

文章编号 1006-8147(2014)04-0267-04

论著

含饱和氢气灌注液对大鼠肝脏冷缺血再灌注肺损伤的影响

巫强¹,朱志军²,徐倩¹,丁梅¹,王玉亮³

(1.天津医科大学研究生院,天津 300070;2.北京友谊医院肝移植病房,北京 100050;3.天津市卫生部危重病急救医学重点实验室,天津 300384)

摘要 目的:评价含饱和氢气乳酸林格灌注液对大鼠肝脏冷缺血再灌注所引起的肺损伤的影响。方法:健康雄性 Wistar 大鼠 24 只,随机分为对照组(S组)、普通灌注液组(I/R组)及含饱和氢气灌注液组(H组),每组 8 只,3 组给予相应实验处理。3 组大鼠均于再灌注 6 h 后经下腔静脉采血离心获取血清,测定血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素-1 β (IL-1 β)的浓度。经腹主动脉采血监测动脉血气。取血后处死大鼠获取肺脏,检测肺组织丙二醛(MDA)的含量及超氧化物歧化酶(SOD)的活性,光镜下观察肺组织病理学改变。**结果:**血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 水平为 I/R 组>H 组>S 组($P<0.05$);肺组织中 MDA 浓度为 I/R 组>H 组>S 组($P<0.05$);而肺组织中 SOD 活性 S 组>H 组>I/R 组($P<0.05$)。各组动脉血 PaO₂ 水平为 S 组>H 组>I/R 组($P<0.05$),各组中 PaCO₂ 差异无统计学意义($P>0.05$)。S 组肺组织形态结构未见明显异常,I/R、H 组均见肺组织损伤,H 组损伤较 I/R 组减轻。**结论:**含饱和氢气乳酸林格灌注液可以降低炎症反应抑制机体脂质过氧化反应,减轻大鼠肝脏冷缺血再灌注肺损伤,改善肺功能。

关键词 氢;肝;肺;氧化应激;缺血再灌注损伤;大鼠

中图分类号 R617

文献标志码 A

Effects of hydrogen-rich perfusion on lung injury by hepatic cold ischemia/reperfusion in rat

WU Qiang¹, ZHU Zhi-jun², XU Qian¹, DING Mei¹, WANG Yu-liang³

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Liver Transplantation, Beijing Friendship Hospital, Beijing 100050, China; 3. The Key Laboratory of Critical Care of Medicine Ministry of Health, Tianjin 300384, China)

Abstract Objective: To evaluate the effects of hydrogen-rich Lactate Ringer's perfusion solution on lung injury caused by hepatic cold ischemia/reperfusion in rats. **Methods:** Twenty-four healthy male Wistar rats, were randomly divided into control group (S group), common perfusion solution group (I/R group), hydrogen-rich liver perfusion solution group (H group) with 8 in each, before corresponding experimental treatment was given. Six hours after reperfusion, serum was obtained by centrifuging the venous blood to detect the level of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-1 β (IL-1 β). Abdominal aortic blood was taken to monitor arterial blood gas. Lungs of all rats in three groups were removed after venous blood collection from inferior vena cava to detect the level of malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) in lungs. The pathological changes of lung were evaluated by light microscopy. **Results:** The levels of TNF- α , IL-6 and IL-1 β in serum ranked I/R group > H group > S group ($P<0.05$); And the descending order of MDA concentrations in the lung tissue was I/R group > H group > S group ($P<0.05$); And for SOD activity of lung tissue, S group > H group > I/R group ($P<0.05$). The levels of arterial blood PaO₂ ranked group S > H group > I/R group ($P<0.05$) with no statistically significant difference between groups of PaCO₂ ($P>0.05$). The modality and structure of lung tissue in group S were normal. The injury in groups I/R and H were obvious, and the injury in group H was alleviated compared to group I/R. **Conclusion:** Hydrogen-rich Lactate Ringer's liver perfusion solution can reduce the lung injury caused by hepatic cold ischemia/reperfusion injury.

Key words hydrogen; liver; pulmonary; oxidative stress; ischemia/reperfusion injury; rat

随着我国医学技术的不断发展和进步,肝移植已经成为治疗终末期肝病的常规手术。有文献报道,急性肺损伤成为了肝移植术后常见和严重的并发症,发生率约为 34.2%~77.8%^[1-2]。低温灌注技术是

基金项目 天津市卫生行业重点攻关项目(12KJ101),国家高技术研究发展计划(2012AA021001)

作者简介 巫强(1987-),男,硕士在读;研究方向:肝移植;通信作者:朱志军,E-mail:zhu-zhijun@medmail.com.cn。

肝脏移植手术中的重要环节,在肝脏缺血再灌注的过程中,大量氧自由基释放入血,引起过氧化反应和全身的炎症反应。氢气具有抗氧化的作用,已有研究证实吸入氢气或静脉注射含氢生理盐水对实验动物肝脏、肾脏甚至皮瓣等器官的缺血再灌注损伤有保护作用^[3-5]。含氢器官灌注液能否减轻低温再灌注导致的肺损伤的研究尚少,有研究称含饱和氢气的

生理盐水能够减轻小肠缺血再灌注引起的肺损伤^[6],本研究采用大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤的模型,并将氢气充入乳酸林格灌注液,观察含饱和氢气乳酸林格灌注液对大鼠肝脏冷缺血再灌注肺损伤的保护作用,为临床肝移植的治疗及预后提供参考。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和仪器 TNF- α 、IL-6、IL-1 β ELISA试剂盒(美国 R&D 公司);丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性试剂盒(南京建成生物工程有公司);Microfuge 22R Centrifuge 离心机(美国 Beckman coulter 公司);RM2016 病理切片机(美国 Leica 公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司, BX51TF);气相色谱分析仪(美国 Agilent 公司, 6890N GC);血气分析仪(GEM Premie 3000)。

1.2 含饱和氢气乳酸林格灌注液的制备 本研究参照 Ohsawa 等^[7]介绍的方法制备含饱和氢气的乳酸林格灌注液。将装有 4℃ 100 mL 乳酸林格液容器内的气体排空,用输血器将该容器与氢气罐相连,从而向容器内充入氢气,0.4 MPa 的压力维持 4 h,氢气则接近饱和状态,采用气相色谱分析法测定乳酸林格液中氢气的浓度,确保氢气浓度在 0.6 mmol/L,制备后的灌注液于 4℃ 常压保存,并于 12 h 内使用以确保氢气浓度稳定。

1.3 实验动物分组及模型的建立 雄性 Wistar 大鼠 24 只,随机分为 3 组,各组术前 12 h 禁食,自由饮水。(1)对照组(S 组):沿腹正中线开腹游离肝脏和血管后关闭腹腔。(2)普通灌注液组(I/R 组):参照 Nozato 等^[8]建立大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤模型。开腹、游离肝脏以及血管,无损伤血管夹阻断入肝血流及右肾静脉水平以上下腔静脉。在门静脉阻断部位上方用胰岛素针注入 1 mL 含 30 U 肝素的常温生理盐水使肝脏及全身血流肝素化,于膈肌下阻断肝上下腔静脉。门静脉阻断水平以上插入连接灌注液的 1 mL 注射器针头(0.5 mm \times 25.0 mm)并用血管夹将其固定后以 4℃ 乳酸林格液灌注肝脏,于肝下腔静脉阻断以上部位切开 1 mm 的缺口作为流出通道,灌注滴速 6~8 mL/min,压力 10 kPa(1 kPa=7.5 mmHg),时间 20 min。停止灌注后,8-0 血管线缝合肝下腔静脉流出口、无菌棉球压迫门静脉穿刺点止血,开放血流并复温后关腹。(3)含饱和氢气组(H 组):操作同 I/R 组,灌注液采用 4℃ 含饱和氢气的乳酸林格液。

1.4 样本的采集和观察指标的测定

1.4.1 血清中炎症因子检测 S 组于游离血管 6 h

后, I/R 和 H 组于再灌注 6 h 后经下腔静脉采血 3.5 mL,于 3 500 r/min 离心 10 min,留取上层血清,采用 ELISA 测定血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的浓度。

1.4.2 动脉血气分析 经腹主动脉采集 1 mL 血检测血气,测得 PaO₂ 和 PaCO₂,以评价肺功能。

1.4.3 肺组织氧化应激指标检测 采血后处死大鼠,获取肺脏组织,0.5 g 肺组织与 4.5 mL 生理盐水制作成组织匀浆,采用比色法测定肺组织匀浆中 MDA 的含量及 SOD 的活性。

1.4.4 形态学检查 部分肺组织用 10% 甲醛溶液固定后常规石蜡包埋,切成 4 μ m 薄片,行苏木素-伊红(HE)染色后于光学显微镜下观察肺组织形态的改变。

1.5 统计学处理 应用 SPSS18.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中炎症因子指标水平 与 S 组相比, I/R 组和 H 组大鼠再灌注后 6 h 血清 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的浓度均升高($P<0.05$);与 I/R 组相比, H 组各指标均降低($P<0.05$)。见表 1。

表 1 各组血清 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 水平($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Serum TNF- α 、IL-6 and IL-1 β levels in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TNF- α /(ng/L)	IL-6/(ng/L)	IL-1 β /(ng/L)
S	8	127.18 \pm 7.34	70.57 \pm 8.12	142.83 \pm 9.01
I/R	8	273.29 \pm 10.49 ^a	149.11 \pm 9.38 ^a	291.43 \pm 11.04 ^a
H	8	191.91 \pm 8.17 ^{ab}	103.25 \pm 637 ^{ab}	235.37 \pm 10.28 ^{ab}

与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 I/R 组比较,^b $P<0.05$

2.2 血气分析结果 与 S 组相比, I/R 组和 H 组在肝脏缺血再灌注 6 h 后 PaO₂ 显著降低;H 组的 PaO₂ 显著高于 I/R 组($P<0.05$)。各组中 PaCO₂ 差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 各组动脉血液 PaO₂ 和 PaCO₂ 水平($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Arterial blood PaO₂ and PaCO₂ levels in each group($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PaO ₂ /(mm Hg)	PaCO ₂ /(mm Hg)
S	8	90.17 \pm 4.81	44.19 \pm 5.27
I/R	8	71.95 \pm 7.20 ^a	40.31 \pm 6.83
H	8	82.03 \pm 6.18 ^{ab}	38.39 \pm 4.34

与 S 组比较,^a $P<0.05$;与 I/R 组比较,^b $P<0.05$

2.3 肺组织氧化应激反应指标水平 与 S 组相比, I/R 组和 H 组大鼠再灌注 6 h 后肺组织匀浆中 MDA 的含量升高, SOD 的活性降低($P<0.05$);与 I/R 组相比, H 组 MDA 的含量降低, 而 SOD 活性升高($P<0.01$)。见图 1。

2.4 肺组织病理学改变 光镜下, S 组大鼠的肺组



与 S 组比较,^a*P*<0.05; 与 I/R 组比较,^b*P*<0.01

图 1 3 组肺组织中 MDA、SOD 的水平

Fig 1 Lung tissue MDA, SOD levels in each group

织结构完整,肺泡间隔均匀一致,肺泡腔清晰,肺泡壁光滑,未见明显的炎症细胞浸润;I/R 组大鼠肺组织可见大量的炎症细胞浸润,肺间隔明显增宽,肺

泡萎陷,大量红细胞渗出,毛细血管充血;H 组大鼠肺组织病理改变较 I/R 组明显减轻,炎性细胞浸润明显减少,少量红细胞渗出。见图 2。

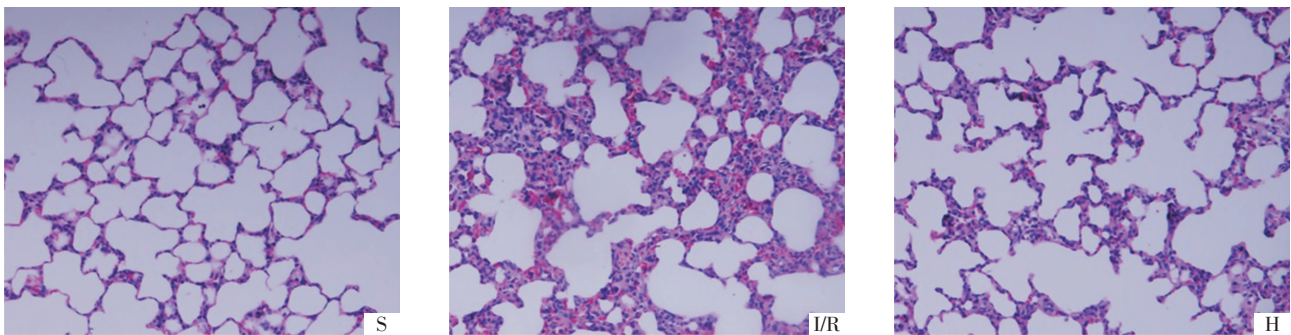


图 2 3 组大鼠肺组织形态学改变(HE,×200)

Fig 2 The pathological changes of lung in S, I/R and H groups(HE,×200)

3 讨论

缺血再灌注损伤是许多不同的机制相互作用的结果,TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 等细胞因子在缺血再灌注损伤过程中发挥着重要的作用,TNF- α 由活化的单核巨噬细胞产生,其可直接介导细胞线粒体的毒性作用,使内皮细胞肿胀,微循环血管的通透性增加,局部发生缺血和血栓形成;同时激活炎性细胞、上调炎性因子 IL-6、IL-1 β 及氧自由基的水平。而 IL-1 β 又能够反过来刺激 TNF- α 的产生,促进氧自由基的生成,形成恶性循环。更为重要的是,在器官移植中,炎症因子不仅是在移植器官中起介导作用,其在器官再灌注过程中随血流进入全身循环将对远处器官造成损伤^[9]。已有研究证实,含饱和氢气的生理盐水或保存液能够明显降低肾脏缺血再灌注损伤产生的 TNF- α 等炎性介质,从而起到减轻组织器官损伤的作用^[10-11]。本研究的实验结果显示,恢复器官灌注后 6 h,含饱和氢气的器官灌注液灌注肝脏的实验组血清内细胞炎性因子水平 TNF- α 、IL-6 以及 IL-1 β 均明显低于不含饱和氢气的普

通灌注液组。可以认为,氢气在灌注过程中起到了一定程度上的抑制肝脏缺血再灌注炎症反应发生及炎性细胞因子产生的作用。

缺血再灌注损伤的过程中,脂质过氧化通过启动链式反应引起细胞代谢异常,MDA 是脂质过氧化的产物,当超过细胞自身修复能力时即启动凋亡程序,最终导致细胞死亡。MDA 不仅反映脂质过氧化程度,也间接反映氧自由基生成的量,因此它被广泛用作组织损伤的可靠标志^[12]。SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,也是体内清除自由基的首要物质,其活性的高低可间接反映机体清除氧自由基的能力。本实验结果显示,经历缺血再灌注损伤的两个实验组 SOD 水平均低于对照组,而作为组织损伤标志物的 MDA 水平明显升高,说明缺血再灌注对实验动物抗氧化应激的能力产生了负面影响。在介导氧化损伤的氧自由基中,以 $\cdot\text{OH}$ 和 ONOO^- 的毒性最强,可导致核酸裂解、脂质氧化及蛋白质活动停止,是导致 I/R 损伤的重要介质。H₂ 是小气体分子,易通过细胞膜等膜性结构,可选择性地清除细胞毒

性氧自由基,保护DNA、蛋白质等不被破坏,维持正常的线粒体功能,增加细胞内SOD的活性^[13]。本实验中含饱和氢气灌注液的实验组SOD水平明显高于普通灌注液组,同时其MDA水平则明显低于普通灌注液组,说明氢气对机体的抗氧化应激能力起到了保护作用,类似的研究亦有相似的结果报道^[6]。

肺外器官发生缺血再灌注损伤后,炎症介质通过全身血液循环到达肺,造成肺泡及毛细血管损伤,同时可聚集并活化白细胞和巨噬细胞,促使氧自由基、蛋白溶解酶、IL-6等多种炎症介质释放,进一步加重肺组织损伤,导致急性呼吸窘迫综合征(ARDS)的发生。光镜下肺组织表现为大量的炎性细胞浸润,肺间隔明显增宽,肺泡萎陷,大量红细胞渗出,毛细血管充血。本实验大鼠肺组织病理学检查可见H组大鼠肺组织病理改变较I/R组明显减轻,炎性细胞浸润明显减少,少量红细胞渗出。上述病变导致肺通气、换气功能障碍,动脉血气分析可见动脉血氧分压降低。ARDS早期低氧血症且二氧化碳弥散能力为氧气的20倍,故二氧化碳分压可不受影响甚至出现低碳酸血症。本实验3组大鼠动脉血气分析结果提示,S组动脉血氧分压明显高于I/R组和H组,而H组的PaO₂显著高于I/R组($P < 0.05$)。明确提示含饱和氢气灌注液对缺血再灌注损伤所致急性肺损伤的肺功能有保护作用。

综上所述,含饱和氢气乳酸林格灌注液可以降低炎性反应抑制机体脂质过氧化反应,减轻大鼠肝脏冷缺血再灌注肺损伤,改善肺功能。

参考文献:

- [1] Mehrabi A, Fonouni H, Müller S A, et al. Current concepts in transplant surgery: liver transplantation today[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2008, 3(393): 245
- [2] Hong S K, H Wang S, Lee L S, et al. Pulmonary complications following adult liver transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2006, 9(38): 2979
- [3] Sun Q, Kang Z, Cai J, et al. Hydrogen-rich saline protects myocardium against ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Exp Biol Med(Maywood)*, 2009, 234(10): 1212
- [4] Zhao L, Wang Y B, Qin S R, et al. Protective effect of hydrogen-rich saline on ischemia/reperfusion injury in rat skin flap[J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2013, 14(5): 382
- [5] Wang F, Yu G, Liu S Y, et al. Hydrogen-rich saline protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *J Surg Res*, 2011, 167(2): 339
- [6] Mao Y F, Zheng X F, Cai J M, et al. Hydrogen-rich saline reduces lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 381(4): 602
- [7] Ohsawa M, Ishikawa K, Takahashi M, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nat Med*, 2007, 13(6): 688
- [8] Nozato E, Shiraishi M, Miyaguni T, et al. In situ perfusion of the liver under portosystemic shunt in rats: a stable model of cold ischemia for orthotopic liver transplantation[J]. *Transplantation Proceedings*, 1998, 30(7): 3718
- [9] Rezende-Neto J B, Moore E E, Melo de Andrade M V, et al. Systemic inflammatory response secondary to abdominal compartment syndrome: stage for multiple organ failure[J]. *J Trauma*, 2002, 53(6): 1121
- [10] Colletti L M, Green M. Lung and liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat is increased by exogenous lipopolysaccharide which also increases hepatic TNF production in vivo and in vitro[J]. *Shock*, 2001, 16(4): 312
- [11] 任恒昌, 杜洪印, 喻文立, 等. 含饱和氢气肾保存液对大鼠肾脏冷缺血再灌注损伤的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(12): 1491
- [12] Jiang D, Wu D, Zhang Y, et al. Protective effects of hydrogen rich saline solution on experimental testicular ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *J Urol*, 2012, 187(6): 2249
- [13] Xie K, Yu Y, Pei Y, et al. Protective effects of hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative stress and HMGB1 release[J]. *Shock*, 2010, 34(1): 90

(2013-11-26 收稿)

欢迎投稿 欢迎订阅