

文章编号:1005-6947(2007)03-0248-05

· 基础研究 ·

## 二氮嗪预处理抑制大鼠肝缺血再灌注所致 细胞凋亡的延迟保护作用

史卫海<sup>1</sup>, 李文美<sup>2</sup>

(1 江苏大学附属武进医院 普通外科, 江苏 常州 213000; 2 徐州医学院附属医院 普通外科, 江苏 徐州 221002)

**摘要:**目的 探讨二氮嗪(DE)预处理模拟缺血预处理(IP)抑制肝缺血再灌注(I/R)损伤所致细胞凋亡的延迟保护(DP)作用及其可能机制。方法 大鼠随机分为5组:IP组以肝缺血5min作I/R预处理;DE组静脉注射DE作I/R预处理;DE+5-HD组在DE组基础上再予静脉注射5-HD作预处理;对照组(C组)仅以等量生理盐水作预处理;假手术组(S组)仅行2次开腹手术,不作其他处理。4个预处理组均在24h后行肝缺血1h再灌注3h。切取肝组织用免疫组化法检测Bcl-2蛋白表达及用TUNEL法检测肝细胞凋亡,并观察显微结构变化。结果 C组肝细胞凋亡指数(AI)明显高于S组( $P < 0.01$ ),光镜与电镜下肝脏结构损伤明显;IP组与DE组Bcl-2蛋白表达指数(BI)高于C组( $P < 0.01$ ),AI明显低于C组( $P < 0.05$ ),组织损伤也轻于C组;而DE+5-HD组BI低于DE组( $P < 0.01$ ),AI则高于DE组( $P < 0.05$ )。结论 使用DE预处理能模拟IP抗大鼠I/R损伤所致肝细胞凋亡的DP作用,可能系通过诱导肝细胞Bcl-2蛋白表达上调而发挥抗凋亡作用。

[中国普通外科杂志,2007,16(3):248-252]

**关键词:** 肝/血液供给;缺血预处理;缺血再灌注;二氮嗪/药理学;鼠科

中图分类号:R333.4;R619.9

文献标识码:A

## Study on the delayed protection of diazoxide preconditioning inhibition of ischemia/reperfusion induced hepatocyte apoptosis in rats

SHI Wei-hai<sup>1</sup>, LI Wen-mei<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, the Affiliated Wujin Hospital, Jiangsu University, Changzhou Jiangsu 213000, China; 2. Department of General Surgery, the Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

**Abstract: Objective** To determine the delayed protective effect of diazoxide (DE), as an ischemic preconditioning (IPC) simulator, on inhibition of ischemia/reperfusion induced hepatocyte apoptosis in rats.

**Methods** Four groups of SD rats ( $n = 8$  each) were pretreated with: (1) 5-min period of liver ischemia (IPC group); (2) DE 5 mg/kg iv (DE group), (3) DE plus 5-hydroxydecanoate (DE + 5-HD group), and (4) with saline (control or C group). Twenty-four hours later, the pretreated rats were subjected to 60-min sustained liver ischemia followed by 180-min reperfusion. All rats were only subjected to 70% liver ischemia. An additional fifth (S) group of rats (sham group) was set up, in which only anesthesia and laparotomy were performed twice. Finally, liver samples were obtained to determine apoptotic cells by TUNEL, and the expressions of Bcl-2 protein by immunohistochemical technique, and pathology. **Results** Apoptosis index were higher in C group than those in S group ( $P < 0.01$ ). There were also severe morphologic damages in C group. The levels of expression of Bcl-2 protein were increased ( $P < 0.01$ ) and

收稿日期:2006-02-25; 修订日期:2006-11-16。

作者简介:史卫海,男,江苏连云港人,江苏大学附属武进医院主治医师,主要从事肝缺血保护方面的研究。

通讯作者:史卫海 E-mail:ocean123789@sohu.com。

apoptosis index were decreased ( $P < 0.05$ ) in IPC group and DE group compared with C group. DE + 5-HD group had the opposite changes, contrasted to DE group ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusions** DE can mimic the delayed protective effects of IPC, and induce delayed protection against hepatocyte apoptosis, possibly due to increased expression of the Bcl-2 protein.

[ Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16 (3) : 248 - 252 ]

**Key words:** Liver/blood supply; Ischemic preconditioning; Ischemic-reperfusion; Diazoxide/pharmacology; Muridae

**CLC number:** R333.4; R619.9

**Document code:** A

肝脏的缺血/再灌注(I/R)损伤常是临床上造成术后肝衰竭或移植肝无功能的主要原因之一。如何有效地预防或减轻肝脏I/R损伤一直是肝脏外科的重要研究课题。缺血预处理(IP)是一种能通过触发机体组织内源性抗损伤机制而发挥抗肝脏I/R损伤的方法;它不但存在即时的早期保护(early protection, EP)作用,而且24h后还具有延迟保护(delayed protection, DP)作用<sup>[1-4]</sup>。由于临床进行IP方法上受到一定限制,因而近年采用药物模拟IP以实现其保护作用。药物预处理渐成为研究重点之一。IP具有抑制肝I/R损伤所致细胞凋亡的DP作用,本研究旨在探讨二氮嗪(diazoxide, DE)是否能够模拟这种作用及其可能机制,为临床药物预处理防治肝脏I/R损伤提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

健康雄性SD大鼠40只,体重250~280g,购于徐州医学院实验动物中心。线粒体ATP敏感性钾通道(mitochondrial ATP-sensitive potassium channels, mitoKATP通道)选择性开放剂DE及阻滞剂5-HD购于Sigma公司。Bcl-2抗体(浓缩型,兔来源)购于Santa Cruz公司。过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)免疫组织化学试剂盒及TUNEL试剂盒购于北京中山生物工程公司。

### 1.2 动物模型制备及分组

大鼠术前禁食12h,自由饮水,20%乌拉坦腹腔注射(1g/kg)麻醉,取正中切口入腹。按文献<sup>[5]</sup>的方法建立大鼠肝脏部分I/R模型:用小号无损伤血管夹夹闭肝左中叶肝蒂,造成约70%的肝脏热缺血。

将大鼠随机分成5组,每组8只。(1)IP组:阻断肝左中叶入肝血流5min后开放,24h后再开腹重新阻断1h后再灌注3h。(2)DE组:使用微量注射泵经大鼠门静脉注入DE(5mg/kg,按每

80mg溶解于5mL 0.1mol/L的NaOH溶液中,再用蒸馏水稀释成40mL<sup>[6]</sup>),时间为10min,24h后处理同IP组。(3)DE+5-HD组:注射DE之前静脉注射5-HD(5mg/kg,按每80mg溶于80mL生理盐水<sup>[6]</sup>),时间为10min,余同DE组。(4)对照组(C组):等量生理盐水同法注射,24h后处理与IP组。(5)假手术组(S组):仅行同样时间的2次麻醉开腹,分离肝蒂,不进一步处理。

### 1.3 指标测定

各组大鼠在2次麻醉开腹完成预定实验操作后即刻取材。

1.3.1 标本制备 切取各组大鼠肝中叶约1.0cm×0.5cm×0.2cm组织块,10%中性甲醛固定,制成石蜡包块,切片(5μm)。切取S组,I/R组,IP组和DE组大鼠肝左叶约1mm×1mm×1mm组织块,4%戊二醛固定,备用用于电镜观察。

1.3.2 Bcl-2蛋白检测 采用三步法SP免疫组化染色。步骤按说明书进行。使用DAB显色试剂盒显色,苏木素复染。阴性对照用磷酸盐缓冲液代替一抗。结果判断:光镜下(×400),胞浆呈棕色为蛋白表达阳性。随机选择5个视野,计算肝细胞Bcl-2蛋白表达指数BI(BI=阳性细胞数/所计细胞数×100%)。

1.3.3 凋亡细胞检测 采用原位末端标记法(TUNEL)显示凋亡细胞。各组随机选取6只。具体步骤按说明书进行。结果判断:细胞核染成棕黄色的为凋亡阳性细胞。每张切片光镜下(×400)随机选择10个区域,计算出肝细胞TUNEL标记阳性率,即凋亡指数AI(AI=阳性细胞数/所计细胞数×100%)。

1.3.4 肝组织学检查 石蜡切片苏木素-伊红染色,光镜观察显微结构变化。电镜标本按以下步骤处理:饿酸后固定2h;乙醇丙酮依次梯度脱水,每级10min;丙酮环氧树脂混合液浸泡;纯环氧树脂包埋液浸泡3h;环氧树脂液包埋聚合成块;修块,超薄切片;铅铀双重染色,透射电镜观察。

## 1.4 统计学处理

结果以均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。用 SPSS11.5 统计软件进行单因素方差分析。各实验组间的两两比较采用  $q$  检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 肝细胞 Bcl-2 蛋白表达指数 (BI)

IP 组与 DE 组中肝细胞 BI 值均明显高于 S 组、C 组和 DE + 5-HD 组均 ( $P < 0.01$ )；IP 组和 DE 组无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (表 1) (图 1)。

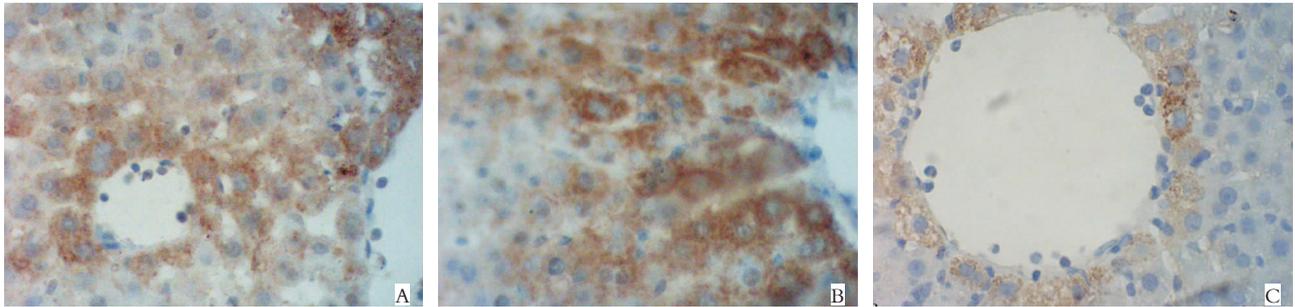


图 1 肝细胞胞浆染成棕黄色的为 Bcl-2 蛋白表达阳性(S-P  $\times 400$ ) A:IP 组;B:DE 组;C:DE + 5-HD 组

### 2.2 肝细胞凋亡指数 (AI)

C 组 AI 值明显高于 S 组 ( $P < 0.01$ )；IP 组与 DE 组的 AI 值均明显低于 C 组 ( $P < 0.05$ )，但仍高于 S 组 ( $P < 0.01$ )；DE + 5-HD 组的 AI 值高于 DE 组和 IP 组 (均  $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 2 各组肝细胞 AI 值 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	N	AI (%)
S	6	$0.48 \pm 0.16$
C	6	$9.69 \pm 2.21^{1),2),3)}$
IP	6	$4.60 \pm 0.89^{1)}$
DE	6	$4.90 \pm 0.98^{1)}$
DE + 5-HD	6	$8.79 \pm 1.90^{1),2),3)}$

注:1)与 S 组比较,  $P < 0.01$ ;2)与 IP 组比较,  $P < 0.05$ ;3)与 DE 组比较,  $P < 0.05$

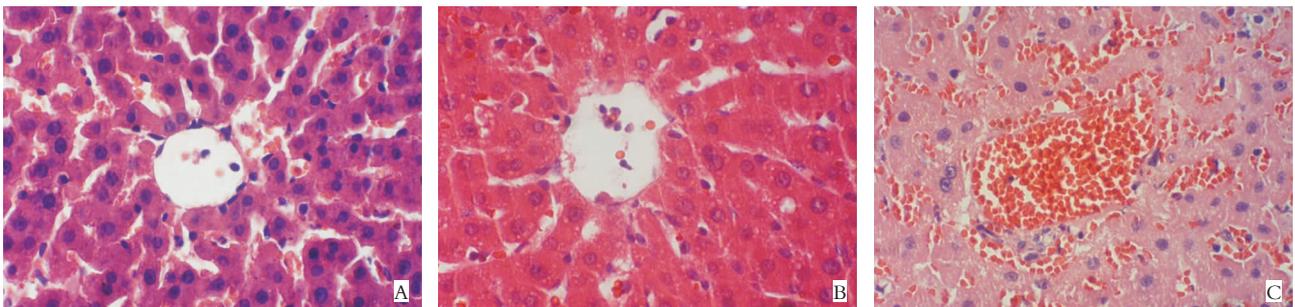


图 2 肝组织学光镜下结构改变(HE  $\times 400$ ) A:IP 组;B:DE 组;C:DE + 5-HD 组

表 1 各组肝细胞 BI 值 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	BI (%)
S	8	$10.13 \pm 3.94^{1),2)}$
C	8	$8.12 \pm 2.42^{1),2)}$
IP	8	$26.75 \pm 6.56$
DE	8	$22.50 \pm 6.50$
DE + 5-HD	8	$6.75 \pm 2.12^{1),2)}$

注:1)与 IP 组比较,  $P < 0.01$ ;2)与 DE 组比较,  $P < 0.01$

### 2.3 肝组织的结构改变

2.3.1 光镜下所见 S 组肝小叶、中央静脉、汇管区结构清晰,无明显炎性细胞浸润。C 组肝细胞、窦内皮细胞肿胀,水肿变性,肝窦淤血明显,窦索结构紊乱,炎症细胞浸润。中央静脉部分内皮剥脱,周围部分肝细胞空泡样改变,肝小叶内及靠近汇管区内可见多发性灶性坏死。IP 组肝细胞损伤明显轻于 C 组,肝汇管区中央静脉结构基本正常,无明显变形;肝窦索结构清晰,肝细胞轻度肿胀,无明显坏死。DE 组与 IP 组相似,但肝细胞肿胀比后者稍明显。DE + 5-HD 组细胞损伤明显重于 DE 组 (图 2)。

2.3.2 电镜超微结构 S组细胞核膜完整,核仁清楚,染色质分布均匀,线粒体呈圆形或椭圆形整齐排列,无肿胀,线粒体膜完整,嵴呈同心圆或纵形排列,嵴密集清晰。C组IP组及DE组均出现凋亡细胞。C组核膜增厚,染色质边集,凋亡细胞染色质固缩并凝结成块。线粒体排列紊乱,

损伤严重,肿胀,膜模糊不清,部分膜破裂,嵴明显疏松溶解或断裂,基质大量空泡形成。IP组细胞核及线粒体结构基本正常,线粒体电子密度增高,可见基质容积有一定程度的增加。DE组线粒体结构基本正常,排列整齐,膜基本完整,嵴密集,基质容积轻度增加,无空泡形成(图3)。

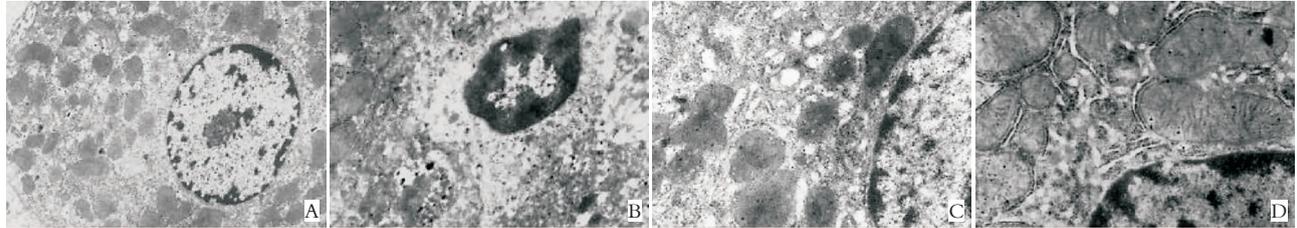


图3 肝组织学电镜下结构改变 A:S组( $\times 5\ 000$ );B:C组( $\times 20\ 000$ );C:IP组( $\times 20\ 000$ );D:DE组( $\times 20\ 000$ )

### 3 讨论

IP的目的是预先给器官组织1次或多次短暂I/R之后,能增强其对随后较长时间的缺血产生显著的耐受性。该现象首先由Murry等<sup>[1]</sup>在心脏实验中发现并命名。IP对缺血心肌保护具有时相性,即EP作用在IP后数分钟形成,并维持2~3h后消失,DP作用在IP之后24h出现并可持续3~4d。后者时间较长,且可通过药物激发并维持<sup>[2]</sup>。研究<sup>[7-8]</sup>表明,IPC对正常肝与硬化肝的I/R损伤均具有明显的EP作用。本课题前期实验<sup>[4]</sup>显示,使用DE预处理能模拟出IPC对大鼠肝脏I/R损伤的DP作用,表现为提高肝脏抗氧化能力,改善肝组织微循环,减轻肝脏水肿。

凋亡是造成肝脏I/R后肝细胞死亡的方式之一<sup>[7]</sup>,多发生在再灌注后早期,其程度与I/R损伤的生物化学及病理学变化呈正相关<sup>[9]</sup>。肝脏及心肌IP的EP作用能上调Bcl-2蛋白的表达,起抗凋亡的作用。使用DE对心肌进行预处理具有抗凋亡的DP作用<sup>[2]</sup>。至于DE在肝脏是否有相似的DP作用目前尚未见有关报道。

本实验结果显示IP对大鼠肝脏的I/R损伤具有明显抗凋亡的DP作用,具体表现在肝细胞凋亡抑制蛋白Bcl-2表达明显高于对照组( $P < 0.01$ ),AI值明显低于对照组( $P < 0.05$ )。说明Bcl-2蛋白被IP激发表达,抑制和减少了I/R损伤所诱发的肝细胞凋亡。DE预处理同样

能显示出这种抗凋亡作用,而使用mitoKATP通道特异性阻滞剂5-HD可阻断DE的保护效应。结合组织学检查发现,光镜下IP组和DE组肝细胞损害明显轻于C组,DE+5-HD组明显重于DE组。电镜下C组、IP组和DE组均发现凋亡细胞,但C组中肝细胞超微结构有不可逆损害,IP组和DE组肝细胞超微结构损害相对较轻,尤其是线粒体保存基本完好。上述结果表明IP及DE对I/R损伤有DP作用,mitoKATP通道的开放参与了IPC的DP作用。IP组AI值低于C组( $P < 0.05$ ),IP组和C组AI值明显高于S组( $P < 0.01$ ),表明细胞凋亡主要为I/R损伤所引起,而非单纯手术创伤所致。

Bcl-2家族是最先被注意到与细胞凋亡有密切关系的基因之一。若Bcl-2蛋白表达降低,会导致肝细胞在I/R后出现凋亡<sup>[10]</sup>。其可能的作用途径有<sup>[11-12]</sup>:(1)通过作用于线粒体,阻断凋亡诱导因子参与Caspase 3活化的Cytc释放,或通过阻止促凋亡基因信号传递,发挥阻止细胞凋亡程序启动的作用;(2)抑制氧自由基的氧化作用,从而抑制凋亡;(3)通过促进NF- $\kappa$ B的抑制物I- $\kappa$ B的降解而活化具有抗凋亡作用的NF- $\kappa$ B信号转导通路。(4)与Bax蛋白形成二聚体,阻止其诱导的凋亡。

本实验中Bcl-2蛋白表达S组与C组无显著性差异( $P > 0.05$ )。但为何C组AI值高于S组?可能与I/R过程中同时还有其他凋亡相关蛋白

存在并起作用有关。IP 抗肝脏 I/R 损伤的 DP 机制比较复杂,可能有多种因素参与或介导这一作用过程。其确切的分子机制尚待深入研究。

DE 又名降压嗪,是已知的抗高血压药物,来源和使用较方便。该药对肝脏 I/R 损伤的 DP 作用<sup>[4]</sup>可望为临床进行药物预处理防治肝 I/R 损伤提供一种新的思路。

#### 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):1124-1136.
- [2] Bolli R. The late phase of preconditioning [J]. *Circ Res*, 2000,87(11):972-983.
- [3] Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003,284(1):G15-G26.
- [4] 史卫海,李文美. 二氮嗪预处理对大鼠肝脏缺血/再灌注损伤的延迟作用[J]. *徐州医学院学报*,2005,25(3):227-230.
- [5] Yoshizumi T, Yanaga K, Soejima T, *et al.* Amelioration of liver injury by ischaemic preconditioning [J]. *Bri J Surg*, 1998,85(12):1636-1640.
- [6] Ramzi O, Venkata R. E, Shinji O, *et al.* Opening of mitochondrial KATP channel induces early and delayed cardioprotective effect: role of nitric oxide [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1999,277(6):2425-2434.
- [7] 陈能志,吕新生,魏尚典. 缺血预处理和 Caspase 抑制剂对缺血再灌注损伤保护作用的比较[J]. *中国普通外科杂志*, 2003,12(11):827-830.
- [8] 李文美,陈坚,路遼阳,等. 缺血预处理对肝硬化大鼠肝缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2002,11(1):23-25.
- [9] Kou PC, Drachenberg CI, A de la Torre, *et al.* Apoptosis and hepatic allograft reperfusion injury [J]. *Clin Transplant*, 1998,12(3):219-23.
- [10] Lai WY, Chen CT, Cheng CL, *et al.* Delayed onset of apoptosis following ischemia/reperfusion in rat liver: downregulation of bax gene [J]. *Transplant Proc*, 1999,31(7):2924-2925.
- [11] Willis S, Catherine L. Day, Mark G. Hinds, *et al.* The Bcl-2-regulated apoptotic pathway [J]. *Cell Sci*, 2003,116(10):4053-4056.
- [12] Borner C. The Bcl-2 Protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions [J]. *Mol Immunol*, 2003,39(11):615-647.

## 关于优先处理、录用课题论文的启事

为及时反映全国各地临床医学的新成果、新技术、本刊将对获得国家、省、市等各类科研基金资助、立项课题的来稿,尽快审稿,对可用稿件尽快刊登。敬请全国各地医药科研临床工作者踊跃投稿。投稿时请附相关材料、资助项目文件的复印件、单位介绍信,并在稿件左下方脚注中注明基金资助项目名称、编号。

## 关于征求论文获奖证书的启事

刊出论文获奖情况是检验期刊质量的一项重要指标,也是对作者及编者工作的肯定。《中国普通外科杂志》在广大作者、读者的支持下,近年来得到了长足的发展和进步,据有关权威机构统计分析其影响因子已居同类期刊前列。为了进一步提高办刊质量,收集各方面反馈信息,编辑部敬请在本刊已发表论文并获得各种奖励者将获奖证书及相关资料复印件寄本刊编辑部。凡寄回获奖证明者可优先发表论文,谢谢合作。

中国普通外科杂志编辑部