DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.10.028
第24卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 10
2002年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2002

文章编号:1000-5404(2002)10-1189-04

论著

胃饲乙醇预处理对缺血再灌注大鼠肝脏 HSP70 表达和缺血再灌注损伤的影响

冯晓彬,董家鸿 (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 探讨胃饲乙醇预处理对缺血再灌注大鼠肝脏 HSP70 表达的影响。方法 雄性 Wistar 大鼠随机分组,动物乙醇预处理后制作缺血再灌注模型,于术后 0~72 h 内不同时相活杀大鼠,留取血及肝脏标本保存待检。结果 实验组和对照组较正常组 ALT 值明显升高,72 h 后基本恢复,实验组恢复较快,但实验组和对照组间统计学差异不明显;病理观察见实验组较对照组表现为较轻的病理损害;免疫组化结果:正常肝脏仅见弱阳性,散在分布于胞浆;术后随再灌注时相的延长,HSP70 表达逐渐增强,实验组表达明显强于对照组和正常组($P<0.05$);Western Blotting 显示 HSP70 阳性条带于再灌注 3 h 开始增强,6 h 明显增强,持续至 72 h 达到最强,实验组和对照组相差显著。结论 胃饲乙醇预处理能够明显增强缺血再灌注大鼠肝脏 HSP70 的表达,从而提示与较好肝脏保护相关。

关键词:胃饲;大鼠;乙醇;预处理;缺血再灌注;肝脏;HSP70
中图法分类号:R322.47;R619.9;4914.4 文献标识码:A

Expression of hsp70 in rat liver pretreated by ethanol and its influences on ischemia-reperfusion injury

FENG Xiao-bin, DONG Jia-hong (Institute of Hepatobiliary Surgery of PLA, Southwest Hepatobiliry Surgery Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression level of HSP70 in rat liver preconditioned by ethanol gavage and its influences on the liver ischemia-reperfusion injury. **Methods** Adult male Wistar rats were divided into different groups. Alcohol were given by gastric gavage to experimental group 24 h before 30-minute's ischemia of rat liver, and then killed at different time point between 0 to 72 h at the period of reperfusion. Blood ALT were determined and liver tissue samples were studied by immunohistochemical method, western blot and under microscope. **Results** 1. Pathological observation: there were obvious differences between experimental group and control group. Despite of a certain degree of inflammatory cell conglomeration at each slides, there was no obvious necrosis oberserved in experimental group as found in the control group. Immunochemistry results: hsp70(+) was found in normal liver cell plasms at a low level and increased after I/R injury. hsp70 was induced at higher level after the ischemia-reperfusion injury than the control group ($P<0.05$). Western Blotting exmination: the hsp70 blot was enhanced at 3 h after liver reperfusion. It increased obviously 6 h after reperfusion up to 72 h. There was obvious difference between two groups. **Conclusion** Induced by ethanol pretreatment, the hsp70 in rat liver can be obviously enhanced by ischemia and reperfusion injury. According to the pathological results, it suggests that hsp70 may provide a protection to the rat liver cell.

Key Words: gastric gavage; rat; liver; ethanol; precondition; ischemia-reperfusion; HSP70

缺血再灌注损害是肝脏外科领域常见的病理生理过程,其直接影响病人对手术的耐受和术后的恢复,一直被视为肝胆外科领域的热点问题。预处理可以有效减轻缺血再灌注对肝脏的损害,这一点在国内外得到公认。预处理的方法较多,目前常用的包括缺血缺氧预处理、热休克预处理、药物预处理等,但现有的预处理方法均不同程度地造成机体的广泛损伤和/或不易被病人接受,且效果不甚理想。本研究试图探讨一种新的预处理模式-胃饲乙醇预处理,观察其对缺血再灌注大鼠肝脏保护和肝脏 HSP70 表达的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970727)
作者简介:冯晓彬(1975-),男,河北省邢台市人,硕士,医师,主要从事肝脏缺血再灌注损伤方面的研究。电话:(023)68754000-73077
收稿日期:2001-11-07;修回日期:2002-03-09

1 材料与方法

1.1 试剂

HSP70 SABC 免疫组化试剂盒及 Western Blottig 试剂盒(博士德公司),HSP70 单克隆抗体(SIGMA 公司)。

1.2 动物及分组

成年 Wistar 大鼠 90 只,雄性,(220±20) g,SPF 级,由重庆中药研究院动物中心提供。按照随机数字表法将动物随机分为胃饲乙醇预处理实验组(42 只)、生理盐水实验对照组(42 只)和正常组(6 只)。

1.2.1 大鼠肝脏缺血再灌注模型的制备 参照文献[1]方法,实验设定缺血时间为 30 min。

1.2.2 胃饲乙醇预处理方法 为本研究自行建立,胃饲乙醇剂量按照预实验结果确定。大鼠于禁食 12 h 后,给予经口管饲 40% 乙醇 5.05 ml/kg,胃饲后自由进食,于 24 h 后行缺血再灌注手术,手术方法同上。

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

1.2.3 实验组 胃饲乙醇预处理后的大鼠肝脏缺血 30 min，于再灌注 0、1、3、6、12、24、72 h 活杀大鼠，取肝右前叶组织，PBS 漂洗后 10%甲醛溶液固定，制作石蜡切片，行病理观察和免疫组化染色分析，其余肝组织置液氮冷冻保存。取血标本待检。

1.2.4 实验对照组 动物禁食 12 h 后胃饲 5.05 ml/kg 的生理盐水后 24 h 行缺血手术，其余操作同上。

1.2.5 正常组 无预处理及手术，于上述相同时相点活杀留取标本待检。

1.3 标本检测

免疫组化染色按照 HSP70 SABC 试剂盒说明进行。Western Blotting 检测：液氮冷冻组织提取总蛋白定量后，按照试剂盒说明书及分子克隆手册进行 SDS-PAGE 蛋白电泳和转印，PVDF 膜采用 DAB(硫酸镍胺)增强显色。

1.4 统计学分析

免疫组化采用四川大学 MIAS 图像分析处理系统进行图像分析，Western Blotting 结果采用 BIO-RAD GEL DOC 2000 进行扫描分析后，拍照保存。实验数据 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPS 统计软件分析。

2 结果

2.1 大体情况

各组动物均无死亡；动物术中肝门阻断后，由于存在尾叶转流，胃肠道未见明显淤血；再灌注后，肝脏颜色较快恢复，术后动物恢复良好。

2.2 肝功能指标(ALT 值)

数据显示大鼠肝脏经过缺血 30 min 后，总体上实验组和实验对照组术后较正常血清 ALT 值明显升高，72 h 后基本恢复，但实验组和对照间无统计学差异。组间比较：缺血末期和再灌注 1 h，实验组和对照组两者间差异不大；而在再灌注 3、6 h 时两者差异显著，实验组明显高于对照组；再灌注 72 h，实验组已恢复正常，而对照组稍高。组内比较：实验组于再灌注后逐渐升高，至 3 h 达到高峰，6 h 后逐步恢复，72 h 达到正常；对照组在 12 h 达到高峰值后渐恢复，至 72 h 尚未完全正常。结合上述提示：胃饲乙醇预处理后大鼠对缺血再灌注损伤的反应较早，但恢复较快；而对照组则对损伤反应和恢复均较慢，见表 1。

表 1 各组动物再灌注不同时相 ALT 值($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Tab 1 ALT value in different groups($\bar{x}\pm s$，$n=6$)

Group	Reperfusion time (h)						
	0	1	3	6	12	24	72
Experimental	229.4±23.5▲	590.9±61.8▲	1061.4±132.6▲*	599.5±77.5▲*	629.5±65.1▲	450.3±33.3▲	31.3±3.6
Control	234.8±21.4▲	602.9±58.5▲	518.1±44.5▲	495.1±82.7▲	601.1±70.5▲	333.0±87.4▲	49.3±3.9
Normal	41.0±4.5	41.0±4.5	41.0±4.5	41.0±4.5	41.0±4.5	41.0±4.5	41.0±4.5

▲：$P<0.05$ *vs* Normal；*：$P<0.05$ *vs* Control

2.3 光镜观察

光镜下术后各组动物标本均无明显大块坏死，组织结构完整，但有不同程度炎症细胞聚集及细胞空泡状改变，以肝小叶中央静脉周围表现较为突出。随着再灌注时相的延长，改变逐渐明显。胃饲乙醇实验组和实验对照组比较：在再灌注早期差异不大，在再灌注 24 h 及 72 h 后，对照组的肝脏病理改变较重，而胃饲乙醇组则相对明显轻微。

2.4 免疫组化染色

各组动物肝组织切片 DAB 显色后，均有不同程度染色，以肝细胞为主，血管内皮细胞及炎症细胞无明显表达。在再灌注早期，HSP70 在肝细胞核和胞浆均有表达，后者较弱；而后期棕黄色颗粒主要集中于胞浆；染色阳性区域主要集中于中央静脉周围；正常组各时相点间无明显变化，均呈弱阳性表达，多为结构性 HSP70。术后动物于再灌注 0、1 h 均表达较弱，较缺血前仅有轻微升高，3 h 开始增强，6 h 明显增强，持续至 72 h 达到最强。组内比较：0 h 和 1 h 差别不大；0 h 与 3 h 间相差明显；12、24、72 h 间差别不显著。每一时相点比较，胃饲乙醇组均比对照手术组强，随时相延长相差明显，见图 1～4，而该两组均比正常组表达强。高倍镜下随机选取 5 个视野，经图象扫描 A 值分析 $P<0.05$，见表 2。

2.5 Western Blotting 检测

正常组各个时相点间阳性条带无明显波动。实验组和对照组转印条带均在 3 h 左右开始增强，12 h 达到第一次高峰，72 h 达到第二次高峰；不同时相间比较：0 h 与 1 h 间差别不大，0 和 3 h、3 和 6 h、6 和 72 h 差别显著；24 和 72 h 无明显差异。组间比较：实验组在 1、3、6、12、24、72 h 均强于对照组，结果与免疫组化染色一致。两组与正常对照组相比，0 h 差别不大，其余时相差异显著，见图 5，6，见表 3。

表 2 免疫组织化学图像扫描分析结果(A，$n=6$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Results of immunochemical analysis(A，$n=6$，$\bar{x}\pm s$)

Group	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	72 h
Experimental	146.83±12.12	151.21±14.11	169.30±12.71▲*	178.38±13.34▲*	189.41±21.01▲	192.58±16.32▲*	201.33±16.33▲
Control	143.30±11.71	150.33±12.02	159.67±21.39▲	170.34±13.71▲	172.64±15.23▲	181.22±14.15▲	190.87±13.12▲
Normal	145.21±11.32	145.21±11.32	145.21±11.32	145.21±11.32	145.21±11.32	145.21±11.32	145.21±11.32

▲：$P<0.05$ *vs* Normal；*：$P<0.05$ *vs* Control

表 3 各组 HSP70 Western blotting 扫描结果(AU * mm^2，$n=6$，$\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Western blotting analysis of HSP70(AU * mm^2，$n=6$，$\bar{x}\pm s$)

Group	0 h	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	72 h
Experimental	0.668±0.051	0.726±0.022	1.125±0.085▲*	1.624±0.096▲*	2.132±0.102▲*	2.316±0.112▲	2.375±0.125▲*
Control	0.670±0.043	0.708±0.015	1.085±0.073▲	1.432±0.087▲	1.831±0.096▲	2.076±0.124▲	2.099±0.137▲
Normal	0.647±0.032	0.647±0.032	0.647±0.032	0.647±0.032	0.647±0.032	0.647±0.032	0.647±0.032

▲：$P<0.05$ *vs* Normal；*：$P<0.05$ *vs* Control

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

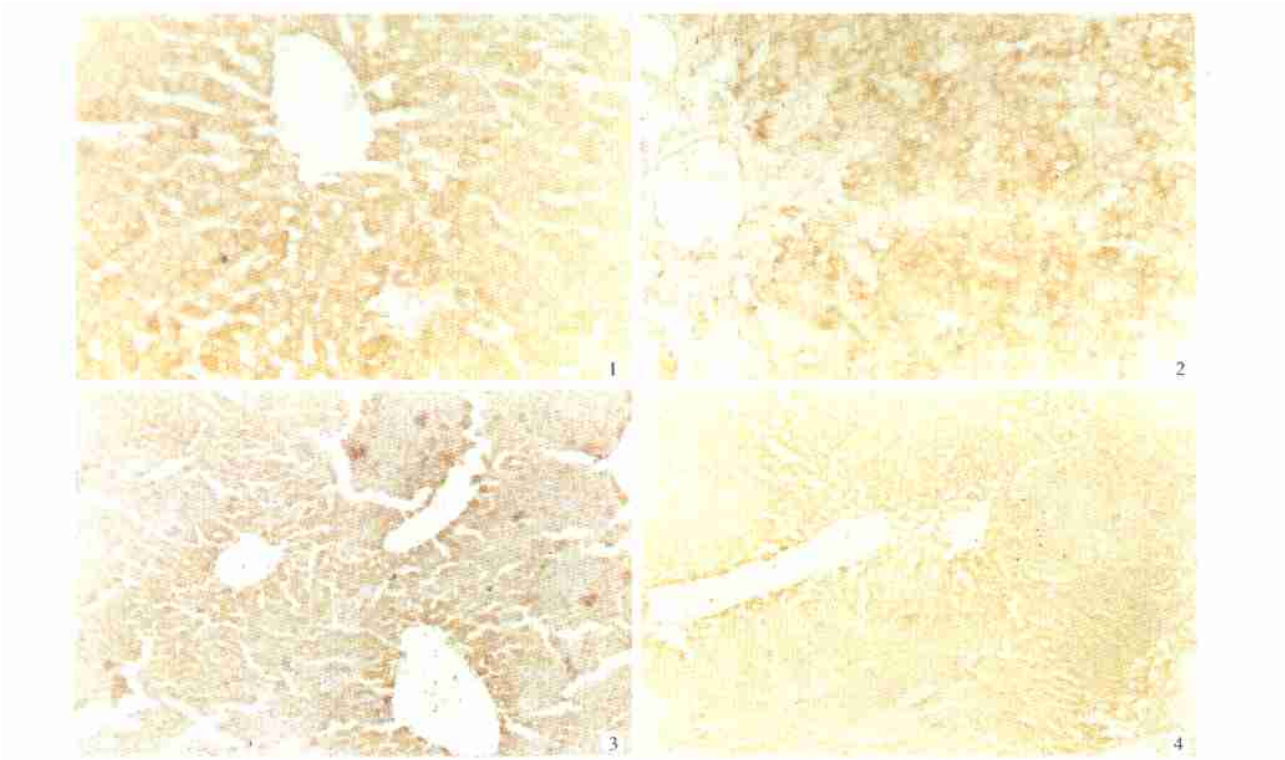


图 1　实验组再灌注 24 h HSP70 免疫组化　（SABC× 100）

Fig 1　Immounohistochemical staining for hsp 70　Exprimental group, 24 h reperfusion　(SABC× 100)

图 2　实验对照组再灌注 24 h HSP70 免疫组化　（SABC× 100）

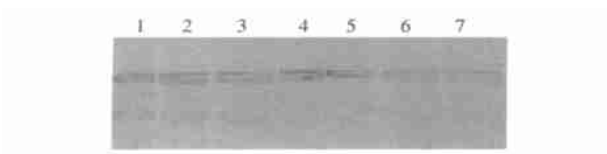
Fig 2　Immunohistochemical staining for hsp 70　Control group, 24 h reperfusion　(SABC× 100)

图 3　实验组再灌注 6 h HSP70 免疫组化　（SABC× 100）

Fig 3　Immunohistochemical staining for hsp 70　Exprimental group, 6 h reperfusion　(SABC× 100)

图 4　实验对照组再灌注 6 h HSP70 免疫组化　（SABC× 100）

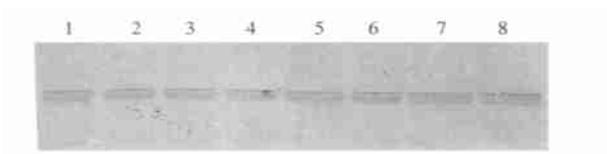
Fig 4　Immunohistochemical staining for hsp 70　Control group, 6 h reperfusion　(SABC× 100)



Lane 1: normal goup; Lane 2、4、6: experimental group, reperfusion for 0、1、3 h; Lane 3、5、7: control group reperfusioon on for 0、1、3 h

图 5　Western blotting 检测

Fig 5　Western blotting analysis for HSP70



Lane 1、3、5、7: experimental group, reperfusion for 6、12、24、72 h; Lane 2、4、6、8: control group reperfusioon on for 12、24、72 h

图 6　Western blotting 检测

Fig 6　Western blotting analysis for HSP70

3　讨论

目前肝脏预处理的方法很多, 研究较多的包括: 缺血缺氧预处理、内毒素预处理、热休克预处理以及药物预处理等。但上述众多的预处理方式均不同程度造成机体的广泛损伤, 对于大规模的临床推广尚具有一定难度, 因而探索一条安全有效的预处理途径成为肝脏外科临床面临的一个紧迫任务。本研究建立了一种新型的肝脏胃饲乙醇预处理模型。该模型可操作性强, 对机体创伤较小。乙醇是一种微毒物质, 摄入后, 迅速由门静脉系统吸收入肝, 大部分在肝脏代谢。对肝细胞而言, 乙醇吸收后对其产生"首过效应"刺激, 之后的代谢过程实质上是一种过氧化应激损害, 本质上产生了其他预处理方式相似的病理生理过程。胃饲给药更大程度上模拟了人体吸收代谢途径, 更能符合应用实际。另外, 由于乙醇代谢的特性, 使得药物作用较多的局限于肝脏, 对肝外脏器的损伤较小, 因而是一种较为理想化的预处理模型, 有望得到临床的进一步认证和推广。采用胃饲乙醇预处理模型来研究肝脏缺血再灌注损伤的保护及其对 HSP70 表达的影响, 国内尚未见相关报道。

国内外对热休克蛋白诱导的研究较为广泛, 对肝脏缺血再灌注的研究也较深入, 但将两者结合起来诱导增强肝脏的缺血再灌注耐受性, 国内外相关研究较少。缺血再灌注的不同时相对 HSP70 的诱导表达有

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

不同的影响，长时间单纯肝缺血并不能激活 HSP70 基因[2]，HSP70 mRNA 只有在肝脏发生缺血再灌注区才有表达，而在非缺血区则无表达[3]。本实验亦证实，肝脏在缺血末期，各组标本无明显 HSP70 的增强，提示单纯缺血对 HSP70 的诱导不明显，与文献报道一致。另外，短时间(15、30 min)入肝血流阻断仅引起轻微而迅速可逆的肝细胞损伤，血供恢复之后，并无 HSP70 表达增强[4]。肝功能指标不能精确反映轻微的肝细胞损害后功能表化，故在本实验中缺血 30 min 的情况下，实验组和手术对照组未见显著性统计学差异。而本研究采用胃饲乙醇预处理后，在缺血再灌注的肝脏中观察到增强表达的 HSP70，与对照手术组相比，随着再灌注时相的延长，两组动物肝脏标本 HSP70 的增强表达程度的差异逐渐显著；胃饲乙醇组病理形态上表现为较轻的细胞损害，肝功能恢复亦较快。以上说明胃饲乙醇预处理对肝脏缺血再灌注后 HSP70 的表达具有诱导增强作用，而 HSP70 增强表达与肝细胞的保护呈正相关，提示乙醇预处理对肝脏有一定的保护作用，而 HSP70 可能是其保护作用的物质基础。

近年有研究表明，有目的的预处理诱导热休克蛋白，对正常肝脏、脂肪肝、纤维化肝热缺血再灌注损伤均有保护作用，表现为肝脏功能损害减轻，恢复加快，术后生存率提高。热休克蛋白(Heat shock protein HSP)广泛存在于各种原核及真核生物细胞中，在细胞蛋白合成、分子跨膜转运、信号传递以及蛋白分子空间结构的形成和维护中发挥重要作用。尤其当组织细胞在生存环境发生改变或面临有害刺激时，热休克蛋白在机体应激反应防御机制中有重要的意义。有关乙醇诱导刺激肝脏产生热休克蛋白的相关报道尚不多见。Calabrese 等[6]报道，给予动物乙醇 7 d 后，在动物肝脏和脑部有明显的 HSP70 的出现。乙醇胃饲后可以诱导热休克蛋白 70 家族基因的激活，其可能和抵抗外界损伤因素有关[5]。本研究证实，胃饲乙醇预处理后，对于相同的缺血再灌注损伤，大鼠肝脏有更高的 HSP70 的表达。其机制可能和乙醇预处理后，肝细胞应激蛋白的基因激活，使肝细胞处于抗损伤的活跃状态，而再次受到缺血再灌注等损害因素刺激后，表现出增强的转录和表达活性，最终表现为 HSP70 的增多。这一推测和本实验的结果完全一致。

本研究建立了胃饲乙醇预处理模型用于诱导增强大鼠肝脏缺血再灌注耐受性，该模型稳定可靠，具有一定的临床应用价值，有望成为一种新的预处理模式。另外，本研究证实：胃饲乙醇预处理能明显增强缺血再灌注 HSP70 的表达，胃饲乙醇预处理对肝脏有一定的保护作用，而 HSP70 可能是其保护作用的物质基础。

参考文献：

[1] 何效东，董家鸿，蔡景修 等. 门静脉转流下入肝血流阻断动物模型的建立及评价[J]. 西北国防医学杂志，1999，3(2)：175－177.

[2] Schoeniger L O，Andreon K A，Ott G R，*et al*. Induction of heat-shock gene expression in post ischemic pig liver depends on superroxide generation [J]. Gastroenterology，1994，106(1)：177－184.

[3] Gingalewski C，Theodoakis N G，Yang J，*et al*. Distinct expression of heat shock and acute phase genes during regional hepatic ischemia-reperfusion [J]. Am J Physiol，1996，271(3 pt 2)：634－636.

[4] Tacchini L，Schiaffonati L，Pappalardo C，*et al*. Expression of HSP70，immediate-early response and hemeoxygenase genes in ischemic-reperfused rat liver[J]. Lab Invest，1993，68(4)：465－471.

[5] Tunici P，Schiaffonati L，Rabellotti E，*et al*. In vivo modulation of 73 kDa heat shock cognate and 78 kDa glucose-regulating protein gene expression in rat liver and brain by ethanol alcohol[J]. Clin Exp Res，1999，23(12)：1861－1867.

[6] Calabrese V，Testa G，Ravagna A，*et al*. HSP70 induction in the brain following ethanol administration in the rat：regulation by glutathione redox state [J]. Biochem Biophys Res Commun，2000，269(2)：397－400.

(编辑 陈聪连)

(上接 1188 页)

活性增强时和/或交感神经活性减低时，HRV 增大，反之，HRV 减少[4]。在时域指标中，SDNN、SDANN、SDNNindex 是反映交感神经张力的指标，RMSSD、PNN50 是反映迷走神经张力的指标，有研究证明 CHD 患者 HRV 较正常人明显下降[5]，心脏迷走神经张力减低是 CHD 猝死和心肌梗死后患者死亡率增高的重要因素之一。由于提高迷走神经张力可降低心肌梗死患者的死亡危险性[6]，因此，应寻求某种方法，以改善心脏自主神经失衡状态，降低 CHD 患者恶性心律失常及猝死的发生。而 β 受体阻滞剂可以增加 CHD 心肌梗死以及正常人的 HRV，降低存活心肌梗死患者的死亡率。卡维地洛在各种缺血性心肌病中的治疗作用已得到证实。对于稳定性心绞痛，它有与维拉帕米相同的提高运动耐量和改善缺血症状的治疗效果，对急性心肌梗死后心室功能不全的病人，卡维地洛的心肌能明显抑制血管和左室扩张。本研究结果显示，与对照组相比，卡维地洛组反映交感神经张力的 HRV 指标：SDNN、SDANN 及 SDNNindex 明显提高，差异性非常显著($P<0.01$)，反映迷走神经张力指标：RMSSD、PNN50 虽有所提高，但无显著性差异($P<0.05$)，说明卡维地洛增加 CHD 患者的 HRV 可能是通过抑制交感神经张力，相对提高迷走神经张力而实现的。虽然治疗 CHD 的药物很多，但对血脂、血糖等代谢因素无影响，这是治疗中至关重要的。本组资料提示，与对照组比较，卡维地洛组对患者的近期血脂、血糖、血尿酸及胰岛素水平均无不利的影响。但本研究样本小，若有大样本和较长期应用随访，将更具有意义。

关键词：心律变异性；冠心病；β 受体阻滞剂；卡维地洛
中图法分类号：R541.4；R972.4 文献标识码：B

参考文献：

[1] Wit A L，Hoffman B F，Rosen M R，*et al*. Electrophysiology and pharmacology of cardic arrhythmias. IX. Cardiac electrophysiologic effects of beta adrenergic receptor stimulation and blockade Parta A[J]. Am Heart J，1975，90(4)：521－533.

[2] 戚文航. 心率变异性测定在心血管疾病应用中的展望[J]. 中华心血管病杂志，1995，23(1)：7－9.

[3] 中华心血管疾病杂志编委会心率变异性对策专题组. 心率变异性检测临床应用的建议[J]. 中华心血管病杂志，1998，26(4)：245－247.

[4] 张荣宝. 植物神经系统生理与临床[M]. 北京：人民卫生出版社，1994. 170－223.

[5] 梁晓光，胡 健，李敏感，等. 冠心病心率变异性的特点[J]. 中国实用内科杂志，1996，16(2)：91－92.

[6] Nolan J，Flapan A D，Goodfield M E，*et al*. Measurement of parasympathetic activity from 24 hour ambulatory electrocardiograms and its reproducibility and sensitivity in normal subjects，patienets with symptomatic myocardial ischemia，and patients with diabetes mellitus[J]. Am J Cardiol，1996，77(2)：154－158.

(编辑 陈聪连)

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