

· 论 著 ·

# 雷帕霉素在肝脏缺血再灌注损伤中对肝脏及胰腺损伤的保护作用

李继维<sup>1</sup>, 张莹<sup>2</sup>

1. 毕节市第一人民医院普外二科, 贵州 毕节 517000; 2. 贵州省人民医院肝胆外科, 贵州 贵阳 550000

**摘要:** **目的** 探讨雷帕霉素在肝脏缺血再灌注损伤(HIRI)中对肝脏及胰腺损伤的保护作用。**方法** SPF级雄性SD大鼠48只随机分为3组,A、B组参照Pringle's法制作大鼠肝脏HIRI模型,C组在手术过程中仅翻动肝脏随即关腹。A组术前3d腹腔注射雷帕霉素 $1.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ,缺血30min;B组术前3d腹腔注射等量的生理盐水,缺血30min。术后24h、3d各组分别处死8只大鼠,取血清测定天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、血清淀粉酶、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )。取部分肝脏、胰腺进行HE染色并于光镜下分析肝脏、胰腺损伤程度。采用Suzuki's半定量评分评价肝脏损伤程度。**结果** A、B组AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、血清淀粉酶术后24h较C组明显升高( $P<0.05$ )。术后24h、3dA组AST、ALT、血清淀粉酶水平均低B组( $P$ 均 $<0.05$ ),术后24hA组TNF- $\alpha$ 水平低于B组( $P<0.05$ ),术后3d则无统计学差异( $P$ 均 $>0.05$ )。HE染色显示,A组、B组肝组织均较正常肝组织有明显改变,A组较B组肝血窦淤血、肝细胞变性、炎性细胞浸润以及胰腺组织水肿,炎性细胞浸润明显减轻。依照C组→B组→A组的顺序Suzuki's半定量评分逐渐增加,两两比较差异均有统计学意义( $P$ 均 $<0.01$ )。**结论** 肝脏缺血再灌注损伤存在胰腺损伤,雷帕霉素可减轻大鼠肝脏缺血再灌注的病理损害以及炎症,减轻胰腺组织损伤。

**关键词:** 雷帕霉素; 肝脏; 胰腺; 缺血再灌注损伤; 病理分析; 肿瘤坏死因子- $\alpha$

**中图分类号:** R 965 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)08-1057-04

## Protective effect of rapamycin on injuries of liver and pancreas in liver ischemia-reperfusion injury in rats

LI Ji-wei\*, ZHANG Ying

\* Department of Second General Surgery, Bijie First Municipal People's Hospital, Bijie, Guizhou 517000, China

Corresponding author: ZHANG Ying, E-mail: zhangyingdoc@163.com

**Abstract: Objective** To investigate the protective effects of rapamycin on liver and pancreas injuries in liver ischemia-reperfusion injury (HIRI) in rats. **Methods** Forty-eight male SD rats of grade SPF were randomly divided into 3 groups. In groups A and B, the rat whole hepatic HIRI model was established with Pringle's method. In group C, only the liver was turned over, and then the abdomen was closed. In group A, intraperitoneal injection of  $1.5\text{ mg/kg}$  rapamycin was administered at 3-day before operation and ischemia of 30 minutes was given. In group B, intraperitoneal injection of equal amount of normal saline was administered at 3-day before operation and ischemia of 30 minutes was given. At 24-hour and 3-day after operation, 8 rats were killed in each group. Serum sample was taken to detect serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), amylase and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). The liver and pancreas were taken to make pathological examination. **Results** At 24-hour after operation, serum AST, ALT, TNF- $\alpha$ , and serum amylase levels in groups A and B increased significantly compared with group C (all  $P<0.05$ ). At 24-hour and 3-day after operation, the AST, ALT, and serum amylase levels in group A were significantly lower than those in group B (all  $P<0.05$ ). At 24-hour after operation, TNF- $\alpha$  levels in group A were significantly lower than those in group B ( $P<0.05$ ), and there was no significant significance between group A and group B at 3-day after operation ( $P>0.05$ ). HE staining showed that liver tissue of group A and group B changed significantly compared with normal liver tissue. The hepatic sinusoidal congestion, hepatocyte degeneration and inflammatory cell infiltration, pancreatic tissue edema and inflammatory cell infiltration at 24-hour after operation in group A were alleviated compared with group B. According to the order of group C→group B→group

A, Suzuki's semi-quantitative score increased, and the difference between the two groups was statistically significant (all  $P < 0.01$ ). **Conclusions** Pancreatic injury exists in HIRI, and rapamycin can reduce the pathological damage and inflammation and pancreatic tissue injury in rats HIRI.

**Key words:** Rapamycin; Liver; Pancreas; Ischemia-reperfusion injury; Pathological analysis; Tumor necrosis factor- $\alpha$

肝脏缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia reperfusion injury, HIRI) 是当代肝脏外科面临的一个重要病理生理过程, 肝脏外伤、肝脏手术及肝移植所致的肝功能损害、肝功能衰竭、胰腺损伤都与之有关<sup>[1]</sup>。如何减轻肝脏缺血再灌注损伤、促进肝脏手术后肝功能恢复, 减轻肝脏缺血再灌注损伤后胰腺损伤有重要的临床意义<sup>[2]</sup>。本研究通过建立大鼠全肝缺血再灌注损伤模型, 探讨雷帕霉素对肝脏缺血再灌注损伤中肝脏和胰腺的保护作用, 以及肝脏缺血再灌注损伤对胰腺损伤可能的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物与主要试剂** SPF 级雄性 SD 大鼠 (由第三军医大学动物实验中心提供) 48 只, 体重 180 ~ 200 g, 适应性喂养 1 周, 体重增至 200 ~ 250 g, 术前 12 h 禁食, 自由饮水。主要试剂: 1.0 mg/ml 的雷帕霉素溶液。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验动物与造模** 48 只 SD 大鼠随机分为 A 组 (16 只, 雷帕霉素干预组)、B 组 (16 只, 实验对照组) 和 C 组 (16 只, 假手术空白对照组)。其中 A 组在术前 3 d 用雷帕霉素 ( $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 腹腔注射, 而 B 组在术前 3 d 用生理盐水 ( $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) 腹腔注射<sup>[2]</sup>, C 组在手术过程中仅翻动肝脏随即关腹。A、B 组在无菌条件下参照 Pringle's 法制作大鼠肝脏 HIRI 模型<sup>[3]</sup>, 10% 水合氯醛 0.3 ml/100 g 麻醉后固定四肢并腹部皮肤消毒, 沿腹正中中线开腹后找到第一肝门, 以无损伤血管夹夹闭。

**1.2.2 检测** 各组大鼠于术后 24 h、3 d 两个时间点分别处死动物 8 只, 后取大小约 1.0 cm × 1.0 cm × 0.5 cm 的部分肝脏、胰腺于 10% 中性福尔马林固定, 石蜡包埋后 HE 染色分别于 ×100、×200 光镜下观察肝脏、胰腺损伤程度。股动脉取血、常温 3 000 rpm

离心 10 min 后取血清测定天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、血清淀粉酶、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )。AST、ALT 由罗氏全自动生化检测仪检测; TNF- $\alpha$  ELISA 试剂盒 (武汉华美生物科技有限公司) 检测 TNF- $\alpha$  水平; 血清淀粉酶由罗氏自动生化仪检测。采用 Suzuki's 半定量评分评价肝脏损伤程度, 评分标准: 肝血窦淤血 (无为 0 分, 极轻微为 1 分, 轻度为 2 分, 中度为 3 分, 重度为 4 分), 肝细胞胞质空泡样改变 (无为 0 分, 极轻微为 1 分, 轻度为 2 分, 中度为 3 分, 重度为 4 分), 肝细胞坏死 (无为 0 分, 单个细胞为 1 分, <30% 为 2 分, 31% ~ 60% 为 3 分, >60% 为 4 分)<sup>[4]</sup>。总分 0 ~ 12 分。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 23.0 软件进行统计分析。正态分布数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK- $q$  检验。计数资料比较采用  $\chi^2$  检验。  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

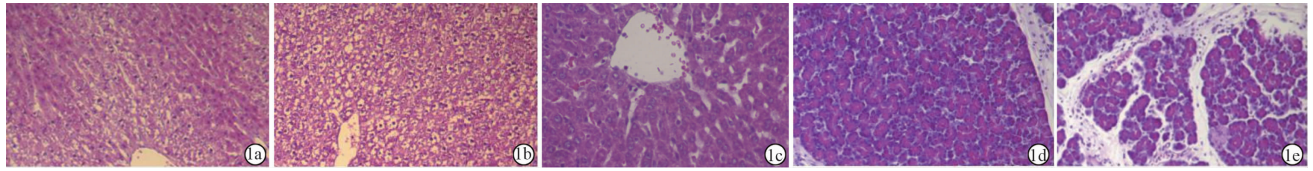
**2.1 各组大鼠术后 AST、ALT、血清淀粉酶、TNF- $\alpha$  变化情况** A、B 组 AST、ALT、TNF- $\alpha$ 、血清淀粉酶术后 24 h 较 C 组明显升高 ( $P < 0.05$ )。术后 24 h、3 d A 组 AST、ALT 水平均低 B 组 ( $P < 0.05$ ), 术后 24 h A 组 TNF- $\alpha$  水平低于 B 组 ( $P < 0.05$ ), 术后 3 d 则无统计学差异。术后 24 h、术后 3 d 血清淀粉酶 A 组较 B 组明显减低 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 各组大鼠肝脏、胰腺大体变化及病理变化** A、B 组在开始腹腔注射 3 d 后大鼠活力无明显差别。术后 24 h 开腹取肝组织时发现 B 组肝组织较 A 组明显晦暗, 肝脏边缘变锐, 肝脏边缘颜色泛白。C 组肝组织色较 A、B 组红润, 饱满。HE 染色后 ×200 光镜下见: A 组术后 24 h 肝小叶结构完整, 中央静脉周围肝细胞水肿变性明显, 胞质疏松呈网状、空泡状, 未见坏死, 汇管区少量炎性细胞浸润 (图 1a); B 组术后

表 1 各组大鼠术后 AST、ALT、血清淀粉酶、TNF- $\alpha$  变化情况 ( $n = 16, \bar{x} \pm s$ )

组别	AST(IU/L)		ALT(IU/L)		血清淀粉酶 (IU/L)		TNF- $\alpha$ (ng/L)	
	术后 24 h	术后 3 d	术后 24 h	术后 3 d	术后 24 h	术后 3 d	术后 24 h	术后 3 d
A 组	353.38 ± 20.07**	126.75 ± 12.33#	116.25 ± 10.74**	40.88 ± 5.14#	1509.25 ± 136.94**	1065.25 ± 146.99#	61.25 ± 8.65**	45.50 ± 5.07
B 组	508.75 ± 50.33*	183.75 ± 16.39	168.63 ± 36.99*	49.50 ± 13.08	1608.50 ± 98.74*	1475.50 ± 131.26	79.25 ± 10.72*	56.50 ± 3.11
C 组	112.63 ± 14.14	108.13 ± 11.38	41.75 ± 9.27	36.63 ± 5.55	229.12 ± 19.83	210.50 ± 37.13	37.14 ± 5.44	35.00 ± 6.98
F 值	304.876	67.718	62.165	4.520	491.604	248.584	48.849	32.986
P 值	0.000	0.000	0.000	0.023	0.000	0.000	0.000	0.000

注: 与 C 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, #  $P < 0.05$ 。



注:肝脏变化,1a:A组,1b:B组,1c:C组;胰腺变化,1d:A组,1e:B组。

图1 术后24 h肝脏及胰腺病理学改变(HE染色,×200)

24 h 肝细胞点状坏死,并且部分细胞形态消失,大量肝细胞水肿变性,可见较多炎性细胞浸润(图1b);C组为正常肝组织(图1c)。A组术后24 h见胰腺腺泡细胞、胰腺小叶之间轻度水肿,腺泡、导管基本正常,中等量炎性细胞浸润(图1d)。B组见胰腺腺泡之间、腺叶之间水肿严重,大量炎性细胞浸润(图1e)。

2.3 各组 Suzuki's 半定量评分比较 A组、B组和C组 Suzuki's 半定量评分分别为(5.90 ± 0.74)、(9.30 ± 0.67)、(2.60 ± 1.26)分,两两比较差异均有统计学意义( $P$ 均 < 0.01)。

### 3 讨论

肝脏缺血再灌注损伤是肝移植、复杂性肝切除等多种疾病导致的多因子参与的复杂病理生理过程,是导致肝脏术后肝功能异常、肝功能衰竭的重要原因。涉及缺氧后代谢异常、氧自由基的产生、以及炎症反应等多种病理生理功能障碍。目前,相关研究表明,炎症反应是引起 HIRI 的主要原因<sup>[5-6]</sup>。在肝移植过程中必然要阻断门静脉血流,造成淤血性 PIRI (胰腺缺血再灌注损伤)<sup>[7]</sup>。PIRI 可导致胰酶明显升高、移位,并释放多种炎症介质入血后加重肝脏损伤程度<sup>[8]</sup>。

研究发现,发生 HIRI 早期,肝血管内皮细胞肿胀形成局部微循环障碍。再灌注后,随着缺血时间延长,可引起库普弗(Kupffer)细胞、中性粒细胞等炎症细胞活化,从而产生和释放 IL-6、TNF- $\alpha$  等重要炎症因子及氧自由基,最终导致肝细胞损伤加剧<sup>[1]</sup>。发生 HIRI 时胰腺损伤机制鲜有研究,相关的机制暂不明确,研究表明与肝脏恢复血流后大量炎症因子及氧自由基释放入血有关<sup>[9]</sup>。肝脏缺血恢复血供后大量氧自由基及炎性细胞因子从肝脏中释放入血引起细胞超微结构改变,以及缺血后能量代谢障碍认为是重要原因之一<sup>[10]</sup>。胰腺作为肝脏同源器官,胰腺静脉血通过门静脉回流入肝,肝血流阻断至肝血流恢复,胰腺可发生组织淤血性缺血及再灌注损伤<sup>[11]</sup>。胰腺损伤后引起胰岛素分泌缺陷,胰岛  $\beta$  细胞分泌障碍。葡萄糖氧化供能异常,进一步加重能量代谢改变,加重肝脏供能障碍,进一步加重肝脏缺血损伤过程<sup>[12]</sup>。

雷帕霉素作为免疫抑制剂长期应用于临床,作为

器官移植后免疫抑制剂广泛应用。A组术前应用雷帕霉素腹腔注射后,AST、ALT、TNF- $\alpha$  较 B 组明显减轻,肝脏及胰腺病理损伤较 B 组减轻,A组肝组织、胰腺组织 HE 染色后炎症细胞浸润、组织结构损伤较 B 组减轻,雷帕霉素对 HIRI 肝脏有保护作用,可减轻 HIRI 后胰腺组织损伤程度。A、B 两组术后 24 h TNF- $\alpha$  升高,AST、ALT 也相应升高。术后 3 d TNF- $\alpha$  减低,AST、ALT 也降低,TNF- $\alpha$  介的炎症反应加重与缺血再灌注后肝脏损伤程度有关,TNF- $\alpha$  升高、炎症反应加重,相应 HIRI 损伤较严重。研究显示,雷帕霉素对大鼠缺血再灌注损伤的保护机制为通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路下游分子 p70S6K 活性,阻止细胞由 G1 期向 S 期转化,抑制细胞增殖,降低炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  的表达水平<sup>[13]</sup>。

综上所述,肝脏缺血再灌注损伤后引起胰腺损伤,发生缺血再灌注损伤前应用雷帕霉素可表现出明显抗炎性,减轻缺血再灌注肝脏损伤,减轻胰腺损伤,可能是雷帕霉素减轻 HIRI 的一个主要机制。

### 参考文献

- [1] 梁浩晖,王成友,倪勇. 肝脏缺血再灌注损伤发生机制的研究进展[J]. 肝胆外科杂志,2002,10(6):478-479.
- [2] 陈峰,王建,张雅敏. 他克莫司预处理对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的影响[J]. 中华肝胆外科杂志,2017,23(3):186-190.
- [3] Pannen BH, Al-Adili F, Bauer M, et al. Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat[J]. Hepatology, 1998,27(3):755-764.
- [4] 陆金梅,娄艳. 维拉帕米后处理和缺血后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护作用的对比[J]. 中国临床研究,2016,29(6):726-729.
- [5] Johnson C, Kannan TR, Baseman JB. Cellular vacuoles induced by Mycoplasma pneumoniae CARDS toxin originate from Rab9-associated compartments[J]. PLoS One,2011,6(7):e22877.
- [6] 徐倩,杜洪印,喻文立,等. 雷帕霉素对大鼠肝脏冷缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 天津医科大学学报,2014,20(3):181-183.
- [7] Abogresha NM, Greish SM, Abdelaziz EZ, et al. Remote effect of kidney ischemia-reperfusion injury on pancreas: role of oxidative stress and mitochondrial apoptosis[J]. Arch Med Sci,2016,12(2):252-262.

(下转第 1063 页)

- [5] Khalifa MM, Sharaf RR, Aziz RK. Helicobacter pylori: a poor man's gut pathogen [J]. Gut Pathog, 2010, 2(1): 2.
- [6] Gasbarrini G, Racco S, Franceschi F, et al. Helicobacter pylori infection: from gastric to systemic disease [J]. Recenti Prog Med, 2010, 101(1): 27-33.
- [7] 刘兵荣, 肖瑾, 陈伟, 等. 幽门螺杆菌感染与脑梗死患者颈动脉粥样硬化斑块稳定性的关系 [J]. 中国脑血管病杂志, 2013, 10(5): 264-267.
- [8] Vizzardi E, Bonadei I, Piovaneli B, et al. Helicobacter pylori and ischemic heart disease [J]. Panminerva Med, 2011, 53(3): 193-202.
- [9] Akbas HS, Basyigit S, Suleymanlar I, et al. The assessment of carotid intima media thickness and serum paraoxonase-1 activity in Helicobacter pylori positive subjects [J]. Lipids Health Dis, 2010, 9: 92.
- [10] 李燕, 李玉东, 李纲, 等. 幽门螺杆菌感染对冠心病患者血清指标的影响 [J]. 中华医院感染学杂志, 2014, 24(3): 662-664.
- [11] Kattan OM, Kasravi FB, Elford EL, et al. Apolipoprotein E-mediated immune regulation in sepsis [J]. J Immunol, 2008, 181(2): 1399-1408.
- [12] Gen R, Demir M, Ataseven H. Effect of Helicobacter pylori eradication on insulin resistance, serum lipids and low-grade inflammation [J]. South Med J, 2010, 103(3): 190-196.
- [13] Polyzos SA, Kountouras J, Zavos C, et al. The association between Helicobacter pylori infection and insulin resistance: a systematic review [J]. Helicobacter, 2011, 16(2): 79-88.
- [14] Papamichael KX, Papaioannou G, Karga H, et al. Helicobacter pylori infection and endocrine disorders: is there a link? [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(22): 2701-2707.
- [15] 宋珏, 冉利梅, 华玉淑, 等. 幽门螺杆菌感染与体质量指数、血脂、尿酸的相关性分析 [J]. 中国临床保健杂志, 2015, 18(2): 160-163.
- [16] 刘玲梅, 罗雁, 刘会领, 等. 幽门螺杆菌感染对动脉粥样硬化的影响 [J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(9): 2072-2073, 2076.
- [17] 朱伟群, 张萍萍, 孙涛, 等. 幽门螺杆菌感染与动脉粥样硬化的关系及危险因素研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(15): 3460-3463.
- [18] 卢晓旭, 卢学锋, 邱敬涛, 等. Hp 感染与超声检测颈动脉粥样硬化程度和 MMP-9 及内脂素的相关性研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(22): 5141-5143.
- [19] 陈晶, 付娟, 刘娜, 等. 幽门螺杆菌感染对冠心病患者相关指标及颈动脉硬化的影响 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(13): 2972-2974.
- [20] Davì G, Neri M, Falco A, et al. Helicobacter pylori infection causes persistent platelet activation in vivo through enhanced lipid peroxidation [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005, 25(1): 246-251.

收稿日期: 2018-02-25 编辑: 王国品

(上接第 1059 页)

- [8] Zhu J, Lu T, Yue S, et al. Rapamycin protection of livers from ischemia and reperfusion injury is dependent on both autophagy induction and mammalian target of rapamycin complex 2-Akt activation [J]. Transplantation, 2015, 99(1): 48-55.
- [9] Li J, Li RJ, Lv GY, et al. The mechanisms and strategies to protect from hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19(11): 2036-2047.
- [10] Lunsford KE, Baird BJ, Sempowski GD, et al. Upregulation of IL-1 $\beta$ , IL-6, and CCL-2 by a novel mouse model of pancreatic ischemia-reperfusion injury [J]. Transplantation, 2013, 95(8): 1000.
- [11] 李航宇, 杨福全, 李岩, 等. 细胞外 HSP70/HSP70-PCs 通过 HIF-1 $\alpha$  影响肝癌细胞 HepG2 Glut1 与 VEGF 的表达 [J]. 世界华人消化杂志, 2013, 23(36): 4175-4179.
- [12] Semenza GL. HIF-1, O<sub>2</sub>, and the 3 PHDs: how animal cells signal hypoxia to the nucleus [J]. Cell, 2001, 107(1): 1-3.
- [13] 王昕. 雷帕霉素对再生障碍性贫血患者骨髓间充质干细胞生物学功能的影响 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.

收稿日期: 2018-03-02 编辑: 王国品