

征甚至死亡。(2)急性期肠管充血、水肿明显,肠吻合后发生肠液漏的机会较多;此外手术及麻醉本身对患者就是一次打击,术后有可能使病情加重,这一点对于年龄较大、一般情况较差患者尤为重要。(3)对于有明确剖腹探查指征而行手术者,术中除了切除已坏死及高度怀疑坏死的肠管外,应同时行肠系膜上静脉及门静脉取栓术。若肠管水肿明显,应尽量避免保留肠管断端一期吻合,可先行远近端肠管造口术,二期再行肠管还纳术。(4)术后患者应继续接受抗凝治疗以避免血栓复发或血栓范围进一步扩大。

参考文献

- [1] Acosta-Merida MA, Marchena-Gomez J, Hemmersbach-Miller M, et al. Identification of risk factors for perioperative mortality in acute mesenteric ischemia. *World J Surg*, 2006, 30 (8): 1579 -

1585.

- [2] Safioleas MC, Moulakakis KG, Papavassiliou VG, et al. Acute mesenteric ischaemia, a highly lethal disease with a devastating outcome. *Vasa*, 2006, 35 (2): 106 - 111.
- [3] 陈大伟, 崔龙, 全志伟, 等. 肠系膜上静脉血栓形成 11 例的诊治. *中华消化外科杂志*, 2008, 7 (3): 224 - 225.
- [4] Impérato M, Moujahid M, Mennecier D, et al. Acute superior mesenteric vein thrombosis. A retrospective study of 9 patients. *Ann Chir*, 2006, 131 (10): 595 - 600.
- [5] Abboud B, Jaoude JB, Sleilaty G, et al. Surgical treatment of mesenteric venous thrombosis. *Presse Med*, 2007, 36 (6 Pt 1): 878 - 880.
- [6] Grisham A, Lohr J, Guenther JM, et al. Deciphering mesenteric venous thrombosis: imaging and treatment. *Vasc Endovascular Surg*, 2005, 39 (6): 473 - 479.

(收稿日期: 2009-04-21)

(本文编辑: 毛蜀)

谷氨酰胺对入肝血流阻断后肠道细胞凋亡的影响

刘国平 朱闻溪 杨广顺 周文平 程广明

【摘要】 目的 探讨谷氨酰胺对入肝血流阻断后肠道细胞凋亡的影响。方法 将雄性 Wistar 大鼠分为 3 组:假手术组、对照组和实验组,每组 40 只。术前实验组大鼠连续 5 d 腹腔注射谷氨酰胺,对照组仅给予等量的生理盐水。对照组和实验组采用 Pringle 法阻断入肝血流,35 min 后开放;假手术组仅行麻醉、开腹。于阻断前及再灌注后 2、4、24 h 检测门静脉血浆内毒素水平,原位末端脱氧核苷酸转移酶法检测肠道细胞凋亡指数;RT-PCR 法检测肠组织中 Bcl-2 mRNA 的表达。采用方差分析,两两比较采用 LSD 法检验。结果 再灌注后 2、4、24 h,实验组内毒素水平及凋亡指数明显低于对照组 ($F = 144.96, 248.62, 268.50; 336.95, 131.81, 215.15, P < 0.05$);而实验组 Bcl-2 mRNA 表达水平显著高于对照组和假手术组 ($F = 7761.95, 2239.43, 1740.36, P < 0.05$)。结论 谷氨酰胺能够促进 Bcl-2 mRNA 表达,从而减轻肠道细胞凋亡,抑制肠源性内毒素易位。

【关键词】 入肝血流阻断; 谷氨酰胺; 肠道细胞凋亡

入肝血流阻断不但引起肝脏缺血再灌注损伤,还可造成肠道的淤血再灌注损伤,从而导致细胞及亚细胞形态结构的改变与破坏。为此,本研究将观察入肝血流阻断后肠道细胞凋亡的变化,以及谷氨酰胺对上述病理变化的影响,并探讨谷氨酰胺对凋亡抑制基因 Bcl-2 表达的影响。

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2010.01.025

作者单位: 110015 沈阳军区总医院肝胆外科(刘国平、周文平、程广明); 110001 沈阳,中国医科大学(朱闻溪); 200438 上海,第二军医大学东方肝胆外科医院(杨广顺)

1 材料与方法

1.1 实验分组及处理

雄性 Wistar 大鼠 120 只,体质量 300 ~ 350 g,按随机数字表法分为 3 组(每组 40 只):(1)假手术组;(2)对照组:生理盐水 4 ml 腹腔注射,每天 2 次,连续 5 d;(3)实验组:谷氨酰胺(300 $\mu\text{g/g}$,用生理盐水稀释至 4 ml)腹腔注射,每天 2 次,连续 5 d。术前禁食 12 h,自由饮水。所有动物均采用戊巴比妥钠(35 $\mu\text{g/g}$)腹腔内注射进行麻醉。对照组和实验组沿腹正中切口切开腹腔,显露第一肝门,采用 Pringle 法用无创血管夹阻断肝十二指肠韧带,持续 35 min 后,恢复血流。假手术组除麻醉、开腹外不做任何处理。分别于缺血前及再灌注后 2、4、24 h 选取 10 只大鼠,开腹后用无菌、无致热源的注射器取门静脉血 1 ml,置于无菌、无致热源装有 0.2 ml 肝素盐水(12 U/ml)的 EP 管内,3000 $\times g$ 离心 40 s,分离出血浆置于无热源 EP 管内, - 30 $^{\circ}\text{C}$ 保存待测。距屈氏韧带以远约 15 cm 处向近端切取约 5 cm 空肠段,用 0 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水冲洗干净,一部分肠组织置于 - 70 $^{\circ}\text{C}$ 中保存待测,剩余部分放入 4% 甲醛溶液固定。

1.2 主要仪器和试剂

L-谷氨酰胺购自上海康达氨基酸厂;内毒素检验试剂盒购自广东湛江海洋生物制品所;凋亡试剂盒购自武汉博士德公司;Trizol 总 RNA 提取试剂购自美国 Promega 公司;反转录试剂盒及 PCR 扩增所需的其他试剂购自 TaKaRa(大连)公司;电泳用聚丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)及琼脂糖等购自上海化工生物工程公司。大鼠 Bcl-2 引物参照 Genbank,由 TaKaRa(大连)公司合成,序列:扩增产物长度为 287 bp;上游:5'-CACCCCTGGCATCTTCTCCTTC-3';下游:5'-CACAATCCTCCCCAGTTCACC-3'。内参照 GAPDH 引物由 TaKaRa(大

连)公司合成,序列:扩增产物长度为 528 bp;上游:5'-ACCA-CCATGGAGAAGGCCG-3';下游:5'-CTCAGTGTAGCCCAGG-ATGC-3'。

1.3 检测方法

每组在各个时相点分别随机选取 5 只大鼠的肠标本,采用 RT-PCR 法检测肠组织中 Bcl-2 mRNA 的表达。采用 TUNEL 法检测细胞凋亡,每张切片随机取 5 个视野($\times 400$),计数阳性细胞数及每个视野细胞总数。内毒素采用反应时间法测定。

1.4 统计学分析

应用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,数据结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,两两比较采用 LSD 法检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

再灌注后各时相点,实验组内毒素水平、凋亡指数明显低于对照组;对照组、实验组则明显高于假手术组。见表 1,2。再灌注后 2、4、24 h,实验组 Bcl-2 mRNA 表达水平显著高于对照组和假手术组。见表 3。

表 1 大鼠门静脉血浆内毒素水平的变化($\bar{x} \pm s$, PU/L)

组别	只数	再灌注后内毒素水平			
		术前	2 h	4 h	24 h
假手术组	40	0.10 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.05	0.12 $\pm$ 0.05
实验组	40	0.11 $\pm$ 0.03	0.47 $\pm$ 0.06 ^a	0.77 $\pm$ 0.10 ^a	0.98 $\pm$ 0.10 ^a
对照组	40	0.12 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.35 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.58 $\pm$ 0.09 ^{ab}
F 值		0.30	144.96	248.62	268.50
P 值		>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$

表 2 大鼠肠道细胞凋亡指数的变化($\bar{x} \pm s$, %)

组别	只数	再灌注后细胞凋亡指数			
		术前	2 h	4 h	24 h
假手术组	40	1.12 $\pm$ 0.27	1.05 $\pm$ 0.26	2.89 $\pm$ 0.32	2.50 $\pm$ 0.33
实验组	40	2.32 $\pm$ 0.35	43.00 $\pm$ 3.45 ^a	48.96 $\pm$ 6.03 ^a	41.26 $\pm$ 3.29 ^a
对照组	40	2.25 $\pm$ 0.51	23.78 $\pm$ 2.77 ^{ab}	31.44 $\pm$ 5.00 ^{ab}	28.26 $\pm$ 4.03 ^{ab}
F 值		15.00	336.95	131.81	215.15
P 值		>0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$

表 3 大鼠肠组织中 Bcl-2 mRNA 表达的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	再灌注后 Bcl-2 mRNA 表达			
		术前	2 h	4 h	24 h
假手术组	40	—	—	—	—
实验组	40	—	1.05 $\pm$ 0.03 ^a	1.03 $\pm$ 0.01 ^a	0.85 $\pm$ 0.01 ^a
对照组	40	0.82 $\pm$ 0.01 ^{ab}	1.32 $\pm$ 0.01 ^{ab}	1.20 $\pm$ 0.05 ^{ab}	1.14 $\pm$ 0.05 ^{ab}
F 值		16808.06	7761.95	2239.43	1740.36
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:“—”为未测;与假手术组比较,^a $P < 0.05$;与对照组比较,^b $P < 0.05$

3 讨论

入肝血流阻断可造成肠道缺血再灌注损伤,与传统缺血再灌注损伤不同的是,它由静脉回流障碍所致,其病理生理改变可能更复杂。当小肠遭受缺血再灌注损伤时,凋亡是黏膜细胞死亡的主要方式^[1-3]。入肝血流阻断后肠道细胞凋亡可能与以下因素有关:(1)氧自由基损伤。研究显示入肝血流阻断可造成肠道过氧化损伤,而氧自由基使细胞膜流动性改变、通透性增加,酶及受体失活,促使细胞凋亡^[4]。(2)细菌及内毒素易位促进肠道细胞凋亡。(3)与细胞凋亡相关的基因和酶发生改变。

本研究通过预先给予谷氨酰胺,发现肠道细胞凋亡指数较对照组明显降低。这表明谷氨酰胺具有抑制入肝血流阻断后肠道细胞凋亡,保护肠道屏障的作用。我们进一步研究发现谷氨酰胺能显著上调肠组织 Bcl-2 mRNA 的表达,说明 Bcl-2 可能与谷氨酰胺抑制入肝血流阻断后肠道细胞凋亡的保护机制有关。

我们前期的研究发现谷氨酰胺具有增加肠道谷胱甘肽含量,减轻过氧化损伤的作用^[5]。由于 Bcl-2 多位于细胞的膜性结构,而膜性结构最易遭受过氧化损伤,因此我们推测谷氨酰胺具有稳定 Bcl-2 蛋白结构的作用。入肝血流阻断后 Bcl-2 表达增加,是一种机体代偿性反应,如果细胞膜性结构被大量破坏,Bcl-2 蛋白结构则不能维持,代偿性反应就会不充分;而给予谷氨酰胺,将减轻细胞膜性结构的破坏,有助于稳定膜上 Bcl-2 蛋白结构,促进这种代偿反应的发生。

综上所述,谷氨酰胺能够促进 Bcl-2 mRNA 表达,减轻肠道细胞凋亡,抑制肠源性内毒素易位。这对临床应用谷氨酰胺防治入肝血流阻断后肠源性内毒素血症及肝功能不全具有重要的实用价值和指导意义。

参考文献

- [1] Bertolotto PR, Fagundes DJ, De Jesus Simões M, et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on the rat intestinal mucosa apoptosis caused by ischemia-reperfusion injury. *Microsurgery*, 2007, 27(4):224-227.
- [2] Wang X, Takahashi N, Uramoto H, et al. Chloride channel inhibition prevents ROS-dependent apoptosis induced by ischemia-reperfusion in mouse cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem*, 2005, 16(4/6):147-154.
- [3] Wu B, Ootani A, Iwakiri R, et al. Ischemic preconditioning attenuates ischemia-reperfusion induced mucosal apoptosis by inhibiting the mitochondria-dependent pathway in rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286(4):G580-587.
- [4] 刘国平,朱闻溪,杨广顺,等.肝门阻断对肠道屏障相关因子的影响及其意义. *中国医师杂志*, 2007, 9(6):837-838.
- [5] 刘国平,朱闻溪,杨广顺,等.谷氨酰胺对肝门阻断后肠道损伤的影响及其意义. *中国现代普通外科进展*, 2007, 10(2):131-134.

(收稿日期:2009-06-20)

(本文编辑:毛蜀)