

· 论 著 ·

肢体缺血预处理和 BQ123 药物后处理对大鼠 肢体缺血再灌注后肝损伤的影响*

赵林静^{1,2}, 王永玲², 杨保胜², 张金盈^{1△}

(1. 郑州大学第一附属医院心血管内科, 郑州 450000; 2. 新乡医学院基础医学院, 河南新乡 453003)

摘要:目的 探讨肢体缺血预处理(IPC)和 BQ123 药物后处理对大鼠肢体缺血再灌注(IR)后肝损伤的影响及机制。方法 雄性 Wistar 大鼠随机分为对照组、肢体缺血再灌注组(LIR 组)、缺血预适应组(IPC 组)和 BQ123 缺血后处理组(BQ123 组),每组 8 只。测定各组血浆内皮素-1(ET-1)、丙二醛(MDA)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)及肝组织 ET-1、MDA、髓过氧化物酶(MPO)含量,测定各组肝组织 DNA 双链百分率。结果 LIR 组与对照组比较,血浆 ET-1、MDA、ALT、AST 含量和肝组织 ET-1、MDA、MPO 含量均明显升高($P < 0.05$),DNA 双链百分率明显下降($P < 0.05$);IPC 组与 LIR 组比较,血浆 ET-1、MDA、ALT、AST 含量和肝组织 ET-1、MDA、MPO 含量均显著下降($P < 0.05$),DNA 双链百分率显著上升($P < 0.05$);BQ123 组与 LIR 组比较,血浆 ET-1、MDA、ALT、AST 含量和肝组织 ET-1、MDA、MPO 含量均显著下降($P < 0.05$),DNA 双链百分率显著上升($P < 0.05$);IPC 组与 BQ123 组上述指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 肢体 IPC 和 BQ123 药物后处理均对大鼠肢体 IR 后肝损伤有一定的保护作用,抑制 ET-1 的作用、减弱脂质过氧化和减少中性粒细胞过度活化聚集可能参与了二者的保护作用。

关键词:缺血预处理;BQ123;再灌注损伤;肝损伤;大鼠

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)28-2911-03

Both limb ischemia preconditioning and BQ123 postconditioning have protective effect on hepatic injury following hind limbs ischemia reperfusion in rats*

Zhao Linjing^{1,2}, Wang Yongling², Yang Baosheng², Zhang Jinying^{1△}

(1. Department of Vasculocardiology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, China;

2. School of Basic Medical, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To evaluate the role of limb ischemia preconditioning and BQ123 postconditioning on hepatic injury following hind limbs ischemia reperfusion in rats. **Methods** Wistar rats were divided into 4 groups ($n=8$): Control group, limbs ischemia-reperfusion group (LIR), limb ischemia preconditioning group (IPC) and BQ123 postconditioning group (BQ123). The changes of Endothelin-1 (ET-1), malondialdehyde (MDA), alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) in plasma were observed. The contents of ET-1, MDA, Myeloperoxide (MPO) and the ratio of DNA chain in liver were measured. **Results** The levels of ET-1, MDA, ALT, AST in plasma and the contents of ET-1, MDA, MPO in liver increased following LIR, the ratio of DNA chain in liver decreased ($P < 0.05$); Comparing to LIR, the levels of ET-1, MDA, ALT, AST in plasma and the contents of ET-1, MDA, MPO in liver decreased, the ratio of DNA chain in liver increased ($P < 0.05$) both in IPC group and in BQ123 group; there were no significant differences in above indexes between IPC group and BQ123 group ($P > 0.05$). **Conclusion** Both limb ischemia preconditioning and BQ123 postconditioning can attenuate liver injury following IR in the hind limbs of rats, the protective effect is perhaps related to restrain the action of ET-1, improving the aggregation of neutrophil and alleviating the damage of the lipid peroxidation.

Key words: ischemia preconditioning; BQ123; reperfusion injury; liver injury; rats

在临床上对急性心肌梗死、肢体创伤和断肢再植等紧急缺血状况的处理中,尽早恢复血流再灌注往往是首要目的。但是,往往会造成缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤。1986年 Murry 等^[1]首先提出缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)的概念,随着研究的深入其保护作用得到公认,但由于临床缺血事件的发生难以预测,使其应用受到了很大局限。2003年 Zhao 等^[2]提出了缺血后处理(ischemic postconditioning, IPO)的概念,即 IR 前反复短暂再缺血处理,可调动机体内源性保护机制,减轻缺血组织的 IR 损伤。但是由于 IPO 属于对机体的有损操作,于是药物后处理得到了愈来愈多的关注。

肝脏的血供非常丰富,新陈代谢旺盛,对 IR 损伤较为敏

感。肢体 IPC 和肢体药物 IPO 是否都对大鼠肢体 IR 后肝损伤起保护作用? 本实验用止血带法建立大鼠肢体 IR 模型,分别应用常规肢体 IPC 和 BQ123 药物 IPO,观察其作用结果并讨论,以期对肢体 IR 损伤的防治提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 雄性 Wistar 大鼠(由郑州大学动物中心提供)32 只,体质量 200~250 g,自由饮水及进食,分笼喂养。随机分为 4 组:(1)对照组;(2)肢体缺血再灌注组(limb IR, LIR 组);(3)缺血预适应组(IPC 组);(4)BQ123 缺血后处理组(BQ123 组),每组 8 只。

1.2 肢体 IR 模型复制 全部动物术前 12 h 禁食,自由饮水,采用止血带法复制大鼠肢体 IR 损伤模型:动物麻醉后以橡皮

表 1 各组大鼠血浆 ET-1、MDA、ALT 和 AST 含量比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	ET-1(pg/mL)	MDA(nmol/L)	ALT(卡门氏单位/mL)	AST(卡门氏单位/mL)
对照组	30.08±12.95	2.93±0.19	10.62±2.74	20.750±6.130
LIR 组	125.80±34.48▲	4.94±0.28▲	68.00±6.75▲	98.620±7.260▲
IPC 组	55.69±5.22▲*	3.01±0.18▲*	30.50±3.07▲*	65.375±5.553▲*
BQ123 组	61.91±14.92▲*	3.59±0.29▲*	32.28±4.11▲*	62.250±4.430▲*

▲: $P<0.05$, 与对照组比较; *: $P<0.05$, 与 LIR 组比较。

表 2 各组动物肝组织中 ET-1、MDA、MPO 和 DNA 双链百分率变化比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	ET-1(pg/mL)	MDA(nmol/mgprot)	MPO(U/g)	DNA 双链百分率(%)
对照组	34.82±5.46	1.01±0.48	1.00±0.14	77.36±6.83
LIR 组	137.67±22.01▲	3.42±0.54▲	2.09±0.42▲	47.45±8.09▲
IPC 组	54.04±8.67▲*	0.85±0.111▲*	0.64±0.10▲*	66.06±2.19▲*
BQ123 组	67.44±8.40▲*	1.12±0.46▲*	1.29±0.27▲*	61.89±9.60▲*

▲: $P<0.05$, 与对照组比较; *: $P<0.05$, 与 LIR 组比较。

带环绕结扎大鼠双后肢根部, 阻断血流 4 h 后松解, 恢复血流灌注 4 h。

1.3 分组处理 对照组双后肢松弛环绕橡皮带但不阻断血流, 其余操作同 LIR 组。LIR 组按模型操作, 再灌前 20 min 以 20% 乌拉坦(5 mL/kg) 腹腔注射麻醉, 左侧颈外静脉插管滴注生理盐水(4 mL/kg)。IPC 组用橡皮带预先阻断双后肢血流 5 min, 然后恢复血流灌注 5 min, 反复 4 次, 其后操作同 LIR 组。BQ123 组肢体再灌注前 20 min 颈外静脉滴注 BQ123 溶液, 剂量为 7 μ g/kg, 溶于生理盐水(4 mL/kg), 其余操作同 LIR 组。

1.4 标本采集及指标检测 各组动物肢体 IR 后 4 h, 腹主动脉放血处死并收集血液离心(3 500 r/min) 10 min 后取血浆, 分装入 Eppendor 管, -70°C 保存备用。取出肝脏, 滤纸吸干, 液氮速冻, -70°C 保存。取肝组织加生理盐水制备 10% 肝组织匀浆, 离心(3 500 r/min) 10 min 取上清液。按试剂盒说明书测定各组血浆内皮素-1(endothelin-1, ET-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)、谷草转氨酶(glutamic-oxaloacetic transaminase, AST)及肝组织 ET-1、MDA、髓过氧化物酶(myeloperoxide, MPO)含量, 采用二苯胺法^[3]测定各组肝组织 DNA 双链百分率。ET-1 试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所, MDA、MPO、ALT 和 AST 试剂盒购自南京建成生物制品公司。主要仪器: JN-A 型扭力天平、722 分光光度计、FSH-II 高速电动匀浆器和 SN-695B 型智能放免 γ 测量仪。

1.5 统计学处理 实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 统计软件分析, 采用单因素方差分析作统计学处理, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组血浆 ET-1、MDA、ALT 和 AST 含量变化 LIR 组与对照组比较, 血浆 ET-1、MDA、ALT 和 AST 含量均明显升高($P<0.05$); IPC 组与 LIR 组比较, 血浆 ET-1、MDA、ALT 和 AST 含量均显著下降($P<0.05$); BQ123 组与 LIR 组比较, 血浆 ET-1、MDA、ALT 和 AST 含量均显著下降($P<0.05$); IPC 组与 BQ123 组上述指标差异比较无统计学意义($P>0.05$), 具体数值见表 1。

2.2 各组肝组织 ET-1、MDA、MPO 和 DNA 双链百分率的变化 LIR 组与对照组比较, 肝组织 ET-1、MDA 和 MPO 含量

均明显升高($P<0.05$), DNA 双链百分率明显下降($P<0.05$); IPC 组与 LIR 组比较, 肝组织 ET-1、MDA 和 MPO 含量均显著下降($P<0.05$), DNA 双链百分率则显著上升($P<0.05$); BQ123 组与 LIR 组比较, 肝组织 ET-1、MDA 和 MPO 含量均显著下降($P<0.05$), DNA 双链百分率则显著上升($P<0.05$); IPC 组与 BQ123 组上述指标比较差异无统计学意义($P>0.05$)。具体数值见表 2。

3 讨 论

随着 2005 年 Kerendi 等^[4]提出了远程 IPO 即心脏远隔器官(如肾脏、小肠和肢体)可减轻心肌的 IR 损伤后, IPO 受到了越来越多的关注, Thibault 等^[5]的临床实验证实了远程 IPO 的保护作用, 国内最新临床研究^[6]也认为肢体 IPO 可有效减轻心肌 IR 损伤。远程 IPO 的器官选择方面, 对位于机体末端的肢体进行 IPO 操作简便安全, 与肾脏、小肠等内脏器官相比可能有着更深远的临床意义。肢体 IPO 已经在心脏^[7]、脑^[8-9]的 IR 实验中被证明是有保护作用的, 但是由于操作本身对机体造成损伤, 所以, 越来越多的学者着眼于药物 IPO, 已有瑞芬太尼^[10]、红花注射液^[11]和吗啡^[12]等多种药物 IPO 被证明对 IR 损伤有保护作用。近年来, 关于肢体 IR 损伤的动物实验以有创的手术法为多, 即切开皮肤、钝性分离和游离股动脉后, 直接丝线扎闭或是动脉夹夹闭股动脉造成下肢的 IR。但是止血带法具有操作简单和无手术创伤等优点, 在作者前期实验中经平均动脉压监测、多普勒血流仪监测血流及活体动物观察, 证实此法具有一定的可靠性和可行性。临床对患者单侧大腿止血带加压充气加压阻断血流减轻肺 IR 损伤的研究^[13]也证实了这一点。本实验通过止血带法建立大鼠肢体 IR 模型, 分别进行肢体 IPC 和 BQ123 药物 IPO, 观察对大鼠肢体 IR 后肝损伤的作用。

内皮素(ET)作为血管内皮细胞分泌的具有强烈缩血管作用的血管活性物质, 在 IR 损伤的研究中受到了很多关注, 其中 ET-1 的活性及缩血管作用最强。肝脏具有 2 套供血系统, 是机体最富血管内皮的实质性器官, 因此, 可产生大量 ET-1。ET-1 作为体内最强的缩血管物质, 能使肝窦持续收缩, 窦内压增高, 导致微循环障碍。有研究认为^[14]微循环障碍在肝 IR 损伤的发生中有重要作用, 并最终决定肝损伤程度。实验中 BQ123 是特异性 ETA 受体阻断剂, 可以直接阻断 ETA 受体

活性。哺乳动物中存在 ETA 和 ETB 2 种内皮素受体,在肝脏主要由 ETA 受体介导血管收缩。有文献记载^[15] ET-1 和 ETB 受体间有高度亲和力,ETB 受体可在 ETA 受体被阻断后捕获 ET-1 并将其灭活。BQ123 组血浆及肝组织 ET-1 含量下降,可能与以上原因有关。本实验观察到 LIR 组 ALT 和 AST 升高,DNA 双链百分率下降,提示肝损伤后细胞损伤和胞浆酶大量漏出。BQ123 组和 IPC 组分别与 IR 组比较,血浆 ET-1 和肝组织 ET-1 含量均明显下降而肝损伤指标明显改善,提示 2 种处理方法均对肝脏有保护作用,通过抑制 ET-1 的生理学作用可能是二者共同的保护机制之一,但其深入的作用机制还有待进一步研究。

自由基由于其极强的氧化能力和活泼的化学性质,其引发的脂质过氧化被认为是 IR 损伤的重要原因。丙二醛(MDA)性质稳定,是自由基攻击膜性成分多不饱和脂肪酸的终产物,此外,还可以进一步引起蛋白质、磷脂和核酸的交联而加重组织损伤,测试 MDA 的含量可以反映机体脂质过氧化程度,间接反映细胞损伤程度^[16]。IPC 的保护机制之一可能是通过减少自由基引起的脂质过氧化,在肾脏 IPC^[17]和肢体 IPC^[18]的研究中均发现其保护作用与减少自由基的产生及 MDA 含量有关,并且在临床 IPC 研究中^[13]也得到了证实。同样在 IPO 的研究中,许多实验^[19]也表明减少自由基产生和减轻脂质过氧化也参与了其保护作用。本实验中 LIR 组与对照组比较,血浆和肝组织 MDA 含量均明显升高,提示脂质过氧化可能参与了肝损伤过程,BQ123 组和 IPC 组分别与 IR 组比较,血浆 MDA 含量均明显降低,提示肢体 IPO 和 BQ123 药物 IPO 对肝损伤的保护作用可能和减轻肝细胞脂质过氧化有关。

参考文献:

- [1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74(5): 112-115.
- [2] 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*, 2003, 285(2): 579-588.
- [3] 庞战军, 周玫, 陈媛. 自由基医学研究方法 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 308-313.
- [4] Kerendi F, Kin H, Halkos ME, et al. Remote postconditioning. Brief renal ischemia and reperfusion applied before coronary artery reperfusion reduce myocardial infarctsize via endogenous activation of denosine receptors [J]. *Basic Res Cardiol*, 2005, 100(3): 404-407.
- [5] Thibault H, Piot C, Staat P, et al. Long term benefit of postconditioning [J]. *Circulation*, 2008, 117(8): 1037-1044.
- [6] 吴万里, 潘朝铤, 吴显儒, 等. 肢体缺血后处理对直接冠状动脉介入治疗心肌再灌注损伤的干预研究 [J]. *临床心血管病杂志*, 2011, 27(3): 186-189.
- [7] Walsh SR, Nouraei SA, Tang TY. Remote ischemic preconditioning for cerebral and cardiac protection during carotid endarterectomy: results from a pilot randomized clinical trial [J]. *Vasc Endovascular Surg*, 2010, 44(6): 434-439.
- [8] Ren C, Yan Z, Wei D, et al. Limb remote ischemic post conditioning protects against focal ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 2009, 1281(1): 88-94.
- [9] 赵瑾, 李杨, 黄磊, 等. 肢体缺血后适应对小鼠脑缺血再灌注损伤的影响及机制 [J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(6): 1096-1101.
- [10] Wong GT, Li R, Jiang LL, et al. Remifentanyl post-conditioning attenuates cardiac ischemia-reperfusion injury via kappa or delta opioid receptor activation [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2010, 54(4): 510-518.
- [11] 王栋, 赵恒珂, 孙银贵, 等. 红花注射液后处理对大鼠缺血再灌注心肌的保护作用探讨 [J]. *临床合理用药*, 2011, 4(1): 24-26.
- [12] Chen Z, Li T, Zhang B. Morphine postconditioning protects against reperfusion injury in the isolated rat hearts [J]. *J Surg Res*, 2008, 145(2): 287-294.
- [13] Lin LN, Wang LR, Wang WT, et al. Ischemic preconditioning attenuates pulmonary dysfunction after unilateral thigh tourniquet-induced ischemia-reperfusion [J]. *Anesth Analg*, 2010, 111(2): 539-543.
- [14] Uhlmann D, Pietsch U, Stefan L, et al. Assessment of hepatic ischemia-reperfusion injury by simultaneous measurement of tissue PO₂, PCO₂, and PH [J]. *Micro Res*, 2004, 67(1): 38-47.
- [15] 金惠铭. 细胞分子病理生理学 [M]. 郑州: 郑州大学出版社, 2002: 231-239.
- [16] Kandilci HB, Gumusel B, Topaloglu E, et al. Effects of ischemic preconditioning on rat lung: role of nitric oxide [J]. *Exp Lung Res*, 2006, 32(7): 287-303.
- [17] 李东北, 刘仁光, 朱明星, 等. 远程后处理合并 ATP 后处理对大鼠缺血再灌注心肌保护作用 [J]. *广东医学*, 2010, 31(14): 1786-1788.
- [18] 张兴华, 李春梅, 马晓静, 等. 肢体与心肌缺血后处理对兔急性心肌缺血再灌注损伤的对比研究 [J]. *中华医学杂志*, 2006, 86(7): 841-845.
- [19] Wang T, Leng YF, Zhang Y, et al. Preventive effects of ischemic postconditioning and eneyclldine hydrochloride on gastric against ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2011, 91(6): 1130-1135.

(收稿日期: 2012-02-29 修回日期: 2012-04-22)

《重庆医学》——中文核心期刊, 欢迎投稿, 欢迎订阅!