

Gln 的 PBMC 中 HSP70 表达均升高,而 NF- κ B P65 表达均下降,有统计学意义, NF- κ B P65 下降得更为显著,表明无论在急性期还是稳定期, Gln 能上调 HSP70 的表达而抑制 NF- κ B 的表达,对 NF- κ B 的作用更为明显。目前国内关于 Gln 对 COPD 患者 PBMC 中 NF- κ B mRNA 及 HSP-70 mRNA 表达的影响还尚未见报道。本研究首次采用 COPD 患者外周血 PBMC 为研究对象,应用 Gln 干预 COPD 患者 PBMC,观察细胞中 NF- κ B 和 HSP70 表达水平的变化,明确了二者参与了 COPD 的炎症反应,为药物治疗 COPD 提供新的理论依据。但目前的研究仅限于细胞水平,还需要进一步体内研究证实。

REFERENCES

- [1] LIU T, PENG M, CAI B Q. Role of glucocorticoid receptor of nuclear factor κ B in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J]. Acta Acad Med Sci(中国医学科学院学报), 2010, 32(2): 147-150.
- [2] VESTBO J, HURD S S, ROISIN R R. The 2011 revision of the global strategy for the diagnosis, management and prevention of COPD (GOLD) – why and what? [J]. Clin Respir J, 2012, 6(4): 208-214.
- [3] LINDSTROM T M, BENNETT P R. The role of nuclear factor kappa B in human labour [J]. Reproduction, 2005, 130(5): 569-581.
- [4] PACCANI S R, TONELLO F, GHITTONI R. Anthrax toxins suppress T lymphocyte activation by disrupting antigen receptor signaling [J]. J Exp Med, 2005, 201(3): 325-331.
- [5] ANDROW C, WANG RD, HSIN T. Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor release [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(8): 1083-1089.
- [6] SHEHATA S M, SHARMA H S, MOOI W J. Expression patterns of heat shock proteins in lungs of neonates with congenital diaphragmatic hernia [J]. Arch Surg, 1999, 134(11): 1248-1253.
- [7] QIN X B, YU S Y. Heat shock protein 70 expression and relation with cytokines in ventilator-induced lung injury in rabbit [J]. China J Mod Med(中国现代医学杂志), 2007, 17(1): 44-50.
- [8] ZHENG Z, KIM J Y, MA H. Anti-inflammatory effects of the 70 kDa heat shock protein in experimental stroke [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(1): 53-63.
- [9] SCHELLI M T, SPITZER A L, JOHSON J A. Heat shock inhibits NF- κ B activation in a dose- and time-dependent manner [J]. Surg Res, 2005, 129(1): 90-93.
- [10] SINGLETON K D, SERKOVA N, BECKEY V E, et al. Glutamine attenuates lung injury and improves survival after sepsis: role of enhanced heat shock protein expression [J]. Crit Care Med, 2005, 33(6): 1206-1213.
- [11] WANG L M, WANG X Y, PAN L Y. Inhibitor of glutamine in cytokines overexpression in mononuclear cell [J]. Parenter Enter Nutr(肠外与肠内营养), 2010, 17(1): 29-31.
- [12] GENG G Q, HUANG S Q. The effect of glutamine on NF- κ B expression in rat lungs after intestinal ischemia/reperfusion [J]. Fudan Univ J Med Sci(复旦学报:医学版), 2009, 36(5): 566-573.

收稿日期: 2012-07-16

不同浓度瑞芬太尼预处理对人肝细胞缺氧复氧损伤保护作用的影响

陈文华¹, 李丽珍², 林鹏焄¹, 郑昊¹, 阮姗², 涂芸芸² (1. 福建医科大学附属协和医院, 福州 350001; 2. 福建医科大学协和临床医学院, 福州 350001)

摘要: 目的 研究不同浓度瑞芬太尼预处理对人肝细胞缺氧复氧损伤保护作用的影响, 探讨瑞芬太尼预处理的适宜浓度。方法 将培养的人肝细胞按瑞芬太尼的浓度梯度分为 11 组: 正常对照组(N 组), 缺氧复氧组(IR 组), 瑞芬太尼预处理组(RE1~RE8 组): 瑞芬太尼终浓度分别为 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ng·mL⁻¹ 预处理 1 h 后建立缺氧复氧模型, 生理盐水组(NS 组)。N 组正常条件下培养, 其他组缺氧 8 h, 复氧 4 h。复氧结束即刻, MTT 法检测肝细胞活力; 全自动生化仪检测细胞培养液中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)和乳酸脱氢酶(LDH)水平; MDA 试剂盒检测肝细胞内丙二醛(MDA)含量。结果 与 N 组比较, 其他各组细胞活力降低, AST, LDH 水平和细胞内 MDA 含量升高($P < 0.05$)。与 IR 组和 NS 组比较, RE2~RE6 组细胞活力升高, AST、LDH 水平和细胞内 MDA 含量降低($P < 0.05$); 而 RE1、RE7 和 RE8 组各项指标差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 临床有效血药浓度(1~30 ng·mL⁻¹)瑞芬太尼预处理对肝细胞缺氧复氧损伤具有保护作用, 而低浓度(0.5 ng·mL⁻¹)和高浓度(≥ 40 ng·mL⁻¹)瑞芬太尼预处理则无此作用。

关键词: 瑞芬太尼; 麻醉药物预处理; 人肝细胞; 缺氧复氧损伤

中图分类号: R965

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2013)01-0125-06

作者简介: 陈文华, 男, 主任医师, 副教授, 硕导

Tel: 13625081007

E-mail: whc6202@163.com

Effect of Remifentanyl Preconditioning in Different Concentrations on Hepatic Hypoxia-reoxygenation Injury

CHEN Wenhua¹, LI Lizhen², LIN Pengtao¹, ZHENG Hao¹, RUAN Shan², TU Yunyun²(1.Department of Anesthesiology, Fujian Medical University Union Hospital, Fuzhou 350001, China; 2.Union Clinical College of Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate different remifentanyl concentrations used to pretreat hepatocytes undergone hypoxia-reoxygenation injury to find out the proper concentration against hypoxia-reoxygenation injury. **METHODS** Hepatocytes HL7702 were cultured *in vitro*, and divided into eleven groups: control group(group N), hypoxia-reoxygenation group(group IR), remifentanyl preconditioning groups (group RE1-RE8) and normal saline group(group NS) were administered one hour before hepatocyte hypoxia-reoxygenation injury at different concentrations of 0.5, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 ng·mL⁻¹ and normal saline respectively. Then 8 hours of hypoxia and 4 hours of reoxygenation were followed in the group IR, group NS and the preconditioning groups, while the group N was cultured in normal condition. Cell viability, ALT, AST, LDH and intracellular MDA were measured. **RESULTS** Compared with group N, cell viability reduced, AST, LDH and intracellular MDA increased in other groups ($P<0.05$). Compared with group IR and group NS respectively, cell viability increased, AST, LDH and intracellular MDA reduced in groups RE2-RE6 ($P<0.05$), however, no differences were shown among group RE1, RE7 and RE8 ($P>0.05$). **CONCLUSION** Remifentanyl preconditioning protects against hypoxia-reoxygenation injury in human hepatocyte. The range of effective concentration is among 1-30 ng·mL⁻¹, which is in accordance with the clinically effective concentration in anesthesia, while the concentration out of the range shows no protection.

KEY WORDS: remifentanyl; anesthetic-induced preconditioning; human hepatocyte; hypoxia-reoxygenation injury

瑞芬太尼是一种新型的超短效、强效阿片受体激动剂,选择性作用于 μ 阿片受体,对 δ 和 κ 阿片受体选择性较低。其起效迅速、作用时间短,阿片样作用不需药物逆转,且与用量及时间无关,并具有代谢不受肝肾功能影响的突出特点,在肝脏手术患者的麻醉中具有应用优势。有文献报道,瑞芬太尼预处理对心^[1-2]、脑^[3-4]、肾^[5-6]等器官缺血再灌注损伤具有保护作用。肝脏缺血再灌注损伤是肝脏外科手术中常见的问题,它直接影响术后患者肝功能和肝脏再生能力,是术后肝功能异常、原发性移植肝无功能、多器官功能衰竭的重要原因,与术后肝功能衰竭的发生和患者死亡率的上升直接相关^[7]。瑞芬太尼预处理可减轻大鼠肝脏缺血再灌注损伤^[8-9],其对人肝细胞缺血再灌注损伤的影响尚不清楚。因此,本研究观察不同浓度瑞芬太尼预处理对人肝细胞缺氧复氧损伤的保护作用,探讨瑞芬太尼预处理的适宜浓度,为临床预防和减轻肝脏缺血再灌注损伤提供体外实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

HL7702 肝细胞株(购自中国科学院上海生命科学研究所);注射用盐酸瑞芬太尼(宜昌人福药业有限责任公司,规格:1 mg,批号:国药准字 H20030197);高糖 DMEM 培养基;高糖 DMEM/F12=1:1 培养基;胎牛血清(美国 Thermo Fisher 公司);无糖 DMEM 培养基、胰酶、MTT、DMSO

均来源于美国 Invitrogen 公司;94% N₂-5%CO₂-1%O₂ 混合气体(医院供气中心提供);ALT、AST、LDH 生化检测试剂盒(美国 Beckman-Coulter 公司);Western 及 IP 细胞裂解液、PMSF、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、MDA 检测试剂盒均购自碧云天生物技术研究所;CO₂ 培养箱(Shel-Lab 2300);电热恒温孵育箱(上海跃进医疗器械厂);缺氧培养盒(长沙长锦科技有限公司;GasAlert Extreme 氧气检测仪(加拿大 BW Technologies);酶标仪(美国 BioTek Epoch);全自动生化仪(美国 Beckman LX20)。

1.2 方法

1.2.1 细胞复苏和培养 将冻存于液氮中的细胞株于 37℃ 恒温水浴箱中快速复温融化,加入完全培养基(含 10%胎牛血清和 22.5% F12 的高糖 DMEM 培养基)混悬,按 $5 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 25 mL 玻璃培养瓶中,放入 37℃、5% CO₂、95%空气、饱和湿度的 CO₂ 培养箱中孵育,次日更换 1 次培养基,以后每 48 h 更换 1 次培养基。待细胞长满瓶底 80%~90%,以含 0.25%胰酶和 0.02% EDTA 的细胞消化液消化传代,继续培养。

1.2.2 细胞分组 台盼蓝排斥试验检测肝细胞存活率,活细胞率>95%的细胞作为实验样本。将细胞以 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL 。混匀后放入 CO₂ 培养箱中培养 24 h。将细胞分为 11 组:①正常对照组(N 组);②

缺氧复氧组(IR 组); ③瑞芬太尼预处理组(RE1~RE8 组); ④生理盐水组(NS 组)。

1.2.3 瑞芬太尼预处理 N 组和 IR 组以每孔 100 μL 新鲜的完全培养基更换, RE1~RE8 组分别每孔加入 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的瑞芬太尼溶液 10 μL 和新鲜的完全培养基 90 μL , NS 组每孔加入生理盐水 10 μL 和新鲜的完全培养基 90 μL 。混匀, 放入 CO_2 培养箱中孵育 1 h。

1.2.4 缺氧复氧损伤模型的建立 参照高毅等^[10] 和何英等^[11] 的研究方法。N 组每孔用 100 μL 完全培养基更换, 放入 CO_2 培养箱中继续培养 8 h。IR 组、RE 组和 NS 组每孔用 100 μL 无糖 DMEM 培养基置换完全培养基, 放入缺氧培养盒中, 培养盒中放入盛有 50 mL 灭菌水的无菌小瓶保持饱和湿度, 将缺氧培养盒放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育箱中, 进气口连接 94% N_2 -5% CO_2 -1% O_2 混合气体, 出气口连接氧气检测仪, 以 2 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 的气体流量通入混合气体, 当氧气检测仪显示出气口氧气浓度<1% 时, 调节混合气体流量 300 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 维持出气口氧气浓度<1%。缺氧 8 h, 以此模拟在体缺血过程。之后每孔分别以 100 μL 新鲜的完全培养基置换, 放入 CO_2 培养箱中正常条件下(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95% 空气、饱和湿度)培养 4 h, 模拟在体再灌注过程。

1.2.5 指标测定 各指标在复氧结束即刻检测。

1.2.5.1 MTT 法检测肝细胞活力 每孔加入 5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 MTT 溶液 20 μL , 放入 CO_2 培养箱中继续孵育 4 h。终止培养, 吸弃孔内上清液, 每孔加入 100 μL DMSO 溶液, 微量振荡器上振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。选择 570 nm 波长, 在酶标仪上测定各孔光吸收度(A)。吸光度越大表明活细胞数量越多, 细胞活力越强。

1.2.5.2 肝细胞功能指标测定^[12] 收集各孔细胞培养液于 Ep 管中, 按照试剂盒说明书全自动生化仪下检测 AST、ALT 和 LDH 水平。

1.2.5.3 细胞内 MDA 测定 按 Western 及 IP 细胞裂解液说明书裂解肝细胞, 收集裂解上清液, 分别按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒和 MDA 检测试剂盒说明书操作, 计算出样品溶液中的蛋白含量和 MDA 含量, 用单位重量的蛋白含量来表示样品中的 MDA 含量($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$ 蛋白)。

1.2.6 统计学分析 使用 SPSS 13.0 软件包进行统计学处理。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 浓度-效应关系采用曲线拟

合, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度瑞芬太尼预处理对肝细胞活力的影响

与 N 组比较, 各组肝细胞活力均降低($P<0.05$)。IR 组细胞活力与 NS 组之间差异无统计学意义。在不同浓度的瑞芬太尼预处理组中, 与 IR 组和 NS 组比较, RE2~RE6 组细胞活力有所上升($P<0.05$), 而 RE1、RE7 和 RE8 组细胞活力无明显增强($P>0.05$)。细胞活力随着瑞芬太尼预处理浓度的升高而上升, 在瑞芬太尼浓度为 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时达高峰, 随后瑞芬太尼预处理浓度的升高反而逐渐回落, 当瑞芬太尼预处理浓度达 40 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 细胞活力与 IR 组之间差异无统计学意义。肝细胞活力和瑞芬太尼预处理浓度之间呈 3 次模型关系, 回归方程为 $y=1.648+0.057x-0.03x^2+3.468\times 10^{-5}x^3$ ($R^2=0.382$, $P<0.01$)。结果见图 1。

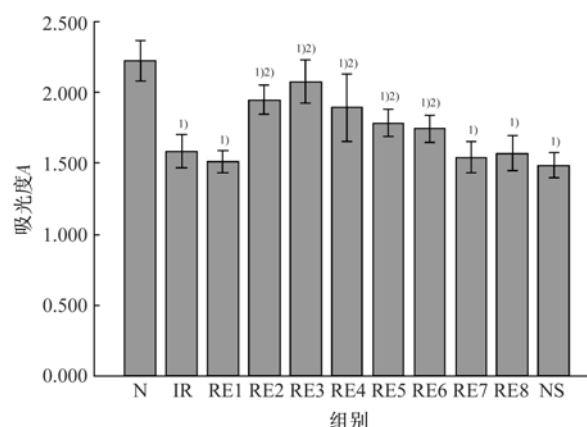


图 1 不同浓度瑞芬太尼预处理下缺氧复氧损伤肝细胞活力的变化趋势

与 N 组比较, ⁽¹⁾ $P<0.05$; 分别与 IR 组和 NS 组比较, ⁽²⁾ $P<0.05$

Fig 1 The trend of cell viability at different concentrations of remifentanyl preconditioning on hepatic hypoxia-reoxygenation injury

Compared with group N, ⁽¹⁾ $P<0.05$; compared with group IR and group NS respectively, ⁽²⁾ $P<0.05$

2.2 不同浓度瑞芬太尼预处理对缺氧复氧损伤肝细胞培养液中 AST、ALT、LDH 水平的影响

与 N 组相比, 各组肝细胞培养液中 AST、LDH 水平明显升高($P<0.05$), 而 ALT 水平未见明显改变($P>0.05$)。IR 组与 NS 组之间差异无统计学意义。在不同浓度的瑞芬太尼预处理组中, 与 IR 组和 NS 组比较, RE2~RE6 组细胞培养液中 AST、LDH 水平下降($P<0.05$), 而 RE1、RE7 和 RE8 组差异则无统计学意义($P>0.05$)。AST、LDH 水平随着瑞芬太尼预处理浓度的升高而降低, 在瑞芬太尼浓度

为 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时最低, 随后瑞芬太尼预处理浓度的升高反而逐渐回升, 当瑞芬太尼预处理浓度达 $40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, AST、LDH 水平与 IR 组之间差异无统计学意义。AST、LDH 水平与瑞芬太尼预处理浓度之间均呈 3 次模型关系, 回归方程分别为 $y(\text{AST})=30.975-0.614x+0.026x^2-2.633 \times 10^{-4}x^3$ ($R^2=0.491$, $P<0.01$), $y(\text{LDH})=242.713-6.033x+0.270x^2-0.003x^3$ ($R^2=0.481$, $P<0.01$)。结果见图 2 和图 3。

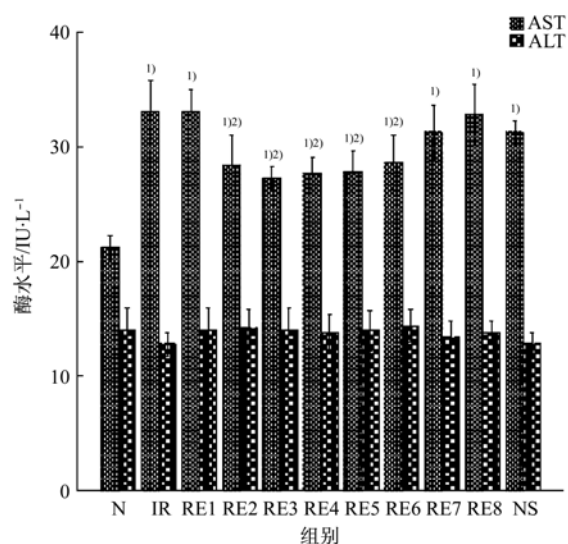


图 2 肝细胞培养液中 ALT、AST 水平的变化趋势
与 N 组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 分别与 IR 组和 NS 组比较, ²⁾ $P<0.05$

Fig 2 The trends of ALT and AST at different concentrations of remifentanyl preconditioning on hepatic hypoxia-reoxygenation injury
Compared with group N, ¹⁾ $P<0.05$; compared with group IR and group NS respectively, ²⁾ $P<0.05$

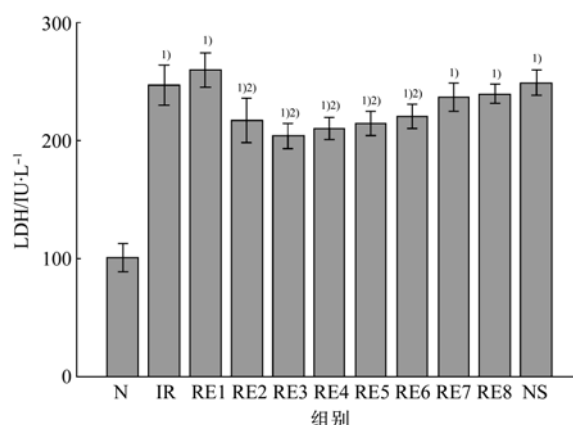


图 3 肝细胞培养液中 LDH 水平的变化趋势
与 N 组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 分别与 IR 组和 NS 组比较, ²⁾ $P<0.05$

Fig 3 The trend of LDH at different concentrations of remifentanyl preconditioning on hepatic hypoxia-reoxygenation injury

Note: Compared with group N, ¹⁾ $P<0.05$; compared with group IR and group NS respectively, ²⁾ $P<0.05$

2.3 不同浓度瑞芬太尼预处理对缺氧复氧损伤肝细胞内 MDA 含量的影响

与 N 组相比, 各组肝细胞内 MDA 含量明显升高($P<0.05$)。IR 组与 NS 组差异无统计学意义。在不同浓度的瑞芬太尼预处理组中, 与 IR 组和 NS 组比较, RE2~RE6 组肝细胞内 MDA 含量下降($P<0.05$), 而 RE1、RE7 和 RE8 组则无明显改变($P>0.05$)。肝细胞内 MDA 含量随着瑞芬太尼预处理浓度的升高而降低, 在瑞芬太尼浓度为 $5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时最低, 随后随着瑞芬太尼预处理浓度的升高反而逐渐回升, 当瑞芬太尼预处理浓度达 $40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 与 IR 组之间差异无统计学意义。肝细胞内 MDA 含量与瑞芬太尼浓度之间呈 3 次模型关系, 回归方程为 $y=227.863-7.278x+0.336x^2-0.004x^3$ ($R^2=0.382$, $P<0.01$)。结果见图 4。

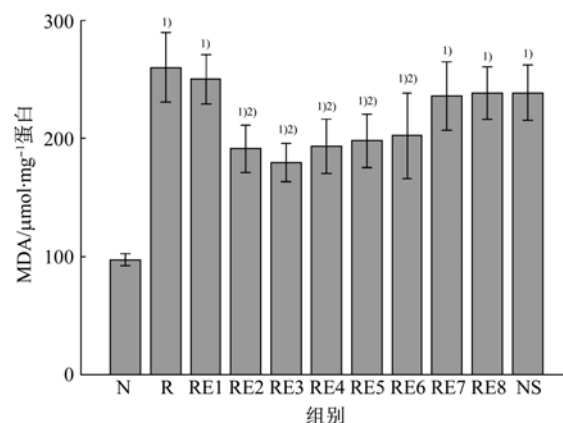


图 4 不同浓度瑞芬太尼预处理下缺氧复氧损伤肝细胞内丙二醛含量的变化情况

与 N 组比较, ¹⁾ $P<0.05$; 分别与 IR 组和 NS 组比较, ²⁾ $P<0.05$

Fig 4 The trend of intracellular MDA at different concentrations of remifentanyl preconditioning on hepatic hypoxia-reoxygenation injury

Compared with group N, ¹⁾ $P<0.05$; compared with group IR and group NS respectively, ²⁾ $P<0.05$

3 讨论

HL7702 肝细胞株来源于成人肝组织, 其结构和生理功能与在体肝细胞接近, 通过体外培养 HL7702 肝细胞株, 最大限度地模拟在体肝脏缺血再灌注过程中供氧、供能的变化, 在体外建立缺氧复氧损伤模型, 这一方法在研究中广泛应用。本研究参照高毅等^[10]和何英等^[11]的研究方法, 经过多次改良后, 选择缺氧 8 h, 复氧 4 h 作为本研究的适宜模型。

肝脏缺血再灌注损伤是一个多因素多环节共同参与、机制复杂的病理过程。其机制主要是大

量氧自由基的产生、细胞内钙超载和微血管损伤等。大量的氧自由基能够使膜脂质过氧化反应增强,丙二醛产量增加。因此,测定肝细胞内的丙二醛含量能反映肝细胞受氧自由基损伤的程度,从而间接反映肝细胞缺血再灌注损伤的程度。多项研究证明^[13-14],肝细胞凋亡在肝脏缺血再灌注损伤中发挥重要作用,并且肝细胞凋亡的程度与肝脏的生化参数相平行,呈正相关^[15]。本研究也显示,与N组比较,各组肝细胞活力降低,培养液中AST、LDH水平和肝细胞内MDA含量上升($P<0.05$)。而培养液中ALT水平各组之间未见明显改变($P>0.05$),可能是因为离体肝细胞的ALT活性易受其他细胞毒性物质的影响,从而影响了测定结果^[16]。

本研究显示,瑞芬太尼预处理(RE2~RE6组)使肝细胞对之后经历的缺氧复氧损伤的耐受力增强,表现为肝细胞活力增强,细胞内生物酶的逸出量和丙二醛的生成量减少。有文献报道^[1-2,17],瑞芬太尼预处理能够模拟缺血预处理的作用,对心肌缺血再灌注具有保护作用,其机制是通过激活心肌的 κ 、 δ 阿片受体和心外的 μ 阿片受体共同起作用的。人类肝脏中分布有 μ 阿片受体^[18],推测瑞芬太尼的肝脏保护作用可能与激活此受体有关。

本研究还发现,瑞芬太尼预处理对缺氧复氧损伤肝细胞的保护作用与浓度并非呈线性相关。RE1、RE7和RE8组虽然也给予了瑞芬太尼预处理,但是肝脏的缺氧复氧损伤并未减轻,与IR组差异无统计学意义($P>0.05$)。RE2~RE6组随着瑞芬太尼浓度的增大,其保护作用先增强,在瑞芬太尼浓度为 $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时最强,而后保护作用开始减弱,达 $40\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时无保护作用。既往研究证实^[19-20],阿片受体激动剂吗啡预处理能剂量依赖地产生心肌保护作用,当吗啡浓度高于 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 才具有心肌保护作用,在 $0.1\sim 1.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内,该作用随着浓度的升高而增强,但当浓度过高(达 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),其对心肌细胞的保护作用会丧失一部分而有减弱趋势,表明这种化合物的浓度-效应曲线是铃形的,其中的原因尚不明确,可能是其高浓度时激动细胞膜上的另一种受体而拮抗其在低浓度时激活的受体的心肌保护作用。本研究显示,瑞芬太尼肝脏保护作用的浓度-效应曲线在 $0\sim 50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内亦呈铃形,推测其可能机制与吗啡

类似。

Yang等^[9]在大鼠原代培养肝细胞缺血再灌注损伤前,分别以不同浓度瑞芬太尼预处理,发现浓度 $>1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 瑞芬太尼预处理使缺血再灌注损伤肝细胞活力增强,而 $0.1\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 瑞芬太尼不能增强缺血再灌注肝细胞的活力。Shirasawa等^[21]探讨高剂量的阿片类麻醉药是否会加剧家兔的脊髓损伤,发现高剂量的瑞芬太尼(瑞芬太尼最大剂量的2倍)复合低浓度的异氟烷并不会加剧家兔脊髓的缺血再灌注损伤。但另有文献报道^[22],在大鼠脑缺血再灌注损伤模型中,静脉给予 $50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 芬太尼之后以 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 持续输注30 min,或者静脉给予 $800\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 芬太尼之后以 $32\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 持续输注30 min,在大鼠脑缺血再灌注损伤18 h后,可见其组织病理学改变加重。由于药物理化性质的不同,不同组织、器官细胞的生化特点不同,以及生物种属的差异,瑞芬太尼预处理的适宜浓度范围可能存在差异。本研究选择与人肝细胞结构与功能最为相近的HL7702肝细胞株作为研究对象,发现 $1\sim 30\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 瑞芬太尼预处理可以减轻肝细胞缺氧复氧损伤,而 $0.5, 40, 50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 瑞芬太尼预处理则无类似作用。可见,瑞芬太尼预处理浓度在 $1\sim 30\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 较为合适。这与瑞芬太尼的临床有效血药浓度范围是 $1\sim 20\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[23]大致相符合。而其保护作用在 $5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时最强,这也与临床应用中,瑞芬太尼的靶控血药浓度约为 $5\sim 8\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[24-25]相一致。

本研究使用的注射用盐酸瑞芬太尼配方中含有甘氨酸辅剂,每1 mg注射用盐酸瑞芬太尼粉剂中含量为15 mg^[26]。近年来有研究表明,游离的甘氨酸具有显著的肝脏保护作用,其肝脏保护的浓度为 $0.06\sim 2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[27]。其中,甘氨酸能通过多方面机制减轻肝脏缺血再灌注损伤,并呈剂量依赖性^[28]。Nagatomi等^[29]报道, $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘氨酸对95% N_2 -5% CO_2 缺氧培养5 h的肝细胞具有保护作用。本研究中,RE8组(瑞芬太尼浓度最高组,为 $50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)甘氨酸终浓度为 $0.01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,RE1~RE7组中的甘氨酸浓度均 $<0.01\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,这远低于具有保护作用的甘氨酸最低有效浓度 $0.06\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因此,本研究中未设立相应浓度的甘氨酸对照组。

综上所述,瑞芬太尼预处理能够减轻肝细胞

缺氧复氧损伤,起到肝脏保护作用。其中,临床有效血药浓度($1\sim 30\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)瑞芬太尼预处理对肝细胞缺氧复氧损伤具有保护作用,而低浓度($0.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)和高浓度($\geq 40\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$)瑞芬太尼预处理则无此作用,其具体机制有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] ZHANG Y, IRWIN M G, WONG T M. Remifentanyl preconditioning protects against ischemic injury in the intact rat heart [J]. *Anesthesiology*, 2004, 101(4): 918-923.
- [2] SUN H T, XUE F S, LIN K P, et al. Effect of remifentanyl preconditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Acta Acad Med Sin(中国医学科学院学报)*, 2009, 31(5): 612-615.
- [3] JIA L L, CAO D R, ZHANG W Z, et al. Effects of remifentanyl pretreatment on the brain tissue MDA and SOD activity in rats induced by cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Guid China Med(中国医药指南)*, 2010, 8(5): 27-29.
- [4] JIA L L, CAO D R, ZHANG W Z, et al. Effects of remifentanyl pretreatment on neuronal apoptosis and Bcl-2 Bax expression in rats induced by cerebral ischemia-reperfusion [J]. *Chin Rem Clin(中国药物和临床)*, 2010, 10(2): 171-173.
- [5] VIANNA P T G, CASTIGLIA Y M M, BRAZ J R C, et al. Remifentanyl, isoflurane, and preconditioning attenuate renal ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(10): 4080-4082.
- [6] CHEN M, LIU B J, ZHANG J L, et al. The influence of remifentanyl preconditioning on the oxidative damage by renal ischemia-reperfusion in rats [J]. *China Med Rep(中国医药导报)*, 2009, 6(36): 35-37.
- [7] CLAVIEN P A, SELZNER M, RUDIGER H A, et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning [J]. *Ann Surg*, 2003, 238(6): 843-850.
- [8] HAO X Q, TAO G C, GU J T, et al. The protective effects of remifentanyl pretreatment on hepatocyte mitochondrial function against ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *Chin J Anesthesiol(中华麻醉学杂志)*, 2008, 28(3): 259-262.
- [9] YANG L Q, TAO K M, LIU Y T, et al. Remifentanyl preconditioning reduces hepatic ischemia-reperfusion injury in rats via inducible nitric oxide synthase expression [J]. *Anesthesiology*, 2011, 114(5): 1036-1047.
- [10] GAO Y, SHAN Y Q, WANG Y, et al. Induction of HSP70 during hepatocyte hypoxic preconditioning [J]. *Chin J Exp Surg(中华实验外科杂志)*, 2004, 21(2): 147-149.
- [11] HE Y, LI Y P, LI S F, et al. Effect of hypoxia/reoxygenation (H/R) on expression of MICA and MICB in human hepatocytes [J]. *J Sichuan Univ(Med Sci Edi)(四川大学学报: 医学版)*, 2005, 36(2): 157-160.
- [12] HUANG B N, WU Y, GE Q F, et al. Hepatoprotective effects of N-acetylcysteine injection on tetrachloride-induced injury in primary rat hepatic cells [J]. *Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学)*, 2011, 28(9): 795-798.
- [13] GUJRAL J S, BUCCI T J, FARHOOD A, et al. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rat: apoptosis or necrosis [J]. *Hepatology*, 2001, 33(2): 397-405.
- [14] XU W H, YE Q F, XIA S S. Apoptosis and proliferation of intrahepatic bile duct after ischemia-reperfusion injury [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis In*, 2004, 3(3): 428-432.
- [15] KUO P C, DRACHENBERG C I, DE-LA-TORRE A, et al. Apoptosis and hepatic allograft reperfusion injury [J]. *Clin Transplant*, 1998, 12(3): 219-223.
- [16] ZHANG X S, ZHANG M L. Effect of potassium cyanide on alanine aminotransferase activity in the isolated rat hepatocyte injury [J]. *Tianjin Med J(天津医药)*, 1995, 23(5): 267-269.
- [17] ZHANG Y, IRWIN M G, WONG T M, et al. Remifentanyl preconditioning confers cardioprotection via cardiac kappa- and delta-opioid receptors [J]. *Anesthesiology*, 2005, 102(2): 371-378.
- [18] CHAKASS D, PHILIPPE D, ERDUAL E, et al. μ -Opioid receptor activation prevents acute hepatic inflammation and cell death [J]. *Gut*, 2007, 56(7): 974-981.
- [19] LIANG B T, GROSS G J. Direct preconditioning of cardiac myocytes via opioid receptors and K_{ATP} channels [J]. *Circ Res*, 1999, 84(12): 1396-1400.
- [20] LI H, XIAO Y B, YANG T D, et al. Effect of morphine preconditioning on ischemia-reperfusion injury in cultured adult rat cardiac myocytes [J]. *J Clin Anesthesiol(临床麻醉学杂志)*, 2005, 21(8): 546-548.
- [21] SHIRASAWA Y, MATSUMOTO M, YOSHIMURA M, et al. Does high-dose opioid anesthesia exacerbate ischemic spinal cord injury in rabbits? [J]. *J Anesth*, 2009, 23(2): 242-248.
- [22] KOFKE W A, GARMAN R H, GARMAN R, et al. Opioid neuro-toxicity: fentanyl-induced exacerbation of cerebral ischemia in rats [J]. *Brain Res*, 1999, 818(2): 326-334.
- [23] SERVIN F S, BILLARD V. Remifentanyl and other opioids [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2008(182): 283-311.
- [24] GUIGNARD B, MENIGAUX C, DUPONT X, et al. The effect of remifentanyl on the bispectral index change and hemodynamic responses after orotracheal intubation [J]. *Anesth Analg*, 2000, 90(1): 161-167.
- [25] BILLARD V, SERVIN F, GUIGNARD B, et al. Desflurane-remifentanyl-nitrous oxide anaesthesia for abdominal surgery: optimal concentrations and recovery features [J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2004, 48(3): 355-364.
- [26] MYLAN INSTITUTIONAL LLC. Ultiva, remifentanyl hydrochloride. Glaxo wellcome, kalamazoo, MI: USA, 5866591 [P]. 1996-07-12.
- [27] MA Z W, DONG J H. The protective effects of glycine on liver [J]. *Dig Surg(消化外科)*, 2003, 2(3): 214-220.
- [28] HABIB M M, HODGSON H J, DAVIDSON B R. The role of glycine in hepatic ischemia-reperfusion injury [J]. *Curr Pharm Des*, 12(23): 2953-2967.
- [29] NAGATOMI A, SAKAIDA I, MATSUMURA Y, et al. Cytoprotection by glycine against hypoxia-induced injury in cultured hepatocytes [J]. *Liver*, 1997, 17(2): 57-62.

收稿日期: 2012-11-19