

# 胰岛素对大鼠肠缺血再灌注损伤的影响

李东升<sup>1</sup> 欧阳军<sup>1△</sup> 赵磊<sup>2</sup>

(石河子大学医学院:1 第一附属医院急诊外科;2 生理学教研室 新疆 石河子 832008)

**摘要** 目的:观察胰岛素对大鼠肠缺血再灌注后小肠组织损伤的影响。方法:雄性 SD 大鼠 40 只随机分为 4 组,每组 10 只,手术对照组、单纯缺血组、再灌注组、胰岛素干预组。于 30min 缺血和 120min 再灌注后,进行组织病理学和生化检测。结果:(1)单纯缺血组肠粘膜损害较手术对照组明显升高( $P<0.01$ ),超氧化物歧化酶(SOD)活性无明显变化;(2)再灌注组 SOD 活性明显降低,与手术对照组和单纯缺血组相比较差异均有显著性( $P<0.01$ );(3)胰岛素组 SOD 活性与再灌注组相比有明显改善( $P<0.01$ )。结论:肠缺血可以引起肠粘膜损伤,再灌注则可加重这种损伤,胰岛素可以减轻再灌注损伤。

**关键词:** 小肠;缺血再灌注损伤;胰岛素

中图分类号:Q578,Q95-3 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2011)02-252-04

## Effect of Insulin on Gut Injury Following Intestinal Ischemia-reperfusion

LI Dong-sheng<sup>1</sup>, OUYANG Jun<sup>1</sup>, ZHAO Le<sup>2</sup>

(1 Department of Emergency Surgery, the First Affiliated Hospital;

2 Teaching and Research Section of Physiology, Medical College of Shihezi University, Xinjiang, Shihezi 832008, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effects of insulin on gut injury following intestinal ischemia-reperfusion (I/R). **Methods:** Forty male SD rats were randomly divided into 4 groups,  $n=10$  in each group: (1)control group,(2)simple ischemia group,(3)re-perfusion group, (4)insulin group. **Results:** (1) Mucosal injury score were significantly higher in the simple ischemia group than the control group ( $P<0.01$ ), the SOD activities have no evident change;(2)The SOD activities of the re-perfusion group were significantly decreased compared to the control group and simple ischemia group ( $P<0.01$ );(3)The SOD activities in the insulin group were significantly higher compared to the reperfusion group ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Intestinal ischemia can damage the intestinal mucosa in rats. Reperfusion can lead to further injury. Insulin can attenuate the mucosa damage.

**Key words:** small intestine; ischemia reperfusion injury; insulin

**Chinese Library Classification(CLC):** Q578, Q95-3 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2011)02-252-04

### 前言

胰岛素应用于临床已有 80 多年,是治疗糖尿病最重要的药物,对非糖尿病性高血糖尤其危重症的抢救亦极为重要。越来越多的证据表明,作为体内最重要的促合成激素,胰岛素不仅仅能降低高血糖,而且能改善代谢失调、炎症应答、免疫功能及出凝血状态,并促进创面愈合,还可用于其他疾病的治疗,其在外科领域的应用亦逐渐受到重视。近年来,大量研究显示胰岛素对缺血性心脏损伤、脑损伤、肾损伤均具有良好的保护作用,且这种保护作用并不完全依赖其外周降血糖效应,但是有关胰岛素治疗肠缺血再灌注损伤的实验研究鲜见报道,有关胰岛素在肠缺血再灌注损伤中的应用文献鲜见报道。本研究采用失血性休克致肠缺血再灌注损伤动物模型,通过对肠缺血再灌注前后小肠的组织形态学改变以及外周血、小肠组织中氧自由基产物的检测,探讨大鼠小肠缺血再灌注损伤的病理、病理生理变化以及小肠损伤程度,观察胰岛素对肠缺血再灌注损伤的影响,为胰岛素治疗急性肠缺血性疾病提供理论和实践依据。

作者简介:李东升(1970-),男,硕士研究生,主要研究方向:腹部创伤与外科急腹症,电话:15026235969,E-mail:lixuoshi200169@sina.com

△通讯作者:欧阳军,E-mail:yifan.jzk@163.com

(收稿日期:2010-10-04 接受日期:2010-10-27)

### 1 材料和方法

#### 1.1 试剂

胰岛素注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司),超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

#### 1.2 动物模型制作及动物分组

1.2.1 动物模型制作 大鼠术前禁食 8h,禁水 2h,称重后用 100g/L 的水合氯醛 10ml/kg 腹腔内注射麻醉,取平卧位,固定于手术台上。颈部、腹部术野备皮并消毒,无菌操作分离右侧颈内静脉、左侧颈内动脉。行左侧颈内动脉穿刺进行平均动脉压监测,行右侧颈内静脉穿刺置管并接三通管(供放血、输液用),以肝素(2mg/kg)行全身抗凝。按大鼠全身总血量的 40%(按 65ml/kg 体重)分两次右侧颈内静脉放血,每次 5min,间隔 15min。放血毕结扎动脉近端、缝合皮肤。试验结束时(再灌注 120min)放血处死。血糖的监测:取鼠尾血 1 滴/次,用微量血糖仪分别于术前、术后 30min、60min、90min、120min 监测各组血糖,使血糖保持在 3.9-6.7mmol/L。

1.2.2 动物分组 健康 SD 大鼠 40 只(新疆维吾尔自治区实验动物研究中心提供),250~300g,雄性。大鼠按随机数字表法被分为 A、B、C、D 组,其中 A 组为手术对照组,B 组为单纯缺血

组,C组为再灌注组,D组为胰岛素干预组,每组均为10只。

A.手术对照组:大鼠进行上述操作,手术后无处理。

B.单纯缺血组:大鼠进行上述操作,失血性休克后无处理。

C.再灌注组:大鼠进行上述操作,在失血性休克后立即开启输液泵进行静脉快速补液:林格氏液。

D.胰岛素干预组:操作同再灌注组,但于补液的同时微量泵静脉持续泵入胰岛素注射液:2IU/kg加50%葡萄糖注射液2g/kg。

### 1.3 检测项目与方法

1.3.1 血清SOD活性测定 大鼠处死时,经右侧颈内静脉取血5ml,离心后取血清,测定血清SOD活性,按南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书进行。

1.3.2 肠组织SOD活性测定 大鼠手术或失血性休克后120min处死,取一段距回盲部5cm、重约100mg的回肠(肠壁全层,去系膜),用眼科剪快速剪碎组织装入试管中,加入匀浆液2ml离心,取上清液。测定肠组织上清液SOD,按南京建成生物工程研究所提供的试剂盒说明书进行。

1.3.3 小肠组织形态学观察及损伤程度评分 大鼠手术或失血性休克后120min处死,取距回盲部25cm处回肠组织5cm,10%福尔马林固定24小时后、酒精梯度脱水、石蜡包埋、切片,PAS染色,光镜观察肠黏膜组织学改变。肠粘膜损伤评分按Chiu氏6级评分法:在400倍显微镜下任选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。评分为,0分为正常小肠上皮绒毛;1分:绒毛顶端上皮下间隙增大,伴毛细血管淤血;2分:上皮下间隙扩展,伴上皮层与固有层中

度分离;3分:绒毛两侧亦有上皮层与固有层大量分离,部分绒毛顶端破损;4分:绒毛破损,伴固有层毛细血管暴露及中性粒细胞增多;5分:固有层破坏、出血和溃疡。

### 1.3 统计学处理

所有数据采用SPSS13.0统计软件包进行处理,结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{X} \pm S$ )表示,采用t检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 血清中SOD活性

血清中SOD活性含量结果显示:单纯缺血组SOD活性为 $109.4 \pm 4.858$ ,与手术对照组( $112.7 \pm 2.946$ )比较无显著性差异( $P > 0.05$ );再灌注组中SOD活性为( $58.0 \pm 14.17$ ),与手术对照组、单纯缺血组相比均明显降低( $P < 0.01$ );胰岛素干预组的SOD活性( $88.3 \pm 7.945$ )与再灌注组相比较显著升高( $P < 0.01$ );胰岛素干预组的SOD活性与手术对照组相比较减低( $P < 0.01$ )。

### 2.2 小肠组织中SOD活性

小肠组织中SOD活性含量结果显示:单纯缺血组SOD活性为 $322.9 \pm 19.28$ ,与手术对照组( $344.3 \pm 44.29$ )比较无显著性差异( $P > 0.05$ );再灌注组中SOD活性为( $162.8 \pm 41.15$ ),与手术对照组、单纯缺血组相比均明显降低( $P < 0.01$ );胰岛素干预组的SOD活性( $251.1 \pm 41.49$ )与再灌注组相比较显著升高( $P < 0.01$ );胰岛素干预组的SOD活性与手术对照组相比较减低( $P < 0.01$ )。

表1 血清及小肠组织SOD活性( $\bar{X} \pm S, n=10$ )

Table 1 The SOD Activities of Serum and Small Intestine Tissues( $\bar{X} \pm S, n=10$ )

组别 Group	血清SOD (活力单位/毫升) The SOD Activities of Serum (U/ml)	小肠组织SOD (活力单位/毫克蛋白) The SOD Activities of Small Intestine Tissues (U/mgprot)
手术对照组 Control Group	$112.7 \pm 2.946$	$344.3 \pm 44.29$
单纯缺血组 Simple Ischemia Group	$109.4 \pm 4.858$	$322.9 \pm 19.28$
再灌注组 Re-perfusion Group	$58.0 \pm 14.17$	$162.8 \pm 41.15$
胰岛素干预组 Insulin Group	$88.3 \pm 7.945$	$251.1 \pm 41.49$

### 2.3 小肠损伤评分

PAS染色显微镜下观察,手术对照组大鼠小肠粘膜基本正常,仅少数部位出现绒毛上皮轻度受损,其余三组均有不同程度的绒毛顶端上皮下间隙增大、上皮下间隙扩展、绒毛两侧有上皮层与固有层大量分离、绒毛破损伴固有层毛细血管暴露及中性粒细胞增多及固有层破坏、出血和溃疡等。三组损伤程度及评分都非常显著地高于手术对照组(均为 $P < 0.01$ ),三组组间差异无显著性意义,见下表。

## 3 讨论

### 3.1 肠缺血再灌注损伤的病理生理机制

肠缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury,IRI)是组织器官发生缺血后血流再灌注加重存活的缺血组织功能障碍和结构损伤的现象,IRI在创伤、严重感染、休克、心肺功能不全、肠移植等病理生理过程中起重要作用。研究表明,小肠IRI不仅会引起局部组织损害,黏膜屏障功能受损,导致肠内细菌和毒素移位到体循环,诱发全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome,SIRS)和多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome,MODS),因此小肠被称为“创伤后多脏器功能衰竭的起源”或者“二次打击的起源”<sup>[4]</sup>。目前的研究表明缺血再灌注损伤的主要机制是氧自由基的作用、钙超载、白细胞介导的炎症作用。McCord等认为损伤不是缺血

期,而主要发生于血流的再灌注期,主要是因为氧自由基大量产生导致了再灌注损伤<sup>[2]</sup>。

超氧化物歧化酶(SOD)是一种内源性氧自由基清除剂,能将过氧化物转化为过氧化氢,并在过氧化酶的作用下生成水,能保护细胞避免损伤,所以 SOD 和过氧化氢酶可减轻或防止

肠缺血再灌注造成的组织损害。因此,可以把内源性 SOD 活性的变化作为观察氧自由基产生的指标。本研究观察了在不同情况下 SOD 活性的变化,以便探讨氧自由基对肠缺血再灌注损伤的影响。

表 2 小肠损伤评分( $\bar{X} \pm S, n=10$ )

Table 2 Evaluation of Injury Severity Score (ISS) of Small Intestine( $\bar{X} \pm S, n=10$ )

组别 Group	损伤评分 Evolution of Injury Severity Score (ISS)
手术对照组 Control Group	0.34± 0.232
单纯缺血组 Simple Ischemia Group	3.38± 0.257
再灌注组 Re-perfusion Group	3.62± 0.305
胰岛素干预组 Insulin Group	3.36± 0.263

本实验结果表明,肠缺血再灌注损伤后大鼠血清和小肠组织 SOD 活性明显降低,手术对照组与单纯缺血组相比无显著性差异,这表明大量的氧自由基并不是产生于缺血期,而是产生于再灌注期,血浆内和肠组织内的 SOD 活性受到抑制。有研究表明,胰岛素具有清除氧自由基的作用,在胰岛素干预下,大鼠血浆、肠组织内 SOD 活性明显升高,表明抑制氧自由基的产生能够改善内源性抗氧化物 SOD 的活性。总之,氧自由基参与了再灌注损伤,其主要产生于再灌注期,而非缺血期<sup>[3-5]</sup>。

### 3.2 肠缺血再灌注损伤的防治

肠黏膜屏障损伤的危害性已被医学界广泛认同,肠道尤其是肠黏膜损伤的保护已成为休克、创伤后综合治疗的重点研究课题之一。本研究在缺血后给予大鼠适量的胰岛素治疗,发现虽然显微镜下其肠组织损伤评分无明显降低,但是胰岛素干预组血清、肠组织内 SOD 的活性明显高于再灌注组,表明胰岛素可以保护内源性抗氧化剂、清除氧自由基,这表明使用胰岛素后可以使大鼠肠缺血再灌注时肠绒毛组织的破坏减少,因此胰岛素可减轻大鼠肠缺血再灌注损伤。

胰岛素对肠缺血再灌注损伤的保护作用可能与以下机制有关:1.有效控制血糖。应激性高血糖不仅导致机体分解代谢增加、负氮平衡、创口愈合不良及感染率增高,还严重影响机体内环境,增加病人的死亡率。在高度应激状态下,应激性高血糖是加重机体能量代谢障碍的重要因素,因而调节能量底物的供给和控制应激性高血糖有可能改善机体能量代谢障碍。强化胰岛素治疗能预防或改善葡萄糖毒性,可以将血糖控制在良好水平,及时纠正糖代谢紊乱,有利于机体正常防御免疫系统的恢复,降低感染的发生率<sup>[6-8]</sup>。2.胰岛素是体内最重要的促合成激素。胰岛素不仅仅能降低高血糖,而且能改善代谢失调、炎症应答、免疫功能及出凝血状态,并促进创面愈合。强化胰岛素治疗对肠缺血再灌注损伤的治疗作用可能与胰岛素能提高细胞膜对葡萄糖的通透性,使其细胞内液浓度增加,加速葡萄糖的利用,同时能增加葡萄糖激酶和糖原合成酶的活性,从而加速糖原和蛋白质合成,抑制糖原、蛋白质和脂肪的分解有关<sup>[9-11]</sup>。

3.胰岛素的氧自由基清除作用。近年来,大量研究显示胰岛素对缺血性脑损伤具有良好的保护作用,且这种保护作用并不完全依赖其外周降血糖效应,而且对心缺血再灌注损伤、肾缺血再灌注损伤亦有显著保护效果。其保护机制与抗氧自由基作用、抑制细胞凋亡、减轻细胞内  $Ca^{2+}$  超载及促进细胞能量代谢有关<sup>[12-15]</sup>。

综上所述,氧自由基参与了再灌注损伤,其主要产生于再灌注期,而非缺血期。肠缺血可以引起肠黏膜损伤,再灌注则可加重这种损伤,胰岛素可以减轻再灌注损伤。

### 参考文献(References)

- [1] Zayat M, Lichtenberger LM, Dial EJ. Pathophysiology of LPS-induced gastrointestinal injury in the rat:role of secretory phospholipase A2[J]. Shock, 2008;30(2):252-262
- [2] McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postschemic tissue injury [J]. N Engl J Med, 1985;312:159-163
- [3] 何伟,张彤彦,周华,等.强化胰岛素治疗对外科重症患者预后的影响[J].中华外科杂志,2007, 45(15):1052-1054.  
He Wei, Zhang Tong-yan, Zhou Hua, et al. Impact of Intensive Insulin Therapy on Surgical Critically Ill Patients [J]. China Journal of Surgery, 2007, 45(15):1052-1054
- [4] 赵京阳,张彤彦,周华,等.严格血糖控制对危重症炎症与免疫状态的影响[J].首都医科大学学报,2007, 22(5):579-583  
Zhao Jing-yang, Zhang Tong-yan, Zhou Hua, et al. Effect of Tight Glucose Control on Systemic Inflammatory and Immune Function during Critical Illness [J]. Journal of Capital Medical University, 2007, 22(5):579-583
- [5] Van den Berghe G, Schoonheydt K, Bexx P, et al. Insulin therapy protects the central and peripheral nervous system of intensive care patients. Neurology, 2005;64:1348
- [6] 邱蔚,王文华.强化胰岛素治疗在重症急性胰腺炎中的作用[J].临床内科杂志,2008, 25(1):36-38  
Qiu Wei, Wang Wen-hua. Effect of Intensive Insulin Therapy in Severe Acute Pancreatitis Patient [J]. J Clin Intern Med, 2008,25(1):

- 36-38
- [7] Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, et al. Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis, N Engl J Med, 2008,358:125-139
- [8] Federico Bilotta, Remo Carramia, Ibolja Cernak, et al. Intensive insulin therapy after severe traumatic brain injury: A randomized clinical trial [J]. Neurocritical Care, 2008,29:159-166
- [9] 柴家科, 申传安, 姚咏明, 等. 胰岛素治疗对烫伤脓毒症骨骼肌蛋白高降解的影响[J]. 中华创伤杂志, 2007, 23:66-69  
Chai Jia-ke, Shen Chuan-an, Yao Yong-ming, et al. Influence of Insulin Therapy in Severe Degradation of Skeletal Muscle Protein of Burn Sepsis[J]. Journal of Chinese Trauma, 2007,23:66-69
- [10] 赵灵, 管向东, 高树梓, 等. 强化胰岛素对严重多发伤患者预后的影响 [J]. 中华急诊医学杂志. 2007, 16(11):1132-1134  
Zhao Ling, Guan Xiang-dong, Gao Shu-zi, et al. Influence of Intensive Insulin Therapy in Prognosis of Severe Multiple Trauma Patients [J]. China Journal of Emergency Medicine, 2007,16(11):1132-1134
- [11] Garg R, Chaudhuri A, Munscharer F, et al. Hyperglycemia, insulin, and acute ischemic stroke--a mechanistic justification for a trial of insulin infusion therapy[J]. Stroke, 2006,37:267
- [12] 于利, 隗兆东, 管英俊, 等. 吡格列酮与胰岛素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 解剖学杂志, 2008, 31(5):658-661  
Yu Li, Jun Zhao-dong, Guan Ying-jun, et al. Protective Effect of Pioglitazone and Insulin on Myocardial Ischemia-reperfusion Injury in rats[J]. Journal of Anatomy, 2008,31(5):658-661
- [13] 张艳敏, 郭勇, 冯志强, 等. 胰岛素对肾小管细胞缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 山东大学学报(医学版), 2005, 43(8):741-744  
Zhang Yan-min, Guo Yong, Feng Zhi-qiang, et al. Protective effect of insulin on ischemia and reperfusion injury in kidney tubules cells [J]. Journal of Shandong University (Health Sciences), 2005,43(8):741-744
- [14] 李云辉, 赖海标, 林中平, 等. 胰岛素治疗重型颅脑损伤的临床研究 [J]. 中国医师杂志, 2007, 9(3):422-423  
Li Yun-hui, Lai Hai-biao, Lin Zhong-ping, et al. Clinical Studies of Insulin Therapy in Severely Brain-injured Patients [J]. Journal of Chinese Physician, 2007, 9(3):422-423
- [15] Tsuruta S, Matsumoto M, Fukuda S, et al. The effects of cyclosporin A and insulin on ischemic spinal cord injury in rabbits. Anesth Analg, 2006,102:1722-1727

## ·重要信息·

### 《分子影像学》第二版已正式出版发行

卜丽红<sup>1</sup> 戴薇薇<sup>2</sup>

(1 哈尔滨医科大学附属第四医院医学影像科 150001; 2 人民卫生出版社医药教育出版中心第四编辑室)

由哈尔滨医科大学附属第四医院申宝忠教授主编的《分子影像学》第二版( ISBN:978-7-117-13344-9/R·13345)一书已于2010年9月14日由人民卫生出版社出版发行。《分子影像学》是国内第一分子影像学大型专著。对于分子影像学的基本概念、基本原理、基本方法和应用概况都有精彩而详细的论述,充分体现了国际分子影像学的最新进展。

《分子影像学》第二版由著名医学影像学家、中国工程院院士刘玉清教授和美国分子影像学专家、美国医学科学院院士 Sanjiv Sam Gambhir 教授亲自作序。编委会包括美国哈佛大学、斯坦福大学等国外知名院校7名专家作为国外编委,国内多家知名大学、研究中心学术带头人13名作为国内编委,还包括国内外共40名专家参与编写。

全书共计130余万字,收录图片378幅,共分基础篇和应用篇。

基础篇共分10章,主要介绍了分子影像学的发展简史,分子成像的相关概念、基本原理、基本技术和设备等,内容较第一版更为精准、完善,覆盖面更加宽泛。着重针对探针合成这一当前分子成像研究的技术瓶颈,纳入了材料学、生物学和化学等相关技术内容。

应用篇共分7章,着重介绍了分子影像学技术的最新进展和应用情况,并详细介绍了分子成像在肿瘤、中枢神经系统和心血管系统疾病诊断中的应用情况,重点阐述了分子成像在监测基因治疗、活体细胞示踪以及新药研发等方面的最新研究进展,并就分子影像学向临床转化所面临的问题进行了深入剖析。

本书内容系统详实,深入浅出,图文并茂,可读性强。可供医学影像学专业、临床专业学生使用,并可为临床各学科研究生、临床医师及其他相关生命科学的研究人员提供参考。

《分子影像学》精装本定价260元,全国各大书店有售。