DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.009
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
772 2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)07-0772-03

梗阻性黄疸大鼠的肾缺血再灌注损伤

何 宇,何振平 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 研究短暂性肾缺血再灌注过程对梗阻性黄疸大鼠肾功能的影响,并观察脱氧胆酸钠在此模型中的作用。方法 实验大鼠分为正常对照组(S组)、正常肾缺血再灌注组(SRI组)、梗阻性黄疸组(J组)、梗阻性黄疸肾缺血再灌注组(JRI组)及梗阻性黄疸脱氧胆酸钠处理肾缺血再灌注组(JTRI组)。在胆道梗阻1周后行双侧肾动脉夹闭10 min后放开,观察再灌注后0、4、12、24 h肝肾功能、内毒素水平及肾组织丙二醛、超氧化物歧化酶含量的变化。结果 JRI组内生肌酐清除率随再灌注时间延长呈持续性下降,JTRI组内生肌酐清除率的下降无明显缓解,J组、JRI组及JTRI组肾组织丙二醛水平明显升高,同时超氧化物歧化酶含量下降。结论 梗阻性黄疸状态下大鼠肾脏对缺血再灌注损伤的敏感性明显升高,缺血再灌注损伤可能与梗阻性黄疸术后急性肾功能衰竭的发生有关,脱氧胆酸钠对此损害过程无明显防治作用。

关键词:大鼠;梗阻性黄疸;肾缺血再灌注损伤;丙二醛;超氧化物歧化酶;脱氧胆酸钠
中图法分类号:R575;R619.9;R692 文献标识码:A

Study on renal ischemic reperfusion injury in rats with obstructive jauncice

HE Yu, HE Zhen-ping (Center of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the influence of temporary ischemic reperfusion (RI) on renal function and the curative effect of sodium deoxycholate on the model of jaundiced rats established by bile-duct ligation. **Methods** Wistar rats were divided into 5 groups, including sham-operation group (S group), sham operation and renal RI group (SRI group), common bile duct ligation group(J group), common bile duct ligation and renal RI group(JRI group), jaundiced rats treated with sodium deoxycholate and renal RI group(JTRI group). One week after bile duct ligation, rat bilateral renal arteries were transiently occluded for 10 min. Changes of renal histology and renal function were observed at different time points after renal reperfusion. Simultaneously, the contents of malondealdehyde (MDA) and superoxide dismutase 3 (SOD3) in the kidney were measured. **Results** Creatinine clearance rate Ccr was decreased progressively in both JRI and JTRI groups along with the prolongation of the duration of reperfusion. In J, JRI and JTIR groups, the level of MDA in the kidney tissue increased while SOD decreased. **Conclusion** Jaundiced rat is sensitive to RI injury. RI may be an important mechanism of acute renal failure after obstructive jaundice surgery. Sodium deoxycholate has no effects on this process.

Key words: obstructive jaundice; renal ischemia-reperfusion injury; malondealdehyde; superoxide dismutase; sodium deoxycholate; rats

在梗阻性黄疸(Obstructive jaundice, OJ)围手术期的多种并发症中以急性肾功能衰竭(Acute renal failure, ARF)的后果最为严重,其发生率约为9%,病死率高达68%[1]。为此人们进行了多年的研究,但其发生的确切机制仍不清楚[2]。通常认为OJ肾脏处于缺血低灌注状态是梗黄ARF发生的病理基础[3,4]。我们注意到在OJ围手术期同时存在着加重肾缺血以及促进肾灌流恢复的两方面因素。具备了肾缺血再灌注损伤(Renal ischemia-reperfusion injury, RI)产生的条件。因此推测RI在梗黄肾损害的加重过程中起了重要作用。作者提出RI与梗黄术后ARF的发生有关,对其展开研究将有助于了解OJ术后ARF发生的机制。本实验在建立梗黄肾缺血再灌注模型的基础上,研究了短暂性肾缺血再灌注过程对OJ肾功能的影响,同时观察了胆盐在该模型中的作用。

基金项目:重庆市科委应用基础研究基金资助项目(1999-13-60)
作者简介:何 宇(1969-),男,重庆市人,硕士,主治医师,主要从事肝胆外科方面的研究。电话(023)68753696
收稿日期:2001-06-25;修回日期:2002-04-10

1 材料和方法

1.1 实验动物模型及分组

Wistar大鼠,雌雄各半,体重200~285 g,购自四川省中药研究所,自由进食及饮水。实验动物分为5个组:正常对照组(S组)、正常肾缺血再灌注组(SRI组)、梗阻性黄疸组(J组)、梗阻性黄疸肾缺血再灌注组(JRI组)及梗阻性黄疸脱氧胆酸钠处理肾缺血再灌注组(JTRI组)。每组大鼠24只,雌雄各半,共计120只。采用腹腔内注射1%戊巴比妥钠麻醉,剂量为30 mg/kg。JRI组游离肝门至胰腺上缘间胆管,间距1 mm双重结扎并切断胆管制成胆道梗阻模型。于胆道梗阻1周以后再次手术,分别暴露双侧肾动脉,用无损伤动脉夹夹闭10 min后放开,JTRI组在行胆道梗阻术后第2天开始灌服脱氧胆酸钠,剂量为5 mg·100 g^{-1}·d^{-1},持续至术后第6天,其余处理同JRI组。S组两次手术仅分别暴露胆管及双侧肾动脉但不做进一步处理。SRI组在手术游离胆管1周后行双侧肾动脉夹闭。J组在胆管结扎1周后再次手术时仅行双侧肾动脉的暴露。

1.2 检测指标

1.2.1 一般情况 观察大鼠黄疸深度的变化。

1.2.2 肾脏组织学检查 ①光镜观察:常规脱水、石蜡包埋、HE染色、封固,光镜下观察组织学的变化。②电镜观察:取肾组织块约1 mm×1 mm×1 mm,常规固定、包埋,超薄切片,铅

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

铀双重染色, 透射电镜观察超微组织结构的改变。

1.2.3　血清生化指标检测　　取冻存血清及尿液按试剂盒说明书检测血清肌酐、尿肌酐、总胆红素、碱性磷酸酶及谷丙转氨酶的水平。将 4 h 定时尿量、体重及血、尿肌酐数值代入下列公式得到内生肌酐清除率(Endogenous creatinine clearance rate, Ccr), 单位为 $ml \cdot min^{-1} \cdot 100\ g^{-1}$。

$$\text{内生肌酐清除率} = \frac{\text{尿肌酐}(\mu mol/L) \times \text{尿量}(ml/min)}{\text{血肌酐}(\mu mol/L) \times 100(g)}$$

1.2.4　取 1 ml 下腔静脉血置于去热原处理的试管中, 2 000× g 离心 10 min, 留取血清, 采用偶氮基质显色法测定内毒素水平。

1.2.5　肾组织丙二醛及超氧化物歧化酶含量的检测　　准确称取左侧肾脏组织块 0.5 g, 加 4.5 ml 生理盐水制成 10%组织匀浆。取 50 μl 标本按试剂盒说明, 利用黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶浓度, 单位为 NU/ml。

另取 100 μl 标本, 按试剂盒说明采用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛含量, 单位为 nmol/mg。

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用第三军医大学数学教研室 SPMR 软件包对数据进行双因素方差分析及线性相关分析。

2　结果

2.1　一般情况

大鼠腹腔注入 1%戊巴比妥钠麻醉 2~3 h 后清醒。胆管结扎 24 h 后小便颜色加深, 48 h 后耳尖及鼠尾出现黄染。随胆道梗阻时间的延长, 黄疸明显加深。各组大鼠处死前体重(Body weight, BW)无显著性差异, 见表 1。

2.2　组织学改变

2.2.1　光镜观察　　J 组出现肾近曲小管上皮细胞浊肿, 肾小球肿胀, 鲍氏囊腔狭窄。SRI 组不同时相点肾小球及肾小管结构基本正常。JRI 组肾脏近曲小管上皮细胞浊肿和肾小球囊腔狭窄随再灌注时间的延长变化更趋明显, 伴局部上皮细胞脱落及刷状缘丢失。JTRI 组肾小球及肾小管的组织学改变较 JRI 组有所减轻。

2.2.3　肾组织超微结构变化　　SRI 组线粒体的轻度肿胀。J 组肾小管上皮细胞浆内有局灶性坏死形成, 线粒体肿胀、嵴减少, 局部肾小球毛细血管基膜增厚及足突融合。JRI 组超微结构改变以再灌注后 24 h 组的变化最为显著, 见肾小管上皮细胞浆内多个局灶性坏死及髓样结构形成, 线粒体明显肿胀, 嵴减少变短, 核周间隙增宽, 毛细血管基膜明显增厚, 广泛的足突融合。JTRI 变化与 JRI 组相比无明显改善。

2.3　血清生化指标测定

2.3.1　肝功能的变化　　各组肝功能检测结果见表 1。J 组、JRI 组及 JTRI 组的总胆红素(Total bilirubin, TB)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)及谷丙转氨酶(Alanine aminotransferase, ALT)水平较 S 组及 SRI 组有显著升高($P<0.01$)。

表 1　体重及血清 TB、ALP、ALT 的变化($n=24$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Changes of body weight and serum concentrations of TB, ALP, and ALT ($n=24$, $\bar{x} \pm s$)

Group	BW(g)	TB(μmol/L)	ALP(U/L)	ALT(U/L)
S	235.5±12.7	15.6±2.7	79.1±10.5	36.1±7.6
SRI	234.2±16.8	15.2±2.0	81.9±6.8	38.2±9.9
J	233.4±13.8	145.3±28.7 *	214.4±36.8 *	145.8±22.7 *
JRI	233.7±15.5	147.1±23.7 *	215.7±26.1 *	142.0±19.8 *
JTRI	234.6±19.8	150.2±13.5 *	205.7±29.7 *	148.4±22.3 *

*: $P<0.01$ *vs* S

2.3.2　肾功能的变化　　Ccr 的检测结果见表 2, J 组、JRI 组及 JTRI 组较 S 组有显著降低($P<0.01$), 且随再灌注时间延长 Ccr 呈持续性下降($P<0.05$)。

表 2　内生肌酐清除率的变化($ml \cdot min^{-1} \cdot 100\ g^{-1}$, $n=24$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Changes of endogenous creatinine clearance rates ($ml \cdot min^{-1} \cdot 100\ g^{-1}$, $n=24$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time of reperfusion(h)			
	0	4	12	24
S	0.109±0.009 6	0.082±0.010 9△	0.108±0.018	0.102±0.015 7
SRI	0.109±0.023 2	0.079±0.009 4△	0.102±0.017 7	0.107±0.023 9
J	0.066±0.005 1 *▲▲*	0.048±0.012 9 **△	0.069±0.003 3 **	0.057±0.004 2 **
JRI	0.068±0.009 4 **▲	0.036±0.008 * *△	0.045±0.005 9 * *△	0.033±0.007 6 * *#
JTRI	0.081±0.005 2 *	0.038±0.011 1 * *△	0.044±0.010 9 * *△	0.030±0.005 5 * *#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* S; △: $P<0.01$ *vs* 0 h; ▲: $P<0.05$, ▲▲: $P<0.01$ *vs* JTRI-0 h; #: $P<0.05$ *vs* 12 h

2.4　血清内毒素水平的测定

J 组和 JRI 组较 S 组明显升高($P<0.01$), JTRI 组各时相点内毒素水平较 J 组有明显的下降($P<0.05$), 但仍高于 S 组和 SRI 组($P<0.05$), 见表 3。

表 3　血清内毒素水平的变化(Eu/ml, $n=24$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3　Changes of serum concentration of endotoxin (Eu/ml, $n=24$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time of reperfusion(h)			
	0	4	12	24
S	0.047 6±0.011	0.040 6±0.011	0.051 2±0.014	0.045 7±0.009
SRI	0.044 1±0.015	0.049 2±0.011	0.046 5±0.012	0.050 4±0.009
J	0.106 6±0.029 **	0.096 1±0.029 7 **	0.110 1±0.020 3 **	0.116 4±0.042 8 **
JRI	0.113 6±0.023 2 **	0.112 9±0.024 2 **	0.104 7±0.038 2 **	0.119 9±0.044 **
JTRI	0.071 5±0.024 2 **△	0.065 2±0.134 **△	0.057 6±0.009 8 * *△△	0.066 4±0.014 4 **△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* S; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* J

2.5　肾组织丙二醛及超氧化物歧化酶含量的测定

J 组、JRI 组及 JTRI 组 MDA 水平较 S 组有显著升高($P<0.01$)。JTRI 组较 JRI 组无明显下降($P>0.05$), 见表 4。

表 4　肾组织丙二醛含量的变化(nmol/mg, $n=24$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 4　Changes of the content of malondealdehyde in kidney tissue (nmol/mg, $n=24$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time of reperfusion(h)			
	0	4	12	24
S	79.73±3.98	74.67±10.67	79.55±5.78	73.10±6.44
SRI	82.07±1.92	77.71±3.79	81.42±4.49	80.49±7.08
J	115.22±12.01 *	116.88±5.19 *	109.93±6.55 *	111.76±6.46 *
JRI	115.27±4.60 *	113.30±14.36 *	114.57±18.98 *	119.87±9.52 *
JTRI	111.87±8.46 *	119.26±12.74 *	110.99±9.41 *	116.00±4.41 *

*: $P<0.01$ *vs* S

J 组、JRI 组及 JTRI 组 SOD 的含量较 S 组、SRI 组有显著下降($P<0.01$), 且 JRI 组随再灌注时间延长明显下降, 以再灌注后 24 h 最低, JTRI 组大鼠的 SOD 水平较无明显升高($P>0.05$), 见表 5。

表 5　肾组织超氧化物歧化酶含量的变化(Nu/ml, $n=24$, $\bar{x} \pm s$)

Tab 5　Changes of the contents of superoxide dismutase in kidney tissue (Nu/ml, $n=24$, $\bar{x} \pm s$)

Group	Time of reperfusion(h)			
	0	4	12	24
S	94.61±4.48	92.75±14.1	88.86±11.1	91.16±5.79
SRI	90.88±6.71	89.29±11.0	91.02±5.67	89.44±14.20
J	68.73±5.36 *	72.90±4.01 *	69.88±8.29 *	74.05±6.68 *
JRI	75.49±8.33 *	47.16±5.41 *▽	39.54±5.56 *△	28.33±6.98 * #
JTRI	72.33±7.65 *	48.03±7.19 *▽	34.65±4.75 *△△	24.30±4.46 * ##

*: $P<0.01$ *vs* S; ▽: $P<0.01$ vs 0 h; △: $P<0.05$ *vs* 4 h; △△: $P<0.01$ *vs* 4 h; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* 12 h

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

2.6 线性相关分析

各参数经直线相关分析表明 MDA 与 SOD 呈负相关，$r=-0.68$；$P<0.01$；MDA 与 Ccr 呈负相关 $r=-0.719$ $P<0.01$；SOD 与 Ccr 呈正相关 $r=0.818$，$P<0.01$

3 讨论

梗阻性黄疸是肝胆外科常见的病症之一。OJ 围手术期患者中约有 8%～9%发生 ARF，病死率高达 68%。其确切发生机制仍不清楚。OJ 血容量的减少使肾脏处于缺血、低灌注状态[5,6]是 OJ 术后 ARF 发生的基础[3,4,7]的观点已得到认可。内毒素可能起着重要作用，它可以影响到肾脏血流动力学的稳定。作者采用肾缺血 10 min 后再通的方法观察到梗黄大鼠肾缺血再灌注后肾脏损害明显加重，并随再灌注时间延长加重。表明 OJ 肾脏对缺血再灌注损害的敏感性增强[8,9]。我们注意到在 OJ 围手术期中存在着诸多如[1]如营养差，进食减少、术前侵入性操作（如 ERCP、PTC 等）对胃肠道的影响、手术麻醉用药及凝血机能障碍等因素。它们在严重影响到梗阻性黄疸血流动力学的稳定同时，加重了肾脏的缺血程度。同时还存在促进梗阻性黄疸缺血肾灌流的因素，例如在目前的治疗过程中强调[1]积极的补液支持治疗纠正体液的丢失。胆道内引流解除黄疸能有效地缓解内毒素血症，从而有利于恢复肾脏的血流。在动物试验中也观察到抗内毒素治疗后可以有效地增加肾脏的血流量[10]。目前已知发生胆道梗阻时肾脏可以合成大量的内皮素，当用内皮素灌注肾脏后肾血管经历了收缩－舒张的过程[11]也是一个的有力的支持。从临床治疗效果看 OJ 术后 ARF 的发生反映出在恢复缺血肾脏的血流灌注过程后肾功能损害反而明显加重，这与 RI 损伤特性既恢复缺血组织灌流后损伤反而加重相吻合。因此我们认为在 OJ 围手术期具备了 RI 产生的条件，RI 在梗黄肾损害的加重过程中起了重要作用。氧自由基可能起了重要作用，可以造成膜性结构的完整性及通透性的变化，此外还引起[12]膜性结构上的功能性蛋白质损害及 DNA 片段的毁损，正常情况下可被 SOD 清除。在本实验胆道梗阻 1 周后大鼠肾组织 MDA 水平明显升高，而 SOD 浓度呈显著下降，这一结果与近来的报道相吻合[13,14]。本实验梗黄肾缺血再灌注大鼠的肾组织中 SOD 水平显著性降低且呈时间依赖性，表明在梗黄肾缺血再灌注刺激下 SOD 的消耗加剧，Yuceyar 等[9]也持相同观点。虽然胆盐已被用于 OJ 病人的治疗中，但对其疗效一直存有争议。Tripathy 等[11,15]认为肠道内的胆盐可以通过乳化作用降解灭活内毒素，也存有相反的观点[16,17]。本研究显示胆盐处理梗阻性黄疸大鼠对肾脏缺血再灌注损伤耐受性无明显增强，这可能是临床对其防治 OJ 肾损害疗效存有较大争议的原因。

参考文献：

[1] Fogarty B J, Parks R W, Rowlands B J, *et al*. Renal dysfunctioin obstructive jaundice[J]. Br J Surg, 1995, 82(7): 877－884.

[2] Inan M, Sayek I, Tel B C, *et al*. Role of endotoxin and nitric oxide in the pathogenesis of renal failure in obstructive jaundice[J]. Br J Surg, 1997, 84(7): 943－947.

[3] Valverde J, Martinez R F, Pereira J A, *et al*. Rapid increase in plasma levels of atrial natriuretic peptide after common bile duct ligation in rabbit[J]. Ann Surg, 1992, 216(5): 554－559.

[4] Gallardo J M, Padillo F J, Rodrigue M, *et al*. Evaluation of body fluid compartments and their relationship with water-electrolyte change in obstructive jaundice[J]. Gastroenterol Hepatol, 1998, 21(1): 1－5.

[5] Martinez R F, Oms L, Carulla X, *et al*. Measurement of body water compartments after ligation of the common bile duct in the rabbit[J]. Br J Surg, 1989, 76(5): 461－464.

[6] Serra A S, Carulla X, Martinez R F, *et al*. Body water compartments in patients with obstructive jaundice[J]. Br J Surg, 1992, 79(6): 553－556.

[7] Bomzon A, Binah O, Blendis L M, *et al*. Hypotension in experimental cirrhosis: Is loss of vascular responsiveness to norepinephrine the cause of hypotension in chronic bile-duct-ligated dog[J]. J Hepatol, 1993, 17(1): 116－123.

[8] Kazuo Tajiri, Happei Miyakewa, Jian Liu, *et al*. Enhanced renal susceptibility to ischemia-reperfusion injury in the rat with obstructive jaundice[J]. Hepatogastroenterology, 1997, 44(15): 789－795.

[9] Yuceyar S, Gumustas K, Erturk S, *et al*. The role of oxygen free radicals in acute renal failure complicating obstructive jaundice: an experiment study[J]. HPB Surg, 1998, 10(6): 387－393.

[10] Alexander P J, Houduk, Teerlink T, *et al*. Arginine deficiency in bile duct-ligated rats after surgery the role of plasma arginase and gut endotoxn restriction[J]. Gastroenterology, 1997, 113(4): 1 375－1 383.

[11] Tripathy U, Dhiman R K, Attari A, *et al*. Preoperative bile salt administration versus bile refeeding in obstructive jaundice[J]. Natl Med J India, 1996, 9(2): 66－69.

[12] Petukhov E B, Filimonv M I, Aleksandrova N R, *et al*. Lipid peroxidation and disorders of erythrocyte properties in patients with mechanical jaundice[J]. Khirurgiia Mosk, 1990, (1): 27－30.

[13] 徐德征，王喜艳，廖 勇. 梗阻性黄疸肾脏病理及超微病理改变及其与氧自由基的关系[J]. 肝胆外科杂志, 1997, 9(3): 105－106.

[14] Maria P P, Daniela B, Balint L, *et al*. Renal functional alterations in extrahepatic cholestasis: Can oxidative stress be involved[J]. Eur Surg Res, 1995, 27(5): 333－339.

[15] Pain J A, Cahil C J, Gilbert J M. Prevention of post-operative renal dysfunction in patients with obstructive jaundice a multicentre study of bile salts and lactulose[J]. Br J Surg, 1991, 78(4): 467－469.

[16] Morgan W A, Kaler B, Bach P H, *et al*. The role of ursodeoxy-acid in bile acid-mediated kidney fragment toxicity[J]. Exp Toxicol Pathol, 1999, 51(1): 35－39.

[17] Poo J L, Estanes A, Pedraza C J, *et al*. Effects of ursodeoxycholic acid on hemodynamic and renal functin abnormalities induced by obstructive. jaundice in rats[J]. Renal Failure, 1995, 17(1): 13－20.

（编辑 冷怀明）

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