

注射用内给氧对缺血再灌注损伤兔肝脏能量代谢的影响

陈卫东, 雷振东, 李永国

(中南大学 湘雅二医院 普通外科, 中国湖南 长沙 410011)

摘要: 为了探讨注射用内给氧对肝脏缺血再灌注(I/R)损伤肝脏能量代谢的影响, 将 48 只健康新西兰长耳大白兔随机分为 4 组: 假手术组(A 组), 缺血再灌注组(B 组), 缺血再灌注+周围静脉注射用内给氧组(C 组), 缺血再灌注+肝动脉注射内给氧组(D 组), 每组 12 只, 采用 Pringle 氏法建立肝脏 I/R 模型, 比较 4 组大白兔缺血再灌注后 1、2、24 h 肝组织内三磷酸腺苷(ATP)、二磷酸腺苷(ADP)、一磷酸腺苷(AMP)含量、肝脏的细胞能荷(EC)及肝组织形态学的变化。结果表明, 与 A 组比较, B、C、D 三组肝功能损害重, 肝组织 ATP 含量, 能荷值(EC)降低($P < 0.05$); 肝组织病理学改变明显($P < 0.05$), B 组以上各项指标差异更为显著, 与 B 组比较, C、D 二组肝组织 ATP 含量, 能荷值(EC)高($P < 0.05$); 肝组织病理学改变较轻($P < 0.05$); C 组与 D 组比较, 各参数无显著性差异。以上研究表明, 注射用内给氧可通过改善肝细胞的能量代谢而减轻肝缺血再灌注损伤。

关键词: 注射用内给氧; 肝脏; 缺血再灌注损伤

中图分类号: R332.47

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2008)02-0174-05

Effects of Intra Oxygen Injection on Hepato Cellular Energy Metabolism in the Reperfusion Injury After Hepatic Ischemia in Rabbits

CHEN Wei-dong, LEI Zhen-dong, LI Yong-guo

(Department of General Surgery, the Second Xiangya Hospital Affiliated to Central South University, Changsha 410011, Hunan, China)

Abstract: To study the effect of intra oxygen injection on hepatocellular energy metabolism in the reperfusion injury after hepatic ischemia in rabbits. 48 rabbits were randomized divided into four groups with A (sham surgery group), B (ischemia/reperfusion group), C (I/R+intra oxygen injection from peripheral vein group) and D (I/R+intra oxygen injection from hepatic artery group). Pringle's way was used to set up hepatic ischemia/reperfusion model. The contents of adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP) were measured. Energy charge (EC) in the liver tissue and hepatocellular morphological changes were observed. Firstly, compare to group A, the injury of liver function of the groups B, C, D were more serious. The ATP content of liver tissue and EC value in groups B, C and D were decreased ($P < 0.05$). The pathological change of liver tissue was evident ($P < 0.05$); the above indexes were greatly changed in group B. Secondly, compare to group B, the ATP content of liver tissue and EC value in groups C and D were higher ($P < 0.05$), the pathological change of liver tissue were minor ($P < 0.05$). Thirdly, there were no significant difference between groups C, D. It could be concluded that intra oxygen

收稿日期: 2008-03-20; 修回日期: 2008-04-16

作者简介: 陈卫东 (1970-) 男, 湖南邵阳人, 中南大学湘雅二医院普通外科主治医师, 博士, 主要从事普通外科疾病研究, Tel:

13808428769, E-mail: lxw105@126.com

injection can attenuate HIRI by improving hepato cellular energy metabolism.

Key words: intra oxygen injection; liver; ischemical reperfusion injury

(Life Science Research, 2008, 12(2) : 174 ~178)

缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤是由于脏器缺血缺氧后引起的一系列病理生理改变而导致的器官结构破坏、功能受损的过程^[1]. 肝脏 I/R 损伤常发生于肝移植、低血容量性和心源性休克以及肝脏肿块和肿瘤的肝叶手术切除中, 是肝功能急性损害的重要原因, 直接影响患者的恢复和术后生存率, 因而, I/R 损伤保护研究是肝脏外科一项重要的课题. 注射用内给氧可直接由静脉进入血液, 能绕过呼吸道、肺循环迅速到达缺氧组织, 提高氧饱和度, 改善组织的低氧血症^[2]. 本实验通过观察注射用内给氧对缺血再灌注 (I/R) 损伤兔肝脏中高能磷酸化合物含量及肝脏组织学、超微结构改变的影响, 以探讨其对肝缺血再灌注损伤时能量代谢的影响.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂

注射用内给氧 (碳酸酰胺过氧化氢) 购自哈药集团三精制药有限公司; ATP 对照品、AMP 对照品、ADP 对照品均购自 Sigma 公司; 蒸馏水为本院制剂室制备.

1.1.2 实验动物及分组

健康新西兰大白兔 48 只 (合格证号: 医动字第 20-002 号), 雌雄各半, 2.0~2.5 kg, 由本院实验动物中心提供. 48 只新西兰大白兔随机分成假手术组 (A 组), 缺血再灌注组 (B 组), 缺血再灌注+周围静脉注射用内给氧组 (C 组), 缺血再灌注+肝动脉注射内给氧组 (D 组), 每组 12 只.

1.2 方 法

1.2.1 给药方法

大白兔试验前禁食 12 h, 自由饮水, 麻醉采用静脉麻醉. 称重后按 3% 戊巴比妥钠 1 mg/kg 体重经耳缘静脉注射. 麻醉满意后仰卧固定于实验台上, 腹部剪毛、备皮后消毒铺巾, 取上腹正中切口长约 5 cm, 依次切开进腹, 常规检查肝、胰、胃、肠等腹内脏器无器质性病变后, 显露肝门、肝蒂, 分离大白兔肝动脉、门静脉, 采用 Pringle 氏法^[3], 用无损伤小动脉夹阻断肝十二指肠韧带中的肝动脉、门静脉和胆总管, 解除钳夹,

恢复肝血流即为再灌注. 除假手术组 (A 组) 不阻断肝门入肝血流外, 余 3 组大白兔入肝血流阻断时间均为 30 min. B 组单纯阻断不给注射用内给氧. C 组在入肝血流阻断前通过耳缘静脉用微量输液泵输入 1% 碳酸酰胺过氧化氢生理盐水溶液, 输入量按体重每 100 g 输液 1.66 mg, 持续 30 min 后即阻断入肝血流. D 组在阻断入肝血流同时用微量输液泵从肝动脉内给予 1% 碳酸酰胺过氧化氢生理盐水溶液, 输入量按体重每 100 g 输液 1.66 mg, 维持 30 min 滴完. 阻断入肝血流 30 min 后松开血管夹使肝脏进入再灌注期.

A 组于解剖肝门, 游离肝动脉后 1、2、24 h 采集肝脏组织标本, B、C、D 组分别于再灌注后 1、2、24 h 采集肝脏组织标本. 方法: 穿刺取肝组织, 部分置液氮罐冷藏, 留作三磷酸腺苷 (ATP)、能荷值 (EQ)、检测. 部分置固定液 (光镜为 10% 福尔马林, 电镜为 2.5% 戊二醛) 内保存, 留作组织形态学检查.

1.2.2 检测方法

采用高效液相色谱仪 (岛津 LC-10A 型) 色谱条件: ODS C₁₈ 色谱柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, 大连依利特), 35 °C 柱温, 254 nm 检测波长; 流动相: 甲醇 0.16 mol/L (pH 6.5) KH₂PO₄ 缓冲液 (15:85), 测 ATP、ADP; 甲醇 0.25 mol/L (pH 4.25) NH₄H₂PO₄ (17:83) 缓冲液测 AMP. 参照 Lanir^[3] 法测定肝组织中 ATP、ADP、AMP 含量, 并计算能荷值 (EQ), EQ 等于 (ATP+0.5ADP)/(ATP+ADP+AMP). 肝组织行光镜、电镜病理组织学观察.

1.2.3 统计学分析

所有资料采用 SPSS12.00 进行统计学分析, 组间计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm SD$) 表示, 组间比较进行 t 检验, 计数资料进行 χ^2 检验.

2 结 果

2.1 肝组织中 ATP 含量、能荷值 (EQ)

与 A 组比较, B 组、C 组、D 组肝组织的 ATP 含量、EQ 均明显降低, 其中以 B 组减低显著 ($P < 0.01$); C 组、D 组与 B 组比较有显著差异性 ($P < 0.05$). C 组、D 组肝组织 ATP 含量、EQ 明显高于

B 组; C 组与 D 组比较, 两组差异不显著 ($P > 0.05$). 具体结果见表 1、表 2.

2.2 肝组织形态学变化

2.2.1 光镜检查

镜下见 A 组仅有 3 例肝细胞轻度水肿外, 其余肝细胞结构正常, B 组 12 例肝细胞均有水肿, 其中 7 例达到重度水肿, 细胞呈气球样, 并有 6

例肝细胞呈点片状溶解性坏死, 胞浆崩解, 胞核消失, 肝脏淤血明显, 有炎性细胞浸润; 内给氧治疗的 C 组、D 组肝细胞水肿程度较 B 组明显降低 ($P < 0.05$), 肝细胞嗜酸性变及坏死程度均减轻 ($P < 0.05$), 肝脏淤血得到显著改善 ($P < 0.05$), 具体结果见表 3.

表 1 肝组织中 ATP、ADP 含量 ($\bar{x} \pm SD$)
Table 1 The content of ATP, ADP in liver tissue ($\bar{x} \pm SD$)

	ATP			ADP		
	T ₀ 1 h)	T ₀ 2 h)	T ₀ 24 h)	T ₀ 1 h)	T ₀ 2 h)	T ₀ 24 h)
A	2.62 ± 0.13	2.58 ± 0.12	2.64 ± 0.09	5.24 ± 0.18	5.16 ± 0.13	5.23 ± 0.16
B	0.35 ± 0.09**	0.68 ± 0.13**	1.32 ± 0.08**	4.78 ± 0.16	4.82 ± 0.15	4.98 ± 0.12
C	1.40 ± 0.14'	1.46 ± 0.09'	1.82 ± 0.13'	5.03 ± 0.13	5.21 ± 0.21	5.22 ± 0.13
D	1.42 ± 0.12'	1.52 ± 0.15'	1.96 ± 0.12'	5.06 ± 0.12	5.18 ± 0.19	5.20 ± 0.16

注: ** : $P < 0.01$; ' : $P < 0.05$ 与 A 组相应时间点比较; : $P < 0.05$ 与 B 组相应时间点比较.

Notes: Compared to the corresponding time points of group A; **: $P < 0.01$; ' : $P < 0.05$; Compared to the corresponding time points of group B; : $P < 0.05$.

表 2 肝组织中 AMP 含量及 EC 值 ($\bar{x} \pm SD$)
Table 2 The EC value and the content of AMP in liver tissue ($\bar{x} \pm SD$)

	AMP			EC		
	T ₀ 1 h)	T ₀ 2 h)	T ₀ 24 h)	T ₀ 1 h)	T ₀ 2 h)	T ₀ 24 h)
A	3.86 ± 0.13	3.76 ± 0.10	4.01 ± 0.12	0.78 ± 0.08	0.76 ± 0.12	0.76 ± 0.09
B	4.33 ± 0.14	4.37 ± 0.18	4.29 ± 0.17	0.42 ± 0.09**	0.40 ± 0.12**	0.41 ± 0.10**
C	3.91 ± 0.12	3.83 ± 0.15	3.87 ± 0.17	0.59 ± 0.08'	0.58 ± 0.09'	0.61 ± 0.10'
D	3.92 ± 0.13	3.89 ± 0.14	3.92 ± 0.16	0.61 ± 0.12'	0.59 ± 0.08'	0.59 ± 0.06'

注: ** : $P < 0.01$; ' : $P < 0.05$ 与 A 组相应时间点比较; : $P < 0.05$ 与 B 组相应时间点比较.

Notes: Compared to the corresponding time points of group A; **: $P < 0.01$; ' : $P < 0.05$; Compared to the corresponding time points of group B; : $P < 0.05$.

表 3 兔肝病理形态学改变
Table 3 Hepatocellular morphological change of Rabbits

病理改变 Pathology change	Group A					Group B					Group C				Group D			
	-	+	++	+++	P	-	+	++	+++	P	-	+	++	+++	-	+	++	+++
肝细胞水肿 Hepatocellular edema	9	3	0	0	<0.01	0	0	5	7	<0.05	4	4	3	1	5	4	2	1
肝细胞脂变 Hepatocyte lipid change	9	3	0	0	<0.01	0	1	8	3	<0.05	6	3	2	1	8	3	1	1
嗜酸性变 Acidophilia change	9	3	0	0	<0.01	0	1	3	8	<0.05	6	3	2	1	8	3	1	1
肝细胞坏死 Hepatocellular necrosis	10	2	0	0	<0.01	0	2	4	6	<0.05	8	3	1	0	9	2	1	0
肝淤血 Hepatocellular congestion	10	2	0	0	<0.01	0	2	5	5	<0.05	7	4	1	0	7	4	1	0
肝细胞再生 Hepatocellular regeneration	9	3	0	0	>0.05	7	5	0	0	>0.05	9	2	1	0	9	2	1	0

注: P 值: A 组与 C、B、D 组比较, B 组与 C、D 组比较

Notes: Value P: group A, was compared to group C, B and D; group B, was compared to group C and D.

2.2.2 电镜检查

镜下,由图 1 见 A 组肝细胞呈基本正常肝细胞结构,内质网、线粒体及糖原丰富,胞核圆形;B 组肝细胞胞浆水肿,线粒体数目减少,仅存的线粒体有固缩,由于细胞水肿,仅见核周的粗面内质网,核固缩,染色质凝集成块;C 组肝细胞胞浆

仅轻度水肿,内质网及线粒体丰富,少部分线粒体水肿,核形态正常,可见核仁;D 组肝细胞胞浆局部水肿、崩解,肝细胞内细胞器丰富,分布基本正常,仅少数线粒体水肿、空泡变,可见部分肝细胞的核固缩、变小。

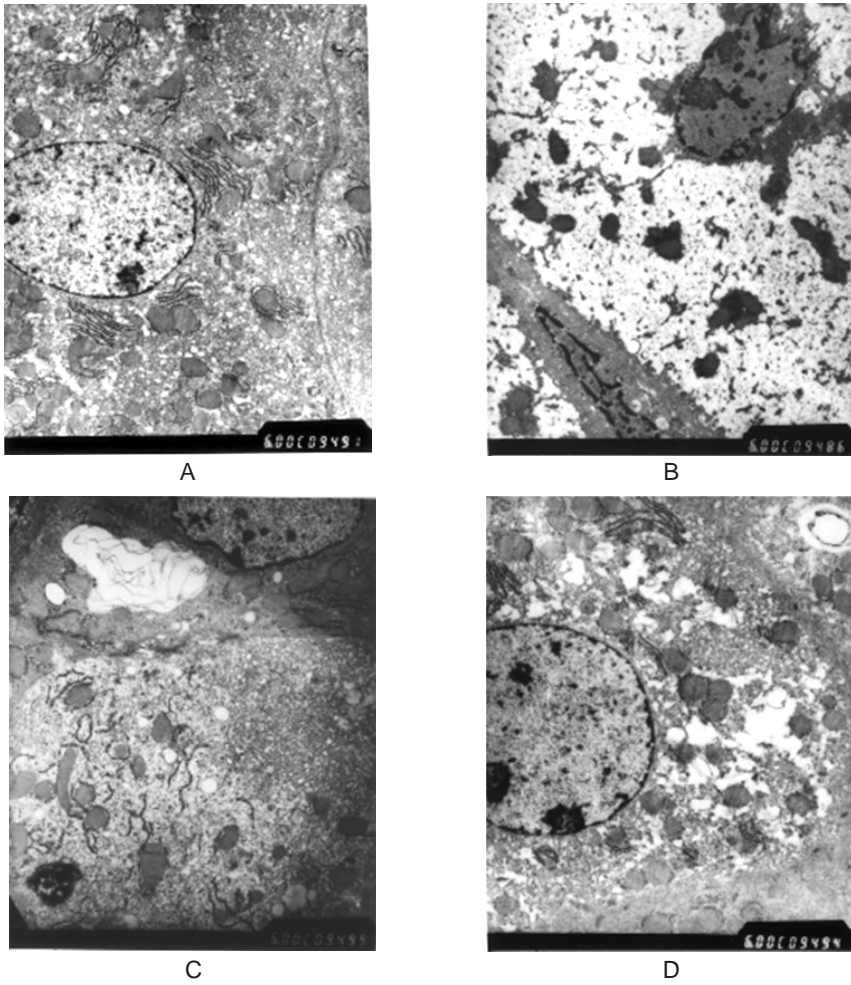


图 1 肝组织电镜下结构图
Fig.1 The liver tissue electron microscopy structure

3 讨论

缺血再灌注时,缺血、缺氧首先导致细胞有氧代谢的障碍,使细胞内的 ATP 合成量急剧下降。Astarcioglu^[4]等报道肝脏缺血期细胞内的无氧糖酵解是肝脏的能量来源。肝脏在有氧代谢时每摩尔葡萄糖或糖原产生 38 mol 的 ATP,而在无氧代谢时只产生 3 mol 的 ATP,且缺氧时 ATP 大量分解为核苷酸,后者通过细胞膜弥散至细胞外液,使肝细胞线粒体再生 ATP 的前物质大量丢失,限制线粒体能量的再生。能量的供给不足使胞膜的通透性增加,同时细胞膜的 Na⁺-K⁺-ATP 酶功能降

低,细胞 Na⁺内流、K⁺外流,造成细胞的急剧水肿。细胞缺氧损害的后期,胞膜破裂,细胞外 Ca²⁺内流增加而积聚于细胞内;同时由于 ATP 合成减少,Ca²⁺-ATP 酶活性降低,细胞内 Ca²⁺外排减少,导致细胞内 Ca²⁺超载^[5]。钙离子重要的生理功能是作为第二信使,通过钙信使系统 (calcium messenger system, CMS) 调节肝细胞的生理机能。正常生理条件下,细胞内外 Ca²⁺浓度存在很大的梯度 10⁻⁷ mol/L 与 10⁻³ mol/L。细胞内低的 Ca²⁺浓度是维持细胞正常功能的前提。缺氧状况下,导致肝细胞内外出现钙离子反常现象 (calcium paradox),它是缺血再灌注器官损伤的

生化基础^[6]。肝细胞内钙超载也可激活磷脂酶、巨噬细胞和蛋白水解酶,促进氧自由基大量生成,诱发花生四烯酸生成和促进内皮素生成,使线粒体 ATP 合成减少等引起肝脏出现一系列病理改变,出现肝损伤。在细胞缺氧受损的晚期,出现细胞 Cl^- 的内流,进而细胞膜破坏溶解, DNA 损伤,最终导致细胞死亡^[7]。

EC 是评价细胞能量水平的客观指标,正常能荷的保持是维持肝脏线粒体正常功能及产生足够 ATP 的重要条件^[8]。线粒体能否产生足够的 ATP 取决于两个因素:氧气和能量基质。肝脏耗氧量仅次于大脑,对低氧的耐受性相对较差,低氧后肝细胞从功能到结构发生一系列变化。故在肝缺血、低氧时,肝脏氧气和能量基质转运受到限制,而设法改善和维持肝脏的能量状态,提高 ATP 的水平,是抵抗缺血、低氧损伤的重要措施。

本实验研究显示注射用内给氧治疗组(C、D组)肝组织 ATP 含量,能荷值(EO)比非干预组 B 组明显升高($P < 0.05$),肝功能损伤减轻,肝组织病理形态改变减轻,证明通过不同途径用注射用内给氧干预肝脏缺血再灌注损伤,能有效提高肝脏内氧储备,改善肝脏组织缺氧程度,促进有氧代谢和 ATP 产生,防止细胞水肿、细胞内钙离子超载和肝脏微循环障碍的发生,从而消除肝脏缺血再灌注损伤形成的生化基础和病理基础,防治肝脏的缺血再灌注损伤。

参考文献(References):

- [1] GUELER F, GWINNER W, SCHWARZ A, et al. Long-term effects of acute ischemia and reperfusion injury[J]. *Kindney Int*, 2004, 66, 523-527.
- [2] SCHMIDT H, REGELSBERGER S. Intravenous oxygen therapy-an interpretation of results in practice from a biochemical and physiological point of view[J]. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd*, 2002; (1): 7-18.
- [3] 王成友, 倪勇, 何海萍, 等. 入肝血流阻断对肝组织 P_iO_2 、 P_iCO_2 、pH 和 T 的影响[J]. *肝胆外科杂志* WANG Chen-you, NI Yong, HE Hai-ping, et al. The change of hepatic tissue P_iO_2 , P_iCO_2 , pH and temperature in ischemia reperfusion injure in rabbit liver[J]. *Journal of Hepatobiliary Surgery*, 2001, 9: 111-113.
- [4] ASTARCI OGLU I, ADAM R, GIGOU M, et al. High levels of glucogen in the donor liver improve survival after liver transplantation in rats[J]. *Transplant Proc*, 1991, 23(5): 2465.
- [5] 安世芝, 王月兰. 异丙酚与肝脏缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *医学综述* (AN Shi-zhi, WANG Yue-lan. Advance of hepato reperfusion injury and propofol[J]. *Medical Review*), 2006, 12(4): 239-240.
- [6] 苏明. 肝脏缺血再灌注损伤的机理与治疗[J]. *中国科技信息* (SU Ming. The mechanism and therapy of hepato reperfusion injury[J]. *China Science and Technology Information*), 2005, 9: 128.
- [7] 徐迅迪, 黄生福, 胡继雄, 等. 肌红蛋白的表达对肝缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *中国普通外科杂志* XU Xun-di, HUANG Sheng-fu, HU Ji-xiong, et al. Protection of expression of myoglobin on hepato reperfusion injury[J]. *Journal of China General Surgery*, 2004, 13(9): 658-660.
- [8] 王万铁, 林丽娜, 王卫, 等. 异丙酚对家兔肝缺血/再灌注损伤后抗氧化能力改变的影响[J]. *中国应用生理学杂志* (WANG Wan-tie, LIN Li-na, WANG Wei, et al. Effects of propofol on the antioxidation of rabbit hepato reperfusion injury[J]. *China Journal of Applicable Physiology*), 2005, 21(1): 26-29.