

异氟醚预处理对缺血/再灌注复合内毒素大鼠肝脏损伤的影响

吕欣 李泉 黄盛东 吴飞翔 杨立群 俞卫锋

【摘要】 目的 观察再灌注期腹腔注射内毒素脂多糖(LPS)对大鼠肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤的影响以及异氟醚(ISO)预处理的干预作用。方法 将 32 只 SD 大鼠随机均分为 4 组:假手术(Sham)组、单纯肝脏 I/R 组、肝脏 I/R 复合 LPS 损伤(I/R+LPS)组及 ISO 预处理组。I/R+LPS 组吸氧预处理后间隔 0.5 h 进行肝脏缺血 1 h、再灌注 4 h,再灌注开始时腹腔内注入 LPS;ISO 预处理组以 ISO 吸入预处理 0.5 h,间隔 0.5 h 后进行 I/R 损伤操作,再灌注开始时腹腔内注入 LPS。再灌注 4 h 处死各组动物,留取肝脏及血液标本;观察各组肝组织病理学改变,血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的变化以及肝组织 TNF- α 、髓过氧化物酶(MPO)活性的改变。结果 与 Sham 组比较,损伤各组血清 ALT、AST、TNF- α 及肝组织 TNF- α 、MPO 活性均显著升高(P 均 <0.01);与 I/R 组比较,I/R+LPS 组肝脏损伤和炎症细胞因子反应明显较重($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与 I/R+LPS 组比较,ISO 预处理组肝脏的病理损伤明显较轻,血清 ALT、AST、TNF- α 水平及肝组织 MPO 活性和促炎细胞因子 TNF- α 的表达水平均显著降低(P 均 <0.05)。结论 再灌注期复合 LPS 腹腔注射明显加重了肝脏的损伤和炎症细胞因子反应,ISO 预处理可明显减轻复合损伤介导的炎症反应,保护肝脏。

【关键词】 缺血/再灌注损伤,肝; 异氟醚; 预处理; 内毒素

Isflurane pretreatment reduced liver injury induced by ischemia/reperfusion combined with lipopolysaccharide in rats LÜ Xin*, LI Quan, HUANG Sheng-dong, WU Fei-xiang, YANG Li-Qun, YU Wei-Feng. * Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China
Corresponding author: YU Wei-feng

【Abstract】 Objective To investigate the effect of lipopolysaccharide (LPS) on ischemia/reperfusion (I/R) injury of liver and the protective effect of isoflurane (ISO) pretreatment on such injury in rat. **Methods** Thirty-two male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned to 4 groups: Sham group, only receive anesthesia and laparotomy; I/R group; I/R+LPS group, with 1 hour of hepatic ischemia and 4 hours of reperfusion, and LPS was given at the beginning of reperfusion; ISO group, received ISO pretreatment for 0.5 hour, then 1 hour of hepatic ischemia followed by 4 hours of reperfusion and LPS given at the beginning of reperfusion. The pathological changes in the liver tissue were assessed. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), the myeloperoxidase (MPO) activity in liver tissue, hepatic and serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) were determined. **Results** Compared with Sham group, ALT, AST, TNF- α in serum and MPO activity in liver tissue, hepatic and serum TNF- α were increased significantly in all injury groups (all $P<0.01$). Compared with ISO group alone, hepatic I/R combined with LPS resulted in severer liver injury, with the levels of ALT, AST in serum, MPO activity in the liver tissue, and hepatic and serum TNF- α level were all increased (all $P<0.05$). Compared with I/R+LPS group, both the liver injury and inflammatory reaction were significantly reduced in I/R group ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** LPS injection during reperfusion results in severer liver injury and inflammatory reaction after hepatic I/R in rats. ISO pretreatment for 30 minutes might reduce the inflammatory reaction and live injury induced by hepatic I/R combined with LPS.

【Key words】 liver ischemia/reperfusion injury; isoflurane; pretreatment; lipopolysaccharide

肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤是肝脏外科常见

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30700788)

作者单位:200438 上海,第二军医大学附属东方肝胆外科医院
麻醉科(吕欣,李泉,吴飞翔,杨立群,俞卫锋);第二军医大学附属上海医院胸心外科(黄盛东)

通讯作者:俞卫锋,教授,博士生导师,主任医师

作者简介:吕欣(1973-),男(汉族),浙江省人,医学博士,主治医师,Email:xinlv@126.com。

的问题^[1-2]。肝脏作为机体重要的防御屏障,是体内清除内毒素的主要器官,肝脏 I/R 可造成肝脏及肠道屏障功能受损,引起明显的内毒素移位入血,而肝脏中内毒素水平的升高,反过来又可加重肝脏损伤,造成恶性循环,是影响肝脏外科手术患者预后的另一重要因素。近年来的研究显示,异氟醚(ISO)等吸入麻醉药可明显减轻内毒素或 I/R 介导的炎症反

应,减轻脏器损伤,具有脏器保护作用^[3-5],但对肝脏 I/R 合并内毒素损伤的影响尚不清楚,我们设想可能同样具有保护作用。故我们建立 I/R 复合内毒素肝脏损伤动物模型,模拟临床上肝脏 I/R 损伤后复合内毒素血症的情况,并观察再灌注期 ISO 预处理对肝脏 I/R 损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物:选取 8~10 周龄健康雄性 SD 大鼠 32 只,体重 180~220 g,由中国医学科学院实验动物中心(上海)提供。

1.2 动物分组及模型制备:大鼠按随机数字表法分为 4 组,每组 8 只。①假手术(Sham)组:给予吸氧预处理 0.5 h,麻醉后仅于相应时间点做开腹等,关腹前腹腔内注入 1 ml 生理盐水;②肝脏 I/R 组:给予吸氧预处理,麻醉后给予肝脏缺血 1 h 再灌注 4 h,再灌注开始时腹腔内注入 1 ml 生理盐水;③肝脏 I/R 复合脂多糖(LPS)损伤(I/R+LPS)组:给予吸氧预处理 0.5 h,麻醉后给予肝脏缺血 1 h 再灌注 4 h,再灌注开始时腹腔内注入 5 mg/kg 的 LPS (E. coli 0111:B4, 美国 Sigma 公司,溶于 1 ml 生理盐水);④ISO 预处理组:给予体积分数为 1.4% 的 ISO (美国雅培公司)吸入预处理 0.5 h,其余同 I/R+LPS 组。模型制备参考文献[6-7]的方法。

1.3 术前预处理:将大鼠置于自制密闭的有机玻璃箱中,箱内的温度保持在 35~37℃。箱底铺钠石灰,使箱内二氧化碳分压(PCO₂)<0.05 atm (1 atm = 101.325 kPa),向箱内输送 ISO 气体,氧气体积分数为 100%,流量为 3 L/min,逐渐升高 ISO 浓度达到 1.4%,放入大鼠,使其自主呼吸 0.5 h 后取出。Sham、I/R、I/R+LPS 组大鼠仅给氧吸入预处理,ISO 预处理组大鼠给予 1.4% ISO 预处理。预处理结束后间隔 0.5 h 给予戊巴比妥(40 mg/kg)腹腔内注射麻醉后行相应手术操作。

1.4 指标检测及方法

1.4.1 标本采集与保存:再灌注 4 h 后,戊巴比妥 40 mg/kg 腹腔内注射麻醉大鼠,腹主动脉抽血处死,留取肝脏及血液标本。离心分离血清,分装于不同的小离心管中,置于-20℃冰箱中保存。取肝脏中叶组织,经体积分数为 10% 的甲醛水溶液固定,石蜡包埋,用于组织病理学观察。取肝左叶组织在液氮速冻后置于-80℃冰箱保存,用于肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和髓过氧化物酶(MPO)测定。

1.4.2 血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)检测:采用全自动生化分析仪(日本日立

公司)测定。

1.4.3 血清及肝组织 TNF-α 浓度检测:取左叶肝组织 100 mg,加入 9 倍磷酸盐缓冲液(PBS)制备组织匀浆,离心取上清液待测。血清及肝组织匀浆上清液中的 TNF-α 浓度参照酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(美国 R.D 公司)说明书操作。

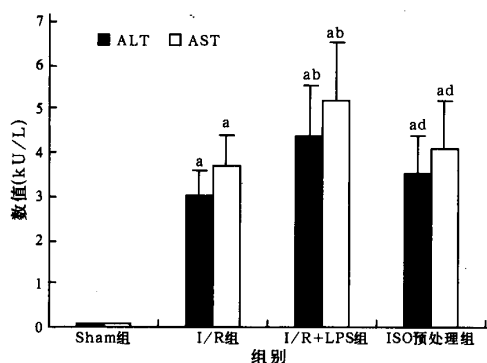
1.4.4 肝组织 MPO 活性测定:参照试剂盒(南京建成生物公司)说明书操作。每克组织在 37℃ 反应体系中分解 1 μmol H₂O₂ 为 1 个酶活性单位(U/g)。

1.4.5 肝组织病理学观察:石蜡包埋肝组织,切成 5 μm 厚的切片,进行苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察肝组织病理学改变。

1.5 统计学处理:用 SPSS 10.0 统计软件进行统计分析。数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ALT、AST 的变化(图 1):与 Sham 组比较,I/R、I/R+LPS 和 ISO 预处理组血清 ALT、AST 均明显升高(P 均 < 0.01);与 I/R 组比较,I/R+LPS 组血清 ALT、AST 水平均显著升高(P 均 < 0.05);与 I/R+LPS 组比较,ISO 预处理组血清 ALT、AST 水平明显降低(P 均 < 0.05)。

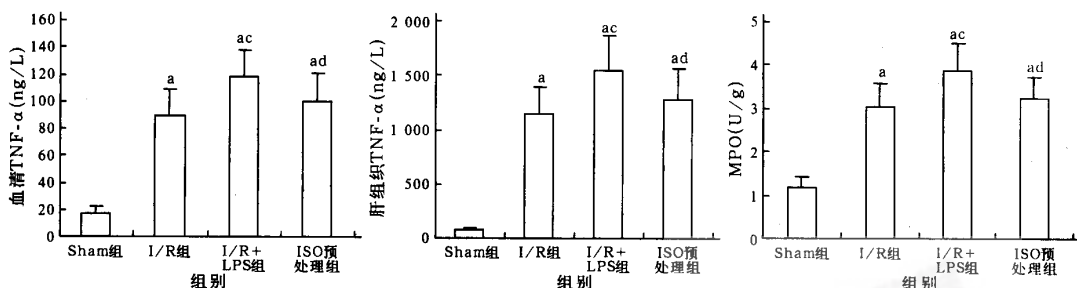


注:与 Sham 组比较,* $P < 0.01$;与 I/R 组比较,^b $P < 0.05$;
与 I/R+LPS 组比较,^d $P < 0.05$

图 1 各组大鼠血清 ALT 和 AST 水平比较

2.2 血清及肝组织 TNF-α 浓度的变化(图 2):与 Sham 组比较,I/R、I/R+LPS 和 ISO 预处理组血清及肝组织 TNF-α 水平均明显升高(P 均 < 0.01);I/R+LPS 组明显高于 I/R 组(P 均 < 0.01);ISO 预处理组明显低于 I/R+LPS 组(P 均 < 0.05)。

2.3 肝组织 MPO 活性的变化(图 2):与 Sham 组比较,I/R、I/R+LPS 和 ISO 预处理组肝组织 MPO 活性明显升高(P 均 < 0.01);与 I/R 组比较,I/R+



注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 I/R 组比较,^c $P < 0.01$;与 I/R+LPS 组比较,^d $P < 0.05$

图 2 各组大鼠血清 TNF-α 及肝组织 TNF-α、MPO 水平比较

LPS 组肝组织 MPO 活性明显升高,提示中性粒细胞浸润程度明显加重($P < 0.01$);与 I/R+LPS 组比较,ISO 预处理能明显降低肝组织 MPO 活性升高,提示中性粒细胞浸润程度明显减轻($P < 0.05$)。

2.4 肝组织病理学改变(彩色插页图 3):Sham 组肝小叶结构清楚,肝细胞索、肝窦结构清晰,肝细胞索排列正常,肝细胞无明显变性。I/R 组和 I/R+LPS 组肝小叶结构不清,肝细胞索、肝窦扩张,分界不清,肝细胞胞质疏松化,空泡变性;I/R 组又见大片肝细胞变性坏死,网状纤维支架塌陷,明显炎性细胞浸润;I/R+LPS 组则广泛大片肝细胞变性坏死,大量炎性细胞浸润。ISO 预处理组肝细胞损伤较 I/R+LPS 组轻,肝细胞浊肿,肝小叶结构破坏,可见大片肝细胞变性坏死,炎性细胞浸润较 I/R+LPS 组明显减轻。

3 讨论

肝脏作为机体重要的防御屏障。其功能受损害造成内毒素血症^[8-9]。肝脏 I/R 损伤后 3~6 h 血清 TNF-α 等炎症因子即显著升高,出现明显的肝功能损害^[10-11]。严重的肝脏外伤、肝叶切除、肝脏移植及休克、感染等,在引起肝脏 I/R 损伤的同时,可通过内毒素移位加重肝脏功能受损,甚至导致多器官功能衰竭(MOF)或死亡^[11-12]。内毒素是革兰阴性菌外膜的主要成分,又称 LPS,被公认是导致脓毒症、严重休克、MOF 的主要致病因子。肝脏是摄取和代谢 LPS 的主要器官,肝内库普弗细胞等多种细胞表面表达各种 LPS 相关受体,它们是机体识别 LPS 的重要“感应器”,也是启动 LPS 激活细胞释放致炎细胞因子等产物的始动环节;LPS 还可直接或间接损伤肝脏,导致肝脏功能障碍。LPS 可激活肝脏库普弗细胞,与血液中 LPS 结合蛋白结合后,被库普弗细胞膜上的内毒素受体复合体(TLR4-MD2-CD14)识别,通过细胞内信号转导引起核转录因子-κB

(NF-κB)抑制因子(IκB)激酶活化降解,并释放出炎症转录因子 NF-κB, NF-κB 转位入核,增强 TNF-α、白细胞介素-1β(IL-1β)等炎症因子的转录,从而引发炎症级联反应。库普弗细胞激活后还可释放大量的氧自由基和蛋白水解酶等,从而造成肝细胞及肝窦内皮细胞的急性损伤^[13]。TNF-α 可诱导肝窦内皮细胞表达细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等黏附分子,促使中性粒细胞与肝窦内皮细胞间发生黏附,在肝组织聚集活化,活化的中性粒细胞释放出大量的氧自由基、蛋白酶等多种毒性介质,造成肝细胞和内皮细胞的进一步损害。此外, LPS 也可直接刺激肝窦内皮细胞释放 IL-1、IL-6 等炎症细胞因子。中性粒细胞在肝窦的过多聚集可导致肝窦狭窄,加上肝窦内皮细胞的损害,凝血系统的激活和紊乱等,血管舒张因子一氧化氮(NO)和收缩因子内皮素(ET)的平衡失调等将导致肝脏微循环功能障碍,进而出现肝脏功能损害^[10-14]。故肝脏 I/R 及内毒素损伤被认为是围手术期肝脏损伤的两大重要因素。

本研究结果显示,采用腹腔注射 LPS 的方法,不仅可以造成肝脏损伤的明显加重,同时也保证了实验期间动物的存活,便于各项实验数据的采集。过度的炎症反应被认为是肝脏 I/R 损伤的重要机制,肝脏 I/R 后出现了明显的病理损伤,酶学指标 ALT、AST 明显升高,伴有以明显的 TNF-α 释放、中性粒细胞聚集等为特征的炎症反应,证实炎症反应与肝脏 I/R 损伤有密切关系。

而 ISO 预处理可明显减轻肝脏 I/R 复合 LPS 导致的病理损伤,降低肝脏中 MPO 活性及血清和肝脏中促炎细胞因子 TNF-α 的升高。提示 ISO 预处理对肝脏 I/R 复合 LPS 损伤有明显的保护作用,其机制可能与抑制肝脏 I/R 损伤介导的炎症细胞因子释放和中性粒细胞聚集有关,ISO 预处理的抗炎作用可能是其发挥肝脏保护作用的重要机制。

参考文献

- [1] 山峰,李莹,马承泰,等.维拉帕米和生脉注射液抗大鼠肝脏缺血/再灌注损伤的作用研究[J].中国中西医结合急救杂志,2007,14(1):35-38.
- [2] 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(1):42-44.
- [3] Plachinta R V, Hayes J K, Cerilli L A, et al. Isoflurane pretreatment inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rats[J]. Anesthesiology, 2003, 98(1): 89-95.
- [4] Reutershan J, Chang D, Hayes J K, et al. Protective effects of isoflurane pretreatment in endotoxin-induced lung injury[J]. Anesthesiology, 2006, 104(3): 511-517.
- [5] Zhong C, Zhou Y, Lin H. Nuclear factor kappaB and anesthetic preconditioning during myocardial ischemia/reperfusion [J]. Anesthesiology, 2004, 100(3): 540-546.
- [6] Serafin A, Roselló-Catafau J, Prats N, et al. Ischemic preconditioning affects interleukin release in fatty livers of rats undergoing ischemia/reperfusion [J]. Hepatology, 2004, 39(3): 688-698.
- [7] Tiberio L, Tiberio G A, Bardella L, et al. Mechanisms of interleukin-6 protection against ischemia-reperfusion injury in rat liver[J]. Cytokine, 2006, 34(3-4): 131-142.
- [8] Liu P, McGuire G M, Fisher M A, et al. Activation of Kupffer cells and neutrophils for reactive oxygen formation is responsible for endotoxin-enhanced liver injury after hepatic ischemia [J]. Shock, 1995, 3(1): 56-62.
- [9] Vajdová K, Smreková R, Kukan M, et al. Endotoxin-induced aggravation of preservation-reperfusion injury of rat liver and its modulation[J]. J Hepatol, 2000, 32(1): 112-120.
- [10] 柯庆宏,郑树森,梁廷波,等.高渗盐水对缺血/再灌注损伤肝脏血红素加氧酶-1表达的影响[J].中国危重病急救医学,2006,18(1):5-8.
- [11] 王万铁,王卫,徐正杓,等.肝缺血/再灌注损伤中脂质过氧化反应及左旋精氨酸的干预作用[J].中国危重病急救医学,2003,15(2):91-93.
- [12] Tadros T, Traber D L, Herndon D N. Opposite effects of prostacyclin on hepatic blood flow and oxygen consumption after burn and sepsis[J]. Ann Surg, 2004, 239(1): 67-74.
- [13] Jirillo E, Caccavo D, Magrone T, et al. The role of the liver in the response to LPS: experimental and clinical findings [J]. J Endotoxin Res, 2002, 8(5): 319-327.
- [14] Yee S B, Hanumegowda U M, Hotchkiss J A, et al. Role of neutrophils in the synergistic liver injury from monocrotaline and bacterial lipopolysaccharide exposure [J]. Toxicol Sci, 2003, 72(1): 43-56.

(收稿日期:2008-02-04 修回日期:2008-03-05)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

内毒素能介导肝生长激素受体蛋白水解减少

生长激素(GH)是一种重要的合成代谢激素。芝加哥科研人员通过细胞培养实验发现,细胞表面的生长激素受体(GHR)对可诱导的金属蛋白水解分裂方式敏感,这种方式可在细胞外产生生长激素结合蛋白(GHBP),从而使细胞对后续的GH刺激失敏。动物实验也发现,脓毒症和过度炎症与肝脏GH失敏有关,但其机制未明。他们进一步应用C3H/HeJ小鼠模型,通过对信号转导蛋白和转录激活因子5(STAT5)酪氨酸磷酸化和核蓄积的测定,并应用非侵袭性生物发光显像系统在体描记每只小鼠肝脏GH连续性信号,来证明给予内毒素脂多糖(LPS)可使肝脏对GH刺激失敏。LPS所致的肝脏GH失敏伴有肝GHR显著减少。还观察到LPS可使野生型小鼠GHR的GHBP脱落,而金属蛋白酶切割位点发生突变的GHR则不会脱落。因此,研究者认为,LPS所致的肝脏GH失敏与GHR蛋白水解有关。通过体内可诱导的GHR蛋白水解,研究者发现了调节GH敏感性的机制及脓毒症和过度炎症时GH的合成作用。

包呈梅,周国勇,编译自《Mol Endocrinol》,2008-03-06(电子版);胡森,审校

危重病患者革兰阳性和革兰阴性脓毒症基因表达模式

革兰阳性和革兰阴性脓毒症宿主反应在转录子水平的差别还不十分清楚。澳大利亚研究人员利用微点阵技术对重症加强治疗病房中的72例危重病患者革兰阳性和革兰阴性脓毒症基因表达模式进行了比较。他们收集患者静脉血分离白细胞并提取RNA,用微点阵技术对每组共18664个基因的表达水平进行了检测,发现革兰阳性和革兰阴性脓毒症基因表达模式并无差别。然而,脓毒症组与正常组比较有94个基因表达有差别,这些基因与免疫调节、炎症、线粒体功能有关。实验结果进一步验证了脓毒症反应是非特异性的,并与不同的微生物有关。

包呈梅,编译自《Crit Care Med》,2008,36(4):1125-1128;胡森,审校

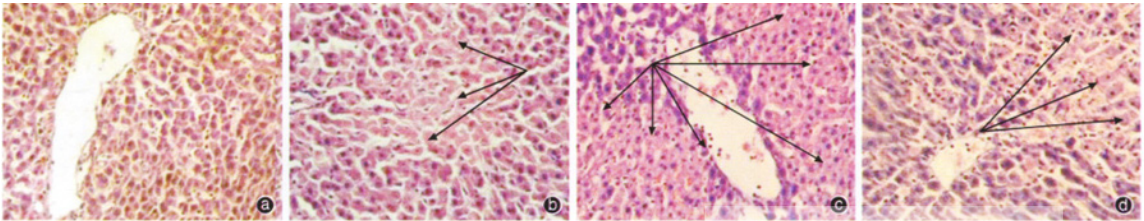
肥大细胞调节神经肽水平降低脓毒症小鼠死亡率

脓毒症常伴有低血压,这与患者心血管系统对感染的宿主反应失调有关。神经降压肽(NT)是一种含13个氨基酸的肽链,可诱导低血压。美国研究人员通过对盲肠结扎穿孔(CLP)小鼠脓毒症模型的研究发现:脓毒症小鼠腹腔和血浆中NT水平增加,而给予NT拮抗剂或NT缺陷的脓毒症小鼠死亡率下降。肥大细胞表达NT受体1;肥大细胞有减少NT、减轻NT所致的低血压及降低脓毒症死亡率的作用。研究者认为,NT增加脓毒症小鼠死亡率,肥大细胞能减少NT水平,提示肥大细胞可通过调节NT水平降低脓毒症死亡率。

包呈梅,编译自《Nat Med》,2008-03-30(电子版);胡森,审校

异氟醚预处理对缺血/再灌注复合内毒素大鼠肝脏损伤的影响

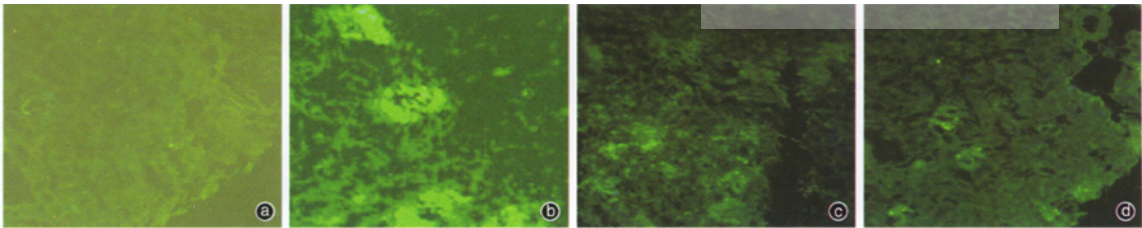
(正文见271页)



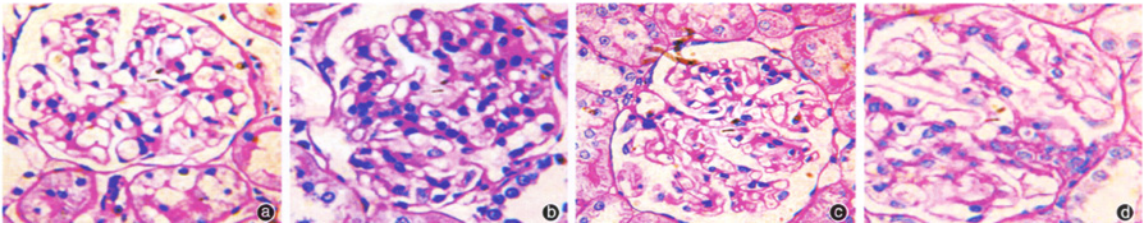
③:Sham组, ④:I/R组, ⑤:I/R+LPS组, ⑥:ISO预处理组; 箭头示坏死区域
图3 各组大鼠肝组织病理学改变(HE, ×400)

leflunomide对IgA肾病大鼠肾脏保护作用的机制研究

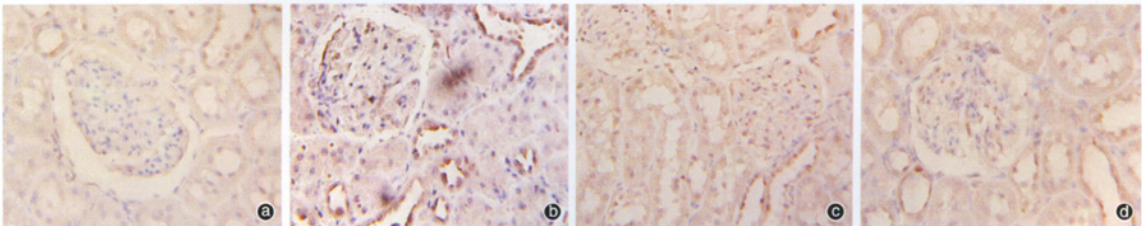
(正文见283页)



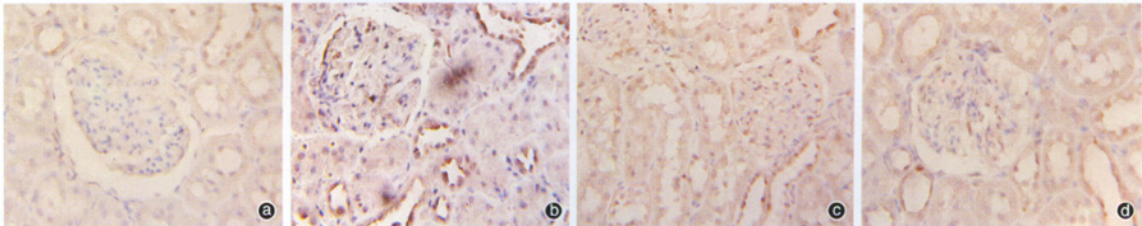
③:正常对照组, IgA(-), ④:模型组, IgA(+++), ⑤:泼尼松组, IgA(-), ⑥:leflunomide组, IgA(±)
图1 各组大鼠肾组织免疫荧光图像(×100)



③:正常对照组, ④:模型组, ⑤:泼尼松组, ⑥:leflunomide组
图2 各组大鼠肾组织病理学改变(PAS, ×400)



③:正常对照组, ④:模型组, ⑤:泼尼松组, ⑥:leflunomide组
图4 各组大鼠肾组织TGF-β1的表达(免疫组化, ×100)



③:正常对照组, ④:模型组, ⑤:泼尼松组, ⑥:leflunomide组
图6 各组大鼠肾组织MCP-1的表达(免疫组化, ×200)