

• 基础研究 •

灯盏花在肢体缺血再灌注致远隔多器官损伤的预防作用

李红梅 崔乃杰 崔德健

【摘要】 目的 观察肢体缺血再灌注致远隔多器官损伤及灯盏花的预防作用。方法 实验共分 3 组：① 再灌注组：夹闭大鼠双侧股动脉，阻断循环 2h 再灌注 5h，建立双下肢缺血再灌注模型；② 灯盏花组：每日腹腔注射云南灯盏花注射液 1ml，共 7d，后再灌注组方法制作模型；③ 对照组：行假手术处理。观察大鼠下肢骨骼肌、远隔器官胃、肾、肺、肝及脑组织超微病理改变、测定心肌酶、肝酶改变、红细胞超氧化物歧化酶(SOD)含量、组织丙二醛(MDA)含量、血清谷胱甘肽(GSH)含量，观察灯盏花对远隔器官损伤的预防作用和对以上指标的影响。结果 再灌注组骨骼肌病变较其单纯缺血时严重，远隔器官肝、肺、肾、胃及脑有弥漫性损伤；心肌酶、肝酶较对照组显著增高($P<0.05$)；红细胞 SOD 及血清 GSH 较对照组显著下降($P<0.05$)；肝、肺组织匀浆 MDA 含量则显著增多($P<0.05$)；灯盏花组病变较对照组明显改善。结论 肢体缺血再灌注不但使再灌注器官本身损伤加重，还可引起远隔多器官损伤，灯盏花作为强抗氧化剂，可明显减轻肢体缺血再灌注所引起的远隔多器官损伤。

【关键词】 再灌注损伤；多器官损伤；灯盏花

Distant multiple organ dysfunction caused by hind limb ischemia/reperfusion and preventive effect of breviscapine

LI Hongmei, CUI Naijie, CUI Dejian

The 304th Hospital of PLA, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To observe the pathogenesis of distant multiple organ dysfunction caused by hind limb ischemia/reperfusion and the preventive effect of breviscapine. Methods Wistar rats were divided into 3 groups: ① Reperfusion group: rats underwent 2-hour bilateral femoral artery occlusion of hind limb to produce ischemia followed by 5-hour reperfusion. ② Breviscapine group: rats received intraperitoneal injection of breviscapine 1 ml every day for 7 days and underwent 2-hour ischemia of hind limb followed by 5-hour reperfusion. ③ Control group: animals underwent sham operation. Ultrastructural pathological changes in the limb muscles after ischemia for 2h, reperfusion for 5h and the distant organs such as the lung, liver, kidney, stomach, brain after reperfusion for 5h were studied. Myocardial and liver enzymes were measured. Superoxide dismutase (SOD) of erythrocyte, malondialdehyde (MDA) in tissues and glutathione (GSH) in serum were assayed. Results It was showed that the muscles of hind limb after reperfusion for 5h were damaged more severely than those after ischemia for 2h. In reperfusion group, extensive injury of remote multiple organs such as the lung, kidney, stomach and brain occurred; Myocardial and liver enzymes were also significantly increased ($P<0.05$); SOD of erythrocyte and GSH in serum were decreased as compared with control group ($P<0.05$); while MDA in tissue homogenates of liver and lung was significantly increased ($P<0.05$). The pathological changes in breviscapine group were obviously alleviated. Conclusions Hind limb ischemia/reperfusion can not only result in local tissue damage, but also cause dysfunction of remote multiple organs. Breviscapine as a powerful antioxidant can alleviate the pathological changes in remote organ dysfunction caused by hind limb ischemia/reperfusion.

【Key words】 reperfusion damage; multiple organ dysfunction; breviscapine

心肌梗死溶栓治疗、休克恢复期、器官移植等都

与缺血再灌注损伤有关。再灌注较单纯缺血时的损伤更重，还可引起远隔多器官损伤^[1]，虽然损伤的机制尚未完全明确，但与再灌注后中性粒细胞被激活，呼吸爆发释放大量的氧自由基及炎性细胞释放大量的炎性介质有关^[2]。作者采用缺血再灌注大鼠模型，观察了远隔器官损伤情况，并探讨其发生机制及中药

作者单位：100037 北京，解放军 304 医院呼吸科（李红梅，崔德健）；300192 天津，天津第一中心医院急救医学研究所（崔乃杰）

作者简介：李红梅，女，医学博士，主治医师

通讯作者：李红梅，电话：010-66867323，传真：010-66867323

灯盏花的预防作用。

1 材料与方法

1.1 体外法初选具有清除氧自由基的药物^[3] 根据 Fenton 反应原理:过氧化氢(H_2O_2)在二价铁离子(Fe^{2+})存在的情况下可形成羟自由基($\cdot OH$),生成的 $\cdot OH$ 用过量的苯甲酸捕捉,可形成有荧光的羟苯甲酸,其荧光强度可代表 $\cdot OH$ 生成的相对量。配制 Fe^{2+} -EDTA, 反应终体积为 3.5ml, 反应体系中含苯甲酸 3mmol/L, K_2HPO_4/NaH_2PO_4 150 mmol/L, pH 7.4, Fe^{2+} -EDTA 0.189 mmol/L, H_2O_2 0.289 mmol/L 及所测定的药物 20% 牛磺酸(南京制药厂)、20% 甘露醇、灯盏花(brevi-scipine)、穿琥宁(四川宜宾制药厂)各 1ml, 加入 H_2O_2 1 μ mol 触发反应, 5h 后用荧光分光光度计测定荧光值。其清除率 $S\% = (F_{\text{空}} - F_{\text{测}}) \div F_{\text{空}} \times 100\%$ 。

1.2 动物与分组 健康 Wistar 大鼠, 体重(250 ± 30)g, 雌雄不分, 随机分为健康对照组(行假手术处理)、下肢缺血再灌注组(再灌注组)和灯盏花组, 每组 6 只。

1.3 动物模型及给药 再灌注组大鼠腹腔注射 20% 乌拉坦(2ml)和氯胺酮(40mg/kg)麻醉, 切开双侧下肢股三角区皮肤, 游离股动脉, 微血管夹夹闭双侧股动脉, 保持股静脉通畅, 同时于股血管鞘下方用细止血带结扎肢体, 阻断肢体侧支循环, 确保下肢动脉供血中断, 2h 后取缺血下肢骨骼肌留超微病理标本, 取出微血管夹, 松解止血带, 缝合皮肤, 恢复血供 5h 后, 股动脉取血、处死; 对照组行假手术处理。灯盏花组每日给予云南灯盏花注射液(云南生物制药厂, 批号滇卫药准字第 001787 号, 10ml/支), 每日 1ml 腹腔注射, 连续 7d 后, 按再灌注组方法制备动物模型。

1.4 取材与实验方法

1.4.1 取外周血 4ml, 取血清在生化分析仪上测定心肌酶和肝酶。

1.4.2 红细胞超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性测定 取动脉血 50 μ l 制备红细胞提取液, 取红细胞提取液 30 μ l, 采用亚硝酸盐形成法按 SOD 试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明测定红细胞 SOD 活性。

1.4.3 血清谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定 取股动脉血 0.1ml, TBA 显色法测定 MDA, 生化法测定 GSH, 按 GSH、MDA 药盒(南京建成生物工程研究所)说明操作。

组织匀浆 MDA 含量测定: 取肝、肺、脑组织各 0.5mg, 加入冷生理盐水 5 ml, 用匀浆机在冰水浴中充分匀浆, 离心($3\,000 \times g$, 5min)取上清液制成 10% 组织匀浆。TBA 显色法测定 MDA。

1.4.4 超微结构变化的观察 再灌注组缺血 2h 时取下肢骨骼肌(单纯缺血标本), 各组再灌注 5h 后取下肢骨骼肌、肾、胃、肝、肺、脑海马组织, 用 25% 戊二醛固定, 按常规操作电镜染色和切片并进行观察分析。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 统计软件包进行 t 检验及方差分析。

2 结果

2.1 体外化学法初筛具有清除作用氧自由基的药物

表 1 结果表明, 牛磺酸对体外生成的 $\cdot OH$ 基本无清除作用(1.71%), 甘露醇对 $\cdot OH$ 的清除作用较弱(8.24%), 而灯盏花清除 $\cdot OH$ 的作用最强(99.96%), 穿琥宁的清除作用(38.64%)介于灯盏花和甘露醇之间。

表 1 不同药物对体外 $\cdot OH$ 的清除作用

组 别	荧光度	清除率(%)
空白组	93.40	—
甘露醇组	85.70	8.24
牛磺酸组	91.80	1.71
灯盏花组	0.04	99.96
穿琥宁组	57.30	38.64

注: $n=6$

2.2 外周血心肌酶和肝酶测定 表 2 结果表明, 再灌注组谷丙转氨酶、碱性磷酸酶和肌酸激酶较对照组显著增高($P<0.05$)。

2.3 红细胞提取液 SOD 活性及血清 GSH 含量 表 3 结果表明, 再灌注组红细胞 SOD 活性及血清 GSH 较对照组显著降低($P<0.05$); 灯盏花组则显著高于再灌注组($P<0.05$)。

2.4 肝、肺、脑组织匀浆 MDA 含量 表 4 结果表明, 再灌注组肝、肺组织匀浆 MDA 含量显著高于对照组($P<0.05$), 脑组织匀浆 MDA 含量与对照组无显著差异($P>0.05$); 灯盏花组肝、肺组织匀浆 MDA 含量显著低于再灌注组($P<0.05$), 而脑组织匀浆 MDA 含量与对照组无显著差异($P>0.05$)。

2.5 组织形态学观察 超微结构观察显示, 再灌注组下肢骨骼肌、肺、肝、肾、胃及脑等组织均存在胞膜溶解、线粒体膜及嵴溶解变性、细胞核异常、染色质局灶性溶解等损害, 并可见大的、成群髓样小体。再

表 2 心肌酶和肝酶的测定结果(U/L)

组 别	谷丙转氨酶 (U/L)	谷草转氨酶 (U/L)	碱性磷酸酶 (U/L)	谷氨酰转肽酶 (U/L)	肌酸激酶 (×10 ⁻³ U/L)	乳酸脱氢酶 (×10 ³ U/L)
对照组	68.3±6.1	219.0±25.2	303.3±19.0	1.3±0.5	1.12±0.96	1.48±0.15
再灌注组	97.7±14.5*	214.0±96.3	356.0±18.3*	2.0±0.8	2.66±0.90*	1.55±0.17

注:n=6。与对照组比较,*P<0.05

表 3 红细胞提取液 SOD 活性、血清 GSH 变化

组 别	SOD 活性(×10 ³ U/L)	GSH(mg/L)
对照组	1 175.3±93.7	322.1±55.4
再灌注组	715.5±206.2*	215.5±22.5*
灯盏花组	1 199.7±137.1 [#]	348.7±119.2 [#]

注:n=6。与对照组比较,*P<0.05;与再灌注组比较,[#]P<0.05

表 4 肝、肺、脑组织匀浆含量的变化(nmol/L)

组 别	MDA 含量(nmol/L)		
	肝	肺	脑
对照组	6.14±1.18	6.76±1.15	11.45±3.73
再灌注组	17.03±4.67*	8.74±0.64*	11.47±1.98
灯盏花组	10.16±1.10 [#]	3.79±0.72 [#]	8.18±1.40

注:n=6。与对照组比较,*P<0.05;与再灌注组比较,[#]P<0.05

灌注组下肢骨骼肌病变较单纯缺血时病变严重,再灌注组下肢骨骼肌和远隔器官肺、肝、肾、胃及脑具有弥漫性损伤,而灯盏花组各器官损伤减轻(图1~图4)。

3 讨 论

本实验采用双下肢动脉结扎再灌注方法,制备了大鼠下肢缺血再灌注致远隔多器官损伤的模型,由于双下肢肌肉体积极大,缺血再灌注后对全身影响较明显,与相关研究结果相一致^[4]。

肢体缺血再灌注引起远隔器官损伤的机制可能有以下方面:嗜中性多形核白细胞(polymorpho-nuclear neutrophilic leukocytes,PMNs)激活后呼吸爆

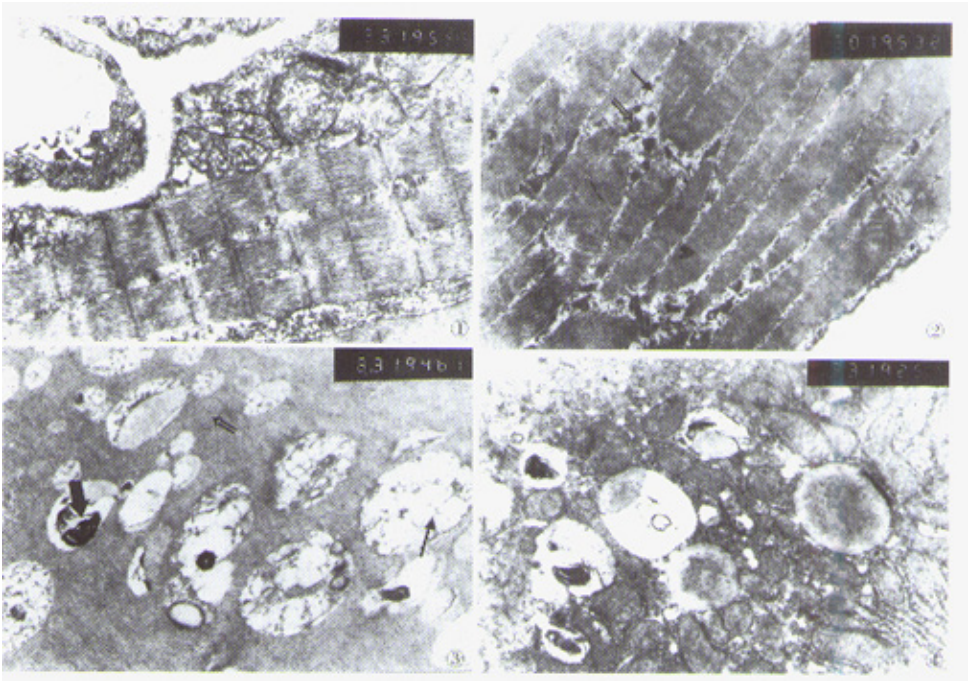


图 1 正常组下肢骨骼肌超微结构(×12 450)
图 2 再灌注组下肢骨骼肌超微结构(×12 450) 注:肌纤维溶解性病变明显(→),肌纤维间疏松,有较多髓样小体(→)
图 3 再灌注组肝脏超微结构(×7 500) 注:肝细胞内多处有脂滴(→),多数线粒体肿胀、嵴断裂或消失(→),可见较多髓样小体(→)
图 4 灯盏花组肝脏超微结构(×12 450) 注:退变、肿胀或髓样小体样线粒体较少,结构正常的线粒体较多,可见脂肪滴

发释放大量的氧自由基^[5,6];活化的炎性细胞及内皮细胞过度表达粘附因子,PMNs 与远隔器官血管内皮细胞粘附引起广泛微血管功能障碍^[7];PMNs、巨噬细胞等炎性细胞释放大量的炎性介质等有关^[1]。此外,研究发现补体亦参与了远隔多器官损伤,C5 基因缺失的大鼠,可减轻远隔器官肺损伤^[8]。

由于氧自由基具有极强的反应活性,半衰期短,难以捕捉,常通过体内氧化-抗氧化系统间接反映体内氧自由基的产生情况。SOD 是清除 O_2^- 的专一歧化酶,GSH 可清除 H_2O_2 和脂质过氧化物,稳定含巯基酶,两者反映了体内抗氧化自由基能力。MDA 反映了机体脂质过氧化程度,间接反映组织内自由基水平^[9]。本实验显示,肢体缺血再灌注后,红细胞 SOD 活性、血清 GSH 显著降低,肝、肺组织匀浆 MDA 含量增加,表明大量的氧自由基释放,抗氧化酶 SOD 及 GSH 消耗增多。再灌注组脑组织匀浆 MDA 含量与对照组无差别,可能与血脑屏障的保护作用有关。

菊科灯盏花属飞蓬属短茎植物,又名灯盏细辛,其有效成分为灯盏花总黄酮。临床实践已表明,灯盏花在扩张微动脉,保护血管内皮细胞,改善微循环、抗血小板及红细胞聚集、降低血粘度、防止血栓形成方面具有一定疗效^[10],这与其能够显著清除氧自由基,减轻氧自由基对各器官的损伤有密切关系。本实验体外化学法亦证实,灯盏花与其他有关药物相比,具有极强直接清除 $\cdot OH$ 的作用。超微病理学检查表明,灯盏花组各器官损伤较再灌注组明显减轻,红细胞 SOD 值及血清 GSH 增高,肝、肺组织匀浆 MDA 含量下降,进一步证明,灯盏花具有极强的抗氧化损伤能力。由于本实验为急性损伤实验,动物致伤后 7h 即行处死,未涉及灯盏花的治疗效应,有关灯盏花对缺血再灌注所致损伤的治疗作用有待进一步研究。

总之,肢体缺血再灌注损伤后激活 PMNs 及其他炎性细胞,产生大量的氧自由基及炎性介质,使机体处于一种无法控制的过度炎症反应状态,引起远隔多器官功能障碍。本实验表明,灯盏花是极强的抗

氧化剂,能够有效清除氧自由基,提高机体抗氧化能力,有可能减轻肢体缺血再灌注损伤后引起的远隔多器官损伤。

参考文献

- 1 Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 2000,190:255-266.
- 2 Neary P, Redmond HP. Ischemia-reperfusion injury and the systemic inflammation response syndrome. In: Ischemia-reperfusion injury. Grace PA, Mathie RT, eds. London: Blackwell Science, 1999. 123-136.
- 3 McCord JM, Day ED Jr. Superoxide-dependent production of hydroxyl radical catalyzed by iron-EDTA complex. *FEBS Lett*, 1978, 86: 139-142.
- 4 Willy C, Dahouk S, Starck C, et al. DNA damage in human leukocytes after ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med*, 2000,28:1-12.
- 5 Kawasaki S, Sugiyama S, Ishiguro N, et al. Implication of superoxide radicals on ischemia-reperfusion-induced skeletal muscle injury in rats. *Eur Surg Res*, 1993,25:129-136.
- 6 Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, et al. Neutrophil elastase and oxygen radicals: synergism in lung injury after hindlimb ischemia. *Am J Physiol*, 1991, 260: H1852-H1856.
- 7 Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, et al. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg*, 1991, 78:651-655.
- 8 Kyriakides C, Austen WG Jr, Wang Y, et al. Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. *J Trauma*, 2000,48:32-38.
- 9 崔乃杰,主编.实用危重病急救医学,天津:天津科学技术出版社,1993. 120-127.
- 10 Zhou QS, Zhao YM, Bai X, et al. Effect of new-breviscapine on fibrinolysis and anticoagulation of human vascular endothelial cells. *Acta Pharmacol Sinica*, 1992, 13: 239-242.

(收稿日期:2002-07-23)

(本文编辑 周宇红)