

# 热应激预处理对大鼠肢体缺血再灌注后血清丙二醛尧超氧化物歧化酶的影响

孙永建<sup>袁正前袁国献袁邦磊袁潭雄进</sup>第一军医大学南方医院创伤骨科<sup>广东广州510515</sup>

**摘要** 目的 探讨热应激预处理对大鼠肢体缺血再灌注损伤的影响。方法 制备大鼠缺血再灌注模型及热应激预处理模型。采用硫代巴比妥酸法测定大鼠丙二醛(MDA)浓度。采用黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶(SOD)活力并与对照组比较。结果 大鼠肢体缺血再灌注后血清中的MDA含量明显增高( $P<0.01$ )并有随再灌时间延长不断升高的趋势。而SOD活力明显降低( $P<0.01$ )。热应激预处理后血清中MDA含量明显降低( $P<0.01$ )，SOD活力明显增高( $P<0.01$ )。

**结论** 热应激预处理可增强SOD清除细胞内氧自由基的水平。

**关键词** 热应激预处理；缺血再灌注；超氧化物歧化酶；丙二醛

中图分类号 R619.9; R345.49; R594.1 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2002)06-0506-03

## Changes of serum MDA and SOD levels in ischemia-reperfusion injuries of the limbs in rats preconditioned with heat stress

SUN Yong-jian, WANG Qian, PEI Guo-xian, ZHENG Lei, TAN Xiong-jin

Department of Orthopedics and Traumatology, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

**Abstract:** Objective To study the effect of pretreatment with heat stress on ischemia-reperfusion injuries of the limbs in rats. Methods Rat models of ischemia-reperfusion injury were established with or without prior heat stress treatment, in which serum malondialdehyde (MDA) levels and superoxide dismutase (SOD) activities were measured by means of thiobarbituric acid and nitroblue tetrazolium respectively. Results Comparison between ischemia-reperfusion group and the control group revealed significantly elevated MDA levels ( $P<0.01$ ) and depressed SOD activities ( $P<0.01$ ) in the condition of ischemia-reperfusion injury. Pretreatment with heat stress, however, significantly lowered the elevated MDA levels ( $P<0.01$ ) and enhanced SOD activities ( $P<0.01$ ) during ischemia-reperfusion injury. Conclusion Pretreatment with heat stress can enhance the activity of SOD to remove free oxygen radicals in the cells.

**Key words:** heat stress; ischemia-reperfusion; superoxide dismutase; malondialdehyde

肢体缺血再灌注损伤是骨科常见的病理过程。创伤、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、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。在肢体缺血再灌流过程中，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，为缺血后再灌流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缺血再灌注组(ischemia-reperfusion, IR组)；③热应激预处理组(heat stress pretreatment, HP组)。

#### 1.2 缺血再灌注模型制备

参照Yokota<sup>等</sup>的方法制备。用20%乌拉坦腹腔麻醉(1.5 g/kg, i.p.)，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

收稿日期 2001-12-28

基金项目 五项卫生医药基金(98D36)

作者简介 孙永建(1971-)，男，山东临沂人，第一军医大学南方医院创伤骨科在读硕士研究生，主治医师，电话：020-85141114-87201

脉络肢体缺血 4 h 后公开血管夹分别于再灌注 1 小时和 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<sup>等</sup>模型制备，选用 20% 乌拉坦腹腔麻醉 (1.5 g/kg, i.v.) 后置于预先加热至 42 ℃ 恒温烤箱内维持 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 1000 r/min，5 min，血清存入超低温冰箱待测。采用硫代巴比妥酸法测定 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 R 组的 MDA 含量显著高于正常对照组和 HP+IR 组 ( $P < 0.01$ )。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 $\bar{x} \pm s$ )				
Group	1h before IR	1h after IR	4h after IR	12h 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 ± 0.03
HP+IR	1.07 ± 0.28	4.02 ± 0.44	7.24 ± 0.62	9.02 ± 0.46

IR: ischemia reperfusion group; HP+IR: heatstimulated 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 $\bar{x} \pm s$ )				
Group	1h before IR	1h after IR	4h after IR	12h after IR
Control	153.52 ± 0.69	152.24 ± 0.18	150.81 ± 0.37	153.71 ± 0.04
IR	152.34 ± 0.56	124.97 ± 0.26	97.35 ± 0.23	82.67 ± 0.69
HP+IR	157.76 ± 0.06	141.45 ± 0.32	114.61 ± 0.74	102.34 ± 0.28

SOD: Superoxidedismutase

## 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，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，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<sup>等</sup>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，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，通过测试 MDA 的含量可以反映脂质过氧化程度。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。OD 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或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<sup>等</sup>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、肺、心脏等器官的缺血再灌注损伤。Donnelly<sup>等</sup>对大鼠心肌及 Perdrized<sup>等</sup>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。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。热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 活力，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。

本实验通过检测血清中 MDA 含量，间接反映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，并有随再灌注时间延长不断升高的趋势。而 SOD 活力明显降低，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，OD 活力明显增高，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。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，随后其活力增高，从而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。②动物试验证实，OD 对

骨骼肌的缺血再灌注损伤有保护作用。通过热应激预处理后诱导产生热休克蛋白 (heatshockproteins, 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 (ADPH) 氧化酶的活性。ADPH 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。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 NADPH 氧化酶，而减少 ROS 产生。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。

## 参考文献院

1. Yokota J, Minei JP, Fantini GA, et al. Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia. Am J Physiol, 1989, 257(4 Pt 2):1068-75.  
 2. Blake MJ, Gershon D, Farnoli J, et al. Discordant expression of heatshock protein mRNAs in tissues of heat-stressed rats. Biol Chem, 1990, 265(25):15275-9.

3. Lindsay T, Walker PM, Mickle DAG, et al. Measurement of hydroxyconjugated dienes after ischemia/reperfusion in canine skeletal muscle. Am J Physiol, 1988, 254(3 Pt 2):H578-83.  
 4. Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, et al. The role of oxygen derived free radicals in ischemia-induced injury in canine skeletal muscle: vascular permeability. Circ Res, 1985, 57:599-609.  
 5. Donnelly TJ, Sievers RE, Vissers FL, et al. Heatshock protein induction in heat: A role for improved myocardial salvage after ischemia and reperfusion. Circulation, 1992, 85(2):769-78.  
 6. Perdrizet GA, Heffron TG, Buckingham FC, et al. Stress condition, a novel approach to organ preservation. 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. 中华整形外科杂志, 1999, 15(5):351-3.  
 8. Wu JM, Lin ZH, Liu Q, et al. Effect of heatshock pretreatment on the survival of island flaps in rats. Chin J Plast Surg Burns, 1999, 15(5):351-3.  
 9. 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. 中华实验外科杂志, 2000, 17(3):284.  
 10. Mehta JL, Chen H, Li D, et al. Modulation of myocardial SOD and iNOS during ischemia-reperfusion by antisense directed at ACE mRNA. Mol Cell Cardiol, 2000, 32(12):2259-68.  
 11. Bor MV, Durmus O, Carmus B, et al. An alternative parameter for monitoring the therapeutic benefit of allopurinol simultaneously in renal ischaemia-reperfusion injury: MDA/ATP Ratio. Cell Biochem Funct, 2000, 18(4):229-34.  
 12. Wong HR. Heatshock proteins. Facts, thoughts and dreams. Shock, 1999, 12(4):323-5.  
 13. Yamagami K, Yamamoto Y, Kume M, et al. Heatshock preconditioning ameliorates liver injury following normothermic ischemia-reperfusion in the rat liver. Surg Res, 1998, 79(1):47-53.  
 14. Yamamoto Y, Kume M, Yamaoka Y, et al. Implications of heat shock proteins during liver surgery and liver perfusion. Recent Results Cancer Res, 1998, 147:157-72.

(责任编辑：侯锦雅)

## 医学搜索引擎 Medical Matrix 介绍

MedicalMatrix 由美国医学信息学会主办，其网址为 <http://www.medmatrix.org/Index.asp>。它是目前最重要的医学专业搜索引擎。它是一个可免费进入的 Internet 临床医学数据库，提供了关键词搜索和分类目录搜索。适合临床医师使用。分类目录搜索是它的主要特色。各种医学信息分为专业、疾病种类、临床应用、文献、教育、健康和职业、医学计算机和 Internet 技术、市场等 8 大类。每一大类下再根据内容的性质分为新闻、全文和多媒体、fullText/MultiMedia、摘要、abstracts、参考书、extbooks、主要网址、MajorSites/HomePages、操作手册、procedures、实用指南、practiceGuidelines/FAQS、病例、cases、影像学和病理切片、images、患者教育、patientEducation、教育资源、educationalMaterials 等亚类。对每一内容均有简明扼要的评论，并对链接的网址按一到五个星进行分级。

MedicalMatrix 收集的内容专业、全面，而且对每一内容有评论和分级。便于使用者事先决定是否进入其网页进一步阅读。节省时间。这一点对我国的使用者尤为有用。MedicalMatrix 是首选的医学专业搜索引擎。使用方法与其它 Internet 信息检索工具的使用方法基本相同。有分类检索和关键词检索两种检索方式。它的特点是提供免费 MailingLists。只要订阅了它的 Mailing Lists，即可定期收到网上新增医学节点的通知。