

# 甘露醇对大鼠小肠移植缺血再灌注损伤的保护作用

赵正维, 王为忠, 管文贤, 于小迪

赵正维, 王为忠, 管文贤, 于小迪, 第四军医大学西京医院胃肠外科 陕西省西安市 710033  
国家自然科学基金资助项目, No. 30371400  
通讯作者: 管文贤, 710033, 陕西省西安市, 第四军医大学西京医院胃肠外科. guanwenxian@medmail.com.cn  
电话: 029-84775261  
收稿日期: 2007-01-18 接受日期: 2007-02-08

## Protective effects of mannitol against small bowel ischemia and reperfusion injury after transplantation in rats

Zheng-Wei Zhao, Wei-Zhong Wang, Wen-Xian Guan, Xiao-Di Yu

Zheng-Wei Zhao, Wei-Zhong Wang, Wen-Xian Guan, Xiao-Di Yu, Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China  
Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30371400

Correspondence to: Guan Wen-Xian, Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China. guanwenxian@medmail.com.cn  
Received: 2007-01-18 Accepted: 2007-02-08

### Abstract

**AIM:** To investigate the effect of mannitol on small bowel ischemia and reperfusion (I/R) injury after transplantation and its possible mechanism.

**METHODS:** Rat models of small bowel I/R injury after transplantation were established in male rats. All the rats were randomly divided into sham operation group, I/R group and mannitol-treated group. After 0.5, 1 and 1.5 hours of I/R, intestinal tissues were collected for histopathological examination. The content of malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) in the intestinal tissues.

**RESULTS:** The height and thickness of intestinal villi were significantly lower in I/R group than those in sham operation group ( $P < 0.01$ ) and mannitol-treated group ( $P < 0.05$ ). At different time points, the content of MDA

was markedly higher in I/R group ( $16.24 \pm 4.56$ ,  $18.50 \pm 2.89$ ,  $19.42 \pm 2.21$ ) than that in sham operation group ( $10.26 \pm 1.72$ ,  $P < 0.01$ ) and mannitol-treated group ( $11.24 \pm 1.51$ ,  $14.03 \pm 3.12$ ,  $16.06 \pm 3.62$ ;  $P < 0.05$ ), but the activity of SOD was notably higher ( $398.36 \pm 18.81$ ,  $363.16 \pm 16.29$ ,  $325.66 \pm 14.58$  vs  $447.97 \pm 16.94$ ;  $422.30 \pm 17.41$ ,  $385.09 \pm 19.11$ ,  $346.15 \pm 14.10$ ;  $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** Mannitol has protective effect against small bowel I/R injury after transplantation in rats by eliminating free radicals.

**Key Words:** Small bowel transplantation; Ischemia and reperfusion; Mannitol; Free radicals; Rat

Zhao ZW, Wang WZ, Guan WX, Yu XD. Protective effects of mannitol against small bowel ischemia and reperfusion injury after transplantation in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(13):1537-1540

### 摘要

**目的:** 探讨甘露醇对大鼠小肠移植缺血再灌注(ischemia and reperfusion, I/R)损伤的保护作用及其作用机制。

**方法:** 建立大鼠小肠移植I/R损伤模型。雄性SD大鼠随机分为假手术组、I/R组和甘露醇处理组。对I/R损伤后不同时间(0.5, 1, 1.5 h)的小肠标本进行组织病理学观察并检测小肠组织中超氧化物歧化酶(SOD, U/mgprot)和丙二醛(MDA, nmol/mgprot)的含量。

**结果:** 不同时间点I/R组小肠绒毛高度和黏膜厚度低于假手术组( $P < 0.01$ )和甘露醇处理组( $P < 0.05$ )。不同时间点I/R组( $16.24 \pm 4.56$ ,  $18.50 \pm 2.89$ ,  $19.42 \pm 2.21$ )MDA水平高于假手术组( $10.26 \pm 1.72$ ,  $P < 0.01$ )和甘露醇处理组( $11.24 \pm 1.51$ ,  $14.03 \pm 3.12$ ,  $16.06 \pm 3.62$ ;  $P < 0.05$ ); 而SOD水平低于假手术组和甘露醇处理组( $398.36 \pm 18.81$ ,  $363.16 \pm 16.29$ ,  $325.66 \pm 14.58$  vs  $447.97 \pm 16.94$ ;  $422.30 \pm 17.41$ ,  $385.09 \pm 19.11$ ,  $346.15 \pm 14.10$ ;  $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ )。

**结论:** 甘露醇可通过清除氧自由基的方式对

### ■背景资料

甘露醇(mannitol)是临床上广泛使用的一种药物, 目前为止, 临床上使用甘露醇主要是利用了其渗透性脱水的作用机制。近年来有研究表明, 甘露醇对许多器官的缺血再灌注损伤具有保护作用。该保护作用并不是单纯通过渗透性脱水实现, 而主要是通过清除氧自由基的方式。甘露醇是一种氧自由基清除剂的观点引起了人们愈来愈多的重视, 但是关于其对小肠移植缺血再灌注损伤的研究尚少。

移植小肠缺血再灌注损伤起到保护作用。

**关键词:** 小肠移植; 缺血再灌注; 甘露醇; 氧自由基; 大鼠

赵正维, 王为忠, 管文贤, 于小迪. 甘露醇对大鼠小肠移植缺血再灌注损伤的保护作用. 世界华人消化杂志 2007;15(13):1537-1540

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1537.asp>

## 0 引言

随着小肠移植存活率和生活质量的迅速提升, 小肠移植被认为是各种原因造成的小肠功能衰竭的重要治疗措施. 小肠对缺血再灌注损伤尤为敏感, 如何防止和减轻移植小肠的缺血再灌注损伤一直是小肠移植领域研究的热点. 甘露醇(mannitol)是临床上广泛使用的一种药物, 目前为止, 临床上使用甘露醇主要是利用了其渗透性脱水的作用机制. 近年来有研究表明, 甘露醇对许多器官的缺血再灌注损伤具有保护作用, 该保护作用的主要机制是通过清除氧自由基的方式, 而非传统的渗透性脱水. 本实验通过建立大鼠小肠移植缺血再灌注损伤的动物模型, 探讨甘露醇对大鼠移植小肠缺血再灌注损伤的保护作用及其机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 雄性近交系成年SD大鼠, 体质量200-250 g, 由第四军医大学实验动物中心提供. 200 g/L甘露醇注射液, 西安京西双鹤药业公司生产. 超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所.

### 1.2 方法

**1.2.1 动物分组** 雄性SD大鼠随机分为3组, 虚拟手术组(6只); I/R组(18对); 甘露醇处理组(18对). I/R组与甘露醇处理组又进一步分为再灌注后0.5, 1.0, 1.5 h 3个亚组, 每组6对. 虚拟手术组仅行左肾切除术, 肾下腹主动脉阻断30 min; 甘露醇处理组: 200 g/L甘露醇注射液, 按10 mL/kg的剂量经尾静脉用输液泵60 min输完, 后行异位节段性小肠移植术; I/R组按相同容积用生理盐水代替甘露醇, 余处理同预处理组.

**1.2.2 模型制备** 实验动物于术前12 h禁食, 不禁水. 以20 g/L盐酸氯胺酮腹腔麻醉, 100 mg/kg. 大鼠小肠移植缺血再灌注损伤模型参照Wallander *et al*<sup>[1]</sup>的方法. 供肠取自小肠中段20 cm, 游离肠系膜上静脉、门静脉至肝门处剪断, 以含肝素

100 kU/L的4℃平衡盐液经肾下腹主动脉行小肠原位灌洗, 压力为0.343 kPa. 同时腹腔以冰盐水降温. 供肠动脉取自肠系膜上动脉根部. 移植肠在4℃肝素平衡盐液中保存70 min后移植于受体, 冷缺血时间约1.5 h. 切除受体左肾, 移植肠以冰盐水纱布保护, 用0/9无损伤缝合针行肠系膜上动脉及腹主动脉侧端吻合, 移植肠门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, 开放血流后, 腹腔以37℃温盐水复温. 移植肠近端关闭, 末端于左下腹造口. 各组于移植肠血流恢复达到预定时间时剖杀取材.

**1.2.3 小肠组织形态学分析** 取移植小肠远端2 cm, 40 g/L甲醛固定, 修剪、脱脂、石蜡包埋和切片, HE染色, 用图形分析仪测定移植小肠绒毛高度、黏膜厚度.

**1.2.4 小肠组织SOD和MDA测定** 小肠标本在冷生理盐水内漂洗、滤纸吸干黏液, 以冷生理盐水作为匀浆介质, 冰浴下以玻璃匀浆器匀浆, 4℃, 3500 r/min转低温离心15 min取上清, -70℃低温保存. 按试剂盒说明操作.

**统计学处理** 应用SPSS 10.0软件包进行统计分析. 实验指标用mean±SD表示. 多个样本均数比较采用完全随机设计资料的方差分析.

## 2 结果

**2.1 小肠组织形态学分析结果** 假手术组小肠黏膜基本完整, 可见轻微毛细血管淤血和极少炎症细胞浸润. 移植小肠再灌注后, 随着再灌注时间的延长, 组织损伤逐渐加重, 炎症细胞浸润增多至大量聚集, 逐渐向肠壁外层扩散. 肠绒毛由顶端向下破坏, 小肠绒毛高度、黏膜厚度逐渐破坏减小, 最终绒毛脱落, 固有层破坏, 出血和溃疡且范围扩大. 再灌注不同时间点I/R组组织损伤均较假手术组严重, 而甘露醇处理组小肠组织损伤总体上较I/R组减轻. 不同时间点I/R组小肠绒毛高度较假手术组均明显减低( $P<0.01$ ); 而甘露醇处理组小肠绒毛高度则显著高于I/R组( $P<0.05$ ). 不同时间点I/R组小肠黏膜厚度较假手术组均明显减低( $P<0.01$ ); 甘露醇处理组除0.5 h组外( $P>0.05$ ), 其余各时间点小肠黏膜厚度则显著高于I/R组( $P<0.05$ ). 见表1.

**2.2 小肠组织SOD和MDA测定结果** 与移植小肠缺血再灌注后, 再灌注不同时间点I/R组小肠组织SOD较假手术组有不同程度的降低; 小肠组织MDA较假手术组有不同程度的升高. 随着再灌注时间的延长, 这种变化更加明显. 而再灌注

表 1 小肠绒毛高度和黏膜厚度测定结果(mean ± SD)

时间(h)	绒毛高度(μm)			黏膜厚度(μm)		
	虚假手术组	I/R组	甘露醇处理组	虚假手术组	I/R组	甘露醇处理组
	313 ± 23			562 ± 17		
0.5	—	260 ± 23 <sup>b</sup>	290 ± 21 <sup>a</sup>	—	529 ± 18 <sup>b</sup>	544 ± 15
1.0	—	217 ± 24 <sup>b</sup>	249 ± 27 <sup>a</sup>	—	507 ± 19 <sup>b</sup>	529 ± 14 <sup>a</sup>
1.5	—	179 ± 21 <sup>b</sup>	214 ± 25 <sup>a</sup>	—	467 ± 20 <sup>b</sup>	491 ± 15 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs I/R组; <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 假手术组.

表 2 小肠组织SOD和MDA测定结果(mean ± SD)

时间(h)	SOD (U/mgprot)			DA (nmol/mgprot)		
	虚假手术组	I/R组	甘露醇处理组	虚假手术组	I/R组	甘露醇处理组
	447.97 ± 16.94			10.26 ± 1.72		
0.5	—	398.36 ± 18.81 <sup>b</sup>	422.30 ± 17.41 <sup>a</sup>	—	16.24 ± 4.56 <sup>b</sup>	11.24 ± 1.51 <sup>a</sup>
1.0	—	363.16 ± 16.29 <sup>b</sup>	385.09 ± 19.11 <sup>a</sup>	—	18.50 ± 2.89 <sup>b</sup>	14.03 ± 3.12 <sup>a</sup>
1.5	—	325.66 ± 14.58 <sup>b</sup>	346.15 ± 14.10 <sup>a</sup>	—	19.42 ± 2.21 <sup>b</sup>	6.06 ± 3.62 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs I/R组; <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 假手术组.

不同时间点甘露醇处理组小肠组织SOD较I/R组有明显的升高, MDA较I/R组有明显的降低. 不同时间点I/R组小肠组织SOD较假手术组均明显降低(*P*<0.01); 甘露醇处理组小肠组织SOD高于I/R组(*P*<0.05). 不同时间点I/R组小肠组织MDA较假手术组均明显升高(*P*<0.01); 甘露醇处理组小肠组织MDA低于I/R组(*P*<0.05, 表2).

### 3 讨论

I/R损伤是导致小肠移植失败的主要原因之一. I/R损伤是器官移植的最初反应, 移植物不可避免的要经历缺血再灌注阶段. 近年来, 一系列实验证明I/R损伤的发生与氧自由基有密切关系<sup>[2-6]</sup>. 生理情况下, 体内自由基的生成与清除处于一种动态平衡, 氧自由基及其引发的脂质过氧化反应, 参与缺血组织器官的损害. 人体内存在多种抗氧化物质, 在正常生理情况下, 他可以清除体内产生的自由基. 但是在缺血再灌注后, 组织中有过量的自由基产生, 而抗氧化物质则失活或减少, 导致自由基不能被完全清除. 这些自由基攻击蛋白质、核酸和生物膜上的不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化作用, 形成脂质过氧化物-丙二醛(MDA)引起细胞损伤. MDA是膜脂质在氧化性极强的自由基作用下发生氧化反应释放出的代谢产物. MDA的含量变化可反映出脂质过氧化反应的程度, 用来反映组织受损的程

度. SOD是体内清除自由基的重要物质之一, 当体内氧自由基生成增多时, 他与超氧阴离子反应生成过氧化氢, 再由过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化酶转变成成为水, 从而使自由基清除. 当体内SOD产生不足或消耗过多时, 可使自由基的水平明显提高, 加重组织的损伤.

针对这一病理机制, 寻找有效的抗氧自由基物质, 减轻移植小肠的I/R损伤是提高小肠移植成功率的关键. 甘露醇作为一种渗透性脱水剂在临床上已有多年的运用历史, 使用范围广泛, 可以降低颅内压、眼内压、消除脑水肿、利尿、还可防止血压上升、动脉硬化、脑膜炎等<sup>[7]</sup>. 近些年许多实验对于甘露醇的功能进行了更为全面的分析. 近来有研究表明, 甘露醇有减轻组织细胞损伤的作用, 这种保护作用与其渗透性脱水的机制并无明显相关性. Winkler *et al*<sup>[8]</sup>研究发现甘露醇的脱水作用只能减少脑组织含水量的2%左右, 因此提出了甘露醇可能还存在着比渗透性脱水更为有效的作用机制. 陈洁丽 *et al*<sup>[9]</sup>的研究也再次证实了Winkler *et al*的观点, 认为甘露醇对脑组织的保护作用并不主要依靠其渗透性脱水的机制. 以后的研究相继发现了甘露醇具有清除氧自由基, 减少细胞凋亡以及减少炎症细胞释放等功能<sup>[10-13]</sup>, 使人们对于甘露醇的药用功能有了全新的认识. 刘富东 *et al*<sup>[14]</sup>研究了甘露醇对大鼠局灶性脑缺血再

### ■同行评价

本实验通过建立大鼠小肠移植缺血再灌注损伤的动物模型, 探讨甘露醇对大鼠移植小肠缺血再灌注损伤的保护作用及其机制. 该研究设计合理, 数据详实, 具有一定理论意义和应用价值.



灌注损伤时神经细胞凋亡的影响, 提出甘露醇能抑制细胞凋亡, 这种作用可能与甘露醇的抗氧化功能有关. Sagsoz *et al*<sup>[15]</sup>报道了甘露醇对大鼠卵巢的缺血再灌注损伤具有保护作用, 提出其机制也是清除氧自由基而非渗透性脱水. Weinbroum *et al*<sup>[16]</sup>研究了甘露醇在因为肝脏缺血再灌注损伤引起的肺缺血再灌注损伤中的保护作用, 同时分析了甘露醇的抗氧化能力大小与剂量之间的关系. Larsen *et al*<sup>[17]</sup>将33位接受冠状动脉搭桥术的病人进行双盲随机分组, 以患者分流过程中冠状窦血液中MDA含量作为判定甘露醇抗氧化能力的指标, 结果发现给予甘露醇干预的各组病人血液中MDA含量与对照组相比有降低的趋势. 在这些器官的I/R损伤过程中, 甘露醇都扮演了氧自由基清除剂的角色. 甘露醇作为一种氧自由基清除剂的观点已受到人们的普遍重视.

我们的实验通过建立大鼠小肠移植I/R损伤的动物模型, 研究甘露醇对大鼠小肠移植后移植肠I/R损伤的保护作用. 为了减少甘露醇高渗性脱水作用对实验结果的影响, 我们利用甘露醇在体内半衰期短的特点, 采用甘露醇持续慢滴的方法, 使其高渗脱水作用不明显, 而清除氧自由基的作用较持久. 实验结果表明甘露醇对移植大鼠小肠I/R损伤具有保护作用, 机制为甘露醇能有效减少小肠组织中的MDA水平, 另一方面提高了SOD水平. 提示甘露醇这一临床上广泛使用的药物在防止小肠移植后的I/R损伤中具有一定的实用价值.

#### 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 Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 181-190
- 3 Poussios D, Andreadou I, Papalois A, Rekka E, Gavalakis N, Aroni K, Kourounakis PN, Fotiadis C, Sechas MN. Protective effect of a novel antioxidant non-steroidal anti-inflammatory agent (compound IA) on intestinal viability after acute mesenteric ischemia and reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2003; 465: 275-820
- 4 Akcakaya A, Alimoglu O, Sahin M, Abbasoglu SD. Ischemia-reperfusion injury following superior mesenteric artery occlusion and strangulation obstruction. *J Surg Res* 2002; 108: 39-43
- 5 CHEN Hong-mao, ZHAO Zuo-qing, LÜ Fa-qin. Changes and significances of SOD and MDA after ischemia reperfusion injury of hepatic neoplasm. *Journal of Medical Colleges of PLA* 2003; 18: 203-204
- 6 刘小南, 霍婷婷, 王为忠, 陈彩平, 管文贤, 陈冬利. 缺血预处理对大鼠移植胰缺血再灌注损伤的保护作用及其与细胞凋亡的相关性. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 871-876
- 7 王桂英, 葛蕾, 王金平. 甘露醇的广泛应用. *中华中西医杂志* 2004; 2: 99-101
- 8 Winkler SR, Munoz-Ruiz L. Mechanism of action of mannitol. *Surg Neurol* 1995; 43: 59
- 9 陈洁丽, 江德华, 张卫华, 梁立平. 甘露醇在脑缺血动物实验中的治疗作用. *中华神经科杂志* 1997; 30: 161-164
- 10 陈建常, 史振满, 王乐农, 卢开柏. 肢体缺血再灌注致肠损伤及甘露醇的保护作用. *中国急救医学* 2000; 20: 153-154
- 11 张文夺, 郭永章, 张炳彦, 王炳煌. 甘露醇对肠组织缺血再灌注损伤保护作用的研究. *昆明医学院学报* 2003; 24: 9
- 12 马支媛, 宋艳玲, 白涛. 体外循环期间甘露醇对氧自由基变化的影响. *中华实用中西医杂志* 2006; 19: 283-284
- 13 曲友直, 赵振伟, 高国栋, 秦怀洲, 李永林. 甘露醇对局灶性脑缺血再灌注大鼠脑组织NO及神经细胞凋亡的影响. *卒中与神经疾病* 2004; 11: 8-9, 12
- 14 刘富东, 吴家晔, 储照虎, 袁存国. 甘露醇对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤时神经细胞凋亡的影响. *临床神经病学杂志* 2002; 15: 21-23
- 15 Sagsoz N, Kisa U, Apan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Hum Reprod* 2002; 17: 2972-2976
- 16 Weinbroum AA, Shapira I, Ben-Abraham R, Szold A. Mannitol dose-dependently attenuates lung reperfusion injury following liver ischemia reperfusion: a dose-response study in an isolated perfused double-organ model. *Lung* 2002; 180: 327-338
- 17 Larsen M, Webb G, Kennington S, Kelleher N, Sheppard J, Kuo J, Unsworth-White J. Mannitol in cardioplegia as an oxygen free radical scavenger measured by malondialdehyde. *Perfusion* 2002; 17: 51-55

电编 郭海丽 编辑 张焕兰