

别嘌呤醇对肠道缺血再灌注损伤的保护作用

代小娟, 杨涛, 许美霞, 曹好好, 张晓霞, 毕传华, 许涛

背景资料

别嘌呤醇可减少缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)时自由基的产生。近年来多项研究证实别嘌呤醇通过其抗氧化作用对心肌细胞起到保护作用, 从而改善心肌缺血、改善心衰功能; 还有研究表明其对缺血缺氧性脑病有保护作用, 然而其对肠黏膜I/R有无保护作用尚无研究。

代小娟, 杨涛, 许美霞, 曹好好, 张晓霞, 毕传华, 许涛, 武汉市普爱医院重症医学科 湖北省武汉市 430015
代小娟, 住院医师, 主要从事重症患者胃肠黏膜损伤的研究。
作者贡献分布: 许涛主要完成课题的设计与指导, 参与全部研究过程、提供指导、论文修改及提供课题经费; 代小娟负责试剂采购、数据处理与分析及论文的撰写; 杨涛、许美霞及曹好好负责动物购买、试剂配制、观测指标测定及汇总; 张晓霞与毕传华负责实验相关资料收集与论文修改。
通讯作者: 许涛, 副教授, 副主任医师, 430015, 武汉市解放大道76号, 武汉市普爱医院重症医学科。5955098@qq.com
电话: 027-68831578
收稿日期: 2015-01-27 修回日期: 2015-03-10
接受日期: 2015-03-18 在线出版日期: 2015-04-18

Protective effect of allopurinol against intestinal ischemia-reperfusion injury

Xiao-Juan Dai, Tao Yang, Mei-Xia Xu, Hao-Hao Cao, Xiao-Xia Zhang, Chuan-Hua Bi, Tao Xu

Xiao-Juan Dai, Tao Yang, Mei-Xia Xu, Hao-Hao Cao, Xiao-Xia Zhang, Chuan-Hua Bi, Tao Xu, Department of Intensive Care Unit, Puai Hospital of Wuhan City, Wuhan 430015, Hubei Province, China
Correspondence to: Tao Xu, Associate Professor, Associate Chief Physician, Department of Intensive Care Unit, Puai Hospital of Wuhan City, 76 Jiefang Road, Wuhan 430015, Hubei Province, China. 5955098@qq.com
Received: 2015-01-27 Revised: 2015-03-10
Accepted: 2015-03-18 Published online: 2015-04-18

Abstract

AIM: To investigate the protective effect of allopurinol against intestinal ischemia-reperfusion injury.

METHODS: Thirty male SD rats were randomly divided into a sham operation group, an allopurinol group and a saline group, with 10 rats in each group. A rat model of intestinal ischemia was established. Serum content of diamine

oxidase (DAO), tissue level of malondialdehyde (MDA) and activity of xanthine oxidase (XO) were detected by colorimetry.

RESULTS: Ileal mucosa Chiu's score differed significantly among the three groups ($P < 0.05$), and the score in the allopurinol group was significantly lower than that in the saline group ($P < 0.05$), but significantly higher than that in the sham operation group ($P < 0.05$). Serum DAO levels differed significantly among the three groups ($P < 0.05$), and serum DAO levels in the allopurinol group was significantly higher than that in the sham operation group ($P < 0.05$), but significantly lower than that in the saline group ($P < 0.05$). MDA contents in the ileum differed significantly among the three groups ($P < 0.05$), and ileal tissue MDA in the allopurinol group was significantly higher than that in the sham operation group ($P < 0.05$), but significantly lower than that in the saline group ($P < 0.05$). XO activity differed significantly among the three groups ($P < 0.05$), and XO activity in the allopurinol group was significantly higher than that in the sham operation group ($P < 0.05$), but significantly lower than that in the saline group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Allopurinol has a protective effect against intestinal ischemia-reperfusion injury possibly through its antioxidant and free radical scavenging activities.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Intestinal ischemia-reperfusion injury; Allopurinol; Diamine oxidase

Dai XJ, Yang T, Xu MX, Cao HH, Zhang XX, Bi CH,

同行评议者
唐世刚, 教授, 湖南省人民医院

Xu T. Protective effect of allopurinol against intestinal ischemia-reperfusion injury. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(11): 1796-1800 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/1796.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i11.1796>

摘要

目的: 探讨别嘌呤醇在肠道缺血再灌注中的保护作用。

方法: 根据随机数字表法将30只♂SD大鼠分为假手术组、别嘌呤醇组和生理盐水组, 每组10只。参照KoiKe等方法复制肠模型, 采用比色法测定二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)水平、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量及黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)活性。应用SPSS16.0统计软件进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结果: 3组大鼠回肠黏膜Chiu氏评分比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 而别嘌呤醇组评分则与生理盐水组比较明显降低($P<0.05$), 但仍高于假手术组($P<0.05$)。3组大鼠血清DAO水平不同, 差异有统计学意义($P<0.05$); 别嘌呤醇组大鼠血清DAO水平显著高于假手术组($P<0.05$); 与生理盐水组比较, 别嘌呤醇组血清DAO水平明显降低($P<0.05$)。3组大鼠回肠组织中MDA含量比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 别嘌呤醇组大鼠回肠组织中MDA含量明显高于假手术组($P<0.05$); 显著低于生理盐水组($P<0.05$)。3组大鼠回肠组织中XO活性测定比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 别嘌呤醇组回肠组织中XO活性测定与假手术组比较均明显升高($P<0.05$); 显著低于生理盐水组($P<0.05$)。

结论: 别嘌呤醇通过抗氧化、清除自由基的作用, 对肠道缺血再灌注损伤有保护作用。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肠道缺血再灌注损伤; 别嘌呤醇; 二胺氧化酶

核心提示: 别嘌呤醇作为黄嘌呤氧化酶的特异性抑制剂, 可明显降低黄嘌呤氧化酶的活性, 本研究预先给予治疗剂量的别嘌呤醇, 以肠黏膜损伤的特异性指标(二胺氧化酶)作为观察指标, 从而证实别嘌呤醇对大鼠肠黏膜再灌注损伤起到保护作用。

别嘌呤醇对肠道缺血再灌注损伤的保护作用. *世界华人消化杂志* 2015; 23(11): 1796-1800 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/1796.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i11.1796>

0 引言

肠道是对缺血反应最敏感的组织之一, 当机体处于休克状态时, 为了保证心、脑等重要器官的供血, 首先减少内脏(胃肠黏膜)和皮肤等部位的血流, 即表现为该部位的供血血管收缩。当缺血的肠黏膜恢复血流后极易引起肠黏膜损伤, 即肠缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)。别嘌呤醇是黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)的特异性抑制剂, 可减少I/R时自由基的产生。自1963年用于临床以来, 其主要临床应用为治疗痛风, 近年来别嘌呤醇在心血管疾病中的应用日益受到国内外学者广泛的关注^[1-4], 通过其抗氧化作用对心肌细胞损伤起到了保护作用。有研究^[5]显示其通过抗氧化、清除自由基的作用对缺血缺氧性脑病有保护作用, 然而其对肠黏膜I/R有无保护作用尚无研究, 本文主要研究预先给予治疗剂量的别嘌呤醇, 是否对大鼠肠黏膜再灌注损伤起到保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康成年♂SD大鼠30只, 体质量180-220 g[购自华中科技大学实验动物中心, SCXK(鄂)20100009]。别嘌呤醇片为泰州美通药业公司产品; 二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)测试盒、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测试盒、黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)活性检测试剂盒均购自南京建成生物研究所。Agilent1100型高效液相色谱仪购自美国Agilent公司。XO活性在721分光光度计下测定, 以U/g组织表示。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型: 将30只SD大鼠按随机数字表法分为3组: 假手术组、别嘌呤醇预处理组、生理盐水组, 每组10只。参照Koike等^[6]方法复制肠模型, 腹腔麻醉的方式, 腹腔内注射20%乌拉坦(0.5 mL/10 g), 然后经腹正中切口, 分离肠系膜上动脉, 动脉夹夹闭, 缝合切口, 1 h后经原切口进腹, 取出动脉夹, 恢复肠黏膜血供。肠系膜上动脉夹闭成功标志为: 动脉夹

研究前沿

肠道I/R的预防是近几年研究的热点, 别嘌呤醇作为一种抗氧化剂对肠道I/R应起到一定的作用, 目前无相关实验研究。本文还可进一步通过细胞凋亡指数、XO蛋白的表达等作为观察指标, 证实别嘌呤醇的保护作用。

代小娟, 杨涛, 许美霞, 曹好好, 张晓霞, 毕传华, 许涛. 别

创新点

别嘌呤醇的临床应用主要为痛风, 对I/RI的临床应用尚未触及, 本研究通过动物实验证实对肠道I/RI的保护作用, 从而为以后的临床应用奠定基础。

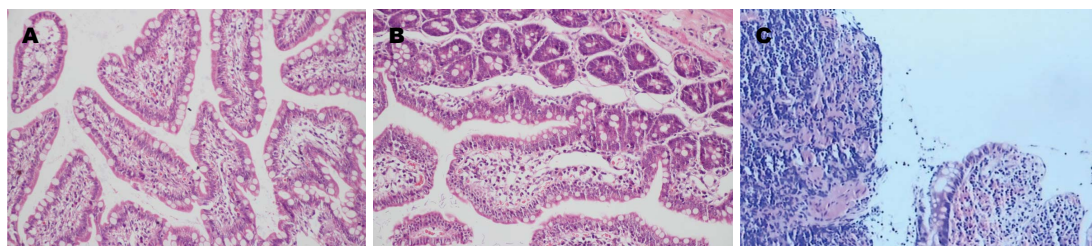


图 1 各组回肠黏膜组织HE染色($\times 200$)。A: 假手术组: 正常肠黏膜; B: 别嘌呤醇组: 黏膜内可见散在炎症细胞; C: 生理盐水组: 腺体崩解, 并可见大量坏死组织。

夹闭后肠管立即收缩, 肠壁变苍白, 肠系膜上动脉搏动消失, 开放血管后血管搏动恢复, 肠壁出现充血。假手术组: 仅分离肠系膜上动脉不夹闭。别嘌呤醇预处理组: 术前3 d开始口服别嘌呤醇(120 mg/kg, 2次/d); 生理盐水组: 则在相同时间点给予等量的生理盐水灌胃处理。

1.2.2 标本收集: 别嘌呤醇预处理组和生理盐水组, 假手术组大鼠于再灌注120 min后处死, 于同一时间点分别采集动脉血4 mL, 室温静置40 min, 1000 g 4 $^{\circ}C$ 离心10 min, 收集血清, -20 $^{\circ}C$ 保存。距离回盲部5 cm处各组大鼠分别切取长约8 cm的末端回肠, 分成两段, 一段置入40 g/L中性甲醛固定, 用作病理检测; 另一段以4 $^{\circ}C$ 生理盐水冲洗干净, 随即在液氮中储存并将其研磨成粉末, -70 $^{\circ}C$ 保存待测。

1.2.3 组织病理学检测: 固定的回肠组织块常规HE染色, 光镜下观察。由两位病理科医师遵循单盲法, 并对各标本的肠黏膜进行Chiu氏评分^[7], 分值与损伤程度呈正相关。

1.2.4 血清DAO的检测: 血清DAO水平的测定将冻存的血清在冰上融解后, 1000 g 4 $^{\circ}C$ 离心15 min, 取上清液, 采用紫外比色法测定DAO水平, 具体操作参照试剂盒说明书进行。

1.2.5 回肠组织MDA含量及XO活性的检测: 将储存的回肠组织粉末加入0.02 mol/L Tris-HCl(pH = 7.3)匀浆后, 16000 g 94 $^{\circ}C$ 离心20 min, 提取上清液。MDA含量及XO活性采用硫代巴比妥酸比色法测定, 具体操作参照各试剂盒说明书进行。

统计学处理 应用SPSS16.0统计软件进行分析, 计量资料采用mean \pm SD表示。组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学改变及回肠黏膜Chiu氏六级

评分 假手术组大鼠回肠黏膜形态正常(图1A); 别嘌呤醇预处理组大鼠回肠黏膜绒毛轻度水肿、顶端可见少量上皮细胞脱落, 腺体轻、中度受损, 固有层可见充血水肿, 淋巴管扩张(图1B); 生理盐水组大鼠回肠黏膜大量绒毛崩解, 腺体破坏明显, 上皮与固有层分离、可见出血及溃疡形成(图1C)。3组大鼠回肠黏膜Chiu氏评分比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 生理盐水组的回肠黏膜Chiu氏评分显著高于假手术组($P < 0.05$), 而别嘌呤醇预处理组评分则与生理盐水组比较明显降低($P < 0.05$), 但仍高于假手术组($P < 0.05$)(表1)。

2.2 各组大鼠血清DAO水平 3组大鼠血清DAO水平不同, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。生理盐水组和别嘌呤醇预处理组大鼠血清DAO水平显著高于假手术组($P < 0.05$); 与生理盐水组比较, 别嘌呤醇预处理组血清DAO水平明显降低($P < 0.05$)(表1)。

2.3 各组大鼠回肠组织中MDA含量 3组大鼠回肠组织中MDA含量比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。生理盐水组和别嘌呤醇预处理组大鼠回肠组织中MDA含量明显高于假手术组($P < 0.05$); 别嘌呤醇预处理组大鼠回肠组织中MDA含量显著低于生理盐水组($P < 0.05$)(表1)。

2.4 回肠组织中XO活性测定 3组大鼠回肠组织中XO活性不同, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。生理盐水组及别嘌呤醇预处理组回肠组织中XO活性测定与假手术组比较均明显升高($P < 0.05$); 与生理盐水组相比, 别嘌呤醇预处理组XO活性测定明显降低($P < 0.05$)(表1)。

3 讨论

I/RI可造成肠黏膜屏障功能障碍, 肠道细菌易位和内毒素血症, 导致肠功能衰竭, 甚至诱发多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS), 从而危及生命。

表 1 各组大鼠回肠黏膜Chiu评分、血清DAO水平、回肠组织MDA含量与XO活性 ($n = 10$, mean \pm SD)

分组	Chiu评分(分)	DAO(U/L)	MDA(μ mol/g)	XO活性(U/g)
假手术组	0.20 \pm 0.42	13.59 \pm 1.21	3.91 \pm 0.53	10.18 \pm 0.87
生理盐水组	3.50 \pm 0.85 ^a	25.11 \pm 4.37 ^a	18.12 \pm 1.00 ^a	13.73 \pm 0.64 ^a
别嘌呤醇组	1.80 \pm 0.63 ^{ac}	21.17 \pm 0.47 ^{ac}	10.08 \pm 1.17 ^{ac}	12.3 \pm 0.59 ^{ac}
F值	62.846	49.461	572.598	64.401
P值	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

^a $P < 0.05$ vs 假手术组; ^c $P < 0.05$ vs 生理盐水组. DAO: 二胺氧化酶; MDA: 丙二醛; XO: 黄嘌呤氧化酶.

应用要点

别嘌呤醇的临床应用较局限, 根据其抗氧化作用等重要的药理作用, 可在预防重要器官I/RI得到广泛应用.

别嘌呤醇作为XO的特异性抑制剂, 通过抑制黄嘌呤氧化酶的活性, 减少自由基的生成, 并且能直接清除自由基, 故被用于防治缺血性器官组织损伤^[8]. 口服别嘌呤醇可在胃肠道内完全吸收, 其半衰期约为14-28 h, 多项研究^[9,10]证实当别嘌呤醇的口服剂量在<50 mg/kg时能有效抑制XO的活性, 当剂量达100 mg/kg时可以发挥清除自由基的作用, 且增大剂量时无不良反应的发生.

黄嘌呤氧化酶系统大量存在于肠黏膜内, 当肠道发生缺血再灌注时, 该系统被激活, 生成黄嘌呤, 同时产生大量不稳定的氧自由基, 不稳定的氧自由基具有高度化学反应活性, 其可直接攻击细胞的脂类、蛋白质及核酸等成分, 造成细胞结构和功能紊乱, 从而引起肠黏膜损伤^[11]. 故氧自由基大量生成是肠黏膜缺血再灌注时组织氧化损伤的重要环节.

XO活性高低与氧自由基的含量呈正相关性, 故其可作为反映氧自由基的灵敏指标^[12]. MDA是氧自由基通过攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引起脂质过氧化作用而形成的过氧化物, 其是自由基的代谢产物, 故其含量反映了细胞脂质过氧化的程度, 可间接地反映出细胞损伤的程度.

本研究病理检查结果显示: 阻断组大鼠回肠黏膜结构破坏严重、回肠黏膜Chiu氏评分增加, 这说明肠道缺血再灌注对大鼠回肠黏膜产生了严重损伤, 这与既往的研究结果一致^[13]. 别嘌呤醇组的MDA含量明显降低, 说明应用该剂量的别嘌呤醇预处理可降低肠道I/RI后的氧自由基水平. 别嘌呤醇组的XO活性明显低于生理盐水组, 差异有统计学意义, 说明别嘌呤醇通过抑制氧化应激及减少能量代谢对大

鼠肠道I/RI起到一定的保护作用. 故别嘌呤醇可通过其抗氧化作用, 清除自由基的机制保护缺血再灌注后肠道黏膜的损伤.

DAO是肠黏膜上层绒毛细胞胞质中具有高度活性的细胞内酶, 主要存在于哺乳动物小肠绒毛上皮细胞中, 极少量分布在胎盘和肾脏中, 控制肠黏膜的增殖. 肠黏膜细胞受损、坏死后, 该酶释放入血, 导致血浆和肠腔DAO活性增高而肠黏膜DAO活性降低. DAO活性与黏膜细胞的核酸和蛋白质合成密切相关, 主要是通过调节细胞离子平衡; 影响胞内传导通路; 抑制膜脂质过氧化促进细胞修复等环节^[14], 保护肠黏膜. 外周血中DAO活性稳定, 通过测定外周血中DAO活性能快速敏感的反映小肠黏膜的损伤和修复程度^[14,15]. DAO可作为肠黏膜上皮细胞成熟度和完整性的血浆标志物. 本研究结果显示: 生理盐水组DAO显著高于假手术组及别嘌呤醇组, 别嘌呤醇预处理组的DAO含量明显降低. 故本研究以肠黏膜损伤的特异性标志物DAO作为衡量指标, 从而证实别嘌呤醇预处理组的肠黏膜损伤程度明显减低, 说明其对I/RI后的肠黏膜有一定的保护作用.

别嘌呤醇作为一种抗氧化剂, 能有效地清除自由基, 从而能减轻缺氧缺血性肠黏膜损伤. 其作用机制可能为: (1)增强缺血组织的抗氧化能力; (2)直接清除自由基; (3)减少能量代谢障碍; (4)减少尿酸及炎症反应; (5)抗细胞凋亡作用. 由于别嘌呤醇的药效学较明确, 价格便宜, 因此, 能成为临床应用防治I/RI的药物.

4 参考文献

- 樊宽鲁, 夏勇, 李东野, 陈清枝. 别嘌呤醇对缺血再灌注心肌P38MAPK活化和凋亡的影响. 吉林医学 2010; 11: 5699-5700

□ 同行评价

国内关于减轻肠道I/R的研究较少, 该文章新颖性较好, 有一定的学术价值; 课题研究设计较为合理, 方法比较可靠, 对临床工作有一定的指导价值。

- 2 王真真, 刘地川, 蔡敏, 吴健. 探讨别嘌呤醇抗氧化作用机制在改善心衰大鼠心功能中的作用. 第三军医大学学报 2014; 36: 1021-1025
- 3 Hirsch GA, Bottomley PA, Gerstenblith G, Weiss RG. Allopurinol acutely increases adenosine triphosphate energy delivery in failing human hearts. *J Am Coll Cardiol* 2012; 59: 802-808 [PMID: 22361399]
- 4 Engberding N, Spiekermann S, Schaefer A, Heineke A, Wiencke A, Müller M, Fuchs M, Hilfiker-Kleiner D, Hornig B, Drexler H, Landmesser U. Allopurinol attenuates left ventricular remodeling and dysfunction after experimental myocardial infarction: a new action for an old drug? *Circulation* 2004; 110: 2175-2179 [PMID: 15466649]
- 5 胡勇, 邵肖梅, 张旭东. 别嘌呤醇对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用. 复旦学报 2004; 31: 5-9
- 6 Koike K, Moore FA, Moore EE, Poggetti RS, Tudor RM, Banerjee A. Endotoxin after gut ischemia/reperfusion causes irreversible lung injury. *J Surg Res* 1992; 52: 656-662 [PMID: 1326681 DOI: 10.1016/0022-4804(92)90145-P]
- 7 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101: 478-483 [PMID: 5457245 DOI: 10.1001/archsurg.1970.01340280030009]
- 8 Van Bel F, Shadid M, Moison RM, Dorrepaal CA, Fontijn J, Monteiro L, Van De Bor M, Berger HM. Effect of allopurinol on postasphyxial free radical formation, cerebral hemodynamics, and electrical brain activity. *Pediatrics* 1998; 101: 185-193 [PMID: 9445490]
- 9 Moorhouse PC, Grootveld M, Halliwell B, Quinlan JG, Gutteridge JM. Allopurinol and oxypurinol are hydroxyl radical scavengers. *FEBS Lett* 1987; 213: 23-28 [PMID: 3030809]
- 10 Tran EH, Hardin-Pouzet H, Verge G, Owens T. Astrocytes and microglia express inducible nitric oxide synthase in mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 1997; 74: 121-129 [PMID: 9119964 DOI: 10.1016/S0165-5728(96)00215-9]
- 11 Granell S, Bulbena O, Genesca M, Sabater L, Sastre J, Gelpi E, Closa D. Mobilization of xanthine oxidase from the gastrointestinal tract in acute pancreatitis. *BMC Gastroenterol* 2004; 4: 1 [PMID: 14728722]
- 12 Dubick MA, Williams C, Elgio GI, Kramer GC. High-dose vitamin C infusion reduces fluid requirements in the resuscitation of burn-injured sheep. *Shock* 2005; 24: 139-144 [PMID: 16044084]
- 13 陈图锋, 黄婵燕, 戴珍桦, 王钟兴. 全反式维甲酸在肠道缺血再灌注损伤中的抗氧化作用. 中华消化外科杂志 2013; 11: 867-872
- 14 Bounous G, Echavé V, Vobecky SJ, Navert H, Wollin A. Acute necrosis of the intestinal mucosa with high serum levels of diamine oxidase. *Dig Dis Sci* 1984; 29: 872-874 [PMID: 6432501 DOI: 10.1007/BF01318436]
- 15 Wollin A, Navert H, Bounous G. Effect of intestinal ischemia on diamine oxidase activity in rat intestinal tissue and blood. *Gastroenterology* 1981; 80: 349-355 [PMID: 6778762]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍

