

潘生丁预处理对大鼠肝缺血/再灌注损伤的保护作用

洪勇 廖文胜 莫瑞祥

【摘要】 目的 探讨潘生丁预处理对肝缺血/再灌注损伤的保护作用。方法 SD 大鼠 30 只,随机分为假手术组、缺血/再灌注组及潘生丁组,每组 10 只。常温下制备大鼠肝缺血/再灌注损伤模型,潘生丁组于缺血前 30 min 经门静脉给予潘生丁 10 mg/kg 加生理盐水至 0.5 ml,假手术组和缺血/再灌注组注入等量生理盐水,用小号无损伤钳阻断肝门 45 min 后恢复血流灌注,并于 1 h 后取门静脉血测定血清丙氨酸转氨酶(ALT)、乳酸脱氢酶(LDH)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及内皮素-1(ET-1),同时取肝组织行病理组织学检查及腺苷酸含量测定。结果 缺血/再灌注组血清 ALT、LDH、TNF- α 及 ET-1 均明显高于假手术组,潘生丁组则明显低于缺血/再灌注组(P 均 <0.01)。缺血/再灌注组肝组织中腺苷酸含量明显低于假手术组,潘生丁组则明显高于缺血/再灌注组(P 均 <0.01)。潘生丁组肝组织病理组织学改变明显轻于缺血/再灌注组,并接近假手术组。结论 潘生丁预处理对肝缺血/再灌注损伤具有保护作用。

【关键词】 潘生丁; 缺血/再灌注损伤,肝; 腺苷酸

Dipyridamole preconditioning protects against ischemia/reperfusion injury of rat liver HONG Yong, LIAO Wen-sheng, MO Rui-xiang. Department of Hepatobiliary Surgery, Nanxishan Hospital, Guilin Medical College, Guilin 541002, Guangxi, China

【Abstract】 Objective To investigate the protective mechanism of dipyridamole preconditioning against hepatic ischemia/reperfusion injury. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into normal control group, ischemia/reperfusion group, and dipyridamole group, with 10 rats in each group. Using 45-minute ischemia/reperfusion rat model at normal temperature, 10 mg/kg of dipyridamole + normal saline were injected into portal vein before ischemia. Only normal saline was injected in the ischemia/reperfusion group. An hour later, blood was obtained from the portal vein to determine the enzyme levels, including alanine aminotransferase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH) and tumor necrosis factor - α (TNF - α), and endothelin - 1 (ET - 1). The alteration in pathological morphology of the ischemia lobe was observed. The content of adenosine phosphates in the liver was determined. **Results** The ALT and LDH activity, TNF - α , ET - 1 levels were significantly higher in the ischemia/reperfusion group than those in the control group (all $P < 0.01$). The levels of these variables were much lower in the dipyridamole group than those of the ischemia/reperfusion group ($P < 0.01$), but little higher than those of the control group ($P > 0.05$). The adenosine phosphates levels of ischemia/reperfusion group were significantly lower than those of the control group ($P < 0.01$). They were much higher in the dipyridamole group than those of the ischemia/reperfusion group ($P < 0.01$), but little higher than those of the control group ($P > 0.05$). The control group had obvious alteration in pathological morphology, but only slight alteration was found in dipyridamole group, compared with control group. **Conclusion** Dipyridamole preconditioning protects against ischemia/reperfusion injury of the liver.

【Key words】 dipyridamole; hepatic ischemia/reperfusion injury; adenosine

一般认为,肝缺血/再灌注损伤经历两个阶段:初期是由活化的非实质细胞释放肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、内皮素-1(ET-1)等细胞因子,造成对肝细胞的直接损害;后期是由中性粒细胞介导的损伤,均可使转氨酶及肝组织学发生变化。本实验中采用大鼠肝缺血/再灌注损伤模型,研究潘生丁对肝缺血/再灌注损伤保护作用的机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组:SD 大鼠 30 只,雌雄不拘,

作者单位:541002 广西,桂林医学院附属南溪山医院肝胆外科
作者简介:洪勇(1971-),男(汉族),江西宜春人,医学硕士,主治医师,参与多项省市级课题,发表论文 10 余篇,研究方向为肝移植、肝肿瘤(Email:hongyong0001@126.com)。

体重 200~250 g。按随机数字表法分成假手术组、缺血/再灌注组及潘生丁组,每组 10 只。

1.2 动物模型制备:大鼠在手术前夜禁食、不禁饮,腹腔注射氯胺酮麻醉。建立尾静脉通路并间断输液,予以全身肝素化(200 U/kg)。取腹部正中切口,将剑突牵向上方,游离肝脏周围韧带,解剖肝门,小号无损伤钳阻断肝门 45 min 后开放,恢复血供,建立肝缺血/再灌注模型。阻断前 30 min 潘生丁组由门静脉注入潘生丁 10 mg/kg 加生理盐水至 0.5 ml;假手术组和缺血/再灌注组则注入等量生理盐水。假手术组只行肝周围韧带游离,而不阻断肝脏血供。1 h 后,取门静脉血 3~4 ml,其中 1 ml 抗凝后,按

3 000 r/min (离心半径 8 cm) 离心 10 min, 留取血浆; 剩余门静脉血以 3 000 r/min 离心 10 min, 留取血浆, 分成两等份, 每份血浆约 0.5 ml, 置于 -20 ℃ 冰箱中保存待检。同时切取大鼠 0.5 cm × 0.5 cm 大小肝组织, 以体积分数为 10% 的甲醛固定备检。留取大部分肝组织用于测定腺苷酸含量。

1.3 检测指标以及方法: ①血清丙氨酸转氨酶 (ALT) 及乳酸脱氢酶 (LDH) 测定: 采用多功能生化分析仪测定; ②血清 ET-1 及 TNF- α 测定: 采用 γ 放射免疫计数器; ③病理组织学观察: 所取肝组织行常规石蜡包埋、切片、苏木素-伊红 (HE) 染色, 置光镜下观察肝组织的病理改变; ④肝组织腺苷酸含量测定^[1]: 采用高效液相色谱法, 各组经实验处理后, 摘取动物肝脏, 用生理盐水冲洗血迹, 拭干后称取 20~30 g 肝组织, 按比例加入生理盐水, 匀浆, 制成质量分数为 10% 的组织匀浆液, 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液测腺苷酸含量。检测仪器: 美国 BECKMEN System Gold 126 型程序控制式输液泵, 166 型可编程紫外检测器, PC8300 型 NEC 系统控制器, SP-4270 型积分仪, AUTEX210A 型进样阀, Rheodyne 702-SNR 微量加样器。分离与检测条件: 国家 ODS 反相柱; 流动相为 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液和体积分数为 25% 的甲醇混合液; 流速为 1.0 ml/min; 紫外检测波长为 254 nm。

1.4 统计学处理: 结果以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析及 q 检验, 检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各组血清 ALT、LDH、ET-1 和 TNF- α 水平比较 (表 1): 缺血/再灌注组 ALT、LDH 及 ET-1、TNF- α 水平均显著高于假手术组 (P 均 <0.01); 潘生丁组上述各项指标稍高于假手术组, 但明显低于缺血/再灌注组 (P 均 <0.01)。

2.2 各组肝组织腺苷酸含量比较 (表 1): 缺血/再灌注组肝组织腺苷酸含量明显降低 (P 均 <0.01), 潘生丁组上述各项指标稍高于假手术组, 但明显高于缺血/再灌注组 (P 均 <0.01)。

表 1 各组大鼠血清 ALT 和 LDH 活性及 ET-1、TNF- α 及腺苷酸含量比较 ($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Comparison of serum ALT, LDH activity, ET-1, TNF- α concentration in serum and adenosine phosphates concentrations in liver among the groups ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	ALT(U/L)	LDH(U/L)	ET-1(ng/L)	TNF- α (μ g/L)	AMP(μ mol/L)	ADP(μ mol/L)	ATP(μ mol/L)
假手术组	60.4 ± 22.6	450.3 ± 165.7	287.5 ± 75.6	0.621 ± 0.124	21.82 ± 4.46	11.86 ± 5.39	13.89 ± 4.65
缺血/再灌注组	142.3 ± 27.8*	2 637.5 ± 745.9*	563.5 ± 56.9*	1.674 ± 0.465*	13.45 ± 3.12*	2.79 ± 1.83*	3.93 ± 1.29*
潘生丁组	81.2 ± 18.9 ^a	574.9 ± 215.3 ^a	325.6 ± 43.2 ^a	0.796 ± 0.241 ^a	22.36 ± 5.47 ^a	12.72 ± 5.67 ^a	14.82 ± 5.43 ^a

注: 与假手术组比较: * $P < 0.01$; 与缺血/再灌注组比较: ^a $P < 0.01$; AMP 为一磷酸腺苷, ADP 为二磷酸腺苷, ATP 为三磷酸腺苷

2.3 肝病理组织学改变: 光镜下假手术组肝组织结构清楚, 汇管区、小叶中央静脉、肝细胞索及肝窦结构清晰, 肝细胞索排列正常, 肝细胞无变性、坏死, 肝窦内皮清楚。潘生丁组肝窦、肝细胞索结构清晰, 细胞轻度肿胀, 无细胞坏死 (彩色插页图 1)。缺血/再灌注组肝细胞肿胀、水样变性明显, 少量点状、灶状肝细胞坏死, 网状纤维支架有塌陷, 并伴有淤血和炎性细胞浸润 (彩色插页图 2)。

3 讨论

目前认为, 肝缺血/再灌注损伤是一种组织功能障碍, 而恢复血流供应后, 则会激发缺血组织一系列复杂的级联反应, 关于这些级联反应一个重要的表现是肝缺血/再灌注激活了肝血窦中性粒细胞黏附和在内皮细胞表面游走^[2,3]。一方面, 中性粒细胞和内皮细胞的黏附、聚集阻塞肝血窦; 另一方面, 聚集的中性粒细胞浸润到肝组织中, 在黏附因子的参与下与肝细胞黏附, 进而释放大量的细胞毒性物质损伤内皮细胞, 受损的内皮细胞更易凝聚血小板, 形成肝血窦内微血栓。因此, 如何阻止中性粒细胞和内皮细胞相互结合是防止肝缺血/再灌注损伤的关键。

腺苷全称腺嘌呤核苷, 由腺嘌呤和戊糖结合而成。腺苷结合 1、2、3 个磷酸后分别为 AMP、ADP、ATP, 其中 ATP 是生物维持正常生命活动所必需的能量形式, 在能量供应减少和耗能情况下, 内皮细胞可通过降解 ADP、ATP 产生腺苷。腺苷在对抗中性粒细胞和内皮细胞附壁中起重要作用, 对缺血/再灌注损伤的保护作用相当关键^[4-7]。腺苷通过抑制细胞因子 TNF- α 、ET-1 的合成及直接抑制中性粒细胞脱粒干扰黏附分子以减轻缺血/再灌注损伤。

潘生丁是一种嘧啶达莫衍生物, 不仅具有扩张血管、改善微循环的作用, 近年来其在减少缺血/再灌注损伤对组织的损害作用方面日益得到重视。其作用机制为: ①抑制腺苷摄取, 提高腺苷在组织内的浓度, 抑制磷酸二酯酶活性, 抑制与 ADP 结合, 局部高浓度腺苷能够促进正常代谢的恢复, 提供修复损伤所需的能量, 最重要的是高浓度腺苷直接抑制中性粒细胞黏附; ②潘生丁可直接抑制黏附因子^[8]。

本研究中缺血/再灌注组 ALT、LDH、ET-1 及 TNF- α 均明显高于假手术组, 潘生丁组各项指标稍高于假手术组, 但明显低于缺血/再灌注组, 证明潘生丁对大鼠肝缺血/再灌注损伤有明显的保护作用, 肝组织切片亦证实了这一点。本研究中潘生丁组腺苷酸含量稍高于假手术组, 但明显高于缺血/再灌注组, 证明了潘生丁减轻肝缺血/再灌注损伤的作用可能与腺苷酸参与有关, 潘生丁通过提高组织中腺苷酸浓度改善微循环, 抑制细胞因子 TNF- α 、ET-1 的合成, 对抗中性粒细胞内皮细胞附壁而发挥作用。潘生丁价廉、易得, 能否作为一种常用药物用于临床防治肝缺血/再灌注损伤, 值得进一步研究。

参考文献:

1 谢红光, 刘立英, 罗晓波, 等. 反相高效液相色谱法紫外检测大鼠组织腺苷酸[J]. 湖南医科大学学报, 1992, 17: 81-83.

- Grace P A. Ischaemia-reperfusion injury[J]. Br J Surg, 1994, 81: 637-647.
- Granger D N, Korhous R J. Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury[J]. Annu Rev Physiol, 1995, 57: 311-312.
- Howell J G, Zibari G B, Brown M F, et al. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions[J]. Transplantation, 2000, 69: 300-303.
- 严博泉, 刘少青, 权昌益, 等. 腺苷对大鼠肾脏缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12: 217-219.
- 张良清, 李立志, 邵义明, 等. 腺苷预处理对体外循环下瓣膜置换术患者围术期炎症反应的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 217-219.
- 张良清, 徐军发, 蔡康荣, 等. 腺苷预处理对缺血/再灌注心肌细胞凋亡及核因子- κ B 表达的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 158-160.
- Miura T, Ogawa T, Iwamoto T, et al. Dipyridamole potentiates the myocardial infarct size-limiting effect of ischemic preconditioning[J]. Circulation, 1992, 86: 979-985.

(收稿日期: 2006-04-03)

(本文编辑: 李银平)

• 病例报告 •

外伤性右支气管离断 1 例救治体会

张端孟 凌丰军 冯学敏

【关键词】 支气管损伤; 离断; 气胸

外伤性支气管断裂是胸部外科的严重急症, 如不及时诊治常危及生命。我院 2005 年 11 月成功救治 1 例右支气管完全离断患者, 报告如下。

1 病历简介

患者女性, 36 岁, 因胸部撞伤后胸痛、气急 2 h 入院。胸部 CT 及 X 线检查显示: 血气胸, 多发性肋骨骨折, 双侧肩胛骨骨折, 并考虑气管损伤。入院查体: 患者体温 36℃, 心率 100 次/min, 呼吸频率 35 次/min, 血压 100/60 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa); 意识清楚, 端坐呼吸, 被动体位, 颈软、无抵抗, 气管明显左移, 胸廓对称无畸形, 前后胸壁多处皮肤擦伤及瘀斑, 整个胸壁皮下捻发音, 左前胸壁骨擦感明显, 右肺叩诊鼓音, 左肺稍浊音, 右肺呼吸音未闻及, 左侧稍弱; 腹部及脊柱、四肢未见异常。入院诊断: 血气胸; 多发性肋骨骨折; 双侧肩胛骨骨折; 多发性软组织挫伤; 考虑气管损伤。入院后立即行胸腔闭式引流, 吸氧、

抗感染、止血及其他对症处理, 患者呼吸困难稍有改善。但 12 h 后仍有大量漏气, 且右肺听诊无明显好转, 考虑气管有损伤, 即在全麻下行气管插管, 右开胸探查。术中发现: 右支气管居隆突下约 2 cm 处完全离断, 两残断端整齐, 分离约 0.5 cm。结扎奇静脉, 分离周围组织, 充分显露断端, 4-0 聚丙烯缝线褥式间断缝合, 纵隔胸膜加固, 置胸腔引流管闭式引流。术后留置气管插管, 呼吸机辅助呼吸, 1 d 后停用呼吸机并拔出气管插管, 患者自主呼吸。继续进行抗感染、补液、预防并发症等治疗, 14 d 后痊愈出院, 术后随访 3 个月无异常。

2 讨论

严重胸部外伤可致气管或支气管损伤, 80% 以上位于气管隆突下 2.5 cm 以内处^[1]。气管破裂多为纵向型, 支气管破裂多为横向型, 发生机制不十分清楚, 可能与下列因素有关: ①胸廓前后径减小和横径增大同时存在, 胸内负压使肺膨胀和表面张力作用在气管隆突区产生的牵拉力超过支气管壁的弹力; ②伤时气道内压突然增加超过支气管壁的弹力; ③突然的速度变化, 对胸部产生一种剪

切力, 这种剪切力易致支气管损伤。

支气管断裂后, 幸存者往往因伤情复杂或行胸腔闭式引流后症状缓解, 尤其在 X 线或胸部 CT 无明显表现时, 不易作出早期诊断。但胸腔闭式引流后在一定时间内若仍有大量漏气, 且肺仍不能膨胀时应考虑支气管损伤的可能, 争取早期确诊。一经确诊应及时修补或行断端吻合。术前必须确保胸腔闭式引流通畅, 以免麻醉加压辅助呼吸致损伤处漏气造成或加重气胸。

术后要积极清除气管分泌物, 保持胸腔闭式引流通畅, 使用有效抗生素预防感染; 及时、合理应用机械通气, 预防急性呼吸窘迫综合征的发生, 降低病死率^[2]; 术后早期可短期内应用激素以减轻吻合口局部炎症反应, 抑制肉芽增生; 为防止肺不张鼓励患者适度咳嗽。

参考文献:

- 吴阶平, 裘法祖. 黄家驹外科学[M]. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1427.
- 陈晓雄. 重症胸部创伤后 ARDS 及创伤性失血性休克的治疗[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 436-437.

(收稿日期: 2006-03-05)

(本文编辑: 李银平)

作者单位: 474450 河南省淅川县公疗医院外科

作者简介: 张端孟 (1979-), 男 (汉族), 河南淅川人, 医师。

整合素 α_v 重组腺病毒的构建和鉴定及对人肝癌细胞黏附特性的影响

(正文见413页)



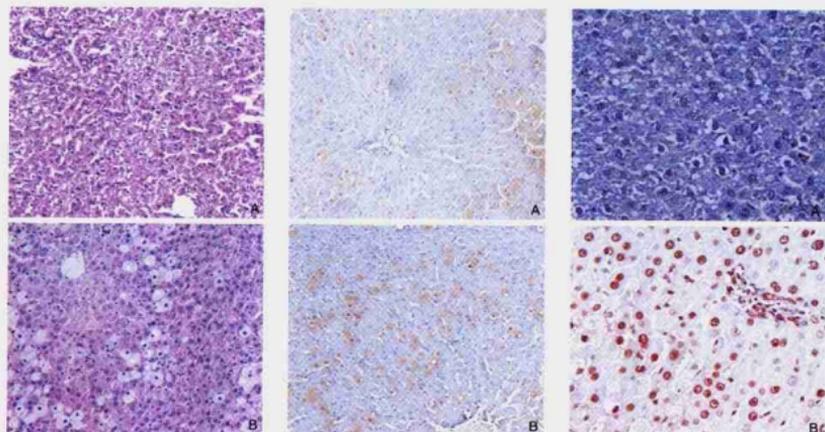
A: 转染整合素 α_v 重组腺病毒质粒 ($\times 100$); B: 整合素 α_v 重组腺病毒携带的绿色荧光蛋白形态 ($\times 100$); C: 用整合素 α_v 重组腺病毒再次感染HEK-293A细胞 ($\times 200$)

图3 增强型绿色荧光蛋白在重组腺病毒中表达的动态观察

Figure 3 Dynamic observation of the expression of EGFP in recombinant adenovirus

急性肝损伤大鼠肝脏Fas和FasL的表达及其意义

(正文见417页)



A: 正常对照组; B: 实验组16 h

图1 大鼠肝组织病理学变化 (HE, $\times 100$)

Figure 1 Pathological changes of liver tissue in rats (HE, $\times 100$)

A: Fas; B: FasL

图2 实验组大鼠24 h肝组织Fas和FasL表达 (免疫组化, $\times 100$)

Figure 2 Expression of Fas and FasL in liver tissue at 24 hours in rats of experiment group (immunohistochemistry, $\times 100$)

A: 正常对照组; B: 实验组24 h

图3 大鼠肝细胞凋亡情况 (TUNEL, $\times 400$)

Figure 3 Hepatocyte apoptosis of rats (TUNEL, $\times 400$)

潘生丁预处理对大鼠肝缺血/再灌注损伤的保护作用

(正文见425页)

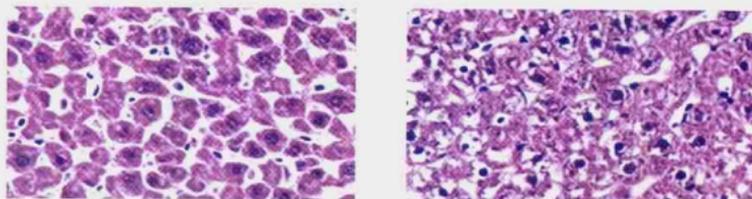


图1 潘生丁组肝组织病理学变化 (HE, $\times 400$)

Figure 1 Pathological changes of liver tissues in dipycamole group (HE, $\times 400$)

图2 缺血/再灌注组肝组织病理学变化 (HE, $\times 400$)

Figure 2 Pathological changes of liver tissues in I/R group (HE, $\times 400$)