

· 研究报告 ·

牛磺酸对兔肝脏缺血-再灌注损伤保护作用的研究

佟立权 乔海泉 周保国 孟凡强 王毓利

【关键词】 牛磺酸; 缺血-再灌注损伤; 兔

本实验拟观察牛磺酸对兔肝脏缺血-再灌注损伤的保护作用,旨在寻求一种可靠的肝细胞保护剂,以减轻肝脏外科实践中缺血-再灌注所造成的肝细胞损伤,报告如下。

1 材料与方

1.1 动物及药品:24 只新西兰大耳白兔,雌雄不拘,体重 2.0~2.5 kg,由哈尔滨医科大学附属第一医院动物中心提供;牛磺酸制剂购自 Sigma 公司。

1.2 实验方法:实验动物按随机数字表法分成假手术组、对照组和实验组,每组 8 只。动物实验前 12 h 禁食,自由饮水。制备常温下肝脏热缺血-再灌注损伤动物模型。用质量分数为 2% 的戊巴比妥钠 (25 mg/kg) 静脉注射麻醉,腹正中切口,探查各脏器无病变后显露第一肝门,用无损血管钳夹闭肝蒂(将门静脉、胆总管、肝动脉及进入肝脏的小动脉一并夹闭);用巾钳暂时关闭腹腔,上敷庆大霉素盐水纱布,阻断血流 30 min 后,放开血管钳恢复血流再灌注。假手术组仅开腹游离肝门而不阻断血管,实验组术前从兔耳缘静脉缓慢推注牛磺酸 (200 mg/kg),对照组术前给予等量生理盐水。

1.3 观察指标

1.3.1 恢复血流前后观察术野情况。

1.3.2 生化指标:分别于缺血后再灌注 0 min、30 min、2 d 和 4 d 时抽取颈静脉血,测定丙氨酸转氨酶 (ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平。

1.3.3 病理学观察:与生化指标同步时间切取兔肝组织,分成两块,一块以体积分数为 10% 的甲醛固定,石蜡包埋,常规苏木素-伊红 (HE) 染色,光镜观察;另一块用体积分数为 5% 的戊二醛固定,

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院普外科

作者简介:佟立权 (1969-),男(满族),黑龙江省大庆市人,博士研究生,副教授,主编、参编专著各 1 部,曾获市级科技进步一、三等奖各 1 项,发表论文 13 篇,其中 SCI 1 篇 (Email:tlq77666@163.com)。

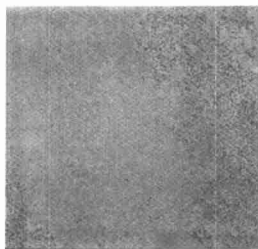


图 1 对照组再灌注 2 d 光镜下病理学变化 (HE, ×200)

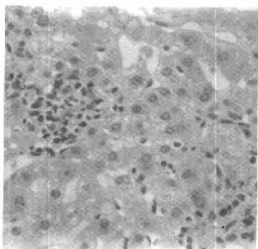


图 3 实验组再灌注 2 d 光镜下病理学变化 (HE, ×400)

Epom 812 包埋,超薄切片,醋酸铀-枸橼酸铅(铅-铀)染色,透射电镜观察。

1.4 统计学方法:所有数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 统计软件包进行 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牛磺酸对兔肝脏缺血-再灌注损伤血清 ALT 和 AST 的影响见表 1。

2.2 形态学观察

2.2.1 肉眼观察:阻断血流 30 min 时,实验组和对照组腹内浆膜面有少量澄清浆液性渗出液,肝表面颜色变暗,胃、小肠、结肠及网膜、系膜等门静脉系紧张、淤血,胃结肠呈青紫色,胃和小肠壁可见较广泛的暗红色针尖大小出血点,结肠未见出血点。恢复血流后胃肠和肝脏的颜色迅速复原,但上述出血点在关腹时

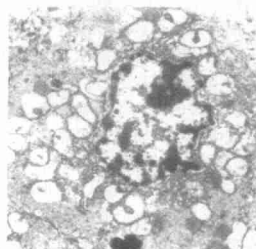


图 2 对照组再灌注 2 d 透射电镜下病理学变化 (铅-铀, ×8 000)

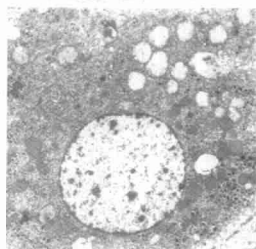


图 4 实验组再灌注 2 d 透射电镜下病理学变化 (铅-铀, ×6 000)

未见消退。假手术组无任何改变。

2.2.2 光镜观察:恢复血流 0 min 时,对照组肝细胞出现混浊肿胀、空泡样变性,并有炎细胞浸润和轻度淤血等表现,且随着再灌注时间的延长逐渐加重;2 d 时最重(图 1);以后逐渐减轻,4 d 时部分肝细胞恢复正常。

2.2.3 电镜观察:恢复血流 0 min 时,对照组肝细胞糖原明显减少,线粒体肿胀,基质密度下降,内质网扩张,核形不整,染色质有些凝集,溶酶体增多。随着再灌注时间的延长,上述变化逐渐加重,2 d 时出现线粒体空泡样变,内皮细胞失去连续性,核形不整,核固缩明显,部分核溶解(图 2);4 d 时肝细胞线粒体轻度肿胀,内质网轻度扩张,核形部分不整,实验组的病理改变均明显轻于相应时间点的对照组(图 3 和图 4)。

表 1 各组动物术后不同时间点 ALT 和 AST 的变化 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

U/L

组别	ALT				AST			
	再灌注 0 min	再灌注 30 min	再灌注 2 d	再灌注 4 d	再灌注 0 min	再灌注 30 min	再灌注 2 d	再灌注 4 d
假手术组	27±17	28±16	28±15	28±18	29±5	30±6	31±6	29±7
对照组	125±13*	171±67*	494±57*	84±20*	96±35*	111±19*	289±28*	72±8*
实验组	60±20*△	89±28*△	189±48*△	56±15*△	51±13*△	74±17*△	122±18*△	50±10*△

注:与假手术组比较,* $P<0.01$,与对照组比较,△ $P<0.01$

3 讨论

肝脏外科作为治疗多种良、恶性肝胆疾病的有效手段而应用于临床,但术中常常需常温下阻断入肝血流,这势必造成肝脏缺血-再灌注损伤。因此,如何减轻常温下肝脏缺血-再灌注损伤具有广泛的临床意义。既往研究已证实,肝细胞内氧自由基(OFR)过量产生及钙离子超载是肝脏缺血-再灌注损伤的两个基本病理机制^[1];OFR 可直接与细胞膜发生脂质过氧化反应,造成膜通透性障碍;钙超载可激活细胞内磷脂酶、蛋白酶等,导致膜性结构破坏;促进 OFR 产生,线粒体钙超载使其呼吸功能受损;激活枯否细胞(KC),释放大量肿瘤坏死因子(TNF),诱发肝细胞凋亡^[2];激活内源性核酸内切酶,引起 DNA 断裂,促进细胞凋亡。有研究表明,Bax 蛋白迁移与肝缺血-再灌注时肝细胞凋亡直接相关^[3]。

在肝热缺血中,ALT 是对肝细胞急性损害程度的重要敏感观察指标^[4]。实验中我们观察到:从再灌注开始,对照组 ALT 就明显升高,2 d 时达正常值的近 20 倍,而实验组 ALT 则显著降低,AST 的变化与 ALT 具有相同趋势;与血清生化测定同步进行的光镜和电镜结果也证实,牛磺酸对兔肝脏具有明显的保护作用。另外,本实验中采用缺血 30 min 的时限,主要是因为需要保证术后动物的存活,在这一时限内肝细胞内溶酶体尚未破坏,肝细胞尚未达到坏死的程度,电镜下观察对照组和实验组得以证实。

牛磺酸是一种含硫的 β-氨基磺酸,易溶于水,为游离氨基酸,无毒副作用。它能同时对 OFR 损伤和调节细胞钙稳定,这与以往的肝细胞保护剂不同^[5]。

我们推测牛磺酸的这一保护作用与以下

几点有关:①牛磺酸具有钙稳定作用。牛磺酸在细胞内低钙时促进钙内流,高钙时减少钙内流,同时还能增加钙离子与某些细胞成分的亲和力以降低胞浆中的钙离子浓度。另外,在细胞膜上还存在着某些牛磺酸敏感的钙离子转运蛋白,可根据细胞内钙水平调节钙转运。有实验证实,血清牛磺酸水平是评价组织器官缺血-再灌注程度的敏感指标^[6]。②牛磺酸具有膜稳定作用。牛磺酸可与膜上特定结构结合,维持不饱和氨基酸数量,保证膜有良好的流动性及工作状态,因此,可延缓或扭转细胞向不可逆损伤发展的趋势。Calza 等^[7]在临床中发现,心肌细胞内牛磺酸的释放反映了心肌细胞膜的损伤程度,并建议将血浆牛磺酸水平用来评价组织器官耐受缺血-再灌注损伤的情况。③牛磺酸具有抗自由基作用。牛磺酸有直接与自由基反应从而将自由基消除的作用;牛磺酸在缺血-再灌注初期供氧不足的情况下可作为能量来源,减少由 ATP 生成的次黄嘌呤,从而减少自由基的生成;牛磺酸可增加 Cl⁻ 通透性,防止细胞膜的渗漏以及离子和水转移造成的细胞破裂。同时,由于牛磺酸具有抗自由基作用,可以减少膜的脂质过氧化反应,从而稳定膜结构和功能^[8]。Foley 等^[9]的实验表明,在对猪进行肝移植时,牛磺酸可明显保护供肝对抗缺血-再灌注损伤,大大提高了移植术后成活和功能的恢复。

综上所述我们认为:牛磺酸对兔肝脏缺血-再灌注损伤具有明显的保护作用,临床中可以开展应用牛磺酸作为肝细胞保护剂的试验。

参考文献:

1 王万铁,徐正衿,林丽娜,等.川芎嗪抗肝

缺血-再灌注损伤作用机制的实验研究[J].中国中西医结合急救杂志,2002,9:216-218.

2 王晓琳,刘荣,王和玫,等.蛋白酶抑制剂对肝缺血-再灌注损伤的保护作用[J].中国危重病急救医学,2002,14:356-358.

3 Ishigami F, Naka S, Takeshita K, et al. Bile salt tauroursode- oxycholic acid modulation of Bax translocation to mitochondria protects the liver from warm ischemia - reperfusion injury in the rat [J]. Transplantation, 2001, 72: 1803 - 1807.

4 林丽娜,王万铁,吴进泽,等.异丙酚对围术期缺血-再灌注损伤肝脏的保护作用[J].中国危重病急救医学,2004,16:42-44.

5 Falasca L, Tisone G, Palmieri G, et al. Protective role of tauroursodeoxycholate during harvesting and cold storage of human liver; a pilot study in transplant recipients[J]. Transplantation, 2001, 71: 1268 - 1276.

6 Nanobashvili J, Neumayer C, Fugl A, et al. Ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle; plasma taurine as a measure of tissue damage [J]. Surgery, 2003,133:91-100.

7 Calza G, Lerzo F, Perfumo F, et al. Clinical evaluation of oxidative stress and myocardial reperfusion injury in pediatric cardiac surgery [J]. J Cardiovasc Surg, 2002,43:441-447.

8 何芳,邓峰美,孙志萍,等.一氧化氮在失血性休克再灌注损伤中的作用及牛磺酸的影响[J].中国病理生理杂志,2003,19:1391-1394.

9 Foley D P, Ricciardi R, Traylor A N, et al. Effect of hepatic artery flow on bile secretory function after cold ischemia[J]. Am J Transplant, 2003, 3:148 - 155.

(收稿日期:2005-06-21

修回日期:2005-09-10)

(本文编辑:李银平)

热烈祝贺北京医学会危重病专业委员会成立