

丙酮酸对大鼠移植小肠缺血再灌注损伤的保护作用

郝志强, 王为忠, 李孟彬, 张洪伟

郝志强, 王为忠, 李孟彬, 张洪伟, 中国人民解放军第四军医大学西京医院胃肠外科 陕西省西安市 710032

项目负责人: 王为忠, 710032, 陕西省西安市长乐西路169号, 中国人民解放军第四军医大学西京医院胃肠外科. weichang@fmmu.edu.cn
电话: 029-83375261

收稿日期: 2004-05-27 接受日期: 2004-06-17

摘要

目的: 探讨丙酮酸(pyruvate)对大鼠移植小肠缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。

方法: 建立大鼠小肠移植缺血再灌注损伤的动物模型, 实验组和对照组分别经肠腔给予含有丙酮酸钠和等能量的多聚葡萄糖营养液, 对不同冷保存缺血、再灌注时间的小肠进行组织病理学观察并利用酶联免疫法检测肠黏膜中的TNF- α 和IL-6水平。

结果: 丙酮酸处理后的小肠组织损伤较对照组明显减轻, 小肠黏膜中TNF- α 和IL-6水平减低。

结论: 丙酮酸对大鼠移植小肠缺血再灌注损伤具有保护作用; 该保护作用与丙酮酸减少小肠组织中的TNF- α 和IL-6水平有关。

郝志强, 王为忠, 李孟彬, 张洪伟. 丙酮酸对大鼠移植小肠缺血再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2005;13(2):265-267
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/265.asp>

0 引言

缺血再灌注损伤是器官移植术后早期失败的主要原因之一, 因此如何防止和减轻移植器官的缺血再灌注损伤一直是器官移植领域基础和临床研究的热点. 在已经开展的移植器官中小肠对缺血再灌注损伤尤为敏感, 研究表明丙酮酸对包括小肠在内的许多器官的缺血再灌注损伤具有保护作用, 但机制尚不十分明了, 而且关于丙酮酸对移植小肠缺血再灌注损伤的研究较少, 因此我们通过探讨丙酮酸对移植小肠缺血再灌注损伤的保护作用及其机制, 为基础研究和临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 近交系成年雄性SD大鼠30只, 第四军医大学实验动物中心提供, 体重200-250 g. 将其随机分为3组: 假手术组(sham group, SG)6只, 作为正常对照, 行剖腹、左侧肾切除. 移植对照组(grafted placebo, GP)6对, 于供体小肠阻断血流、灌洗前10 min向肠腔内注入含有0.26 g多聚葡萄糖(由Sigma公司提供)的营养液10 mL(以整蛋白纤维型肠内混悬营养液、即能全力为

溶质, 由无锡钮迪希亚制药有限公司提供); 移植处理组(grafted treatment, GT)6对, 于供体小肠阻断血流、灌洗前10 min向肠腔内注入含有0.32 g丙酮酸(由上海化学试剂公司提供)的营养液10 mL。

1.2 方法

1.2.1 实验动物 于术前12 h禁食, 不禁水. 以2%盐酸氯胺酮腹腔麻醉, 75 mg/kg. 参照Wallander *et al*^[1]的方法, 供肠取自小肠中段20 cm, 游离肠系膜上静脉、门静脉至肝门处, 供肠动脉取自肠系膜上动脉根部、带部分腹主动脉. 肠腔内注入营养液10 min后行小肠原位灌洗直至小肠变白, 供体肠于4℃肝素平衡盐溶液中保存约70 min后行肠系膜上动脉与腹主动脉端侧吻合, 移植肠静脉与左肾静脉利用外径2.0 mm聚乙烯Cuff管行袖套式吻合, 期间以冷盐水纱布湿敷肠管并以冷盐水盥洗腹腔, 冷缺血时间约1.5 h. 分别留取冷保存45 min(GI_{45m})、90 min(GI_{90m})和再灌注30 min(GR_{30m})、180 min(GR_{180m})肠组织标本。

1.2.2 取直径约1.5 cm全层小肠组织, 修剪后以40 g/L甲醛固定, 石蜡包埋、切片, HE染色, 光镜下观察病理组织学改变. 按Chiu^[2]六级评分评价小肠组织损伤. 评价标准参(表1)。

1.2.3 小肠标本在冷生理盐水中漂洗、滤纸吸干黏液, 玻片刮取黏膜并称重; 组织匀浆、离心后取上清进行TNF- α 和IL-6水平酶联免疫测定; 试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供, 按说明书操作。

统计学处理 资料数据采用标准统计软件SPSS10.0处理, 处理结果以mean $\pm$ SD表示, 组织学损伤用Wilcoxon秩和检验、TNF- α 和IL-6水平用方差分析进行统计学分析。

2 结果

2.1 组织学观察结果 将组织损伤评分累计, 统计学处理后结果如表2所示, 假手术组小肠黏膜基本完整, 可见有轻度毛细血管淤血和极少量炎症细胞浸润. 小肠冷保存45 min即出现轻度组织损伤, 伴随缺血再灌注时间的延长, 组织损伤逐渐加重, 再灌注后尤为明显. 肠绒毛由顶端向下破坏, 直至绒毛脱落和固有层出血. 炎症细胞浸润增多且逐渐向肠壁外层扩散, 由充血进而出血且范围扩大, 以至造成中重度损伤. 缺血再灌注不同时相对照组组织损伤均较假手术组严重, 两组之间的差异有非常显著性的意义($P < 0.01$); 而丙酮酸处理后小肠组织损伤较对照组明显减轻($P < 0.01$), 与假手术组比较无显著性的意义($P > 0.05$)。

表1 Chiu' 小肠组织损伤评价标准

	黏膜损伤	炎症反应	充血/出血
0分	正常黏膜绒毛	无炎症反应	无充血/出血
1分	上皮下 Gruenhagen 间隙增大, 通常在绒毛的尖端, 常伴有毛细血管淤血	炎症细胞在固有层局部增多	固有层毛细血管充血
2分	上皮间隙扩张伴随上皮层同固有层的中度分离	炎症细胞在固有层弥散增多	固有层局部出血
3分	绒毛两侧上皮层大量的同固有层分离, 部分绒毛顶端破损	炎症细胞在内皮下聚集	固有层弥漫出血
4分	绒毛破损伴随固有层毛细血管暴露, 可能观察到固有层的细胞成分增多	炎症细胞在内皮下弥散	内皮下出血
5分	固有层破坏和不完整, 出血和溃疡	炎症细胞大量聚集	大量出血

表2 小肠黏膜组织损伤 Chiu' 评分结果分析(分)

Group	Control	Pyruvate	Placebo
Sg	2.17 ± 1.17		
GI45m		2.17 ± 1.17 ^d	5.50 ± 0.55 ^b
GI90m		2.33 ± 1.51 ^d	6.33 ± 0.52 ^b
GR30m		2.50 ± 1.38 ^d	7.50 ± 1.05 ^b
GR180m		2.67 ± 1.51 ^d	12.17 ± 0.75 ^b

^b $P < 0.01$ vs Sg; ^d $P < 0.01$ vs Placebo.表3 小肠黏膜 TNF- α 水平测定($\mu\text{g/L}$)

Group	Control	Pyruvate	Placebo
Sg2	0.31 ± 0.05		
GI45m		0.33 ± 0.05 ^d	1.13 ± 0.65 ^b
GI90m		0.32 ± 0.04 ^d	1.16 ± 0.08 ^b
GR30m		1.04 ± 0.09 ^{bd}	2.99 ± 0.22 ^b
GR180m		0.86 ± 0.05 ^{bd}	2.69 ± 0.22 ^b

^b $P > 0.01$ vs Sg; ^d $P < 0.01$ vs Placebo.

表4 小肠黏膜 IL-6 水平测定(pg/ml)

Group	Control	Pyruvate	Placebo
Sg2	123.04 ± 2.30		
GI45m		126.42 ± 3.95 ^{ad}	437.87 ± 34.63 ^b
GI90m		127.10 ± 3.39 ^d	449.13 ± 23.30 ^b
GR30m		294.66 ± 24.23 ^{bd}	1500.46 ± 94.91 ^b
GR180m		221.50 ± 10.64 ^{bd}	1075.57 ± 52.97 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P > 0.01$ vs Sg; ^d $P < 0.01$ vs Placebo.

2.2 小肠组织 TNF- α 和 IL-6 水平测定 结果如表3、表4所示, 小肠缺血45 min即可见组织中 TNF- α 和 IL-6 水平升高, 再灌注后升高尤为明显, 且随着缺血再灌注时间的延长逐渐升高, 冷保存45 min时丙酮酸处理组 TNF- α 和 IL-6 水平与假手术组比较无显著性意义($P > 0.05$). 冷保存90 min时丙酮酸处理组小肠组织中 IL-6 水平进一

步升高, 与假手术组比较具有显著性的意义($P < 0.05$). TNF- α 水平与假手术组比较仍无显著性的意义($P > 0.05$), 其余时相小肠 TNF- α 和 IL-6 的水平均明显高于假手术组, 而丙酮酸处理组明显低于对照组, 统计学处理有非常显著性的意义($P < 0.01$).

3 讨论

小肠缺血/再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)损伤是外科常见的组织器官损伤之一, 除造成肠道局部损伤外, 还可以诱发内毒素血症、成人呼吸窘迫综合征及多器官系统功能不全综合征. I/R损伤是器官移植的最初反应, 自获取器官之始, 移植植物不可避免的要经历缺血, Tabasco *et al*^[3]证实, 在急性排斥反应期间由于减少移植小肠黏膜的血流, 并存有 I/R 注损伤和免疫引起的损伤. 以往对肠 I/R 损伤机制的认识主要着重于氧自由基损伤、能量衰竭、细胞内钙超载、白细胞黏附与内皮细胞损伤等. 赵佐庆、王一芳 *et al*^[4-5]研究表明小肠 I/R 后及移植后急性排斥反应期内细胞凋亡数量显著增加. 近年来, 细胞因子在小肠 I/R 损伤中所起的作用及其机制越来越引起人们的重视.

丙酮酸是正常生理条件下能量代谢的中间产物. Rastellini *et al*^[6]研究证实加入富含丙酮酸的培养基能够使离体胰岛培养存活时间达到120 d, 移植后器官的功能完好. 该方法已经成功地应用于临床胰岛移植. Cicalese *et al*^[7]研究表明:丙酮酸对小肠 I/R 损伤有明显的保护作用, 经丙酮酸处理后的小肠组织在缺血及再灌注后氧自由基形成和中性粒细胞浸润均明显减少, 组织损伤均减轻, 但这种保护作用的机制尚不清楚. Borle *et al*^[8]研究表明丙酮酸可以通过阻止超氧化物的形成防止氧自由基的产生, 丙酮酸还可以通过与过氧化氢反应生成二氧化碳和水清除氧自由基. Korthouis *et al*^[9]证实氧自由基对中性粒细胞有潜在性的刺激作用, 可以引起中性粒细胞的浸润. 然而, Chan *et al*^[10]认为自由基和中性粒细胞本身并不是导致临床 I/R 损伤病理生理改变的独立因素.

现有的研究表明 TNF- α 等前炎症性细胞因子在小肠 I/R 损伤中起着十分重要的作用. Nezu *et al*^[11]证实犬小肠 I/R 可以导致血清 TNF- α 、IL-6 的活性显著升高.

Stallion *et al*^[12-13]在大鼠小肠 I/R 模型中也获得一致的结果,这就提示小肠 I/R 可以导致系统性的前炎症细胞因子反应,而后者可能与 I/R 损伤密切相关.在 I/R 损伤反应中,活化的巨噬细胞是 TNF 的主要来源,近来人们开始认识到小肠是 TNF 的主要来源,研究表明有大量的巨噬细胞存在于小肠黏膜固有层,因而小肠有产生 TNF 的巨大潜力. TNF 在炎症反应的早期由巨噬细胞释放,可以引起白细胞渗出造成组织损伤并刺激内皮细胞释放 IL-6 和 IL-8. TNF 还能诱导多型核白细胞、内皮细胞表达黏附分子,引起白细胞与血管内皮的黏附并激活白细胞使之易于产生其他炎性递质如活性氧,从而加重组织损伤. IL-6 具有前炎症反应的性质而且被证实为在系统性炎症反应中发挥作用. Kishimoto *et al*^[14]证实 IL-6 是一种多向性的细胞因子,可以诱导肝脏合成急性期反应蛋白. Youker *et al*^[15]发现 IL-6 在 I/R 实验模型中显示具有激活中性粒细胞和诱导内皮细胞表达 ICAM-1 的作用. 因此认为 IL-6 是机体 I/R 损伤后引起远离器官损伤的首要递质. Biffi *et al*^[16]分析临床上外伤或失血性休克后 IL-6 延迟升高常伴有多脏器功能衰竭和很高的致死率.

我们采用同种小肠移植动物模型,以避免排斥反应的影响. 结果显示超生理浓度的丙酮酸能有效地减轻同种小肠移植条件下的 I/R 引起的小肠组织损伤. 组织学观察与 Hinnebusch *et al*^[17]结果一致,小肠 I/R 后损伤始自微绒毛的顶端,伴随 I/R 时间的延长,由顶端向下破坏,直至绒毛脱落和固有层出血. 炎症细胞浸润逐渐增多. 此外,丙酮酸处理组小肠组织内 TNF- α 和 IL-6 的水平较对照组明显减低,提示这种保护作用与丙酮酸通过一定的信号转导途径引起组织内细胞因子 TNF- α 和 IL-6 减少有关. 越来越多的证据表明,在炎症反应的复杂因子网络中, NF- κ B 的激活可能是一个中心环节. Zou *et al*^[18]发现应用 NF- κ B 抑制剂可减少小肠 I/R 损伤引起的 TNF- α 和 IL-6 表达增高. 现有的研究结果表明氧自由基可以促进细胞因子的表达和生成,而一些细胞因子又以活性氧作为细胞内信使发挥作用,因此我们推测这种保护作用也可能与二者的相互作用机制有关. 缺血期丙酮酸可能主要通过清除作用、再灌注期主要通过阻止氧自由基的生成而减少组织内氧自由基的含量,进而阻断下游的信号转导通路,发挥保护作用. 缺血 90 min 时丙酮酸处理组 IL-6 的水平与假手术组比较具有显著性的意义,而 TNF- α 水平与假手术组比较仍无显著性的意义可能与 TNF- α 刺激内皮细胞释放 IL-6 有关. 再灌注后两种细胞因子明显增加可能与再灌注后迅速大量产生氧自由基,进而通过 NF- κ B 的激活促进细胞因子生成有关. 由于缺血再灌注损伤的机制十分复杂,丙酮酸处理组再灌注后组织内 TNF- α 和 IL-6 的水平仍明显高于假手术组,也提示有其他机制发挥作用,尚有待于进一步研究.

总之,我们的实验结果证实丙酮酸对大鼠小肠组织缺血再灌注损伤及同种移植条件下的小肠缺血再灌注损伤

均有保护作用,该保护作用与丙酮酸减少小肠组织中的 TNF- α 和 IL-6 水平有关. 提示丙酮酸这一正常生理代谢的中间产物在防止组织缺血再灌注损伤中有一定的实用价值.

4 参考文献

- 1 Wallander J, Holtz A, Larsson E, Gerdin B, Lackgren G, Tufveson G. Small-bowel transplantation in the rat with a nonsuture cuff technique. Technical and immunological considerations. *Transpl Int* 1988;1:135-139
- 2 Chiu CJ, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1970; 101:478-483
- 3 Tabasco- Minguilan J, Cicalese L, Lee RG, Rakela J. Mucosal perfusion and reactivity of the rat small intestinal allograft: effect of acute rejection. *Transplantation* 1995;60:1572-1577
- 4 赵佐庆. 犬小肠缺血再灌注血管内皮细胞 Bcl-2、Bax 和 VEGF 的表达及意义. *中国局解手术学杂志* 2002;10:231-233
- 5 王一芳, 许爱刚, 华一兵, 吴文溪. CTLA4Ig 局部转基因对小肠移植急性排斥的治疗作用. *世界华人消化杂志* 2004;12:685-688
- 6 Rastellini C, Cicalese L, Zeevi A, Mattes C, Stanko RT, Starzl TE, Rao AS. Long-term culture of viable human pancreatic islets in pyruvate-rich medium. *Transplant Proc* 1995;27:3383-3384
- 7 Cicalese L, Lee K, Schraut W, Watkins S, Borle A, Stanko R. Pyruvate prevents ischemia-reperfusion mucosal injury of rat small intestine. *Am J Surg* 1996;171:97-100
- 8 Borle AB, Stanko RT. Pyruvate reduces anoxic injury and free radical formation in perfused rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1996;270(3 Pt 1):G535-G540
- 9 Korthouis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol* 1993;16(4 Suppl):19-26
- 10 Chan RK, Ibrahim SI, Verna N, Carroll M, Moore FD Jr, Hechtman HB. Ischaemia-reperfusion is an event triggered by immune complexes and complement. *Br J Surg* 2003;90: 1470-1478
- 11 Nezu Y, Tagawa M, Sakaue Y, Hara Y, Tsuchida S, Ogawa R. Kinetics of endotoxin concentration and tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 activities in the systemic and portal circulation during small intestinal ischemia and reperfusion in dogs. *Am J Vet Res* 2002;63:1680-1686
- 12 Stallion A, Kou TD, Berger DS, Knotts KA, Dudgeon DL, Levine AD. Intestinal expression of interleukin 6 after intestinal ischemia and reperfusion injury: a primary mediator of multi-system organ failure? *Current Surgery* 2001;58:504-505
- 13 Lane JS, Todd KE, Lewis MP, Gloor B, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW, Chandler CF. Interleukin-10 reduces the systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. *Surgery* 1997;122:288-294
- 14 Kishimoto T. The biology of interleukin-6. *Blood* 1989;74:1-10
- 15 Youker K, Smith CW, Anderson DC, Miller D, Michael LH, Rossen RD, Entman ML. Neutrophil adherence to isolated adult cardiac myocytes. Induction by cardiac lymph collected during ischemia and reperfusion. *Clin Invest* 1992;89:602-609
- 16 Biffi WL, Moore EE, Moore FA, Peterson VM. Interleukin-6 in the injured patient. Maker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg* 1996;224:647-664
- 17 Hinnebusch BF, Ma Q, Henderson JW, Siddique A, Archer SY, Hodin RA. Enterocyte Response to Ischemia Is Dependent on Differentiation State. *J Gastrointestinal Surg* 2002;6:403-409
- 18 Zou L, Attuwaybi B, Kone BC. Effects of NF-kappa B inhibition on mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G713-21
- 19 Nezu Y, Tagawa M, Sakaue Y, Hara Y, Tsuchida S, Ogawa R. Kinetics of endotoxin concentration and tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 activities in the systemic and portal circulation during small intestinal ischemia and reperfusion in dogs. *Am J Vet Res* 2002;63:1680-1686