

黄芪百合颗粒对亚硝酸钠中毒致缺氧性损伤小鼠的保护作用

张苡铭¹, 苏 楹¹, 颜春鲁¹, 刘永琦^{1,2*}, 张丽昕¹, 陈 刚¹, 冯彩琴¹, 成新平¹
(1. 甘肃中医药大学, 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室, 甘肃 兰州 730000; 2. 敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730000)

摘要: **目的** 观察黄芪百合颗粒对亚硝酸钠致缺氧性损伤小鼠的保护作用。**方法** 72 只小鼠随机分为空白组, 阳性对照组, 模型组, 黄芪百合颗粒低、中、高剂量组 (1.75、3.5、7 mg/kg), 各实验组小鼠灌胃给予相应药物 30 d。末次给药 1 h 后, 各组 (除空白组外) 小鼠腹腔注射亚硝酸钠 (100 mg/kg), 1 h 后采血, 比色法测定高铁血红蛋白 (MetHb) 含量, ELISA 法测定硫代巴比妥酸反应物 (TBARS) 含量, HE 染色观察小肠病理学变化, 免疫组织化学法检查脑组织中脑红蛋白 (Ngb) 表达。**结果** 与空白组比较, 模型组 MetHb、TBARS 含量显著提高 ($P < 0.01$), 小肠黏膜上皮大量脱落, 炎细胞浸润数量、Ngb 表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪百合颗粒各剂量组和阳性对照组 MetHb、TBARS 含量显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 小肠黏膜上皮少量脱落, 炎细胞浸润数量显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Ngb 表达显著增加 ($P < 0.01$), 胞浆、胞核均可见棕黄色颗粒状免疫反应阳性产物。**结论** 黄芪百合颗粒可通过降低 MetHb 含量、抑制膜脂过氧化水平、改善小肠病理程度、提高 Ngb 表达来显示对亚硝酸钠致缺氧性损伤小鼠的保护作用。
关键词: 黄芪百合颗粒; 缺氧性损伤; 亚硝酸钠中毒
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)07-1479-05
doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.07.006

Protective effects of Astragalus Lily Granules on sodium nitrite-induced anoxic injury in mice

ZHANG Yi-ming¹, SU Yun¹, YAN Chun-lu¹, LIU Yong-qi^{1,2*}, ZHANG Li-xin¹, CHEN Gang¹, FENG Cai-qin¹, CHENG Xin-ping¹
(1. Provincial-level Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and the Prevention and Treatment with Traditional Chinese Medicine Research in Gansu Colleges and Universities, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Ministry of Education Key Laboratory for Dunhuang Medicine and Transformation Co-founded by Gansu Province and MOST, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT: **AIM** To observe the protective effects of Astragalus Lily Granules (ALG) on sodium nitrite-induced anoxic injury in mice. **METHODS** Seventy-two mice were randomly divided into blank group, positive control group, model group, low-dose ALG group (1.75 mg/kg), medium-dose ALG group (3.5 mg/kg) and high-dose ALG group (7 mg/kg), the mice in various experimental groups were given 30-day intragastric administration of corresponding drugs. After 1 h of last administration, the mice in the various groups (except for the blank group) were intraperitoneally injected with sodium nitrite (100 mg/kg), followed by blood sampling after 1 h. Methemoglobin (MetHb) content was determined by colorimetric method, thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) content was determined by ELISA, small intestinal pathological changes were observed by HE staining, and neuroglobin (Ngb) expression was detected by immunohistochemical method. **RESULTS** Compared with the blank group, the model group manifested with significantly increased MetHb and TBARS contents ($P < 0.01$),

收稿日期: 2018-04-12
基金项目: 陇原青年创新人才扶持计划 (2014-93-72); 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治重点实验室开放基金 (ZYG15-16-3); 2014 年省级自然科学基金 B 类计划 (148RJZA080)
作者简介: 张苡铭 (1990—), 男, 硕士, 研究方向为中西医结合防治肿瘤。Tel: 18194293413, E-mail: 327620132@qq.com
* 通信作者: 刘永琦 (1973—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中西医结合防治肿瘤。Tel: 13919019578, E-mail: liuyongqi73@163.com

small intestinal mucosal epithelium's much abscission, significantly increased inflammatory cell infiltration number and Ngb expression ($P < 0.01$). Compared with the model group, the ALG groups and the positive control group shared decreased MetHb and TBARS contents ($P < 0.05$, $P < 0.01$), small intestinal mucosal epithelium's little abscission, significantly decreased inflammatory cell infiltration number ($P < 0.05$, $P < 0.01$), significantly increased Ngb expression ($P < 0.01$), and brown-yellow granular positive immune response products were observable in cytoplasm and nucleus. **CONCLUSION** ALG can exhibit protective effects on sodium nitrite-induced anoxic injury in mice by decreasing MetHb content, inhibiting membrane lipid peroxidation level, improving small intestinal pathological degree, and increasing Ngb expression.

KEY WORDS: Astragalus Lily Granules; anoxic injury; sodium nitrite poisoning

在日常生活中,人们因误食亚硝酸盐或食入富含硝酸盐的蔬菜而引起中毒现象屡见不鲜。亚硝酸钠中毒是临床常见的一种化学性中毒,它能将正常的血红蛋白(Hb)氧化成高铁血红蛋白(MetHb)而失去携氧能力,造成组织细胞缺氧^[1]。目前,中医药对亚硝酸钠中毒所致缺氧性损伤作用的研究主要集中在红景天等单味中药及中药单体成分,而对中药复方的研究相对较少,故本实验将观察黄芪百合颗粒对亚硝酸钠中毒致缺氧性损伤小鼠的保护作用。

1 材料

SPF 级昆明种雄性小鼠 72 只,体质量(20 ± 2) g,购于兰州兽医研究所实验动物中心,许可证号 SCXK2015-0001,质量合格证号 62000600000206。黄芪百合颗粒(组方黄芪 9 g、红景天 3 g、百合 9 g、陈皮 3 g、枸杞 6 g、黄精 9 g),由甘肃中医药大学科研实验中心中药药理与毒物实验室制备;红景天枸杞胶囊,购于青海鑫池源生物科技有限公司,批号 20160407。亚硝酸钠(天津市北辰方正试剂厂,批号 20160220);4% 多聚甲醛(北京索莱科技有限公司,批号 20161024)。

2 方法

2.1 分组与给药 小鼠适应性喂养 3 d 后,随机分为空白组,模型组,阳性对照组,黄芪百合颗粒低、中、高剂量(1.75、3.50、7.00 mg/kg)组,每组 12 只,每天灌胃给药 1 次(20 mL/kg),连续 30 d,阳性对照组给予红景天枸杞胶囊(0.5 mg/kg),空白组、模型组给予等体积生理盐水。末次给药 1 h 后,除空白组外其余各组腹腔注射中毒剂量(100 mg/kg)的亚硝酸钠,1 h 后麻醉处死小鼠。

2.2 指标检测

2.2.1 MetHb 含有量 将小鼠全血加到肝素抗凝

管中,封口后轻轻颠倒混匀, MetHb 测试盒测定 Hb 含有量。取全血 0.01 mL,与 2.5 mL 100 倍稀释的 Hb 测定应用液混匀,静置 5 min,双蒸水调零(光径 1 cm),在 540 nm 波长处测定吸光度($A_{540\text{ nm}}$)。另取全血 0.05 mL,加入 2.5 mL Hb 测定应用液,混匀,静置 5 min,双蒸水调零(光径 1 cm),测定 602、630 nm 波长处吸光度($A_{602\text{ nm}}$ 、 $A_{630\text{ nm}}$),计算含有量。具体公式分别为 Hb 含有量 = $A_{540\text{ nm}} \times 367.7$ 、MetHb 占比 = $[(A_{630\text{ nm}} - A_{602\text{ nm}} \times 0.14) / (A_{602\text{ nm}} \times 1.67)] \times 100\%$ 、MetHb 含有量 = Hb 含有量 $\times$ MetHb 占比。

2.2.2 硫代巴比妥酸反应物(TBARS)含有量 分离血清, TBARS ELISA 检测试剂盒进行检测,在 450 nm 波长处测定吸光度($A_{450\text{ nm}}$),计算含有量。

2.2.3 小肠黏膜上皮细胞病理形态学变化 麻醉处死小鼠后,取空肠段 2.5 cm,4% 多聚甲醛固定 7 d,石蜡切片,HE 染色,显微镜下观察病理形态学变化。HE 切片于显微镜下观察,范围由目镜测微尺划定,每组观察 5 例标本,每例 3 个视野,计算方格内炎性细胞数,取平均值^[2]。

然后,每组大鼠制作 10 例标本,每例取 5 个在高倍显微镜下观察,以损伤最严重的视野计分。按照小肠组织结构损伤程度分为 5 个等级:0 分为正常,小肠绒毛基本完整,无细胞变性坏死、无炎性细胞浸润;1 分为黏膜下和(或)固有层轻度分离;2 分为黏膜下和(或)固有层中度分离,或黏膜下和肌层水肿;3 分为黏膜下和(或)固有层重度分离,或黏膜下和肌层严重水肿,明显扩张充血,局部绒毛脱落,肠腺排列较乱,同时可见炎性细胞浸润;4 分为肠绒毛消失,肠腺排列紊乱,大量炎性细胞浸润^[3]。

2.2.4 脑红蛋白(Ngb)表达 取各组小鼠脑组织,免疫组化法检测 Ngb 表达。蛋白表达阳性结

果的判定标准为细胞胞浆中出现棕黄色颗粒，颜色深表示表达强；如细胞中未出现棕黄色颗粒，则为表达阴性。

然后，每例标本取3个组织切面，每个随机取5个视野，BI-2000医学图像分析系统进行处理，去除背景灰度，计算得到每例标本棕黄色产物的平均灰度（以5个视野光密度的平均值作为每个组织切面的数值，每例标本的平均光密度为3个组织切面数值的平均值）。灰度值越大，其阳性表达水平越低，反之则表达水平越高^[4]。

2.3 统计学分析 通过SPSS 17.0软件进行处理，计量数据用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，组间比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 黄芪百合颗粒对MetHb含有量的影响 表1显示，各组Hb含有量无明显差异($P > 0.05$)。与空白组比较，模型组、阳性对照组、黄芪百合颗粒各剂量组MetHb含有量均明显升高($P < 0.01$)；与模型组比较，阳性对照组和黄芪百合颗粒高、中剂量组MetHb含有量明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表1 黄芪百合颗粒对小鼠MetHb含有量的影响 $(\bar{x} \pm s)$
Tab. 1 Effect of Astragalus Lily Granules on MetHb content in mice $(\bar{x} \pm s)$

组别	动物数/ 只	Hb/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	MetHb/ ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
空白组	12	152.22 ± 18.52	2.16 ± 0.91
模型组	11	139.22 ± 4.83	47.84 ± 3.69 ^{△△}
阳性对照组	10	158.69 ± 10.61	36.94 ± 5.97 ^{△△△△}
黄芪百合颗粒高剂量组	12	142.83 ± 4.51	32.73 ± 4.55 ^{△△△△}
黄芪百合颗粒中剂量组	10	148.69 ± 7.18	40.94 ± 5.19 ^{△△△}
黄芪百合颗粒低剂量组	11	148.77 ± 8.96	41.45 ± 5.86 ^{△△}

注：与空白组比较，^{△△} $P < 0.01$ ；与模型组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$

3.2 黄芪百合颗粒对TBARS含有量的影响 表2显示，与空白组比较，模型组、阳性对照组、黄芪百合颗粒各剂量组TBARS含有量明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)；与模型组比较，阳性对照组、黄芪百合颗粒各剂量组TBARS含有量明显降低($P < 0.01$)，以阳性对照组和黄芪百合颗粒高剂量组更显著。

3.3 黄芪百合颗粒对小肠病理形态学的影响 图1、表3显示，空白组小肠黏膜上皮完整，黏膜绒毛细长，排列整齐、紧凑，表面结构完整，无水肿、脱落现象，肠壁厚实，无肿胀，未见明显炎细胞浸润。与空白组比较，模型组小肠黏膜上皮大部分脱落，上皮细胞大量坏死，小肠组织病理评分

表2 各组TBARS含有量 $(\bar{x} \pm s)$		
Tab. 2 TBARS contents in various groups $(\bar{x} \pm s)$		
组别	动物数/只	TBARS/($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
空白组	12	7.04 ± 3.60
模型组	11	32.95 ± 1.89 ^{△△}
阳性对照组	10	11.59 ± 2.67 ^{△△△}
黄芪百合颗粒高剂量组	12	12.89 ± 2.84 ^{△△△}
黄芪百合颗粒中剂量组	10	18.23 ± 2.31 ^{△△△△}
黄芪百合颗粒低剂量组	11	27.77 ± 2.45 ^{△△△△}

注：与空白组比较，[△] $P < 0.05$ ，^{△△} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{△△△} $P < 0.01$

及炎性细胞计数明显升高($P < 0.01$)；与模型组比较，阳性对照组小肠黏膜上皮细胞水肿、坏死程度明显减轻，病理评分及炎性细胞计数均明显下降($P < 0.05$)，而且黄芪百合颗粒中、高剂量组小肠黏膜损伤在绒毛排列、水肿、脱落、坏死等方面均明显减轻，病理评分及炎性细胞计数均明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

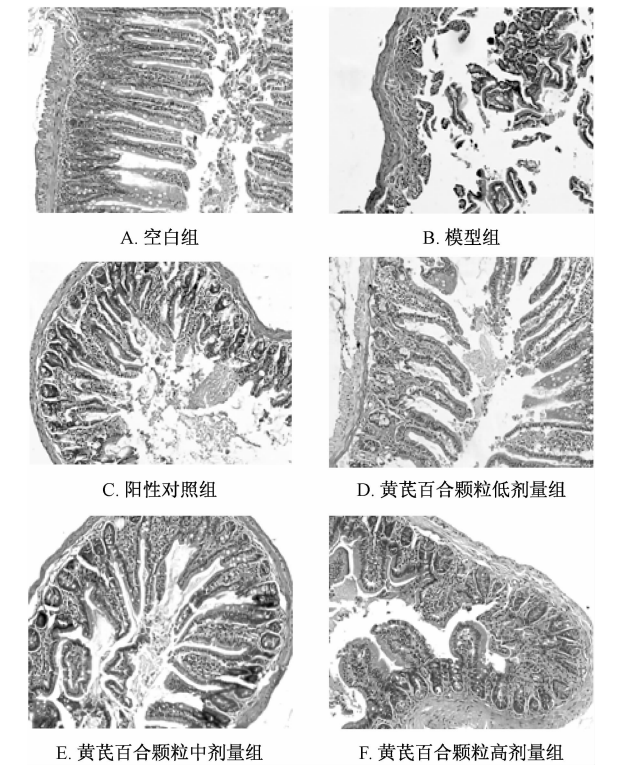


图1 各组上皮形态变化(HE, 20 ×)
Fig. 1 Epithelium morphological changes in various groups (HE, 20 ×)

3.4 黄芪百合颗粒对Ngb表达的影响 图2显示，空白组大脑皮质Ngb表达较少或无表达。与空白组比较，模型组大脑皮质细胞质或细胞核中棕黄色和褐色颗粒明显增多；与模型组比较，阳性对照组及黄芪百合颗粒中、高剂量组亦然。表4显示，与空白组比较，模型组、阳性对照组、黄芪百合颗粒

表3 各组病理评分及炎性细胞计数 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.3 Pathological scores and inflammatory cell counts in various groups ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	病理评分	炎性细胞计数/个
空白组	0.76 ± 0.38	4.16 ± 2.25
模型组	3.21 ± 0.68 ^{△△}	15.95 ± 3.69 ^{△△}
阳性对照组	1.94 ± 0.93 ^{△△▲▲}	8.62 ± 3.58 ^{△△▲▲}
黄芪百合颗粒高剂量组	2.11 ± 0.87 ^{△△▲▲}	10.93 ± 3.46 ^{△△▲▲}
黄芪百合颗粒中剂量组	2.30 ± 1.02 ^{△△▲}	11.78 ± 2.66 ^{△△▲}
黄芪百合颗粒低剂量组	2.93 ± 0.76 ^{△△}	15.43 ± 2.97 ^{△△}

注:与空白组比较,^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$

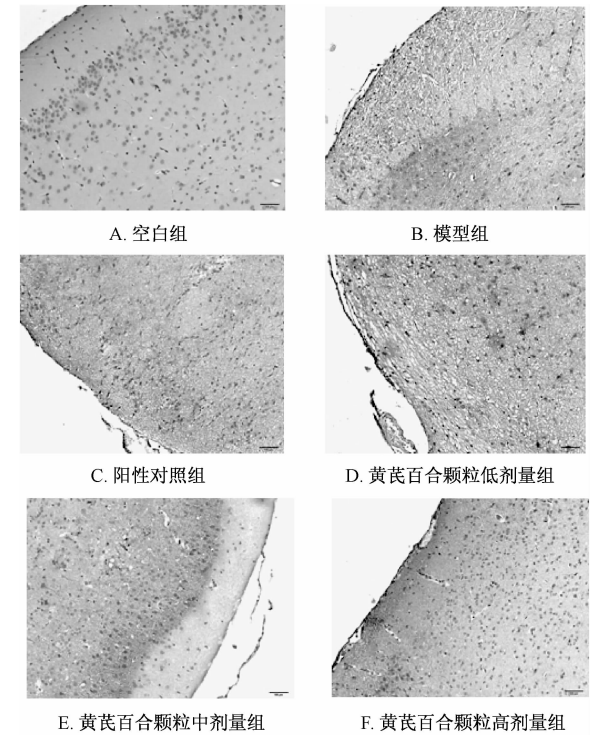


图2 各组 Ngb 免疫组织化学染色 (20 ×)

Fig.2 Immunohistochemistry staining of Ngb in various groups (20 ×)

表4 各组 Ngb 表达的平均灰度值 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.4 Average gray values of Ngb expression in various groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	平均灰度值
空白组	165.83 ± 2.80
模型组	137.15 ± 1.66 ^{△△}
阳性对照组	118.65 ± 2.67 ^{△△▲▲}
黄芪百合颗粒高剂量组	127.39 ± 2.84 ^{△△▲▲}
黄芪百合颗粒中剂量组	111.39 ± 3.41 ^{△△▲▲}
黄芪百合颗粒低剂量组	145.62 ± 2.92 [△]

注:与空白组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较,^{▲▲} $P < 0.01$

各剂量组 Ngb 表达的平均灰度值显著下降 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,阳性对照组及

1482

黄芪百合颗粒中、高剂量组亦然 ($P < 0.01$)。

4 讨论

亚硝酸钠是一种有毒化学品,摄入过量时可与血液中的血红蛋白 (Hb) 结合而转化为高铁血红蛋白 (MetHb),使血细胞失去携氧能力,导致组织缺氧^[5]。同时,它作为一种强氧化剂,进入人体内时可产生 NO^[6],与阴离子结合后生成有毒物质^[7],引起脂质过氧化,进而生成一系列自由基^[8],可侵犯神经系统,产生神经毒性^[9]。研究表明,小鼠腹腔注射亚硝酸钠后,可引起脑部脂质过氧化作用增强,自由基浓度迅速增加,对脑部造成急性缺氧性损伤^[10]。

在黄芪百合颗粒组方药材中,黄芪是传统补气中药,具有补气固表、益气脱毒、敛疮生肌、补中益气的功效,含有黄芪多糖、黄芪黄酮、黄芪皂苷等多种有效成分,具有清除自由基、减少脂质过氧化、抑制血小板聚集^[11]、减轻脑水肿、延长缺氧小鼠存活时间等作用^[12];百合味甘、微寒,具有润肺止咳、养阴消热、清心安神等功效,所含的百合皂苷具有清除自由基、抗氧化等药理作用^[13];红景天主要生长于高原地区,有着缓解体力疲劳、增强耐力、抗氧化、抗衰老、抗病毒、抗肿瘤、抗炎和保护神经系统等作用^[14-15],具有改善机体耐缺氧的能力^[16];陈皮味苦、辛、平,无毒,具有理气健脾、燥湿化痰等功效,其黄酮类成分有着抗炎、抗氧化、抗癌、降血脂等药理活性^[17],上述药材均呈现出抗氧化损伤活性,对亚硝酸钠所致中毒缺氧性损伤具有保护作用。

本实验发现,当给予中毒剂量 (100 mg/kg) 的亚硝酸钠 1 h 后,黄芪百合颗粒各剂量组 MetHb、硫代巴比妥酸反应物 (TBARS) 含有量明显降低,表明药物可迅速还原 MetHb 含有量,抑制膜脂过氧化水平,对亚硝酸钠所致的缺氧性损伤具有保护作用。急性亚硝酸钠中毒对肠道有损伤作用,通过 HE 染色发现,黄芪百合颗粒中、高剂量组小肠黏膜损伤在绒毛排列、水肿、脱落、坏死等方面均明显减轻,高剂量组还发现有多处淋巴滤泡出现,表明药物提高了肠道免疫力,增加了淋巴组织增生,对肠道具有良好的保护作用。脑红蛋白 (Ngb) 作为一种携氧球蛋白,能在大脑急性缺氧状态下应激性释放自身所携带的氧,以减轻脑组织因缺氧而引起的损害^[18]。急性亚硝酸钠引起的中毒缺氧会引起脑组织损伤,通过免疫组织化学检测发现,黄芪百合颗粒中、高剂量组皮质细胞水肿明

显减轻, Ngb 免疫反应阳性细胞明显增加, 颜色明显加深, 表明药物具有明显的抗氧化作用, 能减轻亚硝酸钠中毒引起的神经元缺氧损伤, 在体内缺氧时可能上调脑组织 Ngb 表达来增加缺氧组织的氧供或降低神经元的氧耗, 以维持大脑正常生理功能, 使脑组织对缺氧产生耐受性与适应性, 减轻脑组织损伤。

综上所述, 黄芪百合颗粒对亚硝酸钠中毒所致缺氧的保护作用机制可能是通过降低 MetHb 含量、抑制膜脂过氧化水平、改善小肠病理程度、提高 Ngb 表达来实现的。

参考文献:

[1] 刘海侠, 孙海涛, 刘晓强, 等. 亚硝酸盐中毒鲤的血液和组织病理学研究[J]. 淡水渔业, 2010, 40(3): 67-71.

[2] 赵静博, 邹文进, 付馨余. 多西环素对碱烧伤大鼠角膜炎症细胞浸润的抑制作用[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(6): 1090-1092.

[3] 杨玉捷, 杨国嵘, 薛永杰, 等. 模拟高原缺氧环境对大鼠小肠组织病理和肠黏膜通透性的影响[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2009, 18(9): 828-831.

[4] 杜显刚, 官 鹏, 陈雪梅, 等. 大鼠脑外伤后大脑皮质脑红蛋白的定量研究[J]. 中国法医学杂志, 2006, 21(3): 129-132, 194.

[5] 唐瑞华, 刘满珍, 陈益元. 亚硝酸钠中毒及解救的合理方案研究[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(10): 96.

[6] 巫光宏, 初志战, 何 平, 等. 亚硝酸盐急性中毒小鼠肝损伤机理探讨[J]. 食品科学, 2009(7): 229-232.

[7] 梁 敏, 吴多志. 亚甲蓝对体内过氧亚硝酸阴离子的清除作用[J]. 中国热带医学, 2007, 7(9): 1556-1558.

[8] Zhang G X, Kimura S, Murao K, *et al.* Role of neuronal NO synthase in regulating vascular superoxide levels and mitogen-activated protein kinase phosphorylation[J]. *Cardiovasc Res*, 2009, 81(2): 389-399.

[9] 蒋 涛, 但 炜. 自由基与颅脑损伤的关系研究现状[J]. 医学综述, 2013, 19(15): 2728-2732.

[10] Tsoi E M, Kovalenko R I, Kuzmin D A. Comparative-physiological study of leukocyte participation in initiation of lipid peroxidation during nitrite intoxication in rats and muskrats[J]. *J Evolut Biochem Physiol*, 2008, 44(4): 476-483.

[11] 任 非, 龚淑英, 智丽敏, 等. 黄芪治疗缺血性脑损伤的有效性[J]. 中国临床康复, 2006, 10(3): 149-151.

[12] 贾瑞喆, 蒋 犁, 乔立兴, 等. 黄芪对新生鼠乏氧缺血脑损伤海马区神经保护作用的研究[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(12): 1174-1177.

[13] 罗林明, 裴 刚, 覃 丽, 等. 中药百合化学成分及药理作用研究进展[J]. 中药新药与临床药理, 2017, 28(6): 824-837.

[14] Zhou Q, Yin Z P, Ma L, *et al.* Free radical-scavenging activities of oligomeric proanthocyanidin from *Rhodiola rosea* L. and its antioxidant effects *in vivo* [J]. *Nat Product Res*, 2014, 28(24): 2301-2303.

[15] 岳星星, 谢春毅, 陶晓瑜. 红景天苷干预心血管系统药理研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(3): 130-133.

[16] 罗定强, 程新萍, 乔蓉霞, 等. 小丛红景天总黄酮抗缺氧作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(7): 1722-1723.

[17] 吴惠君, 欧金龙, 池晓玲, 等. 陈皮药理作用研究概述[J]. 实用中医内科杂志, 2013, 27(17): 91-92.

[18] 汪隐蛟, 林海峰. 脑红蛋白在缺血缺氧性脑损伤中保护机制的研究进展[J]. 中国微侵袭神经外科杂志, 2015, 20(3): 142-144.