

文章编号:1005-6947(2005)07-0492-05

· 实验研究 ·

肝糖原贮备的变化对热缺血再灌注期大鼠肝储备功能的影响

陈文斌¹, 张瑞明², 张笑春²

(1. 解放军总医院肝胆外科研究所, 北京 100853; 2. 内蒙古医学院附属第一医院 普通外科, 内蒙古 呼和浩特 010059)

摘要:目的 探讨增加肝糖原贮备对肝缺血再灌注损伤的保护作用。方法 建立大鼠肝热缺血再灌注模型。动物分组:(1)H组,于缺血前24h尾静脉注射25%葡萄糖(2mL/只,1次/6h);(2)L组,缺血前禁食24h,饮水不限;(3)缺血再灌注对照组(C组),建模前不注射葡萄糖,亦不禁食;(4)假手术对照组(N组)。H,L,C组动物于缺血45min,再灌注1/4h,1/2h和1h后取样测血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(AKP)和吲哚氰绿代谢试验(ICGR₁₅)、胰高血糖素负荷试验(GLT),同时取肝组织行光镜形态学观察。结果 (1)肝储备功能(HFR):ICGR₁₅在各个时点4组间差异有显著性,N组<H组<C组<L组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);GLT,负荷后c-AMP浓度及应答比(CAR)在各个时点4组间差异有显著性,N组>H组>C组>L组($P < 0.01$)。H,C,L组的ICGR₁₅和GLT在组内各时点间差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(2)肝酶学指标各时点4组间差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),N组<H组<C组<L组;各组内1/2h与1/4h之间差异无显著性($P > 0.05$)。(3)肝脏病理组织学改变:H组明显轻于C组及L组,并接近N组,L组最严重。结论 (1)预防性增加肝糖原贮备能拮抗热缺血再灌注损伤过程中肝储备功能的损害。(2)ICGR₁₅,GLT较常规肝功能酶学指标能更早期、灵敏反映肝热缺血再灌注过程中肝储备功能的变化。

关键词:肝糖原/代谢;再灌注损伤;肝功能试验

中图分类号:R539.2;R619.9

文献标识码:A

Effects of liver glycogen storage on hepatic functional reserve during warm ischemia and reperfusion injury in rats

CHEN Wen-bin¹, ZHANG Rui-ming², ZHANG Xiao-chun²

(1. Research Institute of Hepatobiliary Surgery, PLA General Hospital, Beijing 100853, China; 2. Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Innermongolia Medical College, Hohhot 010059, China)

Abstract: Objective To study the role of hepatic glycogen reserve in protecting the ischemia-reperfusion injury of rat liver. **Methods** A model of rat liver warm ischemia and reperfusion injury (WIRI) was set up. Rats were divided into 4 groups: (1) Group H, given 25% glucose by tail vein injection (2ml, q6h, iv); (2) group L, food was not supplied (drinking unlimited) 24 hours before warm ischemia; (3) control group (group C), rats took food freely; and (4) sham operation group (group N). After 45 min of ischemia, reperfusion for 1/4h, 1/2h and 1h, blood was taken to test for ICGR₁₅ and GLT (glucagon loading test). Meanwhile, the levels of enzymes (including AST, ALT, AKP) were observed. **Results** (1) Hepatic functional reserve (HFR): ①ICGR₁₅: groupN < groupH < groupC < groupL ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). ②GLT: c-AMP level in plasma after GLT and c-AMP answering rate (CAR): group N > groupH > group C > groupL ($P < 0.01$). There were significant differences of ICGR₁₅, GLT between the periods of reperfusion of 1/2h, 1/4h and 1h in group H, C and L ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). (2) Enzyme level: There were significant differences in the same periods among the four groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), groupN < groupH < groupC < group L. No difference was observed between 1/2h and 1/4h enzyme level in the groups

收稿日期:2004-06-18; 修订日期:2005-01-29。

作者简介:陈文斌(1966-),男,山西介休人,解放军总医院博士研究生,主要从事肝胆外科方面的研究。

通讯作者:陈文斌 电话:010-68230961, 13718381050(手机); E-mail:chenwenbinsou@sohu.com。

($P > 0.05$)。 (3) Histopathologic changes in the liver: They were significantly milder in group H than in groups C and L, and the changes in group H were similar to group N. The changes in group L were the most severe.

Conclusions (1) Prophylactic increase of hepatic glycogen storage could counteract the injury of hepatic functional reserve that occurs during warm ischemia and reperfusion. (2) The changes of hepatic functional reserve that occurs during warm ischemia reperfusion can be earlier and more sensitively reflected by $ICGR_{15}$ and GLT than by the routine enzyme parameters of hepatic function.

Key words: Liver Glycogen/metab; Reperfusion Injury; Liver Frunction Tests

CLC number: R539.2; R619.9

Document code: A

肝脏缺血再灌注损伤 (Ischemia and reperfusion injury, IRI) 是肝切除及肝移植等外科临床过程中常涉及的共同的病理生理过程。因此寻求保护肝脏,防止或减轻肝缺血再灌注损伤的方法和措施成为研究焦点。提高肝糖原贮备能否拮抗 IRI? 此课题在组织形态、分子机制等方面的研究较多。本文从与肝储备功能 (hepatic functional reserve, HFR) 有关的物质、能量代谢等角度进行研究,报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材 料

(1) Wistar 雄性大鼠: 体重 250 ~ 300 g, 由内蒙古大学动物实验中心提供。(2) 胰高血糖素 (诺和生): 规格为 1U 内含胰高血糖素盐酸盐 1mg 和乳糖 107mg (盐酸和/或氢氧化钠用于调节 pH 值) 及无菌注射用水 1mL。本品购自丹麦诺和诺德公司。(3) 注射用吲哚氰绿购自辽阳第三制药厂。(4) 谷草转氨酶 (AST), 谷丙转氨酶 (ALT), 碱性磷酸酶 (AKP) 检测试剂盒购自南京建成生物工程所。(5) c-AMP 放免试剂盒, 由上海中医药大学同位素室提供。(6) 752 型紫外分光光度计购自山东高密分析仪器厂。(7) GC-911 g 放射免疫计数器购自中国科学技术大学科技实业总公司。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组 Wistar 大鼠 96 只 (体重 250 ~ 300g), 随机分为 4 组。(1) IRI 对照组 (C 组): 打开腹腔, 无创血管夹夹闭肝蒂, 45min 后松开血管夹, 再灌注 1/4h, 1/2h, 1h 后取材。建模前自由进食。(2) 高糖原组 (H 组): IRI 术前 24h 开始每只动物每 6h 尾静脉注射 25% 葡萄糖 2mL, 共 4 次。(3) 饥饿组 (L 组): IRI 术前禁食 24h, 饮水不限。(4) 假手术对照组 (N 组): 开腹骚扰腹腔, 但不夹闭肝蒂。每组 24 只再按缺血再灌注时相 1/4h, 1/2h, 1h 随机分为 3 个亚组, 每组 8 只。另取大鼠 96 只, 随机分为 4 组 (同前), 每组 24 只 (按 1/4h, 1/

2h, 1h 分为 3 个亚组, 每组 8 只), 用于检测胰高血糖素负荷试验 (glucagon loading test, GLT)。

1.2.2 动物模型的制备 乙醚吸入维持麻醉。建立尾静脉输液通道, 2mL 肝素 (100U/mL) 尾静脉注射, 生理盐水 10mL 皮下注射。打开腹腔, 无创血管夹夹闭肝蒂 (N 组除外), 并开始计时。肝蒂夹闭后肝脏颜色逐渐变深, 肝肿胀、质地变硬, 肠壁淤血。45min 后松开血管夹, 再灌注 1/4h, 1/2h, 1h。

1.2.3 标本采集 (1) 各组分别于再灌注后 1/4h, 1/2h, 1h (每时点 8 只) 进行心腔取血 (测 $ICGR_{15}$ 组于时相点前 15min 尾静脉注射 1mg/kg 的吲哚氰绿), 肝素抗凝, 3 000r/min 离心 10min。留取血浆 2 份置于 -20℃ 冰箱中保存待检, 1 份用于测 AKP, ALT, AST, 1 份测 ICG 浓度。各组取血后立即切取肝组织, 以 10% 中性甲醛固定备检。(2) 检测 GLT 各组于再灌注各时点 (每时点 8 只) 前 10min 尾静脉注射胰高血糖素 (20mg/kg, 1mg 诺和生 + 生理盐水至 100mL 即 10mg/mL) 并分别于注药前及注药后 10min 门静脉采血 1 ~ 2mL (取血后回注等量生理盐水)、置于 EDTA 抗凝管, 冰浴, 2 000r/min 离心 10min 后取血清 1mL, -20℃ 冰箱保存待检。

1.3 检测指标

1.3.1 肝脏酶学检测 血清 AST, ALT, AKP 测定按试剂盒说明进行。

1.3.2 肝脏储备功能检测 (1) $ICGR_{15}$ ICG 浓度按药物说明书绘制 ICG 标准曲线。取样品血浆 1mL 加生理盐水 2mL 稀释混匀, 752 型紫外分光光度计 805nm 处测定吸光度。查标准曲线计算出 ICG 浓度。 $ICGR_{15} = ICG \text{ 浓度} / 1.0 \times 100\%$ 。(2) GLT 以放射免疫法 (RIA) 测血浆 c-AMP 浓度。按说明书绘制标准曲线。血浆标本处理: 取 0.1mL 备检标本血浆加入 2mL 无水酒精, 振摇 1min, 静置 5min, 3 000r/min 离心 10min, 将上清液倒入指形瓶, 残渣再加入 75% 酒精 1mL 摇匀, 3 000r/min 离

心 10 min;合并上清液,于 60℃ 水浴吹干。测定时用 0.1 mL 醋酸缓冲液溶解,取 0.1 mL 待测,稀释倍数为 100 倍。结果乘 100 即为 pmol/mL。按说明书取样品检测,加样于各试管,4℃ 过夜,离心 (3 000 r/min) 15 min 负压去上清液,测定沉淀 γ -放射性强度。从标准曲线查得 pmol 数乘以稀释倍数。计算注射 GLT 前、后血浆 c-AMP 的应答比 (CAR)。CAR = GLT 后血浆 c-AMP 浓度/GLT 前 c-AMP 浓度 $\times 100\%$ 。

1.3.3 病理组织学染色 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。

1.4 统计学处理

数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。用 SPSS11.0 软件统计分析。对组内及组间进行单因素方差分析及 q 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ALT, AST, AKP 检测结果

4 组间 3 种酶水平,各时点差异有显著性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), H 组显著低于 C 组及 L 组 ($P < 0.01$), 高于 N 组 ($P < 0.05$); L 组明显高于 N 组 ($P < 0.01$) 及 C 组 ($P < 0.05$)。各组 1/2 h 与 1/4 h 之间差异均无显著性 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 各组大鼠血 AST, ALT 及 AKP 浓度 (U/L, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

指标	再灌注时点	N 组	H 组	C 组	L 组
ALT	1/4h	78.08 \pm 15.04	97.96 \pm 14.08 ^{1),3)}	124.74 \pm 20.62	174.76 \pm 29.25 ^{2),4)}
	1/2h	77.91 \pm 16.08	114.84 \pm 14.29 ^{2),4),5)}	145.74 \pm 15.64 ⁵⁾	192.72 \pm 15.23 ^{2),4),5)}
	1h	78.23 \pm 14.30	191.02 \pm 21.49 ^{2),4)}	220.94 \pm 22.37	270.75 \pm 22.58 ^{2),3)}
AST	1/4h	29.40 \pm 6.33	75.29 \pm 13.23 ^{2),3)}	93.08 \pm 12.56	113.74 \pm 12.60 ^{2),3)}
	1/2h	28.99 \pm 6.15	85.37 \pm 14.16 ^{2),3),5)}	109.16 \pm 14.28 ⁵⁾	128.47 \pm 12.62 ^{2),3),5)}
	1h	29.09 \pm 5.85	106.44 \pm 16.31 ^{2),4)}	136.35 \pm 15.46	166.03 \pm 15.42 ^{2),4)}
AKP	1/4h	30.85 \pm 3.30	41.01 \pm 8.97 ^{1),3)}	56.93 \pm 10.40	70.73 \pm 10.13 ^{2),3)}
	1/2h	31.20 \pm 3.57	46.23 \pm 11.93 ^{1),3),5)}	63.53 \pm 11.11 ⁵⁾	78.36 \pm 10.53 ^{2),4),5)}
	1h	30.94 \pm 3.34	66.71 \pm 10.48 ^{2),3)}	84.09 \pm 11.54	100.23 \pm 10.86 ^{2),3)}

注:与 N 组比较,1) $P < 0.05$, 2) $P < 0.01$; 与 C 组比较,3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$; 与组内 1/4h 时点比较,5) $P > 0.05$

2.2 ICGR₁₅

H 组 1/4, 1/2, 1h 各时相点均显著低于 L 组及 C 组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) 而高于 N 组 ($P < 0.01$), L 组各时相点明显高于 N 组及 C 组 ($P <$

0.05 或 $P < 0.01$)。H, C, L 组内 3 个时相点间差异亦具有显著性, ICGR₁₅ 随着再灌注时间的延长而增高 (表 2, 图 1)。

表 2 各组大鼠 ICGR₁₅ (%) ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

再灌注时点	N 组	H 组	C 组	L 组
1/4h	5.68 \pm 1.93	17.04 \pm 5.27 ^{1),2)}	25.08 \pm 5.32	34.05 \pm 6.16 ^{1),2)}
1/2h	5.90 \pm 1.93	26.54 \pm 7.04 ^{1),2),3)}	36.75 \pm 7.30 ³⁾	47.39 \pm 7.37 ^{1),2),4)}
1h	5.67 \pm 1.86	37.02 \pm 7.46 ^{1),2),3)}	47.71 \pm 7.18 ³⁾	59.74 \pm 10.05 ^{1),2),3)}

注:与 N 组比较,1) $P < 0.01$; 与 C 组比较,2) $P < 0.05$; 与组内前一时点比较,3) $P < 0.05$, 4) $P < 0.01$

2.3 GLT

负荷后 c-AMP 浓度及应答比 (c-AMP answering rate, CAR) H 组显著高于 C 组 ($P < 0.01$) 及 L 组 ($P < 0.01$) 而低于 N 组 ($P < 0.01$); L 组明显低

于 N 组 ($P < 0.01$) 及 C 组 ($P < 0.01$)。H, C, L 各组内时相点间差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (表 3, 图 2)。

表3 血浆 c-AMP 浓度的变化 (pmol/mL, $\bar{x} \pm s$, n = 8)

组别	再灌注 1/4h			再灌注 1/2h			再灌注 1h		
	负荷前	负荷后	应答比(100%)	负荷前	负荷后	应答比(100%)	负荷前	负荷后	应答比(100%)
N	6.91 ± 0.95	55.00 ± 5.91	8.00 ± 0.74	6.93 ± 0.90	55.36 ± 6.67	8.02 ± 0.67	7.13 ± 1.04	56.92 ± 7.46	8.02 ± 0.72
H	4.80 ± 0.73	27.71 ± 4.80 ^{1),2)}	5.77 ± 0.38 ^{1),2)}	3.88 ± 0.78	17.93 ± 2.64 ^{1),2),3)}	4.67 ± 0.41 ^{1),2),3)}	3.28 ± 0.62	13.20 ± 2.48 ^{1),2),3)}	4.02 ± 0.18 ^{1),2),3)}
C	3.23 ± 0.59	12.31 ± 2.21	3.81 ± 0.16	2.05 ± 0.39	6.06 ± 0.61 ³⁾	3.01 ± 0.39 ³⁾	1.78 ± 0.71	4.40 ± 1.57 ⁴⁾	2.52 ± 0.29 ⁴⁾
L	0.95 ± 0.24	1.88 ± 0.39 ^{1),2)}	2.00 ± 0.16 ^{1),2)}	0.91 ± 0.27	1.38 ± 0.34 ^{1),2),3)}	1.53 ± 0.14 ^{1),2),3)}	0.76 ± 0.21	0.95 ± 0.25 ^{1),2),4)}	1.25 ± 0.21 ^{1),2),4)}

注:与 N 组比较,1) P < 0.01; 与 C 组比较,2) P < 0.01; 与组内前一时点比较,3) P < 0.01, 4) P < 0.05

图1 4组大鼠 ICGR₁₅ 试验结果比较

图2 4组大鼠 CAR 比较

2.4 病理组织学改变

N 组肝细胞组织结构形态正常(附图 a)。其余各组肝细胞出现不同程度胞浆疏松化、细胞水肿、灶性细胞空泡变性(附图 b),以小叶中央区明显。汇管区有程度不同的炎性细胞浸润(附图 c),部分

肝细胞胞浆的嗜酸性变性较明显。大片片状溶解坏死,以小叶中央为著(附图 d);各组肝细胞变性程度随再灌注时间的延长而加重,H 组(附图 b)肝组织损伤程度较轻于 C 组(附图 c)及 L 组(附图 d)的相对对应时相点。

a: N 组

b: H 组

c: C 组

d: L 组

附图 4组光镜下病理改变(HE × 400)

3 讨论

肝脏缺血再灌注损伤多发生于休克以及需要阻断肝蒂血流的肝脏外科手术。已有证据表明,大部分损伤发生于再灌注后,且机制十分复杂^[1]。近年来有关上述机制的研究结果主要有:自由基损伤^[2],钙超载^[3],细胞因子^[4],肝细胞线粒体的

功能障碍^[5,6],细胞凋亡^[7],内毒素的损伤,等学说。而从以上机制可看出肝脏能量“危机”是关键问题。目前普遍认为,肝细胞生物能量缺乏是引发热缺血肝脏一系列病理改变的始动因素^[8]。细胞内糖原在缺血肝细胞的能量代谢中起主导作用^[9]。本实验结果显示 GLT(肝储备功能指标之一)在 H 组中显著改善而 L 组中明显恶化,证实

了这一观点。胰高血糖素主要在肝脏代谢,其通过激活腺苷酸环化酶使 ATP 转化为 c-AMP,大部分 c-AMP 在肝细胞内调节糖代谢,小部分 c-AMP 进入血液,并且这两部分 c-AMP 在浓度上密切相关,前者的微小变化可以引起后者较大的变化,并在外源性胰高血糖素的作用下,血中增加的 c-AMP 主要来自肝脏,其增加量与肝细胞数量及其腺苷酸环化酶活性密切相关^[10]。增加细胞内糖原可提高肝细胞 ATP 的含量^[11]。据此推断提高肝糖原可拮抗 IRI,其主要通过以下途径:(1) ATP 含量高, Ca^{2+} -ATP 酶活性增强,抑制 Ca^{2+} 超载。(2) 抑制自由基产生,间接影响有关基因表达^[12]。Bcl-2/bax 分别起抑制和促进细胞凋亡的作用,两者比例失调则促进凋亡^[13,14]。本实验中高糖原组(H组)肝储备功能等指标较C组显著改善,饥饿组(L组)结果则相反。此结果进一步证实肝糖原贮备在拮抗肝 IRI 中起重要作用。

本研究还发现,ICGR₁₅ 和 GLT 两项肝储备功能指标在肝缺血再灌注早期(1/2h)时已出现明显变化(与1/4h比较, $P < 0.05$),而肝酶学指标在此阶段则未发生明显变化,说明肝脏的能量代谢及物质代谢损害性变化较形态学变化为早。CGR15 和 GLT 反映肝储备功能变化趋势一致,提示 GLT 与 ICGR₁₅ 同样适用于肝缺血再灌注过程中肝储备功能变化的动态观察及评价肝活力。管文贤等^[15]实验表明,在兔肝切除时 GLT 能较常规肝功能试验更灵敏和准确,能及时检测轻度肝功能异常。本实验结论类似。

肝储备功能是指肝细胞最大功能的总和。肝 IRI 体现在肝储备功能的损害。同时,只有精确判定肝储备功能,才能正确反映肝功能即肝活力状态。本研究主要从肝储备功能的角度出发,结果表明:(1) 预防性提高大鼠肝糖原贮备能拮抗肝脏热缺血再灌注过程中肝储备功能的损害。提示临床上在阻断肝血流施行复杂的肝脏手术之前,若能增加肝细胞糖原含量,有望减轻肝脏缺血再灌注过程中肝储备功能的损害程度,降低手术风险。(2) GLT 和 ICGR₁₅ 可早期、灵敏地反映肝脏 IRI

过程中肝储备功能的变化,具有临床应用价值。

参考文献:

- [1] Welbourn CRB, Goldman G, Paterson IS. Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: central role of the neutrophil [J]. *Br J Surg*, 1991, 78(6): 651 - 655.
- [2] 孙备,姜洪池,赵金鹏,等. 大鼠肝脏保存再灌注时羟自由基与细胞凋亡、Bcl-2 蛋白表达的关系及丹参的保护作用 [J]. *中华普通外科杂志* 2000, 15(9): 191 - 194.
- [3] Uchida M, Takemoto Y, Nagasue N, *et al.* Calcium in pig liver following ischemia and reperfusion [J]. *Hepatology*, 1994, 20(6): 714 - 719.
- [4] Jaeschke H, Farhood A. Neutrophil and Kupffer cell-induced oxidant stress and ischemia-reperfusion injury in rat liver [J]. *Am J Physiol*, 1991, 260(3 Pt 1): G355 - 362.
- [5] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis [J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1309 - 1312.
- [6] Reed JC. Cytochrome c: can't live with it - can't live without it [J]. *Cell*, 1997, 91(5): 559 - 562.
- [7] Sasaki H, Matsuno T, Tana N, *et al.* Activation of apoptosis during the reperfusion phase after rat liver ischemia [J]. *Transp Proc*, 1996, 28(3): 1908 - 1909.
- [8] Cywes R, Greig PD, Morgan GR, *et al.* Rapid donor liver nutritional enhancement in a large animal model [J]. *Hepatology*, 1992, 16(5): 1271 - 1279.
- [9] Wolf RFE, Hoeven JAB, Kamman RL, *et al.* Tissue PH in cold store human donor livers preserved in University of isconsin solution [J]. *Transplantation*, 1996, 61(1): 66 - 70.
- [10] 管文贤,高志清,付由池. 胰高糖素负荷试验在肝储备功能检测中的作用 [J]. *国外医学临床化学与检验分册*, 1994, 15(5): 281 - 283.
- [11] 汤礼军,田伏洲,王雨,等. 肝细胞内糖原含量与肝脏缺血再灌注损伤关系的实验研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2000, 9(1): 35 - 38.
- [12] 胡国璜,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.
- [13] Yamamoto H, Ohdan H, Shintaku T, *et al.* Analysis of apoptosis - associated genes: Fas Ligand, Bcl - 2 and Bax in the rat liver allograft [J]. *Transplant Proc*, 1998, 30(1): 22 - 24.
- [14] Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, *et al.* Bax directly induces release of cytochrome C from isolated mitochondria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(9): 4997 - 5002.
- [15] 管文贤,高志清,付由池. 胰高糖素负荷试验在肝储备功能检测中的作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 1997, 6(2): 71 - 74.