

- [5] Hartwell L H, Kastan M B. Cell cycle control and cancer [J]. *Science*, 1994, 266: 1821-1828.
- [6] Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 16483-16486.
- [7] MacLachlan T, El-Deiry W. Apoptotic threshold is lowered by p53 transactivation of aspace-6 [J]. *PNAS*, 2002, 99: 9492-9497.
- [8] Carter B, Wang R, Schober W, et al. Targeting survivin expression induces cell proliferation defect and subsequent cell death involving mitochondrial pathway in myeloid leukemic cells [J]. *Cell Cycle*, 2003, 2: 488-493.

芦荟凝胶对大鼠缺血再灌注损伤肾脏的保护作用

崔 桅, 肖 彬, 王 磊*, 高 洁, 孟庆杰

(天津市人民医院, 天津 300121)

摘要:目的 观察大鼠肾脏缺血再灌注损伤 (IRI) 时芦荟凝胶对肾组织的保护作用。方法 建立大鼠 IRI 模型; 将实验动物分成 IRI 模型组、芦荟凝胶高、低剂量 (300、100 mg/kg) 组及假手术组, 分别采用酶速率法、酶终点法和比色法测定各组大量血清尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr) 水平及肾组织匀浆中丙二醛 (MDA) 水平, 并对肾组织进行病理学比较。结果 芦荟凝胶高剂量组和低剂量组在术后不同时间 BUN、Cr 水平均低于 IRI 组, 且随着时间的延长这种差异更为明显; 不同组别大鼠肾组织局部 MDA 水平在不同时间内的差异亦有显著性, 芦荟凝胶高剂量组和低剂量组 MDA 水平均呈较明显的下降趋势; 组织病理切片显示, 芦荟凝胶可明显改善肾小球、肾小管的充血、肿胀等现象。结论 芦荟凝胶对大鼠肾 IRI 后肾组织具有一定的保护作用, 该作用与药物剂量呈现正相关。

关键词: 芦荟凝胶; 缺血再灌注损伤 (IRI); 尿素氮; 肌酐

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)08-1214-03

Protection of aloe gel on kidney of ischemia-reperfusion injured rats

CUI Wei, XIAO Bin, WANG Lei, GAO Jie, MENG Qing-jie

(Tianjin People's Hospital, Tianjin 300121, China)

Key words: aloe gel; ischemia-reperfusion injury (IRI); ureanitrogen (BUN); creatinine (Cr)

组织经过一段时间的缺血后恢复血流供应, 可能出现缺血性损伤进一步加重的现象, 即缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI)。IRI 常发生于医疗过程中, 可直接或间接地引起再灌注心律失常、心肌舒缩功能障碍以及脑功能、肾功能、肠功能等多脏器损伤, 成为影响缺血治疗效果的一个重要因素。由于 IRI 所致的病死率多年来一直居高不下, 且临床至今尚缺乏可靠的治疗方案, 因此, 对其发病机制的探讨和防治的研究日益受到业内人士的普遍关注。芦荟的抗自由基损伤的作用已有研究和报道^[1]。芦荟提取物能提高机体抗自由基氧化的能力、抑制细胞膜的脂质过氧化作用, 减轻肝脾细胞 DNA 损伤的程度, 从而可起到延缓衰老的作用^[2,3]。芦荟凝胶是芦荟提取物中的重要成分, 可明显提高免疫低下小鼠的胸腺、脾脏质量及溶血素抗体水平, 提高其巨噬细胞的吞噬功能, 增加自然杀伤细胞 (NK) 的活性, 使白细胞介素-2 (IL-2) 维持在正常

水平, 并可明显提高荷瘤小鼠的肿瘤坏死因子 (TNF) 水平, 从而显示出一定的调节免疫和抗肿瘤的作用^[4]。笔者从前期的实验中观察到, 对于内毒素血症大鼠, 芦荟可通过保护血管内皮细胞, 降低由内毒素诱发的有害活性介质在血清中的水平, 从而起到对肾组织的保护作用^[5]。本实验拟探讨芦荟凝胶对肾 IRI 后自由基损伤的防治作用, 以期研制开发治疗 IRI 药物提供部分实验依据。

1 材料

1.1 动物: 雄性 Wistar 大鼠, 体重 200~220 g, 购自军事医学科学院实验中心, 合格证号 SCXK-(军) 2002-001。

1.2 药物与试剂: 库拉索芦荟凝胶冻干粉 (含糖 ≥12%) 由云南万绿集团提供。丙二醛 (MDA) 试剂盒、考马斯亮蓝测试盒均购自南京建成生物研究所; 尿素氮 (BUN) 试剂盒由日本协合公司提供; 肌酐 (Cr) 试剂盒由罗氏公司提供。

1.3 仪器设备:TDA—30 全自动生化分析仪(日本东芝公司);Thermofo RMA702 超低温冰箱(美国 Thermo 公司);721 紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司);Leica RM2235 病理切片机(德国 Leica 公司);DM1000 光学显微镜(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 大鼠 IRI 模型制备:大鼠以 10% 水合氯醛 ip (6 mL/kg) 麻醉,仰卧位固定,腹壁中线切开,结扎右肾动静脉后进行右肾切除,游离左肾蒂,以无损伤动脉夹夹闭肾动脉后开始计时,30 min 时松开动脉夹,左肾由暗红逐渐变为鲜红,表明无血栓形成,再灌注手术成功。缝合腹部伤口,放回鼠笼饲养。

2.2 分组及给药:雄性 Wistar 大鼠 96 只,于实验开始前随机分成 4 组:假手术组,于术前 3 d 开始 ig 给予生理盐水 2 mL/(kg·d),连续给药至实验结束;IRI 组,给药方法同假手术组;芦荟凝胶低、高剂量组,于术前 3 d 开始 ig 给予芦荟凝胶 100、300 mg/(kg·d),连续给药至实验结束。给药 3 d 后除假手术组游离左肾蒂后不进行动脉夹闭操作以外,其余各组制备 IRI 模型。

2.3 标本采集:将大鼠先行麻醉,术前由内眦静脉采血,术后由腹腔静脉取血,3 500 r/min 离心 15 min,分离血清,—20 ℃ 保存备用。取肾上缘 1/3

处,迅速以冷生理盐水溶液冲洗并用滤纸拭干,称质量,加适量生理盐水后将组织块剪碎,以内切式组织匀浆机 10 000~15 000 r/min 制成 10% 肾组织匀浆,3 000 r/min 离心 15 min 后留取上清液;其余肾组织以 10% 甲醛固定,经脱钙后以石蜡包埋、切片,HE 染色,100 倍、400 倍光镜下进行常规病检。

2.4 观察指标:分别于手术后第 3、6、9、15 天以酶速率法测定血清 BUN 水平,以酶终点法测定血清 Cr 水平,以比色法测定肾组织匀浆中 MDA 水平;观察术前、术后不同时间肾组织病理学表现。

2.5 统计学处理:实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示;组间比较采用方差分析, q 检验。

3 结果

3.1 血清 BUN、Cr 水平的变化:见表 1。除假手术组外,其余 3 组大鼠不同时间血清中 BUN、Cr 水平均有较明显的改变。芦荟凝胶高剂量组和低剂量组随着术后时间的延长,两项指标均下降明显,而 IRI 组则无此表现。与 IRI 组比较,芦荟凝胶高剂量组不同时间血清 BUN、Cr 水平均有极显著性差异,且实验第 9、15 天血清 BUN 水平已接近假手术组;芦荟凝胶低剂量组于实验第 6 天血清 BUN 水平、实验第 9 天血清 Cr 水平,与 IRI 组比较差异无显著性。结果表明,芦荟凝胶对改善由 IRI 引起的肾功能损害有一定的积极作用,这一作用可能与药物剂量有关。

表 1 芦荟凝胶对 IRI 大鼠血清 BUN 和 Cr 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of aloe gel on levels of BUN and Cr in serum of IRI rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组 别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	BUN/(mmol·L ⁻¹)				Cr/(mmol·L ⁻¹)			
		第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 15 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 15 天
假手术	—	4.6±0.57**	4.9±0.69**	5.0±0.73**	4.5±0.43**	9.6±1.17**	8.1±0.96**	5.2±0.61**	4.5±0.63**
芦荟凝胶	300	16.5±0.74**	12.2±0.98**	4.8±0.63**	6.6±0.66**	27.2±2.11*	21.1±1.81**	12.0±1.17**	10.9±1.38**
	100	20.6±1.09	16.6±1.17	11.2±0.91**	9.5±0.76**	30.7±2.14	21.6±2.02**	22.1±1.94	13.6±1.59**
IRI	—	21.0±1.04	17.7±1.21	14.3±1.03	16.4±1.32	31.2±2.27	28.2±2.01	23.3±1.86	25.2±2.09

与 IRI 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs IRI group

3.2 肾组织匀浆中 MDA 水平变化:见表 2。假手术组 MDA 水平基本正常。在整个实验观察期内,IRI 组该指标明显高于假手术组,且两组比较差异显著。与假手术组相比,术后第 3 天时芦荟凝胶低剂量组 MDA 水平升高明显,从术后第 6 天开始,两用药组均有下降的表现,至术后第 15 天,两组 MDA 水平分别与 IRI 组相比,差异均有统计学意义。

3.3 在鼠肾组织病理学变化比较:IRI 组肾小球周围可见间隙性出血,囊外有红细胞渗出;肾小管有较明显的空隙,因管壁通透性增加可见红细胞渗出、破裂和胞浆外逸等现象;近曲小管附近和远曲小管分

表 2 芦荟凝胶对 IRI 大鼠肾组织中 MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of aloe gel on MDA level in kidney tissue of IRI rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组 别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·mg ⁻¹)			
		第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 15 天
假手术	—	2.01±0.27**	2.44±0.25**	1.82±0.18**	1.97±0.28**
芦荟凝胶	300	2.28±0.38**	3.11±0.11**	2.96±0.47**	2.90±0.28**
	100	2.92±0.12	3.28±0.19**	3.39±0.28**	3.08±0.33**
IRI	—	3.13±0.27	4.31±0.18	3.88±0.35	4.52±0.25

与 IRI 组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs IRI group

别可见弥散性出血及蛋白渗入,表明肾缺血再灌注对两者均有不同程度的损伤。与 IRI 组相比,芦荟凝胶低剂量组肾小球间隙有红细胞渗出并伴有程度较轻的弥散性出血,近曲小管周围亦可见弥散性出血,部分远曲小管管壁破裂后有蛋白渗入形成蛋白尿。芦荟凝胶高剂量组近曲小管基本正常,其他病理表现与假手术组基本相同。病理结果显示,芦荟凝胶 300 mg/kg 对改善大鼠肾 IRI 后的病理表现要好于芦荟凝胶 100 mg/kg。

4 讨论

肾脏经一段时间的缺血后,可引起中性粒细胞活化,并产生大量氧自由基,再灌注时,活化的中性粒细胞和氧自由基一起涌入缺血组织后,由中性粒细胞的呼吸爆发引起自由基的链式反应。由于氧自由基含有不配对电子,其性质极不稳定,具有脂质双分子层的细胞膜、细胞器膜上多价不饱和脂肪酸的丙烯双键极易受到攻击,形成铁依赖性的脂质过氧化反应,该反应可使细胞膜和细胞器膜上生物酶受损或激活,降低膜的流动性并增加其通透性,导致细胞代谢和功能结构的改变,从而影响组织器官的正常生理功能。有研究表明^[6],中性粒细胞的活化、与血管内皮细胞黏附、释放大炎症介质是导致肾脏结构和功能性损伤的重要因素之一^[7]。目前部分自由基清除剂已应用于临床,但尚有一些问题未得到解决,如该类药物多数在体内没能达到足够的浓度,因而清除效果不明显,而若使其浓度加大,又会对人体防御机制造成不利影响^[7]。

本实验数据显示,芦荟凝胶高剂量组和低剂量组均能降低 IRI 肾皮质中 MDA 水平,术后第 3 天芦荟凝胶高剂量组效果好于低剂量组,第 15 天时两组间差异无显著性,但与 IRI 组相比效果显著,表明芦荟凝胶可能通过抑制脂质过氧化作用,从而减轻了肾 IRI 后的自由基损伤以达到保护的作用。通过 BUN、Cr 和病理指标也看出,芦荟凝胶可较明显地

降低血清 BUN、Cr 水平,改善肾脏缺血再灌注后的病理学表现,从而证实芦荟凝胶对减轻 IRI 后大鼠肾结构和肾功能的损害具有积极作用,且芦荟凝胶 300 mg/kg 组这一作用更为明显。

现代医学研究已经证实芦荟具有调节免疫、拮抗内毒素、降低炎性细胞因子表达等诸多药理作用^[8,9]。芦荟凝胶可有效抑制由内毒素引起的中性粒细胞的活化^[10],减少自由基的释放和脂质过氧化物的生成。本实验观察到,芦荟凝胶可明显降低 IRI 大鼠肾组织局部 MDA 水平,改善微循环障碍,减轻肾结构与功能性损害,对肾 IRI 上有一定的防治作用。

References:

- [1] Huang L Y, Lin X H, Chen W, *et al.* Study of aloe-emodin and emodin scavenging oxy-free radicals [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 2006, 26(1): 12-14.
- [2] Lü M Z, Chen B, Zhang Z Z, *et al.* Experimental research of action of aloe extracts on anti-free radical oxidation damage DNA in senile model rats [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm* (中国医药学报), 2003, 18(3): 136-138.
- [3] Wang G L, Tian B, Fang H J, *et al.* Properties of an antioxidant from aloe with protective effect on red blood cells [J]. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2002, 24(4): 380-384.
- [4] Miao L C, Wang L Q, Li L Q, *et al.* Study the effect of aloe jelly on the immunity and antineoplasm of mice [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学学报), 2003, 19(2): 87-89.
- [5] He Z M, Gao X G, Xiao P, *et al.* Protection role of *Aloe vera* L. from endotoxemia in jury to rat kidney [J]. *Tianjin Pharm* (天津药学), 2003, 15(2): 6-8.
- [6] Brady H. Leukocyte adhesion molecules and kidney disease [J]. *Kidney Int*, 1994, 45: 1285-1230.
- [7] Chen X Q, Jin Y Y, Tang G. *Newly-compiled Materia Medica* (新编药理学) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004.
- [8] Cui W, Bu Y S, Gao X G. Inhibitory effect of serum contained *Aloe vera* L. on endotoxin *in vitro* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35(10): 1163-1164.
- [9] Duansak D, Somboonwong J, Patumraj S. Effect of *Aloe vera* on leukocyte adhesion and TNF-alpha and IL-6 levels in burn wounded rats [J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2003, 29 (3-4): 239-246.
- [10] Tian B, Hua Y J, Ma X Q. Relationship between anti-bacterial activity of aloe and its anthraquinone compounds [J]. *China J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28 (11): 1034-1037.