

· 基础研究 ·

大鼠急性肠缺血模型中血清肠脂肪酸结合蛋白和D-乳酸浓度与缺血时间和肠组织损伤的相关性

石 卉, 吴本俨*, 王昌正, 王卫华, 刘文徽

(解放军总医院南楼临床部消化内科, 北京 100853)

【摘要】目的 探索大鼠急性肠缺血模型的血清肠脂肪酸结合蛋白(I-FABP)和D-乳酸(D-Lac)浓度与缺血时间、肠黏膜损伤的相关性。**方法** 建立大鼠肠系膜前动脉缺血模型,按照缺血时间随机分为6组:假手术组(空白对照),缺血30min, 60min, 90min, 120min, 150min组,每组10只。ELISA法分析各组血清I-FABP和D-Lac水平。免疫组化法评估受损肠黏膜组织I-FABP含量。对病变组织进行损伤评分,评估血清I-FABP和D-Lac水平与组织损伤的相关性。**结果** 大鼠肠缺血30min时血清I-FABP浓度明显升高,于90min达到峰值[(1741.37 ± 184.12) mg/L], I-FABP抗体染色阳性率达 72.5% ($P < 0.05$);大鼠肠缺血60min时血清D-Lac浓度开始升高,随缺血时间延长, D-Lac浓度升高越明显 ($P < 0.05$)。小肠黏膜损伤评分结果提示,缺血时间越长,组织损伤评分越高。Spearman等级相关非参数检验结果表明,血清D-Lac浓度与组织损伤评分正相关($r = 1$);血清I-FABP浓度与组织损伤评分无相关性($r = 0.6$)。**结论** 血清I-FABP在大鼠急性肠缺血早期明显升高,达到峰值后随缺血时间的延长而下降,血清D-Lac在缺血中后期升高明显,可反映肠组织损伤程度。

【关键词】 脂肪酸结合蛋白质类; 乳酸; 缺血

【中图分类号】 R574

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2013.00133

Correlation of serum intestinal fatty acid binding protein and D-lactate with ischemic time and intestinal injury in acute mesenteric ischemia rats

SHI Hui, WU Ben-Yan*, WANG Chang-Zheng, WANG Wei-Hua, LIU Wen-Hui

(Department of Geriatric Gastroenterology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】 Objective To investigate the correlation of the serum levels of intestinal fatty acid binding protein (I-FABP) and D-lactate (D-Lac) with ischemic time and intestinal mucosa injury in rats with acute mesenteric ischemia. **Methods** A total of 60 rats were randomly and equally divided into 6 groups, that is, sham-operation group and 5 mesenteric ischemia groups according to mesenteric artery occluded for 30, 60, 90, 120 and 150 min respectively. Their serum levels of I-FABP and D-Lac were determined by ELISA. The content of I-FABP in the damaged intestinal mucosa was measured by immunohistochemical assay. Histopathological analysis was performed in the injured intestinal mucosa to evaluate the score of injury. The correlation of serum levels of I-FABP and D-Lac with tissue injury was analyzed. **Results** The serum I-FABP level was significantly increased from 30 min after ischemia, and reached a peak at 90 min [(1741.37 ± 184.12)mg/L], and the cells positive to I-FABP accounted for 72.5% ($P < 0.05$). The serum level of D-Lac was significantly increased from 60 min after ischemia and showed a time-dependent manner ($P < 0.05$). The score of injury was also increased with the extent of ischemic time. Spearman's rank correlation non-parameter test indicated that the serum level of D-Lac was positively correlated with intestinal mucosa injury ($r = 1$), but that of I-FABP had no such correlation ($r = 0.6$). **Conclusions** Serum I-FABP is increased at the early stage of acute mesenteric ischemia, and then after reaching peak, decreased with the elapse of ischemic time. Serum D-Lac is obviously increased at the late stage, and might be used to predict the severity of intestinal ischemic injury.

【Key words】 fatty acid-binding proteins; lactic acid; ischemia

This work was supported by the Central Science Research Project of Healthcare (B2009A105) and the Innovation Foundation of Geriatric Division of Chinese PLA General Hospital.

Corresponding author: WU Ben-Yan, E-mail: benyanwu@vip.sina.com

收稿日期: 2012-11-01; 修回日期: 2013-01-09

基金项目: 中央保健专项资金科研课题(B2009A105); 解放军总医院南楼创新基金

通信作者: 吴本俨, Tel: 010-66876265, E-mail: benyanwu@vip.sina.com

急性肠缺血 (acute mesenteric ischemia, AMI) 时由于急性的肠壁动脉血供不足或静脉回流障碍, 从而引起肠壁的营养障碍或运动障碍, 其主要并发症为肠管节段性坏死^[1]。该病起病急骤, 早期症状、体征不典型, 误诊率及病死率较高, 尚缺少特异性生物标志物^[2], 当出现明显的腹膜炎体征以及特异性影像学表现时, 病情往往已经进入晚期, 其临床表现为肠管坏死、中毒性休克、多器官功能衰竭等, 严重危及患者生命。尽管其在诊断技术和治疗方法已有一些进展, 但急性肠缺血的死亡率仍高达60%~80%^[2], 误诊率达80%~95%^[3]。本研究旨在探索大鼠急性肠缺血模型血清肠脂肪酸结合蛋白 (intestinal fatty acid binding protein, I-FABP) 和D-乳酸 (D-lactate, D-Lac) 浓度与缺血时间、肠黏膜损伤的相关性, 以期急性肠缺血早期血清标志物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

抗I-FABP单克隆抗体 (Sigma公司, 美国), D-Lac测定试剂盒 (嘉美生物, 中国), ELISA免疫试剂盒 (Cayman chemical, 美国), 酶标仪 (DENLEY DRAGON Wellscan MK 3, 芬兰), 分析软件 (Ascent software for Multiskan), 离心机 (TGL-168)。

1.2 实验动物和分组

健康成年雄性Wistar大鼠60只 (250~300g), 购于解放军总医院动物实验中心。标准饲料饲养, 大鼠自由摄食和饮水。在进行实验前, 大鼠最少饲养1周以适应实验室环境。采用随机数字表法, 将大鼠随机分为6组: 假手术组 (空白对照)、缺血30min组、缺血60min组、缺血90min组、缺血120min组、缺血150min组, 每组10只。

1.3 动物造模

手术前实验动物禁食24h, 自由饮水。手术当日, 大鼠称重后, 10%水合氯醛 (5mg/kg) 腹腔注射麻醉。麻醉成功后, 大鼠取背卧位固定于解剖垫, 腹部手术区备皮, 碘伏消毒。取腹部正中切口, 长3~4cm, 逐层剪开腹壁各层进入腹腔。将小肠向左侧外置于温生理盐水浸湿的无菌纱布垫上, 显露肠系膜前动脉, 在其主动脉起源处向远端钝性分离出1~2cm, 靠近其根部用一个无创性微血管夹夹闭肠系膜前动脉, 阻断血流, 观察肠系膜区无血管搏动, 肠色泽变苍白, 肠蠕动消失从而确认肠缺血诱导完成。假手术组仅开腹, 显露肠系膜前动脉, 不进行缺血处理。之后, 将

外置的小肠还纳腹腔, 用两把小血管钳夹闭腹膜暂时关腹。同时右侧股静脉插管至下腔静脉, 用于持续输液 [生理盐水 5ml/(kg·h)]。根据分组既定时间, 打开腹腔, 经腹主动脉抽血7~10ml, 截取自幽门向下小肠组织约15cm, 按上、中、下各5cm分瓶放入10%中性缓冲福尔马林溶液固定, 大鼠开放性气胸致死, 手术完毕。实验期间, 用加热灯照射手术区以维持大鼠体温恒定, 所有大鼠肠系膜前动脉阻断后给予生理盐水50ml/kg皮下注射以扩容抗休克, 手术操作遵循无菌术原则。

1.4 实验标本预处理

1.4.1 血清标本制备及测定 各组动物实验终点, 通过腹主动脉穿刺采集全血样本7~10ml, 采血时注意防止溶血。37℃静置20min使血液凝固, 低温离心机4℃ 2000转/min离心20min分离血清, 取上清液3~5ml于-80℃保存备用。依据ELISA试剂盒说明书测定标本中I-FABP和D-Lac的浓度。

1.4.2 肠组织标本损伤评分 各组实验终点, 动物处死前, 截取自幽门向下小肠组织约15cm, 按上、中、下各5cm分段, 迅速用冷生理盐水溶液冲洗, 清除黏液、污物等肠腔内容物后, 立即分瓶置入10%中性缓冲福尔马林溶液, 固定后石蜡包埋。依据Park/Chiu肠组织损伤评级系统, 进行半定量的肠组织病理学评级。采用Kurt等^[4]的评分系统: 0级, 正常组织黏膜; 1级, 上皮表面受损, 肠绒毛尖端上皮下间隙轻度增大; 2级, 黏膜局灶溃疡, 上皮层从固有层消失或上皮下间隙增大程度中等以上; 3级, 局灶透壁性溃疡, 部分绒毛消失或大量上皮层消失; 4级, 大面积透壁性溃疡, 大量绒毛消失, 毛细血管暴露扩张; 5级, 大面积透壁性溃疡、出血, 固有层中断。

1.5 统计学处理

所用统计学描述和分析均在SPSS17.0统计包上进行。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。生化指标分析采用单因素方差分析 (one-way analysis of variance, ANOVA) 及Student-Newman-Keuls post-hoc analysis评价各分组之间的差异。对于组织病理学评级, 组间差异的比较采用Kruskal-Wallis检验及Mann-Whitney U检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各缺血时间组血清I-FABP和D-Lac浓度测定

各组血清I-FABP和D-Lac浓度的变化如表1所示。缺血30min时血清I-FABP浓度即开始升高, 缺

血90min血清I-FABP浓度达到峰值 ($P < 0.05$)，其后随着缺血时间的延长，I-FABP浓度逐渐下降。缺血60min时D-Lac开始升高，随缺血时间延长，D-Lac浓度升高越明显 ($P < 0.05$)。

表1 各组血清I-FABP和D-Lac浓度的变化
Table 1 Serum I-FABP and D-Lac concentration in rats of each group ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Group	D-Lac(ng/L)	I-FABP(mg/L)
Sham-operation group	0.72 ± 0.18	22.62 ± 5.33
Mesenteric ischemia group		
30min	0.97 ± 0.15	$713.28 \pm 68.43^*$
60min	$1.53 \pm 0.16^*$	$1227.61 \pm 197.28^*$
90min	$2.76 \pm 0.35^*$	$1741.37 \pm 184.12^*$
120min	$3.62 \pm 0.31^*$	$1372.17 \pm 151.71^*$
150min	$5.81 \pm 0.28^*$	$1096.74 \pm 163.82^*$

I-FABP: intestinal fatty acid binding protein; D-Lac: D-lactate. Compared with sham-operation group, $^*P < 0.05$

2.2 I-FABP 免疫组化结果

经I-FABP抗体以及DAB染色后，正常小鼠肠黏膜镜下染色阳性率为9.2%，缺血90min组，镜下染色阳性总个数、阳性总面积以及阳性率均为最高（平均72.5%；图1），缺血120min组镜下阳性率平均61.2%，缺血150min组镜下阳性率平均值为44.8%。

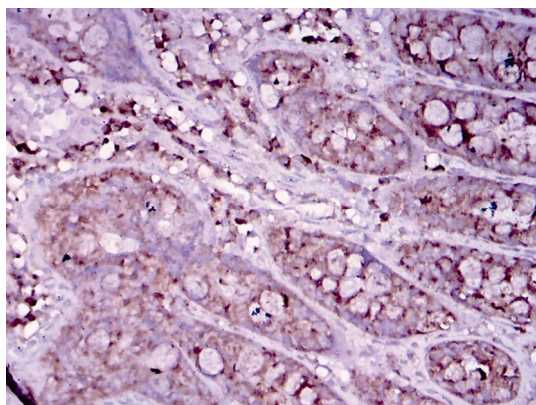


图1 缺血90min时I-FABP染色结果(阳性率最高达72.5%)
Figure 1 Immunohistochemical staining of I-FABP at 90min with positivity rate of 72.5% (DAB ×400)

2.3 小肠黏膜损伤评分统计

假手术组小肠壁柔软温暖，系膜动脉搏动有力，色泽正常，蠕动均匀，约8次/min。其余各组缺血早期，可观察到小肠、盲肠和部分结肠色泽苍白，肠管痉挛变细，蠕动明显增快，约12次/min。随着缺血时间延长，缺血150min时，肠管无蠕动，肠壁颜色发黑，温度明显降低，但未见肠管穿孔。具体评分如表2所示。结果提示缺血时间越长，组织损伤评分越高。

表2 各组小肠黏膜损伤评分
Table 2 Histopathological scores of intestinal mucosa in different groups (n)

Group	0	1	2	3	4	5
Sham-operation group	8	2	0	0	0	0
Mesenteric ischemia group						
30min	4	5	1	0	0	0
60min	1	1	6	2	0	0
90min	0	0	2	3	3	2
120min	0	0	0	2	5	3
150min	0	0	0	0	3	7

2.4 I-FABP和D-Lac与小肠黏膜组织损伤相关性分析

Spearman等级相关非参数检验结果表明，血清D-Lac浓度与组织损伤正相关 ($r = 1$)；血清I-FABP浓度与组织损伤评分无相关性 ($r = 0.6$)。

3 讨 论

I-FABP属于细胞质脂肪酸结合蛋白家族成员，富含于肠黏膜上皮绒毛中，正常情况下，周围血管中I-FABP含量很低，但当遭受炎症、缺氧、缺血及再灌注损害时，肠上皮细胞通透性增加，I-FABP释出，通过毛细血管及毛细淋巴管进入血循环，可在周围血中检测出^[5]。I-FABP具有如下特点^[6]：(1)是存在于胞质中的可溶性蛋白；(2)具有较高组织特异性；(3)组织含量丰富；(4)分子量低，易于检测。有研究表明：由于I-FABP更多的位于绒毛的顶端，在缺血早期能比肝脂肪酸结合蛋白(liver fatty acid binding protein, L-FABP)更早释放入血达到有效浓度^[7]。赵海东等^[8]用大鼠制作肠缺血模型，测定血清中的I-FABP含量，并与乳酸脱氢酶和肌酸激酶同工酶含量进行比较，发现肠缺血45min后血清I-FABP含量最高。刘牧林等^[9]应用大鼠缺血再灌注模型，分别于肠缺血15min、肠缺血45min、肠缺血45min再灌注2h、肠缺血45min再灌注6h测定I-FABP浓度，发现缺血45min时I-FABP达峰值，而且I-FABP浓度与肠组织损伤程度正相关。

本研究发现，I-FABP在肠缺血30min即明显升高，90min达到峰值，而后随着缺血时间的延长，其水平下降。I-FABP浓度与组织损伤程度无相关性，但是在缺血早期，即缺血90min内，I-FABP与组织损伤程度正相关。病变肠组织免疫组化也显示：缺血90min组镜下染色阳性总个数、阳性总面积以及阳性率均为最高（68.3%~76.4%），进一步验证了此时被破坏的肠黏膜组织释放的I-FABP总量最高。本研究采用结扎大鼠肠系膜前动脉的方式造模，发现在

持续肠缺血的情况下,血清I-FABP的浓度与肠组织损伤无相关性。考虑血清I-FABP浓度下降系由于缺血中后期富含I-FABP的肠黏膜绒毛组织破坏殆尽所致,提示当I-FABP水平下降时,缺血损害已侵及肠黏膜肌层。

D-Lac是肠道内细菌的主要酵解产物之一,肠道菌群中多种细菌都可以产生,发生肠缺血时,正常肠黏膜屏障被破坏,导致其通透性增加,致使血清D-Lac浓度升高^[10]。D-Lac具有以下特点^[11]:(1)肠道通透性发生改变时即可引起血中D-Lac的浓度变化;(2)人体内自身不产生D-Lac,且无D-Lac的代谢酶类,浓度相对稳定;(3)D-Lac为肠道内细菌代谢产物,其浓度改变具有较强的特异性。在本研究中,D-Lac水平在肠缺血早期升高不明显,自缺血60min开始明显升高,随着肠缺血时间的延长而持续明显升高,D-Lac与组织损伤具有明显相关性,提示D-Lac可作为判定肠黏膜损伤的指标。但在肠缺血早期,D-Lac浓度变化不明显。

综上所述,I-FABP在缺血90min内与肠组织损伤正相关,诊断敏感性较高,血清D-Lac在缺血60min后与肠组织损伤正相关。两种指标均能准确反应肠黏膜损伤,如果I-FABP升高,而D-Lac正常,说明肠黏膜受到损伤,但肠黏膜屏障尚完整;如果I-FABP和D-Lac同时升高,说明肠黏膜屏障可能已经受到破坏。因此,可考虑联合采用这两种指标,建立诊断模型用于急性肠缺血的早期诊断。

【参考文献】

- [1] 中华医学会老年医学分会. 老年人缺血性肠病诊治中国专家建议[J]. 中华老年医学杂志, 2011, 30(1): 1-6.
- [2] Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, *et al.* Acute mesenteric ischaemia: a clinical review[J]. Arch Intern Med, 2004, 164(10): 1054-1062.
- [3] Brandt LJ, Boley SJ. AGA technical review on intestinal ischemia[J]. Gastroenterology, 2000, 118(9): 954-968.
- [4] Kurt Y, Akin ML, Demirbas S, *et al.* D-dimer in the early diagnosis of acute mesenteric ischemia secondary to arterial occlusion in rats[J]. Eur Surg Res, 2005, 37(4): 216-219.
- [5] Pelsers MM, Hermens WT, Glatz JF. Fatty acid binding proteins as plasma markers of tissue injury[J]. Clin Chim Acta, 2005, 352(1-2): 15-35.
- [6] 石 卉, 吴本俨. 肠脂肪酸结合蛋白在缺血性肠病中的研究进展[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2011, 10(6): 556-559.
- [7] Kanda T, Tsukahara A, Ueki K, *et al.* Diagnosis of ischemic small bowel disease by measurement of serum intestinal fatty acid-binding protein in patients with acute abdomen: a multicenter, observer-blinded validation study[J]. J Gastroenterol, 2011, 46(4): 492-500.
- [8] 赵海东, 田晓峰, 郭 健, 等. 肠型脂肪酸结合蛋白对肠缺血早期诊断的意义[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13 (7): 513-516.
- [9] 刘牧林, 张 嘉. 肠脂肪酸结合蛋白和D-乳酸早期诊断肠缺血-再灌注损害的实验研究[J]. 中华创伤杂志, 2006, 22(10): 767-770.
- [10] Evennett NJ, Petrov MS, Mittal A, *et al.* Systematic review and pooled estimates for the diagnostic accuracy of serological markers for intestinal ischemia[J]. World J Surg, 2009, 33(7): 1374-1383.
- [11] Block T, Nilsson TK, Bjorck M, *et al.* Diagnostic accuracy of plasma biomarkers for intestinal ischaemia[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2008, 68(3): 242-248.

(编辑: 王雪萍)