

潘晓慧,张朋辉,江国健,等. 缺血时间差异对大鼠肠缺血再灌注损伤的影响研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(12): 32-36.

Pan XH, Zhang PH, Jiang GJ, et al. Effects of ischemia time on intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(12): 32-36.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.12.005

## 缺血时间差异对大鼠肠缺血再灌注损伤的影响研究

潘晓慧,张朋辉,江国健,李娟,陈桂煌,姚欣伶,冯学轩\*

(广东省医学实验动物中心,广州 528248)

**【摘要】** 目的 从氧化损伤途径及组织病理学层面评价小肠缺血时间对小肠缺血再灌注模型的影响,为该疾病的研究提供建模条件及基础数据。方法 24只雄性SD大鼠随机分为假手术组、缺血30 min组、缺血1 h组、缺血2 h组,各造模组结扎肠系膜上动脉使缺血一定时间后,再灌注4 h诱导缺血再灌注损伤模型。恢复供血4 h后大鼠安乐死,取10%肠组织匀浆后通过试剂盒对应检测,比较小肠组织超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽(GSH)水平,HE染色观察肠组织形态,并测量小肠绒毛高度及黏膜厚度。结果 与假手术组比较,缺血30 min组及缺血1 h组的SOD、GSH-Px、MDA水平显著升高( $P<0.05$ ),缺血30 min、1 h及2 h均可使炎性细胞浸润加重,病理Chiu's评分显著升高( $P<0.05$ ),此外,缺血1 h及2 h还可显著降低小肠绒毛高度及黏膜厚度( $P<0.01$ )。但缺血2 h可引起动物死亡(死亡率33.3%)。结论 缺血1 h再灌注4 h建立的小肠缺血再灌注模型的氧化指标及肠道组织形态最为理想,该条件下建立的小肠缺血再灌注模型适用于疾病研究及药物开发。

**【关键词】** 小肠缺血再灌注损伤;缺血时间;氧化指标;组织病理学

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2022)12-0032-05

## Effects of ischemia time on intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat model

PAN Xiaohui, ZHANG Penghui, JIANG Guojian, LI Juan, CHEN Guihuang, YAO Xinling, FENG Xuexuan\*  
(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangzhou 528248, China)

**【Abstract】** **Objective** To evaluate the effects of ischemia time on intestinal ischemia-reperfusion injury in a rat model by assessing oxidative damage and histopathology, to provide optimal modeling conditions and basic data for future studies. **Methods** Twenty-four male SD rats were divided randomly into a sham operation group, 30 min ischemia group, 1 h ischemia group and 2 h ischemia group. Ischemia-reperfusion injury models were induced by ischemia of the superior mesenteric artery for the noted time, followed by reperfusion for 4 h. After resumption of the blood supply, the rats were euthanized. Then, take 10% intestinal tissue homogenate and test with kit, test the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione peroxidase (GSH-Px) and glutathione were determined. The morphology of the intestinal tissue was observed by hematoxylin and eosin staining, and villus height and mucosa thickness were measured. **Results** SOD, GSH-Px and MDA were all significantly increased in the 30 min and 1 h ischemia groups compared with the sham operation group ( $P<0.05$ ). Inflammatory cell infiltration was aggravated and the pathological Chiu's score was significantly increased in the ischemia groups ( $P<0.05$ ). In addition, 1 h and 2 h of ischemia significantly reduced the villus height and mucosal thickness in the small intestine ( $P<0.01$ ), while 2 h of ischemia could cause death (death rate

[基金项目] 广东省中医药局科研项目(20211056);广东省医学科学技术研究基金项目(A2021396)。

[作者简介] 潘晓慧(1995—),女,药师,本科,研究方向:毒理学研究。E-mail:KiritoAsunaForever@126.com

[通信作者] 冯学轩(1990—),男,主管药师,硕士,研究方向:药理药效学研究。E-mail:hinfung@126.com

33.3%)。 **Conclusions** An intestinal ischemia-reperfusion model established by 1 h ischemia and 4 h reperfusion had the most ideal oxidation index and intestinal tissue morphology, and is thus suitable for disease research and drug development.

**【Keywords】** intestinal ischemia-reperfusion injury; ischemia time; oxidation index; histopathology

小肠缺血再灌注损伤 (intestinal ischemia-reperfusion injury, IIRI) 主要是指由于肠道疾病或肠道外科手术等原因引起肠道缺血,在恢复血流供应时,产生大量的氧自由基,由于组织细胞内线粒体功能未恢复,对氧自由基清除能力不足,引起氧化应激压力上升,导致细胞损伤,进而加速细胞凋亡<sup>[1-3]</sup>在临床上表现为肠道功能紊乱和结构损伤、全身炎性反应综合征、多器官功能衰竭等,最终可导致死亡,肠黏膜损伤且伴有肠系膜缺血的患者死亡率可高达 59%~93%<sup>[4-5]</sup>,其死亡率之高及预后不良使得 IIRI 成为了临床上研究的热点。如何成功建立与临床症状相一致的 IIRI 模型,将有助于推动该类疾病的基础研究,包括临床症状研究及预后研究,也将有利于药物干预研究。但目前针对 IIRI 建模的研究较为薄弱,缺血时间对于 IIRI 模型的成立起着至关重要的作用,缺血时间的长短决定了机体内自由基的多少及氧化应激压力的高低,缺血时间过短未必能造成损伤,缺血时间过长会使组织直接在缺血期发生不可逆损伤甚至坏死,目前针对 IIRI 建模的研究较为薄弱,而缺血时间对于 IIRI 模型的成立起着至关重要的作用。因此,本实验主要研究关键因素——缺血时间,对 IIRI 模型建立的影响,并从发病机制、氧化损伤层面及组织病理学方面评价模型的适用性,为用于缺血再灌注损伤防治药物的研发提供相应的模型工具及基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

24 只 SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重 221.2~230.6 g,购于广东省医学实验动物中心 [SCXK(粤)2018-0002]。动物饲养在广东省医学实验动物中心 SPF 级动物房 [SYXK(粤)2018-0002],饲养温度与湿度:20℃~26℃,40%~70%,采用 10 h:14 h 昼夜间断照明。动物自由进食和饮水,所有饲料和饮用水均由广东省医学实验动物中心提供。本实验经广东省医学实验动物中心动物伦理委员会批准 (B202005-6),并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

戊巴比妥钠:批号 P3761,德国默克生产;乌来

糖:批号 20171219,国药集团化学试剂有限公司生产;氯化钠注射液,批号:201207136,安徽丰原药业股份有限公司淮海药厂生产;SOD 试剂盒,批号:20210604,南京建成生物工程研究所生产;GSH-Px 试剂盒,批号:20210603,南京建成生物工程研究所生产;MDA 试剂盒,批号:20210605,南京建成生物工程研究所生产;GSH 试剂盒,批号:20210605,南京建成生物工程研究所生产。

BS-3000A 电子分析天平,感量:0.1 g,上海友声衡器有限公司生产;BSA224S 电子分析天平,感量:0.1 mg,赛多利斯科学仪器(北京)科技有限公司生产;KDC-2046 低速冷冻离心机:科大创新股份有限公司中佳分公司生产;RM2135 轮转切片机:德国 LEICA 公司生产;ASP300S 生物组织全自动脱水机:德国 LEICA 公司生产;EG1150 生物组织包埋机及冷冻机:德国 LEICA 公司生产;CS-VI 摊片烤片机:湖北孝感医用仪器有限公司生产;AutoStainer-XL 生物组织全自动染色机:德国 LEICA 公司生产;BX43 型生物显微镜:日本 OLYMPUS 生产;CellSens Standard 显微图像软件:日本奥林巴斯公司提供。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 实验动物分组

将 24 只 SD 大鼠检疫结束后,根据体重随机分为假手术组、缺血 30 min 组、缺血 1 h 组、缺血 2 h 组,6 只/组。

#### 1.3.2 模型制备

按 2 mL/kg 体重的剂量腹腔注射 3%的戊巴比妥钠溶液将 SD 大鼠麻醉,先腹部剃毛备皮,之后仰卧位固定,于腹部正中,腹白线处开腹,分离肠系膜上动脉,用 4 号手术线活结结扎根部使缺血,直至见肠系膜血管颜色变浅,即为缺血成功。动物按 20 mL/kg 体重腹腔注射氯化钠注射液进行补液在缺血开始及再灌注开始时,假手术组只分离肠系膜上动脉,不进行缺血再灌注。各实验组缺血对应时间后,将活结解开,恢复供血 4 h 后大鼠按 60 mL/kg 体重腹腔注射 20%乌来糖溶液麻醉,腹主动脉采血后处死,取小肠进行氧化指标及组织病理学检测。

#### 1.3.3 指标检测

##### (1) 肠道组织大体剖检观察

大鼠大体剖检肉眼观察肠道变化。

##### (2) 氧化指标检测

取 10% 肠组织匀浆,按各试剂盒说明,测定 SOD、GSH-Px 活性及 MDA、GSH 含量。

### (3) 肠组织病理学观察及肠组织损伤评分

动物安乐死后取小肠固定于 4% 中性甲醛固定液,进行常规石蜡切片,HE 染色观察,并测量小肠绒毛高度及粘膜厚度,观察炎症细胞聚集情况并进行炎症细胞浸润情况评分,见表 1。参照 Chiu's 6 级评分法对小肠组织进行半定量评分,见表 2。

## 1.4 统计学方法

所有数据采用平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析;计量资料数据方差齐,或数据经转换后方差齐,则采用 LSD 组间两两比较的单因素方差分析方法;若数据经转换后方差仍不齐,采用秩和检验进行统计分析,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 动物死亡情况

缺血 2 h 组其中两只大鼠缺血 2 h 恢复供血后出现严重拉稀,并于缺血 3 h 后死亡,剖检发现小肠出血,瘀黑,死亡动物实验结果未参与统计。

### 2.2 大体剖检结果比较

假手术组小肠表面红润有光泽,回肠至盲肠处内容物成型;缺血 30 min 组小肠轻微胀气,内容物偏软;缺血 1 h 组肛门处可见稀便,小肠肠壁变薄,小肠内胀气明显,内容物呈黄色嗜喱状,偶见出血点;缺血 2 h 组,拉稀严重,小肠内可见明显出血,小肠肠壁变薄且全部肠段胀气明显,内容物呈红色嗜喱状。

### 2.3 SOD、GSH-Px 活性及 MDA、GSH 含量比较

与假手术组比较,缺血 30 min 组和缺血 1 h 组 MDA 含量升高( $P < 0.05$ ) (图 1A),缺血 1 h 组 SOD 活性显著升高( $P < 0.05$ ) (图 1B),各缺血组 GSH-Px 活性升高( $P < 0.01$ ) (图 1C),缺血 30 min 组和缺血 2 h 组 GSH 含量降低( $P < 0.05$ ) (图 1D)。

### 2.4 肠组织病理学结果比较

#### 2.4.1 组织病变

假手术组小肠黏膜层、肌层完整,黏膜上皮细胞排列整齐、未见变性、坏死、炎症,部分黏膜下层见淋巴小结,血管未见扩张、出血;缺血 30 min 组小肠绒毛顶端上皮间隙增宽、毛细血管淤血,黏

表 1 炎症细胞浸润情况评分标准

Table 1 Inflammatory cell infiltration scoring standard

评分 Score	病理学改变 Pathological changes
1	最轻微:炎症细胞浸润面积占整个视野的比例 $< 10\%$ 。 Slightest, Infiltrated area of inflammatory cells accounted for $< 10\%$ of the whole field of vision.
2	轻度:炎症细胞浸润面积占整个视野的比例 11%~20%。 Slight, Infiltrated area of inflammatory cells accounted for 11%~20% of the whole field of vision.
3	中度:炎症细胞浸润面积占整个视野的比例 21%~40%。 Medium, Infiltrated area of inflammatory cells accounted for 21%~40% of the whole field of vision.
4	重度:炎症细胞浸润面积占整个视野的比例 41%~100%。 Heavy, Infiltrated area of inflammatory cells accounted for 41%~100% of the whole field of vision.

表 2 小肠组织损伤 Chiu's 评分量表

Table 2 Intestinal tissue injury Chiu's score

评分 Score	病理学改变 Pathological changes
0	正常小肠上皮绒毛。 Normal small intestinal epithelial villi.
1	小肠绒毛顶端上皮间隙增宽,伴毛细血管瘀血。 Widening of the subepithelial space at the apex of the villi, accompanied by capillary stasis.
2	小肠绒毛顶端上皮间隙扩展,伴上皮层与固有层中度分离。 Apical subepithelial space of the small intestine villi expanded with moderate separation of the superior cortex and lamina propria.
3	小肠绒毛两侧上皮层与固有层大量分离,绒毛顶端部分破损。 Upper cortex on both sides of the small intestinal villi separated from the lamina propria, and the apical part of the villi was damaged.
4	小肠绒毛破损,伴固有层毛细血管暴露及炎性细胞增多。 Small intestine villi damage accompanied by lamina propria capillary exposure and increased inflammatory cells.
5	固有层破坏,出血和溃疡。 Lamina propria damage, bleeding and ulceration.

膜层极少量炎细胞浸润;缺血 1 h 组小肠绒毛顶端上皮下间隙增宽或绒毛顶端部分破损、毛细血管淤血,个别样本黏膜上皮细胞坏死、溃疡、固有层破坏、固有层及黏膜下层血管淤血、出血,黏膜层极少量至轻度炎细胞浸润;缺血 2 h 组小肠黏膜上皮细胞坏死、溃疡、固有层破坏、固有层及黏膜下层血管淤血、出血,黏膜层轻度炎细胞浸润,见图 2。

#### 2.4.2 绒毛高度

与假手术组比较,缺血 1 h 组、缺血 2 h 组小肠绒毛高度降低,有统计学差异( $P < 0.01$ ),见表 3。

#### 2.4.3 黏膜厚度

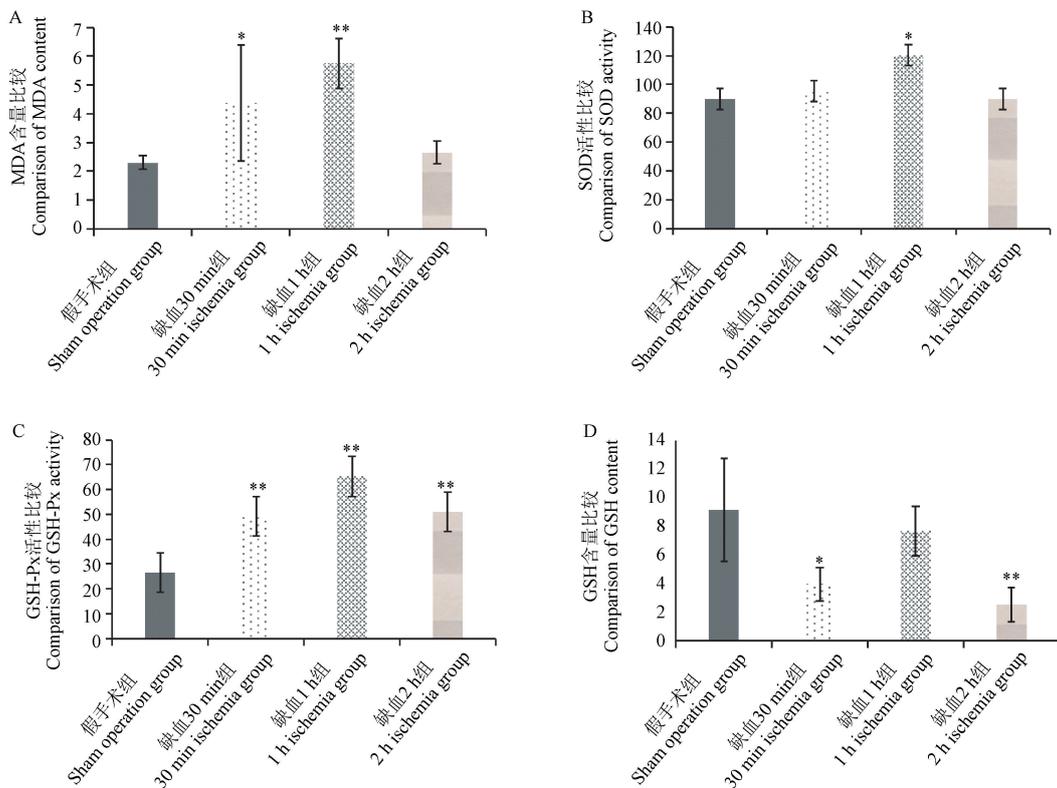
与假手术组比较,缺血 1 h 组、缺血 2 h 组小肠黏膜厚度减小,有统计学意义( $P < 0.01$ ),见表 3。

#### 2.4.4 炎症细胞浸润情况评分

与假手术组比较,各缺血组小肠均有不同程度的炎症细胞浸润,且有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

#### 2.4.5 Chiu's 评分

与假手术组比较,各缺血组小肠均有不同程度的病理学改变,且有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

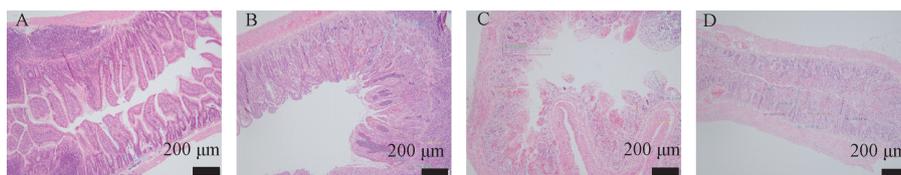


注:与假手术组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 1 不同组别 MDA、GSH 含量及 SOD、GSH-Px 活性比较

Note. Compared with the sham operation group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

Figure 1 Comparison of MDA and GSH contents and SOD and GSH-Px activities in different groups



注:A:假手术组;B:缺血 30 min 组;C:缺血 1 h 组;D:缺血 2 h 组。

图 2 不同组别小肠组织病理学变化情况(HE 染色)

Note. A, Sham operation group. B, 30 min ischemia group. C, 1 h ischemia group. D, 2 h ischemia group.

Figure 2 Histopathological changes of intestine in different groups(HE staining)

表 3 肠组织病理学结果( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 3 Intestinal histopathology results

组别 Groups	n	绒毛高度 Villus height	黏膜厚度 Thickness of mucosa	炎症细胞浸润评分 Infiltration of inflammatory cells score	Chiu's 评分 Chiu's score
假手术组 Sham operation group	6	387.98±44.56	540.52±73.64	0.0±0.0	0.0±0.0
缺血 30 min 组 30 min ischemia group	6	338.20±57.15	468.88±73.55	1.3±0.5*	1.8±1.6*
缺血 1 h 组 1 h ischemia group	6	217.67±18.40**	307.93±31.45**	1.3±0.5*	2.0±1.7*
缺血 2 h 组 2 h ischemia group	4	193.26±43.42**	268.14±66.41**	2.0±0.0**	4.0±2.0**

注:与假手术组相比, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ 。

Note. Compared with the sham operation group, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ .

### 3 讨论

据报道,氧化应激、炎症反应及继发性细胞凋亡是小肠缺血再灌注损伤发生发展的重要病理机制<sup>[6-8]</sup>。小肠动脉缺血情况下,氧供给下降,导致氧自由基大量产生并激活炎症因子,引起炎细胞在病灶上聚集<sup>[9-11]</sup>,因此,不同缺血时间下机体的氧化应激水平以及小肠黏膜结构的改变及炎细胞浸润程度能很好反映 IIRI 的情况。以此为切入点,本研究从氧化水平和病理层面探讨了 IIRI 模型的建模条件。

在研究中发现,短时间缺血情况下,氧自由基产物 MDA 含量明显升高,且升高幅度与缺血时间呈正相关,证明机体内已产生大量的自由基。MDA 的急剧升高,正反馈调节抗氧化酶类 SOD 和 GSH-Px 的产生,以抵抗体内的氧化应激压力,使得 SOD、GSH-Px 的产生呈现与 MDA 相似的趋势,因此可见在缺血 1 h 时,模型动物 MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活性均高于缺血 30 min,且与正常动物有显著差异。另外,在实验过程中发现缺血 2 h 时,MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活性不升反降,结合病理结果和动物临床表现,我们得知,在缺血 2 h 时,小肠病理损伤严重,上皮细胞坏死、溃疡、固有层破坏,炎症细胞浸润明显,小肠绒毛高度及黏膜厚度显著降低,且损伤程度较缺血 1 h 时要严重,且动物临床状态较差,个别动物肠道肉眼可见出血,出现了动物死亡的情况,正因此,机体对各项刺激的反应性下降,导致 MDA 含量和 SOD、GSH-Px 活性不升反降的结果出现。病理结果同时显示,缺血 30 min 及 1 h 均可见小肠组织的病理变化,且变化程度与缺血时间呈正相关性,缺血 1 h 更可见小肠绒毛高度及黏膜厚度明显下降,但病变程度均弱于缺血 2 h 组。

综上所述可知,缺血 30 min, IIRI 模型症状较

轻,小肠绒毛高度及黏膜厚度未见明显变化;缺血 2 h,动物死亡率较高,且小肠病理损伤十分严重,不适用于 IIRI 建模;缺血 1 h,可见氧化指标明显变化,MDA 含量显著升高,同时小肠病理变化明显,小肠绒毛高度、黏膜厚度显著降低,炎性细胞轻度浸润,可见 IIRI 模型程度适中,相对理想,因此在 IIRI 疾病研究时,建议采用缺血 1 h 再灌注 4 h 的条件进行造模。

#### 参考文献:

- [1] 杨凤蕊,林秀珍. 肠缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2002, 8(4): 319-319.
- [2] 武向鹏,崔薇. 大蒜素对小肠缺血再灌注损伤保护作用的研究 [J]. 实用药物与临床, 2018, 21(9): 1007-1010.
- [3] 谭杨波,李通,甘嘉亮. 番茄红素对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(23): 2512-2515.
- [4] Opal SM, van der Poll T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock [J]. J Intern Med, 2015, 277(3): 277-293.
- [5] Ferencz A, Weber G, Helyes Z, et al. Presence of endogenous PACAP-38 ameliorated intestinal cold preservation tissue injury [J]. J Mol Neurosci, 2010, 42(3): 428-434.
- [6] 杨洁,张海霞,赵东伟,等. 参附注射液对肠缺血再灌注大鼠肝肾功能及 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平的影响 [J]. 山东医药, 2012, 52(19): 27-28.
- [7] 谢云飞,徐亮. 小肠缺血再灌注研究进展 [J]. 西南军医, 2012, 14(1): 90-92.
- [8] 陈建雷,孙庆林. 白藜芦醇对大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中华小儿外科杂志, 2011, 32(2): 139-142.
- [9] van der Vliet A, Bast A. Role of reactive oxygen species in intestinal diseases [J]. Free Radic Biol Med, 1992, 12(6): 499-513.
- [10] 张臣,连树华,柳宏. 肠缺血再灌注损伤的病理机制研究进展 [J]. 临床小儿外科杂志, 2018, 17(2): 141-145.
- [11] 肖玲燕,刘宁. 缺氧与炎症 [J]. 中国急救医学, 2012, 32(12): 1133-1135.

[收稿日期] 2022-05-16