

# 异氟醚预处理对大鼠肠缺血再灌注后肠损伤的影响

柳垂亮<sup>1,4</sup>, 李向宇<sup>2</sup>, 程志芳<sup>3</sup>, 黄洋<sup>1</sup>, 曾维安<sup>1\*</sup> (1. 华南肿瘤学国家重点实验室, 中山大学肿瘤防治中心麻醉科, 广州 510060; 2. 广东省中医院麻醉科, 广州 510120; 3. 河南中医院第一附属医院麻醉科, 郑州 450000; 4. 禅城区中心医院麻醉科, 广东 佛山 528031)

**摘要:**目的 研究不同浓度的异氟醚预处理对大鼠肠缺血再灌注损伤的影响, 并初步探讨其作用机制。方法 成年雄性 SD 大鼠 60 只, 按照随机分层区组设计分为 5 组 ( $n=12$ ): 肠缺血再灌注组 (缺血再灌注损伤组): 暴露腹腔后夹闭肠系膜上动脉 1 h 后开放再灌注 2 h; 0.25 肺泡最低有效浓度、0.5 肺泡最低有效浓度、1.0 肺泡最低有效浓度异氟醚预处理 30 min 组 (即 0.25 M 组、0.5 M 组和 1.0 M 组); 在暴露腹腔前预吸入相应浓度的异氟醚 30 min, 再行肠缺血再灌注; 假手术组: 仅暴露腹腔, 不行异氟醚预处理及肠系膜上动脉夹闭。颈动脉插管监测平均动脉压。在再灌注 2 h 时采血检测血浆超氧化物歧化酶活力、丙二醛和肿瘤坏死因子  $\alpha$  含量; 取小肠组织行组织切片 HE 染色, 在光镜下观察其结构病理变化程度及改良 Chiu's 评分, 并用免疫组化染色法和 Western blot 方法检测肠组织 Caspase-3 活化表达情况。**结果** 与缺血再灌注损伤组比, 0.5 M 组、1.0 M 组的病理评分值显著性减低 ( $P<0.01$ ), 而 0.25 M 组无显著差异 ( $P>0.05$ )。在再灌注期, 缺血再灌注损伤组的平均动脉压随时间延长呈明显下降趋势, 显著低于假手术组 ( $P<0.05$ ), 而异氟醚预处理能明显减缓平均动脉压下降 ( $P<0.01$ )。0.5 M 组、1.0 M 组较缺血再灌注损伤组的超氧化物歧化酶活力显著性增高, 而丙二醛水平减低 ( $P<0.01$ )。与缺血再灌注损伤组相比, 1.0 M 组、0.25 M 组的肿瘤坏死因子  $\alpha$  含量无显著性差异 ( $P>0.05$ ), 而 0.5 M 组较缺血再灌注损伤组显著性降低 ( $P<0.01$ )。0.5 M 组、1.0 M 组的 caspase-3 蛋白表达量较 0.25 M 组和缺血再灌注损伤组明显减少 ( $P<0.05$ )。**结论** 0.5 M 与 1.0 M 异氟醚预处理均能相似地减轻缺血再灌注后的肠黏膜结构的病理改变, 并可减缓再灌注期的低血压, 其保护效应可能与提高超氧化物歧化酶活性、减少丙二醛生成、下调肿瘤坏死因子  $\alpha$  生成的炎症反应级联效应以及抑制细胞凋亡有关。

**关键词:** 异氟醚; 肠缺血再灌注损伤; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 肿瘤坏死因子; 半胱天冬酶-3

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2012)21-1711-05

## Effect of Isoflurane Preconditioning on Gut Injury following Intestinal Ischemia-Reperfusion in Rats

LIU Chui-liang<sup>1,4</sup>, LI Xiang-yu<sup>2</sup>, CHEN Zhi-fang<sup>3</sup>, HUANG Yang<sup>1</sup>, ZENG Wei-an<sup>1\*</sup> (1. Department of Anaesthesia, Sun Yat-sen University Cancer Center, State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, China; 2. Department of Anaesthesia, Guangdong Provincial TCM Hospital, Guangzhou 510120, China; 3. Department of Anaesthesia, The First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000, China; 4. Department of Anaesthesia, Chancheng Central Hospital, Foshan 528031, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To observe the effect of isoflurane of different concentrations on the intestinal ischemia-reperfusion injury (IRI) in rats, and to preliminarily investigate its mechanism. **METHODS** Sixty adult male SD rats (200–220 g) were randomly divided into five groups ( $n=12$  in each group): sham operation group (sham group), intestinal ischemia-reperfusion group (IRI group), and isoflurane precondition for 30 min groups (0.25 M group, 0.5 M group, 1.0 M group). Carotid artery was cannulated for mean arterial blood pressure (MAP) monitoring every 30 min during the experiment. Two hours after reperfusion, 3 mL of blood were collected from the inferior cava, which was centrifugated to test the activity of SOD, the contents of MDA and TNF- $\alpha$ . And a strip of small intestine was taken from the distal end of ileum for preparation of pathology HE staining sections which were observed for the structural damage under microscope and quantitatively assessed the damage degree by improved Chiu's scale. Meanwhile, the expression of protein caspase-3 was analyzed by immunohistochemical and Western Blot methods. **RESULTS** Compared with IRI, the MAP of isoflurane APC group was significantly improved. The improved Chiu's scales in 0.5 M group and 1.0 M group were obviously lower than that in IRI group, but there was no significant difference between 0.25 M group and IRI group ( $P>0.05$ ). The plasma SOD activity in IRI group was lower than sham group ( $P<0.01$ ). But that in 0.5 M group and 1.0 M group was significant higher compared with IRI group ( $P<0.01$ ). Compared with IRI group, the plasma SOD activity was obviously lower in isoflurane precondition group ( $P<0.01$ ). Compared to IRI group, TNF- $\alpha$  content in 1.0 M and 0.25 M groups had no significant difference ( $P>0.05$ ), but signif-

**基金项目:** 广东省自然科学基金资助项目 (8151040701000062)

**作者简介:** 柳垂亮, 男, 博士研究生 研究方向: 重要脏器功能保护 \* **通讯作者:** 曾维安, 男, 教授, 博士生导师 研究方向: 麻醉药与肿瘤 Tel: (020) 87765368 E-mail: zengwa@sysu.edu.cn

ificantly decreased in 0.5M group ( $P < 0.01$ ). Compared with IRI group and 0.25M group, the protein expression of Caspase-3 in 0.5M group and 1.0M group was reduced significantly ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION** Isoflurane preconditioning at 0.5MAC and 1.0MAC for 30 min can similarly protect against the intestinal IRI, but 0.25MAC isoflurane has little protective effect. The protective effect of isoflurane against acute intestinal IRI is probably by improving the activity of SOD, reducing the lipid peroxidation, and inhibiting the cell apoptosis and TNF- $\alpha$ -induced inflammation cascade.

**KEY WORDS:** isoflurane; intestinal ischemia-reperfusion injury; superoxide dismutase; malondialdehyde; tumor necrosis factor; caspase-3

近年研究发现,临床常用吸入麻醉药可诱导与缺血预处理(ischemia-induced preconditioning, IPC)相同的心肌保护效应,称为麻醉药诱导的预处理效应(anesthetic-induced preconditioning, APC)<sup>[1-4]</sup>。吸入麻醉药异氟醚对心、脑、脊髓、肺、肝、肾等多个器官缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)均有明显的保护作用<sup>[5-6]</sup>,其抗损伤的机制为多途径,具有无创伤,不加重组织缺血损害,不增加发生血栓的风险,同时具有便于实施等优点<sup>[1-2]</sup>,为临床上脏器 IRI 的预防和治疗开辟一条新途径。但目前尚无研究报道异氟醚是否也有抗肠 IRI 损伤的作用。本实验拟观察不同浓度的异氟醚预处理对大鼠肠 IRI 的影响,寻找异氟醚发生保护作用的合适浓度,并初步探讨其作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物及分组

SPF 级 SD 雄性大鼠 60 只,体质量 200 ~ 220 g [广东省实验动物中心,许可证号:SCXK(粤)2008-0002,生产批号:0065798、0066473],按随机分层区组设计分为 5 组( $n = 12$ ):假手术组,肠缺血再灌注组(IRI 组),1.0 肺泡最低有效浓度(minimum alveolar concentration, MAC),1.0MAC 异氟醚的体积分数为 1.15%)异氟醚预处理组(1.0M 组)、0.5MAC 异氟醚预处理组(0.5M 组)、0.25MAC 异氟醚预处理组(0.25M 组)。

### 1.2 动物模型制作及麻醉处理

动物实验室为广东省中医药研究院 SPF 级动物室。手术前禁食 12 h,自由饮水。腹腔注射 20% 乌拉坦( $0.06 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ )麻醉后,保持自主呼吸,参照笔者以往研究报道的方法<sup>[7]</sup>,复制缺血 1 h 及再灌注 2 h 的肠 IRI 模型。

动物开腹前 30 min 放置于自制密闭的麻醉箱中,0.25M 组、0.5M 组及 1.0M 组使用相应浓度的异氟醚(批号 8670828,美国雅培制药有限公司),由 30% 氧气和氮气混合气体输送通过该麻醉箱行 APC

30 min,假手术组和 IRI 组仅使用湿化的 30% 氧气混合气体。Utima 气体监测仪检测及调节麻醉箱内异氟醚浓度(MAC 值)、 $\text{O}_2$  和  $\text{CO}_2$  浓度。

### 1.3 生理指标监测

每组 3 只大鼠,右颈总动脉置管连接压力传感器,通过 Biolap 98 智能型生物信号显示处理系统连续监测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP),每次记录监测波形持续 30 s,取其平均值作为该时间点的测量值,记录时间点:手术前(基础值 T0)、吸入 30 min (T1)、夹闭 30 min (T2)、夹闭 60 min (T3)、再灌注 30 min (T4)、再灌注 60 min (T5)、再灌注 90 min (T6)、再灌注 120 min (T7)。

0.25M 组、0.5M 组、1.0M 组及假手术组在异氟醚吸入前(基础值)和吸入 30 min 时,抽取颈动脉血用便携式血气分析仪(美国 i-STAT)检测 pH、 $\text{PaO}_2$  和  $\text{PaCO}_2$ 。实验期间各组大鼠均吸入 30% 氧气混合气体。

### 1.4 血浆 MDA、SOD 和肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 水平检测

每组另外 9 只大鼠再灌注 2 h 时迅速抽取肝下腔静脉血 3 mL,经离心后取上清液,分半放入两 1.5 mL EP 管,  $-80^\circ\text{C}$  冰箱保存。采用比色法检测血浆丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)活力(分别由碧云天生物技术和南京建成生物工程研究所提供试剂盒),Elisa 法检测血浆 TNF- $\alpha$  水平(美国 Pierce 公司)。

### 1.5 小肠组织病理学观测

再灌注 2 h 时迅速开腹,在回盲部前 10 cm 剪取两份小肠组织,用冷生理盐水洗净,滤纸吸干。一份肠组织放入 4% 多聚甲醛液固定后行常规石蜡包埋、4  $\mu\text{m}$  厚切片,用于 HE 染色及 caspase-3 免疫组织化学染色;另一份肠组织放入 1.8 mL 冻存管于液氮罐保存用于 Western blot 检测 caspase-3 蛋白表达。

HE 染色切片在 100 倍、200 倍、400 倍光镜下观察肠组织结构的变化,彩色图像摄录输入仪拍照。由一位广东省动物中心动物病理学专家依据改良 Chiu's 评分方法<sup>[7]</sup>,任选 5 个非重叠视野观察小肠组织损伤

程度并评分,取其平均值用于统计。

1.6 Caspase-3 蛋白的激活水平检测

分别用免疫组织化学染色法和 Western blot 方法检测肠组织 caspase-3 活化表达。前者在 100、200 及 400 倍光学显微镜下定性分析每组 caspase-3 阳性表达情况,并以彩色图像摄录输入仪拍照。后者使用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统采集转膜后的 caspase-3 显影胶片图像,采用 Quantity One 图像分析系统采集灰度值(A),经与内参  $\beta$ -actin 的 A 值校正误差后得到蛋白的相对表达量。

1.7 统计学处理

所有数据采用 SPSS16.0 for windows 统计软件和 Microsoft Excel 2000 自带统计软件进行统计学处理。计量资料以均数  $\pm$  标准差表示,动脉血压、血气数据采用重复测量方差分析方法进行检验,其余参数组间比较使用单因素方差分析(ANOVA),两两比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

各组大鼠体重及实验室温度均无显著性差异( $P > 0.05$ )。术中均存活,麻醉效果满意。IRI 组及各异氟醚预处理组的大鼠肠缺血再灌注 2 h 时肠壁明显水肿,呈不同程度紫黑色。

2.2 MAP 及动脉血气的变化

在缺血期各组大鼠 MAP 基本保持平稳,而在再灌注期(T4 ~ T7),IRI 组的 MAP 随时间延长呈明显下降趋势,与假手术组同时间点相比,有统计学差异( $P < 0.05$ );各异氟醚预处理组与 IRI 组相比有显著性差异( $P < 0.01$ ),但与假手术组比较仍呈降低趋势,见表 1。

各组大鼠动脉血 pH、PaCO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub> 在吸入前无统计学差异( $P > 0.05$ )。而在吸入 30 min 时,与假手术组同时间点相比,0.5M 组、1.0M 组的 pH 和 PaO<sub>2</sub> 下降、PaCO<sub>2</sub> 升高( $P < 0.05$ ),并且 1.0M 组较 0.5M 组变化幅度更明显( $P < 0.05$ ),见表 2。

2.3 肠组织病理损伤程度的比较

假手术组:正常绒毛和腺体未见明显病变,见图 1A。IRI 组:上皮与固有层分离,绒毛脱落明显,毛细血管扩张,固有层绒毛脱落,腺体受损明显;固有层开始消化、分解,部分出现了溃疡及出血,见图 1B。0.25M 组:绒毛脱落明显,毛细血管扩张;部分固有层绒毛脱落,腺体受损。0.5M 组:上皮 Gruenhagen's 腔开始形成,出现上皮间隙过大,毛细血管充血部分上皮与固有层轻度分离,腺体受损较轻,见图 1C。1.0M 组:上皮与固有层中度分离,腺体受损,部分顶部绒毛脱落,尚未见明显毛细血管扩张。

假手术组的肠组织病理评分与其他各组比较,

表 1 异氟醚预处理对大鼠在肠缺血再灌注期间的 MAP 的变化趋势的影响 . mmHg,  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab.1 Changes of MAP in different groups during I/R. mmHg,  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	Isoflurane	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Sham	OMAC	111.5 $\pm$ 9.2	111.4 $\pm$ 8.8	97.2 $\pm$ 6.7	89.0 $\pm$ 4.8	88.2 $\pm$ 1.6	83.4 $\pm$ 6.8	77.2 $\pm$ 4.8	73.0 $\pm$ 3.9
IRI	OMAC	108.8 $\pm$ 5.5	99.3 $\pm$ 7.9	78.6 $\pm$ 4.8 <sup>1)</sup>	71.5 $\pm$ 1.8 <sup>1)</sup>	60.8 $\pm$ 2.9 <sup>1)</sup>	58.6 $\pm$ 3.8 <sup>1)</sup>	65.2 $\pm$ 5.2 <sup>1)</sup>	49.6 $\pm$ 6.6 <sup>1)</sup>
0.25M	0.25MAC	110.2 $\pm$ 5.7	106.7 $\pm$ 3.0	86.8 $\pm$ 11.4 <sup>1)</sup>	79.6 $\pm$ 7.5 <sup>1)2)</sup>	69.1 $\pm$ 4.2 <sup>1)2)</sup>	64.1 $\pm$ 3.0 <sup>1)2)</sup>	66.5 $\pm$ 5.4 <sup>1)</sup>	59.3 $\pm$ 3.4 <sup>1)2)</sup>
0.5M	0.5MAC	106.7 $\pm$ 4.1	97.6 $\pm$ 1.5	80.8 $\pm$ 6.3 <sup>1)</sup>	78.1 $\pm$ 1.0 <sup>1)2)</sup>	75.5 $\pm$ 9.3 <sup>1)2)</sup>	62.0 $\pm$ 2.1 <sup>1)2)</sup>	59.2 $\pm$ 8.0 <sup>1)</sup>	59.1 $\pm$ 6.7 <sup>1)2)</sup>
1.0M	1.0MAC	112.2 $\pm$ 7.1	82.8 $\pm$ 0.8	76.1 $\pm$ 10.6 <sup>1)</sup>	75.6 $\pm$ 5.4 <sup>1)2)</sup>	68.5 $\pm$ 2.1 <sup>1)2)</sup>	64.2 $\pm$ 1.3 <sup>1)2)</sup>	60.4 $\pm$ 4.5 <sup>1)</sup>	59.2 $\pm$ 1.3 <sup>1)</sup>

注:与假手术组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与 IRI 组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$

Note:compared with sham group,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;compared with IRI group,<sup>2)</sup> $P < 0.05$

表 2 异氟醚预处理对大鼠动脉 pH、PaCO<sub>2</sub>、PaO<sub>2</sub> 的变化趋势的影响 .  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Tab.2 Changes in arterial blood pH, PaCO<sub>2</sub>, and PaO<sub>2</sub> in different groups before and after inhalation.  $n = 3, \bar{x} \pm s$

Group	Isoflurane	pH		PaO <sub>2</sub> (mmHg)		PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	
		0 min	30 min	0 min	30 min	0 min	30 min
Sham	OMAC	7.37 $\pm$ 0.03	7.36 $\pm$ 0.03	132.6 $\pm$ 7.02	129.3 $\pm$ 9.07	45.7 $\pm$ 1.33	48.6 $\pm$ 1.08
0.25M	0.25MAC	7.37 $\pm$ 0.02	7.35 $\pm$ 0.02	134.6 $\pm$ 8.50	128.3 $\pm$ 10.2	46.20 $\pm$ 1.67	47.1 $\pm$ 1.25
0.5M	0.5MAC	7.37 $\pm$ 0.00	7.31 $\pm$ 0.01 <sup>1)</sup>	132.0 $\pm$ 7.00	110.3 $\pm$ 3.51 <sup>1)</sup>	46.1 $\pm$ 0.98	54.4 $\pm$ 3.64 <sup>1)</sup>
1.0M	1.0MAC	7.38 $\pm$ 0.02	7.15 $\pm$ 0.03 <sup>1)2)</sup>	131.6 $\pm$ 3.05	91.6 $\pm$ 4.04 <sup>1)2)</sup>	46.1 $\pm$ 1.11	67.5 $\pm$ 2.18 <sup>1)2)</sup>

注:与假手术组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与 0.5M 组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$

Note:compared with sham group,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;compared with 0.5M group,<sup>2)</sup> $P < 0.05$

均有显著性差异( $P < 0.01$ );而0.5M组、1.0M组较IRI组、0.25M组的病理评分显著性减低( $P < 0.01$ )。IRI组与0.25M组间无显著性差异( $P > 0.05$ ),见表3。

2.4 血浆MDA、SOD和TNF-α水平的比较

IRI组血浆SOD活力明显低于假手术组( $P < 0.01$ )。与IRI组相比,0.25M组SOD活力无显著性差异( $P > 0.05$ ),而0.5M组、1.0M组均高于IRI组( $P < 0.01$ ),见表3。

IRI组MDA含量明显高于假手术组( $P < 0.01$ ),而0.5M组、1.0M组及0.25M组的MDA含量均低于IRI组( $P < 0.01$ ),其中0.5M组低于1.0M组、0.25M组( $P < 0.01$ ),并且与假手术组无显著性差异( $P > 0.05$ ),见表3。

与假手术组相比,其余各组TNF-α均显著升高( $P < 0.01$ )。0.5M组TNF-α低于IRI组( $P < 0.01$ ),而1.0M组、0.25M组的TNF-α与IRI组相比无显著性差异( $P > 0.05$ ),见表3。

2.5 肠组织caspase-3激活水平的比较

Caspase-3免疫组织化学染色阳性反应物分布于胞浆内,呈棕褐色;IRI组、0.25M组胞浆阳性染色明显深于且多于0.5M组、1.0M组,而假手术组在胞浆中偶有表达,见图2。与假手术组比较,各组的caspase-3蛋白表达量明显升高( $P < 0.01$ ),而0.5M组、1.0M组较0.25M组、IRI组明显减少( $P < 0.05$ ),见图3。

3 讨论

异氟醚是临床广泛使用的全身麻醉药之一,除了麻醉作用外,还有其他非麻醉的药理作用。目前国内外在研究异氟醚对各脏器IRI的影响中,研究最多也最深入的是对心肌IRI的保护作用。Weber等<sup>[4]</sup>在动物实验中,使用APC策略包括吸入0.5~1.0MAC吸入麻醉药5~75 min,单次或多次循环吸入,在诱导心肌缺血前15~30 min洗出麻醉药,减少心肌梗死面积程度与5 min的IPC一致。Obal等<sup>[6]</sup>研究报道,

异氟醚诱导的APC的最低有效浓度是0.25MAC,而低剂量的异氟醚减少心肌梗死面积比高剂量更有效。但异氟醚抗IRI的组织脏器的特异性、保护作用的量效关系、最佳时间窗及其具体机制也不完全一致,即使同一器官在缺血再灌注的不同时期,其作用机制也不一致<sup>[1]</sup>。由于尚未有文献报道异氟醚APC对肠IRI的影响及其有效浓度范围,本实验采用较多学者使用的异氟醚浓度:0.25MAC、0.5MAC及1.0MAC预处理30 min,来观察不同浓度的异氟醚APC能否模拟肠IPC的保护效果。

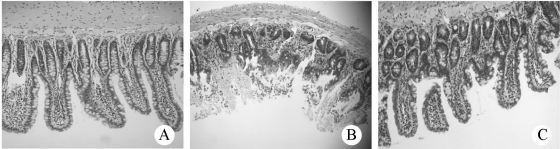


图1 HE染色观测异氟醚预处理各组肠组织病理学变化(×200)

A – 肠组织病理学基本正常,可见于假手术组;B – 肠组织损伤严重,多见于IRI组和0.25M组;C – 肠组织损伤较轻,多见于0.5M组和1.0M组

Fig.1 Pathological changes of small intestine tissue stained with HE staining (×200)

A – normal histological features in sham group; B – seriously injured intestinal tissue in IRI group and 0.25M group; C – slightly injured intestinal tissue in 0.5M group and 1.0M group

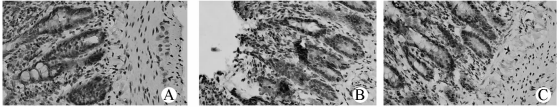


图2 IHC观察异氟醚预处理各组肠组织caspase-3表达的变化(×400)

A – 几无caspase-3阳性表达,见于假手术组的肠组织;B – caspase-3阳性高表达,多见于IRI组和0.25M组的肠组织;C – caspase-3阳性表达较少,多见于0.5M组和1.0M组的肠组织

Fig.2 Changes of immunohistochemistry for activated caspase-3 expressed in small intestine tissue (×400)

A – none-expression of caspase-3 in sham group; B – over expression of caspase-3 in IRI group and 0.25M group; C – under-expression of caspase-3 in 0.5M group and 1.0M group

表3 异氟醚预处理对大鼠肠组织病理评分和血浆生化指标的影响. n = 9,  $\bar{x} \pm s$

Tab.3 Comparison of improved Chiu's scales of intestinal mucosa and plasma levels of SOD, MDA and TNF-α in different groups.

Group	Isoflurane	Improved Chiu's scale	SOD activity/U · mL <sup>-1</sup>	MDA/μmol · mg <sup>-1</sup>	TNF-α/pg · mL <sup>-1</sup>
Sham	0MAC	0.33 ± 0.22	200.45 ± 26.91	2.26 ± 0.62	0.28 ± 0.45
IRI	0MAC	6.71 ± 1.06 <sup>1)</sup>	103.55 ± 20.45 <sup>1)</sup>	7.67 ± 1.41 <sup>1)</sup>	37.41 ± 4.27 <sup>1)</sup>
0.25M	0.25MAC	6.08 ± 1.04 <sup>1)</sup>	112.72 ± 12.52 <sup>1)</sup>	5.52 ± 1.25 <sup>1)2)</sup>	34.73 ± 3.64 <sup>1)</sup>
0.5M	0.5MAC	4.15 ± 0.90 <sup>1)2)</sup>	155.94 ± 15.43 <sup>1)2)</sup>	3.16 ± 0.91 <sup>2)</sup>	20.01 ± 11.93 <sup>1)2)</sup>
1.0M	1.0MAC	4.85 ± 1.96 <sup>1)2)</sup>	132.62 ± 8.81 <sup>1)2)</sup>	5.13 ± 1.35 <sup>1)2)</sup>	29.71 ± 8.03 <sup>1)</sup>

注:与假手术组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;与IRI组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.01$   
Note:compared with sham group,<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ;compared with IRI group,<sup>2)</sup> $P < 0.01$

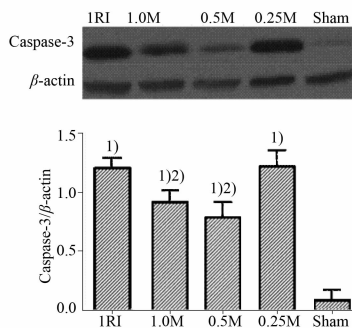


图3 WB检测异氟醚预处理肠组织caspase-3表达的变化。

$n=3, \bar{x} \pm s$

与假手术组比较, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ;与IRI组比较<sup>2)</sup> $P<0.01$

**Fig. 3** Changes of activated caspase-3 expressed in small intestine tissue by Western blotting.  $n=3, \bar{x} \pm s$

Compared with sham group, <sup>1)</sup> $P<0.01$ ; compared with IRI group, <sup>2)</sup> $P<0.01$

在开腹阻断肠系膜上动脉前,30%氧气混合异氟醚预处理30 min时检测动脉血气发现,1.0MAC组的PaO<sub>2</sub>值尽管尚在正常值范围,但PaCO<sub>2</sub>已明显升高,提示1.0MAC异氟醚吸入对腹腔乌拉坦麻醉后大鼠的呼吸有较明显抑制作用。在停止吸入异氟醚后可快速减轻或避免呼吸抑制,恢复正常水平PaCO<sub>2</sub>,因此1.0MAC组的高PaCO<sub>2</sub>是短时、一过性的,其影响异氟醚APC效应的可能性微小。

本实验通过阻断肠系膜上动脉1 h再灌注2 h成功复制了肠IRI模型。由于实验过程中均没有给予动物补液,假手术的假手术组动物随着体液丢失导致MAP逐渐下降;与IRI组相比,异氟醚预处理各组在再灌注期(T4~T7)均能明显改善MAP下降趋势,延缓低血压发生。在光学显微镜下观测IRI组肠组织结构受损最严重,评分值显著高于其他各组( $P<0.01$ );而0.5M组和1.0M组都能减轻肠病理形态学变化并降低损伤程度( $P<0.01$ ),但仍高于假手术组,提示0.5MAC和1.0MAC异氟醚APC具有明显的肠保护功效,而相对较低浓度的0.25MAC异氟醚未能减轻肠损伤。

TNF- $\alpha$ 是启动和加速各种炎性连锁反应的关键因子<sup>[8]</sup>。SOD是清除体内O<sup>2-</sup>的专一性酶,MDA是脂质过氧化反应的代谢终产物,其含量不仅可以反映IRI时氧自由基的生成,同时也与氧自由基对细胞膜损伤的严重程度呈正相关<sup>[9]</sup>。本实验发现,0.5MAC和1.0MAC异氟醚预处理能明显提高肠IRI后血浆SOD活力、降低MDA水平,并且0.5MAC异氟醚预处理能非常显著减低血浆TNF- $\alpha$ 水平( $P<0.01$ ),提示异氟醚APC抗肠IRI的作用

与其抗氧化应激损伤及抑制TNF- $\alpha$ 生成的炎症反应级联效应有关。

Caspase家族蛋白酶的激活是凋亡发生机制中的关键环节,caspase-3是此家族中最重要的凋亡执行者。本实验分析肠组织caspase-3免疫组织化学染色结果表明,IRI组和0.25M组的胞浆阳性染色明显深于且多于0.5M组和1.0M组;WB结果也证明,0.5M组与1.0M组较0.25M组和IRI组明显减少,提示0.5MAC和1.0MAC异氟醚预处理能显著地降低caspase-3激活、减少细胞凋亡发生,从而发挥抗肠IRI的效应。

本实验仅在再灌注2 h时观察肠病理学变化,尚难以对异氟醚抗急性肠IRI作用的时效性进行研究。另外,在其他时间窗使用异氟醚是否同样有效及其更深入的作用机制仍有待今后进一步的研究。

综上所述,0.25MAC异氟醚预处理30 min无明显抗肠IRI,但0.5MAC与1.0MAC异氟醚具有相同程度的减轻肠缺血再灌注后的肠组织结构的病理改变,并使再灌注期的循环血压得到一定改善,其保护效应可能与抗氧化、抗炎及抑制细胞凋亡的作用有关。

## REFERENCES

- [1] LIU C L, LI Y J, SHI Y Y. Research advances on inhalation anesthetics protect against ischemia-reperfusion injury [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2009, 44(18):1369-1371.
- [2] STADNICKA A, MARINOVIC J, LJUBKOVIC M, et al. Volatile anesthetic-induced cardiac preconditioning [J]. *J Anesth*, 2007, 21(2):212-219.
- [3] HONG L. Volatile anesthetic preconditioning with sevoflurane provides delayed window of myocardial protection in 72 h[J]. *Anesthesiology*, 2005, 103:558.
- [4] WEBER N C, SCHLACK W. Inhalational anaesthetics and cardioprotection[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008, 182:187-207.
- [5] LEE H T, EMALA C W, JOO J D, et al. Isoflurane improves survival and protects against renal and hepatic injury in murine septic peritonitis[J]. *Shock*, 2007, 27(4):373-379.
- [6] OBAL D, WEBER N C, ZACHAROWSKI K, et al. Role of protein kinase C- $\epsilon$  (PKC- $\epsilon$ ) in isoflurane induced cardioprotection. Low, but not high concentrations of isoflurane activate PKC- $\epsilon$ [J]. *Br J Anaesth*, 2005, 94(2):166-173.
- [7] LIU C L, LI Y J, LI X Y, et al. Effects of electrical stimulation of vagus nerve on gut injury following intestinal ischemia-reperfusion in rats [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2006, 22(7):1306-1310.
- [8] WU B, FUJISE T, IWAKIRI R, et al. Venous congestion induces mucosal apoptosis via tumor necrosis factor- $\alpha$ -mediated cell death in the rat small intestine [J]. *J Gastroenterol*, 2004, 39(11):1056-1062.
- [9] HUA L C, MENG S M, YANG J. Experimental study on the changes of free radical scavengers and MDA in ischemia-reperfusion injury of animal's small intestine [J]. *J Chin Microcircul* (中国微循环), 1999, 3(4):205-207.

(收稿日期:2011-12-05)