

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.27.002

## N-乙酰-L-色氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注后肠损伤的保护作用\*

王淑惠<sup>1</sup>,姜红心<sup>2</sup>,李晓双<sup>2</sup>,胡梦琪<sup>3</sup>,于海<sup>2</sup>,张明<sup>2</sup>,于树娜<sup>2</sup>,王健欣<sup>2</sup>,蒋吉英<sup>2△</sup>

(1. 潍坊医学院临床医学院 2013 级 17 班,山东潍坊 261053;2. 潍坊医学院人体解剖学教研室,山东潍坊 261053;3. 潍坊医学院临床医学院 2013 级 7 班,山东潍坊 261053)

**[摘要]** **目的** 探讨 N-乙酰-L-色氨酸(L-NAT)对大鼠肝脏缺血再灌注中肠损伤的保护作用。**方法** 将健康成年雄性 SD 大鼠 24 只分为假手术组(Sham 组)、缺血再灌注组(IR 组)和缺血再灌注加 L-NAT 组(IR+L-NAT 组)。用夹闭肝中叶和左叶肝蒂分支的方法制作肝缺血再灌注模型,用苏木素-伊红(HE)染色法观察小肠组织的形态学结构,用免疫组织化学染色观察激活型 Caspase-3、Bax、Bcl-2 的表达。**结果** (1)IR 组小肠绒毛结构破坏,肠黏膜充血脱落,上皮细胞变性坏死,出现炎症细胞浸润;L-NAT 可使之减轻。(2)免疫组织化学染色显示,与 Sham 组相比,IR 组激活型 Caspase-3、Bcl-2 和 bax 的表达升高,L-NAT 干预后,Caspase-3 和 Bax 的表达下降,而 Bcl-2 的表达进一步升高。**结论** L-NAT 可抑制肝脏缺血再灌注损伤引起的小肠上皮细胞凋亡,减轻小肠上皮细胞损伤。

**[关键词]** 缺血再灌注损伤;小肠;N-乙酰-L-色氨酸;细胞凋亡;大鼠**[中图分类号]** R657.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)27-3748-04

## Protective effect of N-acetyl-L-tryptophan on intestinal damage after rat hepatic ischemia reperfusion\*

Wang Shuhui<sup>1</sup>, Jiang Hongxin<sup>2</sup>, Li Xiaoshuang<sup>2</sup>, Hu Mengqi<sup>3</sup>, Yu Hai<sup>2</sup>, Zhang Ming<sup>2</sup>, Yu Shuna<sup>2</sup>, Wang Jianxin<sup>2</sup>, Jiang Jiying<sup>2△</sup>

(1. Class 17 of Grade 2013, Clinical Medical College, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China; 2. Teaching and Researching Section of Anatomy, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China; 3. Class 7 of Grade 2013, Clinical Medical College, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the protective effects of N-acetyl-L-tryptophan (L-NAT) on intestinal damage after rat hepatic ischemia reperfusion. **Methods** Twenty-four healthy adult rats were divided into the sham operation group (Sham), ischemia reperfusion group (IR), ischemia reperfusion and N-acetyl-L-tryptophan group (IR+L-NAT). The hepatic ischemia reperfusion model was established by occluding the afferent vessels of the left and middle lobes. The morphological structures of the small intestine were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The expressions of active caspase-3, Bax and Bcl-2 were detected by immunohistochemistry staining. **Results** (1) In the IR group, the structure of intestinal villis was destroyed, the intestinal mucosa showed congestion and exfoliation, the epithelial cells had degeneration and necrosis, and infiltration of inflammatory cells appeared; which could be alleviated by L-NAT. (2) The immunohistochemistry showed that compared with the Sham group, the expression of active caspase-3, Bcl-2 and Bax in the IR group was increased, after L-NAT intervention, the Bax and caspase-3 expression was decreased, while the Bcl-2 expression was further increased. **Conclusion** L-NAT could inhibit the apoptosis of small intestinal epithelial cells caused by liver ischemic reperfusion and attenuates intestinal epithelial damage.

**[Key words]** ischemia-reperfusion injury; small intestine; N-acetyl-L-tryptophan; apoptosis; rat

在近代肝脏外科手术中,肠道损伤是常见的病理生理现象,手术中肝门阻断可造成门静脉淤血致肠黏膜屏障破坏,肠黏膜通透性增高,引发肠内毒素及菌群移位,加重肝脏缺血再灌注损伤,形成恶性循环<sup>[1-2]</sup>,从而影响手术的成功率和患者的存活率。有研究发现,P 物质(substance P, SP)通过 SP/NK-1 系统参与了心、脑、肝、胰、肺、结肠等多种内脏器官的氧化应激损伤<sup>[3-7]</sup>。N-乙酰-L-色氨酸(N-acetyl-L-tryptophan, L-NAT)具有拮抗 NK-1 受体的作用<sup>[8]</sup>,但对肝脏缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)后小肠上皮细胞损伤的保护作用尚未见报道。本研究通过建立肝脏 IR 模型,探讨 L-NAT 对肠损伤的保护作用,为开发治疗肝脏 IR 后肠损伤的新药提供实

验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物的分组、动物模型的制备和药物预处理** 健康成年雄性 SD 大鼠 24 只,购自山东鲁抗制药有限公司,体质量 200~250 g。分为假手术组(Sham 组)、IR 组、IR 加 L-NAT 组(IR+L-NAT 组),每组 8 只。实验动物术前禁食 12 h,自由饮水。用 1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔注射麻醉,上腹部正中切口,游离肝门血管,无创血管夹夹至肝左叶、中叶肝蒂的分支 30 min,夹闭后肝的颜色由红色变为暗紫红色,表明模型制作成功。在 30 min 后去除血管夹复流形成再灌注,逐层关腹。6 h 后开腹取小肠中段组织。IR+L-NAT 组在制备 IR 模型前

\* 基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2010HM006;ZR2014HL020;ZR2014HL021);山东省教育厅资助课题(J11LF14);山东省医药卫生科技发展计划资助课题(2014WS0464);潍坊医学院科技创新研究基金资助项目(K1301001);潍坊医学院大学生科技创新基金资助项目(KX20150091);2015 年地方高校国家级大学生创新创业训练计划(201510438010;201510438007)。作者简介:王淑惠(1994-),本科,主要从事肝损伤研究。△ 通信作者,E-mail:jiangjiying2002@163.com。

30 min 腹腔注射 10 mg/kg L-NAT, 其他处理同 IR 组。Sham 组仅行麻醉开腹分离至左叶、中叶的入肝管道, 但不阻断肝血流。

1.2 取材与切片 取部分大鼠小肠组织, 生理盐水冲洗肠粪便物, 组织置于多聚甲醛(4 g/L)固定, 48 h 后梯度浓度蔗糖沉底过夜, 冰冻切片(厚 10 μm), 常规染色。

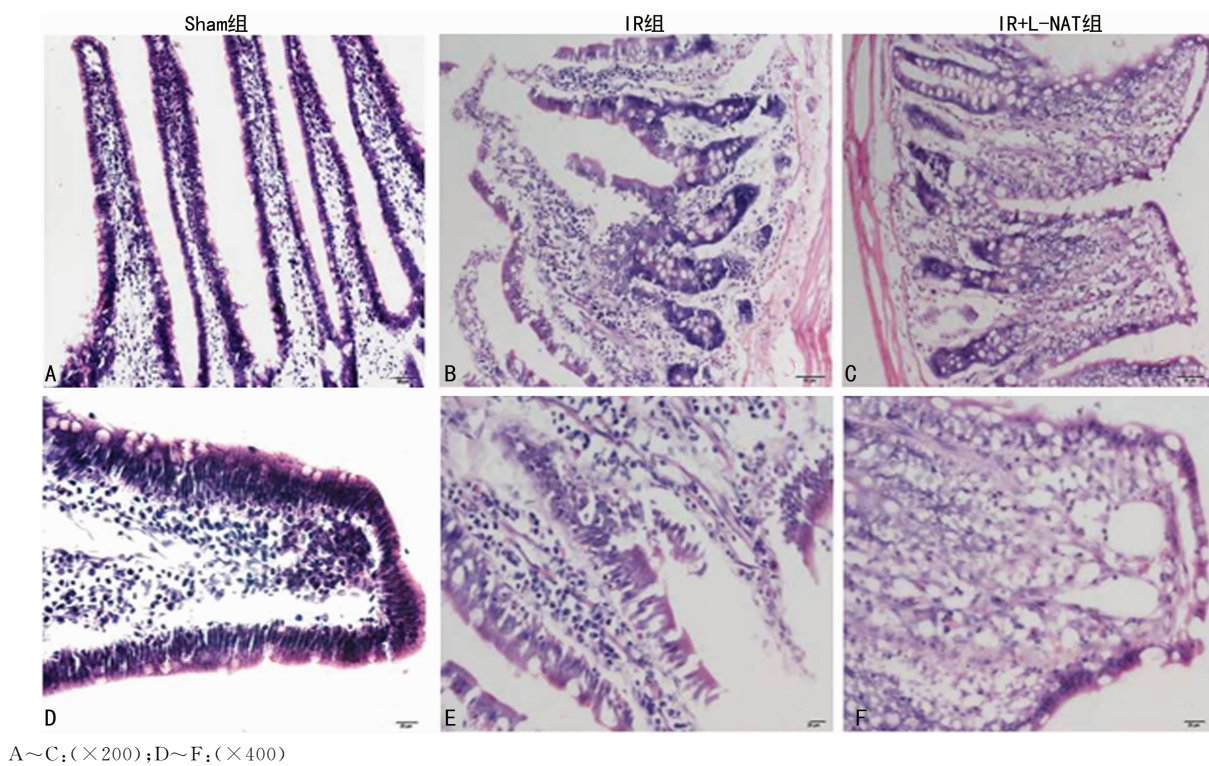
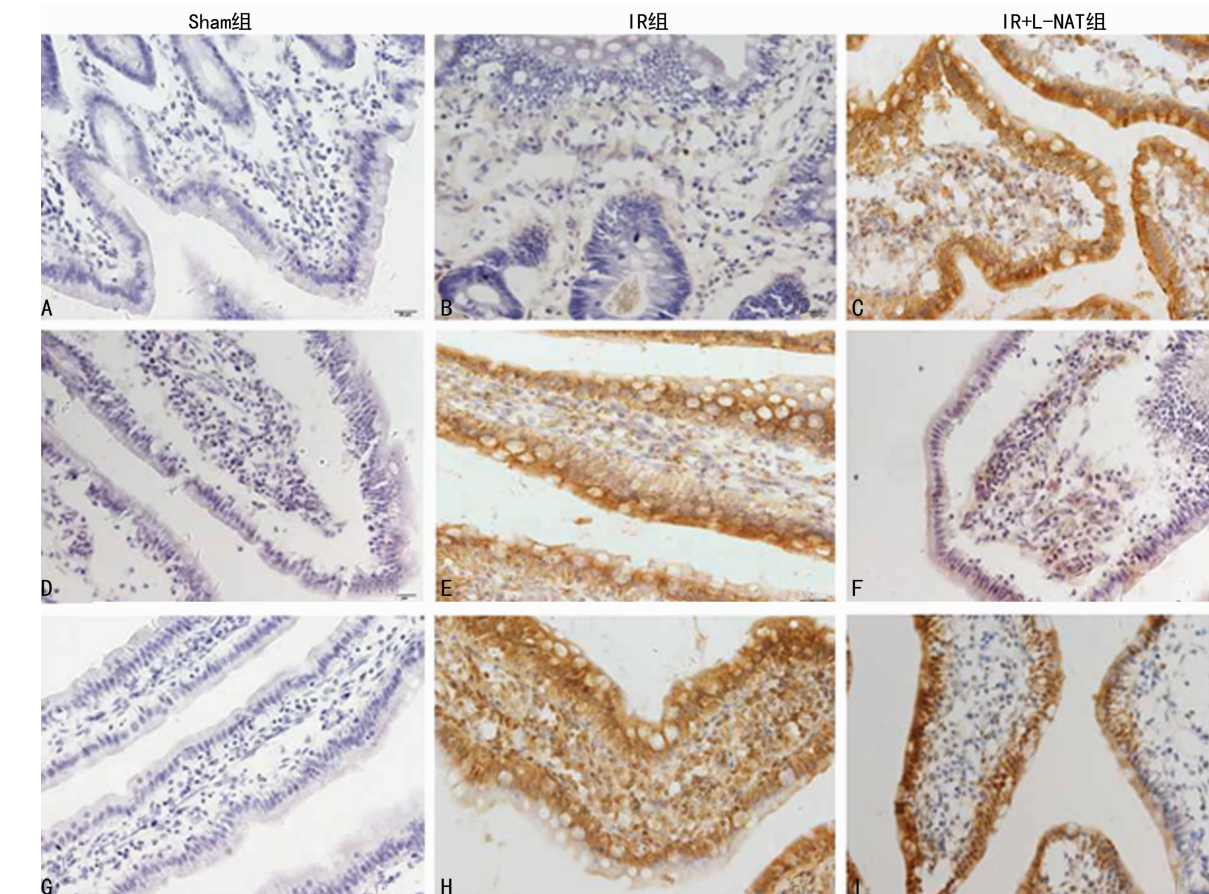


图 1 小肠上皮细胞的形态变化(HE 染色)



A~C: Bcl-2; D~F: Bax; G~I: Caspase-3

图 2 免疫组织化学染色显示 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 在小肠上皮细胞中的表达(×400)



**1.3 HE 染色** 常规冰冻切片, HE 染色, 在光学显微镜下观察小肠绒毛和上皮细胞的变化。

**1.4 免疫组织化学染色** 采用 SP 法进行 Caspase-3 (Cell Signaling, 1:200)、Bcl-2 (Santa Cruz, 1:200)、Bax (Santa Cruz, 1:200) 免疫组织化学染色, 以 PBS 代替一抗做阴性对照。

## 2 结果

**2.1 小肠光镜病理观察** HE 染色显示, Sham 组肠绒毛完整, 排列整齐, 隐窝结构明显。IR 组肠绒毛结构破坏严重, 绒毛顶部大量脱落破裂, 溃疡严重, 上皮细胞变性坏死, 大量炎性细胞浸润, 肠壁各层出现出血, 隐窝结构破坏。IR+L-NAT 组形态变化明显减轻, 小肠绒毛基本完整, 小肠绒毛上皮细胞轻度水肿, 有少量炎性细胞浸润 (图 1)。

**2.2 免疫组织化学 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 的表达** 免疫组织化学染色显示, 免疫组织化学阳性信号可不同程度表达于小肠黏膜上皮细胞中, 呈棕黄色或黄褐色颗粒, 其中, Bax 在细胞质表达, Bcl-2 在细胞质和细胞膜表达, Caspase-3 在细胞核表达。Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 在 Sham 组均无表达。IR 组 Caspase-3、Bax、Bcl-2 等阳性细胞数量均明显增多。与 IR 组比较, L-NAT 干预后 Caspase-3 与 Bax 的表达减弱, Bcl-2 表达增加 (图 2)。

## 3 讨论

肝脏是人体最大的实质性器官, 血供比较丰富。在肝脏移植、处理严重肝创伤等手术时, 为减少术中出血, 经常需要阻断肝门, 而重新恢复血液供应则可造成肝脏的缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI)<sup>[9]</sup>。近年来有研究表明, 肝脏缺血缺氧使大量  $Ca^{2+}$  进入细胞内造成钙超载, 促使黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤氧化酶, 为氧自由基的产生提供催化剂。肝脏缺血缺氧时, 肝细胞的无氧酵解, 会使酸性代谢产物堆积过多, pH 值降低, 而灌注后 pH 值的改变, 则会促进细胞死亡, 加重缺血再灌注损伤 (IRI); 同时, 肝脏中的 kupffer 细胞被激活并释放大量的毒性介质, 干扰 DNA 的逆转录过程, 使细胞内具有酶活性的蛋白质失活, 细胞发生严重的功能代谢紊乱, 导致肝脏发生严重损伤<sup>[10-11]</sup>。另有研究表明, 肝脏 IR 不仅影响肝脏结构和生理功能, 还参与多种远隔器官的缺血/缺氧损伤<sup>[12]</sup>。张东江等<sup>[13]</sup>发现, 随 HIRI 发生时间延长, 肾小球、肾小管细胞发生水肿坏死, 出现严重肾功能不全表现。赵磊等<sup>[14]</sup>发现发生 HIRI 后肺泡腔完整性被破坏, 间隔明显增厚, 肺泡上皮细胞变性坏死, 并伴有肺水肿。杨进城等<sup>[15]</sup>发现肝脏 IR 后, 肾脏、胰腺、心脏中测得 SOD 活性下降及 MDA 水平升高, 提示 HIRI 可诱发多器官功能障碍综合征 (MODS)<sup>[16]</sup>。

当肝门被阻断后, 门静脉的反流与入肝血量明显减少, 在加重肝脏缺血的同时, 不可避免的造成了肠道的淤血损伤, 出现小肠黏膜屏障破坏, 肠黏膜通透性增高, 造成细菌移位, 形成内毒素和菌血症<sup>[17]</sup>。当重新恢复血流后, 内毒素随血液回流入肝脏, 进而加重 HIRI。肝门阻断后门脉回流受阻导致肠道淤血损伤, 当肝脏再灌注时毒性物质又可经血液流经肠道, 导致肠道的双重损害<sup>[18]</sup>。因此, 肠道被誉为是外科手术的“中心器官”。有学者发现, 肝门阻断后小肠会出现淤血性损伤<sup>[19]</sup>。周吉安等<sup>[20]</sup>发现由于小肠绒毛发卡式结构的存在, 其顶部黏膜层细胞易出现脱落坏死、线粒体肿胀和细胞连接松弛。赵佐庆等<sup>[21]</sup>发现犬小肠在 IR 后肠黏膜淋巴细胞、中性粒细胞等炎性细胞数量增多, 同时 Bax、c-Fos 基因表达增多, 提示小肠 IRI 与细胞凋亡密切相关。综上所述, 在肝脏缺血手术中保持肠黏

膜完整性, 减少肠道的损伤具有重要的意义。

细胞凋亡是 IR 中细胞死亡的重要方式, 而线粒体途径是凋亡的主要途径。Bcl-2 家族和 Caspase 家族在线粒体途径中有极为重要的调控作用。Caspase-3 在促进细胞凋亡中起关键作用, 是内源性细胞凋亡和外源性细胞凋亡共同的效应分子, 可启动细胞凋亡, 从而形成 Caspases 依赖性的细胞凋亡<sup>[22]</sup>。Bcl-2 家族中 Bax、Bcl-2 是目前已知的与细胞凋亡密切相关的功能相对立的基因。研究表明, 抗凋亡基因 Bax 和促凋亡基因 Bcl-2 的比例可影响细胞凋亡的状态, 即当 Bcl-2 与 Bax 比值增高时, 促进细胞存活, 否则促进细胞凋亡<sup>[23]</sup>。Bcl-2、Bax 作为上游调控基因可改变线粒体膜的通透性, 控制下游 Caspase-3 蛋白酶的活性和 Cyt-c 的释放。线粒体释放的 Cyt-c 与 Apaf-1、dATP 结合形成凋亡体, 并招募 pro-Caspase-9 使其激活为活性 Caspase-9, 后者又可激活 Caspase-3, 促进细胞凋亡<sup>[24-27]</sup>。由此可见, 在细胞程序性死亡中, Cyt-c 发挥最后通路的作用。本实验发现, 与 IR 组比较, IR+L-NAT 组 Caspase-3 与 Bax 表达减弱, Bcl-2 表达增强, Caspase-3 的表达降低。说明 L-NAT 可以通过抑制 Cyt-c 从线粒体向胞质中释放, 减少活化型 Caspase-3 的表达, 从而减少细胞的凋亡。

研究表明, P 物质是一个由 11 个氨基酸组成的多肽, 它作为一种兴奋性胃肠肽大量分布在肠道的肌间神经丛和黏膜下神经丛。P 物质通过与 NK-1 受体结合, 刺激肠黏膜分泌水和电解质, 加快离子转运, 导致肠管扩张, 通透性增加, 同时诱导细胞表达 TNF- $\alpha$  和分泌 TNF- $\alpha$  调节炎性细胞因子<sup>[3]</sup>。朱金照等<sup>[26]</sup>发现, 肝衰竭时小肠的功能减弱与 P 物质的分布有一定的关系。L-NAT 是 P 物质特异性受体 NK-1 的拮抗剂, 是由美国 FDA 批准的用于治疗恶心、呕吐和精神病变的药物。有学者已证实 L-NAT 对新生鼠脑缺血缺氧具有保护作用<sup>[27-28]</sup>, 但对肝脏缺血后肠损伤的保护作用未见报道。本研究通过肝门阻断法完全阻断肝脏血流, 制备肝脏 IR 模型。研究发现 Sham 组肠绒毛完整, 排列整齐。IR 组肠绒毛结构破坏严重, 顶部绒毛大量脱落破裂, 上皮细胞变性坏死, 大量炎性细胞浸润。而 IR+L-NAT 组形态变化明显减轻, 小肠绒毛基本完整, 较 IR 组有较大改善。因此可以说明 L-NAT 对肝脏缺血后肠损伤具有保护作用。

## 参考文献

- [1] 李斌, 钱海鑫. 肝脏缺血再灌注损伤中的肠黏膜屏障功能障碍[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2013, 19(3): 348-350.
- [2] Unno N, Uchiyama T, Yamamoto N, et al. Portal triad occlusion induces endotoxin tolerance; role of portal congestion[J]. J Surg Res, 2006, 135(2): 213-217.
- [3] 熊观瀛, 林琳, 赵志泉. P 物质与肠易激综合征[J]. 国外医学内科学分册, 2003, 30(6): 245-248.
- [4] Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, et al. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000, 279(6): 1298-1306.
- [5] Kramer JH, Spurney C, Iantorno M, et al. Neurogenic inflammation and cardiac dysfunction due to hypomagnesemia[J]. Am J Med Sci, 2009, 338(1): 22-27.
- [6] Zhu J, Xu W, Wang J, et al. The neurokinin-1 receptor modulates the methamphetamine-induced striatal apopto-

- sis and nitric oxide formation in mice[J]. *J Neurochem*, 2009, 111(3):656-668.
- [7] Li PC, Lai IJ, Lin YC, et al. Substance P scavenger enhances antioxidant defenses and prevents prothrombotic effects on the rat lung after acute exposure to oil smoke [J]. *J Biomed Sci*, 2009, 16(1):58-68.
- [8] Macleod AM, Merchant KJ, Brookfield F, et al. Identification of L-tryptophan derivatives with potent and selective antagonist activity at the NK1 receptor[J]. *J Med Chem*, 1994, 37(9):1269-1274.
- [9] Heneghan MA, Sylvestre PB. Cholestatic diseases of liver transplantation[J]. *Semin Gastrointest Dis*, 2001, 12(2):133-147.
- [10] 王生兰. 肝缺血再灌注损伤的机制及药物的保护作用[J]. *青海医学院学报*, 2005, 26(1):63-66.
- [11] 千年松, 帝振宇, 陶开山. 肝脏缺血再灌注损伤的发生机制研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2009, 17(8):1589-1592.
- [12] 郑德义, 王毅, 杜娇, 等. 小鼠肠缺血再灌注诱发多器官功能障碍的动物模型研究[J]. *贵阳医学院学报*, 2015, 40(4):346-348, 355.
- [13] 张东江, 王红梅, 张建龙. 大鼠肝缺血再灌注损伤时肾功能不全发生机制探讨[J]. *新疆医科大学学报*, 2008, 31(12):1664-1666, 1670.
- [14] 赵磊, 杨拔贤, 马瑞云, 等. 肝缺血再灌注后肺损伤机制及乌司他丁保护作用的实验研究[J]. *中华普通外科杂志*, 2006, 21(9):672-675.
- [15] 杨进城, 季锡清, 李朝龙, 等. 肝缺血再灌注损伤早期对其他脏器的影响[J]. *第一军医大学学报*, 2004, 24(9):1019-1022.
- [16] Harward TR, Brooks DL, Flynn TC, et al. Multiple organ dysfunction after mesenteric artery revascularization[J]. *J Vasc Surg*, 1993, 18(3):459-467.
- [17] Tüfek A, Tokgöz O, Aliosmanoglu I, et al. The protective effects of dexmedetomidine on the liver and remote organs against hepatic ischemia reperfusion injury in rats[J]. *Int J Surg*, 2013, 11(1):96-100.
- [18] Liu DL, Jeppsson B, Hakansson CH, et al. Multiple-system organ damage resulting from prolonged hepatic inflow interruption[J]. *Arch Surg*, 1996, 131(4):442-447.
- [19] 陈笑, 毛羽, 王植平. 肝门阻断对大鼠小肠形态学的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2004, 21(2):229-229.
- [20] 周京安, 李宁. 肠道耐受淤血-再灌注损伤的安全时限观察[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2010, 26(3):339-344.
- [21] 赵佐庆, 朱文侠, 张志培. 犬小肠缺血再灌注后 NO 和 SOD 的改变及免疫细胞凋亡基因的表达[J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24(18):1700-1703.
- [22] 董雅洁, 高维娟. bcl-2, bax, caspase-3 在细胞凋亡中的作用及其关系[J]. *中国老年学杂志*, 2012, 32(21):4828-4830.
- [23] Tsujimoto Y. Cell death regulation by the Bcl-2 protein family in the mitochondria[J]. *J Cell Physiol*, 2003, 195(2):158-167.
- [24] Hastak K, Gupta S, Ahmad N, et al. Role of p53 and NF-kappaB in epigallocatechin-3-gallate - induced apoptosis of LNCaP cells [J]. *Oncogene*, 2003, 22(31):4851-4859.
- [25] Reed JC. Mechanisms of apoptosis [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157(5):1415-1430.
- [26] 朱金照, 饶俊伟, 黎环, 等. 肝衰竭大鼠小肠 P 物质、生长抑素的形态学变化[J]. *临床消化病杂志*, 2014, 26(4):212-214.
- [27] 蒋吉英, 姜桂兰, 李磊, 等. N-乙酰-L-色氨酸具有对新生鼠脑缺血/缺氧损伤的保护作用[J]. *解剖学报*, 2011, 42(4):451-455.
- [28] 于树娜, 王志芳, 杜晓东, 等. N-乙酰-L-色氨酸减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导小鼠海马神经元细胞凋亡[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(4):423-428.

(收稿日期:2016-11-05 修回日期:2017-05-21)

(上接第 3747 页)

- 10(6):337-343.
- [3] Yoshinari O, Shiojima Y, Igarashi K. Anti-obesity effects of onion extract in Zucker diabetic fatty rats[J]. *Nutrients*, 2012, 4(10):1518-1526.
- [4] Huang KP, Huang J, Xie X, et al. Sirt1 resists advanced glycation end products-induced expressions of fibronectin and TGF-beta 1 by activating the Nrf2/ARE pathway in glomerular mesangial cells[J]. *Free Radical Biol Med*, 2013, 65(65):528-540.
- [5] Emma F, Montini G, Parikh SM, et al. Mitochondrial dysfunction in inherited renal disease and acute kidney injury [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12(5):267-280.
- [6] 李栋, 林珊. 氧化应激与糖尿病肾病[J]. *中国实用医药*, 2008, 43(6):138-139.
- [7] Kao TC, Shyu MH, Yen GC. Glycyrrhizic acid inhibit inflammation via PI3K/Akt/GSK3beta signaling and glucocorticoid receptor activation[J]. *Food Chem*, 2010, 58(15):8623-8629.
- [8] 卢梦玲, 闫超, 赖多, 等. CyclinD1 与细胞周期调控[J]. *生物技术通报*, 2011, 43(10):55-59.
- [9] 毛志敏, 黄燕如, 万毅刚, 等. 糖尿病肾病肾组织氧化应激的调控机制及中药的干预作用[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(19):3707-3712.
- [10] 剧孟磊, 左洋洋, 赖宇雄, 等. 线粒体活性氧——糖尿病肾病进展的中心环节[J]. *中华肾脏病杂志*, 2015, 31(11):866-869.
- [11] Chen J, Zhou Y, Mueller-Steiner S, et al. SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-κB signaling [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(48):40364-40374.
- [12] Kong XX, Wang R, Liu XJ, et al. Function of SIRT1 in physiology[J]. *Biochemistry (Mosc)*, 2009, 74(7):703-708.

(收稿日期:2016-11-21 修回日期:2017-04-09)