

文章编号:1005-6947(2006)08-0622-04

· 简要论著 ·

潘生丁与阿霉素对兔肝缺血再灌注损伤保护作用的对照研究

戴小明^{1,2}, 叶启发¹, 齐海智², 贺志军², 王永刚^{1,2}, 明英姿¹, 余兴国¹

(1. 卫生部移植医学工程研究中心、中南大学湘雅移植医学研究院、中南大学湘雅三医院, 湖南长沙 410013; 2. 中南大学湘雅二医院器官移植中心, 湖南长沙 410011)

摘要:为探讨潘生丁对兔肝缺血再灌注损伤保护作用及作用机制。笔者将30只体重2.2~3.0 kg的健康新西兰长耳大白兔随机分成3组:对照组(A组),阿霉素预处理组(B组),潘生丁预处理组(C组),每组10只。实验前3d起B组从耳缘静脉注入阿霉素1 mg/kg, 2次/d; C组从耳缘静脉注入潘生丁0.2 mg/kg, 2次/d; A组从耳缘静脉注入等量的生理盐水。采用Pringle,s方法建立肝脏缺血再灌注模型,留取肝脏标本和下腔静脉血比较3组大白兔肝门阻断前(T1),肝门阻断30 min后(T2),再灌注2h后(T3)的血小板聚集率(PAGT)、肝功能(AST和ALT)、肝组织的抗氧化能力(SOD)、脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量、肝指数(湿重/干重%)、组织形态学变化。结果显示,在不同时相,与A,B组比较,C组的血小板聚集率下降($P < 0.05$);与A组比较,B,C组的肝组织水肿程度较轻($P < 0.05$)、肝组织出现较轻的病理学改变,肝功能损害轻、肝组织匀浆超氧化物歧化酶含量高和丙二醛含量减少($P < 0.05$);与B组比较,C组的血小板聚集率下降($P < 0.05$)、肝组织水肿程度较轻($P < 0.05$),A,B两组各项指标之间无显著差异($P > 0.05$)。提示潘生丁对兔肝缺血再灌注损伤有保护作用,且其作用比阿霉素预处理对肝缺血再灌注损伤的保护作用强。

关键词:潘生丁/药理学;阿霉素/药理学;肝缺血;再灌注损伤

中图分类号:R619;R979.14

文献标识码:B

肝移植中供肝热缺血和低温保存时的冷缺血后的再灌注损伤是原发性移植物无功能(PNF)的重要因素。临床肝脏手术时,为减少术中出血,常规应用肝门阻断,肝脏缺血再灌注损伤也是导致术后急性肝功能衰竭的重要原因。目前国内外研究表明,应用合理的缺血预处理能有效地减轻缺血再灌注损伤,保护肝脏的作用^[1]。由于我国肝移植绝大多数是尸体供肝,无法实行缺血预处理。而药物预处理既能模拟缺血预处理启动内源性保护机制,又能针对患者实行个体化处理,更具有广阔的应用前景。国内外较多应用阿霉素预处理^[2-3]已取得较好的临床和实验效果,本实验通过与阿霉素预处理对照研究旨在探讨潘生丁预处理对肝脏缺血再

灌注损伤中保护作用及可能的作用效果。

1 材料和方法

1.1 实验材料与方法

1.1.1 动物及分组 健康的新西兰大白兔30只,雌雄不拘,体重2.2~3.0 kg,随机分成对照组(A组),阿霉素预处理组(B组),潘生丁预处理组(C组)。

1.1.2 药品、试剂、仪器 注射用的潘生丁购于吉林威威药业有限公司;注射用的阿霉素购于深圳万乐药业有限公司;丙二醛(MAD)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)测试盒购自南京建成生物工程研究所;WTT-III型双通道血小板聚集率测定仪由中国人民解放军九七五七工厂生产,由湖南师范大学医学院血液检测学教研室提供。

1.2 干预处理

实验前3d起,B组从耳缘静脉注入阿霉素

基金项目:本研究为卫生部部属临床重点学科项目赞助(98040362)。

收稿日期:2006-04-10; **修订日期:**2006-06-07。

作者简介:戴小明,男,湖南衡阳人,中南大学湘雅三医院主治医师,主要从事器官移植方面的研究。

通讯作者:戴小明 E-mail: xiaomingdai@hotmail.com。

1 mg/kg, 浓度 0.5 mg/mL, 2 次/d; C 组从耳缘静脉注入潘生丁 0.2 mg/kg, 浓度 0.1 mg/mL, 2 次/d; A 组组从耳缘静脉注入等量生理盐水, 2 次/d。

1.3 动物实验方法及标本采集

实验前动物禁食 12 h, 禁水 4 h, 称重后按 3% 戊巴比妥钠 1 mg/kg 经耳缘静脉注入麻醉。采用 Pringle, s 法建立缺血再灌注模型, 阻断 30 min 后再灌注 2 h。各组分别于解剖肝门后阻断前、再灌注时、及再灌注后 2 h 采集血标本和肝组织标本。采血时从肝下下腔静脉抽取 4 mL 静脉血, 2 mL 置入非抗凝管, 静置, 待血液凝固后以 3 500 r/min 离心 5 min, 分离血清, 置入 -70℃ 冰箱中保存, 备肝功能 (ALT, AST) 检测; 2 mL 置入枸橼酸钠抗凝管中, 800 r/min 离心 10 min, 分离 PRP (富含血小板血浆), 2 h 内做血小板聚集率检测。取少量肝脏组织置液氮罐中冷藏, 留做 MAD、SOD 检测; 取少量肝组织置入 10% 的福尔马林中保存, 1 周内制成组织切片, 留做组织形态学检查; 切取肝左叶, 称出即刻湿重, 置入 60℃ 烤箱 48 h, 称出干重。

1.4 检测指标和方法

1.4.1 血小板聚集率测定 采用透光度和吸光度的变化, 判断血小板的聚集程度。以富含血小板的血浆为透光度为 0% 和吸光度为 100%, 乏血小板的血浆为透光度为 100% 和吸光度为 0%, 通过血小板聚集仪测定各血浆标本的透光度和吸光度的变化来计算血小板的聚集率。

1.4.2 组织匀浆的制备 取肝组织块 (0.2 ~ 1 kg) 在冰冷的生理盐水中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 称重; 用移液管量取预冷的生理盐水, 其体积总量为组织块重量的 9 倍, 置入相应的试管中, 用眼科剪尽量剪碎肝组织块。用捣杆上下转动研磨, 充分研碎, 使组织匀浆化。将制备好的 10% 匀浆用离心机 3 500 r/min 离心 15 min, 将离心好的匀浆留上清液弃下面沉淀备用。

1.4.3 SOD 测定 采用黄嘌呤氧化酶法。应用比色法通过分光光度计测定其吸光度, 定义每克组织蛋白在 1 mL 反应液中超氧化物歧化酶抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位 (U)。通过公式计算求出被测样品中的 SOD 活力。公式为: 组织匀浆中超 SOD 活力 = [(对照管吸光度 - 测定管吸光度) × 反应液总体积] / [对照管吸光度 × 组织中蛋白含量 × 取液量]。

1.4.4 MDA 测定 采用 MDA 试剂盒测试原理 (TBA 法): 利用 MDA 可与硫代巴比妥酸 (TBA) 缩合, 形成红色产物, 在 532 nm 处有最大吸收峰, 通过分光光度计测定其吸光度值来计算出样品中 MDA 含量。公式为: 组织匀浆中 MDA 含量 (nmol/mgprot) = [(测定管吸光度 - 测定空白管吸光度) × 标准品浓度] / [(标准管吸光度 - 标准空白管吸光度) × 肝组织中蛋白含量]。

1.4.5 AST、ALT 测定 采用安泰医疗仪器有限公司的安泰 738 半自动生化分析仪, 采用 AST, ALT 测试盒连续检测。

1.4.6 肝水肿程度评价——肝指数 (W/D) 测定 将切取的左半肝即刻称出湿重 (W) 后置入 60℃ 的恒温烤箱中 48 h, 称出干重 (D); 计算出湿重干重比, 得出 W/D%, 即为肝指数, 描述肝水肿程度。

1.4.7 肝细胞形态学观察 将肝组织甲醛固定, 石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜下观察, 并采用病理分级标准对肝组织损伤程度进行分级判断。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计分析, 所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用方差分析, 两样本均数间的比较采用 T 检验分析结果。P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血小板聚集率 (PAGT) 测定

与 A 组比较, 不同时相的 B, C 组血液中血小板的聚集率都明显降低 (P < 0.05); 与 B 组比较, 不同时相 C 组血液中血小板的聚集率更低 (P < 0.05) (表 1-2)。

2.2 肝组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、丙二醛 (MDA)、肝功能血浆谷草转氨酶 (AST) 和血浆谷丙转氨酶 (ALT) 测定

T1 时相三组间均无显著性差异 (P > 0.05); T2, T3 时相, 与 A 组比较, B, C 组肝组织中超氧化物歧化酶活力明显升高 (P < 0.05), 丙二醛活力明显降低 (P < 0.05), 血浆谷草转氨酶和谷丙转氨酶均明显降低 (P < 0.05); 而 B, C 组之间差异无显著性 (P > 0.05) (表 1-2)。

2.3 肝水肿程度评价——肝指数 (W/D%)

T3 时相, 与 A 组比较, B, C 组肝水肿程度评价——肝指数 (W/D%) 明显降低 (P < 0.05); 与 B

组比较, C组更低($P < 0.05$) (表1-2)。

2.4 肝病理形态学变化

光镜下观察: A组均有形态学改变, 肝血窦明显变窄, 其中有4例肝细胞呈点状溶解坏死或灶性坏死, 胞浆崩解, 胞核消失, 空泡变性明显, 7例肝脏明显淤血。B组亦均有形态学改变, 但较A组轻, 其中2例肝血窦变窄; 2例肝细胞呈点状溶解坏死, 胞浆崩解, 胞核消失; 2例肝脏淤血(图1)。与A、B组比较, C组肝血窦基本正常, 肝细胞轻度水肿, 肝细胞坏死程度亦较轻, 肝脏淤血不明显

(图2)。

表1 T1时相不同组标本的各项实验结果

项目	对照组	阿霉素预	潘生丁预
	(A组)	处理组(B组)	处理组(C组)
SOD	152.96 ± 8.51	157.39 ± 10.18	154.09 ± 11.13
MDA	3.50 ± 1.39	3.56 ± 0.63	3.34 ± 0.51
ALT	43.00 ± 7.39	46.90 ± 11.68	40.20 ± 10.87
AST	70.90 ± 47.52	73.90 ± 14.05	69.30 ± 13.21
PAGT	46.23 ± 6.21	43.38 ± 4.97	36.26 ± 2.49

注: 1)与A组比较, $P < 0.05$; 2)与B组比较, $P < 0.05$

表2 T2, T3时相不同组标本的各项实验结果

项目	对照组(A组)		阿霉素预处理组(B组)		潘生丁预处理组(C组)	
	T2	T3	T2	T3	T2	T3
	SOD	119.40 ± 7.60	108.50 ± 4.82	125.10 ± 9.89 ¹⁾	119.53 ± 4.16 ¹⁾	125.64 ± 9.99 ¹⁾
MDA	5.38 ± 2.16	11.00 ± 5.81	4.12 ± 0.89 ¹⁾	4.25 ± 0.77 ¹⁾	4.10 ± 0.71 ¹⁾	4.31 ± 0.88 ¹⁾
ALT	148.20 ± 39.86	173.90 ± 43.64	116.10 ± 18.21 ¹⁾	129.10 ± 22.70 ¹⁾	100.90 ± 28.42 ¹⁾	120.40 ± 28.51 ¹⁾
AST	217.00 ± 68.61	245.80 ± 40.85	109.60 ± 11.44 ¹⁾	140.00 ± 26.92 ¹⁾	86.00 ± 25.88 ¹⁾	122.90 ± 25.09 ¹⁾
PAGT	50.34 ± 4.18	57.76 ± 3.36	47.66 ± 4.17 ¹⁾	51.77 ± 3.58 ¹⁾	40.32 ± 2.89 ^{1), 2)}	45.53 ± 3.26 ^{1), 2)}
W/D%	-	4.35 ± 0.67	-	3.61 ± 0.26 ¹⁾	-	3.23 ± 0.45 ^{1), 2)}

注: 1)与A组比较, $P < 0.05$; 2)与B组比较, $P < 0.05$

图1 阿霉素处理组

图2 潘生丁处理组

3 讨论

缺血再灌注损伤无疑是为多因素参加, 其包括多种机制^[4-6]: 氧自由基损伤, 能量衰竭, 微循环衰竭, 钙离子异常, 中性粒细胞浸润, 内毒素作用, 细胞凋亡, 枯否氏细胞、黏附因子、核转录因子的参与等等。其中微循环障碍是肝脏缺血再灌注的病理基础^[7]。肝脏微循环障碍致肝窦内皮细胞、肝细胞缺血缺氧后水肿、坏死, 肝窦变窄, 其表面受体与其下组织结构暴露, 致血小板黏附和聚集,

血管内凝血形成微血栓, 堵塞肝窦, 进一步加重微循环障碍, 出现肝恢复血流再灌注时“无血再灌注”, 肝缺血缺氧仍在继续, 从而激活一系列的细胞因子、组织因子的释放、炎性细胞的浸润, 进一步加重肝脏的损伤^[8]。目前阿霉素预处理对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用已被国内外学者广泛认可, 其作用机制可能是阿霉素预处理可以使肝细胞热休克蛋白70(HSP70)表达明显增加^[3], HSP70在应激状态下作为保护性因子在保护细胞内蛋白、稳定细胞及细胞内结构中发挥重要作用,

另外阿霉素可能在体内介导生成活性氧簇,介导细胞氧化应激反应,发挥抗氧化损伤作用有关^[9],从而减轻肝脏的缺血再灌注损伤。

本实验发现,与对照组(A组)及阿霉素预处理组(B组)比较,潘生丁预处理组血小板的聚集率明显降低($P < 0.05$)。病理切片显示其肝窦基本正常,肝细胞水肿、变性、坏死较对照组及阿霉素预处理组轻,肝功能显示肝脏损伤亦较轻,证实了潘生丁能够有效的改善缺血再灌注时肝脏的微循环状况,可能是通过抑制红细胞和血管内皮细胞对腺苷的摄取和代谢,增高血浆中腺苷的浓度,激活腺苷环化酶促进前列环素(PGI_2)产生,减少血栓素(TXA_2)的生成^[10],抑制血小板的聚集、增加微循环的血量,改善组织的缺血缺氧情况,改善组织的能量代谢,从而达到抑制炎症细胞的活化,减少组织因子及细胞因子的释放,达到保护肝脏缺血再灌注损伤。

本实验阿霉素预处理组与潘生丁预处理组的肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)活力、肝组织中丙二醛(MDA)含量、肝功能血浆谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)等均无显著性差异($P > 0.05$)。证实了潘生丁预处理具有与阿霉素预处理同样减少氧自由基产生,提高组织的抗氧化能力,从而达到保护肝脏缺血再灌注损伤的作用。且病理学显示潘生丁组肝细胞水肿、变性、坏死较轻,肝水肿程度评价一肝指数(W/D%)明显降低($P < 0.05$),血小板的聚集率明显降低($P < 0.05$),且均有显著性差异,因此,笔者认为潘生丁的保护效果比阿霉素更好。

参考文献:

[1] Howell JG, Zibari G, Brown MF, *et al.* Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease leukocyte endothe-

lial cell interactions [J]. *Transplantation*, 2000, 69(2): 300 - 303.

[2] Koji IT, Hisashi OZ, Katsuhiko S, *et al.* Doxorubicin preconditioning: a protection against rat hepatic ischemia - reperfusion injury [J]. *Hepatology*, 2000, 31(2): 416 - 420.

[3] Kume M, Yamamoto K. Pharmacological hepatic preconditioning: involvement of 70 - kDa heat shock proteins (HSP72 and HSP73) in ischemic tolerance after intravenous administration of doxorubicin [J]. *British Journal of Surgery*, 2000, 87(9): 1168 - 1175.

[4] Pamela RU, Mario UM, Luis AV. Molecular mechanisms in liver ischemic - reperfusion injury and ischemic preconditioning [J]. *Rev Med Chile*, 2005, 133(4): 469 - 476.

[5] Xin HZ, Yu DQ, Hao S, *et al.* Effect of matrine on Kupffer cell activation in cold ischemia reperfusion injury of rat liver [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(6): 1112 - 1116.

[6] Yoshikazu T, Masayuki S, Yukiyasu K, *et al.* Dual role of vascular endothelial growth factor in hepatic ischemia - reperfusion injury [J]. *Transplantation*, 2005, 79(9): 1110 - 1115.

[7] Cutm JC, Perrelli MG, Cavalieri B, *et al.* Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of preconditioning. *Free Radic [J]. Biol Med*, 2002, 54(1): 28 - 33.

[8] Donckier V, Loi P, Closset J, *et al.* preconditioning of donors with interleukin - 10 reduces hepatic ischemia - reperfusion injury after liver transplantation in pigs [J]. *Transplantation*, 2003, 75(6): 902 - 904.

[9] Lee HJ, Lee MG. Pharmacokinetics of Adriamycin and Adriamycinol after intravenous administration of Adriamycin to rats with water - deprivation for 48 hours [J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, 1997, 96(2): 299 - 306.

[10] 陈新谦,金有豫,汤光. 新编药理学[M]. 第15版. 北京:人民卫生出版社,2003. 545.