本文引用:张彬,贺德栋,朱绍辉,等. 高氧液联合缺血后处理对家兔肠缺血再灌注致肝损伤的保护作用[J]. 新乡医学院学报,2014,31(8):603-608,611.

【基础研究】

高氧液联合缺血后处理对家兔肠缺血再灌注致肝损伤的保护作用

张 彬, 贺德栋, 朱绍辉, 房祥杰
(新乡医学院第一附属医院普通外科,河南 卫辉 453100)

摘要: 目的 探讨高氧液联合缺血后处理对家兔肠缺血再灌注所致肝损伤的保护作用。**方法** 将家兔48只随机分为假手术组(SO组)、缺血再灌注组(IR组)、高氧液组(HO组)和高氧液缺血后处理组(HI组),每组12只。SO组家兔仅手术显露肠系膜上动脉(SMA);IR组家兔阻断SMA 60 min,再灌注120 min;HO组家兔在阻断SMA 60 min和再灌注120 min过程中静脉输入高氧液;HI组家兔于阻断SMA 60 min后,再灌注开始时静脉输入高氧液,同时进行3个循环的30 s再灌注/30 s阻断的缺血后处理。再灌注120 min后采集各组家兔动脉血、静脉血及部分小肠、肝组织,检测肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素(IL)-10、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)及内毒素水平,测定血清及小肠、肝组织内丙二醛(MDA)含量及髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)活性,Chiu 6级评分法观察肠黏膜损伤情况,细菌培养观察细菌移位率,免疫组织化学观察肝组织中核因子κB(NF-κB)p65的表达。**结果** IR组家兔血清中TNF-α、IL-10、内毒素水平显著高于SO组($P<0.01$);HO组和HI组家兔血清中TNF-α、内毒素水平显著低于IR组($P<0.05$);HI组家兔血清中TNF-α、内毒素水平显著低于HO组($P<0.05$,$P<0.01$)。HO组和HI组家兔血清中IL-10水平显著高于IR组($P<0.01$),HO组和HI组家兔血清中IL-10水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。IR组家兔血清中MPO活性和MDA水平显著高于SO组($P<0.01$),HO组和HI组家兔血清中MPO活性和MDA水平显著低于IR组($P<0.01$);HI组家兔血清中MPO活性和MDA水平显著低于HO组($P<0.05$,$P<0.01$)。IR组家兔血清中SOD活性显著低于SO组($P<0.01$),HO组和HI组家兔血清中SOD活性显著高于IR组($P<0.01$),且HI组家兔血清中SOD活性显著高于HO组($P<0.01$)。IR组、HO组和HI组家兔肠黏膜损伤评分显著高于SO组($P<0.01$),HO组和HI组家兔肠黏膜损伤评分显著低于IR组($P<0.01$),HI组家兔肠黏膜损伤评分显著低于HO组($P<0.05$)。IR组家兔小肠黏膜组织中MPO活性和MDA水平显著高于SO组($P<0.01$);HO组和HI组家兔小肠黏膜组织中MPO活性和MDA水平显著低于IR组($P<0.01$);HI组家兔小肠黏膜组织中MPO活性和MDA水平显著低于HO组($P<0.05$)。IR组家兔小肠黏膜组织中SOD活性显著低于SO组($P<0.01$);HO组、HI组血清SOD活性仍显著高于IR组($P<0.01$);HI组家兔小肠黏膜组织中SOD活性显著高于HO组($P<0.05$)。SO组家兔肝组织均无细菌移位,IR组家兔肝脏细菌移位率100.0%,HO和HI组家兔肝脏细菌移位率均为83.3%,HO和HI组家兔肝脏细菌移位率与IR组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。IR组、HO组、HI组家兔肝组织内NF-κB p65阳性表达显著高于SO组($P<0.01$),HO组和HI组家兔肝组织内NF-κB p65阳性表达显著低于IR组($P<0.01$),HI组家兔肝组织内NF-κB p65阳性表达显著低于HO组($P<0.05$)。IR组家兔肝组织中MPO活性及MDA、ALT、AST水平显著高于SO组($P<0.01$);HO组和HI组家兔肝组织中MPO活性及MDA、ALT、AST水平仍显著低于IR组($P<0.01$);HI组家兔肝组织中MPO活性及MDA、ALT、AST水平显著低于HO组($P<0.05$)。IR组家兔肝组织中SOD活性显著低于SO组($P<0.01$),HO组和HI组家兔肝组织中SOD活性显著高于IR组($P<0.01$);HI组家兔肝组织中SOD活性显著高于HO组($P<0.05$)。**结论** 高氧液联合缺血后处理可以减轻肠缺血再灌注引起的肝损伤。

关键词: 高氧液;缺血后处理;肠缺血再灌注损伤;肝损伤
中图分类号: R363 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)08-0603-07

Protective effect of hyperoxic solution combined with ischemic postconditioning on hepatic injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rabbits

ZHANG Bin, HE De-dong, ZHU Shao-hui, FANG Xiang-jie
(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui* 453100, *Henan Province, China*)

Abstract: Objective To observe the protective effect of hyperoxic solution combined with ischemic postconditioning

DOI: 10.7683/xxyxyxb.2014.08.003
收稿日期: 2014-03-25
基金项目: 河南省卫生厅科技攻关项目(编号:201203071);河南省教育厅自然科学项目(编号:2012b320019,2011a32001,14A320075)
作者简介: 张 彬(1980-),男,黑龙江哈尔滨人,硕士,主治医师,讲师,研究方向:肠缺血再灌注损伤。

(IP) on hepatic injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rabbits. **Methods** A total of 48 rabbits were randomly divided into sham operation group(SO group), ischemia reperfusion group(IR group), hyperoxic solution group(HO group) and HO + IP group(HI group), with 12 rabbits in each group. The rabbits in SO group were treated with exposing superior mesenteric artery(SMA). The rabbits in IR group were treated with SMA interruption and 120 minutes reperfusion. The rabbits in HO group were treated with hyperoxic solution by intervenous drop infusion in the course of 60 minutes SMA interruption and 120 minutes reperfusion. The rabbits in HI group were treated with hyperoxic solution by intervenous drop infusion before reperfusion, at the same time, three cyclical reperfusion(30 seconds) and interruption(30 seconds) were performed. The arterial blood, venous blood, enteric and hepatic tissue were collected at the time of 120 minutes after reperfusion. The levels of tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-10(IL-10), alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) and endotoxin were detected. The level of malonaldehyde(MDA), the activity of myeloperoxidase(MPO) and superoxide dismutase(SOD) in enteric and hepatic tissue were detected. The intestinal mucosae injury was evaluated by Chiu-6 standard scoring. The bacterial metachoresis rat was observed by germiculture. The expression of nuclear factor-κB(NF-κB) in hepatic tissue was detected by immunohistochemistry. **Results** The levels of serum TNF-α, IL-10 and endotoxin in IR group were significantly higher than those in SO group($P<0.01$). The levels of serum TNF-α and endotoxin in HO group and HI group were significantly lower than those in IR group($P<0.05$). The levels of serum TNF-α and endotoxin in HI group were significantly lower than those in HO group($P<0.05$, $P<0.01$). The IL-10 level in HO group and HI group was significantly higher than those in IR group($P<0.01$). There was no significant difference in IL-10 level between HO group and HI group($P>0.05$). The serum MPO activity and MDA level in IR group were significantly higher than those in SO group($P<0.01$), the serum MPO activity and MDA level in HO group and HI group were significantly lower than those in IR group($P<0.01$), and the serum MPO activity and MDA level in HI group were significantly lower than those in HO group($P<0.05$, $P<0.01$). The serum SOD activity in IR group was significantly lower than those in SO group($P<0.01$), the serum SOD activity in HO group and IR group were significantly higher than those in IR group($P<0.01$), and the serum SOD activity in HI group was significantly higher than that in HO group($P<0.01$). The intestinal mucosae injury score of rabbits in HO group and HI group was significantly higher than that in SO group($P<0.01$). The intestinal mucosae injury score of rabbits in HO group and HI group was significantly lower than that in IR group($P<0.01$), and the intestinal mucosae injury score of rabbits in HI group was significantly lower than that in HO group($P<0.01$). The MPO activity and MDA level in intestinal mucosae tissues of rabbits in IR group were significantly higher than those in SO group($P<0.01$). The MPO activity and MDA level in intestinal mucosae tissues of rabbits in HO group and HI group were significantly lower than those in IR group($P<0.01$). The MPO activity and MDA level in intestinal mucosae tissues of rabbits in HI group were significantly lower than those in HO group($P<0.01$). The SOD activity in intestinal mucosae tissues of rabbits in IR group was significantly lower than that in SO group($P<0.01$). The SOD activity in intestinal mucosae tissues of rabbits in HO group and HI group was significantly higher than that in IR group($P<0.01$). The SOD activity in intestinal mucosae tissues of rabbits in HI group was significantly higher than that in HO group($P<0.05$). There was no bacterial metachoresis of hepatic tissue of rabbits in SO group. The bacterial metachoresis rat of hepatic tissue of rabbits was 100.0% in IR group, while the bacterial metachoresis rat of hepatic tissue of rabbits was 83.30% in HO group and HI group, but there was no significant difference in bacterial metachoresis rat of hepatic tissue of rabbits in HO, HI and IR group($P>0.05$). The NF-κB p65 positive expression in hepatic tissue of rabbits in IR group, HO group and HI group was significantly higher than that in SO group($P<0.01$); in HO group and HI group it was significantly lower than that in IR group($P<0.01$), and in HI group it was significantly lower than that in HO group($P<0.05$). The MPO activity and the levels of MDA, ALT, AST in hepatic tissue of rabbits in IR group were significantly higher than those in SO group($P<0.01$). The MPO activity and the levels of MDA, ALT, AST in hepatic tissue of rabbits in HO group and HI group were significantly lower than those in IR group($P<0.01$). The MPO activity and the levels of MDA, ALT, AST in hepatic tissue of rabbits in HI group were significantly lower than those in HO group($P<0.05$). The SOD activity in hepatic tissue of rabbits in IR group was significantly lower than that in SO group($P<0.01$), the SOD activity in hepatic tissue of rabbits in HO group and HI group was significantly higher than that in IR group($P<0.01$), and in HI group it was significantly higher than that in HO group($P<0.05$). **Conclusion** Hyperoxic solution combined with IP can relieve the hepatic injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rabbits.

Key words: hyperoxic solution; ischemic postconditioning; intestinal ischemia reperfusion injury; hepatic injury

肠缺血再灌注损伤(ischemical reperfusion injury,IRI)在严重感染、创伤、休克、心肺功能不全及小肠移植的病理演变过程中起重要作用[1],不仅可以引起肠黏膜上皮细胞吸收功能下降、肠黏膜屏障功能受损及肠道内正常菌群失调,引发全身炎症反应综合征,还可以造成肝损伤,具有较高的发病率和病死率[2],在这一过程中引起器官早期损害的直接首要因素是组织缺氧。高氧液是一种具有高氧分压并含有治疗剂量臭氧的医用液体,可以通过物理方法改变氧的活性,使氧离子化,并在一定的压力下溶解于水,再通过分子载体将氧直接带入血液循环,增加组织氧储备,提高机体的缺氧耐受能力,可以部分代偿向组织细胞供氧,已应用于肝移植及缺血缺氧性脑病的研究[3]。缺血后处理(ischemic post-conditioning,IP)是指在长时间缺血的组织或器官再灌注起始即刻采取反复短暂的再灌注/停灌注,之后再恢复正常灌注,达到减轻组织或器官 IRI 的目的[4]。有研究发现,不同的保护措施联合应用对缺血器官的再灌注损伤可取得更好的治疗效果[5-6]。目前针对二者联合应用对小肠 IRI 保护作用鲜有报道,本研究拟通过高氧液联合 IP 干预家兔肠 IRI 模型,探讨其对小肠及肝损伤的保护作用。

1　材料与方法

1.1　实验动物　健康家兔 48 只由新乡医学院实验动物中心提供,雌雄不拘,体质量 2.5 ~ 3.7 kg,于新乡医学院实验动物中心喂养,空气湿度50.0% ~ 55.0%,室温(18.0 ± 4.0)℃,光照随昼夜自然变化,标准饮食,自由饮水,术前禁食 12 h。实验计划通过新乡医学院第一附属医院伦理委员会批准,实验过程符合《关于善待实验动物的指导性意见》的规定。

1.2　主要试剂及仪器　内毒素放射免疫试剂盒购自美国 Sigma 公司,肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor,TNF-α)、白细胞介素-10(interleukin-10,IL-10)检测试剂盒购自晶美生物工程有限公司,丙二醛(malondialdehyde,MDA)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase,MPO)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,链霉亲和素-生物素复合物(strept avidin-biotin complex,SABC)免疫组织化学试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,兔抗大鼠核因子 κB(nuclear factor kappa B,NF-κB)p65 Ⅰ抗购自 Santa Cruz;GY-1 型高氧医疗液体治疗仪购自西安高氧医疗设备有限公司。

1.3　高氧液的制备　用医用生理盐水 500 mL 作为基液,将医用氧通过 GY-1 型高氧医疗液体治疗仪进行量子化处理,通过增加基液的净水压,去除基液中的气核,提高其表面张力,使生理盐水变成高氧液,应用血气分析法测得溶氧前液体氧分压为(20.2 ± 0.4)kPa,溶氧后氧分压达到(106.2 ± 7.8)kPa,整个配制过程根据机器的菜单提示完成操作。

1.4　家兔肠缺血再灌注模型建立　称家兔体质量,耳缘静脉注射 30 g · L^{-1} 戊巴比妥钠 30 mg · kg^{-1} 麻醉,仰卧固定(背部交叉)。颈部正中切口,分离右颈总动脉,插管连接压力传感器,通过监护仪监测动脉压。常规消毒后取腹部正中切口:腹正中线自剑突下 2 cm 起向下作 6 cm 长切口,将腹腔内脏器左移,并齐右肾门垂直分离腹主动脉分出的肠系膜上动脉(superior mesenteric artery,SMA),在 SMA 根部用 1 个套硅胶管的小动脉夹钳夹,观察 2 min,待确定 SMA 血流已被阻断,肠壁苍白,血管无搏动后,缝合伤口,关闭腹腔。60 min 后重新开腹,打开动脉夹,恢复 SMA 血流供应,肠壁变红,血管搏动良好,再次关闭腹腔;为避免体液及热量的丧失,再灌注 2 h 后,重新开腹取标本。移动腹腔内脏器时动作要轻柔,不可过度牵拉损伤肠管,脏器不移出腹腔外,避免使用锐利器械分离 SMA,以免造成大出血而导致实验失败。

1.5　实验分组　48 只大鼠随机分为 4 组,每组 12 只。假手术组(SO 组):仅行开腹术,分离 SMA 不夹闭;缺血再灌注组(IR 组):阻断 SMA 60 min 造成小肠缺血,然后打开动脉夹恢复血流灌注,于再灌注 120 min 结束实验;高氧液组(HO 组):在阻断 SMA 60 min 和再灌注 120 min 过程中以 20 mL · kg^{-1} · min^{-1} 速度静脉输入高氧液,其余操作同 IR 组;高氧液 IP 组(HI 组):于夹闭 SMA 60 min 后,于再灌注开始时以 20 mL · kg^{-1} · min^{-1} 速度静脉输入高氧液,同时进行 3 个循环的 30 s 再灌注/30 s 阻断的 IP,总时间为 3 min,然后持续灌注 117 min 后结束实验。

1.6　标本采集　家兔在再灌注 2 h 后,在无菌操作下重新开腹,处死前抽取腹主动脉血和外周静脉血各 5 mL;另取 1 mL 门静脉血,采用合成基质偶氮显色法定量分析血液中细菌内毒素含量;静脉血低温离心,分离血清,全自动生物化学分析仪检测血清中丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase,ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase,AST)水平;动脉血清中 TNF-α、IL-10 水平测定采用双抗体夹心酶联免疫吸附法,严格按照试剂盒说明书操作。无菌操作下切取部分小肠组织及肝组织,一部分于体积分数 4% 甲醛溶液中固定 48 h,经脱水透明、浸蜡、包埋后,切成 4 μm 石蜡切片,苏木精-伊红(hematine eosin,HE)染色;肠黏膜损伤程度按

Chiu 6 级评分法[7]分析。一部分肝组织用来检测细菌移位;另一部分小肠及肝组织用生理盐水洗 3 次,清除残血,用滤纸吸干,刮取肠黏膜组织及肝组织各 0.5 g,分别加入 40 ℃磷酸盐缓冲溶液 5 mL,在冷水中用匀浆机匀浆,3 500 r · min^{-1}离心 1 min,取上清,-70 ℃ 冰箱保存。采用硫代戊巴比妥酸法测定血清和组织匀浆中 MDA 含量,黄嘌呤氧化酶还原法测定血清和组织匀浆中 SOD 活性,比色法测定血清和组织匀浆中 MPO 活性。

1.7 免疫组织化学检测肝组织内 NF-κB p65 表达 按照 SABC 试剂盒说明书操作,取石蜡切片常规脱蜡至水,体积分数 3% H_2O_2 灭活内源性过氧化氢酶,高压抗原修复,山羊血清封闭,滴加 1∶100 比例稀释的兔抗大鼠 NF-κB p65 一抗,4 ℃过夜后滴加山羊抗兔二抗,滴加 SABC 复合物,二氨基联苯胺显色,蒸馏水洗涤终止显色,苏木精复染、脱水、透明、封片,以磷酸盐缓冲液代替 I 抗孵育作为阴性对照。高倍镜下细胞质内呈棕黄色或黄色的颗粒或团块为阳性细胞,观察片中 10 个具有代表性的高倍镜视野,计算 1 000 个肝细胞中染色阳性细胞数除以 1 000 作为 NF-κB p65 表达阳性指数(positive index,PI),并用数码相机成像。

1.8 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组家兔血清中 TNF-α、IL-10、内毒素、MDA 水平及 MPO、SOD 活性的变化 结果见表 1。再灌注 2 h 后,IR 组家兔血清中 TNF-α、IL-10、内毒素水平显著高于 SO 组,差异有统计学意义($P<0.01$);HO 组和 HI 组家兔血清中 TNF-α、内毒素水平显著高于 SO 组,但显著低于 IR 组,差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$);HI 组家兔血清中 TNF-α、内毒素水平显著低于 HO 组,差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。HO 组和 HI 组家兔血清中 IL-10 水平显著高于 IR 组,差异有统计学意义($P<0.01$);HO 组和 HI 组家兔血清中 IL-10 水平比较差异无统计学意义($P>0.05$)。IR 组家兔血清中 MPO 活性和 MDA 水平显著高于 SO 组,差异有统计学意义($P<0.01$);HO 组和 HI 组家兔血清中 MPO 活性和 MDA 水平显著高于 SO 组,但显著低于 IR 组,差异均有统计学意义($P<0.01$);HI 组家兔血清中 MPO 活性和 MDA 水平显著低于 HO 组,差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$)。IR 组、HO 组和 HI 组家兔血清中 SOD 活性显著低于 SO 组($P<0.01$),但 HO 组和 HI 组家兔血清中 SOD 活性均显著高于 IR 组($P<0.01$),且 HI 组家兔血清中 SOD 活性显著高于 HO 组($P<0.01$)。

表 1 各组家兔血清中 TNF-α、IL-10、MDA、内毒素水平及 MPO、SOD 活性比较

Tab.1 Comparison of the levels of TNF-α, IL-10, MDA, endotoxin and the activity of MPO, SOD in serum of rabbits in the groups ($\bar{x} \pm s$)

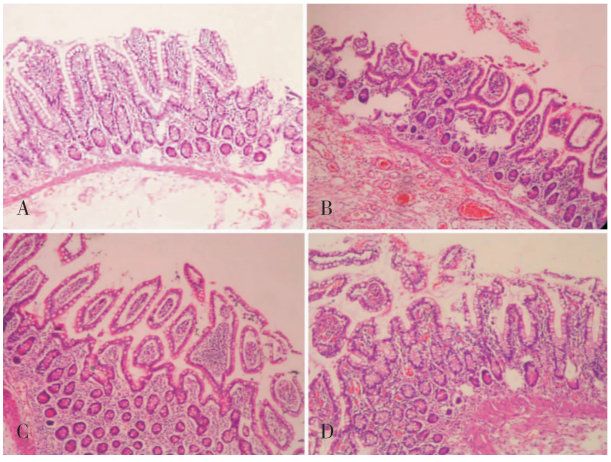
组别	n	TNF-α/(μg · L^{-1})	IL-10/(ng · L^{-1})	内毒素/(kEu · L^{-1})	MDA/(mmol · L^{-1})	MPO/(U · L^{-1})	SOD/(kU · L^{-1})
SO 组	12	1.16 ± 0.63	43.74 ± 10.12	0.17 ± 0.05	25.47 ± 6.18	1.45 ± 0.37	29.73 ± 6.75
IR 组	12	3.53 ± 0.92^{a}	67.38 ± 11.74^{a}	3.12 ± 0.54^{a}	49.75 ± 8.11^{a}	8.23 ± 1.62^{a}	6.32 ± 2.14^{a}
HO 组	12	2.34 ± 0.79^{ac}	81.33 ± 12.53^{ad}	1.38 ± 0.23^{ad}	33.94 ± 5.18^{ad}	4.23 ± 1.42^{ad}	17.33 ± 7.21^{ad}
HI 组	12	2.05 ± 0.88^{ace}	89.13 ± 13.26^{ad}	0.91 ± 0.12^{bdf}	29.47 ± 4.76^{ad}	3.71 ± 0.73^{ade}	22.37 ± 5.32^{adf}

注:与 SO 组比较$^{a}P<0.01$,$^{b}P<0.05$;与 IR 组比较$^{c}P<0.05$,$^{d}P<0.01$;与 HO 组比较$^{e}P<0.05$,$^{f}P<0.01$。

2.2 小肠黏膜病理改变及其 MDA 水平和 MPO、SOD 活性变化 光镜下 SO 组家兔小肠黏膜绒毛完整,无明显上皮下间隙扩张;IR 组家兔小肠黏膜可见绒毛破损,上皮细胞水肿明显,部分坏死脱落,固有层红细胞增多,少部分肠黏膜固有层破坏和溃疡;HO 组和 HI 组小肠黏膜绒毛损伤程度较 IR 组减轻,HI 组损伤程度较 HO 组轻;见图 1。IR 组、HO 组和 HI 组家兔肠黏膜损伤评分显著高于 SO 组($P<0.01$),HO 组和 HI 组家兔肠黏膜损伤评分显著低于 IR 组($P<0.01$);HI 组家兔肠黏膜损伤评分显著低于 HO 组($P<0.05$)。IR 组家兔小肠黏膜组织中 MPO 活性和 MDA 水平显著高于 SO 组($P<0.01$);HO 组和 HI 组家兔小肠黏膜组织中 MPO 活性和 MDA 水平显著高于 SO 组($P<0.01$),但显著低于 IR 组($P<0.01$);HI 组家兔小肠黏膜组织中 MPO 活性和 MDA 水平显著低于 HO 组($P<0.05$)。IR 组、HO 组和 HI 组家兔小肠黏膜组织中 SOD 活性显著低于 SO 组($P<0.01$);HO 组、HI 组家兔血清 SOD 活性均显著高于 IR 组($P<0.01$);HI 组家兔小肠黏膜组织中 SOD 活性显著高于 HO 组($P<0.05$);见表 2。

2.3 各组家兔肝脏病理学改变及肝组织内 NF-κB p65 表达、MDA 水平及 MPO 和 SOD 活性的变化 光镜下 SO 组家兔肝小叶结构完整,肝板排列整

齐,血管内皮细胞无脱落,肝窦间隙正常,内皮细胞无脱落,肝细胞无变性坏死;IR 组家兔肝小叶结构不完整,肝板排列紊乱,肝细胞有不同程度的变性,胞核浓缩、深染,可见脱落的内皮细胞,伴有肝细胞点状坏死;HO 组和 HI 组家兔肝组织病理改变较 IR 组轻,肝小叶结构尚完整,肝板排列比较整齐,偶见内皮细胞脱落,肝细胞变形坏死少见;见图 2。无菌操作下分别切取肝组织进行细菌培养,发现 SO 组家兔肝组织均无细菌移位,IR 组家兔肝脏细菌移位率 100.0%,HO 和 HI 组家兔肝脏细菌移位率均为 83.3%,HO 和 HI 组家兔肝脏细菌移位率与 IR 组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。细菌培养结果显示主要细菌为大肠杆菌、肠球菌、葡萄球菌,与小肠内细菌相同。IR 组、HO 组、HI 组家兔肝组织内 NF-κB p65 阳性表达显著高于 SO 组($P<0.01$),HO 组和 HI 组家兔肝组织内 NF-κB p65 阳性表达显著低于 IR 组($P<0.01$),HI 组家兔肝组织内 NF-κB p65 阳性表达显著低于 HO 组($P<0.05$);见图 3 和表 3。再灌注 2 h 后,IR 组家兔肝组织中 MPO 活性及 MDA、ALT、AST 水平显著高于 SO 组($P<0.01$);HO 组和 HI 组家兔肝组织中 MPO 活性及 MDA、ALT、AST 水平仍显著高于 SO 组($P<0.01$),但显著低于 IR 组($P<0.01$);HI 组家兔肝组织中 MPO 活性及 MDA、ALT、AST 水平显著低于 HO 组($P<0.05$)。IR 组家兔肝组织中 SOD 活性显著低于 SO 组($P<0.01$),HO 组和 HI 组家兔肝组织中 SOD 活性仍低于 SO 组,但显著高于 IR 组($P<0.01$);HI 组家兔肝组织中 SOD 活性显著高于 HO 组($P<0.05$);见表 3。



A:SO 组;B:IR 组;C:HO 组;D:HI 组。

图 1　再灌注 2 h 后各组家兔小肠黏膜病理学改变(HE,×100)

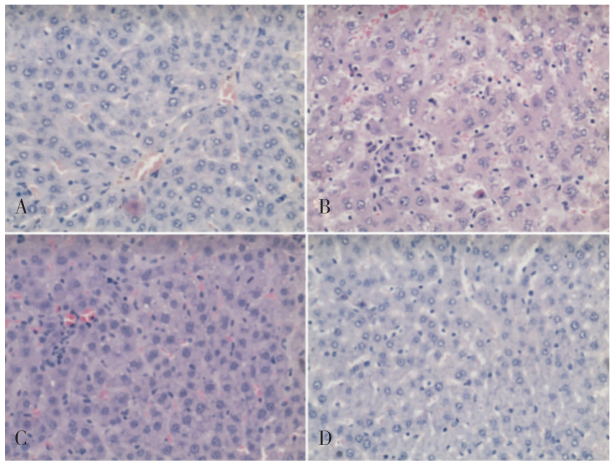
Fig. 1　Pathological changes of intestinal mucosa of rabbits in each group two hours after reperfusion(HE,×100)

表 2　各组家兔小肠黏膜组织中 MDA 水平、SOD 和 MPO 活性及肠黏膜损伤评分

Tab. 2　Levels of MDA, the activity of SOD and MPO in intestinal mucosae tissue, and intestinal mucosae injury score of rabbits in the groups　　$(\bar{x}\pm s)$

组别	n	MDA/($\mu mol\cdot g^{-1}$)	SOD/($kU\cdot g^{-1}$ Prot)	MPO/($U\cdot g^{-1}$ Prot)	黏膜损伤评分
SO 组	12	3.36±0.18	47.14±16.75	0.57±0.23	0.27±0.11
IR 组	12	17.72±0.21[a]	21.20±6.53[a]	2.57±0.38[a]	3.57±0.47[a]
HO 组	12	6.13±0.41[ad]	28.74±8.67[ad]	1.82±0.88[ad]	2.77±0.58[ad]
HI 组	12	5.67±0.89[ade]	34.76±5.72[bde]	1.63±0.40[ade]	2.31±0.46[ade]

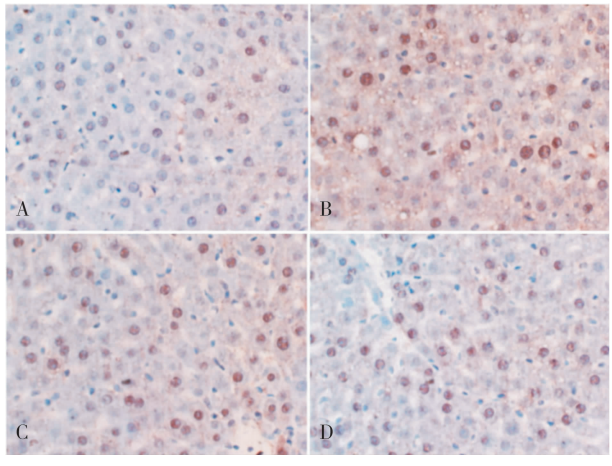
注:与 SO 组比较[a]$P<0.01$,[b]$P<0.05$;与 IR 组比较[c]$P<0.05$,[d]$P<0.01$;与 HO 组比较[e]$P<0.05$。



A:SO 组;B:IR 组;C:HO 组;D:HI 组。

图 2　再灌注 2 h 后各组家兔肝组织病理学改变(HE,×200)

Fig. 2　Pathological changes of liver tissues of rabbits in each group two hours after reperfusion(HE,×200)



A:SO 组;B:IR 组;C:HO 组;D:HI 组。

图 3　再灌注 2 h 后各组家兔肝组织 NF-κB p65 的表达(SABC,×200)

Fig. 3　Expression of NF-κ B p65 in liver tissue of rabbits in each group two hours after reperfusion(SABC,×200)

表 3 各组家兔肝组织中 SOD 和 MPO 活性、NF-κB p65 表达及 MDA、ALT、AST 水平比较

Tab. 3 Comparison of SOD and MPO activity, NF-κB p65 positive expression, and MDA, ALT, AST levels in liver tissue of rabbits in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ALT/(U·L^{-1})	AST/(U·L^{-1})	MDA/(μmol·g^{-1})	SOD/(kU·g^{-1} Prot)	MPO/(U·g^{-1} Prot)	NF-κB p65/%
SO 组	12	44.25 ± 5.56	57.47 ± 6.12	37.18 ± 11.21	112.53 ± 27.16	1.27 ± 0.12	5.83 ± 1.27
IR 组	12	138.52 ± 30.14^{a}	118.38 ± 8.24^{a}	77.13 ± 23.71^{a}	44.15 ± 11.81^{a}	2.04 ± 0.32^{a}	31.32 ± 8.14^{a}
HO 组	12	79.34 ± 17.79^{ab}	77.13 ± 11.15^{ab}	63.91 ± 19.16^{ab}	64.47 ± 9.88^{ab}	1.63 ± 0.40^{ab}	17.33 ± 7.21^{ab}
HI 组	12	67.25 ± 21.88^{abc}	68.41 ± 13.16^{ab}	59.31 ± 13.12^{abc}	79.70 ± 14.16^{abc}	1.41 ± 0.37^{abc}	13.77 ± 5.13^{abc}

注：与 SO 组比较$^{a}P<0.01$；与 IR 组比较$^{b}P<0.01$；与 HO 组比较$^{c}P<0.05$。

3 讨论

高氧液可以不依赖于肺的气体交换功能，通过血液循环系统直接向组织供氧，迅速改善动脉血氧分压、组织氧分压以及细胞有氧代谢水平[8]，持续灌注高氧液及高氧液预处理均可减轻心脏、肺脏的 IRI。由于上述应用高氧液的方式只能在缺血之前进行，而临床中缺血的时机常不可预知，所以高氧液预处理与持续灌注的应用价值受到很大限制。IP 是一种机械性干预措施，可以在缺血后施行，可操作性大，目前 IP 对心脏[9]、肝脏[10] IRI 的保护作用已取得进展，有研究发现 IP 与抗氧化剂联合对脏器 IRI 的保护作用可能更强[11]。

MDA 是氧自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸引发过氧化作用形成的脂质过氧化物，可间接反映细胞损伤程度[12]，MPO 是中性粒细胞胞质中的一种特异性酶，血清及组织中 MPO 活性可间接反映中性粒细胞浸润和激活的程度[13]。SOD 是氧自由基清除剂，其活性降低可反映氧自由基的增多和细胞损伤的加重。本研究发现，肠 IRI 2 h 后，IR 组家兔血清和小肠、肝组织中 MDA 水平和 MPO 活性均比 SO 组显著升高，SOD 活性较 SO 组显著降低；表明 IRI 后小肠及肝组织脂质过氧化反应增强，中性粒细胞浸润增加，自身清除氧自由基能力减弱，引起组织及血液中氧自由基升高，抗氧化能力下降，加重组织损伤。本研究发现，HO 组和 HI 组家兔血清及小肠、肝组织 MDA 水平和 MPO 活性较 IR 组明显下降，SOD 活性较 IR 组明显升高，提示静脉应用高氧液和高氧液联合 IP 均能够提升小肠及肝脏的氧自由基的清除能力，减轻中性粒细胞浸润，启动了细胞内源性保护机制，进而提高抗氧化能力，减轻组织损伤，其中高氧液 IP 的清除自由基和抗氧化能力更强，其可能的机制是通过多次反复灌注/缺血使缺血的脏器血流恢复，减少了氧自由基底物，增加了组织的供氧，减少了氧自由基的生成，减轻脏器的损伤。

本实验还发现，再灌注 2 h 后，肠黏膜屏障受到损害，导致肠道细菌、内毒素移位，肠源性细菌及内毒素持续侵入门静脉以及肠源性炎性介质释放入血，激活炎性细胞，使肝脏受损，ALT、AST 水平急剧升高。肝细胞损伤进一步激活 Kupffer 细胞、中性粒细胞释放大量促炎因子和炎性介质，激活 NF-κB 信号通路，而活化的 NF-κB 可上调前炎性细胞因子 TNF-α 的基因转录[14]。TNF-α 是由激活的巨噬细胞、内皮细胞、中性粒细胞等分泌的具有多功能的多肽，在炎症反应过程中起着十分重要的作用[15]。TNF-α 可以诱导氧自由基产生，促进中性粒细胞产生氧自由基等活性氧递质并导致肝损伤[16]。IL-10 是由辅助性 T 淋巴细胞分泌的细胞因子，作为体内炎症反应过程中的内生性抗炎细胞因子，抑制 TNF-α，IL-1β 等多种炎症相关因子的产生[17]。从炎性因子指标的变化及 NF-κB p65 的阳性表达变化方面推断，发生肠 IRI 后，血液中内毒素增加，抗氧化能力下降，氧自由基的清除能力下降，释放大量促炎因子和脂质炎性介质，激活 NF-κB 信号通路，上调 TNF-α 水平，引起肝损伤。单独应用高氧液及高氧液联合 IP 均可以减少内毒素的释放，增强抗氧化能力，减少促炎因子和脂质炎性介质的释放，降低 NF-KB p65 的表达，抑制 NF-κB 信号通路调控的炎症级联反应，减轻肝损伤，但高氧液联合 IP 的保护作用明显优于单独应用高氧液。

综上所述，高氧液是一种高效抗氧化剂，单独应用高氧液和高氧液联合 IP 均可以减轻肠黏膜损伤，减少内毒素移位，减少氧自由基的生成，促进抗炎因子的激活，抑制 NF-κB 信号通路调控的炎症级联反应，减轻肝损伤。但高氧液联合 IP 的保护效果优于单独应用高氧液，其联合应用的保护机制仍需进一步研究，但高氧液联合 IP 可以为临床外科防治肠 IRI 所导致的多器官损伤治疗及预防提供新策略。

（下转第 611 页）

失调，随着感染时间增加，Th1 受到抑制，Th2 变化不明显；实验组小鼠肺指数 3、5、7 d 升高明显，随着病程延长肺指数逐渐下降；提示随着感染时间的延长，肺质量逐渐增加，肺部炎性病变程度越严重；恢复期开始肺指数逐渐下降，病变缓解。

MP 能黏附在宿主呼吸道上皮细胞表面受体上，还可诱发自身免疫抗体，最终产生免疫效应[9]。免疫紊乱是 MP 感染反复发作的主要原因，IL-4 可使免疫系统向 Th2 依赖的过敏反应方向发展，IFN-γ 则与 IL-4 相反，其抑制 Th2 细胞增殖，对 IgE 有下调作用[10]。本研究发现，实验组小鼠第 3 天肺泡灌洗液中 IFN-γ、IL-4 水平均有所升高，随着感染时间的延长，IL-4 水平持续增高，IFN-γ 水平有所降低；提示 MP 感染后机体主要以 Th2 介导的免疫反应为主。2 组小鼠 IFN-γ/IL-4 比值第 3、5、7 天比较，差异有统计学意义；2 组小鼠 14、21 d IFN-γ/IL-4 比值比较差异无统计学意义；提示 MP 感染对机体造成的免疫功能紊乱持续时间较长，其远期预后仍有待进一步探讨。

参考文献：

[1] 韩玉芳，魏琴，冯艳广，等. 新乡市小儿肺炎支原体、肺炎衣原体感染情况[J]. 实用儿科临床杂志，2012，27(10)：731-785.

[2] 王佳贺，牛慧彦，白雪，等. 3 种肺炎支原体感染检测方法的临床效果比较[J]. 新乡医学院学报，2011，28(1)：51-53.

[3] Zhao F，Liu G，Wu J，*et al*. Surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Beijing，China，from 2008 to 2012[J]. *Antimicrob Agents Chemother*，2013，57(3)：1521-1523.

[4] 杨风华，王华，张俊梅，等. 儿童肺炎支原体感染相关性脑梗死[J]. 实用儿科临床杂志，2012，27(24)：1869-1873.

[5] 陈江鱼，赵宏伊，李杰，等. 儿童抽动障碍与病原微生物感染及其免疫的相关性[J]. 实用儿科临床杂志，2012，27(19)：1536-1537.

[6] Nguipdop-Djomo P，Fine P E M，Halsby K D，*et al*. Cyclic epidemics of *Mycoplasma pneumoniae* infections in England and Wales from 1975 to 2009：time-series analysis and mathematical modelling[J]. *Lancet*，2013，382：S78.

[7] 黄晓红，龚铭，李桃，等. 肺炎支原体感染大鼠模型的建立及治疗研究[J]. 南方医科大学学报，2009，29(11)：2219-2221.

[8] Furuhashi K，Shirai T，Suda T，*et al*. Inflammatory markers in active pulmonary tuberculsis association with Th1/Th2 and Tc1/Tc2 balance[J]. *Kekkaku*，2012，87(1)：1-7.

[9] You S Y，Jwa H J，Yang E，*et al*. Effects of Methylprednisolone pulse therapy on refractory *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in Children[J]. *Allergy Asthma Immunol Res*，2014，6(1)：22-26.

[10] 陈志敏. 肺炎支原体与支气管哮喘[J]. 临床儿科杂志，2011，29(8)：701-704.

（本文编辑：孟　月　英文编辑：孟　月）

（上接第 608 页）

参考文献：

[1] Vollmar B，Menger M D. Intestinal ischemia/reperfusion：microcirculatory pathology and functional consequences[J]. *Langenbecks Arch Surg*，2011，396(1)：13-29.

[2] Mallick I H，Yang W X，Winslet M C，*et al*. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury[J]. *Dig Dis Sci*，2004，49(9)：1359-1377.

[3] 梁忠平，劳学军，何文芳，等. 高氧液对大鼠肝移植的保护作用[J]. 中国组织工程与临床康复，2010，14(18)：3247-3251.

[4] 张彬，刘慧杰，朱绍辉，等. 氢水联合缺血后处理对大鼠小肠缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 新乡医学院学报，2014，31(5)：333-337，342.

[5] 刘国华，梁培岳. 缺血预处理联合缺血后处理对肺移植中缺血再灌注肺损伤的影响[J]. 中国组织工程研究，2012，16(5)：839-842.

[6] 李恒昌，许立新，李知平，等. 依达拉奉后处理联合远隔缺血后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. 中华麻醉学杂志，2013，33(1)：99-102.

[7] Chiu C J，McArdle A H，Brown R，*et al*. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological，hemodynamic，and metabolic reappraisal[J]. *Arch Surg*，1970，101(4)：478-483.

[8] Xu H，Xing J，Cao W，*et al*. Clinical application of hyperoxygenated genated solution supplernentation oxygen supply in new ways to prevent and reduce hypoxic injury[J]. *Int J Anesth*，2010，31(1)：52-55.

[9] Hahn J Y，Song Y B，Kim E K，*et al*. Ischemic postconditioning during primary percutaneous coronary intervention：the effects of postconditioning on myocardial reperfusion in patients with ST-segment elevation myocardial infarction randomized trial[J]. *Circulation*，2013，128(17)：1889-1896.

[10] Zhang B，Zhao Y，Bao L，*et al*. Protective effects of remote limb preconditioning on ischemia reperfusion injury in rats liver[J]. *J Gastroen Hepatol Res*，2013，2(9)：791-794.

[11] Xin P，Zhu W，Li J，*et al*. Combined local ischemic postconditioning and remote perconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*，2010，298(6)：1819-1831.

[12] 袁勇，郭皓，张毅，等. 缺血后处理对大鼠小肠缺血再灌注损伤的保护作[J]. 重庆医学，2011，40(24)：2410-2412.

[13] Liu K X，Li Y S，Huang W Q，*et al*. Immediatc postconditioning during reperfusion attenuates intestinal injury[J]. *Intensive Care Med*，2009，35(5)：933-942.

[14] Thomas S，Satoshi K，Mex B，*et al*. Roles of nuclearfactor-κB in postischemic liver[J]. *Hepatol Res*，2008，38(5)：429-440.

[15] Cutm I C，Perrelli M C，Cavalieri B，*et al*. Micmvescular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic precongditioning[J]. *Free Radic Biol Med*，2002，33(9)：1200-1208.

[16] Xin P，Zhu W，Li J，*et al*. Combined local ischemic postconditioning and remote perconditioning recapitulate cardioprotective effects of local ischemic preconditioning[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*，2010，298(6)：1819-1831.

[17] Ikizceli I，Yurumez Y，Avsarogullari L，*et al*. Effect of interleukin-10 on pancreatic damage caused by organophosphote poisoning[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*，2005，42(3)：260-264.

（本文编辑：徐自超　英文编辑：徐自超）