

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01379

• 研究简报 •

肝缺血再灌注损伤后老年大鼠认知功能及脑内 IL-1 β 和 TNF- α 的变化

Effect of liver ischemia-reperfusion injury on postoperative cognitive dysfunction and cerebral IL-1 β and TNF- α expression in elderly rats

胡永初[△], 傅海龙[△], 李永华, 张 灏, 朱秋峰*

第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003

[关键词] 肝; 再灌注损伤; 认知障碍; 老年; 肿瘤坏死因子 α ; 白细胞介素 1 β

[中图分类号] R 657.3

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2010)12-1379-02

术后认知功能障碍(postoperative cognitive dysfunction, POCD)是老年肝移植患者术后早期常见的并发症,具体机制尚不清楚,可能与一些非特异性炎症反应有关^[1]。炎症细胞因子,包括白介素 1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)等可能在再灌注早期导致神经细胞的损伤。因此,本研究采用老年大鼠肝脏热缺血再灌注损伤模型,观察术后早期脑组织非特异性炎症因子的表达及认知功能的变化情况。

1 材料和方法

1.1 主要仪器及试剂 乙酰胆碱酯酶(AchE)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;IL-1 β 和 TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自上海西唐生物科技有限公司。18个月龄 SD大鼠由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 动物分组及处理 健康 SD大鼠 80只,体质量约 650g,雌雄各半,随机均分为假手术组和实验组(I/R组)。每组随机选择 30只大鼠术前 10d行 Morris水迷宫实验评价大鼠初始认知功能。术前 12h禁食,不禁水。采用 1%戊巴比妥 40mg/kg腹腔注射麻醉,腹正中切口开腹,I/R组用无损伤血管夹夹闭肝左叶和肝中叶入肝血管(相应肝叶门静脉和肝动脉),行 70%肝脏热缺血 40min,之后松开血管夹行再灌注^[2]。假手术组不阻断血流,其余同实验组。再灌注后 1d在确定大鼠四肢行动良好后,再次行 Morris水迷宫试验,评估认知功能。每组剩余的 10只大鼠术后做后续标本处理。

1.3 Morris水迷宫实验 水迷宫由一黑色正圆形水槽($d=160$ cm)组成,水槽中有一圆形平台($d=12$ cm),可供大鼠站立。实验前,水槽中灌水,水深没过平台 2cm,水温(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。在训练的第 1天将大鼠置于平台上 10s,使其了解此安全区域的存在。在定位航行实验中,将大鼠头朝水槽按顺序依次从 4个象限放入水中,计时 2min,大鼠找到平台并在

其上停留 10s后,计时自动停止,在 2min内未找到平台的,将其引至平台,放置 10s,引导其学习记忆。第 6天进行空间探索实验,撤除平台后,记录大鼠 2min内穿越平台次数。

1.4 标本处理 术后 24h处死大鼠,迅速取其部分脑组织,标本-70 $^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存;各取 1只大鼠脑标本组织用中性甲醛固定液固定做病理检测。取出冷冻保存的脑组织标本,匀浆,离心去除沉淀,按试剂盒方法操作分别检测脑组织 AchE的活性,以及上清液中 IL-1 β 和 TNF- α 的浓度,考马斯亮蓝法标定蛋白含量。组织病理学标本的制备和 H-E染色;迅速取出大鼠脑组织,切成 2mm \times 3mm的切块,经固定、脱水、石蜡包埋、切片,定位后 H-E染色,10倍和 20倍光学显微镜下观察病理组织学形态。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 15.0(SPSS Inc., IL)统计软件进行处理。计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,计数数据采用百分比描述。两组各指标的比较,计量资料采用两独立样本比较的 t 检验,对于方差不齐的情况采用非参数检验方法;计数数据采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 水迷宫试验测试结果 水迷宫测试中对照组和实验组分别有 1只和 9只大鼠死亡,其资料予以剔除。结果(表 1)表明:对照组和 I/R组术前水迷宫试验中潜伏期、上台前路程和穿越平台次数无统计学差异,I/R组术后水迷宫测试潜伏期和上台前游泳距离较对照组均明显延长,平台象限穿越次数明显减少($P<0.05$)。

2.2 脑组织病理学改变及炎症因子测定结果 结果(图 1)表明:两组术后 24h脑组织 H-E染色病理切片观察,对照组大鼠神经细胞周围未见明显水肿,神经元胞质丰富,核膜清晰,核仁可见;神经纤维未见明显水肿,走行一致,排列不紊

[收稿日期] 2010-08-08 [接受日期] 2010-10-29

[基金项目] 上海市科委生物医药引导项目基金(08411962200)。Supported by Biomedical project foundation of STCSM (Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, 08411962200)。

[作者简介] 胡永初,住院医师。E-mail: adsfoxen@sina.com.cn; 傅海龙,主治医师。E-mail: fuhailong1979@163.com

[△]共同第一作者(Co-first authors)。

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81885826, E-mail: zhuqiufeng6f@126.com

乱。I/R组大鼠部分神经元胞体缩小,毛细血管增多,血管内充血,内有中性粒细胞聚集,血管周围水肿。炎症因子测

定结果(表2)表明:I/R组脑组织 IL-1 β 、TNF- α 的表达较对照组明显增加($P<0.05$),但 AchE 活性差异无统计学意义。

表 1 两组手术前后 Morris 水迷宫实验结果的比较

($\bar{x}\pm s$)

组别	n	潜伏期 t/s		上台前游泳距离 l/mm		穿越平台次数	
		术前	术后	术前	术后	术前	术后
对照组	29	75.2 \pm 41.9	72.1 \pm 39.4	11 991.9 \pm 7 910.5	11 493.3 \pm 6 550.0	2.1 \pm 1.7	2.3 \pm 1.4
I/R组	21	74.2 \pm 41.4	101.2 \pm 31.9*	12 945.7 \pm 8 822.6	15 365.3 \pm 9 842.1*	2.5 \pm 1.5	1.3 \pm 0.6*

I/R: 缺血再灌注实验组; * $P<0.05$ 与对照组比较

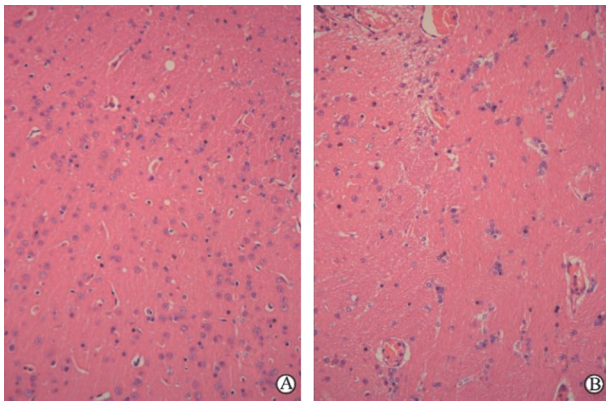


图 1 H-E 染色观察脑组织病理改变

A: 对照组; B: I/R 组再灌注 24 h. Original magnification: $\times 20$

表 2 两组术后 24 h 脑组织 IL-1 β 和 TNF- α 的表达及 AchE 活性比较

($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	IL-1 β $\rho_B/(pg \cdot ml^{-1})$	TNF- α $\rho_B/(pg \cdot ml^{-1})$	AchE ($U \cdot mg^{-1}$)
对照组	0.069 \pm 0.008	0.211 \pm 0.012	11.8 \pm 5.0
I/R组	0.125 \pm 0.011*	0.367 \pm 0.016*	13.5 \pm 4.2

* $P<0.05$ 与对照组比较

3 讨论

非心脏术中各种炎性因子的产生是否对脑细胞产生不良影响及其与 POCD 发生的关系仍不清楚。临床上老年患者肝脏手术后早期 POCD 发生较多,以往认为可能与围术期肝肾功能及脑功能的基础异常相关^[3],目前认为可能与大脑炎症性改变或脑内自发免疫系统激活相关^[4-5],尚无证据表明麻醉方式或麻醉药物对 POCD 发生存在直接影响。盐酸布洛芬可以改善肝性脑病大鼠的学习记忆功能^[6],提示抗炎治疗在改善脑功能方面具有特定作用,佐证了炎症因子引起

的脑组织损伤在围手术期 POCD 的发生中可能起到重要作用。

本研究显示,在老年大鼠肝脏 I/R 后 24 h 脑组织有充血和中性粒细胞聚集现象,而脑组织免疫组化结果显示 IL-1 β 和 TNF- α 的表达在术后 24 h 明显增加,但本研究结果显示在术后脑组织 AchE 活性没有改变的同时,I/R 组认知功能较对照组明显下降。结果提示肝脏 I/R 后脑组织内 IL-1 β 和 TNF- α 的表达可能与 POCD 的发生相关。

综上所述,随着对围术期脑保护的研究深入,围术期多种因素导致的非特异性炎症反应对 POCD 的影响将成为关注的焦点,但具体的细胞因子与 POCD 发生的关系及具体机制尚待进一步研究证实。

[参考文献]

- [1] 谭塔林,王红梅,张建龙,马琪,孙湛,马小娟. 大鼠肝缺血再灌注损伤时脑组织损伤机制的探讨[J]. 中华肝病杂志, 2006,14:553-555.
- [2] Yadav S S, Howell D N, Gao W, Steeber D A, Harland R C, Clavien P A. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver[J]. Am J Physiol, 1998, 275(6 Pt 1): G1341-G1352.
- [3] 傅海龙,傅宏,傅志仁,丁国善,张建军,马钧,等. 原位肝移植术后发生脑病的相关因素分析[J]. 中华器官移植杂志, 2005, 26: 335-338.
- [4] Chen J, Buchanan J B, Sparkman N L, Godbout J P, Freund G G, Johnson R W. Neuroinflammation and disruption in working memory in aged mice after acute stimulation of the peripheral innate immune system[J]. Brain Behav Immun, 2008, 22: 301-311.
- [5] Godbout J P, Chen J, Abraham J, Richwine A F, Berg B M, Kelley K W, et al. Exaggerated neuroinflammation and sickness behavior in aged mice following activation of the peripheral innate immune system[J]. FASEB J, 2005, 19: 1329-1331.
- [6] Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Boix J, Felipe V. Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts[J]. Hepatology, 2007, 46: 514-519.

[本文编辑] 贾泽军