



热应激预处理对大鼠肢体缺血再灌注后血清丙二醛、超氧化物歧化酶的影响

肢体缺血再灌注损伤是骨科常见的病理过程，创伤、血栓栓塞、血栓形成、断肢再植、术中使用止血带时间过长、四肢大血管损伤、骨筋膜室综合征等疾病都可引起肢体缺血，超过一定的时间，就可导致肢体的缺血再灌注损伤。这种缺血再灌注损伤往往更进一步加重组织的损伤，严重者会导致肢体的缺血坏死，甚至危及生命。热应激预处理即预先给生物强烈热刺激致其发生热休克反应，提高组织细胞抗缺血、缺氧或毒物损害的能力。在肢体缺血再灌注过程中，氧自由基的大量形成和脂质过氧化的增加是细胞损伤的主要病理过程之一。丙二醛(MDA)是脂质过氧化反应的最终产物，测定MDA的含量可反映组织中自由基的含量和脂质过氧化程度。而超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内主要的抗氧化酶——超氧自由基清除剂。本试验通过SD大鼠热应激预处理模型和缺血再灌注模型，测定了血清中SOD和MDA在缺血1 h前及缺血4 h后再灌注不同阶段的含量变化，探讨其相互关系，为缺血后再灌注损伤的治疗提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组

取体质量200~250 g雄性SD大白鼠72只(由第一军医大学南方医院动物中心提供)，随机分为3组：(1)正常对照组；(2)缺血再灌注(ischemia reperfusion, IR)组，本组再分为4个时间段：缺血前1 h、缺血再灌注1、4和12 h组；(3)热应激预处理(heat stress pretreatment, HP)+缺血再灌注(IR)组。

1.2 缺血再灌注模型制备

参照Yokota, [1]的方法制备。用20%乌拉坦腹腔麻醉(1.5 g/kg·b.w.)。剃毛、消毒、铺巾、手术开腹，在近两髂总动脉分枝处以无创伤性血管夹夹闭右髂总动脉。肢体缺血4 h后，松开血管夹，分别于再灌注1、4和12 h后取材。

正常对照组按缺血再灌注模型制备步骤行手术操作，但不用血管夹夹闭血管。

1.3 热应激预处理模型的制备

参照Blake [2]模型制备。用20%乌拉坦腹腔麻醉(1.5 g/kg·b.w.)后，置于预先加热至42℃恒温烤箱内，并维持30 min后取出，室温下大鼠恢复6 h制取缺血再灌注模型。

1.4 样本制备及测定方法

麻醉状态下心脏取血2 ml，立即离心(3 000 r/min)15 min。取血清存入超低温冰箱待测。采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定MDA浓度，采用黄嘌呤氧化酶法测定SOD活力。

1.5 统计学处理

应用SPSS10.0软件，采用重复测量的方差分析处理数据。

2 结果

从表1可以看出, IR组的MDA含量显著高于正常对照组和HP+IR组($P<0.01$), HP+IR组的MDA含量显著高于正常对照组($P<0.01$), MDA含量随再灌注时间延长有不断升高的趋势; 从表2可以看出, IR组的SOD含量显著低于正常对照组和HP+IR组($P<0.01$), HP+IR组的SOD含量显著低于正常对照组($P<0.01$), SOD含量随再灌注时间延长有不断下降的趋势。

表 1 血清 MDA 浓度测定结果 (nmol/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab.1 Serum MDA level in the rats (nmol/ml, *Mean±SD*)

Group	1 h before IR	1 h after IR	4 h after IR	12 h after IR
Control	1.22±0.12	1.24±0.18	1.23±0.13	1.24±0.15
IR	1.23±0.14	5.14±0.31	9.27±0.72	12.38±1.03
HP+IR	1.07±0.28	4.02±0.44	7.24±0.62	9.02±0.46

IR: ischemia reperfusion group; HP+IR: heat stimulated pretreatment +IR group; MDA: Malondialdehyde

表 2 血清 SOD 活力测定结果(nU/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab.2 Activity of serum SOD in the rats (nU/ml, *Mean±SD*)

Group	1 h before IR	1 h after IR	4 h after IR	12 h after IR
Control	153.52±7.69	152.24±5.18	150.81±4.37	153.71±4.04
IR	152.34±6.56	124.97±4.26	97.35±6.23	82.67±4.69
HP+IR	157.76±6.06	141.45±3.32	114.61±5.74	102.34±5.28

SOD: Superoxide dismutase

3 讨论

肢体缺血再灌注损伤是骨科常见的病理过程, 肢体是一个复合组织, 包括皮肤、肌肉、骨骼、神经、血管、肌腱等组织, 其中骨骼肌代谢活跃, 对缺血反应最敏感。多数学者倾向于氧自由基是造成缺血再灌注损伤的重要因素。氧自由基具有高度活性和细胞毒性, 并通过脂质过氧化作用引起细胞损伤, 导致细胞内蛋白质和核酸碎裂、聚合及构象改变, 造成细胞不可逆损伤。在大鼠、兔、狗及猪的骨骼肌缺血再灌注实验中均发现氧自由基引起的微血管和肌细胞的损害。Lindsay [3] 在狗股薄肌经历 3~5 h 缺血和 5~180 min 再灌注后, 发现肌中脂质过氧化产物羟偶合二烯明显增加, 并引起微血管和细胞的进一步损害。MDA 和 SOD 是反映脂质过氧化程度的一对指标。MDA 为众多脂质过氧化产物的一种。测试 MDA 的含量可以反映脂质过氧化程度, 间接反映出细胞损伤程度。而 SOD 可以将超氧阴离子这一脂质过氧化的主要自由基歧化为过氧化氢和水, SOD 的测定可反映组织内自由基水平及脂质过氧化程度。动物实验证实, 应用氧自由基清除剂、抗氧化剂均能有效地减轻骨骼肌缺血再灌注损伤。SOD 是生物体内主要的抗氧化酶—超氧自由基清除剂。国外学者 [4] 通过狗股薄肌实验, 预先应用氧自由基清除剂 SOD, 使缺血再灌注损伤明显减轻。近年来研究表明, 热应激预处理能减轻脑、肝、肾、心脏等器官的缺血再灌注损伤。Donnelly [5] 对大鼠心肌及 Perdriozed 等 [6] 对大鼠肾脏的研究证明热应激预处理能增高大鼠心肌和肾脏对缺血再灌注损伤的耐受性。也有学者研究表明, 热应激预处理能减轻缺血再灌注对皮瓣的损伤 [7]。近年来, 研究发现热应激预处理可提高缺血细胞的抗损伤能力。应激预处理明显减少了

缺血再灌注心肌MDA的产生,增加了心肌SOD活性,表明应激对心肌缺血再灌注损伤的保护机制与心肌内源性抗氧化能力增强有关。高温预处理调动了内源性抗心肌缺血再灌注损伤的防御保护机制[5][8]。

本实验通过检测血清中MDA含量,间接反应细胞脂质过氧化损伤程度。结果发现,大鼠肢体缺血再灌注后血清中的MDA含量明显增高,并有随再灌时间延长不断升高的趋势,而SOD活性明显降低。表明再灌注后肢体发生脂质过氧化反应,产生的氧自由基引起肢体进一步的损伤。对SD大鼠进行热应激预处理后,血清中MDA含量明显降低,SOD活性明显增高。表明热应激预处理可减轻肢体的缺血再灌注损伤,增强SOD清除细胞内氧自由基的水平。

目前,热应激预处理能够提高机体细胞对缺血再灌注损伤的抵抗力,但其作用机制还不十分清楚。我们认为,热应激预处理的保护机制主要有3种途径:(1)热应激预处理后,诱导组织内源性SOD增加,随后其活性增高,加速对缺血再灌注过程中产生的氧自由基清除,减少脂质过氧化产物MDA的产生,从而减轻组织的缺血再灌注损伤。动物试验证实,SOD对骨骼肌的缺血再灌注损伤有保护作用[9][10]。(2)热应激预处理后诱导产生热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs),HSPs本身具有抗氧自由基的作用。同时,HSPs促进缺血再灌注后细胞内变性、损伤的蛋白质修复或加速其降解和清除,使细胞得以维持自稳态。研究表明,细胞表达HSP70即可减少细胞内自由基水平,增加抗氧化剂还原型谷胱甘肽的含量。Wong等[11]发现,热预处理诱导表达的HSP70能明显抑制脂多糖所致的肺病动脉内皮细胞凋亡,HSP70基因转染方法也证实了该结果。同时也发现,HSP70的表达能明显减少脂多糖刺激细胞产生的氧自由基。已知HSP70能抑制烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶的活性,NADPH氧化酶参与产生氧自由基的关键性反应,因此HSP70通过反馈作用减少氧自由基的产生。HSP70可以阻止活性氧族(reaction oxygen species, ROS)导致的骨骼肌细胞损伤、坏死或凋亡。Yamagami等[12]发现HSP70能抑制氧自由基、脂质过氧化物的产生,增强细胞耐受力。另一报道发现HSP70能促进机体内源性抗氧化物触酶的产生,同时可通过抑制氧自由基关键酶,即NADPH氧化酶,从而减少ROS产生等[13]。(3)HSPs可保护SOD等细胞自由基酶免受损伤,同时使SOD的活性增加。

(责任编辑:吴锦雅)

参考文献:

- [1]Yokota J, Minei JP, Fantini GA, et al. Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia[J]. *Am J Physiol*, 1989, 257(4Pt2): 1068-75.
- [2]Blake MJ, Gershon D, Fargnoli J, et al. Discordant expression of heat shock protein mRNAs in tissues of heat-stressed rats[J]. *J Biol Chem*, 1990, 265(25): 15275-9.
- [3]Lindsay T, Walker PM, Mickle DAG, et al. Measurement of hydroxy-conjugated dienes after ischemia reperfusion in canine skeletal muscle[J]. *Am J Physiol*, 1988, 254(3pt2): H578-83.
- [4]Korthuis RJ, Granger DN, Townsloy MI, et al. The role of oxygen derived free radicals in ischemia induced injury in canine skeletal muscle vascular permeability[J]. *Circ Res*, 1985, 57: 599-609.
- [5]Donnelly TJ, Sievers RE, Vissern FL, et al. Heat shock protein induction in heat: A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion[J]? *Circulation*, 1992, 85(2): 769-78.
- [6]Perdrizet GA, Heffron TG, Buckingham FC, et al. Stress condition, a novel approach to organ preservation[J]. *Curr Surg*, 1989, 46(1):23-6.
- [7]吴建明, 林子豪, 刘麒, 等. 热应激预处理对皮瓣缺血再灌注损伤的影响及机制[J]. *中华整形外科杂志*, 1999, 15(5), 351-3. Wu JM, Lin ZH, Liu Q, et al. Effect of heat shock pretreatment on the survival of island flaps in rats[J]. *Chin J Plast Surg Burns*, 1999, 15(5), 351-3.
- [8]曹雪梅, 傅春景, 高晓群, 等. 高温预处理防止大鼠心肌缺血再灌注损伤的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2000, 17(3): 284.
- [9]Mehta JL, Chen H, Li D, et al. Modulation of myocardial SOD and iNOS during

ischemia-reperfusion by antisense directed at ACE mRNA[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(12): 2259-68.

[10]Bor MV, Durmus O, Carmus B, et al. An alternative parameter for monitoring the therapeutic benefits of allopurinol simultaneously in renal ischaemia-reperfusion injury: MDA/ATP Ratio[J]. Cell Biochem Funct, 2000, 18(4): 229-34.

[11]Wong HR. Heat shock proteins. Facts, thoughts and dreams[J]. Shock, 1999, 12(4): 323-5.

[12]Yamagami K, Yamamoto Y, Kume M, et al. Heat shock preconditioning ameliorates liver injury following normothermic ischemia reperfusion in steatotic rat liver[J]. J Surg Res, 1998, 79(1): 47-53.

[13]Yamamoto Y, Kume M, Yamaoka Y, et al. Implications of heat shock proteins during liver surgery and liver perfusion[J]. Recent Results Cancer Res, 1998, 147: 157-72.

参考文献:

[1]Yokota J, Minei JP, Fantini GA, et al. Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia[J]. Am J Physiol, 1989, 257(4Pt2): 1068-75.

[2]Blake MJ, Gershon D, Fargnoli J, et al. Discordant expression of heat shock protein mRNAs in tissues of heat-stressed rats[J]. J Biol Chem, 1990, 265(25): 15275-9.

[3]Lindsay T, Walker PM, Mickle DAG, et al. Measurement of hydroxy-conjugated dienes after ischemia reperfusion in canine skeletal muscle[J]. Am J Physiol, 1988, 254(3pt2): H578-83.

[4]Korthuis RJ, Granger DN, Townsloy MI, et al. The role of oxygen derived free radicals in ischemia induced injury in canine skeletal muscle vascular permeability[J]. Circ Res, 1985, 57: 599-609.

[5]Donnelly TJ, Sievers RE, Vissern FL, et al. Heat shock protein induction in heat: A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion[J]? Circulation, 1992, 85(2): 769-78.

[6]Perdrizet GA, Heffron TG, Buckingham FC, et al. Stress condition, a novel approach to organ preservation[J]. Curr Surg, 1989, 46(1):23-6.

[7]吴建明, 林子豪, 刘麒, 等. 热应激预处理对皮瓣缺血再灌注损伤的影响及机制[J]. 中华整形外科杂志, 1999, 15(5), 351-3. Wu JM, Lin ZH, Liu Q, et al. Effect of heat shock pretreatment on the survival of island flaps in rats[J]. Chin J Plast Surg Burns, 1999, 15(5), 351-3.

[8]曹雪梅, 傅春景, 高晓群, 等. 高温预处理防止大鼠心肌缺血再灌注损伤的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2000, 17(3): 284.

[9]Mehta JL, Chen H, Li D, et al. Modulation of myocardial SOD and iNOS during ischemia-reperfusion by antisense directed at ACE mRNA[J]. J Mol Cell Cardiol, 2000, 32(12): 2259-68.

[10]Bor MV, Durmus O, Carmus B, et al. An alternative parameter for monitoring the therapeutic benefits of allopurinol simultaneously in renal ischaemia-reperfusion injury: MDA/ATP Ratio[J]. Cell Biochem Funct, 2000, 18(4): 229-34.

[11]Wong HR. Heat shock proteins. Facts, thoughts and dreams[J]. Shock, 1999, 12(4): 323-5.

[12]Yamagami K, Yamamoto Y, Kume M, et al. Heat shock preconditioning ameliorates liver injury following normothermic ischemia reperfusion in steatotic rat liver[J]. J Surg Res, 1998, 79(1): 47-53.

[13]Yamamoto Y, Kume M, Yamaoka Y, et al. Implications of heat shock proteins during liver surgery and liver perfusion[J]. Recent Results Cancer Res, 1998, 147: 157-72.

[回结果列表](#)