

· 论 著 ·

缺血后处理对大鼠小肠缺血-再灌注损伤的保护作用*

袁勇¹, 郭皓², 张毅¹, 甘平¹, 周东¹, 陈嘉勇^{1△}

(1. 昆明医学院附属第二医院 650101; 2. 昆明医学院附属甘美医院 650011)

摘要:目的 探讨缺血后处理(IPo)对大鼠小肠缺血-再灌注损伤的保护作用。方法 40 只健康无特殊病原体级雄性 SD 大鼠随机分为 4 组。S 组:假手术组;IR 组:缺血-再灌注组,夹闭肠系膜上动脉(SMA)45 min,再灌注 2 h;IPr 组:缺血预处理组,分离 SMA 后给予 3 个循环的缺血及再灌注各 2 min 处理余同 IR 组;IPo 组:缺血后处理组,夹闭 SMA 45 min,给予 3 个循环的再灌注及缺血各 2 min 处理后再灌注 2 h。再灌注结束时切取小肠行病理分析;ELISA 法检测血清 IL-1 β 、IL-6、IL-10 及 TNF- α ;计数肠外组织细菌易位菌落数(CFU/g)。结果 病理损伤 Chiu's 评分 IPr 组和 IPo 组明显低于 IR 组($P < 0.05$);与 IR 组比较,IPr 组和 IPo 组血清 IL-1 β 、IL-2、IL-6 及 TNF- α 明显降低($P < 0.05$),而 IL-10 升高($P < 0.05$);细菌易位 S 组没有发现菌落,IPr 组和 IPo 组菌落数明显少于 IR 组。结论 缺血后处理可减轻大鼠小肠黏膜缺血-再灌注损伤,抑制促炎性因子释放并能抑制细菌易位。

关键词: 小肠;再灌注损伤;大鼠;缺血后处理

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.24.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)24-2410-03

Protective effect of ischemic postconditioning on the intestinal ischemia-reperfusion in rats*

Yuan Yong¹, Guo Hao², Zhang Yi¹, Gan Ping¹, Zhou Dong¹, Chen Jiayong^{1△}

(1. Department of Emergency, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650101, China; 2. Department of Cardiology, Calmette Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650011, China)

Abstract: **Objective** To investigate protective effect and mechanism of ischemic postconditioning on the rat model of intestinal ischemia-reperfusion. **Methods** Forty healthy SPF male rats were randomly divided into four groups. The sham group, which underwent a laparotomy and dissection of superior mesenteric artery(SMA) before the peritoneal cavity was closed; the IR group, undergoing mesenteric ischemia(45 minutes) and reperfusion(two hours); the IPr group, three cycles of ischemia alternated with three cycles of reperfusion lasting two minutes each were performed before 45 minutes ischemia and 120 minutes reperfusion; and the IPo group, undergoing ischemia(45 minutes) and reperfusion(two hours) (before the beginning of reperfusion, three cycles of reperfusion alternated with three cycles of ischemia lasting two minutes each were performed. At the end of procedure, the intestinal morphometric study was measured by Chiu's classification, the TNF- α , IL-1 β , IL-6 and IL-10 in serum were measured by ELISA and the colony forming units/g(CFU/g) were counted. **Results** The degree of pathological impaired of small intestine in IPr and IPo groups were lighter than IR group($P < 0.05$). The IPr and IPo rats had enhancement of IL-10 and suppressed production of serum TNF- α , IL-1 β and IL-6, compared to IR group rats($P < 0.05$). The E. coli DH5 α was hardly detected in the S group. And the levels of bacterial translocation in the IR group were higher than those of IPr and IPo groups($P < 0.05$). **Conclusion** The IPo has a positive effect on lessening intestinal mucosa injury, on inhibiting secretion of proinflammatory cytokines, and reducing levels of the bacterial translocation.

Key words: intestine, small; reperfusion injury; rats; ischemic postconditioning

小肠是对缺血-再灌注(ischemia/reperfusion, IR)损伤最敏感的器官之一^[1]。引起小肠 IR 损伤的疾病常见于急性肠系膜缺血性疾病、各种小肠梗阻、小肠移植、新生儿坏死性小肠结肠炎、腹部损伤以及休克等病理情况^[2]。小肠 IR 损伤不仅诊断困难,而且目前也没有一种有效的治疗手段,在临床中小肠 IR 损伤可以导致全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),甚至多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),发病率及病死率高^[3]。有临床统计表明,患者一旦诊断为小肠 IR 损伤后其病死率在 60%~80%^[4]。因此,研究小肠 IR 损伤的治疗方法具有重要的临床意义。

1986 年 Murry 等^[5]提出在缺血性心肌疾病中缺血预处理(ischemic preconditioning, IPr)可以保护心肌缺血-再灌注损伤的作用,而且也有研究表明 IPr 能减轻小肠缺血-再灌注损伤,然而,由于 IPr 需要在组织缺血前进行干预,而在临床工作中当患者就诊时往往已经发生了组织的缺血性病损,使其临床应

用价值受到了一定的限制。Zhao 等^[6]于 2003 年首先提出了缺血后处理(ischemic postconditioning, IPo)理论,在心肌缺血后再灌注开始前交替给予数个循环短暂的再灌注和缺血处理之后全面恢复再灌注,能对缺血-再灌注损伤的心肌产生有效的保护作用。然而,目前 IPo 对小肠缺血-再灌注损伤的研究很少被报道,其保护机制也没有具体阐明。本组通过建立大鼠小肠缺血-再灌注损伤模型,研究 IPo 对小肠缺血-再灌注损伤的保护作用,以期对小肠缺血-再灌注损伤的治疗提供一种新的手段。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 健康成年雄性大鼠 40 只(购买于郑州大学实验动物中心),体质量 280~320 g,饲养于昆明医学院无特殊病原体(specific-pathogen free, SPF)级标准动物饲养中心,室温为(18 \pm 4) $^{\circ}$ C,给予标准鼠食喂养。大鼠实验得到昆明医学院伦理委员会的批准。

1.2 大肠杆菌绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)

表 1 各实验组血清 IL-1 β 、IL-6、IL-10 及 TNF- α 的变化($\bar{x}\pm s$)

组别	n	IL-1 β	IL-6	IL-10	TNF- α
S 组	10	195.52 \pm 52.26 \blacklozenge	259.89 \pm 89.41 \blacklozenge	359.38 \pm 76.32 \blacklozenge	53.82 \pm 8.94 \blacklozenge
IR 组	10	601.29 \pm 58.33 \triangle	567.25 \pm 69.62 \triangle	126.06 \pm 50.37 \triangle	575.02 \pm 50.56 \triangle
IPr 组	10	468.52 \pm 52.79	424.16 \pm 60.89	652.41 \pm 53.74	115.53 \pm 16.89
IPo 组	10	501.34 \pm 54.53	494.29 \pm 60.34	657.51 \pm 39.77	146.56 \pm 27.07

\blacklozenge : $P < 0.05$, 与 IR、IPr、IPo 组比较; \triangle : $P < 0.05$, 与 IPr 组及 IPo 组比较。

标记 选用非致病性大肠埃希杆菌(E. coli DH5 α)为实验菌种, 该菌种由昆明医学院微生物教研室提供。用于标记的具有氨苄青霉素抗性的绿色荧光蛋白质购自美国 Invitrogen 公司。细菌标记采用 CaCl₂ 法使细菌成为感受态, 然后应用热休克法导入绿色荧光蛋白质粒。含有氨苄青霉素的培养基筛选菌落后在肉汤培养基内培养成浓度为 7.5 \times 10⁶/mL 的细菌悬浮液。

1.3 动物模型的建立及分组 40 只健康成年雄性 SD 大鼠随机分为 4 组: 假手术组(S 组)、缺血-再灌注损伤组(IR 组)、缺血预处理组(IPr 组)和缺血后处理组(IPo 组), 每组 10 只。每组均在实验前 2 h 给予 GFP 标记的大肠杆菌悬浮液 2 mL 灌胃, 应用乌拉坦 200 mg/kg 进行腹腔内麻醉。S 组取腹正中切口 3 cm, 辨清肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA), 进行分离而不夹闭后关腹; IR 组分离 SMA 后以微动脉夹夹闭 45 min 后取出微动脉夹, 给予再灌注 2 h; IPr 组在分离 SMA 后给予 3 个循环各 2 min 的缺血及再灌注处理, 然后夹闭 SMA 45 min 后再进行再灌注 2 h; IPo 组分离 SMA 并夹闭 45 min 后给予 3 个循环各 2 min 的再灌注及缺血处理, 然后再进行再灌注 2 h。

1.4 标本取材及制作 在再灌注 2 h 结束时收集并制作标本, 取静脉血 2 mL 离心后取血清应用酶联免疫吸附测定法(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 IL-1 β 、IL-2、IL-6 及 TNF- α ; 切取距回盲部 10 cm 处小肠组织 0.5 cm 进

行固定及 HE 染色; 处死大鼠后取 0.1 mL 门静脉血及肠系膜淋巴结、肝脏、脾脏和肺组织各 0.1 g, 分别进行匀浆后均匀涂布于含有氨苄青霉素的琼脂培养基内培养 24 h, 计数细菌菌落数(CFU/g)。

1.5 统计学处理 应用 SPSS12.0 软件进行统计分析, 计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用单因素方差分析、 q 检验、秩和检验和 Kruskal-Wallis H 秩和检验法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清 IL-1 β 、IL-6、IL-10 及 TNF- α 检测 血清 ELISA 检测结果显示, 促炎症反应因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 在 IR 组中明显高于其他各组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), IPr 组及 IPo 组较 S 组也显著升高($P < 0.05$); 而抑制炎症反应的因子 IL-10 在 IR 组中显著低于 IPr 组及 IPo 组($P < 0.05$); 各因子在 IPr 组及 IPo 组两组间差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

表 2 各组别病理切片 Chiu 氏评分($\bar{x}\pm s$)

组别	n	Chiu 氏评分
S 组	10	0.00 \pm 0.00 \blacklozenge
IR 组	10	3.50 \pm 0.85 \triangle
IPr 组	10	2.50 \pm 1.08
IPo 组	10	2.30 \pm 0.96

\blacklozenge : $P < 0.05$, 与 IR、IPr、IPo 组比较; \triangle : $P < 0.05$, 与 IPr 组及 IPo 组比较。

表 3 各组织器官细菌易位细菌菌落数($\bar{x}\pm s$, CFU/g)

组别	n	淋巴结	肝	肺	脾	门静脉
S 组	10	1.20 \pm 1.03 \blacklozenge	0.00 \pm 0.00 \blacklozenge	0.00 \pm 0.00 \blacklozenge	0.00 \pm 0.00 \blacklozenge	2.00 \pm 2.58 \blacklozenge
IR 组	10	25.10 \pm 3.41 \triangle	20.50 \pm 3.03 \triangle	25.50 \pm 3.92 \triangle	15.20 \pm 3.01 \triangle	19.90 \pm 3.70 \triangle
IPr 组	10	11.40 \pm 2.91	11.70 \pm 2.62	10.50 \pm 2.27	7.50 \pm 1.96	11.30 \pm 2.98
IPo 组	10	8.90 \pm 2.60	9.80 \pm 2.44	10.50 \pm 2.72	9.80 \pm 2.25	7.60 \pm 2.22

\blacklozenge : $P < 0.05$, 与 IR、IPr、IPo 组比较; \triangle : $P < 0.05$, 与 IPr 组及 IPo 组比较。

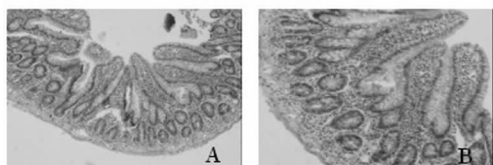
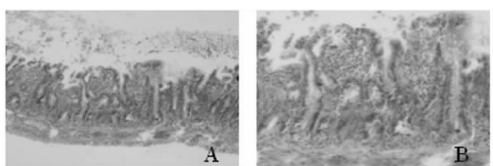


图 1 S 组正常小肠组织学表现(分级 0 级)(HE 染色 A \times 100, B \times 200)

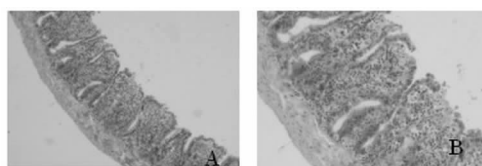


小肠绒毛脱落, 肠间可见大量脱落细胞碎屑, 黏膜完整性破坏, 大量白细胞浸润及出血(分级 4 级)。

图 2 IR 组组织学表现(HE 染色 A \times 100, B \times 200)

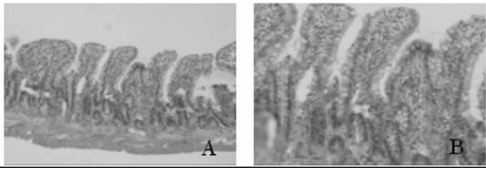
2.2 病理检测 各组病理切片进行 HE 染色, 采用双盲法由昆明医学院病理教研室进行评分。评分采用小肠损伤 Chiu 氏分级。S 组为正常的小肠切片表现; 在其他各实验组小肠黏膜均有不同程度的损伤, 病变以 IR 组中最为严重(表 2), 各组组织学表现见图 1~4。

2.3 标记细菌易位检测 计数菌落直径大于 2 mm 的细菌菌落数。在 S 组内几乎没有菌落数; IR 组计数的菌落数明显多于其他各组($P < 0.05$), 见表 3。



小肠绒毛顶端部分细胞脱落, 内皮细胞排列紊乱, 间质内有出血及白细胞浸润(分级 3 级)

图 3 IPr 组组织学表现(HE 染色 A \times 100, B \times 200)



小肠绒毛顶端少部分细胞脱落,细胞排列尚整齐,少量白细胞浸润,无出血表现(分级 2 级)。

图 4 IPo 组组织学表现(HE 染色 A×100, B×200)

3 讨论

小肠 IR 损伤是指在各种病理情况下,小肠由于有效血液循环不足引起小肠的缺血性损伤,当解除缺血、恢复有效循环灌注时,小肠将进一步遭受再灌注损伤,再灌注损伤的程度远远超过缺血性损伤^[7]。研究显示,一旦小肠发生缺血-再灌注损伤,将不可避免地引起小肠吸收功能障碍。而且认为小肠对营养物质的摄入不足与该病的病死率相关^[8-9]。在一些严重病例,如坏死性小肠炎以及缺血-再灌注损伤后小肠切除所致的短肠综合征,小肠的吸收功能障碍更为明显,而且直接影响患者的预后^[10]。小肠缺血-再灌注损伤可以使小肠黏膜屏障受损,大量的细菌及其毒素穿过小肠黏膜到达肠系膜淋巴结以及肠外远处器官,如肝脏、脾脏、肺等器官,从而引起远处器官的结构及功能的改变,严重者引起 SIRS,或发展成为 MODS^[3]。Cucchetti 等^[11] 研究显示在小肠移植患者中发生细菌易位的比率高达 46.4%。发生细菌易位的主要原因是小肠黏膜屏障受损导致其通透性增高,细菌及其毒素容易透过黏膜屏障^[12];另一主要原因则认为由于小肠缺血-再灌注损伤时大量的细菌繁殖以及宿主免疫系统遭到破坏,而使得细菌能大量易位于肠外组织及器官^[13]。同时小肠缺血-再灌注损伤将破坏机体的免疫系统,产生大量的炎症因子及氧自由基。当细胞因子入血后可以引起 SIRS,从而损害远处器官的正常结构及功能,使得多个器官发生功能不全。例如可以引起肺功能不全而出现急性呼吸窘迫综合征^[14]。因此小肠被认为是 MODS 的“发动机”^[15]。

小肠 IR 损伤的诊断和治疗都很困难,而且预后较差,具有很高的病死率^[4]。因此,在腹部外科临床中小肠 IR 损伤的诊治仍然是一个亟待解决的难题。国内有研究采用药物治疗本病具有一定的保护作用,但其机制不甚清楚^[16]。本研究通过建立大鼠小肠 IR 损伤模型,应用 IPo 方法研究其对小肠损伤的保护作用。实验结果显示:(1)IPo 能减少炎症因子 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 的释放,刺激抗炎因子 IL-10 的释放,从而减轻机体的炎症反应;(2)IPo 对 IR 损伤的小肠黏膜具有一定的保护作用,病理切片损伤分级统计显示在 IPo 明显减轻小肠黏膜 IR 损伤的程度;(3)IPo 能有效地抑制肠内正常细菌向肠外组织器官的易位。实验采用 GFP 标记的非致病性大肠杆菌作为条件致病菌,也获得小肠 IR 损伤导致细菌易位的直接证据。因此,本组认为 IPo 的保护作用机制可能是通过保护小肠黏膜的完整性,维持正常黏膜屏障,从而抑制了细菌及其毒素透过黏膜屏障,也进一步减轻了机体的炎症反应。实验中也显示 IPo 和 IPr 均能对小肠 IR 损伤具有一定的保护作用,鉴于 IPr 在临床工作中很难实施,因此 IPo 被认为是一种有效的治疗方法,具有更好的临床应用前景。

参考文献:

[1] Mojzis J, Hviscova K, Germanova D, et al. Protective

effect of quercetin on ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal injury in rats[J]. *Physiol Res*, 2001, 50(5): 501-506.

- [2] Mallick IH, Yang W, Winslet MC, et al. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury[J]. *Dig Dis Sci*, 2004, 49(9): 1359-1377.
- [3] Choi HS, Jung KH, Lee SC, et al. Bovine colostrum prevents bacterial translocation in an intestinal ischemia/reperfusion-injured rat model[J]. *J Med Food*, 2009, 12(1): 37-46.
- [4] Yasuhara H. Acute mesenteric ischemia; the challenge of gastroenterology[J]. *Surg Today*, 2005, 35(3): 185-195.
- [5] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia; a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. *Circulation*, 1986, 74(5): 1124-1136.
- [6] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion; comparison with ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 285(2): 579-588.
- [7] Stallion A, Kou TD, Miller KA, et al. IL-10 is not protective in intestinal ischemia reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2002, 105(2): 145-152.
- [8] Rajeevprasad R, Alavi K, Schwartz MZ. Glucagonlike peptide-2 analogue enhances intestinal mucosal mass and absorptive function after ischemia-reperfusion injury[J]. *J Pediatr Surg*, 2000, 35(11): 1537-1539.
- [9] Sileri P, Morini S, Schena S, et al. Intestinal ischemia/reperfusion injury produces chronic abnormalities of absorptive function[J]. *Transplant Proc*, 2002, 34(3): 984.
- [10] Scolapio JS, Fleming CR. Short bowel syndrome[J]. *Gastroenterol Clin North Am*, 1998, 27(2): 467-479.
- [11] Cucchetti A, Siniscalchi A, Bagni A, et al. Bacterial translocation in adult small bowel transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(4): 1325-1330.
- [12] 李琳, 张楠, 解基良, 等. 肠缺血-再灌注大鼠模型肠黏膜上皮细胞凋亡的观察[J]. *山东医药*, 2007, 47(33): 37-38.
- [13] Tascilar N, Irkorucu O, Tascilar O, et al. Bacterial translocation in experimental stroke: what happens to the gut barrier[J]. *Bratisl Lek Listy*, 2010, 111(4): 194-199.
- [14] Kuzu MA, Koksoy C, Kuzu I, et al. Role of integrins and intracellular adhesion molecule-1 in lung injury after intestinal ischemia-reperfusion[J]. *Am J Surg*, 2002, 183(1): 70-74.
- [15] Grootjans J, Lenaerts K, Derikx JP, et al. Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized; experiences from a new translational model[J]. *Am J Pathol*, 2010, 176(5): 2283-2291.
- [16] 史洪涛, 邓志龙, 冷恩仁. 谷参肠安对缺血-再灌注家兔肠道的保护作用[J]. *重庆医学* 2002, 31(2): 96-97.

(收稿日期: 2011-01-09 修回日期: 2011-03-22)