

山莨菪碱对肝脏缺血再灌注后氧自由基的影响

董满库, 崔彦, 周立艳, 施靖华, 王强, 王平, 吉敏, 李晓鸥

董满库, 崔彦, 周立艳, 王平, 吉敏, 李晓鸥, 中国人民解放军第306医院肝胆外科 北京市 100101
施靖华, 王强, 中国人民解放军第二军医大学附属长征医院 上海市 200003
项目负责人: 董满库, 100101, 北京市安翔北里9号, 中国人民解放军第306医院肝胆外科. cuiyan@public.fhnet.cn.net
收稿日期: 2002-09-13 接受日期: 2002-10-03

摘要

目的: 探讨山莨菪碱对肝脏缺血再灌注后氧自由基的影响作用。

方法: 选用 Wistar 大鼠 160 只, 随机分为正常对照组、缺血再灌注组、生理盐水组和山莨菪碱组, 观察了肝脏缺血 60 min 再灌注 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h 后血浆和 / 或肝组织中内皮素 - 1 (ET-1)、谷丙转氨酶 (ALT)、丙二醛 (MDA) 和再灌注 1h 后肝细胞内游离 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 含量变化以及肝组织病理学变化。

结果: 肝脏缺血再灌注后血浆和 / 或肝组织中 ET-1、ALT、MDA 和肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量均显著升高。肝脏缺血再灌注前应用山莨菪碱后, 肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量明显降低, 肝组织中 MDA 也有不同程度的降低, 同时肝酶的漏出减少, 肝组织病理学损害明显减轻。

结论: 山莨菪碱可以减少肝脏缺血再灌注后氧自由基的生成, 对肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用。

董满库, 崔彦, 周立艳, 施靖华, 王强, 王平, 吉敏, 李晓鸥. 山莨菪碱对肝脏缺血再灌注后氧自由基的影响. 世界华人消化杂志 2003; 11(1): 82-84
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/82.htm>

0 引言

肝脏缺血再灌注损伤是肝脏和创伤外科疾病中常见的病理过程, 许多疾病均涉及到这一过程, 如严重的肝外伤、广泛的肝叶切除、肝移植以及休克、感染等。导致肝脏缺血再灌注损伤的原因众多, 机制复杂。研究发现, 氧自由基在肝脏缺血再灌注损伤中起了重要作用^[1-5], 我们在实验中选用山莨菪碱, 以探讨其对肝脏缺血再灌注后氧自由基生成的影响及其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物与试剂 本实验选用 Wistar 大鼠, 重约 210-250 g, 由第二军医大学实验动物中心提供; ET-1 试剂盒由解放军总医院东亚免疫技术研究所提供; MDA 试剂盒由南京建成生物工程研究所提供; Fura-

2/AM, Triton-x-100 和 EGTA 购自美国 sigma 公司; 山莨菪碱由江苏连云港东风制药总厂提供。

1.1.2 动物模型制作及分组 实验动物术前 12 h 禁食, 自由进水, 以 3% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 腹腔内注射麻醉, 取上腹正中切口, 显露第一肝门部, 按 Nauta et al^[6] 的方法制作肝脏缺血再灌注模型 (此模型可造成约 70% 的肝脏缺血, 但不影响门静脉血液回流)。动物随机分为 4 组: (1) 正常对照组 (A 组): 只行假手术; (2) 缺血再灌注组 (B 组): 阻断入肝血流 60 min 后松开无创动脉夹, 恢复入肝血流, 于所需时相点处死动物取材; (3) 生理盐水组 (C 组): 阻断入肝血流前 10 min 自尾静脉注射生理盐水 1 ml, 其他同 B 组; (4) 山莨菪碱组 (D 组): 阻断入肝血流前自尾静脉注射稀释成 1 ml 的山莨菪碱约 0.5 mg (2.0 mg/kg), 其余同 B 组。

1.2 方法

1.2.1 血浆和肝组织中 ET-1 含量的测定 血浆 ET-1 含量的测定: 采取血液约 1 ml, 加入 10 μ l 10% EDTA 二钠和 20 μ l 抑肽酶, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 3 000 rpm 离心 10 min, 取上清液于 -70 $^{\circ}$ C 保存。肝组织中 ET-1 含量的测定: 切取活肝组织约 100 mg, 加入 1 ml 1 mmol HCl 碾磨, 随后置于 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 匀浆, 4 $^{\circ}$ C 3 000 rpm 离心 10 min, 取上清液于 -70 $^{\circ}$ C 保存。测定前将标本置于冷水中复融, 再次离心, 取上清液按 ET-1 试剂盒说明书所述方法用放射免疫法测定血浆和肝组织中 ET-1 含量。

1.2.2 肝组织中 MDA 含量的测定 切取活肝组织约 100 mg, 加入 1 ml 1 mmol HCl 碾磨, 随后置于 100 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 匀浆, 4 $^{\circ}$ C 3 000 rpm 离心 10 min, 取上清液于 -70 $^{\circ}$ C 保存。测定前将标本置于冷水中复融, 再次离心, 取上清液, 按 MDA 试剂盒说明书所述方法用硫代巴比妥酸比色法测定肝组织中 MDA 含量。

1.2.3 肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量的测定 将新鲜肝组织制成细胞悬液, 浓度调至 $1 \times 10^9/L$, 离心去上清液, 加 Fura-2/AM 及适量负载液, 混均, 置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中共温浴 45 min, 并持续均匀轻振, 使 Fura-2/AM 进入细胞内并充分反应。温浴后离心去上清液, 用悬浮液 (负载液中加入 $CaCl_2$) 冲洗 2 次, 然后再加适量悬浮液, 保持 37 $^{\circ}$ C 1 h 内测完。将样品移入 10 nm 石英比色池内, 设定激发光栅 5 nm, 发射光栅 10 nm, 发射波长 500 nm, 以 300-500 nm 激发光谱扫描测定荧光值 F; 加 Triton-x-100 (1 g/L) 破坏细胞膜, 测定 F_{max} ; 再加 EGTA (6 mmol/L) 测定 F_{min} 。结果计算: $[Ca^{2+}]_i = kd \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$, 其中 kd 是 Fura-2 和 Ca^{2+} 反应的解离常数, 为 314 nmol/L。

1.2.4 血浆 ALT 含量的测定 血浆 ALT 含量用常规生化方法测定。

1.3 肝组织病理学变化的观察 采取新鲜肝组织用质量浓度为 100 g/L 的甲醛溶液固定 24 h,按病理学常规制片, H-E 染色, 光学显微镜观察。

统计学处理 实验所得数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较用 Student's t 检验。

2 结果

2.1 血浆和肝组织中各检测指标含量的变化

2.1.1 血浆和肝组织中 ET-1 含量的变化 肝脏缺血再灌注后, 血浆和肝组织中 ET-1 含量均显著升高, 于再灌注后第 3 小时达到高峰, 此后缓慢下降, 与 A 组比较, 其他各组均有明显的统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$); 应用山莨菪碱后, ET-1 略有下降, 但与 B, C 组无明显统计学意义, 见表 1, 表 2。

2.1.2 血浆 ALT 含量的变化 血浆 ALT 于缺血再灌注后第 6 小时达高峰, 再灌注后 24 h 仍维持在较高水平, 与 A 组比较, 其他各组均有统计学意义 ($P < 0.01$); 应用山莨菪碱后, 血浆 ALT 含量明显下降, 与 B、C 组比

较有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

2.1.3 肝组织中 MDA 含量的变化 肝脏缺血再灌注后, 肝组织中 MDA 含量增加, 第 6 小时达高峰, 第 24 小时基本接近正常水平, 与 A 组比较, B、C 组有统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$), D 组与 B、C 组相比, 部分时相点有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 4。

2.1.4 肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量的变化 肝脏缺血再灌注后, 肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量升高, 与 A 组 (154 ± 12 nmol/L) 比较, B 组 (384 ± 16 nmol/L)、C 组 (368 ± 15 nmol/L) 均有统计学意义 ($P < 0.01$); 而 D 组 (218 ± 14 nmol/L) 与 B、C 组比较也有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 肝组织病理学变化 光镜下正常对照组肝细胞和肝窦内皮细胞均正常。缺血再灌注组和生理盐水组肝脏瘀血明显, 以门静脉为中心向周边呈放射状排列, 同时, 肝细胞可见不同程度的浊肿变性和空泡状变性, 偶尔可见点状坏死; 晚期主要以肝细胞局灶性及片状坏死为主。山莨菪碱组再灌注后早期肝脏的瘀血明显减轻, 细胞变性坏死不明显, 晚期偶尔可观察到点状坏死, 无成片状细胞坏死。

表 1 血浆 ET-1 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, pg/ml)

| 再灌注时间 | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
|-------|-----------------|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| B 组 | 5.2 ± 1.3^a | 12.8 ± 1.2^a | 5.6 ± 1.6^a | 4.8 ± 0.8^a | 4.1 ± 0.8^a |
| C 组 | 4.8 ± 0.3^a | 11.5 ± 0.6^a | 7.3 ± 0.4^a | 4.5 ± 1.8^a | 4.2 ± 0.6^a |
| D 组 | 4.2 ± 1.6^a | 9.3 ± 0.8^a | 5.2 ± 1.2^a | 4.0 ± 0.8^a | 3.9 ± 0.4^a |

^a $P < 0.01$ vs A 组 (1.1 ± 0.5).

表 2 肝组织中 ET-1 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, ng/100 mg)

| 再灌注时间 | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
|-------|----------------|----------------|----------------|----------------|--------------|
| B 组 | 314 ± 34^b | 650 ± 82^a | 381 ± 68^a | 325 ± 65^b | 206 ± 25 |
| C 组 | 302 ± 25^b | 570 ± 48^a | 385 ± 56^a | 302 ± 60^b | 210 ± 30 |
| D 组 | 284 ± 20^b | 582 ± 60^a | 360 ± 48^a | 310 ± 58^b | 198 ± 31 |

^a $P < 0.01$ vs A 组 (164 ± 30), ^b $P < 0.05$ vs A 组。

表 3 血浆 ALT 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, u/L)

| 再灌注时间 | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
|-------|------------------|------------------|-------------------|------------------|------------------|
| B 组 | 137 ± 32^a | 144 ± 33^a | 182 ± 36^a | 162 ± 28^a | 148 ± 32^a |
| C 组 | 140 ± 35^a | 148 ± 38^a | 176 ± 28^a | 152 ± 42^a | 150 ± 36^a |
| D 组 | 82 ± 12^{ab} | 88 ± 15^{ab} | 102 ± 14^{ab} | 91 ± 25^{ab} | 90 ± 18^{ab} |

^a $P < 0.01$ vs A 组 (19 ± 4), ^b $P < 0.05$ vs B、C 组。

表 4 肝组织中 MDA 含量的变化 ($\bar{x} \pm s$, nmol/g)

| 再灌注时间 | 1 h | 3 h | 6 h | 12 h | 24 h |
|-------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|---------------|
| B 组 | 7.9 ± 1.2^b | 8.2 ± 1.0^b | 11.2 ± 1.6^a | 10.2 ± 1.4^a | 6.5 ± 0.6 |
| C 组 | 7.4 ± 0.8^b | 9.4 ± 0.6^a | 10.4 ± 1.8^a | 9.6 ± 2.0^a | 6.0 ± 0.4 |
| D 组 | 6.0 ± 0.4 | 6.2 ± 0.8 | 6.0 ± 1.2^c | 5.2 ± 0.3^c | 4.4 ± 0.6 |

^a $P < 0.01$ vs A 组 (4.0 ± 1.1); ^b $P < 0.05$ vs A 组; ^c $P < 0.05$ vs B、C 组。

3 讨论

我们在实验中观察到,肝脏缺血再灌注后血浆 ET-1、ALT 和肝组织中 ET-1、MDA、肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 含量均显著增加,说明肝脏缺血再灌注后导致了肝细胞损伤.研究发现^[7,8],在肝血管平滑肌细胞和肝窦贮脂细胞膜上存在 ET_A和 ET_B受体,ET-1可作用于 ET_A受体,使平滑肌细胞和贮脂细胞收缩,最终导致肝脏微循环障碍,使入肝血流量减少^[9].肝脏缺血缺氧时,ATP 生成减少甚至停止,同时 ATP 分解加速,ATP 的减少可降低 Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-ATP 酶的活性,Na⁺和 Ca²⁺便在细胞内蓄积,导致细胞水肿和细胞内 Ca²⁺超载.细胞内 Ca²⁺超载可激活 Ca²⁺依赖性蛋白水解酶,在 ATP 降解产物代谢过程中,可促进活性氧自由基的生成^[9].ET-1 还可刺激兴奋性氨基酸的释放,促进中性粒细胞的黏附,活化释放蛋白酶产生氧自由基^[10,11].氧自由基可导致脂质过氧化反应,使细胞膜和膜酶损伤,同时,非自由基的醛式代谢产物还能带着自由基的损伤潜能,从其生成的部位如内质网扩散到线粒体、核糖体和其他细胞成分,导致细胞和细胞组分的损伤.

肝脏缺血再灌注前应用山莨菪碱,可使肝细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 和肝组织中 MDA 的含量明显下降,以及肝酶的漏出减少,说明山莨菪碱可以减轻肝细胞内 Ca²⁺超载并降低氧自由基的产生.山莨菪碱可嵌入细胞膜脂质双层,增加膜的流动性,有利于细胞膜发挥其功能^[12-14].山莨菪碱还具有稳定细胞内溶酶体膜,保护线粒体和提高细胞利用氧的能力,同时还可以增强线粒体固定 Mg²⁺的能力,从而减少 Mg²⁺的丢失^[15].由于应用山莨菪碱后细胞膜和细胞器膜受到了较好的保护,同时 Mg²⁺的丢失减少,故可以减轻肝细胞和线粒体内 Ca²⁺超载.研究发现,山莨菪碱还可通过蛋白激酶 C 系统阻断 Ca²⁺内流,从而减轻肝窦内皮细胞和肝细胞的损伤.细胞内 Ca²⁺超载的减轻,可以减少 Ca²⁺依赖性蛋白水解酶的激活,减少黄嘌呤脱氢酶向黄嘌呤氧化酶的转化,从而可使氧自由基的生成减少.由此可见,山莨菪碱可以减少氧自由基的生成,对肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用.

4 参考文献

- 1 Yamaguchi Y, Matsumura F, Liang J, Okabe K, Ohshiro H, Ishihara K, Matsuda T, Mori K, Ogawa M. Neutrophil elastase and oxygen radicals enhance monocyte chemoattractant protein- expression after ischemia/reperfusion in rat liver. *Transplantation* 1999; 68:1459-1468
- 2 Gasbarrini A, Pasini P, Nardo B, De Notariis S, Simoncini M, Cavallari A, Roda E, Bernardi M, Roda A. Chemiluminescent real time imaging of post-ischemic oxygen free radicals formation in livers isolated from young and old rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:211-216
- 3 Vendemiale G, Grattagliano I, Altomare E. An update on the role of free radicals and antioxidant defense in human disease. *Int J Clin Lab Res* 1999; 29:49-55
- 4 王万铁, 林丽娜, 徐正 介, 王宗敏. 中性粒细胞在肝缺血再灌注损伤中的作用及川芎嗪的保护效应. *世界华人消化杂志* 1998; 6:774-775
- 5 陈玺华, 鲍民生, 李正中. 大鼠肝缺血腺苷预处理的作用机制. *世界华人消化杂志* 1999; 7:298-299
- 6 Nauta RJ, Tsimoyiannis E, Uribe M, Walsh DB, Miller D, Butterfield A. Oxygen-derived free radicals in hepatic ischemia and reperfusion injury in the rat. *Surg Gynecol Obstet* 1990; 171:120-125
- 7 Yokoyama Y, Baveja R, Sonin N, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG. Altered endothelin receptor subtype expression in hepatic injury after ischemia/reperfusion. *Shock* 2000; 13:72-78
- 8 Sonin NV, Garcia-Pagan JC, Nakanishi K, Zhang JX, Clemens MG. Patterns of vasoregulatory gene expression in the liver response to ischemia/reperfusion and endotoxemia. *Shock* 1999; 11:175-179
- 9 Wang Y, Lawson JA, Jaeschke H. Differential effect of 2-aminoethyl-isothiourrea, an inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion and endotoxemia. *Shock* 1998; 10:20-25
- 10 Manika A, Trinh T, Lagace G, Dugas MA, Proulx F, Lepage G, Champagne J, Lavoie JC, Cousineau J, Russo P, Chartrand C, Yandza T. N-acetylcysteine in pig liver transplantation from non-heart-beating donors. *Transplantation* 1999; 68:327-330
- 11 Soejima Y, Yanaga K, Nishizaki T, Yoshizumi T, Uchiyama H, Sugimachi K. Effect of specific neutrophil elastase inhibitor on ischemia/reperfusion injury in rat liver transplantation. *J Surg Res* 1999; 86:150-154
- 12 Wang LZ, Liu YQ, Cui YH, Zhu FH, Wang BS, Lun N. Effects of dexamethasone, cyproheptadine, anisodamine, and dinoprostone on TNF alpha production in endotoxic shock. *Chung Kuo Yaoli Hsueh Pao* 1999; 20:171-174
- 13 董满库, 陈昌玮, 崔彦, 施靖华, 徐冠南, 王平, 杨飞, 肖广生. 山莨菪碱对再灌注后肝细胞保护作用的实验研究. *世界华人消化杂志* 2000; 8:925-927
- 14 Zhang X, Yan J, Hong S. An experimental study on the treatment of fetal rabbits with intrauterine growth retardation. *Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih* 1996; 31:97-99
- 15 Wang WC, Lee YN. Effects of anisodamine and atropine on the microvasculature of liver, skeletal muscle and foot-pad skin in anesthetized rats. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 1992; 27:385-387