

metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates in human liver microsome by liquid chromatography/mass spectrometry: application to high-throughput screening for cytochrome P450 inhibition effect of terpenoids [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2007, 21: 635-643.

[4] 苏启表, 和凡, 卢宇靖, 等. 抗肿瘤活性物 SYU 1Q25 对

大鼠肝组织细胞色素 P450 基因表达的影响 [J]. *中国基层医药*, 2006, 13(5): 721-722.

[5] Deng Y, Bi H C, Zhao L Z, et al. Induction of cytochrome P450s by terpene trilactones and flavonoids of the *Ginkgo biloba* extract EGb 761 in rats [J]. *Xenobiotica*, 2008, 38: 465-481.

## 广藿香挥发油对肠屏障功能的保护作用

谢肄聪, 唐方\*

(天津医科大学总医院 中医科, 天津 300052)

**摘要:**目的 研究广藿香挥发油对缺血-再灌注大鼠肠屏障功能的保护作用。方法 采用肢体缺血-再灌注模型, 观察肠上皮组织形态、肠黏液分泌量及肠黏膜肥大细胞数目, 检测血浆二胺氧化酶 (DAO) 活性。结果 与对照组比较, 模型组小鼠肠黏膜结构损伤明显, 肠黏液分泌量明显减少 ( $P < 0.01$ ), 肥大细胞数目明显增多 ( $P < 0.01$ ), 血浆 DAO 活性降低 ( $P < 0.01$ )。广藿香挥发油能显著提高肠黏液分泌量 ( $P < 0.01$ ), 能显著减少肥大细胞数目 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 并能降低血浆 DAO 活性 ( $P < 0.05, 0.01$ ), 减轻肠黏膜上皮结构的损伤。结论 广藿香挥发油对缺血-再灌注损伤的肠屏障功能的保护作用机制与增加肠黏液分泌量, 减少肠黏膜肥大细胞数目, 降低 DAO 活性并维持正常的肠黏膜上皮结构有关。

**关键词:**广藿香挥发油; 肠屏障; 肥大细胞; 二胺氧化酶

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)06-0942-03

广藿香 *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. 为芳香运脾法的常用、主要药物。广藿香为唇形科刺蕊草属植物。其味辛, 微温, 归脾、胃、肺经, 具有芳香化浊, 开胃止呕, 发表解暑的功能, 临床用以芳香除秽, 疏通中州, 恢复脾胃受纳运化。广藿香含挥发油约 1.5%, 广藿香醇为挥发油主要成分, 占 52%~57%。本实验以肢体缺血-再灌注大鼠为模型, 通过对肠组织形态学观察, 肠黏液分泌量、血浆二胺氧化酶 (DAO) 活性及肠黏膜肥大细胞数目的测定来阐述广藿香挥发油成分对肠屏障功能的保护作用。

### 1 材料与方

1.1 动物: 一级 Wistar 大鼠 50 只, 雌雄不限; 平均体重 (250 ± 20) g, 购自军事医学科学院四所, 实验大鼠适应性平衡饲养 1 周后用于实验。

1.2 药品与试剂: 广藿香挥发油 (主要含广藿香醇) 采用蒸馏法提取, 生药产地广东, 制成含生药 50 mg/g 原液, 由天津达仁堂制药厂提供。投药前用 0.1% 羧甲基纤维素钠溶液稀释。磷酸缓冲液, 0.2 mol/L, pH 7.2, 购自北京鼎国生物技术发展中心。

辣根过氧化物酶溶液, 40 μg/mL, 购自北京鼎国生物技术发展中心。邻联 (二) 茴香胺, 5 mg/mL, 购自 Sigma 公司。尸胺二氢氯化物溶液, 1.75 mg/mL, 购自 Sigma 公司。二胺氧化酶 (DAO) 标准品, 购自 Sigma 公司。

1.3 模型制备: 肢体缺血-再灌注模型制备采用改良 Yassin 法<sup>[1]</sup>。于造模前 24 h 禁食, 以 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g) ip 行术前麻醉。约 5 min 后, 使用统一拉力强度橡皮筋, 结扎实验大鼠双侧大腿根部, 环绕 2 周, 持续 3 h, 造成双下肢缺血。迅速解除结扎, 形成肢体再灌注, 18 h 后结束实验。对照组在行腹腔麻醉后, 不做结扎处理。

1.4 分组及给药: 造模前将实验动物随机分为对照组、模型组各 10 只, 中药组 30 只。中药组用量按 200 mg/(kg·d) 的 10 倍、15 倍、20 倍计算, 分别为 2、3、4 g/(kg·d), 每投药组各 10 只。每次 ig 2 mL, 对照组及模型组给予等量 0.1% 羧甲基纤维素钠溶液, 各组连续 ig 5 d。于实验开始第 6 天, 模型组及中药组进行肢体缺血-再灌注造模。对照组不作任何处理。

\* 收稿日期: 2008-10-06

作者简介: 谢肄聪 (1969—), 女, 天津市人, 副主任医师, 主要从事中医药消化系统疾病防治及研究工作。

E-mail: xieyicong2006@126.com

\* 通讯作者 唐方 Tel: (022) 60363599 E-mail: zhongyi3599@sina.com

1.5 光镜标本制备:实验结束,摘取距回肠末端 2 cm 肠组织,纵行剖开,10% 中性福尔马林固定,常规脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色。

1.6 黏液染色与结果判断:同 1.5 方法摘取标本,以阿尔辛蓝过碘酸雪夫反应(ABPAS)显示肠黏膜表层黏液量。以红色显示中性黏液物质、蓝色显示酸性黏液物质、紫红色显示中性和酸性黏液的混合性物质。应用图像分析系统,在低倍镜视野下( $\times 100$ )每个检体随机计测 5 个视野内黏液物质面积,计算平均数。由此计算黏液的面积密度(黏液物质面积平均数与单位面积之比的百分数),每组各 10 例。

1.7 肥大细胞的染色与结果判断:将回肠末端组织切片,60℃ 烤箱内烘干 8 h。以甲苯胺蓝改良法显示胞核呈蓝色,细胞呈紫红色肥大细胞颗粒。应用图像分析系统,于高倍镜视野下( $\times 400$ ),每例检体随机计数 10 个视野内肥大细胞数。求取平均值作为每例检体肥大细胞个数,每组各 10 例,计数结果以个数/视野表示。

1.8 血浆二胺氧化酶(DAO)活性测定:依 Hosoda 等分光光度检测法测定<sup>[2]</sup>。

1.9 统计学处理:采用 SPSS 11.0 统计软件处理,实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

2.1 一般形态学观察:模型组肠黏膜结构明显损伤,主要表现为肠绒毛排列不整,绒毛萎缩、增粗,部分绒毛脱落、缺损;间质明显充血、水肿、淋巴管扩张,大量炎细胞浸润;上皮细胞排列不整,变性坏死;网状纤维支架结构破坏。与模型组相比,各剂量挥发油组可显著抑制肠绒毛萎缩,间质充血水肿、炎细胞浸润;上皮细胞排列整齐,未见细胞变性坏死。见表 1。

表 1 各组回肠组织形态学比较 (n=10)

Table 1 Histomorphological comparison of intestinal in every group of rats (n=10)

组别	例数	肠绒毛排列不整		间质水肿		大量炎性细胞浸润		上皮细胞坏死脱落	
		例数	阳性率/%	例数	阳性率/%	例数	阳性率/%	例数	阳性率/%
对照	-	1	10	1	10	0	0	0	0
模型	-	9	90**	8	80**	6	60**	6	60**
广藿香挥发油	2	5	50	4	40	2	20	4	40
	3	1	10	1	10	1	10	0	0
	4	1	10	0	0	0	0	1	10

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

与模型组比较:  $P < 0.05$   $P < 0.01$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group

$P < 0.05$   $P < 0.01$  vs model group

2.2 黏液物质染色结果:模型组大鼠肠黏液面积较

对照组明显减少,挥发油不同剂量药效作用比较,结果显示,与低、中剂量相比,高剂量可显著提高黏液量( $P < 0.01$ )。挥发油剂量与黏液面积相关分析结果显示,伴随药物剂量的增加,黏液面积呈同向增长。黏液量具有浓度依存性。见表 2。

2.3 血浆 DAO 活性:肢体缺血再灌注后,与对照组相比较,模型组大鼠血浆 DAO 活性显著增高( $P < 0.01$ );与模型组比较,挥发油各组血浆 DAO 活性明显下降( $P < 0.01$ )。见表 2。

2.4 肥大细胞个数:由表 2 可见,模型组肠黏膜肥大细胞数与对照组比较明显增高,中药各组的肥大细胞数与模型组比较显著减少。相关分析结果显示,随着挥发油剂量的升高,肥大细胞的数目降低,即肥大细胞数与浓度变化呈负相关。

表 2 各组间黏液物质面积密度、DAO 活性、肥大细胞数目比较 ( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

Table 2 Comparison of mucus area density, DAO activity, and IMMC number in every group of rats ( $\bar{x} \pm s$ , n=10)

组别	剂量/ (g · kg <sup>-1</sup> )	黏液面积密度/ %	DAO 活性/ (U · mL <sup>-1</sup> )	肥大细胞数
对照	-	24.02 ± 2.70	0.19 ± 0.16	8.76 ± 0.59
模型	-	14.18 ± 2.51**	2.67 ± 1.17**	15.68 ± 2.40**
广藿香挥发油	2	16.82 ± 3.73	0.98 ± 0.76	13.29 ± 1.52
	3	16.84 ± 2.90	1.12 ± 0.27	12.74 ± 1.98
	4	22.02 ± 2.07	0.53 ± 0.37	11.64 ± 1.55

与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

与模型组比较:  $P < 0.05$   $P < 0.01$

\*\*  $P < 0.01$  vs control group

$P < 0.05$   $P < 0.01$  vs model group

## 3 讨论

肠屏障功能是肠道的一个重要特征。肠道黏膜本身是维持肠屏障功能完整性的基础和主要屏障。肠黏膜直接或间接损伤所致的肠道黏膜屏障损伤和肠通透性增加是引起肠源性细菌和内毒素易位的主要原因。其结果可触发全身炎症反应和多器官功能衰竭(MODS)。因此,寻找和建立肠屏障保护的治疗方法与有效药物,近年来日益受到临床医师的重视。

广藿香以芳香除秽,疏通中州,恢复脾胃受纳、运化之能为功效。广藿香富含挥发油成分,如广藿香酮、广藿香醇,及萜类、黄酮类、醇、酚、酮、醛等类物质。实验研究证实,广藿香挥发油成分有良好的抗菌作用<sup>[3,4]</sup>,协调和促进胃肠运动功能<sup>[5]</sup>,增加大鼠胃部纵、环行肌条的张力及运动指数<sup>[6]</sup>,促进消化吸收<sup>[7]</sup>。提示芳香类药物调整胃肠运动,增进肠吸收,可能与调节及保持肠组织的屏障功能有关。为

此,本研究以广藿香挥发油成分作为实验药物,依据肠黏膜具有高代谢与绒毛微血管丰富,对血流不足表现敏感的生理特点,选用肢体缺血-再灌注大鼠模型,自肠组织结构,肠黏液分泌,血浆 DAO 活性及肠黏膜肥大细胞数目等方面,对广藿香挥发油对肠屏障保护的药理作用进行了初步探讨。本实验结果显示,肢体缺血-再灌注引发的肠系膜血流减少、绒毛低灌注,使肠壁各层组织结构发生明显损伤。而广藿香挥发油成分可有效抑制缺血-再灌注导致的肠黏膜上皮结构损伤,保护肠黏膜上皮的完整性。

附着于肠黏膜表面含量丰富的肠黏液,是润滑黏膜、包融和捕获细菌,阻止致病菌对黏膜损伤的重要防御屏障。模型组大鼠肠黏液分泌量减少表明,缺血和再灌注的双重外源性损伤导致肠黏膜损伤。广藿香挥发油成分可明显提高中药组大鼠肠黏液量,并且具有显著的浓度依赖性。广藿香挥发油对肠黏膜的保护作用,还包括通过促进肠黏膜分泌功能,提高肠道自身防御体系。

DAO 是存在于人类和哺乳动物小肠黏膜表层的细胞内酶,当肠道黏膜细胞受损时便可释放入血,外周血中 DAO 活性是反映黏膜上皮细胞成熟和完整性的血浆标志物,故血浆 DAO 的活性能较准确地反映小肠黏膜细胞的完整性和损伤程度<sup>[8,9]</sup>,并可用于肠黏膜屏障功能的监测<sup>[10]</sup>。模型大鼠伴随血浆 DAO 活性显著升高,提示肠黏膜上皮组织破坏,肠黏膜机械屏障功能受损。广藿香挥发油对黏膜结构的改善与血浆 DAO 活性的降低呈一致性,能有效减轻肠黏膜损害。说明其对肠上皮细胞的保护作用,是通过对上皮细胞结构和功能的整体调节所实现的。

肠黏膜肥大细胞存在于肠道黏膜固有层,与肠神经、血管毗邻。肥大细胞的增多可导致促炎反应的加剧。另外,近期学者们对肠缺血-再灌注损伤研究中发现,应用肥大细胞膜稳定剂可减轻局部及全身炎症反应<sup>[11,12]</sup>。本研究通过特殊染色对肠黏膜肥大细胞进行量化的观察与分析,发现肠屏障损伤后肥大细胞数目明显增多,广藿香挥发油可减少肢体缺血-再灌注模型大鼠的肥大细胞数量,且肥大细胞的增多与用药浓度呈显著负相关。由此说明广藿

香挥发油对肠免疫屏障的保护作用在于通过减少肥大细胞数量抑制细胞因子的释放,减轻相关的病理过程程度,达到保护肠屏障的作用。

本研究结果表明,广藿香挥发油成分对肠黏膜机械屏障的作用主要表现在对黏膜结构的保护作用,其有益于肠上皮细胞的完整性,维持机械屏障功能的正常,从而对肢体缺血-再灌注后肠屏障功能具有保护作用。同时进一步揭示了肥大细胞参与肠屏障损伤,为深入了解肠黏膜免疫系统变化在缺血-再灌注损伤发生中的作用及为防治肠屏障功能损伤提供了新途径。本研究不仅为广藿香挥发油具有保护肠屏障功能提供了实验依据,同时也为以广藿香挥发油为主要成分的相关制剂的临床应用提供了理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Yassin M M I, Barros D S A, Parks T G, *et al.* Lower limb ischemia-reperfusion injury alters gastrointestinal structure and function [J]. *Br J Surg*, 1997, 84: 1425-1429.
- [2] Hosoda N, Nishi M, Nakagawa W, *et al.* Structural and functional alterations in the gut of parenterally or enterally fed rats [J]. *J Surg Res*, 1989, 47: 129-133.
- [3] 苏镜娱,张广文,李核,等.广藿香精油化学成分分析与抗菌活性研究[J].*中草药*,2001,32(3):204-205.
- [4] 张广文,蓝文键,苏镜娱,等.广藿香精油化学成分分析与其抗菌活性[J].*中草药*,2002,33(3):210-212.
- [5] 李永渝,魏玉,李莉娟,等.藿香、大黄等 CCB 中药影响胃肠运动功能的机制探讨[J].*中国中西医结合外科杂志*,1997,3(3):187-190.
- [6] Tang F, Noda H, Yoshimura M, *et al.* The effects of water extract of *Pogostemi Herba* on intestinal mucosa of mice with zinc abnormality [J]. *J Tradit Med*, 1995, 12: 29-37.
- [7] 邱赛红,陈立峰,柳克玲,等.芳香化湿药开胃作用机理的实验研究[J].*中药药理与临床*,1995,11(4):24-27.
- [8] 黎君友,吕艺,付小兵,等.二胺氧化酶在创伤后肠道损伤中变化及意义[J].*中国危重病急救医学*,2000,12:482-484.
- [9] 黏君友,孙世荣,薛立波,等.烧伤后二胺氧化酶活性变化[J].*中华整形烧伤外科杂志*,1997,13(1):40-42.
- [10] Kamei H, Hachisuka T, Nakao M, *et al.* Quick recovery of serum diamine oxidase activity in patients undergoing total gastrectomy by oral enteral nutrition [J]. *Am J Surg*, 2005, 189(1): 38-43.
- [11] Dib M, Zhao X, Andersson R, *et al.* Mast cell contribute to early pancreatitis-induced systemic endothelial barrier dysfunction [J]. *Pancreatology*, 2002, 2(4): 396-401.
- [12] 甘小亮,黑子清,罗刚健,等.肥大细胞膜稳定剂对肠缺血再灌注小肠组胺、MDA 和 SOD 的影响[J].*中国病理生理杂志*,2008,24(1):153-156.