

文章编号:1005-6947(2006)07-0512-04

· 基础研究 ·

牛磺酸对大鼠小肠缺血再灌注后肝、肾损伤的保护作用

佟立权¹, 乔海泉¹, 宋光平², 王毓利¹, 孟凡强¹, 周保国¹, 孙学英³

(1. 哈尔滨医科大学第一临床医学院 普外四科, 黑龙江 哈尔滨 150001; 2. 黑龙江省大庆市第二医院 病理科, 黑龙江 大庆 163311; 3. 新西兰奥克兰大学分子医学系)

摘要:目的 研究牛磺酸对大鼠小肠 I/R 后肝、肾损伤的保护作用。方法 雄性 Wistar 大鼠随机分为 3 组:假手术对照组(S 组)、生理盐水对照组(I/R 组)和牛磺酸保护组(T 组)。T 组术前 30 min 经鼠阴茎背静脉注射 2% 的牛磺酸 200 mg/kg。采用肠系膜上动脉根部阻断 1 h 后复流行再灌注的方法制作肠 I/R 模型。除 S 组外,其余 2 组分别于再灌注 1.5, 3, 6, 12 h 抽血测定 ALT, AST, BUN 及 Cr 值,评定肝、肾功能。肝、肾切片行 HE 染色,比较组织病理学差异。用原位末端标记(TUNEL)法测定肝、肾细胞凋亡百分率,评定平均光密度值。**结果** I/R 组与 S 组相比,血清 ALT, AST, BUN 及 Cr 值均明显升高($P < 0.05$),3h 最高,以后开始下降,12h 仍高于 S 组;肝、肾病理损伤 I/R 组也相应严重,肝、肾细胞 TUNEL 阳性表达率、平均光密度值明显增加($P < 0.05$)。T 组与 I/R 组相比,前者血清 ALT, AST, BUN 及 Cr 水平明显减低($P < 0.05$),病理损伤也相应较轻;肝、肾细胞 TUNEL 阳性表达率、平均光密度值明显减少($P < 0.05$)。**结论** 牛磺酸对大鼠小肠 I/R 后肝、肾损伤具有明显的保护作用。

关键词: 缺血再灌注/预防和控制; 牛磺酸; /治疗应用; 肝/病理生理学; 肾/病理生理学; 肠缺血
中图分类号: R619.9; R657.2 **文献标识码:** A

Protective effects of taurine on liver and kidney injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats

TONG Li-quan¹, QIAO Hai-quan¹, SONG Guang-ping², WANG Yu-li¹,
MENG Fan-qiang¹, ZHOU Bao-guo¹, SUN Xue-ying³

(1. Department of General Surgery, the First Affiliated Clinical Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 2. Daqing Second Hospital, Daqing, Heilongjiang 163300, China; 3. Department of Molecular Medicine and Pathology. The University of Auckland, Auckland, New Zealand)

Abstract: **Objective** To study the protective effects of taurine on liver and kidney injury induced by intestinal ischemia-reperfusion (I/R) in rats. **Methods** Male Wistar rats were randomly assigned into Sham, I/R, and taurine groups. Thirty min before operation, 2% taurine (200 mg/kg) was injected via dorsal vein of the rat's penis. Intestinal ischemia-reperfusion was produced by occlusion of superior mesenteric artery for one hour later, then the blood flow was restored by removing the clamps. Blood samples were taken from rats in I/R and taurine groups at 1.5, 3, 6 and 12 h after reperfusion, and the serum levels of ALT, AST, BUN and Cr were measured to evaluate the functions of liver and kidney. Tissues from livers and kidneys were cryostated and stained with hematoxylin and eosin to observe changes in histological pathology. TUNEL was also performed to examine apoptotic cells and the average light density levels were measured. **Results** The serum levels of ALT, AST, BUN and Cr in I/R group were significantly higher than those in Sham group ($P < 0.05$),

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30571753)。

收稿日期:2005-09-04; **修订日期:**2006-02-14。

作者简介:佟立权,男,黑龙江大庆人,哈尔滨医科大学第一临床医学院副主任医师,博士研究生,主要从事缺血再灌注基础方面的研究。

通讯作者:佟立权 电话:0451-88271339(O); E-mail:tlq777666@163.com。

reached peak 3 h after reperfusion, but were still higher than control even 12 h after reperfusion. Histological staining showed severe injury in livers and kidneys in I/R groups. More TUNEL-positive cells and higher average light density levels were observed in I/R group, compared to Sham group ($P < 0.05$). However, compared with I/R group, taurine treatment significantly reduced the serum levels of ALT, AST, BUN and Cr, attenuated the pathological injury, and decreased the numbers of apoptotic cells and average light density levels of livers and kidneys. **Conclusions** Taurine has protective effects on the injury of the liver and kidneys induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats.

Key words: Reperfusion/prev; Taurine/ther use; Liver/physiopathol; Kidney/physiopathol; Intestinal Ischemia

CLC number: R619.9; R657.34

Document code: A

既往研究^[1]表明,创(烧)伤、休克后的肠 I/R 能导致炎症介质释放、肠麻痹以及细菌、毒素移位,进而诱发炎症反应综合征(SIRS)、多器官功能障碍综合征(MODS),甚至多器官衰竭(MOF)。I/R 为 SIRS,MODS 始动因素之一。因此,如何预防、治疗 I/R 后诱发的 SIRS,MODS 是目前临床研究的重点之一。牛磺酸(Taurine, Tau)对抗心、肝、肾等器官 I/R 已有研究^[2-4],但其对抗肠 I/R 所致的 SIRS,MODS 国内外鲜有报道。本实验观察牛磺酸对抗肠 I/R 损伤的肝、肾细胞凋亡,了解其作用效果及保护机制。为临床预防、治疗 SIRS,MODS 提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂及动物

健康雄性 Wistar 大鼠 54 只,体重(250 ± 20)g,由哈尔滨医科大学第一临床医学院动物中心提供。Tau 注射剂购自 Sigma 公司;细胞凋亡 TUNEL 检测试剂盒购自美国 Roche 公司;TUNEL 检测蛋白酶 K (PK)自美国 Life Technologies 公司;DAB 显色剂购自福州迈新生物技术开发有限公司。

1.2 实验方法

动物随机分为假手术对照组(S组, $n = 6$)、生理盐水对照组(I/R组, $n = 24$,各时点均 6 只)、Tau 保护组(T组, $n = 24$,各时点均 6 只)。术前 12h 禁食,自由饮水。1%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔注射麻醉;满意后切口开腹,探查各脏器无病变后游离肠系膜上动脉,用无损伤血管夹夹闭根部;1h 后放开血管夹行再灌注,制作小肠热 I/R 动物模型。I/R 组术前 30min 给予等量生理盐水。T 组成模术前 30min 于大鼠阴茎背静脉缓慢推注 2% Tau(200mg/kg)。S 组仅切口开腹,游离肠系膜上

动脉而不阻断。各组动物分别于再灌注 1.5,3,6,12h 从腹主动脉各采血 5mL,注入离心管,然后立即活杀取材。血液离心 15min(3 000r/min)后抽取上清液, -70℃ 保存,备作生化检查。切取肝左叶及右肾浸泡于体积分数 4% 的多聚甲醛溶液中 24h,进行石蜡包埋、切片,苏木素-伊红(HE)染色和原位末端标记(TUNEL)。

1.3 观察指标及检查方法

1.3.1 肝、肾功能测定 血清送本院生化室,由日本 OLYMPUS AU5400 型全自动生化仪检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)及肌酐(Cr)。

1.3.2 病理形态学检查 常规石蜡包埋、切片、HE 染色。

1.3.3 细胞凋亡的检测 常规石蜡包埋、切片,原位末端标记(TUNEL)法检测凋亡。按照试剂盒说明书操作,细胞核被染成棕黄色并有凋亡特性者为阳性细胞。显微镜下($\times 400$)随机采集 10 个视野,应用人工计数结合数码图像分析系统,以百分率(%)表示凋亡阳性细胞百分数,以平均光密度值(D)表示染色强度,对凋亡肝、肾细胞进行定量分析。

1.4 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS11.0 软件进行方差分析、 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 各组肝、肾功能的改变

随着 I/R 时间的延长,I/R 组的 ALT,AST,BUN 及 Cr 值逐渐升高,3h 达高峰,以后开始下降,12h 仍高于 S 组(各时点均 $P < 0.05$);T 组与 I/R 组相比,前者各时点均明显降低($P < 0.05$)(表 1)。

表1 各组动物不同时点 ALT, AST, BUN 及 Cr 值变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	时点(h)	AST(U/L)	ALT(U/L)	BUN(mmol/L)	Cr(mmol/L)
S组	术后1.0	100 ± 35	45 ± 12	7.2 ± 1.1	29.8 ± 5.6
I/R组	I/R 1.5	260 ± 64 ²⁾	105 ± 23 ²⁾	10.8 ± 2.6	43.5 ± 8.2 ¹⁾
	I/R 3.0	634 ± 116 ²⁾	165 ± 44 ²⁾	15.9 ± 2.1 ²⁾	57.9 ± 11.3 ²⁾
	I/R 6.0	295 ± 78 ²⁾	105 ± 45 ¹⁾	12.5 ± 2.0 ²⁾	40.8 ± 11.0
	I/R 12.0	150 ± 32 ¹⁾	62 ± 26	8.8 ± 0.9 ¹⁾	30.5 ± 8.2
	T组	I/R 1.5	160 ± 43 ⁴⁾	75 ± 17 ³⁾	8.4 ± 0.8
T组	I/R 3.0	468 ± 89 ³⁾	218 ± 49 ⁴⁾	12.6 ± 1.5 ³⁾	41.7 ± 10.1 ³⁾
	I/R 6.0	194 ± 59 ⁴⁾	100 ± 34	9.1 ± 0.8 ⁴⁾	34.6 ± 9.6
	I/R 12.0	114 ± 15 ³⁾	56 ± 14	8.3 ± 1.0	30.1 ± 6.9

注:与S组比较;1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$;与I/R组同时点比较;3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$

2.2 肝、肾组织形态学改变

S组肝、肾组织形态正常。I/R组肝细胞索排列紊乱,细胞浊肿,间质大量炎性细胞浸润,尤以中央静脉周围损伤最重;肾细胞肿胀,肾小管管腔结构消失,部分细胞溶解,尤以皮、髓质交界和髓质损伤明显。T组病理改变明显轻于I/R组(HE 3h,图1)。

2.3 肝、肾的细胞凋亡

S组偶见肝、肾细胞凋亡。T组凋亡细胞散在、零星分布。I/R组细胞凋亡分布广泛,明显多于S组和T组(TUNEL 3h,图2)。同一时点各组肝、肾TUNEL阳性细胞率、平均光密度值相比差异均有显著性($P < 0.05$)(各组肝、肾TUNEL阳性细胞率3h,图3)。

a. T组肝

b. I/R组肝

c. T组肾

d. I/R组肾

图1 T组和I/R组肝、肾组织的形态学改变(HE × 400)

a. T组肝

b. I/R组肝

c. T组肾

d. I/R组肾

图2 T组和I/R组肝、肾组织的细胞凋亡情况(TUNEL × 400)

a. 阳性细胞率

b. 阳性细胞吸光度值

图3 3h 各组肝、肾 TUNEL 阳性细胞率及阳性细胞吸光度值

3 讨论

肠 I/R 后的损伤累及多个脏器,严重时可导致 MODS 或 MOF 的发生。其机制十分复杂,有多种因素参与,主要包括氧化代谢产物、炎症介质、白细胞黏附、一氧化氮代谢障碍及三磷酸苷(ATP)下降等,其中炎症反应是导致 MODS 的重要因素^[5]。因此,如何对抗肠 I/R 后诱发的 SIRS, MODS 至关重要。

Tau 分子式为 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, 是一种含硫的 β -氨基磺酸,易溶于水,为游离氨基酸。其细胞保护作用表现为:维持机体细胞内外渗透压平衡,调节膜稳定作用,调节细胞钙稳态,清除氧自由基,抗脂质过氧化损伤^[6]。Tau 对抗心、肝、肾等器官 I/R 损伤已有过报道^[2-4],基于此,本实验观察其对抗肠 I/R 所致多脏器损伤是否有保护作用。结果证实 Tau 可明显保护肠源性 I/R 对肝、肾细胞的损伤。

肝、肾功能可反应肠 I/R 后 MODS 或 MOF 的程度^[7]。本实验发现,肠 I/R 后不但小肠本身损伤,而且,肝、肾等多脏器受累。I/R 组的 ALT, AST, BUN 及 Cr 值明显高于 S 组,差异均具有显著性($P < 0.05$),再灌注 3h 时达高峰,12h 仍高于 S 组。组织形态学显示 I/R 组肝细胞、间质,肾实质细胞、肾小管形态结构严重受损。肝、肾细胞凋亡率也明显增加($P < 0.05$)。T 组与 I/R 组比较,前者各项损伤指标均明显减轻($P < 0.05$)。

本文结果表明,Tau 可通过对抗细胞凋亡发挥对肠 I/R 后肝肾损伤的可靠的保护作用。依据本结果并复习文献,笔者推测,Tau 对抗肠 I/R 损伤可

能通过如下机制:(1)调节 Bax 基因表达,抑制凋亡,保护肝、肾细胞免受凋亡^[8]; (2)保护细胞 DNA 免受损伤,促进肝、肾细胞进入细胞周期^[9]。

参考文献:

- [1] Olanders K, Borjesson A, Zhao X, *et al.* Effects of anticoagulant treatment on intestinal ischaemia and reperfusion injury in rats [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2005, 49(4): 517 - 524.
- [2] Hanna J, Chahine R, Aftimos G, *et al.* Protective effect of taurine against free radicals damage in the rat myocardium [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2004, 56(3): 189 - 194.
- [3] Wettstein M, Haussinger D. Taurine attenuates cold ischemia-reoxygenation injury in rat liver [J]. *Transplantation*, 2000, 69(11): 2290 - 2296.
- [4] Michalk DV, Hoffmann B, Minor T. Taurine reduces renal ischemia/reperfusion injury in the rat [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2003, 526: 49 - 56.
- [5] 邵堂雷,蔡伟耀,李宏为. 移植肝再灌注损伤的发生机制 [J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10(2): 173 - 175.
- [6] Kingston R, Kelly CJ, Murray P. The therapeutic role of taurine in ischaemia-reperfusion injury [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10(19): 2401 - 2410.
- [7] 李文美,陈坚,路遼阳,等. 缺血预处理对肝缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(2): 23 - 25.
- [8] Ishigami F, Naka S, Takeshita K, *et al.* Bile salt tauroursodeoxycholic acid modulation of Bax translocation to mitochondria protects the liver from warm ischemia-reperfusion injury in the rat [J]. *Transplantation*, 2001, 72(11): 1803 - 1807.
- [9] Chen YX, Zhang XR, Xie WF, *et al.* Effects of taurine on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells in vitro [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2004, 3(1): 106 - 109.