

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00413

经下腔静脉逆灌注含氧自体稀释血对中低温停循环猪血清及肝肾MDA、SOD的影响

林宝泉¹,李怀军²,纪广玉¹,邹良建^{1*},王 军¹,徐志云¹,黄盛东¹

1. 第二军医大学长海医院心胸外科,上海 200433

2. 中国人民解放军沈阳军区联勤部门诊部,沈阳 110005

[摘要] **目的** 探讨中低温停循环时经下腔静脉逆行灌注对猪血清及肝、肾组织丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量及超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性的影响。**方法** 选择健康小型猪 20 只,随机分为 2 组,每组 10 只。A 组(对照组)给予中低温停循环 90 min, B 组(实验组)给予中低温停循环联合经下腔静脉逆行灌注 90 min。检测逆灌注前(T₁)、停循环 1 h (T₂)及复灌 1 h(T₃)、3 h(T₄)、5 h(T₅)血清及肝、肾组织内 MDA 含量及 SOD 活性。**结果** 血清及肝肾组织内 MDA、SOD 在 T₁ 时间点两组差异无统计学意义。在 T₃~T₅ 时间点两组血清 MDA 含量均升高, SOD 活性均下降, 但 B 组变化幅度低于 A 组 (P<0.05)。A 组在 T₂~T₅ 时间点肝、肾组织内 MDA 含量高于 B 组, 而 SOD 活性低于 B 组 (P<0.05)。**结论** 经下腔静脉逆灌注含氧自体稀释血能部分改善中低温停循环猪肝、肾器官缺血再灌注损伤, 对肝肾功能具有一定的保护作用。

[关键词] 逆灌注; 中低温停循环; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 再灌注损伤

[中图分类号] R 654.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)04-0413-04

Effect of retrograde perfusion with autologous blood through inferior vena cava on MDA and SOD in serum, liver and kidney during moderate hypothermic lower body circulatory arrest in pigs

LIN Bao-quan¹, LI Huai-jun², JI Guang-yu¹, ZOU Liang-jian^{1*}, WANG Jun¹, XU Zhi-yun¹, HUANG Sheng-dong¹

1. Department of Cardiothoracic Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Clinic of Joint Service Department, PLA Shenyang Military Area Command, Shenyang 110005, Liaoning, China

[Abstract] **Objective** To study the effect of retrograde perfusion through the inferior vena cava (IVC) during moderate hypothermic lower body circulatory arrest on malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity in the serum, liver and kidney of pigs. **Methods** Twenty healthy pigs were randomly divided into two groups: group A had moderate hypothermic lower body circulatory arrest for 90 min, group B had moderate hypothermic lower body circulatory arrest and retrograde perfusion through IVC at the same time. SOD activities and MDA contents in the serum, liver and kidney were analyzed before retrograde perfusion(T₁), 1 h after circulatory arrest(T₂), and 1 h (T₃), 3 h (T₄), and 5 h (T₅) after reperfusion. **Results** There were no significant differences in SOD activities and MDA contents in the serum, liver or kidney between the two groups at T₁ (P<0.05). Serum MDA contents were increased and the SOD activities were decreased in both groups at T₃, T₄, and T₅, with the changes in group B being significantly small than those in group A (P<0.05). MDA contents in the liver and kidney in group A were significantly higher and the SOD activities were significantly lower than those in group B at T₂-T₅ (P<0.05). **Conclusion** Retrograde perfusion with autologous blood through IVC can partly alleviate the ischemic-reperfusion injury of liver and kidney during moderate hypothermic lower body circulatory arrest in pigs, showing a protective effect on the hepatic and renal function.

[Key words] retrograde perfusion; moderate hypothermic circulatory arrest; malondialdehyde; superoxide dismutase; reperfusion injury

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(4): 413-416]

累及主动脉弓部的 Stanford A 型主动脉夹层是一种危及生命的疾病, 年发病率为 2.9/10 万, 21% 的患者入院前死亡, 68.2% 在入院 48 h 内死亡, 显

示了本病的高危性^[1]。对于 Stanford A 型主动脉夹层只有外科手术能够有效挽救患者生命, 手术需要在低温停循环条件下进行, 但停循环期间的缺血及复灌

[收稿日期] 2010-12-06

[接受日期] 2011-01-11

[作者简介] 林宝泉, 博士生. E-mail: baoquanlin@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81873418, E-mail: zouliangjian@hotmail.com

后的缺血再灌注损伤容易造成术后腹腔脏器功能不全或衰竭^[2-3]。本研究通过建立中低温停循环经下腔静脉逆行灌注自体血动物模型,观察其对动物肝肾功能及血清、肝肾组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平的影响,探讨中低温停循环时经下腔静脉逆行灌注对腹腔脏器可能的保护作用。

1 材料和方法

1.1 主要仪器 Sarns人工心肺机和变温水箱(美国3M公司),膜式氧合器(宁波菲拉尔医疗用品厂),DH-140B型动物人工呼吸机、心电监护仪(美国HP公司),CPS超声波粉碎机(上海华岩仪器设备有限公司)。SOD活性、MDA含量检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物分组及麻醉处理 上海种白猪20只(由第二军医大学实验动物中心提供),体质量25~30 kg,雌雄不拘,随机分为2组(A、B),每组10只。动物麻醉前肌肉注射东莨菪碱0.2 mg,肌肉注射氟哌利多5 mg及氯胺酮20 mg/kg诱导麻醉。麻醉成功后,行气管插管呼吸机辅助呼吸,并在颈部动脉和静脉处进行置管用于血压监测和液体支持。普鲁泊福、芬太尼和琥珀酰胆碱(司可林)从颈静脉注射维持麻醉。

1.3 体外循环(CPB)的建立及逆行灌注 体外循环预充100 ml羟乙基淀粉+200 ml乳酸林格液。置实验猪于仰卧位,取胸部正中切口暴露心脏。行升主动脉及上、下腔静脉插管。充分肝素化后,连接体外循环机开始体外循环。流量80 ml/(kg·min),常温转流10 min后开始降温,控制降温时间20 min。同时开腹显露肝肾组织。待肛温降至28℃,停止体外循环,阻断升主动脉并注入肌麻痹液使心脏停跳。同时经右无名动脉插管予持续顺灌注脑保护。停循环期间每隔30 min灌注1次心肌保护液。A组(对照组)单纯低温停循环90 min;B组(实验组)在停循环同时经下腔静脉逆灌注含氧的灌注液,灌注压力为25 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa),灌注流量在20~25 ml/(kg·min),灌注液为体外循环机储血槽内的自体血,氧饱和度是95%~100%,Hct 20%~25%。两组均在停循环90 min后开放升主动脉,心脏复跳,缓慢复温至37℃循环稳定后脱离体外循环机,继续维持麻醉状态5 h,放血处死。

1.4 检测指标及方法 分别在逆灌前(T₁)、停循环1 h(T₂)、复灌1 h(T₃)、复灌3 h(T₄)、复灌5 h(T₅)取少量肝、肾组织块(约10 g),放在冰冷的生理盐水中漂洗称质量,用移液管量取预冷的生理盐水,生理盐水体体积与组织块质量之比为9:1,用CPS超声波粉碎机制成10%组织匀浆,然后倒入试管中,用离心机1 000×

g 4℃离心10 min,取上清液测定MDA含量及SOD活性。并分别在T₁~T₅时间点抽取颈静脉血4 ml分成2管,2 ml用于检测血清MDA含量、SOD活性,另外2 ml用于检测丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、β₂-微球蛋白(β₂-MG),标本送第二军医大学长海医院检验科行全自动生化分析检测。

MDA检测原理:过氧化脂质降解产物中的MDA可与硫代巴比妥酸(TBA)结合,形成红色产物,在532 nm处有最大吸收峰值。SOD检测原理:通过黄嘌呤以及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基,后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂的作用下呈现紫红色,分光光度仪测其光密度(D)。当被测样品中含有SOD时,则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的光密度值低于对照管的光密度值,通过公式计算可求出被测样品中的SOD活力。MDA、SOD检测严格按照说明书要求进行测定。

1.5 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行分析处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数的比较采用 t 检验,检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 不同时间点动物肝肾功能指标的变化 结果(表1)表明:B组ALT、AST在T₅时间点比A组降低($P < 0.05$);Scr和BUN水平在T₄、T₅时间点明显低于A组($P < 0.05$);而反映肾功能的早期敏感指标β₂-MG两组出现差异的时间更早,在T₃时间点差异就有统计学意义($P < 0.05$)。T₂时间点全身停循环,此时局部的静脉血浓度不能反映全身的肝肾功能水平,故不纳入统计对比。结果说明经下腔静脉逆行灌注对猪肝、肾功能具有一定保护作用。

2.2 不同时间点血清MDA含量、SOD活性变化 结果(图1)表明:两组血清MDA含量随复灌时间延长而相应增加,SOD活性随复灌时间延长而相应下降,在T₃~T₅时间点数值对比差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 不同时间点肝脏组织中MDA含量、SOD活性变化 结果(图2)表明:与A组相比,B组在T₂~T₅时间点MDA含量下降,SOD活性升高($P < 0.05$)。组内不同时间点对比:A组在T₂~T₅时间点MDA含量较T₁时间点升高,SOD活性降低($P < 0.05$);而B组MDA含量、SOD活性在T₂~T₃时间点较T₁时间点差异无统计学意义,仅在T₄~T₅时间点差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 不同时间点猪肝肾功能指标对比

Tab 1 Changes of indicators of liver and kidney function at different time points in each group

Indicator	Group	T ₁	T ₃	T ₄	T ₅
ALT $\bar{x}_B/(IU \cdot L^{-1})$	A	23.32±5.35	27.34±6.73	35.98±8.53	44.84±11.37
	B	24.78±6.72	26.87±6.84	29.74±7.64	32.62±7.24*
AST $\bar{x}_B/(IU \cdot L^{-1})$	A	35.87±5.86	42.87±7.83	49.87±12.84	64.84±11.84
	B	37.74±6.87	41.73±8.73	43.48±6.84	48.84±9.89*
BUN $\bar{x}_B/(mmol \cdot L^{-1})$	A	10.84±4.72	14.75±5.89	20.78±9.78	26.87±13.87
	B	9.87±3.73	12.83±6.87	15.87±7.87*	18.87±10.87*
SCr $\bar{x}_B/(mmol \cdot L^{-1})$	A	60.83±18.98	73.94±19.83	87.26±22.74	109.87±36.73
	B	64.83±24.87	70.98±22.87	74.87±18.87*	79.98±28.98*
β_2 -MG $\bar{x}_B/(mg \cdot L^{-1})$	A	1.48±0.35	2.64±0.73	3.78±1.02	4.87±1.87
	B	1.62±0.42	2.06±0.55*	2.65±0.89*	2.89±1.32*

Group A had moderate hypothermic lower body circulatory arrest for 90 min, group B had moderate hypothermic lower body circulatory arrest and retrograde perfusion through IVC at the same time. * $P < 0.05$ vs group A; $n = 10, \bar{x} \pm s$

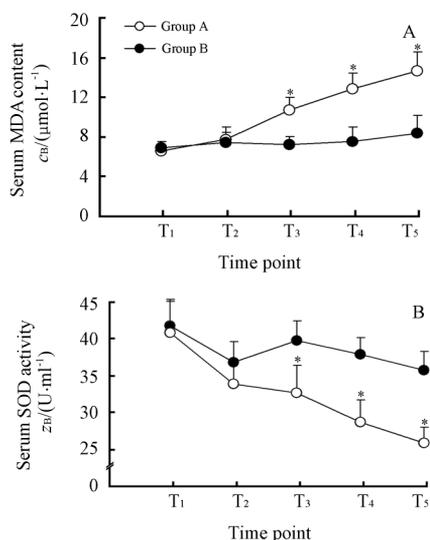


图 1 不同时间点血清中 MDA 含量(A)与 SOD 活性(B)变化

Fig 1 Changes of serum MDA contents (A) and SOD activity (B) at different time points

* $P < 0.05$ vs group B; $n = 10, \bar{x} \pm s$

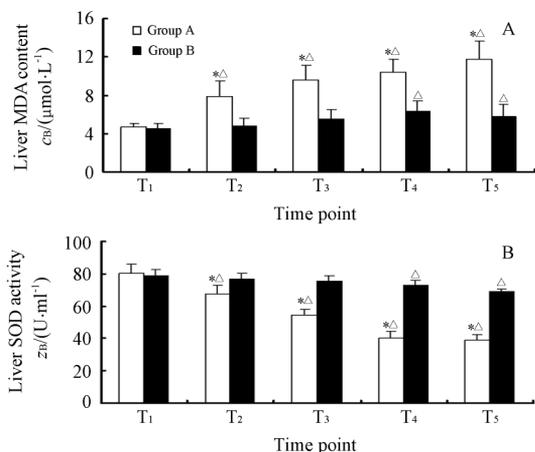


图 2 不同时间点肝脏组织中 MDA 含量(A)与 SOD 活性(B)变化

Fig 2 Changes of MDA contents (A) and SOD activity (B) in liver tissues at different time points

* $P < 0.05$ vs group B; $\Delta P < 0.05$ vs T₁. $n = 10, \bar{x} \pm s$

2.4 不同时间点肾脏组织中 MDA 含量、SOD 活性变化 结果(图 3)表明:与 A 组比较,B 组在 T₂~T₅ 时间点 MDA 含量下降,SOD 活性升高($P < 0.05$)。与 T₁ 时间点比较,A 组在 T₂~T₅ 时间点 MDA 含量升高,SOD 活性降低($P < 0.05$);而 B 组 MDA 含量、SOD 活性在 T₂~T₃ 时间点差异无统计学意义,仅在 T₄~T₅ 时间点差异有统计学意义($P < 0.05$)。

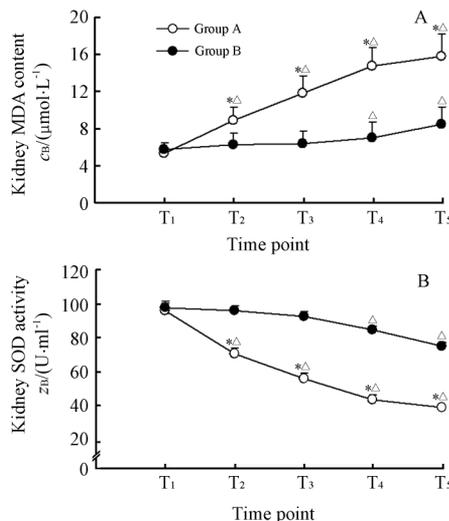


图 3 不同时间点肾脏组织中 MDA 含量(A)与 SOD 活性(B)变化

Fig 3 Changes of MDA contents (A) and SOD activity (B) in kidney tissues at different time points

* $P < 0.05$ vs group B; $\Delta P < 0.05$ vs T₁. $n = 10, \bar{x} \pm s$

3 讨论

脏器损伤一直是深低温停循环后常见的并发症之一。近年来,很多学者倡导提高停循环温度结合选择性顺行脑灌注的方法来施行主动脉弓部手术^[4-7],已基本解决了脑保护的问题。但停循环温度大幅提高后腹腔脏器对缺血缺氧的耐受程度也相应降低,肝肾功能损害进一步加重^[8-9]。停循环期间的缺血和复灌后缺血再灌注损伤(IRI)是腹腔脏器损

伤的主要原因。停循环期间,腹腔脏器处于缺血状态,再灌注后可通过氧自由基、钙超载、白细胞及炎症介质等的作用造成腹腔脏器的缺血再灌注损伤。同时,由于血液与体外循环人造物质接触激活白细胞,通过白细胞活化,促进血液炎症因子释放,白细胞和炎症介质通过血液循环到达腹部组织,会进一步造成腹腔脏器损伤^[10-11]。此外,停循环期间毛细血管微栓沉积导致微循环闭塞也是原因之一^[12]。因此,保证腹腔脏器持续的血流灌注是脏器保护的环节。本研究拟在中低温停循环条件下,经下腔静脉逆行灌注含氧灌注液,通过检测血清及肝肾组织中MDA含量及SOD活性变化,评价该方法对腹腔脏器的保护作用。猪、犬与人解剖结构相似,下腔静脉及肝、肾等大静脉处均无明显的静脉瓣^[13],理论上经下腔静脉逆灌更容易到达肝、肾、肠道等重要脏器从而起到保护作用。

本研究结果发现,对照组在中低温停循环后,SOD活力降低,MDA含量上升,且随着缺血再灌注时间的延长(复灌后5h内),SOD活性进一步下降,MDA含量进一步上升。MDA为脂质过氧化代谢产物,其含量可反映机体内脂质过氧化的程度,用以判断细胞损伤的程度;SOD是自由基的重要清除酶之一,能清除超氧化物阴离子,对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,保护细胞免受损伤,其活性可反映组织内清除自由基的能力。因此,MDA与SOD的联合检测可以推测体内自由基的代谢情况^[14-15]。本研究结果说明停循环后造成腹腔脏器缺血缺氧,氧自由基增加,脂质过氧化反应增强,抗氧化酶大量消耗,从而引起组织缺血再灌注损伤。这与对照组术后的ALT、AST升高及肾功能损伤的结果相符合。

实验组予下腔静脉逆灌干预后,能显著上调SOD的活性和抑制MDA表达,而SOD活性增加和MDA含量减少能加快组织内氧自由基清除,提升机体的抗氧化能力,从而减轻缺血再灌注损伤,对腹腔脏器起到明显的保护作用。其机制可能与逆灌后机体的血氧含量增加,组织氧量增加,机体缺氧状况得到改善有关;也可能与逆灌后血流能提供组织代谢需要的ATP等多种底物并带走代谢产物有关。实验结果还表明,实验组ALT、AST在T₅时间点较对照组明显下降,Scr和BUN指标在T₄~T₅时间点就出现改善,而肾功能的早期敏感指标 β_2 -MG在T₃时间点就较对照组明显改善。这些结果与逆灌后体内的SOD活性上升和MDA水平下降的结果具有一致性。

综上所述,中低温停循环时经下腔静脉逆行灌注含氧自体稀释血的方法能减轻停循环时腹腔器官的缺血再灌注损伤,从而对肝肾功能起到一定保护

作用,有望成为主动脉弓部手术中腹腔重要脏器保护的新手段。

[参考文献]

- [1] Mészáros I, Mórocz J, Szlávi J, Schmidt J, Tornóci L, Nagy L. Epidemiology and clinicopathology of aortic dissection [J]. *Chest*, 2000, 117: 1271-1278.
- [2] Augoustides J G, Pochettino A, Ochroch E A, Cowie D, Weiner J, Gambone A J, et al. Renal dysfunction after thoracic aortic surgery requiring deep hypothermic circulatory arrest: definition, incidence, and clinical predictors [J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2006, 20: 673-677.
- [3] Haverich A, Hagl C. Organ protection during hypothermic circulatory arrest [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2003, 125: 460-462.
- [4] Kamiya H, Hagl C, Kropivnitskaya I, Böthig D, Kallenbach K, Khaladj N, et al. The safety of moderate hypothermic lower body circulatory arrest with selective cerebral perfusion: a propensity score analysis [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 133: 501-509.
- [5] Minatoya K, Ogino H, Matsuda H, Sasaki H, Tanaka H, Kobayashi J, et al. Evolving selective cerebral perfusion for aortic arch replacement: high flow rate with moderate hypothermic circulatory arrest [J]. *Ann Thorac Surg*, 2008, 86: 1827-1831.
- [6] Leshnower B G, Myung R J, Kilgo P D, Vassiliades T A, Vega J D, Thourani V H, et al. Moderate hypothermia and unilateral selective antegrade cerebral perfusion: a contemporary cerebral protection strategy for aortic arch surgery [J]. *Ann Thorac Surg*, 2010, 90: 547-554.
- [7] Pacini D, Leone A, Di Marco L, Marsilli D, Sobaih F, Turci S, et al. Antegrade selective cerebral perfusion in thoracic aorta surgery: safety of moderate hypothermia [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2007, 31: 618-622.
- [8] Bakhtiyar F, Dogan S, Zierer A, Dzemali O, Oezaslan F, Therapidis P, et al. Antegrade cerebral perfusion for acute type A aortic dissection in 120 consecutive patients [J]. *Ann Thorac Surg*, 2008, 85: 465-469.
- [9] Nardi P, Scafuri A, Pellegrino A, Bassano C, Zeitani J, Bertoldo F, et al. Surgery for type A aortic dissection: long-term results and risk factor analysis [J]. *G Ital Cardiol (Rome)*, 2007, 8: 580-585.
- [10] Li S, Price R, Phiroz D, Swan K, Crane T A. Systemic inflammatory response during cardiopulmonary bypass and strategies [J]. *J Extra Corpor Technol*, 2005, 37: 180-188.
- [11] Valenzuela-Flores A G, Valenzuela-Flores A A, Ortega-Ramírez J A, Penagos-Paniagua M, Pérez-Campos J P. [Physiopathological alterations secondary to extracorporeal circulation in cardiac surgery] [J]. *Cir Cir*, 2005, 73: 143-149.
- [12] Wilde J T. Hematological consequences of profound hypothermic circulatory arrest and aortic dissection [J]. *J Card Surg*, 1997, 12(2 Suppl): 201-206.
- [13] Oohara K, Usui A, Tanaka M, Abe T, Murase M. Determination of organ blood flows during retrograde inferior vena caval perfusion [J]. *Ann Thorac Surg*, 1994, 58: 139-145.
- [14] Hoshida S, Yamashita N, Otsu K, Hori M. The importance of manganese superoxide dismutase in delayed preconditioning: involvement of reactive oxygen species and cytokines [J]. *Cardiovasc Res*, 2002, 55: 495-505.
- [15] Vijayarathay K, Shanthi Naidu K, Sastry B K. Melatonin metabolite 6-Sulfatoxymelatonin, Cu/Zn superoxide dismutase, oxidized LDL and malondialdehyde in unstable angina [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 144: 315-317.