

肝门阻断再灌注后脑皮层组织和血清S100 β 蛋白的差异性改变及意义

郑晓春, 陈卫民, 盖成林

■背景资料

肝门长时间阻断后再灌注不仅加剧肝脏和肠道损伤,也可伤及远隔脏器,严重时可导致多器官功能衰竭。其机制目前仍然未明,可能与氧自由基, NO, 缓激肽, 前列腺素以及其他一些细胞因子等相关,自主神经系统可能也有重要作用。脑的缺血再灌注损伤的研究倍受重视,但远隔器官I/R损伤对中枢神经系统的影响及机制研究却鲜有报道。

■研究前沿

机体作为整体,远隔脏器间的相互作用日益受到重视。肝门阻断后再灌注过程中肠道因素是肝外脏器损伤的重要引擎,该领域的热点主要集中在作用机制研究,但尚未有明确结论。

郑晓春, 陈卫民, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科 辽宁省沈阳市 110001

郑晓春, 福建省立医院麻醉科 福建省福州市 350001

盖成林, 中国人民解放军第230医院麻醉科 辽宁省丹东市 118001

通讯作者: 陈卫民, 110001, 沈阳市和平区三好街36号, 中国医科大学附属盛京医院麻醉科, chenwm@cmu2h.com

电话: 024-83955029 传真: 024-83955029

收稿日期: 2006-05-13 接受日期: 2006-07-10

Alteration of cortex and serum S100 β protein in rats undergoing hepatic portal occlusion reperfusion

Xiao-Chun Zheng, Wei-Min Chen, Cheng-Lin Gai

Xiao-Chun Zheng, Wei-Min Chen, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Xiao-Chun Zheng, Department of Anesthesiology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Cheng-Lin Gai, Department of Anesthesiology, the 230th Hospital Chinese PLA, Dandong 118001, Liaoning Province, China

Correspondence to: Wei-Min Chen, Department of Anesthesiology, Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China. chenwm@cmu2h.com

Received: 2006-05-13 Accepted: 2006-07-10

Abstract

AIM: To explore the alterations of neuroglia cell reactivity and central nervous system (CNS) injury in rats undergoing hepatic portal occlusion (HPO) reperfusion using S100 β protein tissue content and serum concentration respectively.

METHODS: A total of 38 Wistar rats were anesthetized by isoflurane inhalation. HPO model was produced by hepatic portal interruption (Pringle' maneuver) for 30 min with a clamp, followed by 6-, 12-, and 24-h reperfusion after removal of the clamp. The animals were randomly divided into group A ($n = 8$) and B ($n = 30$). Group A served as the sham operation group, while HPO model was induced in group B. The

pH values, Ca²⁺ and K⁺ concentrations of portal vein blood sample were measured by blood-gas analysis, and the brain cortex content and serum concentration of S100 β protein were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

RESULTS: As compared with that in group A, the pH value of portal vein blood in group B was significantly decreased after HPO, but gradually recovered after reperfusion. Simultaneously, K⁺ concentration was remarkably increased and lasted to 6-h reperfusion, while Ca²⁺ concentration was decreased gradually and lasted to 12-h reperfusion ($P < 0.05$). The cortex S100 β protein content in group B was elevated significantly after 12- and 24-h reperfusion in comparison with that in group A (12.04 ± 3.29 , 14.81 ± 8.04 vs 2.71 ± 3.9 , $P < 0.01$ and $P < 0.05$). The serum concentration of S100 β protein was not markedly different between group A and B ($P > 0.05$). However, it was noticed that the number of patients with S100 β concentration higher than $0.2 \mu\text{g/L}$ was higher in group B.

CONCLUSION: Reperfusion after HPO can activate the reactivity of neuroglia cells and increase the cortex content of S100 β protein, but S100 β protein over-express can result in brain injury, which may be one of the mechanisms for the neurological complications after liver transplantation.

Key Words: Hepatic portal occlusion; Liver reperfusion injury; Brain injury; S100 β protein; Wistar rat

Zheng XC, Chen WM, Gai CL. Alteration of cortex and serum S100 β protein in rats undergoing hepatic portal occlusion reperfusion. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(31):3046-3049

摘要

目的: 通过观察肝门阻断(hepatic portal occlusion, HPO)再灌注后脑损伤特异性标志物S100 β 蛋白在中枢和外周的变化趋势,研究HPO再灌注对中枢神经系统(CNS)的影响。

方法: 成年Wistar大鼠异氟烷(isoflurane)吸入麻醉后随机分成对照组(A组, $n = 8$): 开腹但不阻断肝血流; 全肝血流阻断组(B组, $n = 30$): Pringle'法阻断门脉、肝动脉及胆总管, 全肝缺血30 min后恢复肝血供. 再灌注后6, 12和24 h取材. 血气分析测定门脉血pH值、 $[K^+]$ 和 $[Ca^{2+}]$, ELISA比较组织和血清S100 β 蛋白水平.

结果: HPO期间门静脉pH显著降低, $[K^+]$ 升幅超过1倍, 但开放后逐渐恢复; $[Ca^{2+}]$ 于再灌注后持续下降至12 h. 和A组比较, B组皮层S100 β 蛋白含量再灌注12和24 h时升高显著(12.04 ± 3.29 , 14.81 ± 8.04 vs 2.71 ± 3.9 , $P < 0.01$, $P < 0.05$). 但各时点的血清S100 β 蛋白的差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 再灌注后浓度超过0.2 $\mu\text{g/L}$ 的例数显著高于A组. 两种来源的S100 β 蛋白未见相关性.

结论: HPO再灌注刺激皮层神经胶质细胞的保护反应, S100 β 蛋白表达显著增加, 但表达过度可致脑损伤, 这可能是肝移植病例术后出现神经精神改变的机制之一.

关键词: 肝门阻断; 再灌注损伤; S100 β 蛋白; 脑损伤; Wistar大鼠

郑晓春, 陈卫民, 盖成林. 肝门阻断再灌注后脑皮层组织和血清S100 β 蛋白的差异性改变及意义. 世界华人消化杂志 2006;14(31):3046-3049

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3046.asp>

0 引言

肝移植和肝肿瘤等手术过程中常规需要肝门阻断(hepatic portal occlusion, HPO)以期减少出血, HPO后缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)损伤是不可避免的一个病理生理过程. 肝脏和肠道IR损伤后血流动力学、凝血功能、电解质、酸碱平衡等发生重大改变. 可致急性肺损伤和心功能不全等肝外脏器功能改变^[1-4], 甚至累及中枢神经系统(central nervous system, CNS), 文献报道肝移植术后神经精神功能紊乱发生率达7%-40%^[5], 一般认为与免疫抑制剂的大剂量应用有关, 本实验通过观察HPO再灌注后脑损伤特异性标志物S100 β 蛋白在中枢和外周的变化趋势, 研究HPO再灌注对CNS影响. 探讨肝移植术后精神功能紊乱的发生机制.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级成年 δ Wistar大白鼠(体质量200 $\pm$ 50g), 由中国医科大学附属盛京医院实验动

物中心提供. 动物术前禁食12 h. 异氟烷吸入麻醉. 尾静脉静注肝素500 U/kg. 常规备皮消毒后取腹部正中切口入腹, 离断肝周韧带以消除肝脏侧支循环. 尾动脉监测平均动脉压(MAP)和脉搏(RBP-1B型大鼠血压计, 中日友好临床医学研究所), 缺血期间根据血流动力学变化间断应用少量新福林保持MAP在80 mmHg以上. 半导体温度传感器(Datex多功能监测仪, 芬兰)监测直肠温度, 灯烤保温. 保持直肠温36-37 $^{\circ}\text{C}$. 术毕关腹前腹腔内注入含青霉素200 kU的温生理盐水1 mL. 皮肤缝合后即停止吸入麻醉, 保温至苏醒后归笼饲养, 术后自主饮用100 g/L葡萄糖水. 至预定时间点取材. 术中失血量超过2 mL者弃用. 血气分析仪为PHILIP M3562A(德国), 测试条为IRMA TRUTOINT(美国), 批号139903. ELISA试剂盒购自大连泛邦生化公司. 酶标仪为ELX-800(Bio-Tech Instrument, 美国).

1.2 方法 所有实验对象随机分成两组: A组(假手术对照组): $n = 8$, 经腹正中切口入腹, 切断全部肝周韧带, 不作肝血流的阻断; B组(全肝血流阻断组): $n = 30$, 于肝十二指肠韧带处用无创伤微血管夹完全阻断门脉、肝动脉及胆总管(Pringle'法^[6]), 使全肝缺血, 暂时关腹. 30 min后原路入腹松开血管夹恢复肝血供. 每组各有8例个体分别于再灌注后6, 12和24 h处死. A组的门脉血作为未阻断的基础值对照, B组再另取6只测定HPO再灌注前的血气分析.

1.2.1 门脉血pH, $[K^+]$ 和 $[Ca^{2+}]$ 在各时间点放血处死前取门静脉血1 mL送检血气分析.

1.2.2 S100 β 蛋白测定 血清标本: 由颈内静脉取血2 mL, 室温静置30 min后3000 rpm离心15 min, 取上清于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存待测. 脑皮层组织标本: 大鼠处死后剪开颅骨取出大脑, 分离左右半球, 取左脑皮层组织约100 mg于-70 $^{\circ}\text{C}$ 冻存待测. 测定时精确称重后在冰面上加PBS(PH: 7.4)10倍(W/V)稀释后以内切式匀浆机8000 r/s匀浆, 3000 r/s离心15 min后取上清. 考马兰蛋白定量. S100 β 蛋白测定均采用双抗体夹心法-酶联免疫吸附法(ELISA)测定. 生物素标记, 检测波长450 nm, 单位分别以 $\mu\text{g/L}$ 和 pg/mg.prot 表示.

统计学处理 所得数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示, 采用SPSS 13.0软件进行统计学分析.

2 结果

2.1 两组大鼠年龄、体重、体温、饲养环境等 没有差别. 缺血期间的MAP均在80 mmHg以

■ 相关报道

研究已经证实脑IR后可引起肝损害, 而短时间的肠道IR却能为脑提供预适应保护, 提示脑和肠道存在反射轴(Brain-Gut Axis). 还有肝IR损伤后出现血清S100 β 蛋白升高并持续24 h, 以及严重的肢体IR损伤后致脑损害等的相关报道.

■ 创新盘点

远隔脏器相互作用的研究尚少, 本研究以S100 β 蛋白为损伤标志物探讨HPO后IR损伤对大脑皮层的影响, 并且同步比较中枢和外周的S100 β 蛋白变化趋势.

■应用要点

HPO后脑损伤可能是肝移植术后后神经精神紊乱并发症的原因之一, 研究提示防治的要点可以从减轻始发脏器的IR损伤和保护脑细胞等多方面考虑。

表 1 门脉阻断前后门静脉血中酸碱度和电解质 (mean $\pm$ SD)

指标	阻断前 (A组, $n = 8$)	再灌注前 0 h ($n = 6$)	再灌注后 (B组, $n = 30$)		
			6 h ($n = 8$)	12 h ($n = 8$)	24 h ($n = 8$)
pH值	7.11 $\pm$ 0.15	6.53 $\pm$ 0.12 ^a	6.93 $\pm$ 0.11	6.94 $\pm$ 0.13	7.11 $\pm$ 0.15
[K ⁺](mmol/L)	6.4 $\pm$ 0.4	13.1 $\pm$ 3.6 ^b	7.2 $\pm$ 1.4	6.7 $\pm$ 1.2	6.6 $\pm$ 2.1
[Ca ²⁺](mmol/L)	1.66 $\pm$ 0.13	1.47 $\pm$ 0.11	1.12 $\pm$ 0.15 ^a	1.12 $\pm$ 0.21 ^a	1.23 $\pm$ 0.22 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 阻断前。

表 2 两组血清和组织S100 β 蛋白含量的比较 ($n = 8$, mean $\pm$ SD)

指标	A组	B组再灌注后		
		6 h	12 h	24 h
组织含量(pg/mg.prot)	2.71 $\pm$ 3.9	3.98 $\pm$ 4.56	12.04 $\pm$ 3.29 ^{bd}	14.81 $\pm$ 8.04 ^{ac}
血清浓度(μ g/L)	0.05 $\pm$ 0.07	0.09 $\pm$ 0.15	0.09 $\pm$ 0.14	0.23 $\pm$ 0.36
血清浓度超0.2 μ g/L的例数	0(8)		4(24) ^a	

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs A组, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs B组6 h。

上。HPO后肝脏颜色变浅, 门静脉怒张, 肠道淤血, 肠系膜动脉搏动逐渐减弱, 脾脏充血。随着阻断时间延长, 肠道淤血加重。动脉搏动消失。复流后动脉搏动逐渐转强, 肠道颜色变红, 肠管张力恢复, 脾脏体积减少, 肝脏色泽变为深红, 体积增大, 有的出现明显的淤血斑块。动物苏醒后A组呼吸与术前无明显差异, 反应良好, 能自主喝水并清洁毛发; B组呼吸明显增快, 频率60-115 bpm, 末梢苍白, 萎顿, 对刺激反应差。

2.2 血气分析 B组HPO后, 再灌注前门脉血中酸性物质堆积, pH值降低, [K⁺]升高, 和阻断前比较差异明显($P < 0.05$, $P < 0.01$), 再灌注后6, 12和24 h均和阻断前水平接近($P > 0.05$); B组的[Ca²⁺]再灌注后即逐渐下降, 12 h时最低, 24 h时略有回升但仍小于阻断前($P < 0.05$, $P < 0.01$)(表1)。

2.3 皮层组织及血清中S100 β 蛋白和A组比较, B组再灌注6 h时S100 β 蛋白组织含量未见差异, 2 h和24 h时升高显著($P < 0.01$, $P < 0.05$)。和A组比较, B组再灌注后各时点的差异无统计学意义(均 $P > 0.05$), 且组内比较也未见显著差异(均 $P > 0.05$)。但是再灌注后各组可见数例出现异常高值, 血清浓度超过0.2 μ g/L的例数显著高于A组, 两种来源的S100 β 蛋白未见相关性(表2)。

3 讨论

严重的肢体缺血再灌注损伤后可出现脑损害^[7]。体外循环后也常见神经精神功能异常。这类远隔脏器IR损伤对中枢神经系统的作用机制并未明确, 多数认为和再灌注后释放的介质有关, 而大

脑由于血流和神经细胞能量代谢的特点, 也对缺血缺氧等敏感。兴奋性氨基酸及其受体激活后引发的细胞内Ca²⁺超载而致神经细胞损伤是广泛认可的一种学说^[8]。血清S100 β 蛋白为小分子量酸性钙结合蛋白, 其 β 亚基对于CNS是高度特异性的。是脑损伤的特异性生化标志物^[9], 正常时不能通过血脑屏障(blood-brain barrier, BBB), 浓度不受年龄、溶血、温度、肝素等的影响, 正常值 ≤ 0.2 μ g/L。当脑组织受损后, 脑脊液的S100 β 蛋白通过受损BBB进入血液, 其浓度变化和神经系统损伤的程度呈正相关, 实验中HPO后24 h内血清S100 β 蛋白浓度均值较高, 但统计学上和对照组比较未见显著差异, 主要是由于结果中标准差较大所致。但是组内各时点均有异常高值的个例出现, 24 h时甚至可达临界值的5倍(1 μ g/L), 而且组中超过0.2 μ g/L的动物显著大于对照组, 提示有脑损伤的个例出现, 文献^[5]中肝移植后神经精神功能紊乱的发生率为7%-40%, 这种远隔脏器的影响有可能是以一定概率出现的, 因此其临床意义大于统计学含义。外周血中S100 β 蛋白的检出和BBB的完整性密切相关, 仅当超阈值的再灌注损伤使BBB通透性增加后, 血中该蛋白检测值才显著升高, 实验中血清与细胞内S100 β 蛋白含量的相关性并不明显。新的研究发现肝、脂肪细胞等也可分泌S100蛋白^[10-11], 脑脊液中的S100 β 蛋白或有更高特异性。本实验研究其上游的细胞内S100 β 蛋白含量, 在脑皮层中该蛋白主要存在于星型胶质细胞(astrocytes)中, 和受体相互作用后的糖化作用终产物是神经细胞存活所

必需的. 近年来认识到胶质细胞还是神经元间信息联系和反应的关键^[12]. HPO后肝和肠道IR损伤出现自由基增加、钙超载^[1,13]等, S100蛋白大量表达以保护神经元细胞, 是胶质细胞对病理因素的应激性反应. 实验中HPO后脑组织的S100 β 蛋白含量有升高并能持续24 h. 由于S100 β 的半衰期只有2 h, 说明再灌注后皮层胶质细胞反应性持续增强, 机体处于保护进程中, 是CNS应激性生化反应. 但是, S100 β 蛋白的过度表达却和多种CNS疾患相关. 高浓度S100 β 蛋白可致细胞凋亡^[14]. 而且CNS损伤后的的主要结果之一-反应性神经胶质细胞增多症(Reactive astrocytosis)也是经由S100 β 蛋白介导的, 这些对应激后神经细胞的存活并不利. 减少这种现象可能成为减轻CNS损伤的一种思路. Asano *et al*^[15]阻止S100 β 蛋白的过度表达可以减轻缺氧性脑损害. 同时有研究表明, 再灌注损伤能激活BBB的小胶质细胞(microglia), 释放蛋白酶和谷酰胺等, 和胶质细胞一样对缺血等低氧性侵袭敏感, 适当抑制小胶质细胞的功能可以保护BBB, 减轻脑水肿^[16]. 提示在伤害性因子持续刺激下, 胶质细胞反应后S100 β 蛋白的过度分泌则可取消保护作用, 造成神经细胞的器质性损伤. 由于肝病患者术前病情复杂, 多并存不同程度的脑损害病理生理基础, 而且围术期的病生改变远大于模型动物, 肝移植中长时间的HPO有可能出现或加重CNS损害, 产生神经精神症状, 影响预后和转归.

总之, HPO再灌注后剧烈的病理生理改变刺激神经胶质细胞的保护反应, S100 β 蛋白表达显著升高, 但表达过度可致脑损伤, 这可能是肝移植病例术后出现神经精神改变的机制之一.

4 参考文献

- 1 郑晓春, 陈彦青, 黄风怡, 彭玲, 于荣国, 林丽珊, 吴晓丹. 抗坏血酸对肠缺血再灌注损伤后大鼠肺的保护作用. 中华麻醉学杂志 2005; 25: 606-607
- 2 Liu P, Xu B, Hock CE. Inhibition of nitric oxide synthesis by L-name exacerbates acute lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion. *Shock* 2001; 16: 211-217
- 3 盛新华, 石汉平. 肠道在多器官功能障碍综合征中的作用. 世界华人消化杂志 2005; 2029-2032
- 4 张军明, 任艳华, 刘芬, 雷亚宁, 张婵, 钱旭. 肝门阻断对大鼠肠道肌间神经丛内NOS阳性神经元的影响. 世界华人消化杂志 2006; 14: 87-91
- 5 Padovan CS, Sostak P, Straube A. Neurological complications after organ transplantation. *Nervenarzt* 2000; 71: 249-258
- 6 Imamura H, Kokudo N, Sugawara Y, Sano K, Kaneko J, Takayama T, Makuuchi M. Pringle's maneuver and selective inflow occlusion in living donor liver hepatectomy. *Liver Transpl* 2004; 10: 771-778
- 7 史中立, 凌亦凌, 姚玉霞, 张爱子, 周君琳, 谷振勇, 黄新莉. 大鼠肢体缺血再灌注所致脑损伤及其机制探讨. 中国病理生理杂志 2001; 17: 451-454
- 8 Mahura IS. Cerebral ischemia-hypoxia and biophysical mechanisms of neurodegeneration and neuroprotection effects. *Fiziol Zh* 2003; 49: 7-12
- 9 Shirasaki Y, Edo N, Sato T. Serum S-100b protein as a biomarker for the assessment of neuroprotectants. *Brain Res* 2004; 1021: 159-166
- 10 Pelinka LE, Harada N, Szalay L, Jafarmadar M, Redl H, Bahrami S. Release of S100B differs during ischemia and reperfusion of the liver, the gut, and the kidney in rats. *Shock* 2004; 21: 72-76
- 11 Netto CB, Conte S, Leite MC, Pires C, Martins TL, Vidal P, Benfato MS, Giugliani R, Goncalves CA. Serum S100B protein is increased in fasting rats. *Arch Med Res* 2006; 37: 683-686
- 12 Volterra A, Meldolesi J. Astrocytes, from brain glue to communication elements: the revolution continues. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 626-640
- 13 黄昌州, 张宗明, 裘法祖. 缺血再灌注损伤对大鼠肝细胞钙池操纵的钙通道电流的影响及药物拮抗. 世界华人消化杂志 2005; 13: 739-742
- 14 Donato R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 637-668
- 15 Asano T, Mori T, Shimoda T, Shinagawa R, Satoh S, Yada N, Katsumata S, Matsuda S, Kagamiishi Y, Tateishi N. Arundic acid (ONO-2506) ameliorates delayed ischemic brain damage by preventing astrocytic overproduction of S100B. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005; 4: 127-142
- 16 Yenari MA, Xu L, Tang XN, Qiao Y, Giffard RG. Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: improvement by minocycline *in vivo* and *in vitro*. *Stroke* 2006; 37: 1087-1093

■名词解释

S100 β 蛋白为小分子量酸性钙结合蛋白, 血清浓度不受年龄、溶血、温度、肝素等的影响. 正常时不能通过血脑屏障, 脑组织损伤后可通过受损BBB进入血液, 其浓度变化可反映神经系统损伤的程度. 大脑皮层中S100 β 蛋白主要由星型胶质细胞分泌, 和受体结合后的糖化作用终产物是神经细胞存活所必需的. 但S100 β 蛋白的过度表达却和多种CNS疾患相关.

电编 李琪 编辑 王晓瑜