DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.23.019
第25卷第23期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 23
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)23-2109-03

论著

地氟醚预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用

鲁开智[1],杜 津[2],陶国才[1],何长生[3],杨丽华[3],易 斌[1],程建保[1] (第三军医大学附属西南医院:[1]麻醉科,[3]检验科,重庆 400038;[2]解放军第254医院,天津 300142)

提 要:目的 探讨地氟醚预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用。方法 将Wistar大鼠制成肝脏缺血再灌注模型,随机分为假手术对照组(N)、肝脏缺血再灌注组(IR)和地氟醚预处理组(D),观察肝脏缺血90 min再灌注1、3、6、及24 h后血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)和肝组织病理学改变。结果 肝脏缺血再灌注后血清ALT和AST含量均显著升高;缺血前吸入1MAC地氟醚30 min后洗脱10 min者,肝酶的漏出减少,肝组织病理学损害明显减轻。结论 地氟醚预处理对肝脏缺血再灌注损伤有一定的保护作用。

关键词:地氟醚;肝脏;再灌注损伤
中图法分类号:R322.47;R654.1;R971.2 文献标识码:A

Protective effect of pretreatment with desflurane on liver ischemic reperfusion injury in rats

LU Kai-zhi, DU Jin, TAO Guo-cai, HE Chang-sheng, YANG Li-hua, YI Bin, CHENG Jian-bao (Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of pretreatment with desflurane on liver ischemic reperfusion injury in rats. Methods A total of 72 healthy adult Wistar rats, weighing between 200 g to 220 g, were randomly divided into three groups: shame-operation group (N, $n=8$), ischemia-reperfusion group (IR, $n=32$) and pretreatment with desflurane group (D, $n=32$). Rats suffered from ischemia for 90 min and were followed by reperfusion for different time. The amimals were killed at 1, 3, 6 and 24 h after reperfusion. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were determined. The histopathologic changes in the liver were also observed. Results Serum levels of ALT and AST increased significantly after liver ischemia-reperfusion. Pretreatment with inhalation of 6% desflurane for 30 min followed by washout for 10 min resulted in the decrease in the leakage of liver enzymes and the attenuation of the histopathological liver injuries. Conclusion Pretreatment with desflurane can protect liver from ischemia reperfusion injury to some extent.

Key words: desflurane; liver; reperfusion injury

最近的研究显示异氟醚、七氟醚和氟烷预处理后能减轻大鼠早期缺血再灌注或缺氧富氧损伤[1,2]。本实验拟采用大体大鼠肝脏缺血再灌注模型,研究地氟醚预处理对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用,以期为临床合理用药提供理论依据。

基金项目:第三军医大学科研基金资助项目(200136)
Supported by the Funds for Scientific Research of Third Military Medical University (200136)
作者简介:鲁开智(1965-),男,四川省新都县人,博士研究生,副教授,副主任医师,主要从事肝脏移植的基础与临床方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)68752851
收稿日期:2003-09-01;修回日期:2003-10-14

1 材料与方法

1.1 研究对象

Wistar大鼠72只,雌雄不限,体质量200~220 g,由第三军医大学实验动物中心提供。将动物分为3组:假手术对照(N组,$n=8$),只行假手术;单纯缺血再灌注(IR组,$n=32$),阻断入肝血流90 min后松开无创动脉夹,恢复入肝血流,分别于再灌注后1、3、6、24 h各时点处死动物取材,每时相点8只;地氟醚预处理(D组,$n=32$),阻断入肝血流前,将动物置入与麻醉机(Ohmeda Excel210)回路相连的密闭容器内,以2 L/min氧流量流经地氟醚蒸发罐,蒸发罐开启浓度为6%,含麻醉药气体流经密闭容器,容器出气口连接Solar 8000 M型麻醉气体监测仪,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

测定地氟醚浓度达6%后维持30 min，进行预处理后洗脱10 min。其余步骤同缺血再灌注组。

1.2 肝脏缺血再灌注模型的制作

动物术前12 h禁食，自由饮水；腹腔注射3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉，上腹正中切口进腹，分离肝脏周围韧带，暴露肝门，用小号动脉夹分别阻断左、中、右叶肝蒂(约占全肝95%)，夹闭门静脉和肝动脉枝，阻断左、中及右叶肝脏血流，造成受累肝叶完全缺血，保留尾状叶(约占全肝5%)血供，作为门静脉血液回流通道，以防肠道淤血。阻断90 min后去除肝蒂阻断夹，恢复肝脏灌流。

1.3 标本采集及检测方法

所有动物于实验结束收集下腔静脉血2 ml，离心析出血清，以日本产Olympus AU 2700型全自动生化分析仪，测定血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)含量。同时取肝左叶组织置10%甲醛液中固定，常规切片和HE染色，光镜下观察肝组织病变情况。选取损伤最为明显的再灌注24 h的病理切片，光镜下评定肝组织损伤分级，其分级标准参考文献[3]：0级：肝小叶、肝细胞、肝细胞索、中央静脉、肝窦均正常；Ⅰ级：个别肝细胞变性，汇管区少量炎细胞聚集；Ⅱ级：肝中央静脉、肝窦内瘀血及散在肝细胞变性坏死，肝组织内炎细胞聚集较多，肝小叶结构完整；Ⅲ级：肝中央静脉、肝窦内瘀血及广泛肝细胞变性坏死，大量炎细胞聚集，部分肝组织结构破坏不完整。

1.4 统计学处理

采用SPSS11.0统计软件，所有数据以$\bar{x}\pm s$表示，双尾t检验检测两组间的差异，肝组织损伤分析用秩和检验。

2 结果

2.1 血清酶学变化结果见表1

缺血再灌注后D组和IR组的血清AST、ALT酶水平于均明显升高($P<0.01$)。经过地氟醚预处理之后，D组在各时相点上均比IR组低，在6、24 h 2个时相点上，ALT和AST的水平与IR组的差异有显著性意义($P<0.05$)。

表1 各组不同时相血清ALT、AST含量(IU/L，$\bar{x}\pm s$，$n=8$)

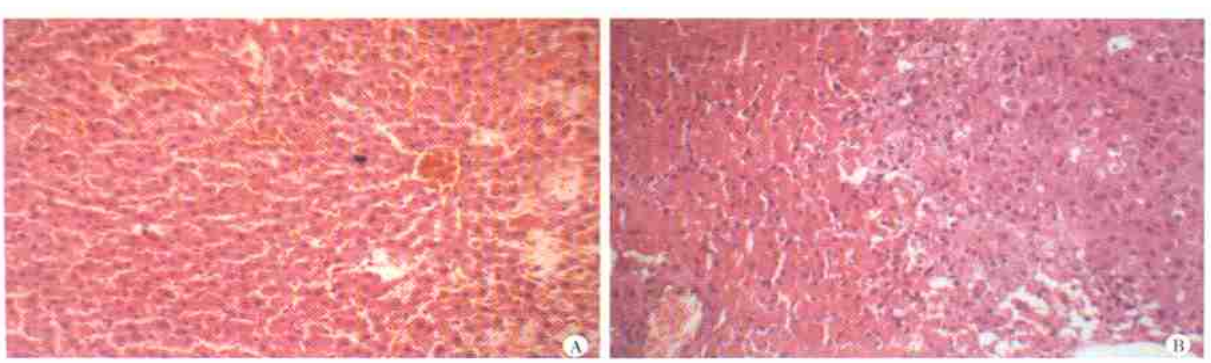
Tab 1 Serum levels of ALT, AST at different time points in each group (IU/L, $\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Group	Time point			
	1 h	3 h	6 h	24 h
ALT				
IR	924.63±67.61△	1 150.25±94.23△	821.25±67.61△	303.13±33.26△
D	824.63±75.96△★	928.75±76.01△★	720.38±53.09△★	146.00±28.51△★
AST				
IR	1 125.13±124.38△	1 403.88±130.24△	1 117.38±66.47△	746.75±98.73△
D	980.75±64.12△★	1 120.88±119.76△★	1 001.50±83.15△★	445.50±46.16△★

ALT and AST in the normal control are (50.38±8.78), (204.75±18.10) IU/L, respectively; △: $P<0.01$ *vs* N, ★: $P<0.05$ *vs* IR

2.2 肝脏组织病理学改变

光镜下正常对照组肝细胞及肝窦内皮细胞均正常。IR组肝脏再灌注后1～3 h，肝窦明显扩张、淤血，汇管区炎细胞浸润，肝细胞可见不同程度的水肿变性和空泡状变性，偶尔可见点状坏死，见图1A。再灌注6～24 h，主要以肝细胞局灶性及片状坏死为主，汇管区大量的炎性细胞聚集，以中性粒细胞为主，部分肝小叶组织结构破坏不完整，见图1B。D组肝脏再灌注1～3 h，肝窦轻度扩张、淤血，汇管区炎症细胞明显为少，肝细胞无明显变性、坏死，见图2A。再灌注6～24 h，部分肝细胞气球样变，偶尔可观察到灶性坏死，无成片状细胞坏死，肝小叶结构完整，未见组织结构破坏，见图2B。2组动物均随着再灌注时相的延长，病变程度逐渐加重。再灌注24 h病理切片肝组织损伤分级，属于Ⅱ～Ⅲ级范畴的动物数：IR组肝组织损伤Ⅲ级8例；D组Ⅲ级只有1例，与IR组比较显著降低($P<0.05$)；其余均为Ⅱ级，与IR组比较显著升高($P<0.05$)。

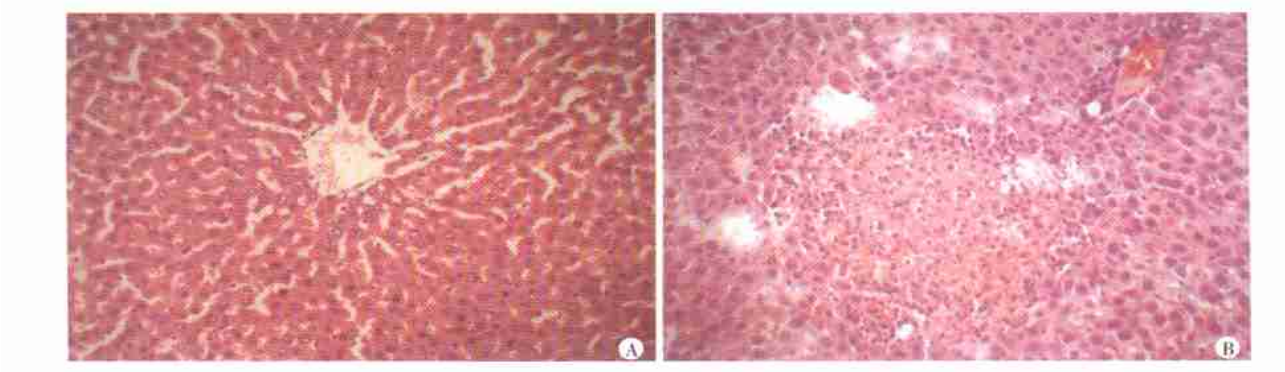


A: Dilatation and hyperemia of hepatic sinus and swelling of hepatocytes are found 1 h after reperfusion, but no obvious infiltration of inflammatory cells; B: Extensive necrosis and hemorrhage with moderate degree of inflammatory cell infiltration are found in liver tissue 24 h after reperfusion

图1 再灌注后肝脏组织变化 (HE×200)

Fig 1 Histological changes of liver after reperfusion (HE×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net



A: Slight dilatation and hyperemia of hepatic sinus and slightly swelling of hepatocytes are found 1 h after reperfusion; B: Hyperemia of the sinus, swelling of hepatocytes with focal necrosis and inflammatory cells infiltrating in the portal area are found 24 after reperfusion

图 2　地氟醚预处理组肝脏组织变化　(HE× 200)

Fig 2　Histological changes of liver in desflurane pretreated group　(HE× 200)

3　讨论

以往研究认为以氟烷为代表的吸入性麻醉药具有肝毒性。最近研究显示在使用吸入性麻醉药麻醉后, 肝脏缺血再灌注损伤减轻, 体现在各肝细胞酶指标明显下降, 提示吸入性麻醉药可能具有保护性作用。本实验通过观察地氟醚预处理后对肝脏缺血再灌注损伤程度的改变, 发现地氟醚同样具有保护性作用。

血清 ALT、AST 水平是反映肝细胞损伤程度的指标, 检测可以反映肝细胞急性损伤程度。本研究 IR、D 两组 ALT、AST 水平明显高于 N 组, 这表明随着肝缺血再灌注的发生, 肝细胞功能受到严重损害。D 组在各时相点的 ALT、AST 水平均低于 IR 组, 在 6、24 h 时相点上, 有显著性差异, 说明经过地氟醚预处理之后, 肝细胞损伤程度明显减轻; 光镜下在各时相点上, D 组组织病理损害明显轻于 IR 组, 这表明地氟醚预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤有一定的保护作用。

肝脏缺血再灌注损伤的发生机制复杂, 受多种因素的共同影响。钙离子超载、氧自由基的产生、细胞因子损害、补体激活、淋巴细胞聚集等导致肝细胞坏死, 肝功能损害[4]。有研究报道安氟醚和异氟醚能抑制自由基的产生、抑制细胞内各种需能过程, 促进缺血再灌注期间 ATP 的形成, 以及直接抑制电压门控的 Ca^{2+} 内流和肌浆网的 Ca^{2+} 释放, 减轻肝细胞内 Ca^{2+} 超载等有关[5,6]; 但另有研究认为吸入麻醉药通过上述的直接作用机制产生肝保护的可能性极小, 而通过类似于吸入麻醉药预处理诱发心肌的保护机制, 是一种细胞保护机制, 具有普遍性, 不仅局限在心肌。通过激活蛋白激酶 C, 与 ATP 敏感的钾离子通道相偶联, 使其激活开放, 引起动作电位持续下降, 从而减少经电压门控制 Ca^{2+} 通道的 Ca^{2+} 内流, 并维持 Na^{+}-Ca^{2+} 交换, 促进 Ca^{2+} 细胞外流, 从而减轻 Ca^{2+} 超载[7,8]。具体机制有待进一步的研究。

本实验采用大鼠模型, 因大鼠耐受持续肝血流阻断的安全时限是 90 min[9], 操作简便, 可重复性强, 能够达肝脏缺血再灌注损伤的动态效果, 而且可避免肠道静脉回流受阻所造成的细菌或内毒素释放入血而造成干扰, 比较适用于肝脏缺血再灌注损伤的研究。

综上所述, 地氟醚预处理对于肝脏的缺血再灌注损伤有一定的保护作用, 这对于临床上的肝脏部分切除、肝脏移植等手术的麻醉有一定的指导意义。

参考文献:

[1] Imai M, Kon S, Inaba H. Effects of halothane, isoflurane and sevoflurane on ischemia-reperfusion injury in the perfused liver of fasted rats[J]. Acta Anaesthesiol Scand, 1996, 40(10): 1242-1248.

[2] Kon S, Imai M, Inaba H. Isoflurane attenuates early neutrophil-independent hypoxia-reoxygenation injuries in the reperfused liver in fasted rats[J]. Anesthesiology, 1997, 86(1): 128-136.

[3] 张　建, 叶　敏, 彭章龙, 等. 安氟醚和异氟醚对肝脏缺血/再灌注损害的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2000, 20(4): 223-225.

[4] Teoh N C, Farrell G C. Hepatic ischemia reperfusion injury: Pathogenic mechanisms and basis for hepatoprotection[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2003, 18(8): 891-902.

[5] Frohlich D, Rothe G, Schwall B, *et al*. Effects of volatile anaesthetics on human neutrophil oxidative response to the bacterial peptide FMLP[J]. Br J Anaesth, 1997, 78(6): 718-723.

[6] Matsushita M, Ohashi I, Becker G L, *et al*. Isoflurane preserve adenosine triphosphate levels in anoxic isolated rat hepatocytes by stimulating glycolytic adenosine triphosphate formation[J]. Anesth Analg, 1996, 82(6): 1261-1267.

[7] Kato R, Foex P. Myocardial protection by anesthetic agents against ischemia-reperfusion injury: an update for anesthesiologists[J]. Can J Anaesth, 2002, 49(8): 777-791.

[8] Lynch C. Anesthetic preconditioning: not just for the heart[J]? Anesthesiology, 1999, 91(3): 606-608.

[9] 何效东, 董家鸿, 蔡景修, 等. 门静脉转流下大鼠耐受入肝血流阻断安全时限的实验研究[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2000, 7(4): 220-223.

(编辑　栾　嘉)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net