

· 论 著 ·

高渗盐水联合牛磺酸预处理对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用*

王玉彬¹, 巴彩凤^{2△}

(1. 辽宁医学院附属第一医院普外科, 辽宁锦州 121001; 2. 辽宁医学院实验动物中心, 辽宁锦州 121001)

摘要:目的 探讨高渗盐水联合牛磺酸预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及其作用机制。方法 将 30 只 SD 大鼠随机等分为 5 组:假手术组(A组)、缺血再灌注组(B组)、高渗盐水预处理组(C组)、牛磺酸预处理组(D组)和高渗盐水联合牛磺酸预处理组(E组)。参照 Pringle 法建立大鼠肝脏缺血再灌注损伤模型。再灌注 6 h 后检测血清谷丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)水平,并在光镜下观察肝组织病理学的改变和肝脏的原位细胞凋亡的变化。结果 缺血再灌注 6 h 后血清 ALT、AST、LDH 和 MDA 水平比较,B、C、D 和 E 组明显高于 A 组($P < 0.01$),C、D 和 E 组明显低于 B 组($P < 0.01$),C 组和 D 组明显高于 E 组($P < 0.05$);血清 SOD 水平比较,A、C、D 和 E 组明显高于 B 组($P < 0.01$),E 组明显高于 C 组和 D 组($P < 0.01$);肝组织病理学显示 B 组损害最重,C、D 组次之,E 组最轻。TUNEL 法检测细胞凋亡显示大鼠肝细胞凋亡率,B、C、D 和 E 组明显高于 A 组($P < 0.01$),C、D 和 E 组明显低于 B 组($P < 0.01$)。结论 高渗盐水和牛磺酸联合应用可以改善大鼠肝脏缺血再灌注损伤。

关键词:盐水,高渗;牛磺酸;再灌注损伤;肝脏

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.31.005

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)31-3132-02

Protective effect of hypertonic saline and taurine on hepatic ischemia reperfusion injury in rats*

Wang Yubin¹, Ba Caifeng^{2△}

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Experimental Animal Center, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: Objective To study the protective effect and its mechanism of hypertonic saline and taurine pretreatment on hepatic ischemia reperfusion injury (HIRI) in rats. Methods Thirty healthy adult male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups ($n=6$), sham operation group (A), IR group (B), hypertonic saline pretreatment group (C), taurine pretreatment group (D), hypertonic saline and taurine pretreatment group (E). HIRI model was replicated according to Pringle's method. The level of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in serum were measured; The histopathological changes of liver and apoptosis of hepatocytes were observed by light microscopies and TUNEL method, respectively. Results Serum level of ALT, AST, LDH and MDA in group B, C, D and E were significantly higher than those in group A ($P < 0.01$); in group C, D and E were significantly lower than in group B ($P < 0.01$), but the level of SOD were significantly higher than in group B ($P < 0.01$). Conclusion Hypertonic saline combined with taurine can protect liver from ischemia reperfusion.

Key words: saline solution, hypertonic; taurine; reperfusion injury; liver

肝脏缺血再灌注损伤是肝脏疾病常见的病理过程,其影响因素是多方面的,对其机制及防治措施的研究具有重要的临床意义。肝脏缺血再灌注以后,线粒体呼吸功能和磷酸化功能显著降低,引起线粒体脂质过氧化损伤,从而形成脂质过氧化物,其中较为重要的是丙二醛(malondialdehyde, MDA)。脂质过氧化消耗超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽(GSH)。SOD在机体氧化与抗氧化损伤的平衡中起至关重要作用,并可造成线粒体内SOD和GSH下降,使线粒体抗氧化系统活性下降。由于高渗盐水具有抗炎作用,可以减少氧自由基(ORF)产生,而且牛磺酸是ORF清除剂,ORF是造成脂质过氧化的主要因素,同时引起细胞内钙离子(Ca^{2+})超载,是肝缺血再灌注损伤的主要机制;国内郑鸿伟等^[1]实验研究发现联合应用高渗盐水和牛磺酸治疗失血性休克效果优于单纯应用高渗盐水或牛磺酸,其机制可能与高渗盐水能够阻止细胞内牛磺酸丧失和(或)促进牛磺酸摄入有关。因此设计此实验,

研究高渗盐水联合牛磺酸预处理对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及可能作用机制,为临床应用提供可靠依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂 健康雄性SD大鼠30只,体质量250~280g,由辽宁医学院实验动物中心提供。牛磺酸购于上海伟进生物科技有限公司;MDA、SOD、细胞凋亡试剂盒购于南京建成生物工程研究所。

1.2 动物模型制备和分组 大鼠术前禁食12h,自由饮水。腹腔麻醉,切开腹壁,分离切断肝脏周围韧带,显露肝门,参照Pringle法建立大鼠肝脏缺血再灌注损伤模型。将30只健康雄性SD大鼠随机等分为5组,每组6只,假手术组(A组),仅行麻醉和肝脏分离,不钳夹肝脏血管;缺血再灌注组(B组),阻断肝血流前5min自阴茎背静脉缓慢注射的0.9%氯化钠注射液(10 mL/kg),按上述方法建立缺血再灌注损伤模型;高渗盐水预处理组(C组),阻断肝血流前5min自阴茎背静脉缓慢注

射 7.5%氯化钠注射液(5 mL/kg),余同 B 组;牛磺酸预处理组(D 组),阻断肝血流前 5 min 自阴茎背静脉缓慢注射 100 mg/mL 的牛磺酸(250 mg/kg),余同 B 组;高渗盐水联合牛磺酸预处理组(E 组),阻断肝血流前 5 min 自阴茎背静脉缓慢注射牛磺酸和 7.5%氯化钠注射液,余同 B 组。所有动物均在再灌注后 6 h 后处死,收集血清及肝脏组织进行检测。

1.3 指标检测及方法

1.3.1 血清的测定 处死大鼠后开腹自腹主动脉取血 2 mL,3 000 r/min,离心 10 min,用日立 7600 型全自动生化分析仪测定血清谷丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase,AST)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)。用牛代巴比妥酸比色法测定血清 MDA,黄嘌呤氧化酶法测定血清 SOD。

1.3.2 病理组织切片的制作与观察 取 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm 大小肝左叶组织,置于体积分数 10%甲醛溶液中固定,浸蜡,包埋,修整蜡块并用组织切片机切取厚度 4~6 μm 切片若干。显微镜下观察。

1.3.3 肝细胞凋亡检测 用末端标记法(TUNEL)法行肝组织切片凋亡细胞的原位检测(按试剂盒说明书进行)每张片随机取 5 个 250 倍视野,用计算机图像处理系统分析凋亡细胞率。计算公式:凋亡细胞阳性率=棕黄或棕褐色细胞数/细胞总数×100%。

1.4 统计学分析 采用 SPSS11.5 软件分析各组数据,所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析和 *q* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ALT、AST、LDH 测定结果 肝脏缺血再灌注 6 h 后 B、C、D 和 E 组血清 ALT、AST、LDH 水平明显高于 A 组(*P* < 0.01);C、D 和 E 组明显低于 B 组(*P* < 0.01);C 组和 D 组明显高于 E 组(*P* < 0.05);C 组和 D 组之间比较,差异无统计学意义(*P* > 0.05),见表 1。

表 1 各组血清 ALT、AST、LDH 水平($\bar{x} \pm s, U/L, n=6$)

组别	ALT	AST	LDH
A 组	60.25±7.07	180.32±8.47	983.25±65.10
B 组	583.87±45.14 ^a	2160.29±59.88 ^a	3992.67±124.45 ^a
C 组	363.77±30.46 ^{abc}	1301.94±65.38 ^{abc}	1763.11±81.86 ^{abc}
D 组	370.14±34.30 ^{abc}	1289.57±73.39 ^{abcd}	1721.56±91.16 ^{abcd}
E 组	197.57±40.09 ^{ab}	986.85±51.86 ^{ab}	1336.24±86.45 ^{ab}

^a:*P* < 0.01,与 A 组比较;^b:*P* < 0.01,与 B 组比较;^c:*P* < 0.05,与 E 组比较;^d:*P* > 0.05,与 C 组比较。

2.2 血清 MDA、SOD 测定结果 肝脏缺血再灌注 6 h 后 B、C、D 和 E 组血清 MDA 水平明显高于 A 组(*P* < 0.01),C、D 和 E 组血清 MDA 水平明显低于 B 组(*P* < 0.01);C、D 和 E 组血清 SOD 水平明显高于 B 组(*P* < 0.01);C 组和 D 组 MDA 水平明显高于 E 组(*P* < 0.05),但血清 SOD 水平明显低于 E 组(*P* < 0.01);C 组和 D 组之间无明显差异(*P* > 0.05),见表 2。

2.3 病理组织学观察结果 光镜下 A 组肝小叶结构完整,肝窦通畅,见封 2 图 1;B 组肝小叶结构破坏,肝血窦严重狭窄,甚至闭塞,并可见大部分肝细胞呈颗粒样及空泡样变性、坏死,见封 2 图 2;C 和 D 组可见肝小叶结构完整,肝血窦内轻度淤血,部分肝细胞肿胀,可见少量肝细胞点状坏死,见封 2 图 3;E 组可见肝小叶结构完整,肝血窦内轻度淤血,少部分肝细胞肿胀,

未见肝细胞坏死,见封 2 图 4。

2.4 肝细胞凋亡检测结果 缺血再灌注 6 h 后, A 组偶见凋亡细胞, B 组可见大量凋亡细胞, C 和 D 组可见少量凋亡细胞, 较 B 组明显减少, E 组可见散在凋亡细胞, 较 C、D 组明显减少。A、B、C、D 和 E 组细胞凋亡率分别为 (7.33±1.42)%、(37.93±1.14)%、(15.31±1.11)%、(14.43±0.95)% 和 (10.06±1.13)%。经统计学处理, B、C、D 和 E 组细胞凋亡率明显高于 A 组(*P* < 0.01); C、D 和 E 组细胞凋亡率明显低于 B 组(*P* < 0.01); C 组和 D 组细胞凋亡率明显高于 E 组(*P* < 0.05); C 组和 D 组之间比较, 差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

表 2 各组血清 MDA、SOD 水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	MDA(mmol/L)	SOD(U/L)
A 组	7.95±2.16	83.19±3.10
B 组	51.87±8.21 ^a	47.66±4.31 ^a
C 组	32.33±6.66 ^{abc}	66.93±3.50 ^{abc}
D 组	29.51±6.54 ^{abcd}	68.21±3.12 ^{abcd}
E 组	18.28±4.03 ^{ab}	76.72±4.06 ^{ab}

^a:*P* < 0.01,与 A 组比较;^b:*P* < 0.01,与 B 组比较;^c:*P* < 0.05,与 E 组比较;^d:*P* > 0.05,与 C 组比较。

3 讨论

郑鸿伟等^[1]实验研究发现联合应用高渗盐水和牛磺酸治疗失血性休克效果优于单纯应用高渗盐水或牛磺酸,其机制可能与高渗盐水能够阻止细胞牛磺酸丧失和(或)促进牛磺酸摄入有关。本实验研究结果也证实,在肝脏缺血前联合应用高渗盐水和牛磺酸预处理后血清 ALT 较高渗盐水和牛磺酸组明显减轻,病理切片也显示肝细胞损伤减轻,说明高渗盐水联合牛磺酸治疗效果优于单纯使用高渗盐水或牛磺酸,二者可能具有协同作用。研究显示 ORF 能通过脂质过氧化物的分解产物引起细胞损伤^[2];SOD 对机体氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,此酶能清除 ORF,保护细胞免受损伤^[3]。本实验结果显示肝脏缺血前联合应用高渗盐水和牛磺酸预处理后血清 MDA 水平较高渗盐水和牛磺酸组明显降低,而 SOD 水平则明显升高,由此可见高渗盐水和牛磺酸联合应用可能协同产生降低 ORF 的作用,减轻肝细胞受 ORF 攻击的损伤程度。另有研究表明,再灌注后细胞内 ORF 含量增多是细胞发生凋亡的重要诱因^[4-5]。本实验结果也显示,高渗盐水联合牛磺酸组肝细胞凋亡程度较高渗盐水和牛磺酸组明显减轻,进一步说明二者联合应用降低 ORF 的作用增强。在肝脏缺血再灌注前进行高渗盐水预处理,具有明显减轻再灌注后肝脏中性粒细胞浸润的作用^[6]。国外有研究者通过离体实验发现小剂量高渗盐水在失血性患者中早期应用,能降低中性粒细胞的细胞毒性,抑制炎症介质的释放,减少中性粒细胞在肝脏和肺脏的积累,减轻中性粒细胞对肝脏和肺脏的损伤^[7-8]。上述研究显示高渗盐水具有抗炎作用,可以减少 ORF 产生,而且牛磺酸是 ORF 清除剂,二者联合应用可能有效抑制 ORF。通过对本实验结果分析证实高渗盐水联合牛磺酸后可有效降低 ORF。因为 ORF 是造成脂质过氧化的主要因素,同时引起细胞内 Ca²⁺ 超载,是造成肝缺血再灌注损伤的主要机制。因此二者联合有效降低 ORF 的作用可能是减轻肝缺血再灌注损伤的主要原因。综上所述,本实验研究结果显示,高渗盐水联合牛磺酸预处理,可以协同减轻肝脏缺血再灌注损伤。其机制可能是通过协同作用有效降低 ORF,抑制脂质过氧化以(下转第 3137 页)

关。Waltenberger 等^[14]用大鼠心脏同种移植模型研究 TGF- β_1 的表达, 结果发现, 移植心脏在发生慢性排斥时 TGF- β_1 生物活性明显升高, TGF- β_1 mRNA 水平也明显升高。

本研究中, 对照组与实验组相比, 4 种蛋白的表达均显著性增加, 说明对照组的缺血-再灌注损伤更重, 炎症反应也更强烈。实验组由于用益生注射液治疗, 可使缺血-再灌注损伤减轻, 从而使炎症反应减轻; 另外, 益生注射液中的 A 成分具有免疫抑制作用, 可抑制 T、B 淋巴细胞和巨噬细胞的增殖, 也可减轻炎症反应。对照组中 TGF- β_1 明显升高, 可能是其迅速发生移植器官失功能病理变化的重要原因。

综上所述, 益生注射液对缺血-再灌注损伤诱导的移植心脏慢性失功能加快模型的干预可能是通过对移植心脏血管内皮细胞的保护作用来实现的。其具体的机制为减轻缺血-再灌注损伤, 减少或避免内皮细胞活化, 抑制炎症级联反应的发生。

参考文献:

- [1] Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic renal allograft dysfunction[J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16(10): 3015-3026.
- [2] 李钺, 龚建平, 刘长安, 等. TIMP-3 在移植慢性排斥反应血管病变中的作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(12): 1215-1217.
- [3] 李明, 严律南. 益生注射液抗大鼠移植心缺血再灌注损伤的实验研究[J]. 重庆医学, 2010, 39(23): 3197-3199.
- [4] 夏穗生. 临床移植医学[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1999.
- [5] 步宏, 陈卫国, 刘于宾, 等. 益生注射液抗大鼠腹主动脉移植硬化的实验研究[J]. 华西药学杂志, 2000, 15(3): 185.
- [6] 辛宇鹏, 袁光亚, 卢一平, 等. 缺血再灌注损伤致慢性移植

肾肾病的发病机理及药物干预的实验研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2007, 38(6): 918-923.

- [7] 辛宇鹏, 卢一平, 高锐, 等. 益生注射液延缓大鼠慢性移植肾肾病的进程[J]. 中华器官移植杂志, 2005, 26(3): 171-174.
- [8] 李明, 李幼平, 严律南. 大鼠移植心慢性失功加快模型的建立[J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31(1): 58-62.
- [9] Ono K, Lindesey ES. Improved technique of heart transplantation in rats[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1969, 57: 225.
- [10] Allison AC, Eugui EM. Mechanisms of action of mycophenolate mofetil in preventing acute and chronic allograft rejection. Transplantation[J]. 2005, 80(2 Suppl): S181-190.
- [11] Jolicoeur EM, Qi S, Xu D, et al. Combination therapy of mycophenolate mofetil and rapamycin in prevention of chronic renal allograft rejection in the rat[J]. Transplantation, 2003, 75(1): 54-59.
- [12] Azuma H, Binder J, Heemann U, et al. Effects of RS61443 on functional and morphological changes in chronically rejecting rat kidney allografts[J]. Transplantation, 1995, 59: 460-466.
- [13] 李胜富, 蒋红梅, 李幼平, 等. 益生注射液对人内皮细胞缺氧再给氧损伤的拮抗机理研究[J]. 华西医科大学学报, 2002; 33(2): 215-219.
- [14] Waltenberger J, Wanders A, Fellstrom B, et al. Induction of transforming growth factor-beta during cardiac allograft rejection[J]. J Immunol, 1993, 151(2): 1147-1157.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-05-12)

(上接第 3133 页)

及细胞内 Ca^{2+} 超载, 达到降低肝脏缺血再灌注损伤的作用, 同时降低肝细胞的凋亡程度, 稳定肝细胞膜, 改善肝脏微循环功能障碍, 减轻肝细胞损伤。但具体机制尚待进一步研究。

尽管作者在高渗盐水联合牛磺酸预处理对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用的研究中取得了一些具有说服力的资料, 可以为临床上防治肝脏缺血再灌注损伤提供可靠的依据和新的思路, 但是由于整个实验受技术、资金和时间的限制, 未能在分子、基因水平进行进一步的分析, 这也将是本研究下一阶段研究的主要目标。

参考文献:

- [1] 郑鸿伟, 张继峰, 凌世长, 等. 高渗盐水和牛磺酸在失血性休克治疗中的作用[J]. 北京医科大学学报, 1994, 26(6): 433-435.
- [2] Del Maestro RF. An approach to free radicals in medicine and biology[J]. Acta Physiol Scand, 1980, 492: 153-168.
- [3] Mizoe A, Kondo S, Azuma T, et al. Preventive effects of superoxide dismutase derivatives modified with monosaccharides on reperfusion injury in rat live transplantation

[J]. J Surg Res, 1997, 73(2): 160.

- [4] Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, et al. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat[J]. Surg Gynecol Obstet, 1990, 171(2): 120-125.
- [5] Troy CM, Shelanski ML. Down-regulation of copper/zinc superoxide dismutase causes apoptotic death in PC12 neuronal cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(14): 6384-6387.
- [6] 柯庆宏, 郑树森, 梁廷波, 等. 高渗盐水预处理可减轻中性粒细胞介导的肝脏缺血再灌注损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(7): 1326-1330.
- [7] David J, Ciesla MD, Ernest E, et al. Hypertonic saline attenuation of polymorphonuclear neutrophil cytotoxicity: timing is everything[J]. Trauma, 2000, 48: 388-395.
- [8] Angle N, Hoyt DB, Coimbra R, et al. Hypertonic Saline resuscitation diminishes lung injury by suppressing neutrophil activation after hemorrhagic shock[J]. Shock, 1998, 9(3): 164-170.

(收稿日期: 2011-03-09 修回日期: 2011-06-14)