

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00659

瑞芬太尼预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用

孙玉明^{1△}, 葛彦虎^{1,2△}, 杨立群^{1*}, 吕浩¹, 刘艳涛¹, 俞卫锋¹

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438

2. 解放军总医院第309临床部麻醉科, 北京 100091

[摘要] **目的:**探讨瑞芬太尼预处理对大鼠肝缺血再灌注损伤的保护作用。**方法:**用SD大鼠制作肝缺血再灌注模型, 随机分为缺血再灌注组(I/R)、缺血预处理组(IPC)、瑞芬太尼预处理组(RPC)和假手术组(Sham), 其中RPC组又分0.2、1、10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 共3个剂量亚组(RPC1、RPC2、RPC3)。观察各组肝脏缺血45 min再灌注2 h后血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平, 肝细胞匀浆中丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量及肝组织病理学的改变。并用TUNEL染色比较各组肝细胞凋亡情况。**结果:**I/R组、RPC1组肝脏缺血再灌注后血清ALT、AST含量显著升高, 肝细胞匀浆中MDA含量增高, SOD含量降低, 肝组织病理学损害明显增加; TUNEL染色显示存在大量凋亡细胞。而IPC、RPC2、RPC3组肝脏缺血再灌注后血清ALT和AST含量与前二组相比显著降低, 肝细胞匀浆中MDA含量减少, SOD含量增加, 肝组织病理学损害和凋亡明显减轻; TUNEL染色显示凋亡细胞明显少于前两组。Sham组未见明显酶学改变和病理学损害表现。**结论:**合适剂量的瑞芬太尼预处理对肝脏缺血再灌注损伤有类似IPC的保护作用。

[关键词] 肝; 再灌注损伤; 瑞芬太尼; 缺血预处理

[中图分类号] R 657.3 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0659-04

Remifentanyl preconditioning attenuates hepatic ischemia and reperfusion injury in rats

SUN Yu-ming^{1△}, GE Yan-hu^{1,2△}, YANG Li-qun^{1*}, LÜ Hao¹, LIU Yan-tao¹, YU Wei-feng¹

1. Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

2. Department of Anesthesiology, No. 309 Clinical Division, PLA General Hospital, Beijing 100091

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the protective effect of remifentanyl preconditioning on liver ischemia and reperfusion injury in rats. **Methods:** Forty-eight healthy adult SD rats, weighing 200-300 g, were divided into 4 groups: ischemic reperfusion group(I/R), ischemic preconditioning group(IPC), sham operation group(Sham), and remifentanyl preconditioning group(RPC). The RPC group was further subdivided into 3 subgroups according to the dose of remifentanyl: 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (RPC1 group), 1 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (RPC2 group), and 10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (RPC3 group). All rats except for those in the sham group were subjected to ischemia for 45 min and followed by reperfusion for 2 hours. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and liver homogenate levels of MDA, SOD were determined. H-E staining was used to observe the hepatic histopathological changes and TUNEL staining was used to examine hepatocyte apoptosis. **Results:** In I/R and RPC1 group, serum ALT and AST were significantly increased; hepatic homogenate MDA content was increased and SOD content was decreased, accompanied by aggravated pathological injury; TUNEL staining showed large amount of apoptotic cells. Compared with I/R and RPC1 groups, serum ALT and AST levels in IPC, RPC2, and RPC3 groups were significantly decreased after liver ischemia and reperfusion, accompanied by decreased homogenate MDA level, increased SOD level, and improved pathological injury. TUNEL staining showed much less apoptotic hepatocytes in IPC, RPC2, and RPC3 groups compared with I/R and RPC1 groups. No obvious changes in histopathology or in other parameters were observed in the sham group. **Conclusion:** Pre-treatment with remifentanyl, like ischemic precondition, can protect liver from ischemia and reperfusion injury.

[KEY WORDS] liver; reperfusion injury; remifentanyl; ischemic precondition

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(6):659-662]

[收稿日期] 2008-10-21 **[接受日期]** 2009-01-27

[基金项目] 国家自然科学基金(30600584), 上海市科技启明星计划(08QA14007). Supported by the National Natural Science Foundation of China(30600584) and Shanghai Rising-Star Program(08QA14007).

[作者简介] 孙玉明, 硕士, 副教授. E-mail: sunyuming2008@gmail.com; 葛彦虎, 硕士, 住院医师. E-mail: yanhu_ge@hotmail.com

△共同第一作者(Co-first authors).

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81875325, E-mail: lqyang72721@hotmail.com

肝脏缺血再灌注(ischemia-reperfusion, I/R)损伤是一种常见的临床病理生理过程,休克、感染、肝脏外伤、肝叶切除及肝移植所致的肝脏功能损害、衰竭均与之有关^[1]。缺血预处理和药物预处理肝脏保护是近10年来的研究热点之一,其中各种麻醉药的肝脏保护作用也越来越受到重视。瑞芬太尼是一种超短效的阿片镇痛药,瑞芬太尼预处理可对心脏I/R损伤产生类似缺血预处理的保护作用,其作用机制与缺血预处理有许多相同之处^[2]。目前认为肝脏非实质细胞可表达阿片受体,应用阿片肽类物质可减轻肝脏I/R损伤程度^[3],但临床常用阿片类药物能否减轻肝脏I/R损伤尚不清楚。本研究应用大鼠肝脏I/R模型,探讨瑞芬太尼预处理对肝脏I/R损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理 雄性SD大鼠48只,体质量250~300 g,由第二军医大学实验动物中心提供。动物分组如下:I/R组($n=8$),经大鼠尾静脉用微量泵给予生理盐水 $6 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,持续给药15 min,停药10 min,然后进行I/R;缺血预处理组(IPC组, $n=8$),大鼠先行阻断门静脉左、中分支15 min,开放10 min,再行I/R;不同剂量瑞芬太尼预处理组(RPC1、RPC2、RPC3组, $n=8$),分别经尾静脉用微量泵给予瑞芬太尼 0.2 、 1 、 $10 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ 预处理,均持续给药15 min,停药10 min,然后进行I/R;假手术组(Sham组, $n=8$),与I/R组同样给予生理盐水,只开腹关腹,但不行肝脏缺血再灌注操作。

1.2 肝脏I/R模型的制备 大鼠术前12 h禁食,自由饮水,腹腔注射3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,上腹正中切口进腹,分离肝脏周围韧带,暴露肝门,游离肝门部血管,用小号动脉夹阻断门静脉左、中分支(约占全肝70%),完全阻断左、中肝叶血流,造成左、中肝叶完全缺血,保留右肝叶(约占全肝30%)血供,作为门静脉血液回流通道,以防肠道淤血。阻断15 min后,开放10 min(IPC组),同时大鼠尾静脉穿刺置入24G套管针,后接微量泵进行预处理给药,微量泵持续给药15 min,停止10 min(I/R组及RPC组)。然后肝门部分阻断(左、中)45 min,后去除肝门阻断夹,恢复肝脏灌流,再灌注2 h后取标本。

1.3 标本检测及病理学观察 所有动物于实验结

束收集下腔静脉血4 ml,离心析出血清,以日本产Olympus AU 2700型全自动生化分析仪测定血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)含量。取新鲜肝左叶组织制成10%肝组织匀浆,用考马斯亮蓝蛋白定量试剂盒(南京建成生物制剂有限公司)测定肝组织蛋白含量,并用MDA和SOD试剂盒(南京建成生物制剂有限公司)测定肝组织匀浆MDA和SOD含量。同时取肝左叶组织置10%甲醛溶液中固定,常规切片和H-E染色,光镜下观察肝组织病变情况。选取损伤最为明显的再灌注的病理切片,光镜下评定肝组织损伤分级,其分级标准:0级,肝小叶、肝细胞、肝细胞索、中央静脉、肝窦均正常;I级,个别肝细胞变性,汇管区少量炎细胞聚集;II级,肝中央静脉、肝窦内淤血及散在肝细胞变性坏死,肝组织内炎细胞聚集较多,肝小叶结构完整;III级,肝中央静脉、肝窦内淤血及广泛肝细胞变性坏死,大量炎细胞聚集,部分肝组织结构破坏不完整。

1.4 TUNEL染色凋亡分析 大鼠肝脏用4%多聚甲醛灌注固定后,石蜡包埋并切片,之后进行切片的预处理、常规脱蜡脱水, TUNEL染色。TUNEL染色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司,按照说明书进行操作,阴性对照以50 μl 标记液代替TUNEL反应混合液。光镜下计数凋亡阳性细胞,同时观察凋亡细胞形态变化。结果判定标准:在200倍高倍视野下,散在分布,胞核染成黄色或黄棕色为阳性细胞。每例标本随机选取5个视野,计算凋亡指数(AI), $\text{AI} = (\text{视野内凋亡肝细胞数} / \text{视野内所有肝细胞数}) \times 100\%$ 。

1.5 统计学处理 采用SPSS 11.0统计软件,组间比较采用多组均数比较的方差分析。

2 结果

2.1 血清转氨酶的变化 I/R组缺血再灌注后血清ALT、AST水平比Sham组明显升高, RPC1组与I/R组相比无统计学差异,而RPC2组、RPC3组及IPC组较I/R组均明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

2.2 肝细胞匀浆MDA和SOD的变化 I/R组缺血再灌注后肝细胞匀浆MDA水平比Sham组明显升高,而SOD水平明显降低, RPC1组两者水平与I/R组差异无统计学意义,而RPC2组、RPC3组及IPC组缺血再灌注后肝细胞匀浆MDA水平均比I/R

组明显降低,SOD水平均比I/R组明显升高,其差异均有统计学意义($P < 0.05$,表1)。

表1 各组血清转氨酶及肝组织匀浆中MDA、SOD含量的比较

Tab 1 Levels of serum transaminase and contents of MDA and SOD in hepatic homogenate

($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	AST $\bar{x}_B / (\text{IU} \cdot \text{L}^{-1})$	ALT $\bar{x}_B / (\text{IU} \cdot \text{L}^{-1})$	MDA $m_B / (\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1})$	SOD $\bar{x}_B / (\text{nU} \cdot \text{mg}^{-1})$
Sham	28.35 ± 20.24	29.61 ± 18.04	1.14 ± 0.28	95.64 ± 4.20
I/R	330.34 ± 97.55*	364.45 ± 60.01*	6.05 ± 0.79*	42.25 ± 3.18*
IPC	57.79 ± 38.01* Δ	146.95 ± 43.79* Δ	2.85 ± 0.40* Δ	81.50 ± 5.92* Δ
RPC1	215.34 ± 97.55*	295.70 ± 57.33*	5.90 ± 0.64*	48.66 ± 3.94*
RPC2	57.99 ± 32.75* Δ	151.23 ± 42.65* Δ	3.48 ± 0.49* Δ	92.95 ± 4.88* Δ
RPC3	83.09 ± 38.43* Δ	108.73 ± 42.99* Δ	2.88 ± 0.51* Δ	91.28 ± 3.91* Δ

* $P < 0.05$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs I/R group

2.3 肝组织病理学改变 I/R 对照组肝脏再灌注后 2 h,肝中央静脉、肝窦内淤血,广泛肝细胞变性坏死,汇管区大量炎细胞聚集,部分肝组织结构破坏不完整,肝组织损伤分级Ⅲ级;RPC1 组再灌注后 2 h,主要以肝细胞局灶性及片状坏死为主,汇管区炎细胞浸润,中性粒细胞为主,部分肝窦扩张、淤血,肝细胞可见不同程度的水肿变性和空泡状变性,偶尔可见点状坏死,肝小叶结构不完整,肝组织损伤分级Ⅲ级;RPC2 组、RPC3 组及 IPC 处理组再灌注后 2 h,部分肝细胞气球样变,偶可观察到灶性坏死,未见成片状细胞坏死,肝小叶结构完整,未见显著组织结构破坏,肝组织损伤分级Ⅰ级;Sham 组未见明显肝细胞坏死改变,肝小叶及肝细胞索结构完整、未见灶性坏死,中央静脉、肝窦均正常,肝组织损伤分级 0 级。

2.4 TUNEL 染色的细胞凋亡情况 I/R 组 [AI: (22.53 ± 4.89)%] 和 RPC1 组 [AI: (20.56 ± 3.76)%] 均可见大量胞核黄染的阳性细胞广泛分布于肝小叶和汇管区,肝细胞明显凋亡,I/R 组更明显。IPC 组 [AI: (10.35 ± 2.34)%]、RPC2 组 [AI: (14.47 ± 2.82)%] 及 RPC3 组 [AI: (11.69 ± 3.26)%] 可见少量阳性细胞,且较多分布于汇管区,此 3 组肝细胞凋亡情况较前两组显著减轻 ($P < 0.05$),Sham 组 [AI: (4.77 ± 2.39)%] 仅有少量的凋亡阳性细胞。

3 讨论

缺血预处理是近年来肝保护研究的一个热点,大量的实验研究证实缺血预处理对心、肝、肺、肾等大器官具有保护作用,临床应用效果也明确了其应用的可行性^[4-5],但常规使用缺血预处理存在增加手

术操作步骤和术中出血量等不利影响。较之缺血预处理,阿片类药物预处理同样能保护肝脏,且不存在增加手术步骤等不良影响。瑞芬太尼是目前唯一一种通过非特异性的血浆和组织酯酶代谢的阿片类药物,其镇痛强度约是吗啡的 100 倍,已开始临床广泛应用。鉴于该药不依赖肝肾代谢,特别适合在肝脏移植等长时间创伤大的手术麻醉^[6]。本研究证实瑞芬太尼预处理对肝脏缺血再灌注损伤有明显的保护作用,能够有效减轻肝脏再灌注损伤后肝细胞的坏死,降低转氨酶水平,减轻过氧化损害,同时减轻肝细胞凋亡。本研究设立 3 个剂量组 (0.2、1、10 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),结果证实瑞芬太尼的肝保护作用具有一定的剂量依赖性。

缺血预处理最早由 Murry 等^[7]于 1986 年在心脏缺血再灌注损伤实验中观察到,其对肝脏的保护作用机制较为复杂,其中非实质细胞较多地参与了缺血预处理的调控过程;Kupffer 细胞激活核转录因子 κB (NF- κB)及下游信号通路在缺血再灌注损伤的早期起到了保护作用,而后则加重了肝损伤^[8];当然缺血预处理尚通过减少细胞应激产生的活性氧(ROS),稳定细胞内能量平衡及减轻细胞内钙超载等机制保护肝脏^[9]。有关阿片类药物预处理保护重要脏器的研究,较多集中于心脏和脑缺血再灌注损伤方面,有研究^[10]表明,阿片类镇痛剂如吗啡、芬太尼等可以模拟 IPC 的保护作用。阿片类对缺血后心肌的保护作用不但在对抗缺血后梗死区上与缺血预处理相似,而且在机制上亦有共同之处,即阿片受体的激活^[11]。肝细胞虽不表达阿片受体,但 Kupffer 细胞和肝窦内皮细胞等非实质细胞上均存在 κ 、 δ 阿片受体^[12]。Yamanouchi 等^[13]的研究证实内源性阿

片肽(脑啡肽)具有抗氧化作用,能够减轻肝脏缺血再灌注损伤,其机制与减轻 Kupffer 细胞激活 ROS 有关,相关的信号转导分子为 G 蛋白通道和 PKC 等,这与 Zhang 等^[14]等应用瑞芬太尼预处理保护心脏的机制研究有许多相似之处。本研究将瑞芬太尼用于肝脏缺血再灌注损伤,发现瑞芬太尼预处理能起到类似缺血预处理的作用,减轻肝脏缺血再灌注损伤,但其具体机制尚不清楚。结合以往研究^[11-14],推测这一短效阿片受体兴奋剂可能通过与肝脏非实质细胞膜上的阿片受体结合,从而促发胞内 NF- κ B 及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)激活,并减少 ROS 的产生。NF- κ B 活化可以抗细胞凋亡,iNOS 激活后 NO 合成增加,后者有明显的抗缺血再灌注损伤的作用,而 ROS 减少可直接减轻细胞损伤。

本研究从整体动物的水平证实了瑞芬太尼预处理的肝脏保护作用,由于该药也作用于中枢阿片受体,因此还不能明确这一保护作用是否通过肝脏组织内的阿片受体所介导,即不能排除远端预处理(remote precondition)^[15]参与其中的可能,这是本研究的一个不足之处,进一步研究可通过离体肝灌注模型来研究瑞芬太尼在肝脏组织的局部作用。此外,为进一步明确瑞芬太尼预处理的受体机制,可以应用 μ 、 κ 、 δ 选择性的阿片受体抑制剂来研究这一效应的受体分型,其下游的可能信号转导通路也可成为进一步的研究方向。

[参考文献]

- [1] Fondevila C, Busuttill R W, Kupiec-Weglinski J W. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look[J]. *Exp Mol Pathol*, 2003, 74: 86-93.
- [2] Zhang Y, Irwin M G, Wong T M. Remifentanyl preconditioning protects against ischemic injury in the intact rat heart[J]. *Anesthesiology*, 2004, 101: 918-923.
- [3] Gross G J. Role of opioids in acute and delayed preconditioning [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35: 709-718.
- [4] Koti R S, Seifalian A M, Davidson B R. Protection of the liver by ischemic preconditioning: a review of mechanisms and clinical applications[J]. *Dig Surg*, 2003, 20: 383-396.
- [5] Clavien P A, Selzner M, Rüdiger H A, Graf R, Kadry Z, Rousson V, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with *versus* without ischemic preconditioning[J]. *Ann Surg*, 2003, 238: 843-852.
- [6] Scott L J, Perry C M. Remifentanyl: a review of its use during the induction and maintenance of general anaesthesia [J]. *Drugs*, 2005, 65: 1793-1823.
- [7] Murry C E, Jennings R B, Reimer K A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium[J]. *Circulation*, 1986, 74: 1124-1136.
- [8] Li X C, Ma Y F, Wang X H. Role of NF-kappaB as effector of IPC in donor livers before liver transplantation in rats[J]. *Transplant Proc*, 2006, 38: 1584-1587.
- [9] Koti R S, Tsui J, Lobos E, Yang W, Seifalian A M, Davidson B R. Nitric oxide synthase distribution and expression with ischemic preconditioning of the rat liver[J]. *FASEB J*, 2005, 19: 1155-1157.
- [10] Kato R, Ross S, Foëx P. Fentanyl protects the heart against ischaemic injury *via* opioid receptors, adenosine A1 receptors and K_{ATP} channel linked mechanisms in rats[J]. *Br J Anaesth*, 2000, 84: 204-214.
- [11] Schultz J E, Hsu A K, Gross G J. Morphine mimics the cardioprotective effect of ischemic preconditioning *via* a glibenclamide-sensitive mechanism in the rat heart[J]. *Circ Res*, 1996, 78: 1100-1104.
- [12] Nicoll J, Axiotis C A, Bergasa N V. The delta opioid receptor 1 is expressed by proliferating bile ductules in rats with cholestasis: implications for the study of liver regeneration and malignant transformation of biliary epithelium [J]. *Med Hypotheses*, 2005, 65: 1099-1105.
- [13] Yamanouchi K, Yanaga K, Okudaira S, Eguchi S, Furui J, Kanematsu T. [D-Ala², D-Leu⁵] enkephalin (DADLE) protects liver against ischemia-reperfusion injury in the rat[J]. *J Surg Res*, 2003, 114: 72-77.
- [14] Zhang Y, Irwin M G, Wong T M, Chen M, Cao C M. Remifentanyl preconditioning confers cardioprotection *via* cardiac kappa- and delta-opioid receptors[J]. *Anesthesiology*, 2005, 102: 371-378.
- [15] Nakano A, Heusch G, Cohen M V, Downey J M. Preconditioning one myocardial region does not necessarily precondition the whole rabbit heart[J]. *Basic Res Cardiol*, 2002, 97: 35-39.

[本文编辑] 孙岩