

缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注肾损伤的影响

杨禄坤¹, 周少朋^{1*}, 林宇静², 肖笑雨¹, 朱颖娴¹
(中山大学附属第五医院 1.麻醉科, 2.病理科, 广东 珠海 519000)

摘要:【目的】探讨缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注肾损伤的影响及可能机制。【方法】30 只 SD 大鼠, 随机分为假手术对照组(Sham 组)、肝缺血再灌注组(IR 组)和缺血预处理组(IPC 组), 每组 10 例。Sham 组仅分离肝门区; IR 组用无损伤血管夹夹闭门静脉和肝动脉的分支, 阻断肝左、中叶血流, 缺血 40 min, 再灌注 6 h; IPC 组先缺血 5 min, 再灌注 5 min, 然后操作同 IR 组。肝缺血再灌注 6 h, 断头处死大鼠, 于下腔静脉抽取血样并取左肾和左肝。血样离心测定血清谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)和肌酐(Cr)的含量。左肾一半制成匀浆, 测定肾组织匀浆超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-6(IL-6)的含量, 另一半和左肝观察组织病理改变。【结果】与 Sham 组比较, IR 组和 IPC 组 ALT、AST、BUN、Cr、MDA、TNF- α 和 IL-6 含量升高, SOD 含量降低($P < 0.05$), 肾组织病理损伤明显; 与 IR 组比较, IPC 组 ALT、AST、BUN、Cr、MDA、TNF- α 和 IL-6 含量降低, SOD 含量升高($P < 0.05$), 肾组织病理损伤减轻。【结论】缺血预处理对肝缺血再灌注导致的肾损伤有保护作用, 其保护机制可能与减少氧自由基的释放和抑制炎症反应有关。

关键词: 再灌注损伤; 缺血预处理; 氧自由基; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-6

中图分类号: R322 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2012)06-0761-05

Effects of Ischemic Preconditioning on Kidney Injury Following with Hepatic Ischemia-Reperfusion in Rats

YANG Lu-kun¹, ZHOU Shao-peng^{1*}, LIN Yu-jing², XIAO Xiao-yu¹, ZHU Ying-xian¹

(1. Department of Anesthesiology, The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China; 2. Department of Pathology, The Fifth Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effects of ischemic preconditioning on the kidney injury following with hepatic ischemia-reperfusion injury in rats and the mechanism involved. 【Methods】 Thirty healthy male SD rats weighing 200–250 g were randomly assigned into three groups ($n = 10$ each): sham operation group (Sham group), hepatic ischemia-reperfusion group (IR group) and ischemic preconditioning group (IPC group). Rats in Sham group underwent surgery, only involved in hepatic hilar region isolating. In IR group, ischemia was achieved by clamping of the branches of the portal vein and hepatic artery that supply the median and left lateral hepatic lobes for 40 min with atraumatic mini-clamp, followed by 6 h reperfusion. In IPC group, each rat was subjected to 5 min ischemia followed by 5 min reperfusion prior to hepatic ischemia, and the rest procedures were as the same as IR group. The animals were killed at 6 h of reperfusion. The left kidney and the left lobe of liver were collected and blood sample was taken from the inferior vena cava. Serum was obtained by centrifugation to measure alanine transaminase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), blood urea nitrogen (BUN) and creatinine (Cr). Half of the left kidney was made into homogenate to measure superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6), while the other and the left lobe of liver were used for pathological analysis. 【Results】 Compared with Sham group, the content of ALT, AST, BUN, Cr, TNF- α , IL-6 and MDA significantly increased, SOD content significantly decreased, and pathological injury was severer in IR group and IPC group. Compared with IR group, the content of ALT, AST, BUN, Cr, TNF- α , IL-6 and MDA significantly decreased, SOD content significantly increased, and pathological injury was milder in IPC group. 【Conclusion】 Ischemic preconditioning can attenuate the kidney

收稿日期: 2012-06-01

基金项目: 珠海市科技计划项目(PC20081032)

作者简介: 杨禄坤, 医学硕士, 主治医师, 研究方向: 临床麻醉与器官保护, E-mail: yanglukun@yahoo.cn; * 通信作者: 周少朋, 博士, 副主任医师, 硕士生导师, E-mail: zsp005@163.com

injury following with hepatic ischemia-reperfusion injury by reducing the oxygen radicals and inhibiting the inflammatory reaction.

Key words: reperfusion injury; ischemic preconditioning; reactive oxygen species; superoxide dismutase; malondialdehyde; tumor necrosis factor- α ; interleukin-6

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(6): 761-765]

肝脏缺血再灌注损伤是肝脏手术中经常经历的病理生理过程,多见于需要阻断肝脏血流的肝脏外科手术,例如肝叶切除、肝肿瘤切除和肝移植等手术。肝脏缺血再灌注不仅导致肝脏损伤,还会导致远隔器的损伤。Park 等发现大鼠肝缺血再灌注会导致急性肾损伤^[1-2]。缺血预处理作为一种简单可行的内源性保护措施对肝缺血再灌注损伤具有保护作用^[3-5],但缺血预处理对肝缺血再灌注导致的肾损伤是否仍有保护作用,这方面的研究尚未见报道,因此,本研究拟探讨缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注后肾损伤的保护作用及其可能机制。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

清洁级成年健康雄性 SD 大鼠 30 只,体质量 200 ~ 250 g,购自广东省实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2008-0002。

1.2 模型制备

术前大鼠禁食 12 h,可自由饮水。腹腔注射 3%戊巴比妥钠(40 mg/kg)麻醉后,仰卧位固定于操作台上,参照 Yamada 等^[5]的方法制备肝缺血再灌注模型。无菌条件下腹部正中切口约 2 cm,分离肝脏周围韧带,暴露第一肝门,暴露肝脏左、中叶肝蒂,按的方法用无损伤血管夹将供应肝左、中叶的门静脉和肝动脉分支夹闭,使肝脏部分缺血约 70%,保持肝右叶和尾状叶血流通畅,防止门静脉及胃肠道淤血,阻断 40 min 后取下血管夹,恢复肝脏供血,实施再灌注 6 h。肝脏表面颜色变灰、质地变软为肝缺血成功标准,肝脏表面颜色恢复红润为再灌注成功标准。

1.3 动物分组

随机分为 3 组($n = 10$):假手术组(Sham 组)仅暴露第一肝门,不阻断肝门;缺血再灌注组(IR 组)缺血 40 min,再灌注 6 h;缺血预处理组(IPC 组)先缺血 5 min,再灌注 5 min,然后缺血 40 min,再灌注 6 h。

1.4 标本采集

肝脏再灌注 6 h 后,于大鼠下腔静脉抽取静脉血 5 mL,于常温下 3 000 r/min 离心 10 min(离心半径 $r = 13$ cm),取血清。断头处死大鼠,取左肾组织和部分左肝组织,一半肾组织放入 -80 °C 冰箱中保存以制备组织匀浆,另一半和左肝置于 100 mL/L 的甲醛溶液中固定 24 h,常规石蜡包埋。

1.5 标本检测

采用 HITACH 7170S 型全自动生化分析仪测定血清谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)和肌酐(creatinine, Cr)的含量。取 100 mg 肾组织加入 0.9 mL 生理盐水制成 10%的组织匀浆,采用化学比色法测定肾组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)的含量,采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)的含量,具体操作步骤参照说明书,试剂盒购于南京建成生物工程研究所。包埋石蜡连续切 4 μ m 厚切片,HE 染色,观察病理学形态的变化。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析。计量资料采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清 AST 和 ALT 的变化

与 Sham 组比较,IR 组和 IPC 组血清 AST、ALT 含量升高,与 IR 组比较,IPC 组 AST、ALT 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

2.2 血清 BUN 和 Cr 的变化

与 Sham 组比较,IR 组和 IPC 组血清 BUN、Cr 含量升高,与 IR 组比较,IPC 组 BUN、Cr 含量降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

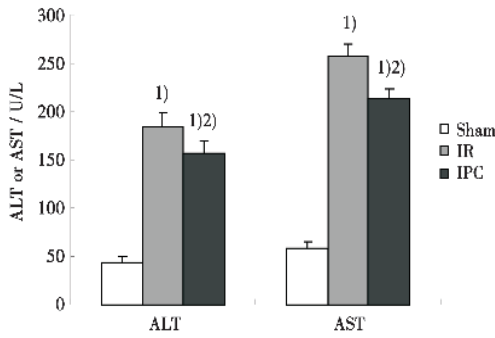


图 1 血清 AST 和 ALT 的变化

Fig.1 Changes of AST and ALT from serum

1) $P < 0.05$ vs Sham group, 2) $P < 0.05$ vs IR group.

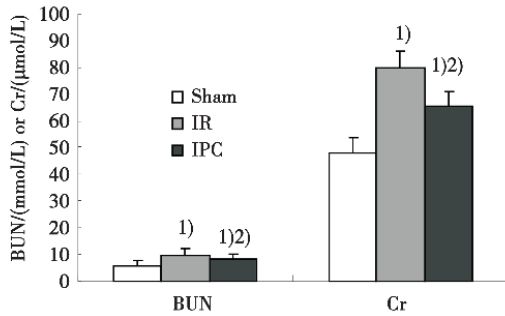


图 2 血清 BUN 和 Cr 的变化

Fig.2 Changes of BUN and Cr from serum

1) $P < 0.05$ vs Sham group, 2) $P < 0.05$ vs IR group.

2.3 肾组织 SOD 和 MDA 的变化

与 Sham 组比较, IR 组和 IPC 组 SOD 含量降低, MDA 含量升高, 与 IR 组比较, IPC 组 SOD 含量升高, MDA 含量降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3)。

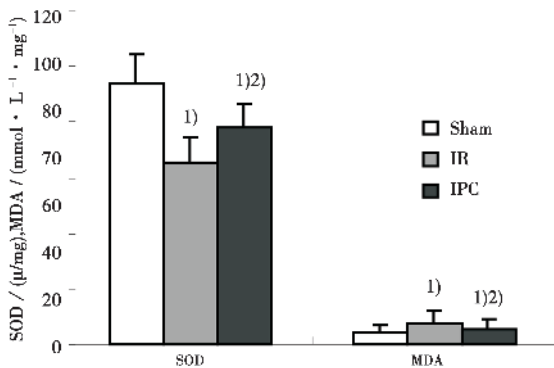


图 3 肾组织 SOD 和 MDA 的变化

Fig.3 Changes of SOD and MDA from renal tissue

1) $P < 0.05$ vs Sham group, 2) $P < 0.05$ vs IR group.

2.4 肾组织 TNF-α 和 IL-6 的变化

与 Sham 组比较, IR 组和 IPC 组 TNF-α、IL-6 含量升高, 与 IR 组比较, IPC 组 TNF-α、IL-6 含量降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。

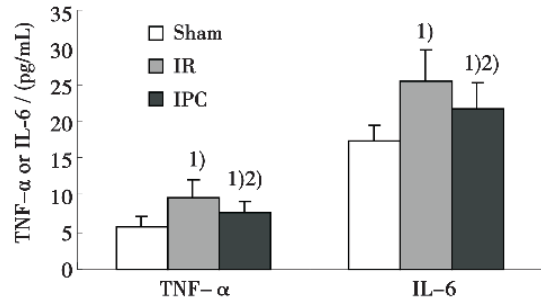


图 4 肾组织 TNF-α 和 IL-6 的变化

Fig.4 Changes of TNF-α and IL-6 from renal tissue

1) $P < 0.05$ vs Sham group, 2) $P < 0.05$ vs IR group.

2.5 肝组织病理的变化

Sham 组肝组织形态正常; IR 组肝细胞坏死严重, 呈灶状或片状坏死 (如图 5 肝 IR 箭头所示); IPC 组肝细胞水肿变性, 并见点状坏死, 坏死程度比 IR 组显著减轻 (如图 5 肝 IPC 箭头所示)。

2.6 肾组织病理的变化

Sham 组肾小管及间质结构正常; IR 组肾小管坏死严重, 肾小管上皮细胞变性坏死, 细胞崩解, 细胞碎屑阻塞管腔, 广泛细胞管型形成 (如图 6 IR 箭头所示); IPC 组坏死程度比 IR 组显著减轻, 仅个别管腔可见程度较轻的坏死, 肾小管上皮细胞空泡和颗粒变性 (如图 6 IPC 短箭头所示), 局部肾小管上皮细胞刷毛缘脱落, 细胞扁平 (如图 6 IPC 长箭头所示), 个别管腔内可见细胞崩解和细胞碎屑阻塞管腔 (如图 6 IPC 虚线箭头所示)。

3 讨论

在本研究中, IR 组大鼠肝缺血 40 min, 再灌注 6 h 后, 血清 AST 和 ALT 含量显著升高, 肝细胞呈碎片状坏死, 表明缺血再灌注导致大鼠肝脏损伤, 肝缺血再灌注损伤的模型制作成功。伴随着肝脏损伤, IR 组大鼠血清 BUN 和 Cr 含量升高, 肾组织病理切片可见广泛细胞管型形成, 肾小管坏死严重, 表明大鼠肝缺血再灌注可导致肾损伤, 与前人的研究结果一致^[1-2]。缺血预处理是一种重要的内源性保护机制, 即预先对一处组织器官进行短暂

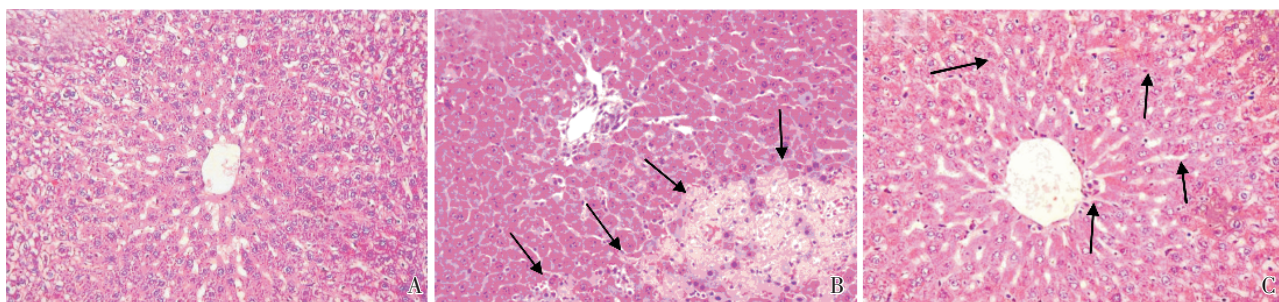


图 5 肝组织病理变化

Fig.5 Representative HE stained photomicrographs of the left lobe of liver

IR group and IPC group resulted in severe necrosis of liver cells compared with Sham group, and the necrosis was significantly milder in IPC group compared with in IR group. A: Sham, B: IR, C: IPC, $\times 100$.

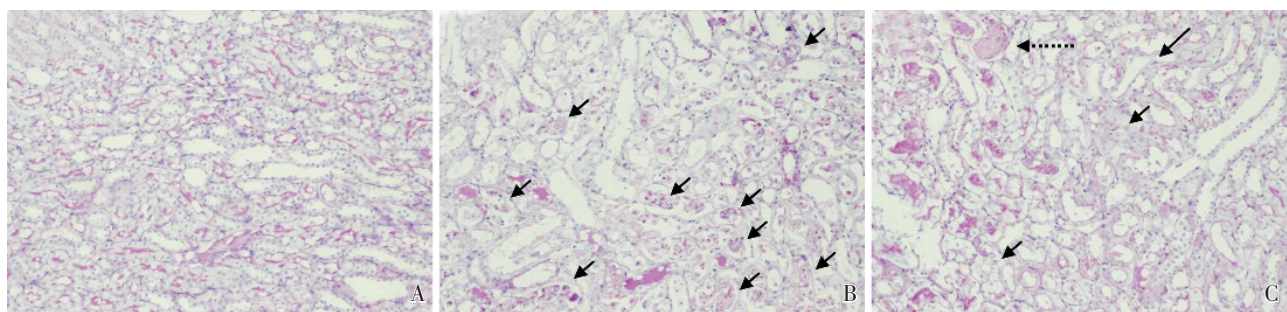


图 6 肾组织病理变化

Fig.6 Representative HE stained photomicrographs of the left kidney

IR group and IPC group resulted in severe necrosis of kidney tubular compared with Sham group, and the necrosis was significantly milder in IPC group compared with IR group. A: Sham, B: IR, C: IPC, $\times 100$.

非致死量的缺血再灌注处理,以提高局部和远端组织器官对抗接着的较长时间的缺血再灌注损伤的自身保护能力。在过去的动物实验研究中,阻断肝脏血流 5 ~ 15 min,再灌注 5 ~ 15 min,可减弱随后的较长时间短血再灌注对肝脏的损伤,并表明,缺血预处理的保护机制和抑制细胞凋亡有关^[6-7]。

本研究采用单次缺血 5 min 再灌注 5 min 的缺血预处理方案。尽管 IPC 组大鼠仍有肝和肾的功能下降和组织病理损伤,但与 IR 组比较,肝和肾的功能下降程度和组织病理损伤的程度却明显地减轻,表明缺血预处理对肝缺血再灌注导致的肝肾损伤有保护作用。已有研究证实缺血再灌注可促使氧自由基释放,引发体内脂质过氧化作用,诱发细胞凋亡,造成细胞损伤^[8-9]。氧自由基对生物体内蛋白质、核酸、骨胶原和多糖等正常物质均有毒性作用,并能破坏细胞器结构膜,引起溶酶体、微粒体及线粒体破裂;另外,氧自由基对细胞双层磷脂结构中的重要脂类有氧化作用,生成多

种脂质过氧化物,从而直接损伤细胞^[10]。SOD 能清除氧离子自由基,保护细胞免受损伤,反应机体清除氧自由基的能力。MDA 是脂质过氧化反应形成的脂质过氧化物,间接反应机体细胞受自由基攻击的严重程度。本研究中,与 IR 组比较,IPC 组大鼠肾组织匀浆 SOD 含量升高,MDA 含量降低,表明缺血预处理能增加 SOD 的活性,增强体内清除氧自由基的能力,减少氧自由基的释放,抑制体内脂质过氧化反应,减轻缺血再灌注损伤。

研究表明,炎症反应参与缺血再灌注损伤的过程,缺血发生后,单核细胞和白细胞向缺血区域浸润,活化的炎症细胞分泌 TNF- α 和 IL-6 等促炎细胞因子,促进炎症反应,诱导细胞凋亡,加重缺血再灌注损伤^[11-14]。TNF- α 刺激单核巨噬细胞合成和分泌白细胞介素等炎症介质,增强中性粒细胞上 CD11/CD18 的表达,诱导血管内皮细胞选择素生成增加,增强缺血时中性粒细胞与血管内皮细胞的黏附,促进中性粒细胞的激活、聚集与浸

润,加重缺血再灌注损伤^[15,16]。TNF- α 诱导细胞凋亡,导致血管内皮细胞功能减退,血管通透性增加,加重微循环障碍,微循环障碍又反过来诱导炎症介质的释放,包括 IL-1、IL-6、IL-8 和 IL-10 等细胞因子,构成炎症损伤的级联放大效应,进一步加重细胞的缺血再灌注损伤^[17-18]。本研究发现,与 IR 组比较,IPC 组大鼠肾组织匀浆 TNF- α 和 IL-6 的含量明显降低,表明缺血预处理能抑制促炎细胞因子的产生,抑制炎症反应,减轻缺血再灌注损伤。

综上所述,缺血预处理对肝缺血再灌注导致的肾损伤有保护作用,其保护机制可能与减少氧自由基的释放和抑制炎症反应有关。

参考文献:

- [1] Park SW, Chen SW, Kim M, et al. Protection against acute kidney injury via $\alpha 1$ adenosine receptor-mediated Akt activation reduces liver injury after liver ischemia and reperfusion in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 333(3): 736-747.
- [2] Park SW, Kim M, Brown KM, et al. Paneth cell-derived interleukin-17A causes multiorgan dysfunction after hepatic ischemia and reperfusion injury [J]. *Hepatology*, 2011, 53(5): 1662-1675.
- [3] Saito T, Ishii S, Abe T, et al. Effect of preconditioning in the liver against ischemia/reperfusion injury, protection of sinusoidal cells and alterations of gene transcription [J]. *Transplant Proc*, 2001, 33(1-2): 849-855.
- [4] Niemann CU, Hirose R, Liu T, et al. Ischemic preconditioning improves energy state and transplantation survival in obese Zucker rat livers [J]. *Anesth Analg*, 2005, 101(6): 1577-1583.
- [5] Yamada F, Saito T, Abe T, et al. Ischemic preconditioning enhances regenerative capacity of hepatocytes in long-term ischemically damaged rat livers [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 22(11): 1971-1977.
- [6] Yadav SS, Sindram D, Perry DK, et al. Ischemic preconditioning protects the mouse liver by inhibition of apoptosis through a caspase-dependent pathway [J]. *Hepatology*, 1999, 30(5): 1223-1231.
- [7] Hu GH, Lu XS. Effect of normothermic liver ischemic preconditioning on the expression of apoptosis-regulating genes C-jun and Bcl-XL in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(17): 2579-2582.
- [8] Jaeschke H, Woolbright BL. Current strategies to minimize hepatic ischemia-reperfusion injury by targeting reactive oxygen species [J]. *Transplant Rev (Orlando)*, 2012, 26(2): 103-114.
- [9] Perrelli MG, Pagliaro P, Penna C. Ischemia/reperfusion injury and cardioprotective mechanisms: Role of mitochondria and reactive oxygen species [J]. *World J Cardiol*, 2011, 3(6): 186-200.
- [10] Kim J, Jang HS, Park KM. Reactive oxygen species generated by renal ischemia and reperfusion trigger protection against subsequent renal ischemia and reperfusion injury in mice [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 298(1): F158-F166.
- [11] Sodha NR, Clements RT, Feng J, et al. Hydrogen sulfide therapy attenuates the inflammatory response in a porcine model of myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2009, 138(4): 977-984.
- [12] 荣健, 王治平, 吴钟凯, 等. 氧控制性再灌注抗犬体外循环肺缺血再灌注早期损伤[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2009, 30(6): 686-690.
- [13] Perry BC, Soltys D, Toledo AH, et al. Tumor necrosis factor- α in liver ischemia/reperfusion injury [J]. *J Invest Surg*, 2011, 24(4): 178-188.
- [14] 谷力加, 黄邵洪, 翁毅敏, 等. 评价早期肺缺血再灌注损伤敏感性的细胞因子探讨[J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2004, 25(Z1): 64-66.
- [15] Agardh CD, Agardh E, Obrosova IG, et al. The aldose reductase inhibitor fidarestat suppresses ischemia-reperfusion-induced inflammatory response in rat retina [J]. *Pharmacology*, 2009, 84(5): 257-263.
- [16] Kaloustian S, Bah TM, Rondeau I, et al. Tumor necrosis factor- α participates in apoptosis in the limbic system after myocardial infarction [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(11): 1308-1316.
- [17] Bigdeli MR, Rahnema M, Khoshbaten A, et al. Preconditioning with sublethal ischemia or intermittent normobaric hyperoxia up-regulates glutamate transporters and tumor necrosis factor- α converting enzyme in the rat brain [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2009, 18(5): 336-342.
- [18] Esposito E, Cuzzocrea S. TNF- α as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma [J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(24): 3152-3167.