

壳寡糖对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用

周春燕 黄智铭 杨 庆 吴金明 吴建胜 张启瑜

摘 要 **目的** 探讨壳寡糖对大鼠肠缺血再灌注(I/R)损伤肠黏膜屏障功能的保护作用及其可能的作用机制。**方法** 采用夹闭肠系膜上动脉(SMA)的方法制作轻度和重度肠缺血再灌注损伤模型。将 40 只成年雄性 SD 大鼠随机分为 5 组,分别为假手术组、重度缺血再灌注组、轻度缺血再灌注组、壳寡糖对轻度及重度缺血再灌注干预组。再灌注后用 Chiu 氏评分法观察肠黏膜的损伤情况,检测血清二胺氧化酶(DAO)与小肠组织髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平以及小肠黏膜组织的 SIgA 水平。**结果** 小肠缺血再灌注后,肠黏膜形态学损伤明显,血清中反应肠损伤的 DAO 以及肠组织匀浆中 MDA 及 MPO 含量明显升高,SOD 活性明显降低,肠黏膜组织的 SIgA 水平明显下降,运用壳寡糖预处理的轻度及重度 I/R 组以上变化均较相同 I/R 时间模型组减轻。**结论** 壳寡糖对大鼠轻度和重度肠缺血再灌注损伤后的肠黏膜屏障有保护作用,该保护作用可能与清除氧自由基、减少中性粒细胞聚集与活化以及增强大鼠肠黏膜免疫屏障功能有关。

关键词 缺血-再灌注损伤 壳寡糖 肠

Protective Effects of Chitosan oligosaccharides on Intestinal Injury Induced by Intestinal Ischemia/reperfusion in Rats. Zhou Chunyan, Huang Zhiming, Yang Qing, et al. Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract **Objective** To investigate the protective effects of chitosan oligosaccharides on intestinal injury induced by ischemia/reperfusion(I/R) and the possible mechanism. **Methods** Intestine ischemia-reperfusion model induced by totally occluding the superior mesenteric artery(SMA) was set up. 40 male SD rats were randomly divided into 5 groups. Every group had 8 rats. They were sham group, model of severe I/R injury, model of mild I/R injury, and chitosan oligosaccharide intervention groups. After reperfusion, Chiu's count was used to assess the changes in intestinal pathological morphology. SOD activity and MDA content in intestinal, DAO activity in serum and SIgA activity of intestinal mucous were observed. **Results** After ischemia/reperfusion, morphology injury of intestinal was obvious. The contents of DAO in blood serum and the contents of MDA and MPO in intestinal homogenate were all increased obviously, and SOD decreased obviously. SIgA level in intestinal mucous was decreased obviously. Above changes in chitosan oligosaccharide intervention groups were obviously alleviated compared with those in model groups. **Conclusion** Chitosan oligosaccharides can protect the intestinal mucosal barrier of rats with gut injury from I/R damage, which may related to removing oxygen free radical, reducing accumulation and activation of neutrophilic granulocyte and enhancing intestinal immunity system.

Key words Ischemia/reperfusion injury; Chitosan oligosaccharides; Intestinal

研究表明,肠缺血-再灌注(I/R)是严重创(烧)伤、休克和感染的发生及救治过程中必经的病理生理过程,由此而产生的肠屏障功能损伤、肠源性细菌毒素入血进而引发失控的炎症反应和脓毒症,是导致严重并发多脏器功能障碍综合征(MODS)的重要原因^[1,2]。目前认为,肠黏膜低灌注、氧自由基损伤及细胞因子作用是其导致肠黏膜损伤 3 大主要因素^[3]。

壳寡糖(COS)是由甲壳素和壳聚糖经水解后产生的一类低聚合度(n 一般在 2~20)可溶于水的氨

基糖类化合物。甲壳素和壳聚糖是一类广泛存在于甲壳动物外壳、昆虫外壳和真菌细胞壁中的一类天然多糖,其资源量仅次于纤维素,研究表明壳寡糖具有显著的清除自由基、免疫增强、抗菌抑菌、抗肿瘤等多种生物活性^[4~7]。因此,壳寡糖受到广泛重视和普遍关注,成为国际上近年来新兴发展的功能性低聚糖。

但迄今未见壳寡糖对肠缺血再灌注损伤作用的相关研究的报道。本文拟参考 Souza 等^[8,9]建立大鼠轻度(缺血 30min 再灌注 30min)和重度(缺血 2h 再灌注 2h)肠缺血再灌注模型,观察预先给予壳寡糖对轻度及重度肠缺血再灌注损伤大鼠肠黏膜屏障的影响,并探讨其作用机制。

作者单位:325000 温州医学院第一附属医院消化内科(周春燕、黄智铭、杨庆、吴金明、吴建胜);肝胆外科(张启瑜)

通讯作者:黄智铭,电子信箱:wyyhzhiming@126.com

材料与方法

1. 药品和试剂:壳寡糖购于福州日冕科技发展有限公司(相对分子质量 2kDa,脱乙酰度 85%),二胺氧化酶、髓过氧化物酶和 SIgA ELISA 检测试剂盒购于美国 R&D 公司,MDA、SOD 检测试剂盒购于碧云天生物技术研究所以。

2. 实验动物与分组:成年健康雄性 SD 大鼠 40 只,平均体重 250~300g,由温州医学院实验动物中心提供,随机分为 5 组(每组 8 只)。即:A 组:假手术组;B 组:缺血 2h 再灌注 2h 组;C 组:缺血 30min 再灌注 30min 组;D 组:缺血 2h 再灌注 2h + 壳寡糖组;E 组:缺血 30min 再灌注 30min + 壳寡糖组。A、B、C 三组按 10ml/kg 体重生理盐水灌胃,D、E 两组给予壳寡糖 1500mg/kg(150mg/ml)体重灌胃,1 次每日,连续 5 日,造模前 30min 灌胃 1 次。

3. 大鼠缺血再灌注模型的建立:动物适应性喂养 1 周后予壳寡糖灌胃,手术前 12h 禁食,自由饮水。大鼠常规腹腔注射水合氯醛麻醉,经腹正中切口,暴露并分离肠系膜上动脉(SMA),无损伤动脉夹夹闭其根部,缝合切口,旁照灯保暖。到达相应时间点后经原切口进腹,取出动脉夹,恢复血供,依次关闭切口。假手术组进行同样操作但不夹闭肠系膜上动脉。每组动物均在再灌注后处死,收集血液,取肠组织标本。

4. HE 染色及病理学评分:距回盲部 10cm 处相同部位取约 1cm 肠段,4% 多聚甲醛固定。石蜡包埋,组织切片,常规 HE 染色在光镜下观察组织细胞学形态。采用改良的 Chiu 氏法评分来评价肠黏膜损伤程度^[10]。

5. 肠组织匀浆制备及丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和髓过氧化物酶(MPO)的检测:在冰浴下将切取的小肠纵行剖开,在生理盐水中漂洗,滤纸吸干,准确称取小肠组织,加入 PBS 制成 10% 组织匀浆,低温离心,取上清液,严格按照说明书采用化学比色法进行 MDA 和 SOD 的测定,采用 ELISA 方法检测组织匀浆中 MPO 的含量。

6. 血清二胺氧化酶(DAO)含量测定:于下腔静脉取血 3ml,室温放置 15min 后 3000r/min 离心 15min,分离血清,严格按照说明书采用 ELISA 方法检测血清二胺氧化酶(DAO)。

7. 肠黏膜 SIgA 水平的检测:取小肠回盲部 10cm 以上的肠管,经冰生理盐水漂净,滤纸吸干,延肠管长轴切开,用玻片轻轻刮取肠黏膜部分,准确称取小肠黏膜组织,制成 10% 组织匀浆,低温离心,取上清液,严格按照说明书采用 ELISA 方法检测。

8. 统计学分析:所有数据进行正态性检验,用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 壳寡糖对大鼠小肠损伤组织形态学改变的影响。假手术组大鼠肠绒毛完整,形态正常,上皮间隙无扩张(图 1);重度缺血再灌注模型组大鼠肠绒毛上皮顶端与固有层分离,肠绒毛顶端破裂,伴固有层毛细血管暴露、出血和溃疡,固有层炎性细胞增多

(图 2);轻度缺血再灌注模型组较重度模型组病理改变轻(图 3)。壳寡糖干预的重度及轻度 I/R 组肠绒毛病理改变分别较对应 I/R 时间模型组明显减轻,但仍可见肠绒毛顶端破裂,固有层出血和炎症细胞浸润(图 4、图 5);肠黏膜病理分级评分结果见表 1。

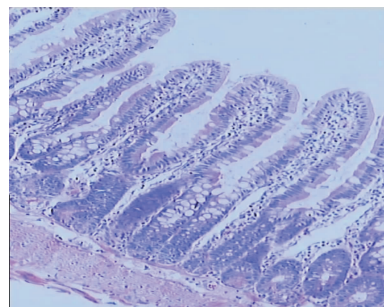


图 1 假手术组(×100)

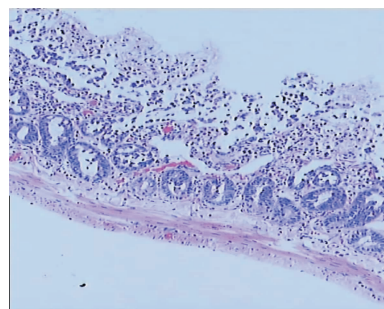


图 2 重度缺血再灌注组(×100)

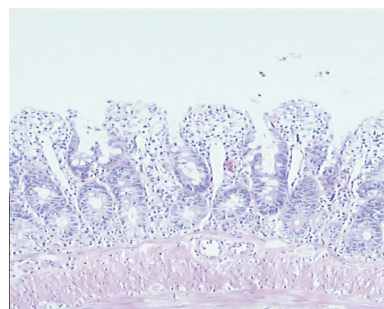


图 3 轻度缺血再灌注组(×100)

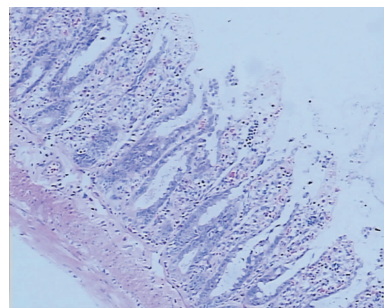


图 4 重度缺血再灌注 + 壳寡糖干预组(×100)

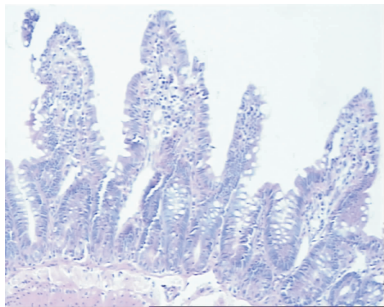


图 5 轻度缺血再灌注 + 壳寡糖干预组 (× 100)

2. 各组大鼠血清 DAO 含量的比较。假手术组大鼠血清中 DAO 含量较低,轻度及重度缺血再灌注组血清 DAO 含量均较假手术组明显升高,与相同 I/R 时间的模型组相比,壳寡糖干预组 DAO 含量均显著降低(表 1)。

3. 各组大鼠肠黏膜 SIgA 水平比较。轻度及重度 I/R 后肠黏膜 SIgA 水平较假手术组都有显著下降,有壳寡糖干预的轻度及重度 I/R 组 SIgA 水平分别较假手术组和相同 I/R 时间的模型组均显著升高(表 1)。

表 1 血清 DAO 含量变化、肠黏膜病理学评分及肠黏膜 SIgA 水平 (n = 8 , $\bar{x} \pm s$)

组别	DAO(U/ml)	Chiu 氏评分	SIgA(ng/mg)
A	0.37 ± 0.39	0.25 ± 0.46	4.13 ± 0.63
B	0.86 ± 0.10 [△]	4.25 ± 0.71 [△]	1.09 ± 0.34 [△]
C	0.65 ± 0.09 [△]	3.00 ± 0.76 [△]	1.70 ± 0.23 [△]
D	0.73 ± 0.95 [*]	3.14 ± 0.90 [*]	5.30 ± 1.41 ^{△*}
E	0.49 ± 0.83 [#]	2.00 ± 0.59 [#]	5.77 ± 0.39 ^{△#}

与 A 组比较, [△] P < 0.01; 与 B 组比较, ^{*} P < 0.01; 与 C 组比较, [#] P < 0.01

4. 各组大鼠肠组织中 MPO、SOD 活力以及 MDA 含量的比较。轻重度 I/R 损伤模型组大鼠肠组织中 MPO 和 MDA 含量较假手术组明显增加,SOD 明显下降;壳寡糖干预组与相同 I/R 时间模型组相比,肠组织 MPO 和 MDA 含量显著降低,SOD 显著增加(表 2)。

表 2 肠组织 MPO、MDA、SOD 活性或含量的变化 (n = 8 , $\bar{x} \pm s$)

组别	MPO(ng/mg)	MDA(nmol/mg)	SOD(U/100mg)
A	0.62 ± 0.33	1.53 ± 0.44	85.88 ± 6.95
B	1.10 ± 0.43 [△]	3.21 ± 0.91 [△]	27.68 ± 8.60 [△]
C	0.83 ± 0.46 [△]	3.02 ± 0.92 [△]	44.00 ± 12.74 [△]
D	0.97 ± 0.80 [*]	2.06 ± 0.86 ^{**}	45.58 ± 7.26 ^{**}
E	0.69 ± 0.43 [#]	1.88 ± 0.49 [#]	65.39 ± 6.37 [#]

与 A 组比较, [△] P < 0.01; 与 B 组比较, ^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01; 与 C 组比较, [#] P < 0.01

讨 论

肠缺血再灌注损伤在手术和创伤患者中发病率较高,并且是导致其病死率较高的重要因素。早在 20 世纪 50 年代 Lillehei 就提出小肠是休克向不可逆发展的关键器官。多项研究表明 I/R 不仅可以引起消化道局部的组织损害而且可以导致肠内细菌和毒素移位到体循环,引起网状内皮系统发生系列反应,进而导致大量相关介质及细胞因子的释放,甚至发生 MODS。因而近年来关于其发生的病理生理机制以及相应防治措施的实验研究越来越受到重视。

Dou 等^[11]研究壳寡糖对静息的中性粒细胞和用豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA)刺激过活的中性粒细胞作对比,发现 COS 可提高静息状态下中性粒细胞的活性,使之产生一系列下游的信号因子用以激发免疫应答反应。而对于 PMA 刺激过活的中性粒细胞,COS 则起到负调控的作用,减少因释放过多细胞因子所引发的细胞损伤。

MPO 是中性粒细胞(PMN)的标志酶,其活性升高表明组织中的 PMN 数量增多。目前认为 PMN 的激活并释放大量的毒性产物是导致肠 I/R 损伤的病理基础。本实验中,肠 I/R 后大鼠肠组织 MPO 活性较对照组明显升高,提示肠 I/R 后中性粒细胞在肠组织内明显增多。壳寡糖干预组大鼠肠组织 MPO 活性较模型组显著降低,说明壳寡糖可以抑制肠 I/R 后中性粒细胞在肠组织中的聚集,从而进一步减少过多细胞因子所引起的组织损伤。

研究表明,氧自由基的生成及其引起的脂质过氧化是 I/R 损伤的重要机制之一,MDA 是目前公认的能反映氧自由基产生及引发的脂质过氧化反应的间接指标,其含量变化可反映其造成组织损伤的严重程度,SOD 是体内重要的自由基清除剂,其活性高低可反映机体清除内源性自由基的能力^[12,13]。本实验结果显示,与假手术组相比,肠 I/R 损伤模型组血清中 SOD 活力显著降低,血清中 MDA 含量显著增加;与相同时间的肠 I/R 损伤模型组相比,壳寡糖干预组血清 SOD 活力显著提高、血清 MDA 含量显著降低。表明 I/R 时,氧自由基生成增多,SOD 被消耗。而壳寡糖能显著改善这种作用。壳寡糖能够改善缺血再灌注大鼠体内的抗氧化水平的可能是因为壳寡糖分子中存在还原端羟基和伯、仲 - OH, - NH₂, 可与 O²⁻ 发生反应,清除掉 O²⁻。并且降低了 O²⁻ 对 SOD 的消耗,使得 SOD 活力显著升高。

李斌等^[14]的研究表明肠缺血再灌注后肠黏膜免疫功能下降,与肠外细菌移位的发生密切相关。本实验中壳寡糖干预组 SIgA 的分泌量较相应的肠缺血再灌注损伤组明显升高,壳寡糖可能通过影响 SIgA 的分泌量从而对肠道免疫屏障起着调节作用。SIgA 是胃肠道和黏膜表面主要的免疫球蛋白,以 SIgA 为主体的体液免疫是防御病菌在肠道黏膜黏附和定植的第一道防线。可阻止病原体在肠黏膜表面的黏附,中和毒素和病毒,增强具有 Fc 受体的细胞的吞噬功能,并与补体和溶酶菌一起协同抗菌;其次 SIgA 可抑制由 IgM 免疫复合物介导的抗体依赖式细胞毒作用(ADCC 作用)对肠道局部的免疫损伤。此外,Diebel 等^[15]研究认为,SIgA 还具有调节肠上皮细胞凋亡的作用,可消除 Caco-2 单层细胞(来源于人结肠腺癌细胞,在体外可进行肠细胞分化培养,它的单细胞层可用来研究小肠表皮下细胞转运和代谢)由于大肠杆菌和缺氧-供氧联合作用后可引起的细胞凋亡,从而维护肠黏膜屏障功能,减少全身炎症反应。

DAO 是存在于小肠黏膜上皮细胞内高活性的结构酶,肠黏膜上皮损伤时可释放入血,故血中 DAO 活性升高反映了肠黏膜上皮细胞的损伤及肠屏障结构的破坏^[16]。本实验中,壳寡糖干预组大鼠血浆 DAO 含量较相同 I/R 时间的模型组明显降低,显示了壳寡糖对大鼠肠黏膜明显的保护作用。

综上所述,壳寡糖通过减少中性粒细胞的聚集;减少脂质过氧化程度,增加氧自由基的清除,促进肠黏膜 SIgA 的分泌增强大鼠肠黏膜免疫屏障功能,对大鼠肠缺血再灌注后的肠道有保护作用。有研究表明壳寡糖还具有促进肠绒毛生长,调节肠道菌群等作用,这些因素是否参与了壳寡糖对 I/R 损伤的保护作用,以及壳寡糖对 I/R 损伤中炎症介质及细胞因子的调节作用有待进一步研究证实^[17,18]。壳寡糖作为一种资源丰富、成本低廉的天然药物有着十分广阔的临床应用前景,本实验为其临床应用提供了依据。

参考文献

- Sheng ZY, Dong YL, Wang XH. Bacterial translocation and multiple system organ failure in bowel ischemia and reperfusion. *Trauma*, 1992, 32:148-53
- Wilmore DS, Smith RJ, Dwyer Sy, *et al.* The gut: A central organ after surgical stress. *Surgery*, 1988, 104:917-923
- 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. 南京铁道医学院学报, 2000, 19(4):246-248
- 吴宏军,陈筱春. 壳寡糖对运动小鼠自由基代谢的影响. 湛江师范学院学报, 2004, 25(6):44-47
- Amin M, Jaafari MR, Tafaghodi M. Impact of chitosan coating of anionic liposomes on clearance rate, mucosal and systemic immune responses following nasal administration in rabbits. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2009, 74(1):225-229
- Choi BK, Kim KY, Yoo YJ, *et al.* In vitro antimicrobial activity of chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetem-comitans* and *Streptococcus mutans*. *Int J Antimicrob Agents*, 2001, 18(6):553-557
- Shen KT, Chen MH, Chan HY, *et al.* Inhibitory effects of chitooligosaccharides on tumor growth and metastasis. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(8):1864-1871
- Souza, D G, Cara G D, Cassali S F, *et al.* Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol*, 2000, 131:1800-1808
- Souza DG, Esser D, Bradford R, *et al.* APT070 (Mirococept), a membrane-localised complement inhibitor, inhibits inflammatory responses that follow intestinal ischaemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol*, 2005, 145:1027-1034
- Chiu CJ, Mcardle AH, Brown R, *et al.* Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg*, 1970, 101(4):478-483
- Dou JL, Tan CY, Du YG, *et al.* Effects of chitooligosaccharides on rabbit neutrophils in vitro. *Carbohydr Polym*, 2007, 69:209-213
- Koike K, Moore FA, Moore EE, *et al.* Gut ischemia mediates lung injury by a xanthine oxidase-dependent neutrophil mechanism. *Surg Res*, 1993, 54(5):469-473
- Schmidley JW. Free radicals in central nervous system ischemia. *Stroke*, 1990, 21(7):1086-1090
- 李斌,文亮,郭毅斌,等. 大鼠肠缺血再灌注损伤后肠黏膜免疫功能的变化与意义. 实用医学杂志, 2004, 20(11):1220-1221
- Diebel LN, Liberati DM, Dulchavsky SA, *et al.* Enterocyte apoptosis and barrier function are modulated by SIgA after exposure to bacteria and hypoxia/reoxygenation. *Surgery*, 2003, 134(4):574-580
- Colak T, Polat A, Bagdatoglu O, *et al.* Effect of trapidil in ischemia/reperfusion injury on rats small intestine. *Invest Surg*, 2003, 16(3):167-176
- 王秀武,张丽,杜昱光,等. 海洋寡聚糖对仔猪结肠内容物营养成分、肠道形态和肠道微生态的影响. 中国动物保健, 2005, 1:31-32
- Orban J I, Patterson J A, Sutton A L, *et al.* Effect of sucrose thermal oligosaccharide caramel, dietary vitamin-mineral level, and brooding temperature on growth and intestine bacterial population of broiler chickens. *Poul Sci*, 1997, 76(3):482-490

(收稿:2010-08-15)