文章编号:1000-5404(2008)03-0241-03

论著

异氟烷对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时细胞间黏附分子-1 表达的影响

徐广民,陶国才,易 斌 (第三军医大学西南医院麻醉科,重庆 400038)

摘 要:**目的** 研究异氟烷对大鼠肝脏缺血再灌注损伤后细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的影响,探讨异氟烷肝脏缺血再灌注保护作用的机制。**方法** 将 32 只 SD 成年雌性大鼠分为假手术组、缺血再灌注组、异氟烷组、异氟烷-缺血再灌注组。假手术组、异氟烷组作为对照 缺血再灌注组和异氟烷-缺血再灌注组阻断支配大鼠肝脏左叶和中叶的门静脉分支,建立肝脏 70% 缺血再灌注模型,缺血 60 min 再灌注 3 h 后取材,测定大鼠血清 ALT、AST 免疫组织化学方法检测 ICAM-1 蛋白的表达,HE 染色进行病理学检查。**结果** 肝脏缺血 60 min 再灌注 3 h 后肝组织 ICAM-1 蛋白表达水平增高 血清酶 ALT 和 AST 升高 肝组织损害严重。异氟烷抑制 ICAM-1 表达,降低 ALT、AST 水平,减轻肝细胞损伤。**结论** 肝脏缺血再灌注损伤程度与肝组织内 ICAM-1 水平有密切的关系,异氟烷可抑制肝脏缺血再灌注期间肝组织 ICAM-1 的表达,同时减轻伤肝脏损伤。

关键词:异氟烷 缺血再灌注损伤 细胞间黏附分子-1
中图法分类号:R392.13;R614;R657.3 **文献标识码**:A

Effect of Isoflurane on ICAM-1 expression in rats during liver ischemia-reperfusion injury

XU Guang-min, TAO Guo-cai, YI Bin (Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the role of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in Isoflurane against hepatic ischemia-reperfusion (I/R) injury *in vivo*. Methods Thirty-two female SD rats were randomly divided into 4 groups: sham-operation group (A), I/R group (B), Isoflurane group (C), I/R + Isoflurane group (D). Groups A and C were be used as controls. In groups B and C, the hepatic hilar vessels distributing to the left and median lobes were clamped to induce partial hepatic ischemia (70%). Reperfusion was done 60 min after hepatic ischemia. The animals were killed 3 h after reperfusion, then the specimens of liver tissues and blood were obtained. ALT and AST in blood serum were detected as liver damage markers. The histological examination of liver tissues was done by hematoxylin and eosin staining. The levels of ICAM-1 protein in the hepatic tissues were detected by immunohistochemistry. Results After hepatic ischemia-reperfusion, the ICAM-1 protein expression in the hepatic tissues increased; ALT and AST increased; Reperfusion induced severe liver damage. Isoflurane significantly inhibited the ICAM-1 expression. Conclusion The degree of hepatic ischemia-reperfusion injury is closely associated with the expression level of ICAM-1. Isoflurane abates liver ischemia-reperfusion injury and inhibits the ICAM-1 expression.

Key words: Isoflurane; ischemia-reperfusion injury; intercellular adhesion molecule-1

肝脏缺血再灌注损伤多见于常温下阻断肝门行部分肝切除术、肝移植术、肝外伤以及休克等。肝脏缺血再灌注后,中性粒细胞聚集,活化释放过氧自由基、蛋白水解酶和过氧化物酶等毒性物质,致使组织局部发生过度炎症反应是肝脏缺血再灌注损伤的主要病理变化。肝脏缺血再灌注时血窦内皮细胞及肝细胞膜细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)表达增加,ICAM-1 介导中性粒细胞和肝细胞紧密黏附,促进中性粒细胞对肝细胞的损伤[1]。异氟烷对肝脏缺血再灌注具有一定的保护作用,但具体的分子机制尚不清楚[2]。本研究拟探索异氟烷对大鼠肝脏缺血再灌注后早期 ICAM-1 表达水平的影响,以阐明异氟烷作用下减轻肝脏缺血再灌注损伤的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要仪器和试剂

健康雌性 SD 大鼠(清洁级)32 只,10~12 周龄,体质量 250~300 g,由第三军医大学实验动物中心提供。Drager Fabius

作者简介:徐广民,男,山东省曹县人,硕士研究生,医师,主要从事围手术期器官保护方面的研究。电话:(023)65463720
通信作者:陶国才,电话:(023)68754197
收稿日期:2007-04-28 修回日期:2007-09-28

型麻醉机(德国 Drager 公司),Solar 8000M 型气体监测仪(美国 GE 公司),异氟烷(国药准字 H20059911,上海雅培制药有限公司),Olympus AU2700 全自动生化分析仪(日本)。ICAM-1 多克隆抗体(武汉博士德生物有限公司,BA2189),PowerVision™ 二步法试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,S-P6001)。

1.2 实验分组及模型制备

将动物分为 4 组,每组 8 只:假手术组和异氟烷组不行肝脏缺血再灌注;缺血再灌注组、异氟烷-缺血再灌注组建立大鼠肝脏 70% 缺血再灌注模型。

假手术组和异氟烷组大鼠用戊巴比妥钠(40 mg/kg),腹腔注射,缺血再灌注组和异氟烷-缺血再灌注组大鼠被 1.0 MAC (minimal alveolar concentration,1.0 MAC = 1.2% ~ 1.4%)异氟烷麻醉。异氟烷麻醉主要参照 Lee 等[3] 的方法并进行改进。首先将麻醉机回路和大鼠麻醉箱进/出气口连接,然后以 5 L/min 氧流量流经异氟烷蒸发罐,蒸发罐开启浓度为 3%,含麻醉药气体流经麻醉箱,出气口连接 Solar8000 M 型麻醉气体监测仪,待箱内异氟烷浓度达 1.0 MAC,且稳定 10 min 后将大鼠置入,持续吸入麻醉 20 min 后待大鼠肺内麻醉药浓度和箱内平衡后,迅速从箱内取出大鼠并将其口鼻部置于相同浓度的大鼠面罩内维持麻醉。

所有大鼠经腹正中切口,暴露肝门,游离门静脉左右支,用小血管夹夹闭门静脉左支(支配肝左叶和中叶),建立大鼠 70% 肝脏缺血再灌注模型。实验过程中保持大鼠直肠温度在 36.5 ~ 37.5 ℃。实验终点从下腔静脉采血 3 ml;门静脉置管,磷酸盐缓冲溶液(1000 U 肝素)灌注 10 min 后取中叶置于 10% 中性福尔马林液固定。

1.3 HE 染色和 ALT、AST 测定

标本固定 24 h,常规行 HE 染色。血液标本室温静置 1 h 后,4 ℃离心(12 000 × g,离心 15 min),抽取上清,-20 ℃保存,待标本集齐后采用 Olympus AU 2700 生化分析仪检测。

1.4 ICAM-1 免疫组织化学染色

免疫组化染色采用 PowerVision™ 二步法,具体步骤:组织切片常规脱蜡至水洗;3% 的过氧化氢处理 20 min 后,PBS 洗 3 次,每次 5 min;切片入枸橼酸钠缓冲液(1 mmol/L pH 7.0),加热至 95 ~ 100 ℃ 20 min;PBS 洗 3 次 × 5 min;加入稀释度 1∶50 兔抗大鼠 ICAM-1 抗体,湿盒孵育,4 ℃过夜;PBS 洗 3 次 × 5 min;直接加入 HRP 标记羊抗兔多聚体,37 ℃ 30 min;PBS 洗 3 次/5 min;DAB 显色 3 ~ 5 min,显微镜下控制时间,充分冲洗中止反应;苏木精复染、脱水、透明、封固。以 PBS 代替一抗作阴性对照。

ICAM-1 阳性染色结果为定位于肝内皮细胞以及肝细胞膜上的棕黄色颗粒。在光镜下,每张切片计数 10 个非重叠视野。根据阳性细胞所占视野细胞总数百分比和染色强度进行记分[1],阳性细胞数 < 5% 为阴性,5% ~ 25% 为 1 分,26% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 75% 为 3 分,75% 以上为 4 分。阳性强度以淡黄色为 1 分,黄色为 2 分,棕黄色为 3 分。两者相乘,1 ~ 4 分为弱阳性(+),5 ~ 8 分为中等阳性(++),9 ~ 12 分为强阳性(+++)。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,对血清酶学指标进行单因素方差分析,组间比较采用最小显著差异法。

2 结果

2.1 病理学改变

假手术组:肝组织基本正常,汇管区基本正常,无明显增宽及纤维组织增生,无炎细胞浸润(图 1A)。缺血再灌注组:多见局灶性肝细胞坏死,亦可见肝细胞凝固性坏死;小叶周边区及中央静脉周围可见明显的肝细胞脂肪变性(图 1B)。异氟烷组:肝组织基本正常,汇管区基本正常,中央静脉增宽,肝血窦扩张,小叶周边区及中央静脉周围可见肝细胞脂肪变性;汇管区无明显异常(图 1C)。异氟烷-缺血再灌注组:中央静脉稍扩张,淤血,少量肝细胞细胞质浊肿,可见点状坏死,肝细胞脂肪变性,汇管区可见少量炎症细胞浸润(图 1D)。

2.2 血清酶学检测结果

检测结果显示:单纯缺血再灌注后,大鼠血清 AST、ALT 酶水平与其他 3 组相比较明显升高($P < 0.05$),缺血再灌注期间,异氟烷-缺血再灌注组血清酶与假手术组和异氟烷组相比有明显增加($P < 0.05$),但较缺血再灌注组显著降低($P < 0.05$)。见表 1。

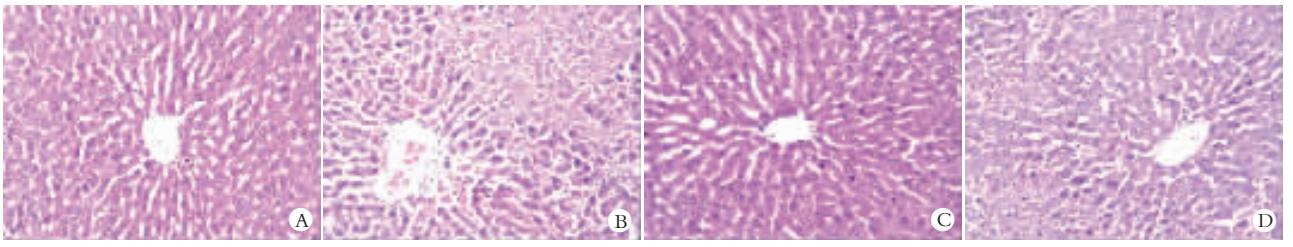
2.3 免疫组化结果

假手术组内皮细胞弱表达,肝细胞、中央静脉和小叶间静脉管壁未见着色(图 2A)。缺血再灌注组内皮细胞、中央静脉和小叶间静脉管壁强表达,肝细胞少量微弱表达(图 2B)。异氟烷组内皮细胞、肝细胞微弱表达(图 2C)。异氟烷-缺血再灌注组可见内皮细胞和肝细胞轻度表达(图 2D)。

表 1 各组血清酶含量变化(IU/L, $n = 8$, $\bar{x} \pm s$)

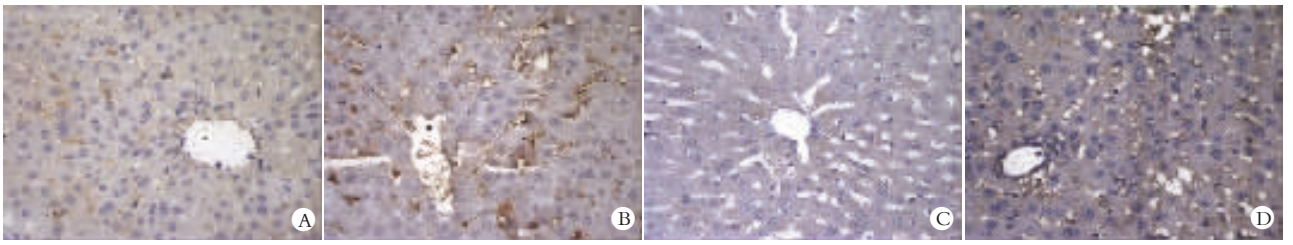
组别	谷丙转氨酶(ALT)	谷草转氨酶(AST)
假手术组	40.63 ± 20.03[ab]	99.13 ± 27.02[ab]
缺血再灌注组	1 881.50 ± 545.80	874.00 ± 578.01
异氟烷组	50.50 ± 15.82[ab]	131.63 ± 53.90[ab]
异氟烷-缺血再灌注组	1 485.50 ± 487.02[a]	401.88 ± 105.55[a]

a:$P < 0.05$,与缺血再灌注组比较;b:$P < 0.05$,与异氟烷-缺血再灌注组比较



A:假手术组;B:缺血再灌注组;C:异氟烷组;D:异氟烷-缺血再灌注组

图 1 各组肝组织病理学观察 (HE × 200)



A：假手术组；B：缺血再灌注组；C：异氟烷组；D：异氟烷-缺血再灌注组

图 2　肝组织 ICAM-1 免疫组化染色　（二步法 ×400）

3　讨论

吸入麻醉药可能通过抑制氧自由基产生，减轻细胞内钙超载，提高缺血再灌注期间肝细胞的能量贮备等途径对肝脏缺血再灌注损伤具有保护作用[2,4]。吸入和静脉麻醉药具有一定的免疫调节作用，可以抑制黏附分子表达，减轻炎症反应[5,6]。

Banga 等[7]研究证实缺血再灌注时，ICAM-1 在中性粒细胞黏附、聚集以及活化过程中起关键作用。活化的中性粒细胞释放蛋白水解酶和活性氧原子产生继发性肝细胞损害。抗 ICAM-1 抗体具有肝脏缺血再灌注的保护作用，在其他器官缺血再灌注过程中减轻 ICAM-1 表达，具有一定的器官保护作用[8]。

本实验以血清 ALT、AST 作为评价缺血再灌注后肝细胞损伤指标，结果显示单纯大鼠肝脏热缺血 60 min再灌注 3 h 后血清 AST、AST 酶水平与其他 3 组相比较明显升高 如果在缺血再灌注期间同时接受异氟烷麻醉，实验终点大鼠血清酶与假手术组和异氟烷组相比虽然明显增加，但是较缺血再灌注组显著降低，这提示异氟烷在肝脏缺血再灌注期间确实减轻了缺血再灌注造成的肝脏损害。免疫组化结果显示，实验中没有接受缺血再灌注的假手术组和异氟烷组大鼠肝组织内皮细胞仅有少量 ICAM-1 表达，但是在缺血 60 min 再灌注 3 h 后肝组织血窦内皮细胞着色呈现强阳性，ICAM-1 在肝组织内表达明显增加，与 Kobayashi 等[1]研究结果一致。进一步在缺血再灌注期间用异氟烷处理后，我们观察到 ICAM-1 较缺血再灌注组表达水平明显降低，但较假手术组和异氟烷组明显增加。上述实验研究表明卤代烷类吸入麻醉药异氟烷在临床使用浓度（1.0 MAC）能降低肝脏缺血再灌注损伤肝细胞释放血清 ALT 和 AST，同时抑制肝组织 ICAM-1 上调，减少肝脏缺血再灌注后的病理损害，推测异氟烷可能通过抑制 ICAM-1 表达减轻缺血再灌注中性粒细胞聚集对肝脏的损伤作用。肝脏缺血再灌注损伤时，NF-κB 激活并进入细胞核内，与一些炎症因子基因启动子区特异序列结合，上调 TNF-α、ICAM-1 mRNA 表达，从而引起肝脏缺血再灌注损伤[9]。在体外吸入麻醉药能够不同程度的抑制多种类型黏附分子表达[10]，其机制可能是通过抑制 NF-κB 途径实现[7]。

综上所述，ICAM-1 上调参与肝脏缺血再灌注损伤早期的炎症反应，加重肝脏损伤。异氟烷能够抑制缺血再灌注肝组织 ICAM-1 表达，同时减轻肝脏损害。异氟烷抑制 ICAM-1 上调的分子机制尚需进一步研究。

参考文献：

[1] Kobayashi A, Imamura H, Isobe M, *et al*. Mac-1 (CD11b/CD18) and intercellular adhesion molecule-1 in ischemia-reperfusion injury of rat liver[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(2): G577 – G585.

[2] Ishida H, Kadota Y, Sameshima T, *et al*. Comparison between sevoflurane and isoflurane anesthesia in pig hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. J Anesth, 2002, 16(1): 44 – 50.

[3] Lee H T, Ota-Setlik A, Fu Y, *et al*. Differential protective effects of volatile anesthetics against renal ischemia-reperfusion injury *in vivo* [J]. Anesthesiology, 2004, 101(6): 1313 – 1324.

[4] 杜　津，鲁开智，陶国才，等. 地氟醚预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时氧自由基的影响[J]. 第三军医大学学报，2003，25(24)：2223 – 2225.

[5] Suter D, Spahn D R, Blumenthal S, *et al*. The immunomodulatory effect of sevoflurane in endotoxin-injured alveolar epithelial cells[J]. Anesth Analg, 2007, 104(3): 638 – 645.

[6] Corcoran T B, Engel A, Shorten G D. The influence of propofol on the expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) in reoxygenated human umbilical vein endothelial cells[J]. Eur J Anaesthesiol, 2006, 23(11): 942 – 947.

[7] Banga N R, Homer-Vanniasinkam S, Graham A, *et al*. Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver[J]. Br J Surg, 2005, 92(5): 528 – 538.

[8] 范连慧，吴雄飞，余荣杰，等. 缺血预适应对缺血再灌注大鼠肾脏黏附分子表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2006，28(16)：1701 – 1703.

[9] 徐　钧，解　军，鲍民生，等. 核因子-κB/I-κB 传导通路在肝脏缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华实验外科杂志，2003，20(7)：614 – 615.

[10] Zhu B, Xue Z G, Jing H, *et al*. The *in vitro* effect of desflurane preconditioning on endothelial adhesion molecules and mRNA expression [J]. Anesth Analg, 2005, 100(4): 1007 – 1013.

（编辑　王　红）