

缺血预处理对大鼠肢体缺血再灌注损伤保护效应的实验研究

司小毛^{1,2}, 仇鹏¹, 朱化刚¹, 余康敏¹, 查斌山¹, 谢文涛¹, 李俊¹

摘要 目的 探讨缺血预处理不同时间方案对肢体缺血再灌注损伤保护作用的差异性, 选择合理的缺血预处理时间。方法 40 只 SPF 级 SD 大鼠随机分成 5 组: 假手术组(A 组, 仅行开腹, 分离腹主动脉不阻断); 缺血再灌注组(B 组, 夹闭腹主动脉缺血 2 h 后再灌注 2 h); C、D、E 组: 分别阻断腹主动脉 1.5 和 10 min, 再灌注 1.5 和 10 min, 重复 3 个循环后进行 2 h 缺血 2 h 再灌注。测定血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-10(IL-10) 水平, 观察各组氧化/抗氧化指标及炎症因子表达的差异性。结果 D 组 SOD 活性升高、MDA 含量下降, 与 B 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$); E 组改变更明显, 和 D 组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 B 组比较, C、D、E 组的 IL-6、TNF- α 明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); E 组的各炎症因子水平最高, 与 C 组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论 预缺血时间与氧化损伤的保护作用在一定时间窗内呈平行关系, 预缺血并无明显抗炎作用, 过长时间预缺血甚至能导致全身性炎症反应; 5 min/3 个循环缺血预处理方案较为适宜。

关键词 大鼠; 肢体; 缺血再灌注; 缺血预处理; 保护机制

中图分类号 R 364.12; R 364.5; R 543.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0569-03

缺血预处理(ischemia preconditioning, IprC)是指在长时间缺血前对组织器官实施多次短暂的缺血来提高组织缺血耐受性、延缓或减轻随后再灌注引起损伤的方法。自 Murry et al^[1]提出此概念以来, 有关 IprC 时间和保护效应之间关系的研究甚少。该研究拟观察不同时间策略 IprC 后血清超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malonaldehyde, MDA)、白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10) 等水平的变化, 从抗氧化损伤和炎症反应角度研究不同 IprC 时间下保护作用的差异性, 探讨相对合理的 IprC 时间,

为临床开展 IprC 提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 40 只成年健康 SPF 级 SD 大鼠, 购自安徽医科大学实验动物中心, 体重 220 ~ 250 g, 雌雄不限, 随机均分成 5 组, 正常对照组(A 组): 仅行开腹, 分离腹主动脉不夹闭; 缺血再灌注组(B 组): 夹闭腹主动脉缺血 2 h 后再灌注 2 h; 1 min/3 个循环预处理组(C 组): 1 min 阻断、1 min 灌注交替共 3 个循环, 然后正式阻断 2 h、再灌注 2 h; 5 min/3 个循环预处理组(D 组)和 10 min/3 个循环预处理组(E 组), 方法均同 C 组, 间隔时间改为 5 min 和 10 min。

1.2 主要试剂 SOD、MDA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所; IL-6、TNF- α 、IL-10 ELISA 检测试剂盒购自武汉新启迪生物科技有限公司。

1.3 动物模型制备 术前禁食 12 h, 禁水 2 h。腹腔 10% 水合氯醛麻醉后经尾静脉留置套管针。开腹分离腹主动脉, 在肠系膜下动脉与双髂分岔间用管夹阻断腹主动脉 2 h, 复通 2 h 为缺血再灌注损伤模型。实验过程关闭腹腔, 以微量输液泵经尾静脉持续补液(8 ml/kg)。

1.4 动物处理及标本采集 各组均在最终恢复血循环后经下腔静脉采血 4 ~ 5 ml, 血标本放入普通冰箱冷藏静置 30 min 后 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 装入 EP 管并标记, -80°C 保存待测。

1.5 指标检测

1.5.1 血清 SOD、MDA 检测 采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定 MDA 浓度, 黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活性, 实验操作严格参照试剂盒说明书进行。

1.5.2 血清 IL-6、TNF- α 、IL-10 浓度检测 使用双抗体一步夹心酶联免疫吸附试验法(ELISA), 用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD)值, 通过标准曲线计算各标本的 IL-6、TNF- α 、IL-10 浓度。实验操作严格参照试剂盒说明书进行。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 所有分组均进行 K-S 检验、方差齐性检验, 组间两两比较采用 LSD 法单因素方差分析。

2014-02-17 接收

基金项目: 安徽省卫生厅医学科研项目(编号: 2010B17)

作者单位: ¹安徽医科大学第一附属医院血管外科, 合肥 230022

²安徽省南陵县中医院普外科, 南陵 241300

作者简介: 司小毛, 男, 医师, 硕士研究生;

朱化刚, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: huagzhu@yeah.net

2 结果

2.1 各组血清 SOD 和 MDA 的比较 与 A 组比较 B 组的 SOD 活力下降 ,MDA 含量升高 ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ;与 B 组比较 ,C、D、E 组的 SOD 活力升高 ,MDA 含量下降 ,其中 C 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ,D、E 组差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ;C、D、E 组进行组间比较 ,E 组的 SOD 活力最高、MDA 含量最低 ,各组差异有统计学意义 ($P < 0.05$) ,见表 1。

表 1 各组血清 SOD 和 MDA 比较 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
A	105.14 ± 11.89	2.79 ± 0.21
B	56.02 ± 7.87 [#]	4.32 ± 0.22 [#]
C	60.27 ± 9.16 [#]	4.16 ± 0.22 [#]
D	71.92 ± 10.33 ^{#*△}	3.77 ± 0.15 ^{#*△}
E	74.99 ± 12.62 ^{#*△▲}	3.62 ± 0.13 ^{#*△▲}

与 A 组比较:[#] $P < 0.05$;与 B 组比较:^{*} $P < 0.05$;与 C 组比较:[△] $P < 0.05$;与 D 组比较:[▲] $P < 0.05$

2.2 各组 IL-6、TNF- α 、IL-10 的比较 与 A 组比较 B 组的 IL-6、TNF- α 、IL-10 水平升高 ,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) ;与 B 组比较 ,C、D、E 组的 IL-6、TNF- α 明显升高 ,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) ;C、D、E 进行组间比较 ,各数值均呈递增趋势 ,IL-6 水平 D 组和 C 组比较、E 组和 D 组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$) 。D 组和 C 组 TNF- α 水平比较 ,差异无统计学意义 ($P > 0.05$) ,E 组和 D 组比较 ,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) 。IL-10 水平各组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$) ,见表 2。

表 2 各组血清 IL-6、TNF- α 、IL-10 水平比较 ($n = 8, \mu\text{g/L}, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-6	TNF- α	IL-10
A	66.66 ± 9.79	113.66 ± 10.20	94.57 ± 11.91
B	94.31 ± 8.40 [#]	170.32 ± 10.87 [#]	121.45 ± 12.31 [#]
C	108.05 ± 11.80 ^{#*}	185.67 ± 15.38 [#]	127.93 ± 13.82 [#]
D	113.90 ± 7.02 ^{#*}	191.50 ± 11.86 ^{#*}	140.68 ± 10.82 ^{#*△}
E	118.59 ± 9.20 ^{#*△}	204.48 ± 10.74 ^{#*△▲}	156.24 ± 11.56 ^{#*△▲}

与 A 组比较:[#] $P < 0.05$;与 B 组比较:^{*} $P < 0.05$;与 C 组比较:[△] $P < 0.05$;与 D 组比较:[▲] $P < 0.05$

3 讨论

在心血管外科领域中 ,如腹主动脉及髂动脉瘤人工血管置换、建立体外循环的心脏手术、动脉栓塞取栓、动脉闭塞性疾病行旁路手术等众多情况 ,机体

都将不可避免的要遭受缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury ,IRI) ,若控制不良还会带来全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome ,SIRS) 及多器官功能障碍综合征 (multiple organs dysfunction syndrome ,MODS) 等后果。缺血再灌注过程中产生大量活性氧 (reactive oxygen species ,ROS) 。攻击生物膜导致脂质过氧化 ,其产物 MDA 水平的高低间接反映了 ROS 对细胞的损伤程度。生理状态下的 ROS 能被以 SOD 为主的抗氧化系统所清除 ,当 ROS 超过机体的清除能力后即出现脂质过氧化增强、抗氧化能力减弱的失衡状态 ,监测 MDA 和 SOD 判断机体的氧化与抗氧化状态。此外 ,缺血会释放多种炎症细胞因子 ,其中 IL-6 和 TNF- α 是早期释放的重要致炎因子 ,而 IL-10 是有代表性的抑炎因子^[2]。

有研究^[3-5]显示 IprC 是减轻缺血再灌注损伤的有效措施 ,众多学者探索其保护机制 ,认为和减轻脂质过氧化、抑制细胞凋亡、增加内源性腺苷释放、激活蛋白激酶 C 调控细胞凋亡、开放线粒体 K-ATP 通道、维持靶缺血肌肉组织的糖原储备、增加缺氧状态下的无氧酵解等因素有关。现行下肢 IprC 的方法主要有腹主动脉下端阻断、髂动脉阻断、股动脉阻断、下肢无创止血带阻断等 ,阻断策略不一 ,缺乏统一标准。IprC 的保护效应有早期保护和延迟保护两个时间窗 ,早期保护持续时间在预缺血的 1~2 h 内 ,起主要作用。延迟保护在 24~72 h ,又称“第二窗口保护期” ,两个时相保护机制有所不同^[6] ,也间接表明长时间的 IprC 可能无益。

本研究显示 ,5 min/3 个循环 IprC 能明显增强 SOD 活性 ,并降低 MDA 水平 ,发挥了很好的清除氧自由基、抗氧化作用 ,10 min/3 个循环时更明显 ,由此观察预缺血时间对下肢氧化损伤的保护作用呈递增趋势 ,但炎症因子在 10 min/3 个循环 IprC 时最高 ,过长时间的预缺血导致了炎症因子的蓄积 ,这可能抵消了 IprC 的预期保护效果。戚炜^[7]认为短时间 (5~15 min/3 个循环) 的 IprC 可一定程度降低氧自由基水平 ,减轻缺血再灌注损伤 ,而 20 min/3 个循环以上的 IprC 则无此作用。也有学者提出 IprC 可能通过降低机体的炎症反应途径达到心肌细胞保护的效果^[8] ,这与 IprC 促进了 IL-10 的释放发挥了一定的抑制炎症作用有关 ,和本研究结果不矛盾。提示小于 5 min/3 个循环的 IprC 可能有一定程度的抗炎作用 ,长时间 IprC 后 IL-10 的升高不足以抑制 IL-6、TNF- α 等致炎因子的过度表达 ,抗炎作用并不

明显。

IprC 虽已被认为能减轻机体缺血再灌注损伤, 但 IprC 的过程中会潜在的伴随着炎症反应和其他损害的发生, 过长时间的 IprC 会增加负面效应。本研究阐释的 IprC 保护机制主要来自其抗氧化清除氧自由基的作用, 虽有一定程度抑制性炎症因子的释放, 但不足以减轻术后的炎症反应。IprC 时间长短直接影响了保护效应, 本研究中的 1 min/3 个循环抗氧化作用甚微, 5 min/3 个循环的 IprC 发挥了显著抗氧化保护效应, 10 min/3 个循环虽然作用更优, 但是长时间的 IprC 导致机体 IL-6、TNF- α 等致炎因子大量蓄积, 加重了炎症反应, 增加了术后发生 SIRS 的风险。本研究不足之处在于未能进行组织病理学分析, IprC 作为一项新兴的预保护措施需更多的研究来证实其可靠性, 临床应全面权衡缺血预处理保护作用及其潜在的负面影响而进行合理运用。

参考文献

[1] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. *Circulation*, 1986, 74(5):1124-36.

- [2] Saxena P, Aggarwal S, Misso N L, et al. Remote ischaemic preconditioning down-regulates kinin receptor expression in neutrophils of patients undergoing heart surgery[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2013, 17(4):653-8.
- [3] Olguner C G, Koca U, Altekin E, et al. Ischemic preconditioning attenuates lipid peroxidation and apoptosis in the cecal ligation and puncture model of sepsis[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(6):1581-8.
- [4] Moses M A, Addison P D, Neligan P C, et al. Mitochondrial KATP channels in hindlimb remote ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288(2):H559-67.
- [5] Lintz J A, Dalio M B, Joviliano E E, et al. Ischemic pre and postconditioning in skeletal muscle injury produced by ischemia and reperfusion in rats[J]. *Acta Cir Bras*, 2013, 28(6):441-6.
- [6] Hausenloy D J, Yellon D M. The second window of preconditioning (SWOP) where are we now? [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2010, 24(3):235-54.
- [7] 戚 炜. 缺血预处理时间对大鼠骨骼肌缺血再灌注损伤保护作用的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2005, 19(4):274-7.
- [8] 唐白云, 陈光献, 刘喜利, 等. 缺血预处理通过抑制炎症反应保护心肌细胞的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(12):1618-20.

Association between ischemic preconditioning time and the protective effects of hind limb ischemia/reperfusion injury in rats

Si Xiaomao^{1,2}, Qiu Peng¹, Zhu Huagang¹, et al

(¹Dept of Vascular Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ²The TCM Hospital of Nanling County Wuhu City, Nanling 241300)

Abstract Objective To investigate the relationship between different ischemic preconditioning protocols and the protective effects of hind limb ischemia/reperfusion injury in rats in purpose of choosing an optimal ischemic preconditioning scheme. **Methods** An experimental study was designed using 40 SD rats divided in five groups ($n = 8$). Group A: the sham group, laparotomy and separating the abdominal aorta without clamping for 240 minutes (min). Group B: ischemia/reperfusion rats submitted to ischemia for 120 min and reperfusion for 120 min. Group C, D and E: animals submitted to three cycles of clamping and releasing the aorta for 1, 5 and 10 min respectively before being submitted to the ischemia/reperfusion procedure; the oxidative damage, inflammatory and protective effects among five groups were evaluated by measuring serum levels of SOD, MDA, IL-6, TNF- α , IL-10. **Results** Compared with group B, SOD activities were significantly higher in group D ($P < 0.05$). SOD activities were significantly higher in group E compared with group D ($P < 0.05$). Compared with group B, the level of IL-6, TNF- α increased obviously in group C, D, E ($P < 0.05$). IL-6, TNF- α , IL-10 was the highest in group E among five groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The relationship between ischemia preconditioning time and anti-oxidation in hind limb ischemia/reperfusion injury seems paralleled. The inflammatory response accompanied with the ischemia preconditioning becomes serious with ischemia time prolonging. Preconditioning doesn't show anti-inflammatory effect. Five min/three circulation ischemia preconditioning scheme is an optimal protocol.

Key words rats; hind limb; ischemia/reperfusion; ischemic preconditioning; protective mechanism