

腺苷 A2a 受体激动剂(CGS21680) 对幼龄大鼠体外循环肝脏损伤的保护作用

储培逸 葛建军 左逸孔 祥 赵智伟 周正春

摘要 目的 探讨腺苷 A2a 受体激动剂(CGS21680) 对幼龄大鼠体外循环肝脏损伤的保护作用。方法 取健康 SD 幼年大鼠 36 只, 随机均分为 3 组: 假手术组、CPB 组及 CGS21680 组。建立幼龄大鼠体外循环模型, CPB 组与 CGS21680 组需要使用预充液进行 60 min 的体外循环, CGS21680 组在体外循环前根据药物说明书加入 CGS21680 (120 μg/kg) 至预充液中。假手术组仅仅进行抗凝及肝素化。分别于肝素化后转流前(T0)、转流 30 min(T1)、转流结束后(T2) 以及术后 1 h(T3) 检测血清白细胞介素(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST) 和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)。术后 1 h 取肝脏组织 检测组织中 IL-1β、IL-6、TNF-α 水平, 并行 HE 染色观察组织形态改变。结果 CPB 组幼龄大鼠的血清中不同时间点 IL-1β、TNF-α、AST 和 ALT 水平显著高于假手术组($P < 0.05$), CGS21680 组的上述指标则是显著低于 CPB 组($P < 0.05$)。CPB 组血清中抗氧化指标 GSH-PX 各时间点显著低于假手术组($P < 0.05$), CGS21680 组中的抗氧化指标则显著高于 CPB 组。而 CPB 组肝脏中的 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 含量显著高于假手术组($P < 0.05$), CGS21680 组中各项指标则显著低于 CPB 组($P < 0.05$)。结论 腺苷受体激动剂 CGS21680 可以显著减轻幼龄大鼠体外循环导致的肝脏损伤。

关键词 体外循环; A2a 受体激动剂; 炎症反应; 幼龄大鼠
中图分类号 R 619+.5
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)07-1028-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.07.005

现如今心脏手术的成功离不开体外循环技术(cardiopulmonary bypass, CPB), 该技术对改善患者预后有着十分重要的作用^[1]。虽然现在越来越多的患者接受心脏手术, 但是 CPB 这种技术由于其对患者全身是一种非常大的刺激, 容易给患者带来多处组织损伤。之前的研究大多更关注心脏、肺及肾

脏等器官, 而对肝脏的关注不够, 大约 10% 的心脏手术患者, 往往存在着术后肝脏损伤。因此, 寻找到一种可以减轻 CPB 对于肝脏所带来的损害是十分有必要的。

肝脏损伤的机制包含全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 与氧化应激反应。SIRS 是由一系列复杂的炎症反应所引起的, 如巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞和血小板的激活, 以及细胞因子和白三烯的增加^[2]。研究^[3]表明, 嘌呤核苷腺苷可以调节多种炎症反应。其中 G 蛋白偶联受体, 包括 A1、A2a、A2b 和 A3, 可以显著地发挥腺苷的细胞活性^[4-5]。正是由于 A2a 受体的存在, 抗炎作用十分突出^[6]。之前有研究^[7]表明, 腺苷 A2a 受体激动剂的激活可以减轻 CPB 后的肺损伤, 但对减轻肝损伤的报道却极少。该研究通过构建幼龄大鼠的 CPB 模型, 探讨腺苷 A2a 受体激动剂(CGS21680) 是否可以减轻幼龄大鼠体外循环带来的肝损伤。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料 健康清洁级幼龄 SD 大鼠 36 只, 5~6 周龄, 体质量(213 ± 10.5) g, 在相对清洁及恒温的环境下, 予以标准饲料饲养。腺苷 A2a 受体激动剂 CGS21680 购自英国 Tocris 公司。

1.2 方法

1.2.1 分组 将 36 只健康幼龄大鼠随机分为 3 组: 假手术组、CPB 组及 CGS21680 组, 每组 12 只, 幼龄大鼠术前 12 h 禁食及 6 h 禁水后, 假手术组不进行 CPB。CGS21680 组在转流前往贮血器中加入 CGS21680(120 μg/kg)。

1.2.2 幼龄大鼠 CPB 模型的建立 本研究采用了 Dong et al^[8] 开发的成年大鼠 CPB 模型, 经腹腔内麻醉后气管切开插管接呼吸机。左侧股动脉穿刺 24 G 静脉留置针用于监测平均动脉压(MAP) 及血气。经右侧颈静脉置入 20 G 多孔套管至右心房以引流静脉血入贮血器, 再通过微量蠕动泵以及膜式肺氧合器, 从右侧股动脉灌注。通过右侧颈静脉予以幼

2019-02-25 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81470530)

作者单位: 安徽医科大学附属省立医院, 合肥 230001

作者简介: 储培逸, 男, 硕士研究生;

葛建军, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-

mail: aygejianjun@163.com

龄大鼠全身肝素化。CPB 预充液采用的是含血预充,共 20 ml。转流开始后约 10 min 流量逐渐加大到每分钟 100 ml/kg,并维持此转速 1 h 后停机,严密观察幼龄大鼠的生命体征变化。

1.3 标本收集 分别于肝素化后转流前(T0)、CPB 30 min(T1)、转流结束时(T2)和术后 1 h(T3)从左股动脉采集血样,高速离心机 5 000 r/min 离心 10 min 后,取血浆保存于 -80 °C 冰箱留待检测各项指标。术后 1 h 后处死幼龄大鼠,打开胸腔,分离肝脏并分成两部分,一部分于 -80 °C 冰箱保存进行相关炎症因子等指标检测,剩余的肝脏切片后,用 4% 甲醛固定,光学显微镜观察形态学变化。

1.4 指标检测

1.4.1 炎症因子的检测 ELISA 法:用根据制造商的指导为幼龄大鼠制备的酶联免疫吸附测定试剂盒测定血液中白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α) 等浓度,其中 IL-1 β 浓度以 ng/L 表示,IL-6 和 TNF- α 浓度则以 μ g/L 表示。

1.4.2 肝功能指标的检测 通过自动分析器(日本日立公司)检测幼龄大鼠的血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate transaminase, AST)水平,浓度均以 U/L 表示。

1.4.3 抗氧化指标谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-PX)检测 根据试剂盒(南京建成生物制品)说明书指示测定 GSH-PX 活性,活性以酶活力单位 U 表示。

1.5 肝脏组织 HE 染色 肝脏组织标本石蜡包埋后,用 HE 染色组织切片并在光学显微镜下观察,并由有经验且对实验不知情的病理学专家进行评估。

1.6 统计学处理 使用 SPSS 19.0 软件进行统计

学分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间均数比较采用单因素方差分析,不同时间点血清炎症指标采用重复测量方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组幼龄大鼠术后一般情况 36 只幼龄大鼠均顺利建立 CPB 模型,术后 1 h 全部存活,酸碱度(potential of hydrogen, pH)、MAP、红细胞比容(hematocrit value, HCT)、PO₂、PCO₂、iCa 等数据在整个实验中的各个时间点都很稳定,所有数据符合临床且可被接受。见表 1。

2.2 各组幼龄大鼠血清 ALT、AST 水平 ALT 及 AST 水平的变化在各组手术开始未发现差异,术中的时候,CPB 组 ALT 及 AST 水平先降低后上升,而假手术组依旧保持低水平。而随着 CGS21680 组中的药物加入,虽然并不能改变 ALT 及 AST 的变化趋势,但是相比较于 CPB 组,AST 及 ALT 的水平有明显降低($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 各组幼龄大鼠血清中炎症因子指标各时间的变化 各组幼龄大鼠血清中 IL-1 β 及 TNF- α 的水平在 T0 时无明显差异,而随着手术的开始, T1 ~ T3 各时间点,CPB 组中血清的炎症指标水平相比较于假手术组是显著上升的($P < 0.05$)。而 CGS21680 组中相对于 CPB 组的炎症指标却有显著下降($P < 0.05$)。见表 2、3。

2.4 各组幼龄大鼠肝脏炎症因子指标的变化水平 CPB 组幼龄大鼠肝脏组织的炎症指标显著上升, IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 显著高于假手术组($P < 0.05$)。而 CGS21680 组的各项炎症指标显著低于 CPB 组($P < 0.05$)。见表 4。

2.5 各组幼龄大鼠血清中抗氧化指标的变化水平

表 1 实验前后幼龄大鼠的基本情况($n = 36, \bar{x} \pm s$)

时间点	pH	MAP(kPa)	HCT(%)	PO ₂ (kPa)	PCO ₂ (kPa)	iCa(mmol/L)
术前	7.29 ± 0.05	11.03 ± 1.04	33.30 ± 5.06	11.71 ± 0.94	7.11 ± 0.71	1.00 ± 0.09
术中	7.51 ± 0.09	9.46 ± 2.00	18.90 ± 3.76	44.13 ± 12.56	3.53 ± 0.64	1.00 ± 0.15
术后	7.51 ± 0.10	8.28 ± 1.53	18.80 ± 4.10	47.44 ± 20.48	3.07 ± 0.66	1.04 ± 0.16

表 2 各组幼龄大鼠血清中 IL-1 β 表达水平($ng/L, n = 12, \bar{x} \pm s$)

时间点	假手术组	CPB 组	CGS21680 组	F 值	P 值
T0	73.63 ± 7.15	61.14 ± 15.22	63.71 ± 17.57	2.15	0.134
T1	91.01 ± 5.36*	98.87 ± 4.70#	68.58 ± 16.30 ∇	23.72	<0.001
T2	87.34 ± 4.44*	97.10 ± 4.02#	71.68 ± 17.00 ∇	15.07	<0.001
T3	87.49 ± 3.59*	94.55 ± 6.96#	71.46 ± 17.71 ∇	11.30	<0.001

与 CPB 组比较: * $P < 0.05$; 与 CGS21680 组比较: # $P < 0.05$; 与假手术组比较: $\nabla P < 0.05$

表3 各组幼龄大鼠血清中 TNF-α 表达水平(μg/L, n = 12 $\bar{x} \pm s$)

时间点	假手术组	CPB 组	CGS21680 组	F 值	P 值
T0	15.97 ± 1.04	16.65 ± 1.03	16.67 ± 1.08	1.41	0.263
T1	18.78 ± 1.10*	20.01 ± 1.18#	17.57 ± 1.08 [▽]	11.58	<0.001
T2	17.43 ± 1.38*	18.74 ± 0.74	17.32 ± 1.25 [▽]	3.44	0.047
T3	17.03 ± 1.24*	18.51 ± 0.82	16.97 ± 1.10 [▽]	5.06	0.014

与 CPB 组比较: * P < 0.05; 与 CGS21680 组比较: # P < 0.05; 与假手术组比较: [▽] P < 0.05

表4 各组幼龄大鼠肝脏中的炎症因子表达水平(n = 12 $\bar{x} \pm s$)

炎症因子	假手术组	CPB 组	CGS21680 组	F 值	P 值
IL-6(μg/L)	13.60 ± 1.12	16.70 ± 2.80*	13.28 ± 1.04#	11.47	<0.001
IL-1β(ng/L)	50.31 ± 4.73	63.63 ± 7.82*	54.59 ± 6.47#	11.11	<0.001
TNF-α(μg/L)	10.21 ± 0.73	11.08 ± 0.70*	9.95 ± 0.69#	7.42	0.002

与 CGS21680 组比较: * P < 0.05; 与假手术组比较: # P < 0.05

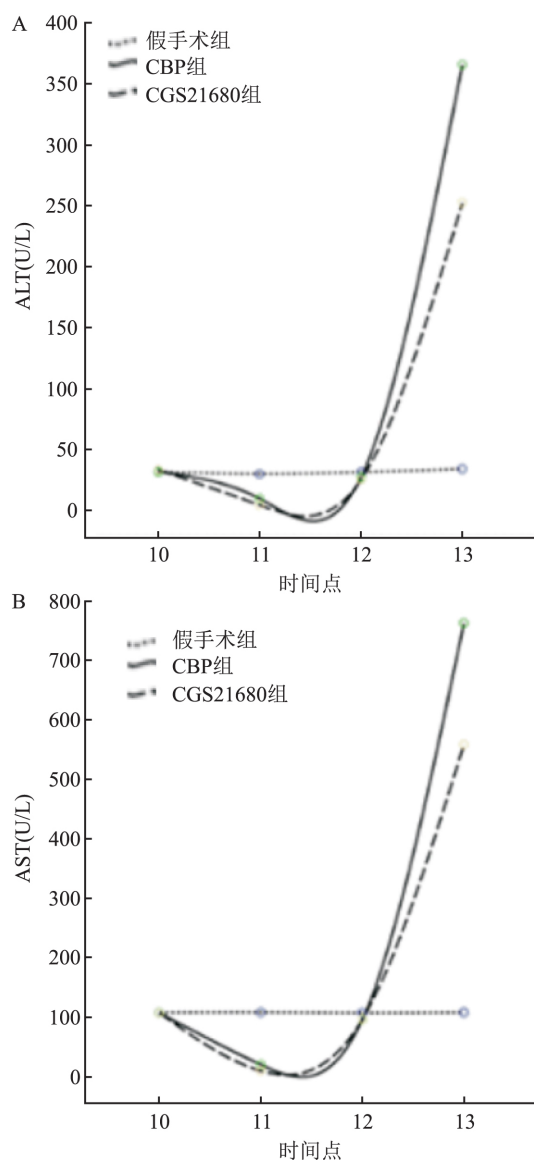


图1 各组幼龄大鼠肝酶表达水平
A: ALT; B: AST

如表5所示,各组幼龄大鼠血清中 GSH-PX 水平在 T0 时无明显差异,而 T1 ~ T3 各时间点,CPB 组与假手术组则有着显著差异(P < 0.05)。在 CGS21680 组中,幼龄大鼠的 GSH-PX 水平显著高于 CPB 组(P < 0.05)。

表5 各组幼龄大鼠血清中 GSH-PX 表达水平(U, n = 12 $\bar{x} \pm s$)

时间点	假手术组	CPB 组	CGS21680 组	F 值	P 值
T0	252.08 ± 73.88	225.55 ± 17.92	229.00 ± 12.92	0.96	0.395
T1	209.96 ± 14.97*	192.97 ± 9.77	216.67 ± 14.49#	6.66	0.049
T2	214.67 ± 19.37*	195.24 ± 7.84	219.87 ± 14.66#	5.91	0.008
T3	217.61 ± 14.70*	198.46 ± 13.56	222.35 ± 11.95#	7.40	0.013

与 CPB 组比较: * P < 0.05; 与假手术组比较: # P < 0.05

2.6 各组幼龄大鼠肝组织 HE 染色情况 假手术组肝索排列整齐,未见肿胀,而 CPB 组出现肝细胞溶解和坏死,组织紊乱,部分肝细胞水肿和少量胆红素积聚。CGS21680 组肝细胞裂解和坏死要轻于 CPB 组,但仍存在少量的肝细胞水肿和组织间隙。见图2。

3 讨论

心脏外科的 CPB 手术对于人及动物来说,术后均会产生严重的创伤,目前研究普遍认为主要是系统性炎症反应综合征,极易产生炎症等反应,这些反应大多数来说都是由于手术本身创伤、转流过程中血液与管道接触、血液细胞的破坏以及全身多处脏器缺血再灌注损伤,而产生炎症因子进入循环中导致的。在过去的三十年中,很多研究关注 CPB 后患者的心脏、肺脏及肾脏等器官损伤及保护^[9]。但现在越来越多的肝脏损伤对患者治愈率及死亡率的影响逐渐显现^[10],所以临床医师越来越多的关注术后

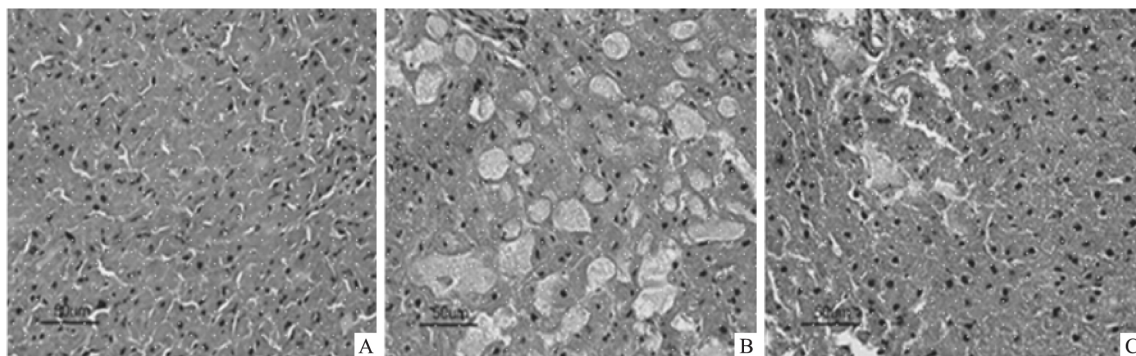


图2 3组肝组织病理图 HE ×200
A: 假手术组; B: CPB组; C: CGS21680组

肝脏损伤,寻找合适的药物来减轻CPB带来的巨大创伤一直是研究的方向。但出于伦理方面的考虑和其他影响因素,所以未能提供组织供以研究。因此,稳定的幼龄大鼠CPB模型是必需的。

本研究通过建立幼龄大鼠的CPB的模型,来观察和对比CPB组与假手术组的组织病理学及生化指标的变化,可以看出CPB后幼龄大鼠出现了肝脏损伤。而肝脏损伤会直接导致血清中的转氨酶上升,转氨酶的上升主要是指AST和ALT的上升,这可能是由于CPB的转流时间过长致使肝脏出现淤血,从而使细胞膜及线粒体受损而造成的变化。

通过检测炎症指标的变化可以看出CPB后,幼龄大鼠出现了肝脏损伤,且CPB组的幼龄大鼠的炎症指标水平明显高于假手术组,所以IL-1 β 、IL-6和TNF- α 等炎症指标的确起到了损伤肝脏的作用,这些作用可能是以补体和凝血系统的激活、内皮细胞功能障碍、血小板的活化及细胞因子产生等刺激方式触发的^[11]。

据报道,腺苷具有显著的抗炎能力^[12]。由于腺苷A_{2a}受体亚型是炎症细胞中表达的主要腺苷受体,意味着腺苷的大部分抗炎作用可能依赖于A_{2a}受体。而A_{2a}受体也被认为存在于所有炎症细胞中,包括内皮细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞、肥大细胞、中性粒细胞和T淋巴细胞^[13]。所以CGS21680可以显著减少CPB后幼龄大鼠体内的炎症指标水平,为了进一步探讨腺苷受体激动剂对幼龄大鼠肝脏保护的作用,CGS21680组中幼龄大鼠在接受CGS21680药物的干预后炎症因子的水平有着十分显著的下降,表明经过CPB后幼龄大鼠体内的大量炎症反应的减少可能的确是由于腺苷A_{2a}受体激动剂CGS21680的存在,这些结果证明药物CGS21680可以通过抗炎作用来减轻幼龄大鼠CPB

后所引起的肝脏损伤。

GSH-PX可以通过催化GSH成为氧化型谷胱甘肽(GSSG)参与抗氧化损伤的细胞防御。一些研究^[14]表明,各种刺激引起的组织损伤与GSH消耗有关。上述结果发现CPB组中GSH-PX显著低于假手术组,而CGS21680组中GSH-PX相对于CPB组来说减少却并不明显。所以说GSH-PX参与了抗氧化防御。因此,结果表明腺苷受体的激活可以抑制氧化应激从而保护幼龄大鼠CPB所导致的肝脏损伤。

综上所述,腺苷受体激动剂CGS21680的确能够显著地减轻幼龄大鼠CPB所引起的肝脏损伤,这种结果可能主要是其抗炎与抗氧化应激作用所带来的^[15]。因此,CGS21680药物可以被认为是保护肝脏损伤的潜在治疗药物,但该药物对于肝脏保护的具体机制及到临床使用等问题仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Daly R C, Dearani J A, Mcgregor C G, et al. Fifty years of open heart surgery at the Mayo Clinic [J]. Mayo Clin Proc, 2005, 80(5): 636-40.
- [2] Krawczeski C D, Woo J G, Wang Y, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentrations predict development of acute kidney injury in neonates and children after cardiopulmonary bypass [J]. J Pediatr, 2011, 158(6): 1009-15.
- [3] Michael S, Warstat C, Michel F, et al. Adenosine A_{2A}, agonist and A_{2B}, antagonist mediate an inhibition of inflammation-induced contractile disturbance of a rat gastrointestinal preparation [J]. Purinergic Signal, 2010, 6(1): 117-24.
- [4] Lebon G, Warne T, Edwards P C, et al. Agonist-bound adenosine A_{2A} receptor structures reveal common features of GPCR activation [J]. Nature, 2011, 474(7352): 521-5.
- [5] Ye L, Eps N V, Zimmer M, et al. Activation of the A_{2A} adenosine G-protein-coupled receptor by conformational selection [J]. Nature, 2016, 533(7602): 265.

- [6] Milne G R , Palmer T M. Anti-inflammatory and immunosuppressive effects of the A2A adenosine receptor[J]. *Scientific World J* , 2014 , 11(1) : 320 - 39.
- [7] Lisle T C , Gazoni L M , Fernandez L G , et al. Inflammatory lung injury after cardiopulmonary bypass is attenuated by adenosine A2A receptor activation[J]. *J Surg Res* , 2008 , 151(2) : 176.
- [8] Dong G H , Xu B , Wang C T , et al. A rat model of cardiopulmonary bypass with excellent survival [J]. *J Surg Res* , 2005 , 123 (2) : 171 - 5.
- [9] Zhang Y , Li D , Luo J , et al. Pharmacological preconditioning with sevoflurane activates PI3K/AKT signaling and attenuates cardiopulmonary bypass-induced lung injury in dog [J]. *Life Sci* , 2017 , 173: 68 - 72.
- [10] Krawczeski C D , Woo J G , Wang Y , et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin concentrations predict development of acute kidney injury in neonates and children after cardiopulmonary bypass[J]. *J Pediatr* , 2011 , 158(6) : 1009 - 15.
- [11] Tsakiridis K , Zarogoulidis P , Vretzkakis G , et al. Effect of lornoxicam in lung inflammatory response syndrome after operations for cardiac surgery with cardiopulmonary bypass [J]. *J Thorac Dis* , 2014 , 6 Suppl 1: S7 - 20.
- [12] Persson P , Friederich-Persson M , Fasching A , et al. Adenosine A2a receptor stimulation prevents proteinuria in diabetic rats by promoting an anti-inflammatory phenotype without affecting oxidative stress[J]. *Acta Physiologica* 2015 , 214(3) : 311 - 8.
- [13] Sharma A K , Laubach V E , Ramos S I , et al. Adenosine A2A receptor activation on CD4+ T lymphocytes and neutrophils attenuates lung ischemia - reperfusion injury [J]. *J Thorac Cardio Sur* , 2010 , 139(2) : 474 - 82.
- [14] Tao J , Shen X , Ai Y , et al. Tea polyphenols protect against ischemia/reperfusion-induced liver injury in mice through anti-oxidative and anti-apoptotic properties [J]. *Exp Ther Med* , 2016 , 12 (5) : 3433.
- [15] Goc Z , Szaroma W , Kapusta E , et al. Protective effects of melatonin on the activity of SOD , CAT , GSH-Px and GSH content in organs of mice after administration of SNP [J]. *Chin J Physiol* , 2017 , 60(1) : 1 - 10.

Protective effects of the adenosine A2a receptor agonist(CGS21680) on hepatic injury post - cardiopulmonary bypass in juvenile rats

Chu Peiyi , Ge Jianjun , Zuo Yi , et al

(Dept of Cardiovascular Surgery , The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230001)

Abstract Objective To verify the hypothesis that the adenosine A2a receptor agonist(CGS21680) could moderate hepatic injury in juvenile rats following cardiopulmonary bypass(CPB). **Methods** Thirty-six juvenile SD rats were divided into three groups randomly: Sham group , CPB group and CGS21680 group. The model of CPB in young rats was established between the CPB group and the CGS21680 group(60 min of cardiopulmonary bypass with priming solution) , CGS21680 was added(120 μ g/kg) to the priming solution before the CPB according to the direction. And the sham group underwent cannulation and heparinization only. Interleukin-1 β (IL-1 β) , tumor necrosis factor- α , alanine aminotransferase(ALT) , aspartate transaminase(AST) and glutathione peroxidase(GSH-PX) in the plasma were measured at different time points including pre-operation(T0) , 30 min(T1) , transfusion finished(T2) and 1 hour after operation(T3) . Liver tissues were taken 1 hour after operation. IL-1 β , IL-6 and TNF- α were measured in the tissues , and histomorphological changes were observed by HE staining. **Results** In the CPB group , the levels of IL-1 β , TNF- α , AST and ALT in the plasma were significantly higher than those in the sham group at different time points($P < 0.05$) . The indices above in the CGS21680 group were significantly lower than in the CPB group($P < 0.05$) . The activity of GSH-PX in the CPB group was lower than that of the sham group at different time points($P < 0.05$) , while in the CGS21680 group was higher than that of the CPB group($P < 0.05$) . In the CPB group , the levels of IL-1 β , IL-6 and TNF- α in the liver were significantly higher than those in the sham group($P < 0.05$) . Those indices were significantly lower in CGS21680 group than in the CPB group($P < 0.05$) . **Conclusion** The adenosine receptor agonist (CGS21680) can ameliorate the hepatic injury induced by cardiopulmonary bypass in juvenile rats.

Key words cardiopulmonary bypass; A2a receptor agonist; inflammatory response; juvenile rat