GSH-Px活力,降低 MDA及细胞内  $Ca^{2+}$ 含量,维持心肌细胞氧化和抗氧化平衡,有效的保护再灌注后的心肌细胞<sup>[2]</sup>。黄芪可能含有钙拮抗的成分,可抑制感染病毒的心肌细胞的  $Ca^{2+}$ 内流<sup>[5]</sup>。本实验发现,肠缺血再灌注(I/R)后大鼠的肝、肾、肺组织 MDA含量,与对照组(Con组)比有明显升高 ( $P < 0.05$ ),且组织中 SOD含量降低。提示肠缺血再灌注时,除有肠道的损伤外,还有肝、肺、肾等肠外器官的损伤。引起肠外器官的损伤可能机制是多方面的,资料表明其中通过过量的炎症介质和自由基的共同作用引起肝细胞及肾、肺组织的损伤是主要的病理学机制<sup>[6,7,8]</sup>。在缺血再灌注前给黄芪,可使组织中 MDA含量降低并使 SOD含量升高,说明黄芪可提高机体的抗氧化能力,减轻细胞膜的脂质过氧化损伤,保护肠粘膜屏障的完整,减轻肠 I/R时肠外器官的损伤。

严重创伤、大面积烧伤,休克时,体内发生炎症反应,产生一系列的生物活性物质,其中 NTF起着重要作用<sup>[9]</sup>。有研究表明,肠 I/R时,从缺血肠道进入体循环的脂多糖可激活巨噬细胞及循环血液和组织器官中的单核细胞释放 TNF,使中性粒细胞聚集,粘附于内皮细胞,引起肺损伤<sup>[10,11]</sup>。本实验结果显示,肠缺血及再灌注 2~6h后,机体外周血 TNF显著增加,同时伴有器官的损伤。黄芪处理组动物血中 TNF的含量较 I/R组显著降低,器官受损情况也减轻。提示肠 I/R时, TNF参与了机体的病理损害过程。黄芪通过对 TNF抑制作用,减轻肠 I/R后 TNF对机体的损伤。

(下转第 213页 Continue on page 213)

## 5 讨论

实验采用甲醇-水作为流动相<sup>[2]</sup>,调整甲醇-水的比例,加入三乙胺以防止拖尾,并用磷酸调 pH 值,所得盐酸麻黄碱峰形较好。

实验预处理过程中,考察了用乙醚洗涤 3 次、氯仿提取 3 次及用乙醚洗涤 4 次、氯仿提取 4 次的情况,测得结果含量偏低,并且有干扰。本试验用乙醚洗涤 5 次,氯仿提取 5 次能较好的消除干扰。

将萃取洗涤弃去的乙醚层蒸干,用磷酸调 pH 值 3.5~4.5 的蒸馏水溶解,定容,制成供试液。在同样色谱条件下测定,麻黄碱出峰阶段无色谱峰出现,说明被测组分无损失。

将氯仿提取过程中剩下的水相层用磷酸酸化后浓缩、过滤,制得供试液。在同样色谱条件下测定,麻黄碱出峰阶段无色谱峰出现,表明被测组分提取完全。

本实验方法与《中华人民共和国药典》(1995 年)<sup>[3]</sup>的方法进行比较,测定结果重现性好;与氯仿超

声提取法<sup>[4]</sup>对比,无干扰峰存在,测得结果准确。

经 10 批样品测定,每批样品测得 3 个数据,结果表明,10 批样品中,最低含量为 3.57%,最高含量为 3.99%,平均含量为 3.86%。考虑到本品在大生产时药材产地不同、药材品种基源不同以及在大量加工提取时存在生产条件的差异,故暂定本品麻黄碱含量不低于 3.40%。

## 参考文献

- 1 梁宏希,于如焜,杨清华等. HPLC 测定止咳化痰丸中麻黄碱、伪麻黄碱的含量. 中成药, 1990, 12(10): 13.
- 2 张智耀,张贞良,张书润等. 高效液相色谱法测定复方苯海拉明滴鼻液中两组份含量. 药物分析杂志, 1993, 13(3): 162.
- 3 中华人民共和国药典(一部). 1995. 285.
- 4 王喜军. 高效液相色谱在中药研究中的应用. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1994. 81.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 209 页 Continue from page 209)

## 参考文献

- 1 姚咏明,盛志勇. MODS 抗炎治疗研究的反思. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 456~458.
- 2 冯国清,秦晓晨,刘洁等. 黄芪对大鼠心肌缺血再灌注损伤的防护作用. 中药药理与临床, 1997, 13(3): 27~29.
- 3 胡森,盛志勇,薛丽波等. 多器官系统功能障碍综合征动物模型的系列研究. 解放军医学杂志, 1996, 21(1): 5~9.
- 4 刘艳红,赵胜利,石瑞如等. 黄芪、枸杞子对衰老大鼠血浆 LPO、SOD 及某些激素的影响. 中药药理与临床, 1996, 12(2): 20~22.
- 5 丁继军,章同华,沈茜. 黄芪皂甙对小鼠柯萨奇 B3 病毒性心肌炎的治疗作用. 第二军医大学学报, 1999, 20(9): 666~668.
- 6 孙春雷,朱锦祥,张锡庆. 肠缺血再灌注粒细胞介导肝损伤实验研究. 苏州医学院学报, 1995, 15(4): 624~626.
- 7 张文颖,郑珊. 小肠缺血再灌注所致肺损伤的机理和治

疗. 中国小儿外科杂志, 1998, 19(3): 182~184.

- 8 华鲁纯,孟淑美,杨俭. 小肠缺血再灌注损伤时自由基清除剂及 MDA 变化的实验研究. 中国微循环, 1999, 3(4): 205~207.
- 9 王今达. 脓毒症: 感染性 MODS 的预防. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 453~455.
- 10 Yao Y M, Sheng Z Y, Yu Y, et al. The potential etiologic role of tumor necrosis factor in mediating multiple organ dysfunction in rats following intestinal-ischemia-reperfusion injury. Resuscitation, 1995, 29(2): 157~168.
- 11 Sorkine P, Setton A, Halpern P, et al. Soluble tumor necrosis factor receptors reduce bowel ischemia-induced lung permeability and neutrophil sequestration. Crit Care Med, 1995, 23(8): 1377~1381.

(责任编辑: 邓大玉)