

褪黑素对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用

张笑春^{1,2}, 张瑞明¹, 陈文斌³, 苏宁², 胡熙芳², 谢维敢²

(1. 内蒙古医学院附属第一医院 普外科, 内蒙古 呼和浩特 010059; 2. 内蒙古包头市中心医院 影像中心, 内蒙古 包头 014040; 3. 解放军第二六四医院 普通外科, 山西 太原 030001)

摘要:探讨褪黑素(MEL)对肝脏缺血再灌注损伤(IRI)的保护作用,在大鼠肝脏热缺血再灌注模型缺血前30 min腹腔注射MEL(10 mg/kg),缺血45 min后恢复血流灌注,并于灌注2 h, 24 h后心腔取血测定血清天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(AKP),同时取肝组织行病理组织学检查及细胞凋亡检测。结果缺血再灌注组(IR组)AST, ALT, AKP及肝细胞凋亡数均明显高于正常对照组(N组)($P < 0.01$),褪黑素预处理组(MEL组)则明显低于IR组($P < 0.05$),而高于N组($P < 0.01$ 或 0.05)。MEL组肝脏病理组织学改变明显轻于IR组,重于N组。提示MEL对肝缺血再灌注损伤具有保护作用。

关键词:肝缺血;再灌注损伤;褪黑素;疾病模型,动物

中图分类号:R619.9; R575

文献标识码:B

肝脏缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)是直接影响肝脏外科手术成败的关键因素之一。因此寻求保护肝脏,防止或减轻肝IRI的方法成为研究焦点。褪黑素(melatonin, MEL)是松果体分泌的神经内分泌激素,具有抗氧化、抗毒性、抗应激及抗炎作用^[1,2]。MEL对脑、心肌、肾脏、视网膜等的IRI具有保护作用。本实验旨在研究MEL对肝脏IRI的保护作用,并探讨其可能的作用机制,试图为临床寻求对肝脏IRI有效的保护方法提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

健康Wistar大鼠48只,体重(280±30)g(由内蒙古大学动物实验中心提供)。随机均分为(1)正常对照组(N组);(2)缺血再灌注组(IR组);(3)褪黑素预处理组(MEL组)。每组16只,并按缺血再灌注时相2 h、24 h分为2个亚组,各8只。

收稿日期:2004-05-24; 修订日期:2005-01-29。

作者简介:张笑春(1974-),女,内蒙古锡盟人,内蒙古医学院第一附属医院硕士研究生(现在内蒙古包头市中心医院),主要从事肝移植方面的研究。

通讯作者:张笑春 电话:0472-6955210; E-mail: xiaochunzhang2001@yahoo.com.cn。

1.2 药品及试剂

MEL纯品购自Sigma公司。天冬氨酸转氨酶(AST),丙氨酸转氨酶(ALT),碱性磷酸酶(AKP)测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 动物模型的制备

乙醚吸入维持麻醉。建立尾静脉输液通道,各组动物尾静脉注射2 mL肝素生理盐水(100 U/L)。MEL组于缺血前30 min皮下注射褪黑素10 mg/kg。N组和IR组皮下注射等量生理盐水。打开腹腔,游离肝蒂;MEL组和IR组分别用无创血管夹夹闭肝蒂,并开始计时。肝蒂夹闭后肝脏颜色逐渐变深、肿胀、质地变硬;45 min后,松开血管夹恢复血供,肝脏颜色逐渐恢复至缺血前状态,关腹。N组仅行肝蒂骚扰,不夹闭。于恢复血流2 h、24 h后心腔取血,3 000 r/min离心10 min,留取血浆分成3份,置-20℃冰箱中待检。同时切取肝组织,分别以10%甲醛溶液、70%酒精固定备检。

1.4 检测指标及方法

(1)血清AST, ALT和AKP按试剂盒说明书进行检测。(2)所取肝组织行常规石蜡包埋、切片、HE染色,置光镜下观察肝脏病理变化。(3)细胞凋亡采用流式细胞技术检测。

1.5 统计学处理

数据均用($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用单因素方差分析、相关分析及 t 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 血清 AST, ALT 及 AKP 检测结果

IR 组 3 种酶学指标均显著高于 N 组 ($P < 0.01$); MEL 组上述指标均高于 N 组 ($P < 0.05$), 但明显低于 IR 组 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组大鼠 AST, ALT 及 AKP 浓度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	再灌注时间(h)	例数	AST(U/L)	ALT(U/L)	AKP(U/L)
IR 组	2	8	151.19 ± 13.98	339.07 ± 33.56	105.86 ± 13.36
	24	8	185.33 ± 18.67	484.98 ± 28.83	137.57 ± 15.42
MEL 组	2	8	128.30 ± 14.56 ^{1),2)}	286.84 ± 32.48 ^{1),3)}	86.72 ± 12.04 ^{1),3)}
	24	8	157.44 ± 13.04 ^{1),3)}	437.13 ± 32.46 ^{1),3)}	114.38 ± 16.88 ^{1),3)}
N 组	2	8	29.03 ± 6.29	77.91 ± 16.08	30.99 ± 3.19
	24	8	29.42 ± 6.27	78.23 ± 14.30	30.47 ± 3.81

注:与 N 组同一时点比较, 1) $P < 0.01$; 与 IR 组同一时点比较, 2) $P < 0.01$, 3) $P < 0.05$

2.2 病理组织学改变

光镜下见 N 组, 肝组织结构清楚, 汇管区、小叶中央静脉、肝细胞索及肝窦结构清晰, 肝细胞排列正常, 肝细胞无变性、坏死、窦内皮清楚。IR 组 2 h

及 24 h 后肝脏组织呈明显弥漫性水肿, 并出现广泛点状坏死、灶状坏死及小片状坏死。MEL 组主要为散在点状及灶状坏死, 各时相细胞水肿及坏死程度均较 IR 组为轻 (图 1, 2)。

图 1 IR 组 24 h 光镜 (HE × 400)

图 2 MEL 组 24 h 光镜 (HE × 400)

2.3 肝细胞凋亡

MEL 组与 IR 组比较, 2 h 及 24 h 细胞凋亡率和 bax 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$), 而 Bcl-2 蛋白表达量明显增高 ($P < 0.05$); MEL 组与 N 组比较细胞凋亡率和 bax 蛋白表达量明显增高 ($P <$

0.05), Bcl-2 蛋白表达量明显降低 ($P < 0.05$)。IR 组的 2 h, 24 h 两时点肝脏组织的 Bcl-2 与 bax 蛋白表达量明显负相关 (r 分别为 -0.884 和 -0.842 , 均为 $P < 0.05$) (表 2, 图 3, 4)。

表 2 再灌注 2 h 及 24 h 肝细胞凋亡百分率、Bcl-2 及 bax 基因表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	再灌注 2h			再灌注 24h		
	凋亡率 (%)	Bcl-2	bax	凋亡率 (%)	Bcl-2	bax
N 组	1.81 ± 0.31	5.61 ± 0.85	2.83 ± 0.67	1.76 ± 0.32	5.65 ± 0.77	2.76 ± 0.70
MEL 组	4.13 ± 0.30 ^{1),3)}	4.50 ± 0.7 ^{1),2),3)}	4.49 ± 0.57 ^{1),4)}	5.51 ± 0.24 ^{1),4)}	3.51 ± 0.54 ^{1),3)}	6.01 ± 1.04 ^{1),3)}
IR 组	4.63 ± 0.39	3.55 ± 0.53	5.78 ± 0.81	6.66 ± 0.58	2.89 ± 0.46	7.38 ± 0.97

注:与 N 组比较, 1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.05$; 与 IR 组比较, 3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$

图3 再灌注2h及24h时点的调亡率

图4 Bcl-2与bax的相关关系

3 讨论

迄今对于肝脏IRI的发病机理尚不完全清楚。细胞凋亡在其中起着重要作用^[3]。肝脏IRI后细胞凋亡的发生是一个多因素、多环节、多途径的复杂过程。一方面缺血缺氧所致的氧自由基的爆发性形成及继发内毒素、肿瘤坏死因子等因素的损害是诱发细胞凋亡的关键因素^[4,5,6]。尤其是氧化性最强、毒性最大的羟自由基。羟自由基既可直接损伤DNA诱导细胞凋亡,也可以攻击蛋白质尤其是具有酶活性的蛋白质,使其功能丧失从而诱导细胞凋亡,还可能通过影响核基因转录、改变细胞的表型特征、诱发凋亡。此外,羟自由基可能作用于细胞膜,诱发脂质过氧化,从而影响细胞的信号传递系统,激发有关的调控基因导致细胞凋亡。另一方面凋亡调控基因的异常表达也能导致细胞凋亡的发生^[7]。本实验表明,IR组各时相Bcl-2(抑凋亡基因)与bax(促凋亡基因)呈明显负相关;Bcl-2基因蛋白表达异常下调,而bax基因蛋白表达异常上调也证实了这一点。此外,还与细胞因子^[8,9]、钙超载、线粒体功能障碍、氧自由基、NO^[10]及TXA₂/PGI₂值失衡等多种因素有关。以上众多因素又互为因果,共同参与引发肝IRI的病理生理过程,最终导致肝实质细胞凋亡增加,肝细胞总数减少,肝组织结构破坏和肝功能损害。

已有报道,MEL可抑制脑、肾、心肌IRI中细胞凋亡的发生,能拮抗脑、肾、心肌组织结构破坏,且可不同程度地减轻肾、心肌、脑功能的损害。本研究结果显示,IR组肝脏缺血45min后,再灌注各时相有不同程度的酶学指标升高,肝细胞凋亡增加,线粒体结构破坏,肝细胞变性坏死。MEL组3种酶的释放和肝细胞凋亡减少,且肝细胞病理损伤程度减弱。提示在肝IRI中MEL同样可以发挥其抑制细胞凋亡、拮抗组织结构破坏、减轻功能损害

的作用。MEL组和IR组各时相的肝功能及肝细胞凋亡的差异均有显著性($P < 0.05$),这充分说明MEL对再灌注不同时间大鼠肝脏具有保护作用。推测其保护作用的发挥可能通过以下途径实现:(1)抗凋亡。已有报道MEL具有清除氧自由基,增强Ca²⁺-ATP酶活性,减轻细胞内钙超载等作用。这可能是其抗凋亡的机制之一。MEL作用于抑制基因Bcl-2,诱导基因bax使二者异常表达;其拮抗细胞凋亡的发生已在心肌IRI得到证实^[11],本实验结果与之一致。(2)保护肝功能和维持肝脏组织结构的完整性。可能机制为:MEL抑制肿瘤坏死因子的产生和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的表达,从而抑制NO的过度产生而保护肝功能及肝细胞活力;MEL抑制细胞间黏附分子及P-选择素的表达从而减少IRI时中性粒细胞的浸润;MEL还可能通过直接清除自由基,提高体内还原型谷胱甘肽(GSH)含量和增强抗氧化酶的活力,使生物大分子如脂质和核酸免受自由基损伤,从而维持肝细胞及线粒体结构和功能的完整性;MEL促进TXA₂和PGI₂平衡的恢复,改善肝微循环,减轻肝组织水肿与缺血。

总之,MEL在一定程度上能抑制IRI所致的肝细胞凋亡,拮抗肝组织结构破坏,减轻肝功能的损害,对大鼠肝IRI具有保护作用。因此,临床预防性应用MEL有望减轻肝脏IRI。

参考文献:

- [1] 周宇,余娟,邱丽颖. 褪黑素对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 中国药理学通报, 2003, 19(2):194-196.
- [2] 许建民,徐叔云,梅俏. 褪黑素抑制一氧化氮生成在小鼠免疫性肝损伤的意义[J]. 中国药理学报, 1998, 14(4):533-535.
- [3] Shimamatsu K, Wanless IR. Role of ischemia in causing apoptosis, atrophy and nodular hyperplasia in human liver[J]. Hepatology, 1997, 26(2):343-351.

- [4] Atalla SL, Toledo-Pereyra LH, MacKenzie GH, *et al.* Influence of oxygen-derived free radical scavengers on ischemic livers [J]. *Transplantation*, 1985, 40(6): 584-590.
- [5] Mathews WR, Guido DM, Fisher MA, *et al.* Lipid peroxidation as molecular mechanism of liver cell injury during reperfusion after ischemia [J]. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16(9): 763-770.
- [6] 张帆. 氧自由基与肝缺血再灌注损伤[J]. 国外医学消化系疾病分册, 1989, 9(4): 199-201.
- [7] 胡国潢, 吕新生. 常温下缺血预处理对肝细胞凋亡调节基因表达影响的临床研究[J]. 中国普通外科杂志, 2001, 10(3): 327-330.
- [8] 梁法生, 宋继昌, 高英堂, 等. 趋化因子 MIP-2 在大鼠肝缺血/再灌注损伤后的表达[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(2): 104-106.
- [9] 吴河水, 王峰, 王琳, 等. 小鼠肝缺血/再灌注损伤时肝脏 Kupffer 细胞中 TLR2D 的表达[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(8): 591-593.
- [10] 詹勇强, 吕新生, 王志明, 等. 一氧化氮在大鼠肝缺血预处理中的作用[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(9): 541-544.
- [11] 明章银, 向继洲, 吴基良, 等. 褪黑素对大鼠心肌缺血再灌注后细胞凋亡的影响[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2003, 32(4): 358-360.

文章编号:1005-6947(2005)07-0541-01

· 病例报告 ·

急性肠系膜缺血疾病 2 例

刘骅, 陈治平, 吴志勇

(上海第二医科大学附属仁济医院 普通外科, 上海 200127)

关键词: 肠系膜血管闭塞; 病例报告

中图分类号: R657.2; R44

文献标识码: D

1 病例报告

例1 女, 77岁。患者入院前3d无明显诱因突发全腹痛, 并解暗褐色水样便2次, 以后未再有肛门排气排便。原有冠心病、房颤史。予以抗感染及对症治疗无缓解, 并出现发热。体查: 体温38.0℃, 脉搏90次/min, 房颤心律, 呼吸21次/min, 血压90/60mmHg。痛苦面容。腹部膨隆, 全腹压痛(+), 反跳痛(+), 肌卫(+)。血白细胞 $14.6 \times 10^9/L$, 中性0.90。立位腹部平片见大量气液平面。拟诊为“急性肠梗阻、腹膜炎”, 行剖腹探查术。术中见腹腔内血性渗液约1000mL, 自屈氏韧带以下120cm处至距回盲部10cm处小肠发黑坏死, 肠系膜上动脉全程栓塞僵硬增粗无搏动, 取一段肠系膜上动脉远侧段剖开证实为血栓。予以坏死小肠切除, 标本病理报告为: 小肠透壁缺血性坏死, “肠系膜上动脉壁”纤维组织增生伴

玻璃样改变。术后出现大便次数增多、稀薄、进食不久即有排便等短肠综合征表现。予以饮食调节、口服及肠外营养支持后有所好转。术后28d出院, 可进半流质饮食, 大便5~6次/d, 稀糊状。随访至今1年无复发。

例2 男, 57岁。因中上腹隐痛2周, 加重4d收治入院。入院前晚出现呕吐及解糊状便, 隐血(++++)。原有房颤及II° I型房室传导阻滞。腹部平片及CT均提示“小肠不完全性梗阻”。体查: 体温36.8℃, 脉搏110次/min, 呼吸25次/min, 血压130/80mmHg。急病面容。中上腹压痛明显, 反跳痛(+), 肌卫(+), 肠鸣音减弱, 移动性浊音(±), 腹穿得2mL血性液体。急诊行剖腹探查术, 术中见腹腔内血性渗液约700mL, 距屈氏韧带50cm以下约150cm小肠发黑坏死, 肠系膜增厚, 其肠系膜静脉内大量血栓形成, 行小肠部分切除术。病理报告为: 小肠出血性坏死表现。术后12d痊愈出院, 随访9个月情况良好, 无复发。

ischemia, AMI)属肠系膜缺血性疾病范畴, 约占肠系膜血管性疾病的30%~35%。

AMI最常发生于年龄大于50岁、有慢性房颤的患者。早期病人的疼痛与体检所见明显不符, 但当梗死发生时, 腹部压痛, 并出现肌卫、反跳痛时则表明肠生机进行性丧失、出现了透壁性坏死。立位腹部平片多只表现为非特异性的肠腔积气液平的肠梗阻表现。多普勒超声和CT是重要的检查手段, 并可藉此鉴别动脉和静脉血栓形成。目前选择性动脉造影成为诊断AMI的主要方法, 同时还可经动脉注射罂粟碱、肝素或加用溶栓剂等进行介入治疗。

少数无肠梗死体征且通过多普勒超声、CT、血管造影等确诊的患者, 可试用肝素和链激酶进行保守治疗。大多数患者因弥漫性腹膜炎需要立即进行剖腹探查术, 以切除梗死和可疑的肠管。但如果全部或大部分小肠或部分右半结肠发生明显的梗死, 切除所有受累的肠管后必然引起短肠综合征等, 因此, 应注意术后处理。

收稿日期: 2004-06-28。

作者简介: 刘骅(1973-), 男, 上海人, 上海第二医科大学附属仁济医院主治医师, 主要从事消化外科基础与临床方面的研究。

通讯作者: 刘骅 电话: 13501943977(手机); E-mail: housman111@sina.com。

2 讨论

急性肠系膜缺血(acute mesenteric