

分类号:  
学 号: 2010109149

密 级:  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕士学位论文



### 右美托咪定联合缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的作用

学 位 申 请 人	郭友祥
指 导 教 师	欧阳军
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	外科学
研 究 方 向	肝胆外科疾病的基础与临床研究
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子  
2015年5月

分类号:  
学 号: 2010109149

密 级:  
单位代码: 10759

# 石河子大学

## 硕 士 学 位 论 文



### 右美托咪定联合缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的作用

学 位 申 请 人	郭友祥
指 导 教 师	欧阳军
申请学位门类级别	医学硕士
学 科、专 业 名 称	外科学
研 究 方 向	肝胆外科疾病的基础与临床研究
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子  
2015年5月

**The Effect of Dexmedetomidine Combined with Ischemic  
Preconditioning on Liver Ischemic Reperfusion  
injury in Rats**

A Dissertation Submitted to

**Shihezi University**

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

**Master of Medicine**

**By**

**Guo You-xiang**

**(Surgery)**

Dissertation Supervisor: Ou-Yang Jun

May, 2015

# 石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

## 学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：

郭友祥

时间：2015年6月4日

## 使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：

郭友祥

时间：2015年6月4日

导师签名：

王心平

时间：2015年6月4日

## 摘要

**目的:** 探讨右美托咪定联合缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的作用及可能机制。

**方法:** 60 只健康雄性清洁型 SD 大鼠, 体重 (251±18) g, 按随机数字表法分为五组 (n=12): 假手术组(S 组)、缺血再灌注组(IR 组)、右美托咪定预处理组(Dex 组)、缺血预处理组(IP 组)和右美托咪定联合缺血预处理组(Dex+IP 组)。采用 Pringle 法分别建立大鼠肝脏缺血再灌注模型, 测定肝脏缺血 30min 再灌注 6h 后血清中 ALT、AST、LDH、TNF- $\alpha$  的浓度。取肝脏组织, 通过 HE 染色观察其病理学改变, TUNEL 检测肝脏组织中细胞凋亡数量, 免疫组化测定肝脏组织血红素氧合酶-1 (heme oxygenase-1, HO-1) 的表达。

**结果:** 与 S 组相比, 其余各组血清中 ALT、AST、LDH 及 TNF- $\alpha$  浓度明显增高 ( $P<0.01$ ); 与 IR 组相比, Dex、IP 及 Dex+IP 组明显降低 ( $P<0.01$ ); Dex+IP 组明显低于 Dex 组及 IP 组 ( $P<0.01$ )。ALT、AST 及 TNF- $\alpha$  浓度在 Dex 组与 IP 组之间无明显差异 ( $P>0.05$ ), LDH 浓度在 Dex 组明显低于 IP 组 ( $P<0.01$ )。肝组织病理学评分 IR、Dex、IP 及 Dex+IP 组明显高于 S 组 ( $P<0.01$ ), Dex、IP 及 Dex+IP 组明显低于 IR 组 ( $P<0.01$ ), Dex+IP 组明显低于 Dex、IP 组 ( $P<0.01$ ), Dex 组与 IP 组之间未见明显差异 ( $P>0.05$ )。肝细胞凋亡指数 IR、Dex、IP 及 Dex+IP 组明显高于 S 组 ( $P<0.01$ ), Dex、IP 及 Dex+IP 组明显低于 IR 组 ( $P<0.01$ ), Dex+IP 组明显低于 Dex、IP 组 ( $P<0.01$ ), Dex 组与 IP 组之间未见明显差异 ( $P>0.05$ )。HO-1 评分, 与 S 组相比, IR 组增高 ( $P<0.05$ ), Dex、IP 及 Dex+IP 组明显增高 ( $P<0.01$ ); 与 IR 组相比, Dex 及 IP 组增高 ( $P<0.05$ ), Dex+IP 组明显增高 ( $P<0.01$ ); Dex+IP 组高于 Dex 及 IP 组 ( $P<0.05$ ); Dex 与 IP 组之间未见明显差异 ( $P>0.05$ )。

**结论:** 右美托咪定及缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤均有保护作用, 两者联合应用效果更好, 其作用均与诱导 HO-1 的表达有一定关系。

**关键词:** 右美托咪定, 缺血预处理, 肝脏, 缺血再灌注损伤

## Abstract

**Objective:** To investigate the effect and possible mechanism of dexmedetomidine combined with Ischemic Preconditioning on liver ischemic reperfusion injury in rats.

**Methods:** Sixty healthy male SD rats, weighing  $(251 \pm 18)$  g, were randomly divided into five groups, twelve rats each group: Sham-operation group (group S), Ischemia-reperfusion group (group IR), Dexmedetomidine Preconditioning group (group Dex), Ischemic Preconditioning group (group IP) and Dexmedetomidine combined with Ischemic Preconditioning group (group Dex+IP). Ischemia-reperfusion model were established according to Pringle's method. After 30 minutes' ischemia and 6 hours' reperfusion of the liver, the concentrations of ALT, AST, LDH and TNF- $\alpha$  in serum were measured. The liver histological changes were examined after HE staining, the liver cell apoptosis were examined by TUNEL and the expression of heme oxygenase-1 were examined by immunohistochemistry.

**Results:** Serum concentration of ALT, AST, LDH and TNF- $\alpha$  in group IR, Dex, IP and Dex+IP were significantly higher than those in group S ( $P < 0.01$ ); in group Dex, IP and Dex+IP, significantly lower than in group IR ( $P < 0.01$ ); in group Dex+IP, significantly lower than in group Dex and IP ( $P < 0.01$ ). There were no significant difference of the serum concentration of ALT, AST and TNF- $\alpha$  between group Dex and IP ( $P > 0.05$ ), the serum concentration of LDH in group Dex were significantly lower than group IP ( $P < 0.01$ ). Pathological score of group IR, Dex, IP and Dex+IP was significantly higher than that of group S; group Dex, IP and Dex+IP was significantly lower than that of group IR ( $P < 0.01$ ); group Dex+IP was significantly lower than that of group Dex and IP ( $P < 0.01$ ), and there were no significant difference between group Dex and IP ( $P > 0.05$ ). The apoptotic index of group IR, Dex, IP and Dex+IP was significantly higher than that of group S; group Dex, IP and Dex+IP was significantly lower than that of group IR ( $P < 0.01$ ), group Dex+IP was significantly lower than that of group Dex and IP ( $P < 0.01$ ), and there were no significant difference between group Dex and IP ( $P > 0.05$ ). Compared with group S, the HO-1 score of group IR was improved ( $P < 0.05$ ), and that of group Dex, IP and Dex+IP was significantly improved ( $P < 0.01$ ); compared with group IR, that of group Dex and IP was improved ( $P < 0.05$ ) and group Dex+IP was significantly improved ( $P < 0.01$ ); compared with group Dex and IP, that of group Dex+IP was improved ( $P < 0.05$ ); there were no significant difference between group Dex and IP ( $P > 0.05$ ).

**Conclusions:** Both of Dexmedetomidine Preconditioning and Ischemic Preconditioning can protect liver from ischemia-reperfusion injury in rats to some extent, the combined application of two gives better effects, which is related to the increasing expression of HO-1 to a certain extent.

**Key words:** Dexmedetomidine, Ischemic preconditioning, Liver, Ischemia-reperfusion injury

# 目 录

前言 .....	1
材料与amp;方法 .....	3
1. 实验材料 .....	3
2. 实验方法 .....	4
结果.....	12
1. 血清 ALT、AST、LDH 及 TNF- $\alpha$ 浓度.....	12
2. 肝脏组织的病理学改变.....	13
3. 肝组织细胞凋亡检测.....	15
4. 肝脏组织 HO-1 的表达 .....	16
讨论.....	17
结论.....	25
参考文献.....	26
文献综述.....	30
致谢.....	41
附录.....	42
作者简历.....	46
导师评语.....	47

## 英文缩略语表

英文缩写	英文全名	中文译名
HIRI	Hepatic ischemia reperfusion injury	肝脏缺血再灌注损伤
IPC/IP	Ischemic preconditioning	缺血预处理
Dex	Dexmedetomidine	右美托咪定
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$	肿瘤坏死因子
IR	ischemia- reperfusion	缺血再灌注
HO	heme oxygenase	血红素氧合酶
HO-1	heme oxygenase-1	血红素氧合酶-1
S	sham-operation	假手术
$\alpha_2$ AR	alpha 2-adrenoceptor	$\alpha_2$ 肾上腺素能受体
TOA	total oxidation activity	总氧化活性
OSI	Oxidative stress index	氧化应激指数
T-AOC	Total antioxidant capacity	总抗氧能力
PON-1	Paraoxonase-1	对氧磷酶-1
ALT	alanine aminotransferase	谷丙转氨酶
AST	aspartate aminotransferase	谷草转氨酶
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor- $\alpha$	肿瘤坏死因子- $\alpha$
XDH	xanthine dehydrogenase	黄嘌呤脱氢酶
XO	xanthine oxidase	黄嘌呤氧化酶
PAF	platelet activating factor	血小板活化因子
PMN	polymorphonuclear	多型核白细胞

## 前言

### (introduction)

肝脏缺血再灌注损伤(Hepatic ischemia re-perfusion injury, HIRI)是指肝脏组织在部分或全部缺血一段时间后恢复血液灌注,不但不能使其功能和结构得以恢复,反而加重其功能障碍和结构损伤的现象。HIRI是近年来肝胆外科领域的一大研究热点,也是肝胆外科一个常见的且不容忽视的病理生理现象。HIRI多见于复杂的肝脏手术、严重创伤恢复血供及重度休克复苏时等。在复杂的肝叶切除(如肝癌等)及严重的肝脏创伤手术中需先阻断全部或部分入肝血流以减少术中出血及充分暴露手术视野,当手术结束后恢复肝脏血液灌注时即可导致HIRI;在肝脏部分移植或全肝移植术中,由于离体的供肝组织在完成移植前需经历较长时间的冷保存(降低肝脏代谢),故其除了需经历移植完成后恢复血液灌注所导致的热缺血再灌注损伤外,还要经历冷保存过程所导致的冷却血再灌注损伤<sup>[1]</sup>;重度休克时机体有效循环血量急剧下降,导致肝脏组织灌注不足,当休克得到复苏而恢复肝脏血流灌注时也可引起HIRI。HIRI是重度休克、复杂的肝叶切除、严重的肝创伤等术后肝功能异常以及原发性肝移植无功能的重要原因<sup>[2]</sup>。故如何预防和降低HIRI是目前肝胆外科面临的一个重大问题。

HIRI发生的机制十分复杂,其中有诸多因素参与,多种机制相互影响,多种通路共同发挥作用,产生放大效应。它不仅包含肝脏缺血过程中的损伤(主要有缺氧及能量耗竭所引起),更重要的是当肝脏恢复血流灌注后产生的一系列损伤(主要由氧化应激及炎性改变所引起)。综合大量专家学者的研究,其可能的机制主要有以下几个方面:氧自由基的损伤作用;钙超载的损伤作用;细胞因子的损伤作用;内皮素与一氧化氮浓度失衡以及相关基因的作用等。肝脏的缺血再灌注使肝细胞与中性粒细胞、Kupffer及单核细胞等多种非实质细胞间发生相互作用<sup>[3]</sup>,而且活化的补体系统以及血小板也参与其中,从而导致大量促炎因子的释放,引起炎症反应,损伤肝窦状隙、破坏内皮细胞,影响凝血系统,导致肝脏微循环障碍,进一步加重组织的损伤,引起细胞凋亡,并影响到肝细胞再生。目前认为氧化应激、钙超载、各种有害细胞因子的表达在HIRI的发生发展中尤为重要。

近年,经过大量专家学者的努力,已有多种方法被证实具有降低HIRI的作用。主要包括缺血预处理(Ischemic preconditioning, IPC)和缺血后处理(Ischemic postconditioning, IPO)、药物预处理和后处理、缺氧预处理、热休克预处理以及联合处理等。其中药物干预是利用药物或其代谢产物的药理作用来提高组织或细胞对缺血再灌注的耐受力,因其实用性强且效果明显而在临床广泛应用<sup>[4]</sup>。

本实验中所研究的药物右美托咪定是一种具有镇静、镇痛(中度镇痛作用)、辅助麻醉等作用的新型的高选择性 $\alpha_2$ 肾上腺素能受体( $\alpha_2$ AR)激动剂。另外,其还具有利尿剂及改善患者血流动力学等作用,是各科重症患者及ICU患者的常用药物(被认为是目前拔管管理最理想的药物之一)。然而新近研究显示其还具有脏器保护作用,能明显降低脏器的缺血再灌注损伤,但目前国内对此研究尚少,且其作用机制尚不明确。

IPC对HIRI的改善作用已经得到广泛的认可。国内外均有研究报道表明IPC可以明显增加缺血器官对长时间缺血再灌注的耐受力，减少组织及细胞损伤，其作用机制与多种途径有关，且各种途径之间相互影响，共同发挥作用。

有研究表明，对于脏器缺血再灌注损伤的干预，两种或两者以上处理因素联合作用效果可能更好。但目前关于右美托咪定预处理及IPC对HIRI的联合作用的研究国内外均未见报道，本研究通过将这两种干预方式同时作用于大鼠HIRI模型，检测各组大鼠之间的血清ALT、AST、LDH及TNF- $\alpha$ 浓度，经HE染色后观察肝脏组织的病理学改变，TUNEL检测肝脏组织细胞凋亡水平，免疫组化技术检测肝脏组织血红素氧合酶1(heme oxygenase-1, HO-1)的表达，通过对各组间的各个指标进行比较，探讨右美托咪定预处理联合IPC对大鼠HIRI的作用及可能机制，从而为预防和减轻HIRI提供一定的临床参考。

## 材料和方法 (Materials and Methods)

### 1. 实验材料

#### 1.1 实验动物

健康雄性清洁型 SD 大鼠 60 只, (许可证号: SCXK 新 2011-0001), 体重 (251 ± 18) g, 购自新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心动物饲养科。所有老鼠以鼠笼单独饲养, 放于动物架上, 室温(20 ± 2)°C, 相对湿度(55 ± 10)%, 自由进食水, 术前 12 h 禁食, 但不禁水。定期更换垫料, 保持笼内清洁干燥。老鼠饲料由新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心动物饲养科提供。

#### 1.2 实验器材

显微手术器械: 上海医疗仪器厂

电子天平: 上海天平仪器厂

架盘药物天平: 北京玄武天平厂

高速低温台式离心机: Thermo Fisher Scientific (美国)

-80°C 冰箱: 中国青岛Haier公司

ELX-800型酶标仪: 美国BIO-TCK公司

轮转式切片机: 德国LEICA公司

石蜡切片机: 德国LEICA公司

免疫组化石蜡包埋机: 德国LEICA公司

恒温水浴箱: 德国 SIEMENS公司

电热恒温干燥箱: 上海医疗仪器厂

美的微波炉: 美的集团有限公司

光学显微镜: 美国奥林巴斯公司

OLYMPUS BX40 图像采集系统: Olympus optical 公司

#### 1.3 主要试剂及药品

盐酸右美托咪定注射液 (艾贝林): 恒瑞公司 (江苏)

水合氯醛: 上海第一生化制药公司

大鼠TNF- $\alpha$  ELISA试剂盒: 建成生物研究所 (南京)

TUNEL试剂盒: Roche公司

HO-1一抗: Abcam 公司

HO-1二抗: 北京中杉金桥公司

甲醛: 上海试剂厂

乙醇: 上海试剂厂

其余试剂、药品由石河子大学医学院及第一附属医院相关科室提供。

#### 1.4 主要试剂配制

(1) 盐酸右美托咪定注射液: 盐酸右美托咪定1支 (200 $\mu$ g/2ml) + 78ml生理盐水, 将其配成2.5 $\mu$ g/ml的盐酸右美托咪定注射液溶液。(注: 盐酸右美托咪定注射液溶液需用

现配，防止药物失效影响实验效果。)

(2) 苏木素染液 (1000ml)

原料及配制方法:

①A液体: 将苏木素5g加入50ml无水乙醇中, 充分搅拌至其完全溶解;

②B液体: 将明矾50g加到500ml双蒸水中, 加热煮沸, 使其充分溶解;

③将A液、B液混合, 大火煮沸1min, 然后缓慢加入氧化汞粉末2.5g混匀(注: 此时容器宜大, 避免沸出), 再加热煮沸2分钟, 然后将染液迅速冷却, 过夜, 次日过滤, 使用前加入冰醋酸30ml及甘油50ml。

(3) 伊红染液 (1000ml)

伊红5g 溶于100ml双蒸水中, 待伊红完全溶解后再加入冰醋酸约500 $\mu$ l, 以清洁滤纸过滤后将沉淀放于60 $^{\circ}$ C烤箱中烤干, 然后加酒精(90%) 1000ml。

(4) PH7.4磷酸缓冲溶液 (PBS)

①A液: 取Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>7.1g, 加蒸馏水至1000ml;

②B液: 取KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>6.8g, 加蒸馏水至1000ml;

③用时取A液80ml、B液体20ml混合, 加入NaCl8.0g, KCl0.2g即可。

(5) 蛋白酶K溶液 (200ug/ml): 蛋白酶K0.02g+PBS100ml。

(6) 含2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的PBS 缓冲液: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2.0ml, PBS 缓冲液 98.0ml。

(7) 0.05%二氨基联苯(DAB)溶液: DAB 5mg; PBS 10ml (pH7.4), 使用时过滤, 加H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>至0.02%。

## 2. 实验方法

### 2.1 动物分组及模型制备

(1) 随机分组 (随机数字表法)

根据实验设计, 将 60 只大鼠按照体重顺序于尾部依次编号 (1-60 号), 并将编号做好记录, 从随机数字表中任选一位置从左往右开始依次抄取 60 个随机数字 (随机数字选取两位数), 如果遇到相同随机数字, 则越过, 抄取下一个数字, 将所抄取的数字依次对应于大鼠编号。将所有随机数字除以 5, 按余数 1、2、3、4、0, 分别放于 S 组、IR 组、Dex 组、IP 组及 Dex+IP 组。如果分组不均, 则继续抄取随机数字, 以该数字除以数量较多组的老鼠数, 根据所得余数选取该组相应老鼠放到较少的组 (如余数为 2, 则选择改组排在第二位的老鼠放到数量较少组), 以此方法进行, 直到所有组的大鼠数量相等 (每组 12 只)。

(2) 模型制备

本研究参照 Pringle 法建立大鼠的 HIRI 模型, 具体如下:

S 组: 术前 30min 腹腔注射与 Dex 组中所用药物容量相当的生理盐水, 以 10%水合氯醛溶液 30ml/kg 经皮腹腔注射, 麻醉后将大鼠固定于清洁的实验动物架上, 备皮, 碘伏腹部常规消毒后, 以正中切口入腹, 逐层切开腹壁, 以小拉钩小心翻起肝脏, 找到、分离肝十二指肠韧带, 显露肝门但不夹闭肝蒂, 松开拉钩将翻起的肝脏轻轻放回原位,

可见肝脏组织始终保持鲜红色。靠拢双侧腹壁，以生理盐水浸湿的无菌纱布覆盖创面，30min 后逐层关腹，关腹完毕后将大鼠放于动物复苏箱中复苏（复苏过程中仍以生理盐水浸湿的无菌纱布持续覆盖手术切口处），持续 6h（自前一个 30 分钟结束开始计时）；

**IR 组：**术前 30min 腹腔注射与 Dex 组所用药物容量相当的生理盐水，以 10% 水合氯醛溶液 30ml/kg 腹腔注射，麻醉后将大鼠固定于实验动物架上，备皮，碘伏腹部常规消毒后，以正中切口入腹，逐层切开腹壁，以小拉钩小心翻起肝脏，找到、分离肝十二指肠韧带，显露肝门后以显微无创血管夹夹闭肝蒂，完全阻断入肝血流，观察可见肝脏组织逐渐由鲜红逐渐变为暗红色，靠拢双侧腹壁，以生理盐水浸湿的无菌纱布覆盖创面，30 分钟后松开血管夹，恢复血液灌注，可见肝脏组织由暗红色逐渐恢复鲜红。逐层关腹，关腹完毕后将大鼠放于动物复苏箱中复苏（复苏过程中仍以生理盐水浸湿的无菌纱布持续覆盖手术切口处），持续 6h（自松开血管夹开始计时）；

**Dex 组：**右美托咪定按照 25 $\mu$ g/kg（2.5 $\mu$ g/ml 的盐酸右美托咪定注射液配液）于手术 30min 前腹腔注射给药，麻醉及后续处理同 IR 组；

**IP 组：**于术前 30min 腹腔注射与 Dex 组中所用药物容量相当的生理盐水，以 10% 水合氯醛溶液 30ml/kg 经皮腹腔注射，麻醉后将大鼠固定于实验动物架上，备皮，碘伏腹部常规消毒后，以正中切口入腹，逐层切开腹壁，以小拉钩小心翻起肝脏，找到、分离肝十二指肠韧带，显露肝门后以显微无创血管夹夹闭肝蒂，完全阻断入肝血流，观察可见肝脏组织逐渐由鲜红逐渐变为暗红色，靠拢双侧腹壁，以生理盐水浸湿的无菌纱布覆盖创面，自夹闭肝蒂起 10 分钟后松开血管夹，恢复血液灌注，可见肝脏组织由暗红色逐渐恢复鲜红，自松开血管夹 10 分钟后再次夹闭肝蒂。以生理盐水浸湿的无菌纱布覆盖创面，30 分钟后（自第二次夹闭肝蒂开始计时），松开血管夹，恢复血流灌注。逐层关腹，然后将大鼠放于动物复苏箱中复苏（复苏过程中仍以生理盐水浸湿的无菌纱布持续覆盖手术切口处），持续 6h（自第二次松开血管夹开始计时）；

**Dex+IP 组：**右美托咪定按照 25 $\mu$ g/kg（2.5 $\mu$ g/ml 的盐酸右美托咪定配液）于手术 30min 前腹腔注射给药，麻醉及后续处理同 IP 组。

各组大鼠于术后 1-2 小时左右开始逐渐苏醒、恢复活力，复苏成功。

## 2.2 标本的收集

再灌注 6h 后再次腹腔注射 10% 水合氯醛溶液 30ml/kg，麻醉后以原来切口入腹，用一次性采血针连接真空采血管自下腔静脉采血两管（各 3ml 左右，一管用于检测血清 ALT、AST 及 LDH 浓度，另一管用于检测血清 TNF- $\alpha$  浓度，按老鼠编号分别做好标记；此步应尽量避免溶血），切取少许肝脏组织（厚约 0.5cm）。

将装有标本的两支采血管放于离心管中分别称重，若重量不等，向较轻的离心管中加入少许自来水，直至两个装有采血管的离心管重量一致。然后将两个离心管对称放于离心机的离心槽内，打开离心机，以 4000r/min 离心 5min，平稳取出采血管，将两个采血管中的上清液分别缓慢倒入一次性血清管中（按大鼠编号及所测项目分别做好标记），置于 -80 $^{\circ}$ C 环境中保存备用。

将所取肝脏组织分别放于盛有充足 10%福尔马林溶液的容器中固定备用（容器密封）。

### 2.3 实验动物处理

实验动物颈椎脱臼处死后立即放入实验室冷冻柜的集装袋中，由实验室专人统一处理。

### 2.4 血清 ALT、AST 及 LDH 浓度测定

待模型建立完毕、取完标本，将上述低温保存的用于 ALT、AST 及 LDH 检测的所有血清标本统一送至石河子大学医学院第一附属医院检验科，由专人利用全自动生化分析仪检测血清中 ALT、AST 及 LDH 浓度。

### 2.5 血清 TNF- $\alpha$ 浓度测定

本研究采用 ELISA 法检测血清中 TNF- $\alpha$  浓度。ELISA 结合了抗原抗体反应的特异性、酶对底物催化的高效性以及底物的显色反应，能对血清等标本中的目标物质进行比较精确的定性及定量检测。主要包括双抗夹心法、间接法、双位点一步法及竞争结合法等。本研究采用的是双抗体夹心法检测血清 TNF- $\alpha$  浓度。其原理为先将已知抗体（大鼠 TNF- $\alpha$  单克隆抗体）连接在固相载体上，让所加入的待测抗原 TNF- $\alpha$  被 TNF- $\alpha$  单克隆抗体捕获而与之结合，通过洗涤以去除未被捕获或结合不牢固的抗原。被捕获的抗原 TNF- $\alpha$  再与生物素化的 TNF- $\alpha$  二抗结合，通过洗涤去除多余的或结合不牢固的二抗，生物素再与加入的亲和链酶素-HRP（经辣根过氧化物（HRP）标记的亲和素（链酶素））结合，通过洗涤去除多余的或结合不牢固的亲和链酶素-HRP，亲和链酶素-HRP 与最后加入的 A、B 两种底物反应，形成有色产物，有色产物形成量与待测抗原 TNF- $\alpha$  浓度呈正比。然后根据分光光度法进行定性和定量分析。具体步骤如下：

(1)标本准备：预先将冷冻的待检测血清样品从-80℃环境中取出放于室温下解冻溶解至常温。

(2)试剂的准备：将实验试剂盒从 2-8℃环境中取出，恢复至常温；将浓缩洗涤液按要求稀释至实验所需浓度，将所有试剂混匀，防止气泡产生，以避免使后续实验产生误差。

(3)大鼠 TNF- $\alpha$  标准品的稀释：取 6 支 1.5ml 离心管，做好浓度标记，分别是 640ng/L、320ng/L、160ng/L、80ng/L、40ng/L、0ng/L。分别吸取 120 $\mu$ l 的标准品稀释液于 6 个离心管中，取 120ng 的标准品原液加于第一个离心管中，漩涡混匀后吸取 120 $\mu$ l 加入第二个离心管中，漩涡混匀后吸取 120 $\mu$ l 加入第三个离心管中，依次稀释至第五个离心管。最后一个为 0 $\mu$ l 的离心管不含标准品，作为空白对照组。

(4)加样及二抗：按每孔 50 $\mu$ l 往已包被了大鼠 TNF- $\alpha$  单克隆抗体的酶标板中加入稀释好的标准品及各个待测标本。依次加入五个浓度的标准品（按梯度加样并做好标记）、空白对照样及各个待测样品。（空白对照及五个浓度的标准品均做复孔。）然后立即加入 10 $\mu$ l 生物素标记的二抗。

(5)加完后反复轻轻拍打酶标板混匀，用盖板膜小心盖好密封酶标板，37℃恒温箱中

孵育 1 小时。

(6)孵育结束后小心去除盖板膜并甩去孔内液体，将所有孔加满洗涤缓冲液，轻轻震荡 30s，甩去孔内液，将整个酶标板倒置在清洁的吸水纸上以吸去残余液体。重复此操作 3 次。

(7)按每孔 50 $\mu$ l 加入亲和链酶素-HRP，小心震荡使其混匀，盖好盖板膜，放于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 30min。

(8)孵育结束后小心去除盖板膜并甩去孔内液体，将所有孔加满洗涤缓冲液，余步骤同“(6)”。

(9)每孔加入 A、B 两种底物各 50 $\mu$ l，小心震荡使其混匀，盖好盖板膜，将其放于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中孵育 10min。(注：由于底物 B 对光敏感，此步操作需避免光照。)

(10)取出酶标本，揭取盖板膜，按每孔 50 $\mu$ l 迅速加入终止液终止反应。

(11)用分光光度法检测各孔 OD 值 (450nm)。

(12)结果判断：利用相关软件绘制“吸光度-标准品浓度”坐标曲线，然后在曲线上找到各个样品的 OD 值结果，计算出标本中 TNF- $\alpha$  浓度。

## 2.6 肝脏标本的蜡块制作及切片

(1)固定：将切取的肝脏标本（厚约 0.5cm）置于长条孔形石蜡包埋盒中（每个包埋盒盛一个肝脏标本，并按模型分组及编号做好标记），然后将包埋盒放于盛有 10%福尔马林溶液的容器中固定 24 小时（福尔马林溶液充足，容器加盖密封）。

(2)脱水：将盛有肝脏标本的石蜡包埋盒从福尔马林溶液中取出，放入由低到高不同浓度梯度的乙醇溶液中脱水，每级 20 分钟，脱水过程中保持容器密封，以免吸收空气中的水分。乙醇浓度依次为 70%乙醇 $\rightarrow$ 80%乙醇 $\rightarrow$ 95%乙醇 $\rightarrow$ 无水乙醇 I  $\rightarrow$ 无水乙醇 II。

(3)透明：将经过充分脱水的肝脏标本（包埋盒）置于透明剂二甲苯中，使二甲苯替换出标本中的乙醇，起到透明作用。具体为：二甲苯 I 级 30 分钟 $\rightarrow$ 二甲苯 II 级 10 分钟 $\rightarrow$ 二甲苯 III 级 10 分钟（更换透明剂时应动作迅速）。

(4)浸蜡：浸蜡过程在 55-60 $^{\circ}$ C 的恒温箱中进行（使石蜡保持液态），标本通过浸蜡去除标本中的二甲苯，使石蜡充分渗入标本中达到饱和状态，以便于包埋。具体为：石蜡 I 2 小时 $\rightarrow$ 石蜡 II 2 小时。

(5)包埋：将石蜡包埋底模置于约 50 $^{\circ}$ C 的保温台上，倒入液态石蜡，并迅速将已经浸透石蜡的肝脏标本从包埋盒中取出平整放入其中，然后再压上包埋盒，补充石蜡，放置于冷冻台上，待冷却凝固后取出并修整蜡块，去除多余的石蜡。(6)切片：调整切片机，使切下的标本石蜡膜片厚度为 3~4  $\mu$ m，用毛笔将膜片取下平放于温水面（水温 50 $^{\circ}$ C 左右，过高会导致组织散开，过低会导致皱摺无法摊平），然后用防脱载玻片（载玻片按照动物模型分组及编号做好标记）从水面平整取出标本石蜡膜，使其固定于载玻片的适当位置。将片子放于切片架上晾干，然后将切片架放入 60 $^{\circ}$ C 左右的恒温箱中烘烤 4 小时左右。

## 2.7 HE 染色及病理学观察

HE 染色，即苏木精-红染色，就是使细胞中具有一定酸碱度各个结构、部位与相应的显色剂发生酸碱综合反应而呈现不同颜色，以检测组织的病理学变化。具体如下：

(1)脱蜡、水化：石蜡能溶于二甲苯，二甲苯又能溶于酒精，故选用二甲苯脱蜡后再以由高到低不同浓度梯度的乙醇溶液去除二甲苯，最后以蒸馏水水洗切片标本。

(2)染色：以苏木精液染色 15 分钟，流动自来水冲洗 15 分钟，使切片变成蓝色。

(3)分化和漂洗、蓝化：经过第“(2)”步，会有过多的染液滞留于标本的组织细胞中，对于未结合的部分，可以直接以水洗去；对于胞浆、胞核中已吸附的部分则需要以分化液脱去，以保证染色质量，便于后续实验及结果的判断。分化之后再用水洗去多余的分化液而终止分化，然后用自来水使被苏木素染上的细胞核呈蓝色，即泛蓝。本实验中是将切片放入 1%盐酸酒精分化 3-5 秒，再以流动自来水冲洗以恢复蓝色。(1%盐酸酒精)

(4)脱水 I、复染：50%乙醇 3-5 分钟→70%乙醇 3-5 分钟→80%乙醇 3-5 分钟→0.5%酒精伊红溶液染色 2-3 分钟。

(5)脱水 II、透明：依次以 95%乙醇及无水乙醇脱水（各 3 分钟）后用吸水纸吸干乙醇，然后以二甲苯透明（5 分钟×2 次）。

(6)封片：为了能长期保存，选用中性树胶封片，直接在载玻片的标本上滴加一滴封片液（滴加时要避免气泡的产生）。

(7)结果评判：读片时首先肉眼观察片子的一般情况，标本是否完整，有无脱片，染色是否均匀等。将片子放到光镜的低倍镜（4×10 倍）下，观察肝脏组织有无病变，找准病变位置，然后再转到 10×10 或 20×10 倍镜下仔细观察病理改变，选择典型的病变部位拍片。

## 2.8 细胞凋亡检测

在细胞凋亡中染色体中的DNA发生不同程度的裂解，当其双链中的一条或两条出现缺口时，其断端露出3′-OH末端。然而正常细胞由于几乎没有DNA断裂，因而没有DNA3′-OH端形成，故可通过标记DNA 3′-OH末端来检测凋亡肝细胞。本研究中运用TUNEL法通过对“DNA 3′-OH末端”的检测来间接检测大鼠HIRI模型的肝脏组织细胞凋亡，比较准确地反映了其细胞凋亡的情况，具体步骤如下：

(1)脱蜡：将石蜡组织切片放入 60℃的烤箱中烘烤 1 小时，再放入二甲苯中浸泡 5 分钟×3 次。

(2)水化：无水乙醇 5 分钟→无水乙醇 5 分钟→90%乙醇 3 分钟→80%乙醇 3 分钟→70%乙醇 3 分钟→50%乙醇 3 分钟。

(3)浸洗：配制磷酸缓冲盐溶液（phosphate buffer saline, PBS），并用 PBS 漂洗标本 2 次，每次 5 分钟。浸洗完成后用滤纸小心清除玻片上标本周围多余的液体，以免影响下一步实验。

(4)组织细胞通透：以蛋白酶 K 溶液消化掉肝脏组织标本中的非目标蛋白，从而起到通透作用，具体如下：

a: 将 10 mM Tris 溶液 (pH8.0) 与 1mg/ml 的蛋白酶 K 溶液按 49:1 的比例混合, 以使蛋白酶 K 的最终浓度被稀释为 20 $\mu$ g/ml。

b: 每个样本上滴加配制好的蛋白酶 K 溶液约 100 $\mu$ L, 完全覆盖样本, 在 25 $^{\circ}$ C 环境中孵育 20 分钟左右 (具体时间长短还应该结合标本的厚度)。

(5)PBS 漂洗 5 分钟 $\times$ 2 次。

(6)DEPC 水浸洗 30 分钟。

(7)PBS 浸洗 5 分钟 $\times$ 3 次。

(8)擦干玻片, 加 50 $\mu$ l TUNEL 反应混合液于标本上, 加盖玻片, 37 $^{\circ}$ C 温箱中保存 1h 后取出回复至常温。

(9)PBS 浸洗 5 分钟 $\times$ 3 次。

(10)擦干玻片, 滴加 POD 液于标本上, 放入湿盒中, 于 37 $^{\circ}$ C 温箱中 30 分钟。

(11)以 PBS 浸洗标本 3 次, 每次 5 分钟。

(12)常规 DAB 呈色(组织切片上滴加新鲜配制的 0.05%DAB 溶液, 常温显色 5 分钟), 自来水冲洗。

(13)以苏木素复染 3min $\times$ 1 次后, 再以自来水冲洗 3 次, 泛蓝 3 分钟。

(14)梯度酒精 (70% $\rightarrow$ 80% $\rightarrow$ 90% $\rightarrow$ 100%) 脱水, 每级 5 分钟。

(15)二甲苯透明 5 分钟 $\times$ 2 次。

(16)在载玻片的标本上滴加一滴中性树胶封片, 滴加时要避免气泡的产生。

(17)结果评判: 将制作完成的片子先以肉眼观察其一般情况, 检查片子是否有脱片, 染色是否均匀等。然后将片子放于光学显微镜下, 以 20 $\times$ 10 倍视野观察其细胞凋亡的大致情况, 以细胞核呈棕褐色为阳性细胞。然后切换到高倍镜(40 $\times$ 10 倍), 随机取 5 个不重叠的视野, 分别记录每个视野中阳性细胞数及细胞总数, 计算每个视野的凋亡指数 (凋亡细胞数 / 细胞数总数 $\times$ 100%), 求出五个视野的平均凋亡指数, 做好记录。

## 2.9 血红素氧合酶-1 的检测

本研究中利用免疫组化技术测定大鼠肝脏组织中 HO-1 的表达, 即将抗原抗体的特异性反应与显色反应结合起来检测组织细胞内目标抗原 (HO-1) 的表达。

HO-1 的表达定位于细胞浆, 经免疫组化技术处理后呈棕褐色。最后根据标本染色面积及染色程度综合评价 HO-1 的表达。

具体步骤如下:

(1)脱蜡: 将石蜡组织切片放入 60 $^{\circ}$ C 的烤箱中烘烤 30 分钟, 再放入二甲苯中浸泡 5 分钟 $\times$ 3 次。

(2)水化: 无水乙醇 5 分钟 $\rightarrow$ 无水乙醇 5 分钟 $\rightarrow$ 90%乙醇 3 分钟 $\rightarrow$ 80%乙醇 3 分钟 $\rightarrow$ 70%乙醇 3 分钟 $\rightarrow$ 50%乙醇 3 分钟。

(3)灭活内源性过氧化氢酶: 大鼠肝脏组织的内源性过氧化氢酶会在 DAB 底物的显色时, 与 HRP 一样催化底物, 使之显色, 影响实验结果。因此, 实验中必须对其进行灭活。灭活方法为: 以 3% $H_2O_2$  溶液室温孵育标本 10 分钟左右 (孵育时间过长易引起脱片)。

(注：过氧化氢液的要现用现配，配好后于 4℃ 避光环境中临时保存。)

(4)以蒸馏水冲洗，PBS 浸泡 5 分钟×2 次。

(5)修复抗原：由于大鼠肝脏组织中的目标抗原在甲醛固定的过程中发生了蛋白之间的交联，以及甲醛的封闭作用使其失去或者减弱了其抗原性，从而使实验结果中出现目标蛋白表达的假性减弱或假阴性。通过修复抗原，可以使得抗原决定簇重新暴露。修复方法为：枸橼酸盐溶液 (PH=6)，微波 350W，10 分钟。

(6)封闭：在大鼠肝脏组织中非目标蛋白的某些位点能和一抗发生非特异性结合，造成后续实验的假阳性，故研究中以正常山羊血清能先和组织中有交叉反应的位点结合，从而防止因此而造成的假阳性。

(7)滴加一抗工作液于 4℃ 环境中孵育过夜。

(8)PBS 小心冲洗 5 次，每次 5 分钟。

(9)滴加适量生物素标记的二抗工作液，然后将标本放于 37℃ 环境孵育 30 分钟。

(10)PBS 小心冲洗 3 次，每次 5 分钟。

(11)DAB 显色：DAB 主要成分为：Reagent A 100ml，Reagent B 3 ml。

具体显色方法如下：

①加入 1 毫升 Reagent A 和 50ul 左右的 Reagent B 到 1.5 毫升离心管，充分混匀即为显色的工作液；

②小心滴加上述显色工作液于片子上，使其铺满整个切片标本表面，于室温下孵育 10 分钟左右，直至标本出现棕褐色；

③用清洁滤纸小心移去切片上的显色工作液。

(注：因 DAB 具有致癌作用，故在配制及使用时应小心操作，避免沾染到皮肤或者衣物上。)

(12)以 PBS 缓冲液浸洗 3 次，每次 5 分钟，然后小心移去切片标本上的 PBS。

(13)复染：苏木素复染 2 分钟，然后直接以自来水洗 2 次，每次 5 分钟。

(14)脱水：梯度酒精 (70%→80%→90%→100%) 脱水，每级 5 分钟。

(15)透明：二甲苯透明 5 分钟×2 次。

(16)封片：为了能长期保存，选用中性树胶封片。直接在载玻片的标本上滴加一滴封片液，滴加时要避免气泡的产生。

(19)结果评判：取制作完成的片子，先肉眼判断标本染色的一般情况，然后放于光学显微镜下进一步读片。镜下可见 HO-1 的表达呈现棕褐色颗粒，定位于细胞浆。综合细胞的染色强度和阳性细胞所占百分比作为评价标准：①染色强度：无着色为 0 分，浅棕色为 1 分，棕色为 2 分，深棕色为 3 分；②阳性细胞所占百分比，将结果分为：无着色为 0 分，阳性表达细胞数 < 10% 为 1 分，10%~50% 为 2 分，> 50% 为 3 分。以染色强度评分与阳性细胞百分比评分的乘积得分作为 HO-1 的最终评分。

## 2.10 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件，计量资料均以  $(\bar{x} \pm s)$  表示，两组间比较采用  $q$  检验，

多组间比较采用方差分析，以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结果

### (Result)

#### 1. 血清 ALT、AST、LDH 及 TNF- $\alpha$ 浓度

##### 1.1 血清 ALT 浓度

与 S 组相比, IR 组、Dex 组、IP 组及 Dex+IP 组明显增高 ( $P<0.01$ ); 与 IR 组相比, Dex、IP 及 Dex+IP 组明显降低 ( $P<0.01$ ); Dex+IP 组明显低于 Dex 组及 IP 组 ( $P<0.01$ ); 而 IP 组与 Dex 组无明显差异 ( $P>0.05$ )。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 ALT 浓度 ( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

Tab.1 Serum concentration of ALT in every group

分组	例数	ALT (U/L)
S 组	12	60.08 $\pm$ 5.93
IR 组	12	533.25 $\pm$ 23.34
Dex 组	12	396.41 $\pm$ 14.84 <sup>a</sup>
IP 组	12	400.25 $\pm$ 15.31 <sup>b</sup>
Dex+IP 组	12	250.08 $\pm$ 10.18
<i>F</i>		1592.68 <sup>**</sup>

<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ; 各组间两两比较除 ab $P>0.05$ , 其余均为  $P<0.01$

##### 1.2 血清 AST 浓度

与 S 组相比, IR 组、Dex 组、IP 组及 Dex+IP 组明显增高 ( $P<0.01$ ); 与 IR 组相比, Dex、IP 及 Dex+IP 组明显降低 ( $P<0.01$ ); Dex+IP 组明显低于 Dex 组及 IP 组 ( $P<0.01$ ); 而 IP 组与 Dex 组无明显差异 ( $P>0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠血清 AST 浓度 ( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

Tab.2 Serum concentration of AST in every group

分组	例数	AST (U/L)
S 组	12	150.33 $\pm$ 8.24
IR 组	12	1269.41 $\pm$ 36.43
Dex 组	12	800.00 $\pm$ 14.93 <sup>a</sup>
IP 组	12	799.83 $\pm$ 16.27 <sup>b</sup>
Dex+IP 组	12	446.58 $\pm$ 9.30
<i>F</i>		7550.14 <sup>**</sup>

<sup>\*\*</sup> $P<0.01$ ; 各组间两两比较除 ab $P>0.05$ , 其余均为  $P<0.01$

##### 1.3 血清 LDH 浓度

与 S 组相比, IR 组、Dex 组、IP 组及 Dex+IP 组明显增高 ( $P<0.01$ ); 与 IR 组相比, Dex、IP 及 Dex+IP 组明显降低 ( $P<0.01$ ); Dex 组明显低于 IP 组 ( $P<0.01$ ); Dex+IP 组明显低与 Dex 及 IP 组 ( $P<0.01$ )。见表 3。

表 3 各组大鼠血清 LDH 浓度 (n=12,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab.3 Serum concentration of LDH in every group

分组	例数	LDH (U/L)
S 组	12	799.25 ± 14.56
IR 组	12	3500.83 ± 50.22
Dex 组	12	1220.75 ± 31.56
IP 组	12	1571.41 ± 32.71
Dex+IP 组	12	898.91 ± 19.37
F		14151.11**

\*\* $P < 0.01$ , 各组间两两比较  $P < 0.01$ 

#### 1.4 血清 TNF- $\alpha$ 浓度

与 S 组相比, IR 组、Dex 组、IP 组及 Dex+IP 组明显增高 ( $P < 0.01$ ); 与 IR 组相比, Dex、IP 及 Dex+IP 组明显降低 ( $P < 0.01$ ); Dex+IP 组明显低于 Dex 组及 IP 组 ( $P < 0.01$ ); 而 IP 组与 Dex 组无明显差异 ( $P > 0.05$ )。见表 4。

表 4 各组大鼠血清 TNF- $\alpha$  浓度 (n=12,  $\bar{x} \pm s$ )Tab.4 Serum concentration of TNF- $\alpha$  in every group

分组	例数	TNF- $\alpha$ (ng/L)
S 组	12	17.04 ± 2.57
IR 组	12	58.28 ± 5.56
Dex 组	12	35.70 ± 4.43 <sup>a</sup>
IP 组	12	36.41 ± 5.19 <sup>b</sup>
Dex+IP 组	12	28.05 ± 4.53
F		131.29**

\*\* $P < 0.01$ ; 各组间两两比较除 ab $P > 0.05$ , 其余均为  $P < 0.01$ 

## 2. 肝脏组织病理学改变

光镜下观察, S 组肝小叶结构及肝窦内皮细胞均正常, 肝窦畅通, 肝细胞形态正常, 间质未见炎性细胞浸润。

IR 组肝小叶结构紊乱, 肝细胞明显水肿及空泡样变性, 部分肝细胞坏死, 细胞质降解明显, 核仁缩小凝集, 大量炎性细胞浸润, 肝窦严重淤血、狭窄。见图 1-IR。

Dex 组肝小叶结构尚可, 肝细胞轻度水肿变性, 肝血窦内轻度瘀血, 但仍然保持基本畅通, 个别细胞坏死。见图 1-Dex。

IP 组可见轻度肝细胞变性, 肝血窦内轻度瘀血, 个别细胞坏死。见图 1-IP。

Dex+IP 组肝小叶结构基本正常, 肝窦畅通, 偶见少量淤血, 肝细胞轻微水肿, 未见明显的肝细胞坏死, 偶可见轻度变性, 仅有少量炎性细胞浸润。见图 1-Dex+IP。

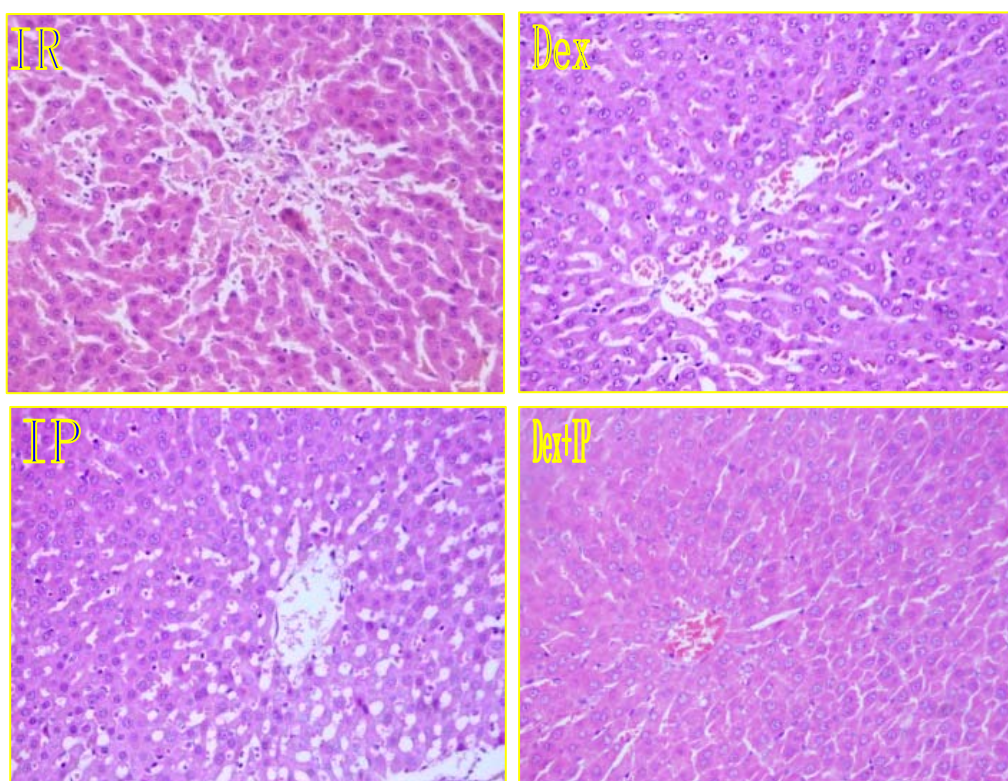
HIRI 的病理评分参照 Suzuki 病理学评分标准<sup>[5]</sup>, 即根据肝窦充血情况、肝细胞质空泡形成程度及肝细胞坏死的多少将肝脏损伤从轻到重分为五个等级, 分别为 0-4 分: 肝窦无充血、肝细胞质无空泡形成且无肝细胞坏死评为 0 分; 肝窦极少量充血、肝细胞质空泡化极轻且肝细胞仅仅出现个别坏死评为 1 分; 肝窦轻度充血、肝细胞质轻度空泡化且肝细胞坏死少于 30% 评为 2 分; 肝窦中度充血、肝细胞质中度空泡化且肝细胞坏死少

于 60% 评为 3 分；肝窦严重充血、肝细胞质严重空泡化且肝细胞坏死多于 60% 评为 4 分。本研究中，每个切片标本根据肝窦充血、肝细胞质空泡化及肝细胞坏死情况分别评分，然后求出平均值作为其最终病理评分。与 S 组相比，IR 组、Dex 组、IP 组及 Dex+IP 组病理评分明显增高 ( $P < 0.01$ )；与 IR 组相比，Dex 组、IP 组及 Dex+IP 评分明显降低 ( $P < 0.01$ )；Dex+IP 组明显低于 Dex 组及 IP 组 ( $P < 0.01$ )，而 Dex 组与 IP 组之间无明显差异 ( $P > 0.05$ )。表 5，图 1。

表 5 各组间肝脏组织病理学评分 ( $n=12, \bar{x} \pm s$ )  
Tab.5 Liver histopathological score in every group

分组	例数	病理评分 (分)
S 组	12	0.27±0.21
IR 组	12	2.90±0.2
Dex 组	12	1.63±0.21 <sup>a</sup>
IP 组	12	1.67±0.18 <sup>b</sup>
Dex+IP 组	12	0.68±0.22
<i>F</i>		273.34 <sup>**</sup>

\*\*  $P < 0.01$ ；各组间两两比较除 ab $P > 0.05$ ，其余均为  $P < 0.01$



IR 组可见部分细胞坏死，细胞变性严重；Dex 及 IP 组肝窦轻度充血，细胞轻度变性，少数细胞坏死；Dex+IP 组细胞仅轻微水肿，个别坏死。

图 1 各组肝脏组织病理学改变 (HE×200 倍)

Fig. 1 Liver histopathological change in every group

### 3. 肝脏细胞凋亡检测

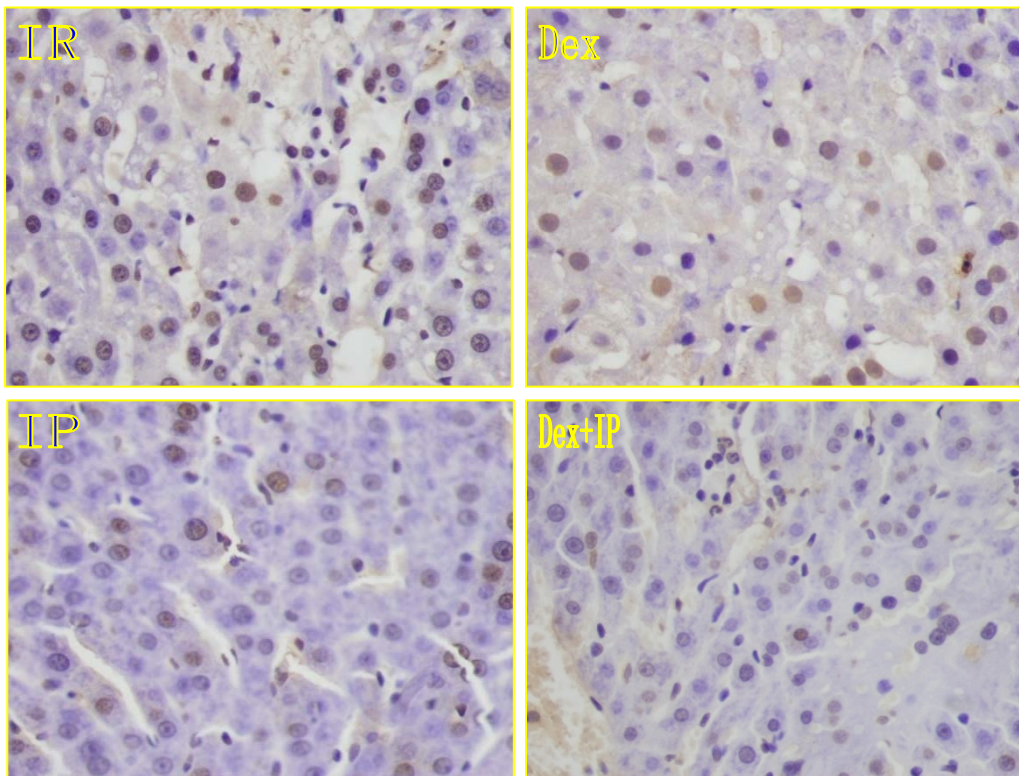
根据 TUNEL 检测法, 比较各组间肝细胞凋亡指数。与 S 组相比, 其余各组肝细胞凋亡指数均明显增高 ( $P < 0.01$ ); 与 IR 组相比, Dex 组、IP 组及 Dex+IP 凋亡指数均明显降低 ( $P < 0.01$ ); Dex+IP 组明显低于 Dex 组及 IP 组 ( $P < 0.01$ ), 而 Dex 组与 IP 组之间无明显差异 ( $P > 0.05$ )。见表 6, 图 2。

表 6 各组间肝脏组织细胞凋亡指数( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

Tab.6 Liver apoptosis index in every group

分组	例数	细胞凋亡指数(%)
S 组	12	6.30 ± 0.59
IR 组	12	38.01 ± 1.29
Dex 组	12	14.46 ± 0.83 <sup>a</sup>
IP 组	12	15.79 ± 0.54 <sup>b</sup>
Dex+IP 组	12	9.06 ± 0.74
<i>F</i>		2696.18 <sup>**</sup>

\*\*  $P < 0.01$ ; 各组间两两比较除 ab $P > 0.05$ , 其余均为  $P < 0.01$



IR 组可见部分细胞凋亡; Dex 及 IP 组可见小部分细胞凋亡;  
Dex+IP 组仅见个别细胞凋亡。

图 2 各组间肝脏组织细胞凋亡 (TUNEL × 400 倍)

Fig. 2 Liver apoptosis index in every group

#### 4. 肝脏组织 HO-1 的表达

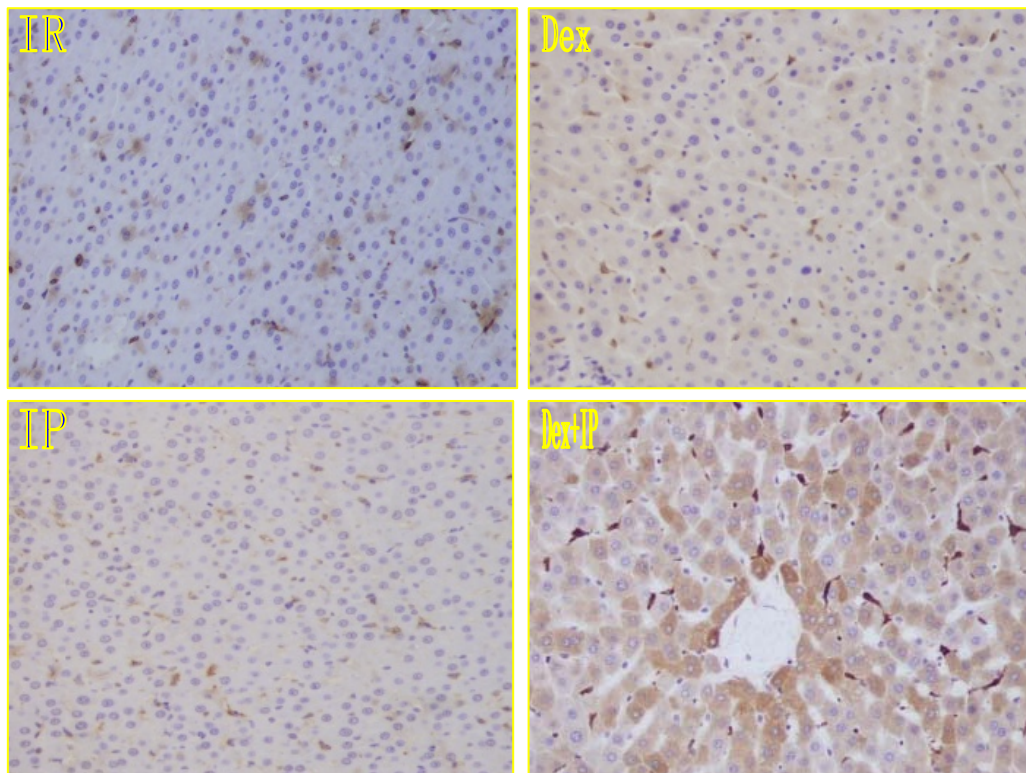
S 组、IR 组、Dex 组、IP 组及 Dex+IP 组 HO-1 评分分别为(1.08±0.90)分、(2.92±1.44)分、(4.58±1.88)分、(4.50±2.02)分、(6.33±2.31)分。与 S 组相比, IR 组评分增高 ( $P < 0.05$ ), Dex 组、IP 组及 Dex+IP 组明显增高 ( $P < 0.01$ ); 与 IR 组相比, Dex 组及 IP 组增高 ( $P < 0.05$ ), Dex+IP 组明显增高 ( $P < 0.01$ ); Dex+IP 组高于 Dex 组及 IP 组 ( $P < 0.05$ ); Dex 组与 IP 组之间无明显差异 ( $P > 0.05$ )。见表 7, 图 3。

表 7 各组间肝脏组织 HO-1 表达评分(n=12,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab.7 Eexpression score of HO-1 in every group

分组	例数	HO-1 评分 (分)
S 组	12	1.08±0.90 <sup>a</sup>
IR 组	12	2.92±1.44 <sup>b</sup>
Dex 组	12	4.58±1.88 <sup>c</sup>
IP 组	12	4.50±2.02 <sup>d</sup>
Dex+IP 组	12	6.33±2.31 <sup>e</sup>
<i>F</i>		14.80**

\*\* $P < 0.01$ , cd $P > 0.05$ ; ab、bc、bd、ce、de $P < 0.05$ ,ac、ad、ae、be $P < 0.01$ 。



HO-1 在 IR 组呈片状表达, 以浅棕色为主; 在 Dex 组及 IP 组呈广泛性表达, 以浅棕色及棕色为主; 在 Dex+IP 组呈广泛性表达, 以深棕色为主。

图 3 各组间肝脏组织 HO-1 表达 (免疫组化×200 倍)

Fig. 3 Eexpression score of HO-1 in every group

## 讨论 (Discussion)

HIRI是指各种原因引起肝脏的部分或全部组织灌注不足,当恢复血液灌注后,不但不能减轻其缺血期所出现的结构损伤及功能障碍,反而使其进一步加重的病理生理改变。

肝脏部分切除术和肝脏移植术已经成为终末期肝病和肝癌的唯一有效治疗手段,另外各种交通工具日益增多使得肝脏创伤的发生率居高不下,以及各种原因导致的重度休克时有发生。这些都会使HIRI的发生成为一个不可避免的问题。肝脏是人体最大的实质性器官,血液供应非常丰富,成人肝每分钟血流量有1500-2000ml,其血容量相当于人体总量的14%。肝脏对缺血缺氧十分敏感,在肝脏因手术等原因阻断入肝血流后,由于氧气供应减少,导致葡萄糖有氧氧化减少、无氧代谢增加,乳酸堆积,引起代谢性酸中毒;氧自由基的增多,使质膜及细胞器膜中的脂肪酸发生过氧化而导致膜结构遭到破坏;能源物质供应不足,ATP生成减少,使 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ 泵及 $\text{Ca}^{2+}$ 泵等依赖ATP的细胞内外离子跨膜转运减少, $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 等离子从细胞外顺浓度梯度进入细胞内,导致细胞的肿胀或水肿,并发生钙超载,钾离子顺浓度梯度穿过细胞膜到达细胞外,进一步改变细胞内外的代谢环境,加重肝细胞损伤及功能。

但是,HIRI的形成不仅包含以上所述的肝脏缺血过程中的损伤,更重要的是肝脏恢复血流灌注后产生的一系列损伤。肝脏对缺血再灌注损伤十分敏感,其机制错综复杂,诸多因素共同作用,形成相互促进、共同作用的关系,主要包括以下方面:

(1) 氧自由基的损伤。氧自由基是带有不成对电子的活性氧,其氧化活性强、极易发生反应,可以通过夺取电子使其它物质发生氧化反应而遭到破坏。氧自由基普遍存在于生物体中,有超氧化物自由基、过氧化氢及氢氧根离子等多种类型,主要来源于Kupffer细胞、中性粒细胞<sup>[6]</sup>和黄嘌呤氧化酶等。然而,机体内同时存在着产生氧自由基的氧化体系及氧自由基清除与抗氧化体系,且正常情况下二者保持动态平衡。体内氧自由基清除剂种类繁多,主要包括酶性自由基清除剂,如超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等;低分子自由基清除剂,如谷胱甘肽及维生素C(抗坏血酸)等;含巯基化合物,如6-巯基嘌呤甘氨酸(MPG);别嘌呤醇等。SOD能催化生物体内具有细胞毒性的超氧自由基发生歧化反应从而将其清除,具有重要的细胞保护作用。GSH-Px可通过催化GSH与 $\text{H}_2\text{O}_2$ 的氧化还原反应,从而减轻因超氧化阴离子引发的细胞内外脂质过氧化所导致的组织细胞损坏;催化过氧化脂质(LPO)的分解,减少LPO的生成,降低LPO对组织细胞造成的损害。别嘌呤醇也具有重要的抗氧化作用,能通过抑制黄嘌呤氧化酶参与的黄嘌呤氧化代谢及次黄嘌呤氧化酶参与的次黄嘌呤氧化代谢,降低氧化应激。生理状况下,体内仅有少量氧自由基的产生,且其可通过氧化物酶等作用而还原为水和分子氧。二者维持动态平衡,能有效防止氧自由基过多而对组织细胞造成破坏。当机体处于病理状态时,氧自由基大量产生或不能被及时清除,二者

的平衡遭到破坏,引起氧化应激,过多的氧自由基就会和周围组织细胞及大分子物质发生反应,破坏生物膜结构,同时DNA、RNA也发生改变,胶原蛋白发生变性,导致组织细胞发生多种病理性改变,从而促使疾病或损伤进一步加重。大量研究表明,氧自由基增多、氧化应激及脂质过氧化在HIRI的发生发展占有重要地位。在肝脏的缺血再灌注中,因组织缺血缺氧,不能进行正常的有氧氧化,导致能量不足,ATP合成减少。然而钙泵作用的发挥需要消耗ATP,故当ATP合成减少时,钙泵活性降低,细胞内的钙不能及时到达细胞外。而且细胞膜因脂质过氧化而被破坏导致其通透性改变,使 $\text{Ca}^{2+}$ 顺浓度梯度从细胞外进入细胞内,导致细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度升高,使得钙依赖性蛋白水解酶被激活,后者催化黄嘌呤脱氢酶(XDH)为黄嘌呤氧化酶(XO)。ATP通过一系列代谢,最终生成次黄嘌呤。当组织处于缺血状态下时,ATP合成减少,次黄嘌呤增多。当组织恢复灌注时,氧供应增加,通过XO的作用,次黄嘌呤与 $\text{O}_2$ 反应生成黄嘌呤、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和超氧阴离子。黄嘌呤再与 $\text{O}_2$ 反应生成尿酸、超氧阴离子和 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。另外,在脏器的缺血再灌注时还发生粒细胞性、线粒体性及儿茶酚胺性氧自由基增多。过多的氧自由基大量消耗抗氧化物质,而且在脏器缺血再灌注损伤时,由于缺氧及ATP耗竭,使得体内抗氧化物质合成减少,致使体内抗氧化系统活性大大减弱。所以当脏器发生缺血再灌注时,大量产生的氧自由基超过了体内氧自由基清除系统的处理能力,致使平衡系统遭到破坏而出现氧自由基堆积。过多的氧自由基可使质膜、线粒体膜等结构因脂质过氧化而遭到破坏,致使其流动性降低,而且膜受体、离子通道、膜转运体及膜蛋白酶等重要结构出现功能障碍,导致生物膜的通透性及酶活性发生改变;另外,过多的氧自由基还可分解细胞内透明质酸、破坏DNA链,损伤肝脏血管内皮细胞,引起粒细胞及血小板等在微血管中聚集,严重影响微循环,再次引起组织灌注不足。氧自由基除了在脏器的缺血再灌注损伤中占有重要地位外,其在休克、多脏器衰竭、ARDS及促衰老等方面都发挥着这重要的作用,故及时有效地清除体内过多的氧自由基十分重要。

(2) 钙超载的损伤作用。作为组织细胞重要的第二信使,细胞内自由钙浓度在调节许多细胞功能和维持结构稳定方面起着重要作用。正常情况下,肝细胞内外的浓度分别为 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 及 $1.3 \text{mmol/L}$ 左右,细胞外液远远高于细胞内液(约1万倍)。细胞内外的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度稳定平衡是通过跨细胞膜 $\text{Ca}^{2+}$ 转运( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换系统、 $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换系统、钙泵的主动转运以及膜对 $\text{Ca}^{2+}$ 的低通透性)和细胞内“钙库”摄取和释放 $\text{Ca}^{2+}$ 等作用来实现的,刚好满足组织细胞需要。细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的稳定对于细胞发挥正常的生理功能至关重要。在HIRI中,肝脏细胞因能量储备不足,而使依赖ATP的 $\text{Na}^+$ 泵及 $\text{Ca}^{2+}$ 泵等功能发生障碍,数量及活性下降,导致细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度升高;质膜结构破坏, $\text{Ca}^{2+}$ 通过被动扩散进入细胞内导致胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度进一步增高而最终引起钙超载。细胞内钙超载又进一步引起线粒体功能障碍,干扰线粒体氧化磷酸化;激活钙依赖性降解酶,从而使得磷脂双分子层结构中磷脂被水解,加重质膜的损害;促进活性氧生成,加重氧化应激;激活肝脏枯否(Kupffer)细胞,释放大量毒性介质而加重肝细胞损伤。

(3) 中性粒细胞的损伤作用。有研究表明组织在缺血再灌注中可见大量中性粒细胞

浸润、聚集<sup>[7]</sup>。中性粒细胞可导致大量氧自由基释放, 损害肝细胞; 产生多种毒性细胞因子, 损害肝细胞及细胞外基质; 还可与血管内皮细胞粘附并增加血管通透性, 加重循环障碍并导致组织水肿。

(4) 枯否细胞的损伤作用。当肝脏组织发生缺血再灌注时, 细胞内发生钙超载, 导致Kupffer易被活化。激活的Kupffer细胞可促进中性粒细胞释放氧自由基, 加重组织的损伤<sup>[8]</sup>; 阻碍中性粒细胞的流动, 加重肝窦的循环障碍; 产生大量肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、IL-6、IL-1以及血小板活化因子(PAF)等多种促炎因子并释放氧自由基, 导致肝细胞损伤。Kupffer细胞还会破坏Disse间隙内的糖蛋白, 使促使窦内皮细胞失去托附, 流入肝窦内, 进一步影响微循环功能, 降低组织灌注。

(5) 细胞因子、黏附分子及核因子的损伤作用。研究表明, 多种细胞因子参与HIRI的发生发展, 且各种因子之间相互作用产生放大效应。主要包括有TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-10等。研究表明TNF- $\alpha$ 、IL-1是在脏器缺血再灌注损伤的发生发展中作用最重要的细胞因子。IL-1主要是由活化的巨噬细胞产生, 不仅能上调多型核白细胞(PMN)释放氧自由基的能力, 还能促使Kupffer细胞产生TNF- $\alpha$ 。而TNF- $\alpha$ 在HIRI的发生发展中起着起始激发作用。研究表明TNF- $\alpha$ 能明显提高肝窦细胞与PMN的相互作用(可能与提高肝窦内皮细胞表面黏附分子表达有关), 并激活PMN释放氧自由基, 致使肝脏微循环受到影响而再次出现供血不足, 同时损害肝细胞。另外, TNF- $\alpha$ 还可直接导致肝窦内皮细胞的肿胀而致其损伤并出现功能障碍, 并与IL-1协同作用于内皮细胞, 诱导其合成纤维蛋白酶及凝血酶, 影响机体凝血功能, 加重HIRI, TNF- $\alpha$ 的活性与HIRI伤程度高度相关。另外, 有研究表明, 在肝脏的缺血再灌注中, 核因子KB(NF-KB)与其特异调节基因序列的结合活性增高, 激活的NF-KB能通过调控TNF- $\alpha$ 、IL-1等多种炎症介质和细胞因子的基因转录, 导致其相应的蛋白表达改变, 进而发挥相关作用(如炎症反应), 而且NF-KB的激活程度与肝组织损伤程度具有良好的相关性。

(6) 其他方面: 研究发现T淋巴细胞在HIRI早期发挥着重要作用; Bcl-2及P53 / P21等相关基因能诱导肝脏在缺血再灌注中的细胞凋亡。

总之, HIRI涉及多种不同机制, 而且各种机制相互影响, 共同作用。

HIRI是肝胆外科一个常见而棘手的问题, 是导致复杂的肝脏外科手术、肝脏移植后肝功能衰竭的重要原因<sup>[9]</sup>, 这严重限制了很多肝脏疾病的外科手术治疗, 直接影响疾病的转归及患者的预后, 并延长住院时间, 增加医疗费用。故如何减轻HIRI, 成为肝胆外科亟待解决的问题。目前, 通过大量学者的研究, 已有多种措施被证实具有减轻HIRI的作用, 主要包括缺血预处理和后处理、药物预处理及后处理、缺氧预处理及联合处理等多种方式, 其中药物处理因实施方便, 作用明显, 成为最主要的处理措施。

药物预处理是指利用相关药物及其代谢产物的生理作用来增强组织细胞对缺血再灌注的耐受性。通过对HIRI机制的了解及相关实验的证实, 具有减轻HIRI作用的药物主要包括氧自由基清除剂、抗氧化剂、钙拮抗剂以及改善组织微循环、抑制有害细胞因子和增强细胞能量代谢的药物等。

右美托咪定是一种的高选择性  $\alpha_2$ AR 激动剂，其对  $\alpha_2$ AR 的选择亲和性明显强于传统的  $\alpha_2$ AR 激动剂。 $\alpha_2$ AR 为 G 蛋白耦联受体，分布于全身多种脏器及组织细胞。右美托咪定通过与  $\alpha_2$ AR 结合而介导一系列与抑制内源性儿茶酚胺释放相关的功能及效应<sup>[10]</sup>，具有镇静、镇痛、催眠、抗焦虑、抑制交感神经以及稳定血流动力学等功能<sup>[11]</sup>，且无呼吸抑制的副作用。Dex 分布半衰期为 6 分钟，消除半衰期为 2 小时<sup>[12]</sup>，临床上主要用于阵痛（中度阵痛作用）、辅助麻醉（能有效抑制围麻醉期的应激反应，改善患者血流动力学，且被认为是目前拔管管理最理想的药物之一）以及重症监护病房的镇静作用。

新近研究表明右美托咪定具有良好的脏器保护作用。在心脏的缺血再灌注中，右美托咪定干预可以提高心肌 ATP 酶活性，从而提高  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  泵和  $\text{Ca}^{2+}$  泵活性，减轻细胞  $\text{Ca}^{2+}$  超载，降低心肌梗死率<sup>[13]</sup>，还能降低心肌组织细胞丙二醛（MDA）活性，提高 SOD 活性，改善血流动力学，减轻心功能改变，降低心律失常发生率及心律失常评分，减轻心肌病理损害，降低心肌酶 CK 及 LDH 的血清浓度<sup>[14]</sup>。通过对重症患者的临床研究试验也表明表明右美托咪定可以降低 IL-6 和 TNF- $\alpha$  等炎症因子的水平，减少炎症细胞因子的产生及中性粒细胞的浸润<sup>[15]</sup>，维持重症患者血流动力学稳定，提高缺血区与非缺血区的血流比例，显著减少拔管期及围手术期的心肌缺血及心梗的发生。右美托咪定通过抑制抗利尿激素分泌，提高肾血流量和肾小球滤过，并增加尿量<sup>[16]</sup>，显著改善肾缺血再灌注损伤<sup>[17-18]</sup>。同时右美托咪定还能明显减轻肾缺血再灌注诱导的远隔脏器损伤，减少肺水肿和炎症反应，降低肺组织中髓过氧化物酶（MPO）活性和 ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  mRNA 的表达<sup>[19]</sup>。在海马缺血实验中，右美托咪定干预可以明显降低海马组织中 MDA 水平，提高 SOD 活性，降低血清 TNF- $\alpha$  浓度，减少海马组织细胞凋亡<sup>[20]</sup>。另外，右美托咪定明显降低皮瓣移植、肠道、骨骼肌、视网膜的缺血再灌注损伤<sup>[21-24]</sup>。Adnan Tüfek 等研究表明右美托咪定能降低肝缺血再灌注后血清、肝脏及远隔脏器中的氧化应激反应，降低肝缺血再灌注时的总氧化活性（TOA）和氧化应激指数（OSI），提高总抗氧化能力（TOC）和对氧磷酶-1（PON-1）的表达水平<sup>[25]</sup>。Taylan Şahin, MD 等研究表明右美托咪定可以提高肝缺血再灌注后组织中超氧化物歧化酶、过氧化氢酶及谷胱甘肽的水平，提高抗氧化能力<sup>[26]</sup>。细胞膜含有多不饱和脂肪酸，是脂质过氧化反应的重要目标，而血液对代谢变化比较敏感，故红细胞的细胞膜极易受到破坏而发生改变，脂质过氧化的产物影响其可塑变形性<sup>[27]</sup>。红细胞变形性是影响器官和组织灌注的重要因素<sup>[28]</sup>，当变形能力的降低时，红细胞不易通过微血管，从而导致微血管中血流减慢或堵塞，影响微循环而引起组织灌注不足，继而导致组织一系列的病变。然而，有研究<sup>[29]</sup>表明，Dex 能明显降低在肝脏缺血再灌注中发挥重要作用的 MDA 的血清浓度，提高 SOD 血清浓度，降低氧化应激及质膜脂质过氧化，减轻质膜损伤，提高红细胞的变形能力，改善了因红细胞变形性降低所引起的微循环障碍。以上分析表明，右美托咪定对脏器缺血再灌注损伤的保护作用可能涉及抑制炎症反应、降低氧化应激维持氧化与抗氧化的平衡、减轻  $\text{Ca}^{2+}$  超载及改善局部循环等方面，且各种因素之间相互影响，共同作用。

目前用于预防和减轻 HIRI 的药物种类繁多，但大多不能用于术中或者术中用药受到

严格限制,而右美托咪定本身就是一种辅助麻醉用药,还能对术中患者起到良好的镇静、镇痛及抗焦虑作用,既可提高麻醉效果、降低患者痛苦又可起到脏器保护作用,一举多得,是肝脏手术中的理想用药,具有广阔的临床前景。

IPC对脏器缺血再灌注损伤的抑制作用是Murry等<sup>[30]</sup>在心肌缺血过程中首次发现的。随后又陆续有研究证实,缺血预处理还对肝脏、肾脏、脑、肠、肺等多个脏器的缺血再灌注损伤都有保护作用,能使脏器对缺血再灌注产生预适应,增加缺血器官对长时间缺血再灌注的耐受力,但其机制错综复杂,尚处于研究阶段。新近研究表明IPC不但能够改善缺血再灌注引起肝脏功能改变,还能改善其血液循环,提高肝缺血再灌注后门静脉的血流量<sup>[31]</sup>,增加肝缺血再灌注后肝脏的微血管血流,改善肝微循环功能<sup>[32-35]</sup>,同时还有抗氧化及炎症抑制的作用。此外,还有研究证实预先给予IPC可明显减轻肝细胞分离过程中白蛋白功能损伤及降低LDH、ALT,提高肝细胞成活率和细胞增殖活性,其机制可能与诱导其抗氧化的能力,提高抗氧化活性及产生缺血性预适应,提高对缺血再灌注损伤耐受性有关相关。IPC对HIRI的抑制作用不但对于健康肝的整体移植和肝细胞移植效果明显,而且其对病理性肝组织的缺血再灌注损伤也有可观的效果。脂肪肝由于脂质含量增加,在缺血再灌注中更易受到氧自由基的攻击,使得脂肪肝对缺血再灌注的抵抗能力大大减弱。而IPC可以通过提高肝脏组织抗氧化能力,抑制氧自由基引起的脂质过氧化,并减少脂肪肝在缺血再灌注中炎性细胞的浸润,降低炎性因子,起到炎症抑制作用,从而增强脂肪肝对HIRI的耐受性。另外,研究还证实对于脂肪肝的缺血再灌注最佳的IPC时间为缺血5-8分钟后再灌注10分钟左右<sup>[36]</sup>。IPC对缺血再灌注的作用也可能是由于影响NO的表达,使通过NO通路介导的脂质过氧化作用衰减,减少中性粒细胞聚集,并改善肝脏微循环而发挥保护作用<sup>[37]</sup>。IPC不但对肝缺血再灌注后其本身有保护作用,而且对其所导致的肾、肺、肠等远隔脏器的损伤也有明显的保护作用。另外,临床研究发现,在进行肝脏移植术前,若供体肝经历过心肺骤停与成功的心肺复苏,其受体血清中ALT及AST浓度明显低于其他一般受体,这表明心跳呼吸停止后成功复苏能明显改善供肝的功能,提高对HIRI的耐受性,从而对供肝起到保护作用<sup>[38]</sup>,因为供体心跳呼吸停止使得肝脏停止血供,当复苏成功时血供得以恢复,相当于经历了一个短时间的缺血再灌注,这对于肝脏移植术经历的长时间缺血再灌注来说就类似于IPC的过程。

总之,关于IPC降低HIRI的机制错综复杂,目前认为主要与以下因素有关:降低肝脏组织过氧化物的含量,使氧自由基的产生减少,降低氧化应激反应;激活枯否细胞处理内毒素的能力,降低内毒素对组织的损伤;使Bcl-2表达上调,从而抑制细胞凋亡<sup>[39]</sup>;抑制白细胞、血小板聚集,改善血液循环以及诱导热休克蛋白70的表达等。

本研究通过建立大鼠的HIRI模型,以右美托咪定预处理及IPC进行干预,检测大鼠血清中ALT、AST、LDH及TNF- $\alpha$ 的浓度,观察肝脏组织病理学改变、细胞凋亡及HO-1的表达,探讨右美托咪定预处理及IPC对HIRI的作用及可能机制。

ALT和AST主要分布在肝脏的肝细胞内,当肝细胞受到损害时其血清浓度就会升高,且其血清活性的改变与肝脏的损伤程度高度相关,是目前应用最广、最有实用价值

的实验室检测肝功能指标之一。ALT主要存在于肝细胞浆内，其活性是循环内总活性的100000倍左右，肝细胞一旦出现损害，血清ALT活性便会明显增高，故血清ALT活性的变化可以灵敏地反映肝细胞损害程度<sup>[40]</sup>。AST是机体内另一种十分重要的转氨酶，是反映肝细胞坏死的标准，常和ALT结合起来反映肝功能的状况。LDH是一种在全身各种组织细胞普遍表达的糖酵解酶，其活性的变化对任何单一器官或组织细胞均无特异的，在本研究中对肝功的损害起辅助判断作用。本研究中，Dex及IP组血清ALT、AST、LDH浓度明显低于IR组，Dex+IP组明显低于Dex组及IP组，这表明右美托咪定预处理及IPC均能有效改善肝脏缺血再灌注所导致的肝功损害，且两者具有协同作用，联合应用效果更好。另外，Dex组LDH浓度明显低于IPC组，表明右美托咪定对脏器功能的保护有可能优于IPC。

大量研究表明，炎症反应是脏器缺血再灌注损伤发生的重要机制之一。TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-10等各种炎性因子通过体液运输、旁分泌、自分泌等方式发挥着激发、维持、加重炎症反应的作用，各种炎性因子不但可以独立发挥作用，更主要的是可以相互影响，呈网格状、瀑布式反应，在HIRI的发生发展中具有重要作用。研究表明TNF- $\alpha$ 是介导脏器缺血再灌注损伤最主要的细胞因子之一，在HIRI中具有激发作用，并且与损伤程度高度相关<sup>[41]</sup>。当肝脏发生缺血再灌注时，组织缺氧，而Kupffer cells等对缺血再灌注极为敏感。活化的Kupffer cell不但可以产生大量氧自由基，造成组织细胞损害，还能产生大量的TNF- $\alpha$ ，后者可通过刺激中性粒细胞，促使大量中性粒细胞在肝脏内浸润。中性粒细胞激活后产生大量的蛋白酶性因子及氧自由基，不但破坏了机体内的氧化-抗氧化系统的平衡，引起氧化应激，从而导致细胞结构和功能损伤，而且还可以激活肝脏组织内的中性粒细胞，分泌出大量的TNF- $\alpha$ 等炎性细胞因子，产生恶性循环。TNF- $\alpha$ 通过活化炎症细胞，致使大量炎性细胞聚集影响血流动力学，另外其产生的氧自由基破坏红细胞膜，致其可塑变形性下降，不易通过微小血管，引起肝窦狭窄闭塞，肝脏微循环障碍，肝细胞索、肝窦充血扩张，组织水肿，破坏肝小叶结构，致使肝细胞凋亡、坏死，导致肝脏结构及功能遭到严重破坏。有研究表明，敲除TNF- $\alpha$ 基因能明显减少小鼠HIRI中的细胞水肿及细胞的坏死，而且低剂量的TNF- $\alpha$ 预处理也能明显降低小鼠HIRI。本研究中，Dex组及IP组TNF- $\alpha$ 活性较S组明显下降，说明右美托咪定预处理及IPC均能有效抑制肝脏缺血再灌注中TNF- $\alpha$ 的表达，从而起到降低HIRI的作用。吴文峰等<sup>[42]</sup>研究也表明右美托咪定能明显减少肝脏缺血再灌注中TNF- $\alpha$ 等炎性因子的表达，降低HIRI，与本研究结果相符。另外，本研究中Dex+IP组TNF- $\alpha$ 血清浓度明显低于Dex组及IP组，说明两者在抑制TNF- $\alpha$ 活性方面更具有协同作用。Dex组与IP组之间TNF- $\alpha$ 活性未见明显差异，表明右美托咪定预处理及IPC在HIRI中对TNF- $\alpha$ 的抑制作用可能相当。

病理学改变是脏器组织损伤最直观的反应，本研究观察了大鼠肝脏组织病理学改变并进行病理学评分。评分结果为IR、Dex、IP及Dex+IP组明显高于S组，Dex、IP及Dex+IP组明显低于IR组，Dex+IP组明显低于Dex、IP组，Dex组与IP组之间未见明显差异。这表明右美托咪定预处理及IPC均能有效减轻肝脏缺血再灌注所导致的肝脏病理学损伤，两

者作用相当,且两者联用效果更佳。

肝脏的缺血再灌注所导致的细胞死亡包括细胞凋亡及细胞坏死,早期以坏死为主,随后细胞凋亡逐渐加重,虽然对于哪种作用在其中占主导地位目前尚无定论<sup>[43]</sup>,但是对于细胞凋亡在肝缺血再灌注损伤中重要作用是毋庸置疑的。细胞凋亡是组织细胞在特定的内源和外源信号诱导下,死亡途径被激活,是一种受基因控制的细胞主动自杀过程。生理性的凋亡有助于机体清除损伤细胞,它与细胞增殖共同维持着组织细胞群的稳定,具有重要的生理作用。凋亡也涉及从病理性炎症反应到肿瘤等一系列疾病的调控。细胞凋亡与HIRI有着密切的联系,在脏器缺血再灌注损伤中发挥着重要的作用<sup>[44]</sup>。在肝脏的缺血再灌注中,细胞凋亡所累及的主要是肝血管内皮细胞和肝细胞,其中前者对冷缺血再灌注损伤较敏感,而后者对热缺血再灌注损伤较敏感<sup>[45]</sup>。大量研究表明细胞凋亡与炎症反应在脏器缺血再灌注损伤的发生、发展中占据重要地位。同时,细胞凋亡也是衡量脏器损伤程度的重要指标。本研究中根据TUNEL检测结果,Dex及IP组细胞凋亡指数明显低于IR组,说明在大鼠的HIRI中右美托咪定预处理及IPC均能有效减少肝细胞凋亡。另外,Dex+IP组明显低于Dex、IP组,Dex组与IP组之间未见明显差异,这表明右美托咪定预处理及IPC在抗肝细胞凋亡方面具有协同作用,而两者单独干预作用相当。

血红素氧合酶(Heme Oxygenase, HO)可以将血红素氧化降解为自由铁、胆绿素和一氧化碳,胆绿素又进一步被转化为胆红素<sup>[46-47]</sup>,是机体内催化血红素降解的起始酶及唯一的限速酶。目前已知HO有三种同工酶,即HO-1, HO-2, HO-3,而HO-1是其中唯一可以被诱导的同工酶。新近研究发现HO-1具有抗凋亡、抗氧化及炎症抑制等多种保护作用<sup>[48-50]</sup>,而且HO-1催化降解的产物胆红素和胆绿素在抗氧化过程中也发挥着重要作用,能对过氧自由基,羟基自由基和过氧化氢等氧自由基起到明显的抑制作用<sup>[51]</sup>,CO有重要的血管张力调节、抗细胞凋亡及抑制促炎症反应作用<sup>[52]</sup>。

在胆道的缺血再灌注中,HO-1能有效减轻肝功损害,减轻肝脏及胆管病理学损伤,减少肝脏汇管区小胆管及肝门部胆管周围炎性细胞浸润,还能诱导血管内皮生长因子(VEGF)和基质细胞衍生因子-1 $\alpha$ (SDF-1 $\alpha$ )的表达,动员内皮祖细胞(EPCs)从骨髓向外周血释放,并且向肝脏内迁移,促进肝内、外PVP损伤的修复与再生<sup>[52-54]</sup>。在肺的缺血再灌注中,通过诱导HO-1的表达,能明显提高动脉血中PaO<sub>2</sub>,降低肺损伤评分(LIS评分)、湿/干重(W/D)比值、MPO活性及MDA含量,减轻缺血再灌注所导致的肺损伤<sup>[55]</sup>。在肝脏的缺血再灌注中,通过诱导HO-1的表达水平,可以明显降低大鼠血清ALT和AST浓度;减轻肝脏组织病理损害;提高超氧化物歧化酶(SOD)和维生素E、维生素C含量,降低氧化应激;提高抗凋亡蛋白BCL-2的表达,降低促凋亡基因产物Caspase 3的表达,减轻肝细胞凋亡;还能抑制枯否细胞的激活,从而减少TNF- $\alpha$ 和IL-6等促炎症细胞因子的产生,从而减轻HIRI<sup>[56-58]</sup>。另外,在肠道、视网膜、脑等其它脏器的缺血再灌注中,HO-1也能起到明显的保护作用<sup>[59-60]</sup>。HO-1不仅可以在机体生理状态下发挥作用,而且可以在机体非正常状态下被诱导,并明显降低相应器官、组织细胞的损害,被认为是在细胞在受到损伤或刺激时维持其氧化与抗氧化动态平衡的关键因素。Seok-Joo Kim等

研究表明通过诱导HO-1的表达可以明显改善酒精脂肪肝在缺血再灌注中的损伤<sup>[61]</sup>。这一成果表明,既往认为不适合作为供体的酒精脂肪肝在通过一定的干预之后也可作为供体,增加边缘性肝移植,这可以使我国脏器移植中供源短缺的现状得到一定改善。对于糖尿病大鼠,通过诱导其体内HO-1的表达可明显提高心脏SOD和GSH-PX水平,降低MDA水平,增强抗氧化应激能力,还能降低心肌纤维化程度和心肌线粒体超微结构损害程度,减轻心肌损害<sup>[62]</sup>。故通过诱导HO-1的表达来降低脏器缺血再灌注损伤具有巨大的临床潜力和前景。研究已证实谷氨酰胺、二氮嗪、异氟醚<sup>[63-65]</sup>等多种药物具有诱导HO-1表达的作用。本研究中,肝组织HO-1表达评分S组最低,IR组高于S组,Dex、IP组高于IR组,这表明HIRI本身可能也能诱导肝脏HO-1的表达,而右美托咪定预处理及IPC对HO-1的诱导作用强于HIRI。Liu A等<sup>[66]</sup>研究也证实缺血预处理能通过诱导HO-1的表达来降低HIRI,与本研究结果一致。另外,本研究中Dex+IP组评分高于Dex、IP组,而Dex组与IP组之间无明显差异,这表明且右美托咪定预处理及IPC对HO-1的诱导具有协同作用,而两者单独作用对HO-1的诱导效果相当。因此,右美托咪定预处理及IPC可能均能通过诱导HO-1的表达来降低HIRI,两者作用强度相当,且具有协同效应。

综上所述,右美托咪定预处理及IPC均能明显降低HIRI,且两者具有协同作用,其作用机制均可能与诱导HO-1的表达有一定关系。

本实验不足之处在于:

(1) 本实验只研究了右美托咪定在单一计量(25 $\mu$ g)、单一时间(术前30min)及单一途径(腹腔注射)给药时对大鼠HIRI的作用,对不同计量、不同时间及不同给药途径的作用强度尚不明确,需进一步研究,以获得右美托咪定对大鼠HIRI最佳作用效果;

(2) 本实验只研究了对大鼠肝脏行单一时间(缺血10分钟及再灌注10分钟)、单一次数(一次)的IPC对大鼠HIRI的作用,对于不同时间长度、不同IPC次数对大鼠HIRI的作用强度尚不明确,需进一步研究,以获得IPC对HIRI的最佳作用效果。

## 结论 (Conclusion)

1. 右美托咪定预处理及缺血预处理均能有效减轻大鼠 HIRI。
2. 右美托咪定联合缺血预处理对大鼠 HIRI 的作用优于两者单独作用。
3. 右美托咪定预处理及缺血预处理对大鼠 HIRI 的作用可能均与诱导 HO-1 的表达有一定关系。

## 参考文献 (Reference)

- [1] Zhao HF, Zhang GW, Zhou J, et al. Biliary tract injury caused by different relative warm ischemia time in liver transplantation in rats[J]. *Hepatobiliary Pancreat DisInt*. 2009, 8(3):247-54.
- [2] Banga NR, Homer Vanniasinkam S, Graham A, et al. Ischemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver[J]. *Br Surg*, 2005, 92(5):528-38.
- [3] Zeng Z, Huang HF, Chen MQ, et al. Heme oxygenase-1 protects donor livers from ischemia/reperfusion injury: the role of Kupffer cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(10):1285-92.
- [4] 郝悦, 周新民. 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2003, 11(10):1636-8.
- [5] Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, et al. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury[J]. *Transplantation*, 1993, 55(6):1265-72.
- [6] Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, et al. Up-regulation of oxygen derived free radicals by interleukin 1 in hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. *Transplantation*, 1997, 64(6):1398-403.
- [7] Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Sal-gado JA, et al. Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2008, 147(1):153-9.
- [8] Tsukamoto H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2002, 4(5): 741-748.
- [9] Pine JK, Aldouri A, Young AL, et al. Liver transplantation following donation after cardiac death: an analysis using matched pairs [J]. *Liver Transpl*, 2009, 15(9):1072-82.
- [10] Gyires K, Zádori ZS, Török T, Mátyus P. alpha (2)-Adrenoceptor subtypes-mediated physiological, pharmacological actions [J]. *Neurochem Int*. 2009; 55(7): 447-53.
- [11] Carollo DS, Nossaman BD, Ramadhyani U. Dexmedetomidine: a review of clinical Applications [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2008, 21(4):457-461.
- [12] Paris A, Tonner PH. Dexmedetomidine in anaesthesia [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2005, 18(4): 412-18.
- [13] 邱永升, 张德甫. 右美托咪定对大鼠心肌缺血再灌注时三磷酸腺苷酶的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(10):2347.
- [14] 苏玲. 右美托咪定预处理对大鼠在体心肌缺血再灌注损伤的影响:[硕士学位论文]. 广东广州: 南方医科大学, 2013.
- [15] Venn RM, Bryant A, Hall GM, Grounds RM. Effects of dexmedetomidine on adrenocortical function, and the cardiovascular, endocrine and inflammatory responses in post-operative patients needing sedation in the intensive care unit[J]. *Br J Anaesth*, 2001; 86(5):650-6.
- [16] Villela NR, do Nascimento Júnior P, de Carvalho LR, et al. Effects of dexmedetomidine on renal system and on vasopressin plasma levels. Experimental study in dogs [J]. *Rev Bras Anesthesiol*, 2005, 55(04):429-440.
- [17] Yanna Si, Hongguang Bao, Liu Han, et al. Dexmedetomidine protects against renal ischemia and reperfusion injury by inhibiting the JAK/STAT signaling activation [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2013, 11:141.
- [18] 斯妍娜, 鲍红光, 韩流, 等. 右美托咪定预先给药和后处理对大鼠肾缺血再灌注损伤的影响 [J]. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(3): 301-303.

- [19] J. Gu<sup>1</sup>, J. Chen, P. Xia, et al. Dexmedetomidine attenuates remote lung injury induced by renal ischemia/reperfusion in mice [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2011, 55(10):1272-8.
- [20] Eser O, Fidan H, Sahin O, et al. The influence of dexmedetomidine on ischemic rathippocampus [J]. *Brain Res*, 2008;1218:250-256.
- [21] Uysal HY<sup>1</sup>, Cuzdan SS, Kayıran O, et al. Preventive effect of dexmedetomidine in ischemia-reperfusion injury[J]. *J Craniofac Surg*, 2012, 23(5):1287-91.
- [22] Zhang Xu-Yu, Liu Zi-Meng, Wen Shi-Hong, et al. Dexmedetomidine administration before, but not after, ischemia attenuates intestinal injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats [J]. *Anesthesiology*, 2012, 116(5):1035-46.
- [23] Dong X, Xing Q, Li Y, Han X, Sun L, et al. Dexmedetomidine protects against ischemia-Reperfusion injury in rat skeletal muscle [J]. *J Surg Res*. 2014, 186(1):240-5.
- [24] Baran Gencer<sup>1</sup>, Turan Karaca<sup>2</sup>, Hasan Ali Tufan, et al. The protective effects of dexmedetomidine against apoptosis in retinal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Cutan Ocul Toxicol*. 2014, 33(4): 283- 8.
- [25] Adnan Tüfek, Orhan Tokgöz, İbrahim Aliosmanoglu, et al. The protective effects of dexmedetomidine on the liver and remote organs against hepatic ischemia reperfusion injury in rats [J]. *International Journal of Surgery*, 2013, 11 (1) :96- 100.
- [26] Şahin T, Begeç Z, Toprak Hi, et al. The effects of dexmedetomidine on liver ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Journal of Surgical Research*, 2013, 183 (1) :385- 390.
- [27] Sivilotti ML. Oxidant stress and haemolysis of the human erythrocyte. *Toxicol Rev*. 2004;23: 169-88.
- [28] Simchon S, Jan KM, Chien S. Influence of reduced red cell deformability on regional blood flow [J]. *Am J Physiol*. 1987; 253:H898-903.
- [29] Arslan M, Metin Çomu F, Küçük A, et al. Dexmedetomidine protects against lipid peroxidation and erythrocyte deformability alterations in experimental hepatic ischemia reperfusion injury [J]. *Libyan J Med*, 2012, 7:18185.
- [30] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia : a delay of lethal cell injury in ischemia myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74(5):1124-36.
- [31] Figueira ER, Rocha-Filho JA, Nakatani M, et al. Hepatic ischemic preconditioning increases portal vein flow in experimental liver ischemia reperfusion injury [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2014, 13(1):40-47.
- [32] Szijártó A, Hahn O, Lotz G, et al. Effect of ischemic preconditioning on rat liver microcirculation monitored with laser Doppler flowmetry [J]. *J Surg Res*, 2006, 131(1): 150-157.
- [33] Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, et al. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state [J]. *J Hepatol*, 2003, 38(1):59-66.
- [34] Koti RS, Yang W, Dashwood MR, et al. Effect of ischemic preconditioning on hepatic microcirculation and function in a rat model of ischemia reperfusion injury [J]. *Liver Transpl*, 2002, 8(12):1182-1191.
- [35] CutrnJC, PerrelliMG, CavalieriB, et al. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning [J]. *FreeRadicBiolMed*, 2002, 33(9):1200-1208.
- [36] Yong Jiang, Jian Jun Tang, Bao Qiang Wu, et al. The Protective Effects of Different-Time -Ischemic Preconditioning on the Reperfusion Injury in Fatty Livers in Rats [J]. *PLOS ONE*, March 2013, 8(3): 1- 6.
- [37] Romanque P, Díaz A, Tapia G, et al. Delayed ischemic preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury in vivo [J]. *Transplant Proc*, 2010, 42(5):1569-75.
- [38] Totsuka E, Fung JJ, Urakami A, et al. Influence of donor cardiopulmonary arrest in human liver transplantation : possible role of ischemic preconditioning [J]. *Hepatology*, 2000, 31(3): 577 -80.

- [39] J.S. Ko, M.S. Gwak, G.S. Kim, et al. The Protective Effect of Ischemic Preconditioning Against Hepatic Ischemic-Reperfusion Injury Under Isoflurane Anesthesia in Rats[J]. Transplantation Proceedings, 2013,45(5):1704-1707.
- [40] PRATTD S, KAPLAN MM. Evaluation of abnormal liver-enzymeresults in asymptomatic paitents [J]. N Engl J Med, 2000, 342:1266-1271.
- [41] AGUILAR MELERO P, LUQUE A, MACHUCA MM, et al. Cardiotrophin-1 reduces ischemia/reperfusion injury during liver transplant[J]. J Surg Res, 2013, 181(2):e83-e91.
- [42] 吴文峰, 黄焕森. 右美托咪定预处理对肝脏缺血再灌注损伤大鼠的影响[J]. 广东医学, 2014, 35(7): 992- 4.
- [43] Eum Hyun-Ae, Cha Young-Nam, Lee Sun-Mee. Necrosis and apoptosis: sequence of liver damage following reperfusion after 60 min ischemia in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007,358(2): 500- 5.
- [44] Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, et al. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis[J]. Hepatology, 2001,33(2):397-405.
- [45] Selzner Nazia, Liu Hao, Boehnert Markus U, et al. FGL2/fibroleukin mediates hepatic reperfusion injury by induction of sinusoidal endothelial cell and hepatocyte apoptosis in mice[J]. J Hepatol, 2012, 56 (1):153- 9.
- [46] Maines MD, Trakshel GM, Kutty RK. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal heme oxygenase. Only one molecular species of the enzyme is inducible [J]. J Biol Chem, 1986, 261(1):411-9.
- [47] Maines MD. Heme oxygenase: multifunction, multiplicity, regulatory mechanisms and clinical application [J]. FASEB J, 1988; 2: 2557-2568.
- [48] Zeng z, Huang HF, Chen MQ, et al. Contributions of heme oxygenase-1 in postconditioning-protected ischemia-reperfusion injury in rat liver transplantation [J]. Transplant Proc, 2011, 43(7):2517-23.
- [49] 胡明政, 张伯, 杨小华, 等. 血红素氧合酶-1 基因在大鼠供肝缺血再灌注损伤中的抗炎作用[J]. 中华消化外科杂志, 2010, 9(5): 383-385.
- [50] Geuken E, Buis CI, Visser DS, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human livers before transplantation correlates with graft injury and function after transplantation [J]. Am J Transplant, 2005,5(8): 1875-1885.
- [51] Kaur H, Hughes MN, Green CJ, et al. Interaction of bilirubin and biliverdin with reactive nitrogen species [J]. FEBS Lett, 2003,543(1-3): 113- 9.
- [52] Bilban M, Haschemi A, Wegiel B, et al. Heme oxygenase and carbon monoxide initiate homeostatic signaling [J]. Mol Med, 2008,86(3): 267- 79.
- [53] 黄汉飞, 侯美玲, 许坚, 等. 血红素氧合酶-1在胆道缺血再灌注损伤中促胆管周围血管丛再生的作用[J]. 中华外科杂志, 2014,52(3):193- 7.
- [54] 黄汉飞, 庞天龙, 许坚吉, 等. 血红素氧合酶-1减轻大鼠胆道缺血再灌注损伤的作用及机制[J]. 中华肝胆外科杂志, 2013,19(11):857- 861.
- [55] 刘东, 汪惠文, 耿智隆, 等. 血红素氧合酶-1在远隔肢体缺血预处理减轻兔肺缺血再灌注损伤中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2014,34(2):219- 22.
- [56] 曾仲, 黄汉飞, 宋飞, 等. 血红素氧合酶-1 减轻大鼠移植肝缺血再灌注损伤的作用及机制[J]. 中华器官移植杂志, 2010,31(1): 41- 5.
- [57] Fang J, Qin H, Seki T, et al. Therapeutic potential of pegylated hemin for reactive oxygen species-related diseases via induction of heme oxygenase-1: results from rat hepatic ischemia/reperfusion

- injury model[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2011 , 339(3):779-89.
- [58] 王科, 王学浩, 张峰, 等. 血红素氧合酶-1减轻老龄大鼠供肝缺血再灌注损伤[J]. *中华器官移植杂志*, 2005,26(4):220- 2.
- [59] He XH, Yan XT, Wang YL, et al. ransduced PEP-1-heme oxygenase-1 fusion protein protects against intestinal ischemia/reperfusion injury[J]. *J Surg Res*, 2014, 87(1):77-84.
- [60] He M, Pan H, Chang RC, et al. Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of Lycium barbarumpolysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage[J]. *PLoS One*. 2014 Jan 6; 9(1):e84800.
- [61] Seok-Joo Kim, Jin Gu Park, Sun-Mee Lee. Protective effect of heme oxygenase-1 induction against hepatic injury in alcoholicsteatotic liver exposed to cold ischemia/reperfusion[J]. *Life Sciences*, 2012, 90(5-6):169- 76.
- [62] 安 敏, 鲍百丽, 赵 猛, 等. 2 型糖尿病大鼠心肌血红素氧合酶-1 表达水平与氧化应激水平的关系[J]. *重庆医学*, 2012,41(30): 3180-3182,3185.
- [63] Shi-Chen Zhang, Qiang Shi, Ya-Ni Feng, et al. Tissue-Protective Effect of Glutamine on Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury via Induction of Heme Oxygenase-1[J]. *Pharmacology*, 2013, 91(1-2): 59- 68.
- [64] Zhong Zeng, Han-Fei Huang, Fei He, et al. Diazoxide attenuates ischemia/reperfusion injury via upregulation of heme oxygenase-1 after liver transplantation in rats[J]. *World J Gastroenterol*, 2012 , 18(15): 1765-72.
- [65] Xin Lv, Liqun Yang, Kunming Tao, et al. Isoflurane Preconditioning at Clinically Relevant Doses Induce Protective Effects of HemeOxygenase-1 on Hepatic Ischemia Reperfusion in Rats [J]. *BMC Gastroenterol*, 2011 Mar 31;11:31.
- [66] Liu A, Fang H, Wei W, et al. Ischemic preconditioning protects against liver ischemia/reperfusion injury via heme oxygenase-1-mediated autophagy [J]. *Crit Care Med*, 2014 , 42(12):762-71.

## 文献综述 (Review)

### 肝缺血再灌注损伤的机制及防治的研究进展

肝脏缺血再灌注损伤(Hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI)是指肝脏组织部分或整体缺血一段时间后恢复血液灌注,不但不能使其功能和结构得以恢复,反而加重其功能障碍和结构损伤的现象。HIRI是很多肝脏疾病无法回避的问题,是失血性休克、复杂的肝叶切除及严重的肝创伤等术后肝功能异常,原发性肝移植无功能、肝功能衰竭的重要原因<sup>[1]</sup>,而且其产生的影响是全身性的,不仅可导致肝脏本身的损伤,还会导致远隔器官的损伤,如肺、肾脏、肠等,从而引起多个器官、系统器质性和功能性改变。故HIRI很大程度上限制了肝癌等很多肝脏疾病、肝损伤的手术治疗,严重影响了病情的转归和患者的预后。近年来,大量专家学者在对于HIRI的机制及防御方面进行了大量的研究,取得了丰厚的成果。现就近年来对HIRI的发生机制及防治的研究进展作一综述。

#### 1. 发生机制

HIRI不但包括肝脏在缺血过程中的损伤,更重要的是当血流灌注恢复所导致的一系列更严重的损伤。其机制涉及多个方面,多种途径,诸多因素参与其中,而且各种因素之间相互促进,共同作用,错综复杂。

当阻断肝脏血流时,肝组织的供氧及供能急剧减少。氧气供应减少导致葡萄糖有氧氧化减少、无氧代谢增加,从而导致乳酸堆积而引起酸中毒,而且进一步加快了能源物质的消耗;氧自由基的增多,使质膜及细胞器膜中的脂肪酸发生过氧化;能源物质供应不足,ATP生成减少,使 $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ 泵及 $\text{Ca}^{2+}$ 泵等依赖ATP的细胞内外离子跨膜转运减少, $\text{Na}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ 等离子从细胞外顺浓度梯度进入细胞内,导致细胞的肿胀,并发生钙超载, $\text{K}^+$ 顺浓度梯度穿过细胞膜到达细胞外,引起高钾血症,进一步改变细胞内外的代谢环境,从而导致肝细胞损伤。

当恢复血流灌注后,损伤进一步加重,主要涉及以下几个方面:

①氧自由基的损伤。氧自由基是以氧为中心的自由基,主要包括超氧化物自由基、过氧化氢及氢氧根离子等,主要来源于Kupffer细胞、中性粒细胞<sup>[2]</sup>和黄嘌呤氧化酶。氧自由基氧化活性强、极易发生反应。然而,机体内同时存在着产生氧自由基的氧化体系及氧自由基清除体系与抗氧化体系。生理状况下,体内仅有少量氧自由基的产生,且其可通过氧化物酶等作用而还原为水和分子氧,二者维持动态平衡,有效防止氧自由基过多而对组织细胞造成的破坏。当机体处于病理状态时,氧自由基大量产生或不能被及时清除,二者的平衡遭到破坏,引起氧化应激。过多的氧自由基就会和周围组织细胞及大分子发生反应,破坏细胞膜、溶酶体、内质网等结构,同时DNA、RNA也发生改变,胶原蛋白发生变性,导致组织细胞发生多种病理性改变,从而使疾病或损伤进一步加重。大量研究表明,氧自由基增多、氧化应激及脂质过氧化在肝脏缺血再灌注损伤中发挥着重要作用。在肝脏的缺血再灌注损伤中,因组织缺血缺氧,不能进行正常的有氧氧化,

导致能量不足，ATP合成减少。由于钙泵作用的发挥需要消耗ATP，故当ATP合成减少时，钙泵活性降低，细胞内的钙不能及时到达细胞外。而且细胞膜因脂质过氧化而被破坏导致其通透性改变，使Ca<sup>2+</sup>顺浓度梯度从细胞外进入细胞内，从而导致细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度升高，Ca<sup>2+</sup>依赖性蛋白水解酶被激活，后者催化黄嘌呤脱氢酶为黄嘌呤氧化酶(XO)。ATP通过一系列代谢，最终生成次黄嘌呤，当组织处于缺血状态下时，ATP合成减少，次黄嘌呤增多。当组织恢复灌注时，O<sub>2</sub>供应增加，通过XO的作用，次黄嘌呤与O<sub>2</sub>反应生成黄嘌呤、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和超氧阴离子。黄嘌呤再与O<sub>2</sub>反应生成尿酸、超氧阴离子和H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>。另外，在脏器的缺血再灌注时还发生粒细胞性、线粒体性及儿茶酚胺性氧自由基增多（中性粒细胞的激活并大量聚集，导致氧自由基的产生显著增多）。同时，在脏器缺血再灌注损伤时，由于体内抗氧化酶类及抗氧化剂合成减少、活性减弱以及被增加的氧自由基大量消耗等原因，体内抗氧化系统能力大大减弱。所以当脏器发生缺血再灌注时，氧自由基的产生超过体内氧自由基清除系统的处理能力，致使氧自由基产生与清除的平衡系统遭到破坏，氧自由基堆积。

过多的氧自由基、尤其是羟自由基可引发生物膜中多价不饱和脂肪酸的皴裂，形成脂性自由基和脂质过氧化物。生物膜的结构被破坏，致使其流动性降低，且膜受体、离子通道、膜转运体及膜蛋白酶等出现功能障碍，导致膜的通透性及酶活性发生改变；另外，过多的氧自由基还可分解细胞内透明质酸、破坏DNA链，损伤肝脏血管内皮细胞，引起血小板及粒细胞等在微血管中聚集，阻碍肝脏微循环，引起微循环障碍，再次引起组织灌注不足。氧自由基除了在脏器的缺血再灌注损伤中占有重要地位外，其在休克、多脏器衰竭、ARDS及促衰老等方面都发挥着这重要的作用，故及时有效地清除体内过多的氧自由基十分重要。

氧自由基清除剂种类繁多，主要包括酶性自由基清除剂，如超氧化物歧化酶（Superoxide Dismutase, SOD）、谷胱甘肽过氧化物酶（GSH-Px）及过氧化氢酶（CAT）等；低分子自由基清除剂，如谷胱甘肽、维生素A、维生素E和维生素C(抗坏血酸)等；含巯基化合物，如6-巯基嘌呤甘氨酸(MPG)；别嘌呤醇；含巯基的ACEI（有抑制O<sub>2</sub>形成的作用）；甘露醇、潘生丁、布洛芬和氟碳乳剂（具有清除自由基的作用）。另外，大量研究表明我国传统医药中的多种中草药也有抗氧化作用，如丹参、何首乌、人参、生麦散、枸杞、小檗碱、黄芪等。SOD是一种广泛存在于生物体内的金属酶。能催化生物体内具有细胞毒性的超氧自由基(O<sup>2-</sup>)发生歧化反应从而清除O<sup>2-</sup>，是机体内O<sup>2-</sup>的天然消除剂，在生物体的自我保护系统中起着极为重要的作用。GSH-Px可通过催化还原型骨谷胱甘肽(GSH)与H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的氧化还原反应，从而减轻因超氧化阴离子引发的细胞内外脂质过氧化所导致的组织细胞损坏。GSH-Px是细胞内抗脂质过氧化作用的酶性保护系统的重要成分，可催化过氧化脂质(LPO, 自由基引发不饱和脂肪酸发生脂质过氧化的最终产物)的分解而产生相应的醇，减少LPO的生成，防止LPO皴裂及引发脂质过氧化作用的链式支链反应，从而降低LPO造成的损害。GSH-Px还能通过阻断脂氢过氧化物(LOOH)引发自由基的二级反应而减少LOOH对机体的损害。别嘌呤醇能通过抑制黄

嘌呤氧化酶参与的黄嘌呤氧化代谢及次黄嘌呤氧化酶参与的次黄嘌呤氧化代谢,减少自由基产生。另外,有研究表明依达拉奉也是一种新型的氧自由基清除剂,进入体内的依达拉奉分子变成依达拉奉阴离子,通过提供一个电子给氧自由基而使后者变成非活性分子,从而降低或消除氧自由基的危害。

②钙超载的损伤作用。作为组织细胞重要的第二信使,细胞内自由钙浓度在调节许多细胞代谢机能和维持结构稳定方面起着重要作用,在维持细胞的增殖、分裂、能最代谢及氧代谢等方面尤为重要。正常情况下,肝细胞内外的浓度分别为 $0.2 \mu\text{mol/L}$ 及 $1.3 \text{mmol/L}$ 左右,细胞外液远远高于细胞内液(约1万倍)。细胞内外的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度稳定平衡是通过跨细胞膜 $\text{Ca}^{2+}$ 转运( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换系统、 $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换系统、钙泵的主动转运以及膜对 $\text{Ca}^{2+}$ 的低通透性)和细胞内“钙库”摄取和释放 $\text{Ca}^{2+}$ 等作用来实现的,刚好满足组织细胞需要。细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的稳定对于细胞发挥正常的生理功能至关重要。当肝脏发生缺血再灌注损伤时,肝脏细胞因能量储备不足,而使依赖ATP的 $\text{Na}^+$ 泵及 $\text{Ca}^{2+}$ 泵等功能发生障碍,数量及活性下降,导致细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度升高;细胞因缺氧而导致细胞膜通透性增加, $\text{Ca}^{2+}$ 通过被动扩散进入细胞内导致钙超载;氧自由基使质膜产生脂质过氧化反应,导致质膜结构改变,还可破坏线粒体结构、干扰氧化磷酸化并加速能量消耗耗竭,使依赖能量的离子泵活性进一步降低,这些均可导致细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 增加。细胞内钙超载又进一步引起线粒体功能障碍,干扰线粒体氧化磷酸化;激活钙依赖性降解酶,从而使得磷脂双分子层结构中磷脂被水解,加重质膜的损害,影响细胞膜的流动性和通透性;促进活性氧生成;激活肝脏枯否(Kupffer)细胞,释放大量毒性介质加重肝细胞损伤。

③中性粒细胞的损伤作用。有研究表明组织在缺血早期即可见大量中性粒细胞浸润,而再灌注时中性粒细胞聚集进一步加重<sup>[3]</sup>。中性粒细胞可导致大量氧自由基释放,损害肝细胞;与血管内皮细胞粘附,导致微循环障碍;产生多种毒性细胞因子,损害肝细胞及细胞外基质;还可增加血管通透性,加重循环障碍并导致组织水肿。

④枯否细胞的损伤作用。Kupffer细胞位于肝窦周间隙,当肝脏组织发生缺血再灌注时易被活化(细胞内钙超载是激活Kupffer细胞的根本原因)。激活的Kupffer细胞可促进中性粒细胞释放自由基,加重组织的损伤<sup>[4]</sup>,阻碍中性粒细胞的流动,加重肝窦的循环障碍;产生大量肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 、IL-6、IL-1以及血小板活化因子(platelet activating factor, PAF)等多种促炎因子,进而促进白细胞、血小板与肝窦内皮细胞的黏附,加重内皮细胞的损伤及肝微循环紊乱;释放蛋白酶破坏Disse间隙内托附肝窦内皮细胞的糖蛋白,使促使窦内皮细胞失去托附,流入肝窦内。这些均进一步加重了微循环障碍,影响组织灌注。有研究表明应用Kupffer细胞活化抑制剂可明显减轻肝缺血再灌注损伤。

⑤细胞因子、黏附分子及核因子的损伤作用。研究表明,HIRI发生的病理生理过程中有多种细胞因子参与,且各种因子之间相互作用产生网格样协同作用。主要包括有TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-10、PAF等细胞因子。研究表明TNF- $\alpha$ 在HIRI中起着起始激发的作用,并与HIRI伤程度高度相关。TNF- $\alpha$ 不但可直接导致肝窦内皮细胞肿胀,而且能显著地增加

肝窦内皮细胞表面黏附分子表达,提高多型核白细胞(polymorphonuclear, PMN)与肝窦内皮细胞相互作用的能力,致肝脏微循环障碍。此外, TNF- $\alpha$ 尚可激活黏附于肝窦内的PMN释放氧自由基而造成肝脏损伤。研究表明敲除小鼠TNF- $\alpha$ 基因或者使用TNF- $\alpha$ 抑制剂均能明显降低HIRI。而IL-1不仅能促使Kupffer细胞产生TNF- $\alpha$ ,上调PMN释放氧自由基的能力,还能与TNF- $\alpha$ 协同作用于内皮细胞,诱导其合成凝血酶及纤维蛋白酶,从而破坏内皮细胞的骨架作用,加重HIRI。IL-2可与TNF- $\alpha$ 协同作用而改变“蛋白酶与抗蛋白酶”系统的平衡,引起内皮细胞基底膜蛋白降解,从而对细胞造成损害。IL-6能诱导肝细胞释放 $\alpha$ -抗胰蛋白酶及C-反应蛋白等物质而损伤肝脏组织细胞,还可以诱导纤维蛋白原的释放而影响凝血系统。IL-10是一种具有保护作用的抗炎细胞因子,它可以通过抑制NF- $\kappa$ B的活性减轻炎症反应,还能抑制细胞间黏附分子(intercellular adhesion molecule, ICAM)-1、巨噬细胞炎性蛋白-2(macrophage inflammatory protein-2, MIP-2)、TNF- $\alpha$ 的mRNA表达,从而减轻肝脏缺血再灌注损伤。

⑥T淋巴细胞的损伤以及代谢性酸中毒等作用。HIRI产生的多种细胞因子能够直接激活T淋巴细胞。活化之后的T淋巴细胞在HIRI早期的发生发展中起着十分重要的作用。研究表明减少CD4<sup>+</sup>的表能明显减轻HIRI。另外,近年研究还发现,不同的T淋巴细胞亚群在HIRI中所起的作用机制不同。而且当把小鼠的T淋巴细胞受体敲除后,在肝脏的缺血再灌注中,中性粒细胞聚集现象及HIRI均明显减轻。

⑦相关基因的作用。研究发现Bcl-2及P53/P21均能诱导肝脏在缺血再灌注中的细胞凋亡。

总之,缺血再灌注损伤涉及多种机制,而且多种不同的机制相互影响,共同作用。

## 2. 防治处理因素

HIRI是肝胆外科一个常见而棘手的问题,是导致复杂的肝脏外科手术、肝脏移植后肝功能衰竭的重要原因<sup>[5]</sup>,这严重限制了很多肝脏疾病的外科手术治疗,直接影响病情的转归及患者的预后。故如何减轻HIRI,成为肝胆外科亟待解决的问题。目前,通过大量学者的研究,已有多种措施被证实具有减轻HIRI的作用,主要包括缺血预处理(Ischemic preconditioning, IPC)和缺血后处理(ischemicpostconditioning, IPO)、药物预处理和后处理、缺氧预处理、热休克预处理以及联合处理等多种方式,其中药物处理因实施方便,作用明显,成为最主要的处理措施。

### 2.1 IPC

IPC是指在长时间缺血再灌注之前,通过一次或几次短暂且重复的缺血再灌注,可以增加缺血器官对长时间缺血再灌注损伤的耐受力。20世纪80年代中期, Murry等<sup>[6]</sup>证实心肌在经多次短暂缺血再灌注后,能在随后的长时间缺血中延迟并减轻心肌损伤。随后陆续证实,缺血预处理对肝脏<sup>[7]</sup>、肾脏等多个脏器的IRI都有保护作用。大量基础及临床研究表明,IPC能够使肝脏对IRI产生预适应,然其机制复杂,尚处于研究阶段。

目前研究表明,IPC对HIRI的保护作用,不但对于健康肝的整体移植和肝细胞移植效果明显,而且其对病理性肝组织的HIRI也有可观的效果。

有研究<sup>[8]</sup>表明IPC对大鼠全肝移植术中供肝有保护作用，主要表现在以下几个方面：(1)提高肝脏对缺血的耐受力，延长肝脏冷保存时间；(2)保护肝脏的内皮细胞，抑制枯否细胞激活；(3)抑制缺血再灌注后肝脏小静脉内白细胞活动，从而减少肝脏的渗出和损伤；(4)保护肝脏实质细胞，改善肝功能；(5)改善肝脏的血液循环。另外，在临床肝移植术中显示，取自于经过心肺复苏供体的肝脏移植后受体血清AST及ALT水平显著低于未经历心肺复苏者。这提示呼吸心跳停止后复苏成功对供肝有保护作用<sup>[9]</sup>。供体呼吸心跳停止后再复苏使肝脏经历了一个缺血再灌注的过程，类似于IPC。这表明在临床肝移植术中，IPC对供肝也同样有保护作用。

此外，还有研究<sup>[10]</sup>表明IPC能减轻移植肝细胞分离过程中的IRI，具体表现为预先给予IPC可减轻肝细胞分离过程中白蛋白功能损伤及降低乳酸脱氢酶、谷丙转氨酶活性，提高肝细胞成活率和MTT增殖活性。其机制可能与诱导其自身的缺血性预适应、抗氧化、清除氧自由基的能力相关。

不仅是对于正常肝组织，相关研究<sup>[11]</sup>还表明，IPC对缺血再灌注损伤耐受能力相对较差的脂肪肝也有很好的保护作用。其机制可能是IPC可减轻脂肪肝IRI后的脂质过氧化反应。

关于IPC保护HIRI的机制现今认识仍不确切，如有研究<sup>[12]</sup>认为IPC可能促使肝脏缺血再灌注早期产生较多的NO，舒张肝脏的血管，降低门静脉压力，改善微循环和组织血液灌注，因而对肝脏有保护作用。后晚期IPC又可抑制缺血再灌注肝脏NO的产生，防止过量NO对肝脏组织的损伤作用。也有研究<sup>[13]</sup>认为其保护机制涉及使Bcl-2表达上调从而抑制细胞凋亡。总之，对于其机制的认识还需要大量、深入的研究，有待进一步完善。

另外，IPC不但对肝缺血再灌注后肝脏本身的损伤有保护作用，其对因肝缺血再灌注导致的肾、肺、肠也有明显的保护作用。

## 2.2 IPO

IPO是指在组织器官缺血处理完成后，在恢复血液供应产生再灌注损伤之前给予短暂的血液再灌注，有文献报道IPO同样能减轻脏器的缺血再灌注损伤<sup>[14-20]</sup>。其作用机制与减少氧自由基的生成、减轻炎性细胞浸润和钙超载、抑制细胞凋亡、保护线粒体超微结构等有关<sup>[21]</sup>。当脏器的缺血再灌注损伤已经发生时，IPC就失去了最佳治疗时期，而此时IPO正好弥补上IPC，起到类似的作用。

IPO是由Zhao等<sup>[22]</sup>于2003年在心脏的缺血再灌注研究中首先提出。该研究表明证明在心肌较长时间缺血后，开始再灌注前，对心脏进行3个短周期的再灌注30 s/阻断30 s处理，然后全面恢复心脏的再灌注，能对再灌注心脏产生抗损伤作用，从而得出一种新的外科干预措施。随后，大量研究<sup>[23-25]</sup>进一步证实IPO能明显降低心脏缺血再灌注后心肌梗死面积，改善心脏功能，降低肌酸激酶同工酶（CK-MB）及炎症因子的表达，减少心肌细胞凋亡，从而降低心脏的缺血再灌注损伤。Weng X等研究<sup>[26]</sup>表明IPO能有效减轻肾小管上皮细胞的凋亡。Han D等<sup>[27]</sup>研究表明IPO能明显抑制脑缺血再灌注中水通道蛋白-4（AQP4）的表达，从而起到减轻缺血再灌注所导致的脑水肿，起到脑保护作用。Cheng

C等研究表明IPO可以通过提高aquaporin-1 (AQP1)的表达,起到降低肺的缺血再灌注损伤。孙凯等<sup>[28]</sup>用IPO方式对HIRI的大鼠研究证实IPO有保护作用。

薛聪龙等<sup>[29]</sup>对于IPO与IPC对大鼠肝脏保护作用的比较研究得出, IPO与IPC一样对肝脏都有保护作用,并且两者的保护作用相似,无明显性差异。在抗HIRI的方法中, IPO是一种在时机选择上不同于IPC的处理方式,他对于减轻HIRI在肝脏器官移植临床应用中具有较好的可预知性和可操作性。

根据目前研究, IPO对抗HIRI的机制主要包括以下几个方面:

(1) 减少肝脏氧自由基的产生,降低氧化应激,增加抗氧化作用。氧自由基的产生以及氧化应激是HIRI的重要原因。研究表明, IPO能明显改善肝脏经历缺血再灌注后肝功的改变以及提高肝脏组织中SOD的表达,降低MDA的表达<sup>[30]</sup>,从而减少氧自由基的表达,降低氧化应激。

(2) 减轻钙超载。缺血/再灌注初期产生大量氧自由基,  $Ca^{2+}$ 通透性增加,大量流入胞内引起钙超载。 $Ca^{2+}$ 浓度的升高又激活磷脂酶和蛋白水解酶,促进氧自由基大量生成,使线粒体内ATP的合成减少,进一步影响能量供应,致使依赖ATP的 $Ca^{2+}$ 泵受到抑制,使细胞内 $Ca^{2+}$ 进一步滞留,形成恶性循环,加重再灌注器官的损伤,最终引起细胞坏死、凋亡。

(3) 减少有害细胞因子的表达。

研究证实IPO能够抑制肝脏Kupffer细胞产生和释放TNF- $\alpha$ ,减少了氧自由基和细胞间黏附分子-1(ICAM-1)等多种活性因子的释放,减少PMN的聚集,从而减轻移植后的HIRI<sup>[31]</sup>。还有研究表明IPO首先通过抑制TNF- $\alpha$ 的上升,并进一步抑制了IL-6和IL-1的增高,从而抑制了促炎症细胞因子之间相互作用,形成许多正反馈环,进一步抑制了“炎症级联反应”的发生,从而减轻IRI达到对再灌注器官的保护作用。

(4) 抑制细胞凋亡。细胞凋亡是一个多因素、多环节、多途径的径的复杂过程,在HIRI的发生发展中起着重要作用。研究表明氧自由基的爆发性形成是致使细胞凋亡的关键因素。IPO还可能是在线粒体途径中提高Bcl-2家族蛋白的表达,增加Bcl-2/Bax的比值,减轻钙超载、氧化应激从而抑制因线粒体膜通透性转换孔道(MPTP)开放而引发的线粒体膜通透性转换(MPT)作用,从而抑制线粒体双膜间隙中的细胞色素C(CytC)和凋亡诱导因子(AIF)释放到胞质,进而减少细胞凋亡,并最终减轻移植肝的HIRI。

(5) IPO还能有效降低肝脏缺血再灌注过程中中心粒细胞的激活、黏附、脱颗粒作用,从而减轻HIRI。

### 2.3 药物预处理

药物预处理是利用外源性生物活性物质及其转化产物的生理作用来增强组织对缺血再灌注的耐受性。也就是利用某些活性物质直接或间接的药理作用来达到类似缺血预处理的保护作用<sup>[32]</sup>,增强组织或细胞对缺血再灌注损伤的耐受性,从而减轻损伤。通过对HIRI机制的了解及相关实验的证实,具有预处理作用的药物主要包括氧自由基清除剂、抗氧化剂、钙拮抗剂、改善组织微循环、抑制细胞因子以及增强细胞能量代谢的

药物。

肝糖原：在缺血期间，肝能量的主要来源是糖原的无氧酵解，而研究认为肝细胞生物能量缺乏是引发缺血性肝损伤一系列病理改变的始动因素。因此可通过在缺血前经静脉给予适量的葡萄糖溶液来增加肝糖原的储备，足够的肝糖原含量可通过提高  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶活性以及减少  $\text{TNF-}\alpha$  的产生等作用机制来拮抗肝缺血再灌注损伤。

谷胱甘肽(GSH)是一种重要的自由基清除剂，对HIRI有明显的抑制作用，这可能与其结构中的巯基有关。其在调节细胞的活动、营养代谢、抗氧化、对抗脂质过氧化物中都起着重要的作用<sup>[33]</sup>，从而减轻细胞凋亡，保护HIRI。

腺苷蛋氨酸(SAMe)是存在于人体的一种生物活性物质，作为甲基供体(参与转甲基作用)和生理性巯基化合物的前体(参与转巯基作用)以及多胺合成前物，参与体内重要的生化反应。研究发现，SAMe 对肝细胞有多重的保护作用，包括稳定细胞膜的流动性，保护细胞骨架；增强  $\text{Na}^{+}$ - $\text{K}^{+}$ -ATP 酶活性抗炎症介质、氧自由基，抗细胞因子等；转载腺苷，改善热肝微循环；预防线粒体损伤，防止其氧化应激并改善肝能量代谢的障碍，最终起到减轻 HIRI 的作用。

新近研究<sup>[34-35]</sup>发现高渗盐水对HIRI也有保护作用，甚至优于缺血与处理。高渗盐水能够减少Bax的表达并促进Bcl-2 的表达，同时又能抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 的产生，增强IL-10 的表达水平以增强抗炎作用，抑制HIRI时肝细胞的凋亡。高渗盐水价格低廉，效果明显，预处理操作方便，适用范围广，为临床肝脏外科减轻HIRI提供有价值的实验依据，具有广泛的临床应用前景和价值。

山莨菪碱是一种拮抗M胆碱受体的抗胆碱药，然而近年来发现山莨菪碱还具有降低脏器缺血再灌注损伤的作用。研究发现，山莨菪碱作为M受体胆碱阻断剂，能解除血管痉挛(尤其微血管)，有效改善微循环，还具有一定的升压作用。另外，山莨菪碱能明显抑制 $\text{Na}^{+}$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交换，降低细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度，防止钙超载，从而发挥对脏器缺血再灌注损伤的作用。山莨菪碱能明显降低脏器缺血再灌注中MDA含量，降低氧化应激，防止氧自由基对质膜的破坏，可在细胞水平上稳定膜结构，发挥细胞保护作用，降低脏器缺血再灌注损伤。随着对相关研究的进一步加深，研究人员发现山莨菪碱对脏器缺血再灌注损伤的作用与 $\alpha 7$ 胆碱能受体有关。研究发现，给予尼古丁 $\alpha 7$ 受体激动剂可明显降低肝脏缺血再灌注早期细胞炎症因子的表达。这可能是由于Kuffer细胞上的尼古丁 $\alpha 7$ 受体被激活，启动了尼古丁 $\alpha 7$ 受体抗炎通路，从而减轻组织损伤。尼古丁 $\alpha 7$ 受体抗炎通路是指迷走神经末梢释放的乙酰胆碱与巨噬细胞膜上的尼古丁 $\alpha 7$ 受体结合后，可调控包括缺血再灌注等各种原因引起的炎症反应程度。而山莨菪碱可增加乙酰胆碱与N型胆碱能受体的结合率，从而增强尼古丁 $\alpha 7$ 受体抗炎作用。

另外，还有很多药物都被证实对 HIRI 有保护作用，如乌司他丁、前列地尔、依达拉奉、乙酰半胱氨酸、赖诺普利、干扰素调节因子及心房钠尿肽等都有可观的效果。

可喜的是，大量研究表明，多种传统的中草药及中成药也具有降低HIRI的作用。脏器缺血再灌注损伤是一个多因素、多环节的瀑布式综合反应，而中成药正好具有多成分、

多途径、多环节、多靶点的作用特点以及“菌(细菌)、毒(内毒素)、炎(炎症介质)”圈并治的优势,故中成药可能为缺血再灌注的脏器提供更全面、更有效的保护手段。如丹参不但能够上调缺血再灌注损伤后肝组织中磷酸化真核生物翻译起始因子  $2\alpha$  (p-eIF- $2\alpha$ ) 的表达,减轻未折叠蛋白和错误折叠蛋白堆积,稳定内质网内环境,减轻内质网细胞凋亡途径中caspase 12 的表达<sup>[36]</sup>,还具有减低OFR脂质过氧化物含量,提高SOD活性,减少钙超载,促进再生修复功能。另外,参附、银杏叶提取物、大黄素<sup>[37-39]</sup>等一些活血化瘀中药也能清除氧自由基,对脏器缺血再灌注损伤具有一定的保护作用。姜黄素<sup>[40]</sup>因其明显的抗氧化作用在HIRI中发挥强有力的抗炎效果,从而起到保护作用。此外,还有研究表明大黄素、四君子汤、三七总皂甙(PNS)、雷公藤甲素(TPT)、银杏内酯、葛根素等对HIRI都具有保护作用。

## 2.4 药物后处理

药物后处理指在肝脏长时间缺血后再灌注时或再灌注前给予药物干预处理,以达到防治或减轻HIRI的目的,其作用机制也与降低氧化应激、抑制炎症改变、减轻钙超载及减少细胞凋亡有关。当错过药物预处理的时机,或药物预处理效果不够理想时,药物后处理便可作为补救,具有重要意义。另外,临床上通常将药物预处理与药物后处理联合应用,以进一步提高对脏器缺血再灌注损伤的耐受性。研究报道瑞芬太尼、异丙酚、丙泊酚等<sup>[41-43]</sup>多种药物均有相关作用。

## 2.5 联合干预

在对于HIRI的研究中证实,两种或两种以上的干预措施之间往往具有明显的协同作用,不管是对于肝缺血再灌注所导致的肝本身的损害还是由此而引起的其他远隔脏器的损害,联合处理效果均明显优于其所对应的单种处理措施,能更好的降低HIRI<sup>[44-46]</sup>。

## 三. 展望

在进行复杂的肝叶切除(如肝癌等)及肝脏移植手术时,HIRI 是一个无法避免的问题,严重影响很多肝脏疾病的手术治疗。随着对 HIRI 研究的不断深入,我们对其机制的认识也将不断清晰,从而找到对 HIRI 更有效的防御方法,进一步降低或者消除HIRI 为临床所带来的影响,改善病情预后,促进患者恢复,减少住院费用。

## 参考文献:

- [1] Banga NR, Homer Vanniasinkam S, Graham A, et al. Ischemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver[J]. Br Surg, 2005, 92(5):528-538.
- [2] Shirasugi N, Wakabayashi G, Shimazu M, et al. Up-regulation of oxygen derived free radicals by interleukin 1 in hepatic ischemia-reperfusion injury[J]. Transplantation, 1997, 64(6):1398-403.
- [3] Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Sal-gado JA, et al. Factors in the Pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury [J]. J Surg Res, 2008, 147(1):153-9.
- [4] Tsukamoto H. Redox regulation of cytokine expression in Kupffer cells [J]. Antioxid Redox Signal, 2002, 4(5):741-48.
- [5] Pine JK, Aldouri A, Young AL, et al. Liver transplantation following donation after cardiac death: An analysis using matched pairs[J]. Liver Transpl, 2009, 15(9):1072-82.

- [6] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia in a delay of lethal cell injury in ischemia myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74(5):1124-36.
- [7] Lloris-Carsi J M; Cejalvo D; ToledoPereyra L H, et al. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia [J]. *Transplant*, 1993, 25(6):3303-4.
- [8] Troisi R, Gammu G, Militerno G, et al. Modulation of portal graft inflow: a necessity in adult living-Donor liver transplantation[J]? *Ann Surg*, 2003, 237(3):429-36.
- [9] Totsuka E, Fung JJ, Urakami A, et al. Influence of donor cardiopulmonary arrest in human liver transplantation: possible role of ischemic preconditioning [J]. *Hepatology*, 2000, 31(3):577-80.
- [10] 梁珊, 石詠中, 聂盛丹, 等. 缺血预处理预防肝细胞分离过程中的缺血再灌注损伤[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(44): 8293- 6.
- [11] Yong Jiang, Jian Jun Tang, Bao Qiang Wu, et al. The Protective Effects of Different-Time -Ischemic Preconditioning on the Reperfusion Injury in Fatty Livers in Rats [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(3):1-6.
- [12] 汪根树, 陈规划, 朱晓峰. 缺血预处理对大鼠小体积供肝的保护作用及机制[J]. *中华肝胆外科杂志*[J]. 2006, 12(10):684-6.
- [13] J.S. Ko, M.S. Gwak, G.S. Kim, et al. The Protective Effect of Ischemic Preconditioning Against Hepatic Ischemic-Reperfusion Injury Under Isoflurane Anesthesia in Rats [J]. *Transplantation Proceedings*, 2013, 45(5):1704-7.
- [14] 袁贵秀, 常业恬, 李李, 等. 缺血后处理对兔肝脏热缺血再灌注损伤的保护[J]. *中国现代手术学杂志*, 2007, 11(2): 98- 100.
- [15] 孙凯, 刘志苏, 孙权. 缺血后处理对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2004, 25(2): 104- 7.
- [16] 赵鸽, 朱宇麟, 杨会, 等. 缺血后处理对大鼠肝大部切除后残肝缺血再灌注损伤的影响[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2012, 33(3): 356- 60.
- [17] 朱宇麟, 李静, 吕毅, 等. 缺血后处理对肝缺血再灌注损伤后磷脂酰肌醇-3 激酶和细胞外信号调节激酶的影响和意义[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(5): 677- 80.
- [18] Guo JY, Yang T, Sun XG, Zhou NY, et al. Ischemic postconditioning attenuates liver warm ischemia-reperfusion injury through Akt-eNOS-NO-HIF pathway[J]. *Journal of biomedical science*, 2011 Oct 28; 18:79.
- [18] Zeng Z, Huang HF, Chen MQ, et al. Contributions of heme oxygenase-1 in postconditioning-protected Ischemia/reperfusion injury in rat liver transplantation[J]. *Transplantation Proceedings*, 2011, 43(7): 2517- 23.
- [20] Santos CH, Pontes JC, Mijji LN, et al. Postconditioning effect in the hepatic ischemia and reperfusion in rats[J]. *Acta Cirurgica Brasileira*, 2010, 25(2): 163- 8.
- [21] 何飞, 曾仲. 缺血后处理在肝移植缺血再灌注损伤中的作用[J]. *国际移植与血液净化杂志*, 2010, 8(3): 12- 15.
- [22] Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 285: H579-H588.
- [23] Wu N, Li WN, Shu WQ, et al. Blocking the mitochondrial permeability transition pore with cyclosporine-A can restore cardioprotection of ischemic postconditioning in hypercholesterolemic rat heart[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2015, 19(3):446-54.
- [24] Lu YZ, Wang J, Zhang CY, et al. The cardioprotective effects of ischemic postconditioning on myocardial interstitium following ischemic/reperfusion in rats[J]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, 2014, 30(5):431-5.

- [25] Kim EK, Hahn JY, Song YB, et al. Effect of ischemic postconditioning on myocardial salvage in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention for ST-segment elevation myocardial infarction: cardiac magnetic resonance substudy of the POST randomized trial[J]. *Int J Cardiovasc Imaging*. 2015 Jan 15.
- [26] Weng X, Wang L, Chen H, et al. Ischemic postconditioning inhibits apoptosis in an in vitro proximal tubular cell model[J]. *Mol Med Rep*. 2015 Feb 12.
- [27] Han D, Sun M, He PP, et al. Ischemic Postconditioning Alleviates Brain Edema After Focal Cerebral Ischemia Reperfusion in Rats Through Down-Regulation of Aquaporin-4[J]. *J Mol Neurosci*. 2015 Feb 8.
- [28] 孙凯, 刘志苏, 孙权. 缺血后处理对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *武汉大学学报* 2004; 25: 104-107
- [29] 薛聪龙, 付晓光, 齐志敏. 缺血后处理与缺血预处理对大鼠肝脏保护作用比较研究. *辽宁医学院学报* 2007;28: 23-26
- [30] 袁贵秀, 常业恬, 李李, 等. 缺血后处理对兔肝脏热缺血再灌注损伤的保护[J]. *中国现代手术学杂志*, 2007,11(2):98-100.
- [31] Jiang Y, Gu XP, Qiu YD, et al. Ischemic preconditioning decreases C-X-C chemokine expression and neutrophil accumulation early after liver transplantation in rats. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(9): 2025-9.
- [32] 郝悦, 周新民. 左旋精氨酸对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *世界华人消化杂志*, 2003,11,(10):1636-8.
- [33] Mart M, Morales A, Colell A, et al. Mitochondrial glutathione, a key survival antioxidant[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(11):2685- 700.
- [34] 柯庆宏, 郑树森, 梁廷波, 等. 高渗盐水预处理可减轻中性粒细胞介导的肝脏缺血再灌注损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2007,23(7): 1326- 30.
- [35] 赵晶, 毕旭东, 穆长征, 等. 高渗盐水对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. *中国老年学杂志*, 2013,33(5):1096- 1100.
- [36] 高建虎, 卢绮萍. 丹参预处理对肝脏缺血再灌注损伤后磷酸化真核生物翻译起始因子 2 $\alpha$  和 caspase12 的影响[J]. *中华消化外科杂志*, 2013,12(6):460- 4.
- [37] Chen T, Cheng M, Yuan Z, et al. Protective role of Shenfu on ischemia-reperfusion injury of rat liver grafts[J]. *Transplantation Proceedings*, 2012, 44(4):978-81.
- [38] Keles MS, Demirci N, Yildirim A, et al. Protective effects of N-acetylcysteine and Ginkgo biloba extract on ischaemia-reperfusion-induced hepatic DNA damage in rats [J]. *Clinical and Experimental Medicine*, 2008, 8(4):193-8.
- [39] 林胜璋, 余耀军, 游涛, 等. 大黄素对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的预防作用[J]. *中国中西医结合外科杂志*, 2006, 12(2):136- 138.
- [40] Lin CM, Lee JF, Chiang LL, et al. The protective effect of curcumin on ischemia-reperfusion induced liver injury[J]. *Transplantation Proceedings*, 2012, 44(4):974-7.
- [41] 王建珍, 杨贺, 马增瑞. 瑞芬太尼后处理及其联合异丙酚后处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(1) :110- 113.
- [42] 刘洪珍, 文先杰, 杨承祥等. 比较异丙酚预处理及后处理对肝缺血再灌注损伤保护作用[J]. *中国现代医学杂志*, 2011, 21(20) :2399-2402.
- [43] 阎旭艳, 曹定睿, 刘晓利. 丙泊酚后处理对大鼠肝缺血再灌注损伤时 Toll 样受体 4、NF- $\kappa$ B 及血清 TNF- $\alpha$  表达的影响[J]. *中国医疗前沿*, 2011, 06(19) :37-38.

- [44] 张琰, 冷玉芳, 方七五. 异丙酚后处理联合缺血后处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2010,30(1): 86-89.
- [45] 窦俊峰, 王家祥. 乌司他丁联合高渗盐水对肝脏缺血再灌注损伤的影响及作用机制的实验研究[J]. 中国医疗前沿, 2008,03(24): 1-2.
- [46] Song X, Zhang N, Xu H, et al. Combined preconditioning and postconditioning provides synergistic protection against liver ischemic reperfusion injury[J]. International Journal of Biological Sciences, 2012,8(5):707-18.

## 致 谢

首先衷心感谢我的导师欧阳军教授给予我的信任、支持、鼓励和帮助。三年来恩师不仅在生活中给予真切的关怀、学业上给予细心的指导和帮助，而且在我的课题研究上给予了莫大的关怀和启发。在此向恩师的辛勤培育和不倦教诲表示崇高的敬意和衷心的感谢！

感谢石河子大学医学院第一附属医院急诊外科全体医护人员在我课题实验中以及临床学习期间给予的支持、鼓励与帮助。

感谢石河子大学医学院第一附属医院科教科主任吴向未老师以及检验科和病理科相关老师提供的良好实验条件和宽松的科研环境，保证我能顺利的完成各项实验任务。

感谢石河子大学医学院郭淑霞等老师在我课题中给予的统计学方面的指导和帮助。

感谢石河子大学医学院及第一附属医院、研究生办公室的领导和老师三年来给予的关心和帮助。

感谢我的工作单位解放军第五四六医院全体领导及战友三年来给予我的帮助和支持。

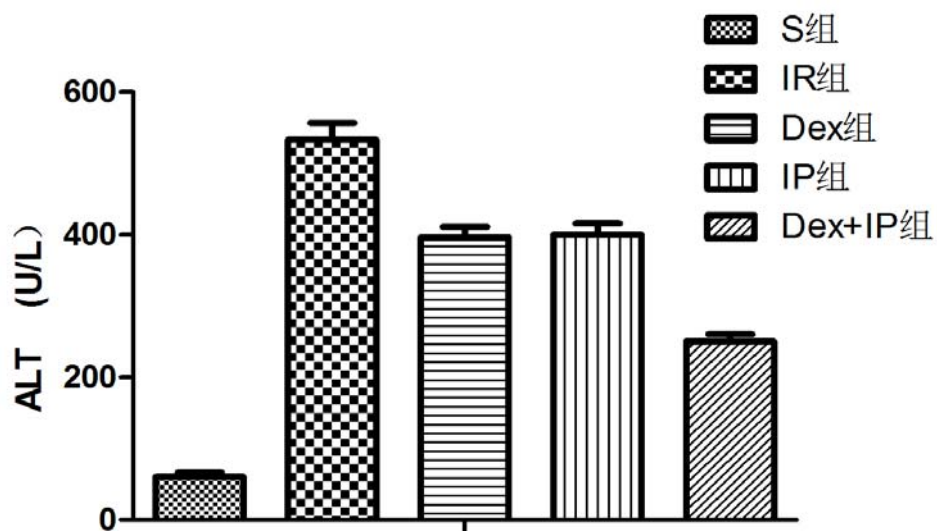
感谢我的家人长期以来对我的理解、关爱与支持，他们永远是我的坚强后盾。

感谢我的同学和朋友们，有了你们的支持、帮助和陪伴，我的生活才会如此丰富多彩。

感谢石河子大学三年来给予的培养，衷心祝愿母校在今后的发展中繁荣昌盛、前程似锦！

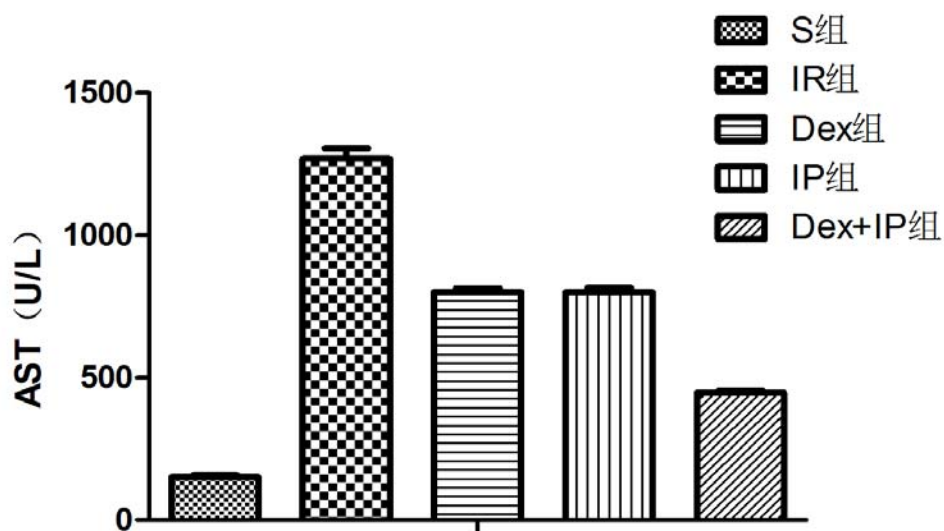
最后，感谢所有的老师、同学、战友和朋友们，祝愿你们在今后的工作和学习中身体健康，万事如意，家庭幸福！

### 附录



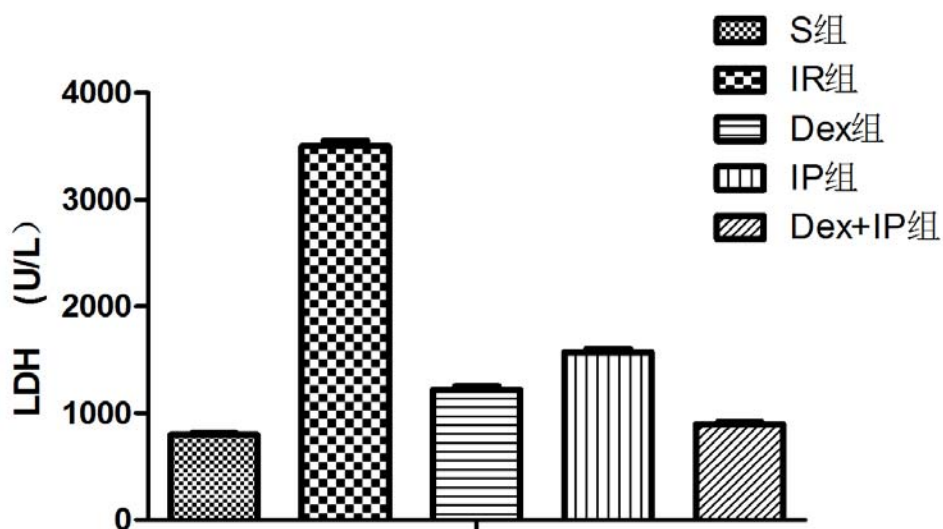
各组大鼠血清 ALT 浓度

Serum concentration of ALT in every group



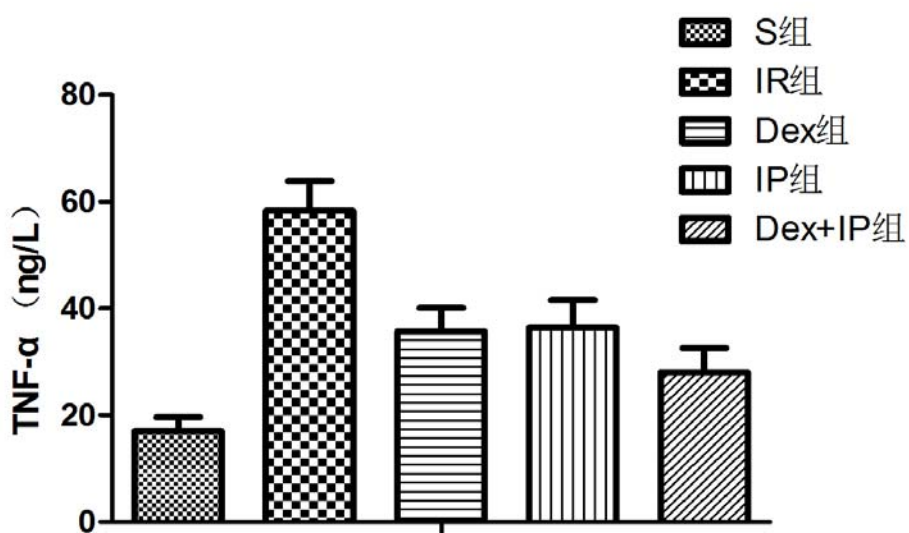
各组大鼠血清 AST 浓度

Serum concentration of AST in every group



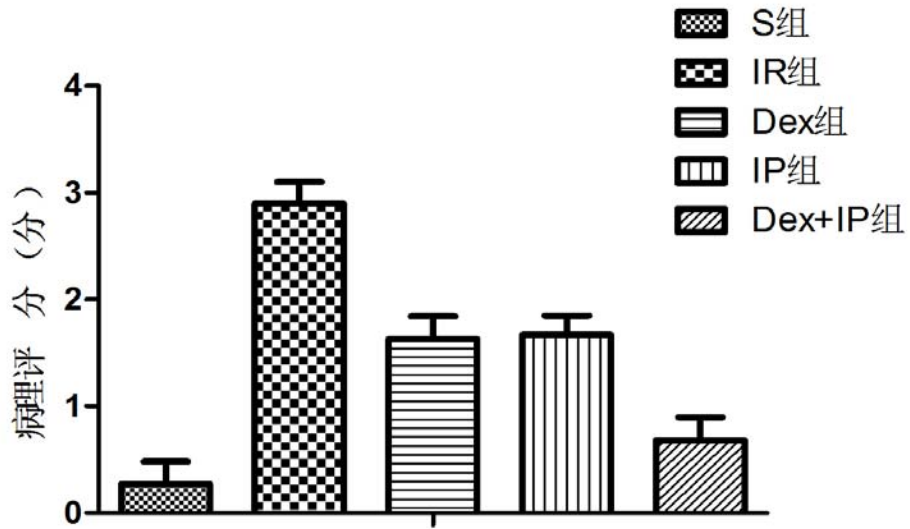
各组大鼠血清 LDH 浓度

Serum concentration of LDH in every group



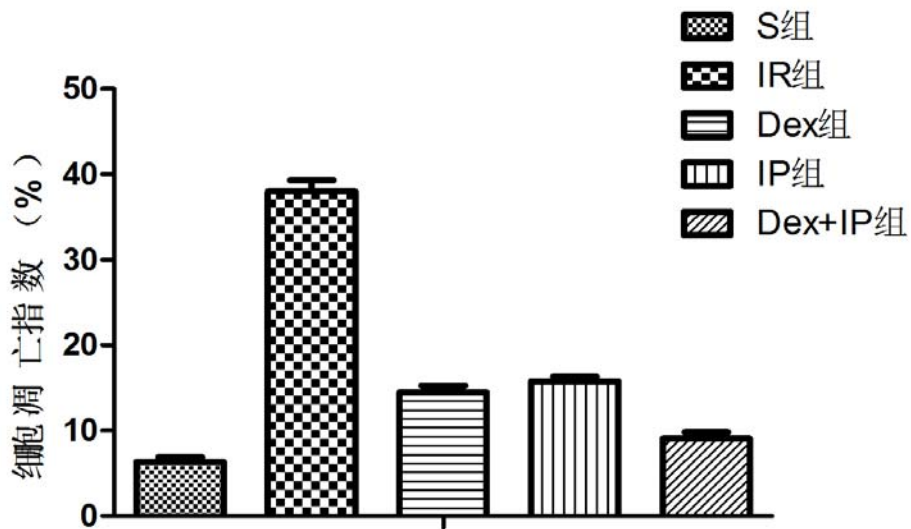
各组大鼠血清 TNF- $\alpha$  浓度

Serum concentration of TNF- $\alpha$  in every group



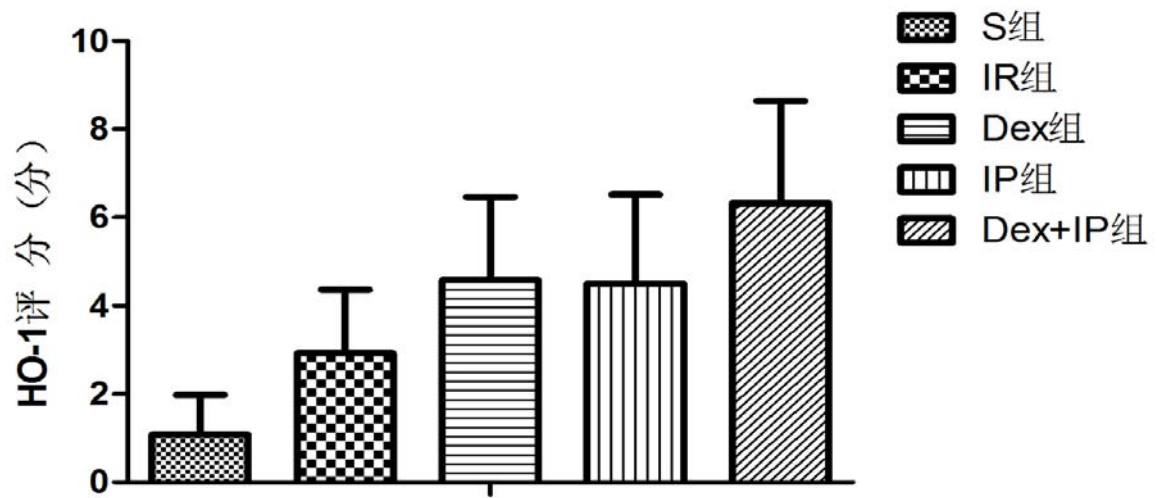
各组间肝脏组织病理评分

Liver histopathological change in every group



各组肝脏组织细胞凋亡指数

Liver apoptosis status in every group



各组肝脏组织 HO-1 的表达评分  
Expression of HO-1 in every group

## 作者简介

郭友祥，男，生于1986年12月，籍贯重庆万州。2005年毕业于石河子大学医学院临床医学专业，获医学学士学位。同年保留研究生学籍，入伍分配到解放军第五四六医院工作。于2012年9月在石河子大学医学院外科学专业学习。

### 在学期间主要参与的研究项目：

在导师的指导下完成课题“右美托咪定联合缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的作用”及“血必净联合缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的作用”的研究。

### 在校期间发表的文章：

- 1.郭友祥、欧阳军、张磊等.右美托咪定联合缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的作用[J].中华急诊医学，录用待发表；
- 2.郭友祥、欧阳军、张磊等.血必净联合缺血预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的作用[J].中国急救医学，录用待发表。

石河子大学硕士研究生学位论文  
导师评阅表

研究生姓名	郭友祥	学制	三年
专业	外科学	研究方向	肝胆外科疾病的临床与基础研究

学术评语:

该论文的选题意义在于: 肝脏缺血再灌注损伤 (Hepatic ischemia re-perfusion injury, HIRI) 是肝胆外科中一个常见的且不容忽视的病理生理现象, 它是失血性休克、复杂的肝叶切除及严重的肝创伤等术后肝功能异常, 原发性肝移植无功能、肝功能衰竭的重要原因。故如何预防和减少 HIRI 是目前面临的一个重大问题。右美托咪定具有脏器保护作用, 且其本身就是一种辅助麻醉用药, 在肝脏手术中既可提高麻醉效果又可起到脏器保护作用, 一举两得, 是肝脏手术中的理想用药。

在论文进行前, 查阅大量与研究方向及相关领域的前人成果和最新前沿动态, 进行归纳总结, 以保证对所研究的相关内容有足够的了解, 使得在后面论文的进行阶段能够顺利进行。论文进度一切按照开题时计划进行, 目前已完成。

该论文所有资料、实验结果和分析数据均真实可靠, 所得结论和观点正确, 逻辑较严密, 推理准确。

该论文的创新点在于目前国内外对于“右美托咪定”干预对 HIRI 作用研究尚少, 而“右美托咪定”联合“缺血预处理”对 HIRI 的作用尚未见报道。故本课题联合右美托咪定预处理及缺血预处理两种方式, 共同作用于大鼠肝脏缺血再灌注模型, 得出两者对 HIRI 的作用, 为临床工作中 HIRI 的预防提供一定的理论依据。论文写作上论述有条理, 表述清楚, 写作规范。

本实验不足之处在于只研究了右美托咪定在单一计量、单一时间及单一途径给药时对大鼠 HIRI 的作用, 对不同计量、不同时间及不同给药途径的作用强度尚不明确, 需进一步研究, 以获得右美托咪定对 HIRI 最佳效果。

指导教师签字:

2015 年 6 月 4 日

