DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.24.024
第25卷第24期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 24
2003年12月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Dec. 2003

文章编号:1000-5404(2003)24-2223-03

论著

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

杜 津[1],鲁开智[1],陶国才[1],李 昆[2],易 斌[1],程建保[1] (第三军医大学附属西南医院:[1]麻醉科,[2]全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 探讨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。方法 将Wistar大鼠制成肝脏缺血再灌注模型,分为对照组(N)、肝脏缺血再灌注组(IR)和地氟醚预处理组(D),测定肝脏缺血90 min再灌注1、3、6、24 h后肝脏超氧化物歧化酶活性、谷胱甘肽和丙二醛含量。结果 肝缺血再灌注损伤时,IR组SOD和GSH显著降低,MDA明显升高。经过1MAC地氟醚30 min预处理后,D组的SOD、GSH、MDA变化不显著,在各时相点上与IR组相差有显著性意义。结论 地氟醚预处理可抑制自由基在肝脏缺血再灌注期的生成和释放。

关键词:地氟醚;肝脏;再灌注损伤;氧自由基
中图法分类号:R322.47;R364.12;R971.2 文献标识码:A

Effect of pretreatment with desflurane on oxygen free radicals in liver ischemic reperfusion injury in rats

DU Jin, LU Kai-zhi, TAO Guo-cai, LI Kun, YI Bin, CHENG Jian-bao (Department of Anesthesiology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of pretreatment with desflurane on oxygen free radicals in liver ischemic reperfusion injury in rats. **Methods** 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 desflurane-pretreated group(D, $n=32$). Rats suffered from ischemia for 90 min, and were followed by reperfusion for different time. Next, the animals were sacrificed at 1, 3, 6 and 24 h after reperfsion. The activity of superoxide dismutase(SOD), content of glutamylcysteinyl glycine(GSH), and malondialdehyde (MDA) were measured. **Results** The activity of SOD and the content of GSH decreased, but the content of MDA increased obviously in group IR after liver ischemia-reperfusion. After pretreatment with inhalation of 6% desflurane for 30 min followed by 10 min washout, the changes of SOD, GSH and MDA in group D were significantly different from those in group IR at each time point($P<0.05$). **Conclusion** Pretreatment with desflurane can protect liver from ischemia reperfusion injury through the inhibition of formation and release of oxygen free radicals.

Key words: desflurane; liver; reperfusion injury; oxygen free radicals

肝脏缺血再灌注损伤(Hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI)是肝脏外科中常见的病理过程,如严重的肝外伤、肝叶切除、肝移植及休克、感染等。HIRI的具体机制一直不明确,但研究发现,氧自由基在其中起着重要的作用[1~3]。有学者发现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,提示吸入性麻醉药在肝脏缺血再灌注损伤上可能具有保护性作用[4,5]。本实验观察大鼠肝脏缺血再灌注损伤时,肝组织中超氧化物歧化酶(Superoxide dismu fase, SOD)活性、谷胱甘肽(Glatamylcysteinyl glycine, GSH)和丙二醛(Malonic aldehyde, MDA)含量的动态变化,及使用地氟醚预处理后对各时限上述指标的影响,旨在为阐明其抗缺血再灌注机制提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

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。

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:杜 津(1973-),男,天津市人,硕士研究生,主治医师,主要从事肝缺血再灌注损伤方面的研究,现在天津市解放军第254医院麻醉科工作,天津 300142。电话:(023)68754000-73095
收稿日期:2003-09-20;修回日期:2003-10-19

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

1.2 分组及药物预处理

将动物分为3组：①对照组（N组，$n=8$）：不阻断肝血流；②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，每时相点观察8只动物；③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，测定地氟醚浓度达6%后维持30 min，进行预处理后洗脱10 min。其余同缺血再灌注组。

1.3 肝脏缺血再灌注模型的制作

参见文献[6]的方法。

1.4 标本采集及检测方法

所有动物于实验结束时开腹，经心脏采血3 ml致死，然后迅速取出肝脏，4 ℃生理盐水洗去血污，滤纸吸净水份，在肝左外叶取一块0.2 g左右组织，液氮冻存待检。检测时将肝组织解冻后取100 g制成10%的匀浆液，采用TBA比色法测定MDA；黄嘌呤氧化酶法测定SOD；二硫代二硝基苯甲酸法测定GSH。操作步骤参照试剂盒说明（试剂盒均购自南京建成生物研究所）。

1.5 统计学处理

采用SPSS11.0 for Windows统计软件，数据以$\bar{x}\pm s$表示，各组之间差异比较作配对t检验。

2 结果

2.1 SOD检测结果见表1

IR组与N组比较，SOD活性下降均非常明显（$P<0.05$）；D组与N组比较，在6、24 h 2个时相点上，SOD活性下降非常明显；D组与IR组相应时限比较SOD活性均上升，差异显著（$P<0.05$）。

表1 不同时相点肝组织SOD含量（NU/mg，$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 1 Changes of SOD activities in hepatic tissue during HIR（NU/mg，$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Group	Time of reperfusion(h)			
	1	3	6	24
N 87.80±4.73				
IR	76.66±5.29△	73.17±6.26△	65.53±5.96△	60.13±5.23△
D	85.96±7.58★	83.08±6.01★	78.86±5.39△★	75.58±6.17△★

△：$P<0.05$ *vs* N；★：$P<0.05$ *vs* IR

2.2 MDA检测结果见表2

IR组和D组的MDA含量在再灌注各时限与N组比均明显升高（$P<0.05$），而在再灌注的各时限D组明显低于IR组，差异显著（$P<0.05$）。

2.3 GSH检测结果见表3

D组、IR组与N组比较，GSH含量下降明显（$P<0.05$）；而在再灌注的各时限D组明显高于IR组，差异显著（$P<0.05$）。

表2 不同时相点肝组织MDA含量（nmol/mg，$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 2 Changes of MDA content in hepatic tissue during HiR（nmol/mg $\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Group	Time of reperfurion(h)			
	1	3	6	24
N 3.41±0.28				
IR	5.36±0.22△	6.31±0.33△	6.87±0.37△	7.65±0.32△
D	3.84±0.49△★	5.04±0.26△★	5.61±0.52△★	6.02±0.41△★

△：$P<0.05$ *vs* N；★：$P<0.05$ *vs* IR

表3 不同时相点肝组织GSH含量（mg/mg，$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Tab 3 Changes of GSH content in hepatic tissue during HIR（mg/mg，$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Group	Time of reperfusion(h)			
	1	3	6	24
N 59.63±5.15				
IR	38.33±3.77△	40.10±3.24△	41.27±6.47△	42.35±4.35△
D	46.08±4.62△★	51.47±6.97△★	52.66±3.15△★	55.46±5.33△★

△：$P<0.05$ *vs* N；★：$P<0.05$ *vs* IR

3 讨论

肝缺血再灌注时，机体可通过多种途径产生大量氧自由基，氧化膜磷脂中的多双键不饱和脂肪酸，引发脂质过氧化反应，导致肝细胞损伤。超氧化物歧化酶（SOD）和谷胱甘肽（GSH）对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用，两者能清除超氧阴离子自由基并保护细胞免受损伤。SOD活力的高低和GSH量的多少间接反应了机体清除氧自由基的能力。丙二醛（MDA）则是自由基攻击生物膜引发脂质过氧化反应的产物，组织中含量可反映脂质过氧化的程度，间接地反映出细胞受自由基攻击和损伤的程度[7]。

有资料表明，大鼠耐受持续肝血流阻断的安全时限是90 min，采用大鼠部分肝缺血再灌注模型既可造成严重的肝损伤，又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[8]。因此，在这种大鼠模型中肝缺血再灌注是机体惟一的伤害性刺激。本实验手术方式操作简便，可重复性强，能够达肝脏缺血再灌注损伤动态观察的效果，未出现大鼠因肝脏缺血时间过长，而致实验过程中出现死亡的例子。

从实验结果上看，IR组与D组各个时限点SOD活力、GSH含量较对照组均明显下降，MDA含量均显著升高。表明体内氧化系统被激活，抗氧化系统受抑制，氧自由基大量生成而清除减少，体内氧自由基水平急剧升高，从而引发一定程度的脂质过氧化反应，以致造成HIRI。地氟醚预处理后，较缺血再灌注组肝组织SOD、GSH含量高，而MDA则显著降低，表明地氟醚能够对抗缺血再灌注时氧自由基对肝脏的损伤，在降低自由基的含量和维持组织超氧化物歧化酶活力方面有

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

重要作用。

综上所述, 抑制自由基在肝脏缺血再灌注期的生成和释放可能是地氟醚抗缺血再灌注损伤从重要机制之一, 但作用于氧自由基生成的哪个环节目前仍不清楚, 尚需进一步研究。

参考文献:

[1] Schemmer P, Connor H D, Atreel G E, *et al*. Reperfusion injury in liver due to gentle in sim organ manipulation during harvest involves hypoxia and free radicals[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 290(1): 235—240.

[2] Nguyen W D, Kim D H, Alam H B, *et al*. Polyethylene glycol superoxide dismutase inhibits lipid peroxidation in hepatic ischemia reperfusion injury [J]. Crit Care, 1999, 3(5): 127—130.

[3] Serracino I F, Habid N A, Mathie R T. Hepatic ischemia reperfusion injury[J]. Am J Surg, 2001, 181(2): 160—166.

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

[5] Kon S, Imaj 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.

[6] 鲁开智, 杜　津, 陶国才, 等. 地氟醚预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(23): 2109—2111.

[7] Larsen M, Webb G, Kennington S, *et al*. Mannitol in cardioplegia as an oxygen free radical scavenger measured by malondialdehyde[J]. Perfusion, 2002, 17(1): 51—55.

[8] Colletti L, Burtch G, Remick, D, *et al*. The production of TNFα and the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion[J]. Transplantation, 1990, 49(2): 268—272.

(编辑　栾　嘉)

(上接 2219 页)

2.2　组织病理变化

在伤后即刻, 4、7、10、20、28 h 共 6 个时相点对局部伤道进行大体观察见: 未浸泡组伤后创面组织颜色暗红, 直至实验结束时, 所有实验动物未见脓苔, 无明显异味; 而在浸泡组, 伤后创面先呈水洗样苍白(无血凝块), 后再次发生渗血并可自行停止, 在实验后期, 伤口明显发臭, 表面伴脓苔形成。

距伤道 0.5 cm 伤后 4 h 用微穿刺针取骨骼肌组织, 病理切片见: 未浸泡组、浸泡组均可见肌纤维变性坏死, 浸泡组坏死肌纤维变细呈明显脱水状。距伤道 1.5 cm 伤后 4、20、28 h 骨骼肌病理切片见: 未浸泡组肌纤维结构清晰, 随时间进展出现炎细胞浸润并逐渐加重; 而浸泡组见肌纤维变性坏死, 残存肌纤维变细, 肌间隙增宽、出血, 炎细胞浸润, 纤维素渗出, 并呈进行性加重。

在动物濒死期或伤后 28 h 时相点, 取心肝肺肾于光镜下行病理学观察见: 大体病理学观察两组无明显差别, 仅镜下观察存在差别。

心脏: 未浸泡组、浸泡组均可见心肌间质轻度水肿, 偶见少量炎细胞浸润; 而浸泡组明显较重, 可见细胞内空泡形成脂肪变性, 部分动物心肌细胞闰盘消失。

肝脏: 未浸泡组均可见肝小叶汇管区内有轻度炎症, 肝细胞轻度脂肪变性; 浸泡组实验动物中均可见肝窦扩张充血(其中多数实验动物伴血栓形成), 汇管区及小叶内炎细胞浸润, 以中性粒细胞多见, 汇管区水肿扩张明显。

肺脏: 未浸泡组见肺泡隔内毛细血管充血, 肺泡隔间隙增宽; 浸泡组实验动物中均见肺泡隔内毛细血管充血, 小血栓形成, 肺泡隔间隙增宽, 部分肺泡腔内可见出血。

肾脏: 未浸泡组、浸泡组均可见肾小管上皮浊肿, 少量炎细胞浸润; 而浸泡后明显加重, 可见肾小球及间质炎性细胞浸润, 部分肾小球内偶见少量血栓形成。

3　讨论

由于动物各项功能指标及病理改变在超过机体代偿范围时, 才会导致动物死亡, 所以死亡率在分析伤情特点中有重要价值。本实验结果表明, 海水浸泡弹烧复合伤动物与弹烧复合伤动物相比明显加重, 这不仅表现在浸泡使动物死亡增高, 还表现在使动物死亡时间提前。与未浸泡组相比较, 浸泡组动物在局部弹道创伤组织中表现为感染严重, 感染出现早, 组织坏死严重, 且组织坏死严重程度较单纯肢体火器伤时海水浸泡一小时更加明显[1]; 导致海水浸泡后机体组织病变恶化的原因在于: ① 海水浸泡后使全身及局部肢体火器伤脂质过氧化反应过度增强[2]; ② 海水浸泡后导致火器伤组织间水肿, 细胞内脱水[3]; ③ 浸泡导致的低温加重了组织能量代谢[4]。

本实验观察结果表明: 海水浸泡弹烧复合伤动物伤情明显较未浸泡组加重; 局部组织坏死严重, 感染严重, 感染出现早, 感染不仅在局部出现, 还可能在存在于重要脏器。由于烧伤及火器伤均可使有效循环血量不足, 因而液体复苏治疗可助于纠正有效循环血量不足从而改善组织灌注。从战伤救治角度考虑, 所有海水浸泡弹烧复合伤伤员均应进行液体复苏抢救, 早期应用适当抗生素。

关键词: 海水浸泡; 犬; 弹烧复合伤
中图法分类号: R64　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 黄　宏, 王正国, 赖西南, 等. 海水浸泡弹道伤骨骼肌组织的病理变化[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(7): 753—755.

[2] 赖西南, 王丽丽, 陈　蕾, 等. 海水浸泡肢体火器伤时骨骼肌组织脂质过氧化反应[J]. 中华骨科杂志, 1999, 19(5): 307—309.

[3] Doronin Iu, Grigor' ev V V. Light optical and electron microscopic changes in striated muscle tissue under the effects of sea water and thymogen in experimental animal[J]. Biull Eksp Biol Med, 1992, 113(1): 94—96.

[4] Tikuisis P. Prediction of survival time at sea based on observed body cooling rates[J]. Aviat Space Environ Med, 1997, 68(5): 441—448.

(编辑　薛国文)

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