

CO及肺泡血管壁通透性在肝硬化大鼠中的变化

杨树平, 王吉耀, 郭津生

杨树平, 南京医科大学第一附属医院消化科 江苏省南京市 210029

王吉耀, 郭津生, 复旦大学附属中山医院消化科 上海市 200032

作者贡献分布: 此课题由杨树平、王吉耀及郭津生设计; 研究过程、数据分析及论文书写由杨树平完成。

通讯作者: 王吉耀, 教授, 200032, 上海市, 复旦大学附属中山医院消化科. jiyao_wang@gmail.com

收稿日期: 2010-10-18 修回日期: 2010-12-15

接受日期: 2010-12-21 在线出版日期: 2011-01-28

Alterations in plasma carbon monoxide levels and alveolar permeability in cirrhotic rats

Shu-Ping Yang, Ji-Yao Wang, Jin-Sheng Guo

Shu-Ping Yang, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, Jiangsu Province, China

Ji-Yao Wang, Jin-Sheng Guo, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

Correspondence to: Professor Ji-Yao Wang, Department of Gastroenterology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China. jiyao_wang@gmail.com

Received: 2010-10-18 Revised: 2010-12-15

Accepted: 2010-12-21 Published online: 2011-01-28

Abstract

AIM: To examine possible alterations in plasma carbon monoxide (CO) levels and alveolar permeability in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis.

METHODS: Liver cirrhosis was induced in rats by subcutaneous administration of carbon tetrachloride. Mean arterial pressure (MAP, kPa), heart rate (HR, b/min), and portal pressure (PP, cm/H₂O) were monitored by using an indwelling catheter. Plasma CO levels were determined by Chalmers method, and alveolar permeability was measured using the Evens blue extravasation technique.

RESULTS: Typical features of cirrhosis were histologically observed in carbon tetrachloride-treated rats. Compared with normal control rats, cirrhotic rats presented a significant increase in portal pressure ($16.67 \text{ cmH}_2\text{O} \pm 0.63 \text{ cmH}_2\text{O}$ vs $8.82 \text{ cmH}_2\text{O} \pm 0.29 \text{ cmH}_2\text{O}$; $P < 0.01$), plasma

CO levels ($18.69 \mu\text{mol/L} \pm 1.86 \mu\text{mol/L}$ vs $10.27 \mu\text{mol/L} \pm 1.21 \mu\text{mol/L}$; $P < 0.01$), and Evens blue extravasation ($36.57 \mu\text{g/g} \pm 1.69 \mu\text{g/g}$ vs $29.83 \mu\text{g/g} \pm 2.34 \mu\text{g/g}$; $P < 0.01$), but a significant decrease in mean arterial pressure ($15.92 \text{ kPa} \pm 0.74 \text{ kPa}$ vs $18.93 \text{ kPa} \pm 0.71 \text{ kPa}$; $P < 0.01$).

CONCLUSION: Activation of the HO-CO system and increased alveolar permeability may be important causes of development of hepatopulmonary syndrome in patients with cirrhosis.

Key Words: Cirrhosis; Hepatopulmonary syndrome; Carbon monoxide; Alveolar permeability

Yang SP, Wang JY, Guo JS. Alterations in plasma carbon monoxide levels and alveolar permeability in cirrhotic rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(3): 281-283

摘要

目的: 观察CCl₄诱导的肝硬化模型中, CO及肺泡血管壁通透性的变化。

方法: CCl₄皮下注射制备大鼠肝硬化模型, 动脉插管生理多导仪记录心率、平均动脉压的变化, 门静脉插管测定门静脉压力, 血浆CO水平的测定用联二亚硫酸盐还原法, 静脉注射伊文思蓝测定肺泡血管壁通透性。

结果: CCl₄成功复制肝硬化模型, 显微镜下见正常肝小叶被完全破坏, 有典型的假小叶形成。肺组织肺泡壁增厚, 肺毛细血管管腔扩张, 部分肺泡腔变小。与正常对照组相比, 肝硬化组平均动脉压显著降低($15.92 \text{ kPa} \pm 0.74 \text{ kPa}$ vs $18.93 \text{ kPa} \pm 0.71 \text{ kPa}$, $P < 0.01$), 门脉压力显著增高($16.67 \text{ cmH}_2\text{O} \pm 0.63 \text{ cmH}_2\text{O}$ vs $8.82 \text{ cmH}_2\text{O} \pm 0.29 \text{ cmH}_2\text{O}$, $P < 0.01$); 血浆CO水平显著升高($18.69 \mu\text{mol/L} \pm 1.86 \mu\text{mol/L}$ vs $10.27 \mu\text{mol/L} \pm 1.21 \mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$); 肺组织EB含量明显增加($36.57 \mu\text{g/g} \pm 1.69 \mu\text{g/g}$ vs $29.83 \mu\text{g/g} \pm 2.34 \mu\text{g/g}$, $P < 0.01$)。

结论: HO-CO的激活、肺泡血管壁通透性增加可能是肝肺综合征的重要原因。

关键词: 肝硬化; 肝肺综合征; 一氧化碳; 肺泡通透性

■背景资料

肝硬化尤其是晚期常伴发肺部结构和功能的改变, 如出现低氧血症并伴有肺部血管扩张即称为肝肺综合征(HPS), 是肝硬化严重并发症之一, 发病机制尚不清楚, 目前认为可能与扩血管物质/缩血管物质的失衡、肺部微血管增生及通透性增加等因素有关。

■同行评议者

王炳元, 教授, 中国医科大学附属第一医院消化内科

■相关报道

Zhang等在结扎胆管造成胆汁性肝硬化模型,发现3-5 wk肺组织HO-1表达升高、COHb逐渐上升,用HO抑制剂后,COHb降到正常,动脉血氧分压和肺内血管的扩张得到改善.

杨树平, 王吉耀, 郭津生. CO及肺泡血管壁通透性在肝硬化大鼠中的变化. 世界华人消化杂志 2011; 19(3): 281-283

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/281.asp>

0 引言

肝硬化尤其是晚期常伴发肺部结构和功能的改变,如出现低氧血症并伴有肺部血管扩张即称为肝肺综合征(hepatopulmonary syndrome, HPS),是肝硬化严重并发症之一,发病机制尚不清楚,目前认为可能与扩血管物质/缩血管物质的失衡、肺部微血管增生及通透性增加等因素有关^[1]. CO是一种扩血管物质,是由血红素氧合酶(heme oxygenase, HO)催化血红素降解而产生的,HO是这一过程的限速酶. 研究提示肝硬化时HO-CO系统被激活,CO过量产生导致全身血管扩张,在HPS发病中的作用受到重视^[2]. 本文拟在CCl₄大鼠肝硬化模型上,观察血CO水平以及肺血管通透性的变化,并探讨在HPS发病中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料 伊文思蓝(Eans Blue, EB)、甲酰胺、联二亚硫酸钠等购自上海化学试剂采购站. 主要仪器有754型分光光度计、生理多导仪(SMUP-PC型包括四路放大器、换能器、数模转换卡、计算机及信号处理软件)等.

1.2 方法

1.2.1 造模及分组: ♂ SD大鼠(购于上海中科院实验动物中心),体质量为180-220 g. 按传统方法制备CCl₄肝硬化模型,即大鼠皮下注射500 mL/L CCl₄(以橄榄油稀释)3 mL/kg体质量(首次加倍),每周两次,正常对照组给予相同剂量的橄榄油. 第12周末结束. 取肝硬化大鼠10只、正常对照大鼠10只进行实验.

1.2.2 血流动力学检测: 用1%戊巴比妥钠40 mg/kg腹腔注射麻醉,取右侧股动脉插管,将接有三通的PE50导管插入,连接生理多导仪以测定心率、血压. 平均动脉压(mean arterial pressure, MAP kPa) = 舒张压+(收缩压-舒张压)/3. 于大鼠腹中线位置纵向剪开皮肤和腹肌,用16G的套管穿刺针在远断刺入门静脉主干开口处,用丝线结扎固定,拔去针芯,接三通和测压管(管中注满肝素生理盐水稀释液),读取水柱高度为门静脉压力.

1.2.3 肺泡壁血管通透性测定^[3]: 股静脉注射1.5% EB, 2 h后放血处死大鼠,用生理盐水灌洗肺血管后,取肺称其质量,用甲酰胺水浴,分光光度仪比色,蒸馏水作空白对照,测定吸光度,

表 1 各组大鼠心率、平均动脉压、门脉压力的变化 (n = 10)

分组	HR(b/min)	MAP(kPa)	PP(cmH ₂ O)
对照组	395.9 ± 14.9	18.93 ± 0.71	8.82 ± 0.29
Cirrhosis	409.6 ± 15.6	15.92 ± 0.74 ^a	16.67 ± 0.63 ^b

^aP<0.05, ^bP<0.01 vs 对照组. HR: 心率; MAP: 平均动脉压; PP: 门脉压力.

根据标准曲线计算出EB含量.

1.2.4 血浆CO的测定^[4]: 用联二亚硫酸盐还原法: 取两支试管分别标明为实验管和对照管,各加入1% Hb溶液1 mL. 实验管加入待测血浆1 mL,对照管加入蒸馏水1 mL. 两管均加入联二亚硫酸钠溶液0.1 mL,混匀,静置10 min. 在波长为540 nm、555 nm分别测吸光度,计算两者的比值R,根据标准曲线计算出CO的量.

1.2.5 形态学检查: 组织用Carnoy液(醋酸: 氯仿: 无水酒精为1:3:6)固定,石蜡包埋切片,HE染色,光镜下观察肝脏、肺等形态学改变.

统计学处理 采用方差齐性检验及t检验. 数值以mean ± SD表示. P<0.05差异有显著性.

2 结果

2.1 病理情况 肝硬化大鼠肝脾明显肿大,肝脏变形、表面凹凸不平呈结节状、质地变硬、边缘变钝. 显微镜下见正常肝小叶被完全破坏,肝细胞脂肪变性、结缔组织明显增生形成纤维条索并包绕肝细胞、肝内脉管系统已完全紊乱,形成典型的假小叶. 肺组织肺泡壁增厚,可见大量吞噬细胞和中性粒细胞浸润,肺毛细血管管腔扩张,部分肺泡腔变小.

2.2 血流动力学指标 肝硬化模型组与正常对照组比较,肝硬化组MAP显著降低,门脉压力显著增高,而两组大鼠的心率无显著性变化(表1).

2.3 各组大鼠血浆CO水平及肺组织EB含量的变化 肝硬化大鼠血浆CO水平显著高于正常对照大鼠(18.37 μmol/L ± 1.79 μmol/L vs 10.27 μmol/L ± 1.21 μmol/L; P<0.01),肺组织EB含量肝硬化组明显高于正常对照组(36.57 μg/g ± 1.69 μg/g vs 29.83 μg/g ± 2.34 μg/g; P<0.01).

3 讨论

HPS是肝硬化或非肝源性门静脉高压的严重并发症之一,发病机制还不清楚,可能与肺循环血管的普遍扩张、肺部血管增生和通透性增加等有关. 研究提示NO在HPS的血管扩张中起重要

作用, CO同NO一样也是一种扩血管气体信使物质^[5], 肝硬化时CO产生增加, 在血管功能紊乱中的作用受到广泛关注^[6].

内源性CO是由HO催化血红素而产生的, 并同时释放等摩尔数的Fe和胆绿素, 后者在胆绿素还原酶的催化下很快还原为胆红素. HO是这一过程的限速酶, 是一种微粒体酶, 目前发现有HO-1、HO-2、HO-3, HO-1是诱导型, 是热休克蛋白32(heat shock protein 32, HSP32), 在缺O₂、内毒素、NO、TNF、重金属、氧化应急等刺激情况下产生, 在正常情况下脾脏有大量的HO-1的表达, 肝脏有少量的表达, 可能与衰老红细胞和游离血红蛋白的清除有关; HO-2是结构型, 是细胞的组成部分, 广泛分布肝脏、脾脏、肺及中枢神经系统等, 起维持血管张力和发挥信息传递作用. HO-3活性很低, 功能目前尚不清楚^[7].

本实验结果显示, 肝硬化大鼠门静脉压力明显升高, 存在门脉高压, MAP显著降低出现血流动力学紊乱现象即所谓的高动力循环状态, 肝硬化大鼠血浆CO水平明显升高, 说明肝硬化时HO-CO系统发生变化, CO产生增加, 这与文献报道一致^[8]. 肺组织病理示肺泡壁增厚, 毛细血管扩张, 肺血管壁通透性增加, 也存在肝硬化发生肺血管并发症的病理生理基础. 有临床研究发现肝硬化合并有HPS患者血COHb水平明显升高^[9], Zhang等^[10]在结扎胆管造成胆汁性肝硬化模型, 发现3-5 wk肺组织HO-1表达升高、COHb逐渐上升, 用HO抑制剂后, COHb降到正常, 动脉血氧分压和肺内血管的扩张得到改善. 该研究同时还发现肝硬化大鼠肺组织内皮细胞中NOS表达也增强, 而这种内皮源性的NOS是毛细血管增生的媒介, 在部分结扎门静脉引起的门脉高压模型和结扎胆管引起的肝硬化模型上观察到内脏毛细血管明显增生并与NOS表达呈正相关, 在肝硬化模型上还观察到内脏微血管壁通透性增加^[11], 临床研究发现肝硬化患者肺泡通透性很容易受损^[12]. 肝硬化状态下HO表达增加、CO水平的上升, 不仅能引起内脏血管扩张, 也能引起肺部血管的扩张, 同时肺部血管通透性的改变更易发生HPS.

肝硬化门脉高压时, HO活性增加、CO产生增多的原因尚不清楚. 肝硬化时常伴有内毒素血症、细胞因子增加、血管切应力改变等, 这些可诱导HO-1的表达. 有研究发现NO能调节HO-1的表达^[13]. NO的供体能刺激主动脉平滑肌细胞的HO-1基因的转录, 引起HO-1 mRNA的表达和蛋白的合成增加. 肝硬化时NO合成增多, 因

而NO也是HO活性增强的原因之一. 肺血管通透性增加可能与血管扩张、低白蛋白等有关. 在临床上HPS在肝硬化中的发病率为4%-47%^[14], 目前只有肝移植, 尚没有其他的有效方法, 故加强这方面的研究对预防和治疗HPS可能有很重要的意义^[15].

4 参考文献

- 1 Varghese J, Ilias-basha H, Dhanasekaran R, Singh S, Venkataraman J. Hepatopulmonary syndrome - past to present. *Ann Hepatol* 2007; 6: 135-142
- 2 Fallon MB. Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease: hepatopulmonary syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2005; 39: S138-S142
- 3 李少华, 吴中立. 伊文思蓝荧光法测定肺血管壁通透性. *中国病理生理杂志* 1990; 6: 220-221, 206
- 4 Chalmers AH. Simple, sensitive measurement of carbon monoxide in plasma. *Clin Chem* 1991; 37: 1442-1445
- 5 Chung HT, Choi BM, Kwon YG, Kim YM. Interactive relations between nitric oxide (NO) and carbon monoxide (CO): heme oxygenase-1/CO pathway is a key modulator in NO-mediated antiapoptosis and anti-inflammation. *Methods Enzymol* 2008; 441: 329-338
- 6 Goh BJ, Tan BT, Hon WM, Lee KH, Khoo HE. Nitric oxide synthase and heme oxygenase expressions in human liver cirrhosis. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 588-594
- 7 Farombi EO, Surh YJ. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol* 2006; 39: 479-491
- 8 Chen YC, Ginès P, Yang J, Summer SN, Falk S, Russell NS, Schrier RW. Increased vascular heme oxygenase-1 expression contributes to arterial vasodilation in experimental cirrhosis in rats. *Hepatology* 2004; 39: 1075-1087
- 9 Arguedas MR, Drake BB, Kapoor A, Fallon MB. Carboxyhemoglobin levels in cirrhotic patients with and without hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2005; 128: 328-333
- 10 Zhang J, Ling Y, Luo B, Tang L, Ryter SW, Stockard CR, Grizzle WE, Fallon MB. Analysis of pulmonary heme oxygenase-1 and nitric oxide synthase alterations in experimental hepatopulmonary syndrome. *Gastroenterology* 2003; 125: 1441-1451
- 11 Geerts AM, De Vriese AS, Vanheule E, Van Vlierberghe H, Mortier S, Cheung KJ, Demetter P, Lameire N, De Vos M, Colle I. Increased angiogenesis and permeability in the mesenteric microvasculature of rats with cirrhosis and portal hypertension: an in vivo study. *Liver Int* 2006; 26: 889-898
- 12 Kao CH, Huang CK, Tsai SC, Wang SJ, Chen GH. Evaluation of lung ventilation and alveolar permeability in cirrhosis. *J Nucl Med* 1996; 37: 437-441
- 13 Ghosh S, Gal J, Marczin N. Carbon monoxide: endogenous mediator, potential diagnostic and therapeutic target. *Ann Med* 2010; 42: 1-12
- 14 Colle I, Van Steenkiste C, Geerts A, Van Vlierberghe H. Hepatopulmonary syndrome and portopulmonary hypertension: what's new? *Acta Gastroenterol Belg* 2007; 70: 203-209
- 15 Zhang ZJ, Yang CQ. Progress in investigating the pathogenesis of hepatopulmonary syndrome. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010; 9: 355-360

■同行评价

本文选题较好, 具有一定的临床意义.