

• 药理学 •

腺苷预适应对缺血再灌注损伤的保护作用

胡佳乐¹, 李伟², 沈甫明³ (1. 解放军第411医院普外科, 上海 200081; 2. 江苏省人民医院采购中心, 南京 210000; 3. 第二军医大学基础部药理教研室, 上海 200433)

摘要: 目的: 观察预适应(缺血及腺苷)对大鼠下肢缺血再灌注后心、肺损伤的保护作用。方法: 雄性SD大鼠随机分4组, 每组8只。行腹主动脉下端阻断及再灌注各120min。组I为手术对照组。组II在缺血再灌注前先行阻断腹主动脉5min后开放5min, 共4次。组III麻醉后经颈静脉持续滴注腺苷生理盐水溶液。组IV为假手术对照组。4组均于麻醉后经舌静脉注入伊文氏兰(Evan's blue dye)溶液, 动脉插管测定再灌注后的平均动脉压(MAP)。实验终点取心、肺组织行病理检查, 心肌ATP酶, 心、肺组织丙二醛(malonyldiadehyde, MDA)含量及Evan氏兰含量测定。结果: 组I、III再灌注后MAP均显著低于组II、组IV($P < 0.05$), 组I、III间, 组II、IV间无显著差异。组I心肌ATP酶(包括 $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$, $\text{Mg}^{2+} \text{ATPase}$ 及 $\text{Ca}^{2+} \text{ATPase}$)活力均低于余3组, 余3组间2, 2比较均无显著差异。组I心、肺组织MDA含量显著高于余3组, 余3组间2, 2比较均无显著差异。组I肺Evan氏兰含量显著高于II、III、IV组, 组II、III高于组IV, 组II、III间无显著差异。结论: 缺血和腺苷预适应能改善大鼠下肢缺血再灌注后心、肺组织和功能损伤。

关键词: 腺苷; 预适应; 缺血再灌注损伤

中图分类号: R965.2

文献标识码: A

文章编号: 1006-0111(2001)04-0206-03

The protective effect of adenosine preconditioning on ischaemia-reperfusion injury

HU Jia-le¹, LI Wei², SHEN Fu-ming² (1. Department of General Surgery, NO. 411 Hospital of PLA, Shanghai 200081, China; 2. Department of Pharmacology, Department of Basic Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE: To investigate the protective effects of preconditioning on cardiac and pulmonary injury induced by lower extremity ischaemia-reperfusion in rats. **METHODS:** Animals were randomized into 4 groups and underwent laparotomy. The abdominal aorta was isolated and clamped below the renal artery level for 120min then declamped for another 120min. Group I ($n=8$) was taken as control. Group II ($n=8$) was pretreated with ischaemia preconditioning that the lower extremities had experienced 4 times of ischaemia and reperfusion 5 min each before the 240 min treatment began. Group III ($n=8$) accepted continuous drip infusion of adenosine. Group IV ($n=8$) was sham operated. All groups were given Evan's blue dye intravenously after anesthesia. Mean artery pressure (MAP), myocardium *ATPase* activities and malonyldiadehyde (MDA), pulmonary MDA and Evan's blue were determined separately. **RESULTS:** MAP was lower in group I and III than in II and IV, neither group I and III nor II and IV, had significant differences ($I: 61 \pm 14$; $II: 86 \pm 12$; $III: 69 \pm 18$; $IV: 94 \pm 23$ mmHg). Myocardium *ATPase* activity was lower in group I than in group II, III, IV ($\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ 8.1 ± 0.4 vs 8.9 ± 2.1 , 9.4 ± 1.0 and 9.0 ± 0.8 U/mg; $\text{Ca}^{2+} \text{ATPase}$ 5.0 ± 0.2 vs 5.3 ± 1.0 , 5.9 ± 0.7 and 5.7 ± 0.8 U/mg; $\text{Mg}^{2+} \text{ATPase}$ 4.4 ± 0.3 vs 5.2 ± 0.8 , 5.1 ± 0.7 and 5.3 ± 0.6 U/mg), the MDA level was higher in group I than in group II, III, IV. (MDA 2.5 ± 0.4 vs 1.8 ± 0.7 , 1.6 ± 0.5 and 1.7 ± 0.7 nmol/mg). Pulmonary MDA and Evan's blue level were higher in group I than in the other three groups (MDA 2.3 ± 0.2 vs 1.6 ± 0.4 , 1.8 ± 0.5 and 1.4 ± 0.6 nmol/mg; Evan's blue 3.1 ± 1.2 vs 1.6 ± 0.5 , 1.5 ± 0.3 and 0.9 ± 0.2 $\mu\text{g}/\text{mg}$). **CONCLUSION:** Ischaemia and adenosine preconditioning have some protective effects on cardiac and pulmonary injury induced by ischaemia-reperfusion of lower extremity in rats.

KEY WORDS: adenosine; preconditioning; ischaemia-reperfusion injury

在血管外科、器官移植的临床实践中发现,缺血再灌注(ischaemia reperfusion, IR)能对远隔器官(remote organ)造成损伤。较为常见的是下肢 IR 致心、肺、肾、消化道和血液系统的组织及功能损伤,其中心、肺是重要的受累靶器官,临床表现为心律失常,血压变化,肺水肿甚至循环功能和呼吸功能障碍^[1]。缺血再灌注是一种氧应激损伤,能引起局部炎症反应及内稳态的变化。当应激达到某种程度或机体存在器质性病理基础时,缺血再灌注损伤可由局部波及全身。本实验观察了缺血和腺苷预适应对下肢 IR 引起心肺损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物及手术

健康成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠(第二军医大学动物研究中心),重 200-300 克,32 只随机分成 4 组,每组 8 只。手术对照组(组 I)大鼠以 1% 戊巴比妥液腹腔注射麻醉(1.5ml/kg),颈部皮下注射生理盐水 3 ml 补充术中体液减少(组 III 除外),气管切开置管接呼吸机,左侧颈总动脉插管接 MPA-2000 型多导生理记录仪(第二军医大学基础部提供)监测术中心率、收缩压、舒张压及平均动脉压(MAP)。腹正中切口进腹,剪开后腹膜,解剖腹主动脉约 1.5cm,在肾动脉水平远端以无损伤血管夹阻断腹主动脉,用袖珍多普勒仪确认双侧腹股沟及下肢无血流后,全层缝合腹壁 2~3 针,计时。于舌静脉注射伊文氏兰(Evan's blue, 30mg/kg, 上海化学试剂公司),120min 后再进腹,松开血管夹,以袖珍多普勒仪确认血流恢复,设定每 10min 测定 MAP 1 次,至手术终点时取平均值。再灌注 120min 后取心、肺标本。缺血预适应组(组 II)在第一次阻断腹主动脉后 5 min 开放动脉夹,再通 5min 后再次阻断,如此重复 4 次。第 5 次夹闭 120min,再灌注 120min。腺苷预适应组(组 III)在麻醉后经颈静脉插管以每 min 每 kg 体重 200μg 量持续滴注腺苷(Sigma 公司)生理盐水溶液,共约 3ml。组 II、组 III 其余处理均同组 I。组 IV 为假手术对照组,不行动脉阻断。

1.2 病理检查

术后取心、肺组织,投入 10% 甲醛液中固定,24h 后脱水、石蜡包埋并 HE 染色,制成心、肺组织切片。

1.3 心肌 ATP 酶(ATPase),心、肺组织丙二醛(MDA)和肺伊文氏兰含量测定

1.3.1 主要仪器 5417R 型高速低温离心机(德国 Eppendorf),UV-754 型紫外分光光度计(上海仪器三厂),JA2003 型电子天平(上海天平仪器厂)。

1.3.2 主要试剂 ATP 酶测定试剂盒,MDA 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),分析纯甲酰胺(上海化学试剂公司)。

1.3.3 主要步骤 测定 ATPase 的心肌组织称重后制成 2% 组织匀浆,按试剂盒步骤进行,660nm 波长,1cm 光径比色。测定 MDA 的心、肺组织称重后制成 10% 组织匀浆,按试剂盒步骤进行,532nm 波长,1cm 光径比色。测定肺伊文氏兰时取肺组织 100mg,在 5ml 甲酰胺液中匀浆,37℃ 水浴 16h,取上清液在 620 nm 处比色。用标准曲线法计算心肌 ATPase、心、肺 MDA 及肺 Evan 氏兰含量。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm S$ 表示,统计学方法为方差分析(S-N-K 法)。SPSS8.0 统计软件处理,以 $P < 0.05$ 为显著性临界值。

2 结果

2.1 病理表现

组 I 大鼠可见少数心肌细胞变性,个别溶解,有炎性细胞浸润;肺组织可见肺泡壁增厚,肺泡内及间质均有渗出,间质炎性细胞浸润。组 II、III、IV 未见明显异常。

2.2 组 I MAP 显著低于组 II、IV ($P < 0.05$),组 III 也显著低于 II、IV 组 ($P < 0.05$),组 I 与组 III 间、组 II 与组 IV 间无显著差异。组 I 心肌 ATPase 包括 $Na^+ K^+ ATPase$, $Ca^{2+} ATPase$ 和 $Mg^{2+} ATPase$ 活力均显著低于组 II、III、IV ($P < 0.05$),组 I 心肌 MDA 含量高于组 II、III、IV ($P < 0.05$),而 II、III、IV 组间 2,2 比较未见显著差异。见表 1。

表 1 预适应对大鼠下肢 IR 后心肌 ATP 酶、MDA 和 MAP 的影响($\bar{x} \pm S$)

Group	n	MAP (mmHg)	ATPase(U/mg)			MDA nmol/mg
			$Na^+ K^+ ATPase$	$Ca^{2+} ATPase$	$Mg^{2+} ATPase$	
I	8	61 ± 14 [△]	8.1 ± 0.4 [*]	5.0 ± 0.2 [*]	4.4 ± 0.3 [*]	2.5 ± 0.4 [*]
II	8	86 ± 12	8.9 ± 2.1	5.3 ± 1.0	5.2 ± 0.8	1.8 ± 0.5
III	8	69 ± 18 [△]	9.4 ± 1.0	5.9 ± 0.7	5.1 ± 0.7	1.6 ± 0.5
IV	8	94 ± 23	9.0 ± 0.8	5.7 ± 0.8	5.3 ± 0.6	1.7 ± 0.7

* 与 II、III、IV 组有显著差异, $P < 0.05$ 。△ 与 II、IV 有显著差异, $P < 0.05$ 。

2.3 组肺组织 MDA 及 Evan 氏兰含量显著高于 II、III、IV 组 ($P < 0.05$), 组 II、III Evan 氏兰含量显著高于组 IV ($P < 0.05$), II、III 间无显著差异。见表 2。

表 2 预适应对大鼠下肢 IR 后肺 MDA 及 Evan 氏兰含量影响 ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	MDA (nmol/mg)	Evan's blue ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
I	8	$2.3 \pm 0.2^*$	$3.1 \pm 1.2^*$
II	8	1.6 ± 0.4	1.6 ± 0.5
III	8	1.8 ± 0.5	1.5 ± 0.3
IV	8	1.4 ± 0.6	0.9 ± 0.2

* 与 II、III、IV 组有显著差异, $P < 0.05$ 。

3 讨论

医源性缺血再灌注损伤的机会随着外科适应证的拓宽而增加, 传统预防 IR 损伤的方法, 如控制缺血时间, 降低缺血区域组织温度, 应用抗氧化剂如谷胱甘肽, 输注高张、高渗盐水等都能有效控制局部损伤反应^[2], 但 IR 对远隔部位组织器官的损伤, 上述方法却难以奏效或因技术原因无法实施。

缺血预适应即在阻断供血血管前用较短的时间使即将缺血组织适应数次缺血-再灌注过程, 在实验中证实可有效降低心肌缺血造成的梗死面积。矫形外科也发现缺血预适应可显著改善肌肉在缺血再灌注后的存活与功能^[3]。预适应还包括药物及加热等方法。预适应的机理可能与热休克蛋白的表达增加, 抗氧化能力动员, 一氧化氮合成酶激活及腺苷受体激活等有关。腺苷在局部组织血流不足发生缺氧时浓度增加, 作用于局部腺苷受体使微血管扩张和血流代偿性增加, 具有保持局部组织氧化代谢和稳定血管阻力的作用。全身性微血管扩张可使循环血压下降, 因此可以解释组 III MAP 较正常对照组为低。腺苷尚能降低 TNF- α 的合成, 后者是 IR 损伤作用的主要炎症介质^[4~6]。

本实验应用缺血及腺苷预适应, 减轻了大鼠下肢缺血再灌注引起的心肺组织及功能的损伤。手术对照组(组 I) 平均动脉压下降可能与 IR 后酸中毒, 组织水肿、血管扩张造成的容量减少有关, 但不能排除因心肌收缩功能下降对 MAP 的影响。心肌 ATP 酶活力的下降即证明存在心肌功能的损害。

但组 III MAP 下降肯定与持续滴注腺苷有关。MDA 是氧自由基损伤细胞膜中的多不饱和脂肪酸引发脂质氧化反应的终产物, 组织 MDA 水平间接反应细胞膜损伤的程度。本实验发现缺血及腺苷预适应组心肌及肺组织中的 MDA 含量显著低于手术对照组, 提示二者的保护作用。

伊文氏兰能在血浆中结合白蛋白, 在肺组织通透性增加时, 伊文氏兰与白蛋白一起进入肺泡间质及肺泡内, 故根据肺组织伊文氏兰的含量可间接观察肺的通透性而判断肺功能。实验发现缺血及腺苷预适应同样具有保护肺功能的作用。局部缺血再灌注对远隔组织器官的损伤作用机理复杂, 临床表现多样, 严重时可发生全身性炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS) 甚至多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)^[7], 因此探讨预防及控制缺血再灌注损伤具有重要的临床意义。

参考文献:

- [1] Vanniasinkam SH, Crinnion JN, Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997, 14(9): 195.
- [2] Waagstein LM, Jivegard L, Haljamae H. Hypertonic saline infusion with or without Dextran70 in the reperfusion phase of experimental acute limb ischaemia [J]. Eur J Vasc Endovasc Surg, 1997, 13(3): 285.
- [3] Gurke L, Marx A, Sutter PM, et al. Ischemic preconditioning—A new concept in orthopedic and reconstructive surgery [J]. J Surg Res, 1996, 61(1): 1.
- [4] Javadpour M, Kelley CJ, Chen G, et al. Thermotolerant induces heat shock protein 72 expression and protects against ischaemia-reperfusion induced lung injury [J]. Br J Surg, 1998, 85: 943.
- [5] Meldrum DR, Cain Bs, Cleveland JR. JC, et al. Adenosine decreases post-ischaemic cardiac TNF- α production: anti-inflammatory implications for preconditioning and transplantation [J]. Immunology, 1997, 92: 472.
- [6] Mubagwa K, Mullane K, Flameng W. Role of adenosine in the heart and circulation [J]. Cardiovasc Res, 1996, 32(5): 797.
- [7] Bane AE. MOF/MODS, SIRS: an update [J]. Shock, 1996, 6 (sup): s1.

收稿日期: 2001-04-05

(上接第 205 页)

- [9] 蒋兰英, 叶坚虹, 娄国强, 等. 谷胱甘肽辅助治疗病毒性肝炎的疗效[J]. 中国新药与临床杂志, 1998, 17(4): 230.
- [10] 彭星亮, 蔡伊梅, 蔡伟, 等. 谷胱甘肽辅助治疗重型病毒性肝炎和肝炎肝硬化[J]. 中国新药与临床杂志, 1998, 17(4): 227.

- [11] 宋秀丽, 杨道锋, 田德英. 谷胱甘肽对病毒性肝炎病人超氧化物歧化酶、过氧化脂质水平的影响及疗效[J]. 中国新药与临床杂志, 1998, 17(4): 234.
- [12] 刘惠敏, 龚慕瑜, 娄国强. 谷胱甘肽联合果糖二磷酸钠辅助治疗慢性重型肝炎[J]. 中国新药与临床杂志, 1998, 17(2): 115.

收稿日期: 2001-04-09