DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.04.028

文章编号:1000-5404(2000)04-0369-03

论著

大鼠胆道梗阻后肝细胞线粒体钙含量变化及粉防己碱的保护作用

张永刚[1],迟彦邦[2],杨彤翰[2] (第三军医大学:[1]附属大坪医院野战外科研究所普通外科,重庆 400042;[2]附属新桥医院肝胆外科,重庆 400037)

提 要:目的 观察肝细胞线粒体钙含量变化在胆道梗阻所致肝损害中的作用及粉防己碱的保护作用。方法 复制大鼠胆道梗阻模型,灌胃给予粉防己碱(Tet)30 mg·kg^{-1}·d^{-1},分离肝细胞线粒体,动态观测肝细胞线粒体钙含量,血清T-Bil、ALT、AlP及GGT含量变化。并观察肝脏显微结构改变。结果 胆道梗阻后,肝细胞线粒体钙含量随梗阻时间延长而逐渐升高,各梗阻组与对照组比较,$P<0.05$;血清T-BiL、ALT、AlP、GGT水平随梗阻时间延长而逐渐升高($P<0.05$);相关性分析结果表明:胆道梗阻后,肝细胞线粒体钙含量与血清ALT、AlP含量变化呈明显正相关,r值分别为0.924和0.919,$P<0.01$。光镜下肝脏损害随梗阻时间延长而加重。各Tet治疗组与同时相的梗阻组比较,肝细胞线粒体钙含量减少($P<0.01$);血清T-Bil、ALT、AlP、GGT水平下降($P<0.05$);光镜下肝脏损害程度明显减轻。结论 胆道梗阻后,肝细胞线粒体钙超载进行性加重;可能是胆道梗阻导致肝损害的重要机制之一。Tet能明显减轻胆道梗阻后肝细胞线粒体钙超载程度,并对胆道梗阻所致肝损害有明显的保护作用。

关键词:胆道梗阻;肝脏;线粒体;粉防己碱;钙;鼠
中图法分类号:R657.43 文献标识码:A

Changes of calcium content of hepatocytic mitochondria and protective effects of tetrandrine after biliary obstruction in rats

ZHANG Yong-gang, CHI Yan-bang, YANG Tong-han (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To investigate the role of the changes of hepatocytic mitochondrial calcium content and the protective effects of tetrandrine (Tet) on hepatic injury after biliary obstruction in rats. **Methods** After the model of complete biliary obstruction (CBO) was established in rats, Tet was administered once a day by gavage at a dose of 30 mg/kg. The contents of mitochondrial calcium and serum T-Bil, ALT, ALP and GGT were measured in each group. Hepatic morphological changes were observed under the light microscope. **Results** After CBO, the content of mitochondrial calcium was increased progressively ($P<0.01$) and those of serum T-Bil, ALT, ALP and GGT increased significantly ($P<0.05$). Light microscopy showed that hepatic injury was intensified progressively. The content of mitochondrial calcium was highly correlated with serum ALT and ALP. **Conclusion** After CBO, the calcium overload of mitochondria is intensified progressively. This may be one of the important mechanisms of hepatic injury. Tet can effectively protect the liver against the injury due to biliary obstruction.

Key words: biliary obstruction; liver; mitochondria; tetrandrine; calcium; rat

我们采用大白鼠胆道梗阻模型,灌胃给予钙通道阻滞剂粉防己碱(Tetrandrine,Tet),通过动态检测胆道梗阻后不同时相肝细胞线粒体钙含量,血清T-Bil、ALT、ALP、GGT含量变化,结合光镜下肝脏病理形态学改变,动态观察胆道梗阻后肝细胞线粒体钙稳态改变情况及其在胆道梗阻所致肝损害中的作用,了解Tet对胆道梗阻后肝损伤的保护作用,为临床治疗提供理论依据。

作者简介:张永刚(1964—),男,辽宁省沈阳市人,硕士,主治医师,讲师,主要从事胆道梗阻所致肝脏损害及其保护方面的研究,发表论文15篇。电话:(023)68757247

收稿日期:1999-03-30;修回日期:1999-10-21

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

1 材料与方法

1.1 实验动物和实验条件

42只Wistar大鼠(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体重(200±20)g,随机分为7组,每组6只:假手术对照组(SO组),胆道梗阻10 d组(CBO_1组),胆道梗阻20 d组(CBO_2组),胆道梗阻30 d组(CBO_3组),胆道梗阻+Tet治疗10 d组(CBO+Tet_1组),胆道梗阻+Tet治疗20 d组(CBO+Tet_2组),胆道梗阻+tet治疗30 d组(CBO+Tet_3组)。术前禁食12 h,3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,取上腹部正中切口入腹,分离、暴露胆总管,在靠近肝脏侧用"0"号丝线双重结扎胆总管,逐层关腹。SO组除不结扎、切断胆总管外,其它操作与CBO组相同。术后饲养条件与术前一致。各CBO+Tet组在手术后6 h开始灌胃给予Tet 30 mg·kg^{-1}·d^{-1},灌胃容量约为1 ml/100 g体重。SO组及各CBO组灌胃给予相同容量5%葡萄糖生理盐水。各组到梗阻时间后,心脏穿刺取血,迅速开腹取肝脏。

1.2 检测项目及方法

Aprill法制备肝细胞线粒体,线粒体蛋白定量按Bradford法进行,以牛血清白蛋白为标准。在IL-951型原子吸收分光光度计(美国)上以火焰原子吸收光谱法直接测定线粒体钙含量。测定波长422.7 nm,灯电流5 mA,光谱区带1.0 nm,燃气/助燃气:空气/乙炔,结果以μg/mg线粒体蛋白表示。用日立7150型自动生化分析仪测定T-Bil、ALT、ALP、GGT含量。粉防己碱为浙江金华制药厂产品。用OLYMPUS光学显微镜做病理观察。

1.3 统计学处理

所得数据用方差分析处理,对部分资料进行相关性分析。

2 结果

2.1 肝细胞线粒体钙含量的变化

各CBO组肝细胞线粒体钙含量较SO组明显升高,且随胆道梗阻时间的延长而加重(各组$P<0.01$);各CBO+tet组与同时相CBO组比较则有明显减轻,分别减少46.67%、45.67%、35.02%(各组$P<0.01$),见表1。结果提示:胆道梗阻后肝细胞线粒体存在明显的钙超载,且随梗阻时间延长而加重;tet可明显减轻线粒体钙超载,且梗阻时间愈短,tet的钙拮抗效果愈好。

表1 肝细胞线粒体钙含量变化(μg/mg,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of calcium content in hepatocytic mitochondria(μg/mg,$\bar{x}\pm s$)

	SO	CBO1	CBO2	CBO3	CBO+Tet_1	CBO+Tet_2	CBO+Tet_3
Mitochondria calcium	0.68±0.04	1.35±0.24※※	2.08±0.30※※	3.17±0.23※※	0.72±0.04△△	1.13±0.11※※△△	2.06±0.16※※△△

※:$P<0.05$,※※:$P<0.01$ *vs* SO;△:$P<0.05$,△△:$P<0.01$ *vs* CBO of the same obstructed time

2.2 血清中T-Bil、ALT、ALP、GGT含量变化

各CBO组与SO组比较,血清T-Bil、ALT、ALP、GGT均随胆道梗阻时间延长而逐渐升高($P<0.01$)。各CBO+Tet治疗组与同时相CBO组相比,血清T-Bil、ALT、ALP、GGT均减少($P<0.05$),见表2。说明tet对胆道梗阻所致的肝细胞损伤有明显的保护作用。

表2 血清中T-Bil、ALT、ALP、GGT含量变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of the level of T-Bil, ALT, ALP, GGT in serum($\bar{x}\pm s$)

Groups	T-BiL(C_B/μmol·L^{-1})	ALT(U/L)	ALP(U/L)	GGT(U/L)
SO	2.80±1.07	71.50±19.92	293.33±40.47	10.17±3.49
CBO1	34.20±5.04aa	80.50±14.51aa	932.00±63.92aa	36.33±2.07aa
CBO2	89.62±5.10aa	193.33±22.07aa	976.33±60.76aa	90.83±5.23aa
CBO3	102.72±8.49aa	607.83±49.70aa	1328.17±92.64aa	264.67±18.55aa
CBO+Tet_1	16.91±4.95ab	136.16±19.68a	266.00±12.31bb	11.50±0.84b
CBO+Tet_2	79.73±17.76aa	14.33±43.21aabb	451.67±99.28abb	42.50±6.63aabb
CBO+Tet_3	80.11±11.53aabb	532.67±60.34aabb	1087.50±111.89aab	120.33±15.88aabb

a:$P<0.05$,aa:$P<0.01$ *vs* SO;b:$P<0.05$,bb:$P<0.01$ *vs* CBO at the same obstructed time

2.3 光镜观察结果

SO组大鼠肝脏组织均未见明显病变。CBO_1组大鼠肝细胞广泛浊肿变性,肝小叶中央静脉及门脉区血管扩张充血,伴有中性粒细胞为主的炎细胞浸润,肝组织内小灶状及片状坏死区较多。CBO_2组肝脏病变加重,突出的改变为肝组织内大小不等的坏死灶增多,坏死灶中的肝细胞崩解,代之以大量分叶核中性白细胞浸润,部分区域肝细胞片状崩解形成液化区。CBO_3组肝脏结构严重紊乱,肝纤维化与肝坏死同时存在。CBO+Tet_1组肝组

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

织变性, 坏死及炎细胞浸润较 CBO_1 组明显减轻。$CBO+Tet_2$ 组与 CBO_2 组比较，肝组织坏死及纤维结缔组织增生均有减轻。$CBO+Tet_3$ 组肝脏病变明显轻于 CBO_3 组。

3　讨论

本实验结果发现胆道梗阻后肝细胞线粒体存在明显的钙超载, 且随梗阻时间延长而加重 ($P<0.01$), 大鼠血清 T-Bil、ALT、ALP 和 GGT 随梗阻时间延长而逐渐升高 ($P<0.01$)，与肝脏显微结构改变相符合，肝细胞线粒体钙含量改变与血清 ALT 和 ALP 含量改变的相关性分析结果均呈显著的正相关 ($P<0.01$)。胆道梗阻后，肝脏有效循环血流量明显减少[1]，胞内 ATP 缺乏，胞膜通透性增加、Ca^{2+} 内流增加，胞膜 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶排 Ca^{2+} 能力减弱，Ca^{2+} 滞留于胞内，线粒体保护性摄 Ca^{2+} 而造成自身钙超载[2]。胆汁瘀积，毒性胆盐损伤胞质膜，导致 $[Ca^{2+}]i$ 和线粒体 Ca^{2+} 含量升高[3]；另外，胆盐使线粒体呼吸功能障碍，ATP 合成减少，并阻碍呼吸链的电子传递、增加电子外泄、促进氧自由基形成，进一步损伤细胞膜性结构而造成胞内和线粒体内钙超载[4]。线粒体 Ca^{2+} 超载严重损伤了线粒体的结构和功能，抑制了 ATP 合成。由于线粒体膜电势丧失，呼吸链功能障碍，电子传递链发生电子外漏，促进了氧自由基的产生；另外，被激活的 Ca^{2+} 依赖蛋白酶促进胞内黄嘌呤氧化酶 (Xanthin oxidase, XOD) 增加，XOD 利用胞内分子氧产生大量的氧自由基，结果导致线粒体及肝细胞的脂质过氧化损伤[2,5]。

本实验结果发现 Tet 可显著减轻胆道梗阻后肝细胞线粒体钙超载程度 (各组 $P<0.01$)，对胆道梗阻所致肝损害有明显的保护作用。有文献报道[2]，钙通道阻滞剂 (Verapamil, Nifedine 等) 可明显减轻肝细胞内钙超载程度，并具有肝保护作用，但所需剂量较大。Tet 是从中药粉防己 (Stephania tetrandra S. Moore) 根块中提取的双苄基异喹啉类生物碱。近年来的研究表明[6]：Tet 既是一种天然钙通道阻滞剂，又是钙调蛋白 (CaM) 拮抗剂；而且对钙通道的阻滞作用是非选择性的。Tet 对胆道梗阻所致肝损伤的保护作用可能有赖于其钙拮抗作用。

参考文献:

[1] 程迅生, 迟彦邦, 祁佐元 . 慢性胆道梗阻时肝脏血流量及微血管床的变化[J] . 中华外科杂志, 1992, 30(12): 751—754.

[2] 张永刚, 迟彦邦, 杨彤翰 . 肝细胞钙超载与肝细胞损伤[J] . 国外医学: 病理学与临床分册, 1997, 17(3): 255—258.

[3] Schmucker D L, Ohta M, Kanai S, *et al*. Hepatic injury induced by bile salts : Correlation between biochemical and morphological events[J] . Hepatology, 1990, 12(1) :1 216—1 221.

[4] Krahenbuhl S, Talos C, Fischer S, *et al*. Toxicity of bile acids on the electron transport chain of isolated rat liver mitochondria[J] . Hepatology, 1994, 19(5) :471—479.

[5] Kass G E N, Bellomo G, Judes M J, *et al*. Toxic effects of calcium on mitochondria[J] . Methods Toxicol, 1993, 2(6) : 378—388.

[6] 张永刚, 迟彦邦, 杨彤翰 . 粉防己碱的药理研究进展[J] . 国外医学: 中医中药分册, 1997, 19(4): 6—8.

(编辑　汪勤俭)

(上接 368 页)

外伤性迟发性颅内血肿病死率较高，其中迟发性脑内血肿的病死率为 25% ~ 55%，有的文献报告甚至高达 44% ~70%。死亡的主要原因是没有及时发现迟发性颅内血肿而导致。本组病例除 1 例由于原发脑伤太重而死亡，其余 5 例均因及时发现手术后恢复良好。因此, 及时的 CT 重复检查是早期诊断迟发性颅内血肿的重要手段。对入院时 CT 扫描阴性，临床症状轻微，但以后突然出现神经系统症状和体征加重，出现意识障碍及脑疝等。或入院后经对症处理如强力脱水等治疗后病情再度恶化应高度怀疑迟发性颅内血肿的发生，应及时复查 CT，明确诊断后立即手术治疗。同时要合理使用脱水药，特别是对中老年病人, 以免因颅内压降低过快而加重颅内出血。

关键词: 颅内血肿; 迟发性; CT
中图法分类号:　R651.15　文献标识码:　B

参考文献:

[1] Cervantes L A. Concurrent delayed temporal and posterior fossa epidural hematomas[J] . J Neurosurg, 1983, 59(2) :351—353.

[2] Tibbs P A, Goldstein S J, Smithsom J R Jr. Delayed traumatic intracerebellar hemetoma[J] .Surg Neurol, 1981, 16(5) : 309—312.

[3] Apuzzo M L J. Brain Surgery : complication avoidance and management[M] . New York : Churchill Livingstone, 1993. 1 948—1 951.

[4] Poon W S, Rehman S U, Poon C Y, *et al*. Traumtic extradural hematoma of delayed onset is not a rarity[J] . Neurosurg 1992, 30(5) 681—683.

(编辑　冯崇英)

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