

兔肾下腹主动脉阻断对子宫缺血/再灌注损伤的影响

王海霞¹, 陈先侠¹, 卢晓倩¹, 季燕雯¹, 孙嘉敏¹, 江梅花¹, 刘敏¹, 孔令霞¹, 汪陶荣², 陈晓宇²

摘要 **目的** 观察家兔肾下腹主动脉不同时间阻断后, 血清细胞因子改变及子宫再灌注损伤情况, 探讨腹主动脉阻断的安全性。**方法** 将40只家兔随机分为4组, 分别为肾下腹主动脉阻断20 min(B)、40 min(C)、60 min(D)组和假手术组(A), 每组10只。假手术组不予阻断, 其他3组均接受肾下腹主动脉阻断后再灌注处理。分别在术前(T_0)、再灌注10 min(T_1)、再灌注40 min(T_2)和再灌注90 min(T_3)抽取颈静脉血, 酶联免疫吸附试验法(ELISA)检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)浓度的变化; 再灌注90 min后, 将兔处死, 取子宫组织, 观察光镜下子宫肌层组织变化, 采用免疫组织化学SP法和Western blot检测子宫肌肉组织中Toll样受体4(TLR4)和核因子- κ B/p65(NF- κ B/p65)的表达, 并进行相关性分析。**结果** ①C组在 T_1 时点IL-6浓度高于A组和B组, 在 T_2 和 T_3 时间点TNF- α 、IL-6浓度均高于A组和B组($P < 0.05$), D组在再灌注后各时间点血清TNF- α 、IL-6浓度均高于其他3组($P < 0.05$); ②A组子宫肌间组织结构正常, B组、C组、D组随着缺血时间延长, 炎症细胞浸润逐渐加重, 间质肿胀明显; ③子宫肌层组织中TLR4、NF- κ B/p65蛋白表达在B、C、D3组明显升高, 且随着缺血时间的延长, 呈上升趋势, 尤其在C组和D组($P < 0.05$)。**结论** 随着家兔肾下腹主动脉阻断时间的延长, 再灌注损伤越严重, 腹主动脉阻断20 min是较为安全时效, 阻断40 min内损伤较小, 相对安全。

关键词 缺血/再灌注损伤; 腹主动脉阻断; NF- κ B/p65; Toll样受体4

中图分类号 R 71

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)09-1400-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.09.014

随着“二胎”政策的实施, 瘢痕子宫再次妊娠的

孕妇明显增加, 胎盘植入的发生率呈上升趋势。在胎盘植入患者剖宫产术中, 临床目前常常采用腹主动脉球囊阻断术, 即通过阻断腹主动脉减少出血, 但阻断腹主动脉易造成子宫缺血/再灌注损伤(ischemia/reperfusion injury, I/RI), 子宫平滑肌收缩乏力, 易引起孕妇产后出血的发生^[1]。I/RI的程度与缺血时间有关^[2], 如何在有效的阻断时间内尽量减少并发症的发生亟待解决。同时, 再灌注子宫损伤的发病机制尚未完全阐明, 但研究^[3]表明, Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)和核因子- κ B/p65(nuclear factor- κ B/p65, NF- κ B/p65)与I/RI关系密切。为进一步明确腹主动脉阻断后再灌注导致子宫平滑肌损伤, 收缩乏力, 该研究通过阻断家兔肾下腹主动脉建立I/RI动物模型, 观察血清炎症细胞因子改变以及不同缺血/再灌注时间点家兔子宫组织TLR4和NF- κ B/p65表达情况, 探讨腹主动脉阻断的安全时效和部分机制, 为临床安全应用腹主动脉阻断术提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 ①实验动物: 健康清洁级新西兰白兔40只, 雌性, 体质量(2.07 ± 0.31) kg, 饲养环境温度20℃, 湿度40%, 由安徽医科大学动物实验中心提供。②试剂盒: 兔和人白介素-6(interleukin-6, IL-6)及肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA试剂盒购自上海碧云天试剂公司; 羊抗兔TLR4、NF- κ B、 β -actin一抗购自美国Santa Cruz生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制备 将雌兔随机分为4组, 分别为假手术组(A)、缺血20 min组(B)、缺血40 min组(C)、缺血60 min组(D), 每组10只兔子, 兔子用20%乌拉坦(5 ml/kg)麻醉, 左侧卧位固定于手术台上, 右下腹部切口, 暴露腹主动脉, 在髂总动脉分叉上方1.0 cm用动脉夹阻断腹主动脉, 至阻断平面以下动脉搏动消失为准, 阻断相应时间后去除动脉夹恢复血流。假手术组(A): 手术步骤同缺血组, 暴露腹主动脉, 但不作腹主动脉阻断。

2019-04-26 接收

基金项目: 安徽省2017年公益性技术应用研究联动计划项目(编号: 1704f0804043)

作者单位: ¹安徽医科大学附属妇幼保健院危急重症产科, 合肥 230001

²安徽医科大学组胚教研室, 合肥 230032

作者简介: 王海霞, 女, 硕士研究生;

陈先侠, 女, 硕士, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: chenxx391@sohu.com;

陈晓宇, 男, 博士, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: chenxy@ahmu.edu.cn

1.2.2 标本采集 B、C、D 3 组分别在术前(T_0)、再灌注 10 min(T_1)、再灌注 40 min(T_2) 和再灌注 90 min(T_3) 4 个时间点抽取 2 ml 颈静脉血, 对照组在与 D 组相同时间点抽血, 以 2 000 r/min 离心后取血清, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。再灌注 90 min 后, 处死家兔, 取部分子宫组织, 10% 甲醛固定 48 h 后脱水, 石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察子宫结构改变。另取部分子宫组织样本, 转移至液氮中冷藏备用。

1.2.3 ELISA 法检测血清 TNF- α 、IL-6 浓度 操作步骤按说明书进行, 于波长 450 nm 检测样本光密度 (optical density, OD) 值, 绘制标准液曲线, 从曲线中得出各组血清中 TNF- α 和 IL-6 浓度。

1.2.4 免疫组织化学 SP 法检测子宫 TLR4、NF- κ B/p65 表达和结果数量判定 操作步骤按照使用说明书进行。组织常规脱水、石蜡包埋, 厚 4 μm 连续切片, 烤片、脱蜡、微波抗原修复, 山羊血清封闭, 滴加一抗 (1:200 稀释) 50 μl , $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 冲洗后滴加生物素标记的二抗 (1:200 稀释) 50 μl , 滴加 DAB 工作液显色, 苏木精复染, 中性树胶封固。以 PBS 代替一抗为阴性对照。利用 Nikon 4500 显微镜摄片, TLR4、NF- κ B 表达阳性染色结果为细胞质或胞核染色成棕黄色。

1.2.5 Western blot 法检测蛋白的表达 按照 BCA 试剂盒说明书, 取冻存的子宫组织, 组织匀浆后提取和测定组织蛋白, 调整上样蛋白质浓度, 行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 分离 1.5 h 后, 200 mA 恒流下 2 h, 转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后, PBST (10 min $\times$ 3 次) 洗去封闭液, 羊抗 TLR4、NF- κ B/p65 和 β -actin 多克隆抗体 (稀释度均为 1:1 000), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日, 摇床上 PBST (10 min $\times$ 3 次) 洗涤后, 将 PVDF 膜放入通用型二抗中, 在摇床上 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温箱中孵育 0.5 h。ECL 显色, Image J 软件半定量进行分析, 以 β -actin 为内参, 比较子宫组织 TLR4、NF- κ B/p65 条带与 β -actin 的 OD 值, 进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 23.0 进行统计分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间重复测量资料采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 TNF- α 、IL-6 浓度指标重复测量方差分析结果 TNF- α 的组间比较差异有统计学意义 ($F = 10\ 906.626, P < 0.001$), 各时间点比较差异有统计学意义 ($F = 9\ 260.965, P < 0.001$), 组间与时间点之间存在交互效应 ($F = 4\ 241.84, P < 0.001$)。

IL-6 的组间比较差异有统计学意义 ($F = 175\ 188.5, P < 0.001$), 各时间点比较差异有统计学意义 ($F = 73\ 139.39, P < 0.001$), 组间与时间点之间存在交互效应 ($F = 40\ 778.52, P < 0.001$), 见表 1。

通过各组 TNF- α 、IL-6 两两比较, 各组在 T_0 时, 血清 TNF- α 、IL-6 浓度差异无统计学意义; D 组在 T_1 、 T_2 、 T_3 时间点血清 TNF- α 、IL-6 浓度均高于其他 3 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); C 组在 T_1 时点 IL-6 浓度高于 A 组和 B 组, 在 T_2 和 T_3 时间点 TNF- α 、IL-6 浓度均高于 A 组和 B 组, 但明显低于 D 组 ($P < 0.05$); A 组和 B 组在各个时间点差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 2。随着再灌注时间的延长, C 组和 D 组 TNF- α 、IL-6 表达呈明显上升趋势, 在 T_2 和 T_3 时刻达到持平。

表 1 TNF- α 、IL-6 指标重复测量方差分析结果

指标	F 值 (组间)	P 值	F 值 (时间)	P 值	F 值(组 间 $\times$ 时间)	P 值
TNF- α	10 906.626	<0.001	9 260.965	<0.001	4 241.84	<0.001
IL-6	175 188.5	<0.001	73 139.39	<0.001	40 778.52	<0.001

表 2 4 组血清细胞因子浓度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mg/ml}$)

组别	时间点	TNF- α	IL-6
A	T_0	19.256 $\pm$ 1.393	101.768 $\pm$ 0.721
	T_1	20.427 $\pm$ 0.933	105.366 $\pm$ 1.167
	T_2	20.751 $\pm$ 0.496	108.553 $\pm$ 0.773
	T_3	21.464 $\pm$ 0.891	105.694 $\pm$ 0.781
B	T_0	19.701 $\pm$ 0.906	101.272 $\pm$ 0.610
	T_1	20.286 $\pm$ 0.736	105.402 $\pm$ 0.776
	T_2	21.684 $\pm$ 0.763	108.420 $\pm$ 0.967
	T_3	21.781 $\pm$ 0.723	106.559 $\pm$ 1.595
C	T_0	19.517 $\pm$ 0.753	101.357 $\pm$ 0.797
	T_1	21.457 $\pm$ 1.258	116.246 $\pm$ 0.821* #
	T_2	45.426 $\pm$ 1.490* #	157.422 $\pm$ 0.889* #
	T_3	44.504 $\pm$ 1.125* #	155.098 $\pm$ 1.494* #
D	T_0	19.168 $\pm$ 0.759	101.292 $\pm$ 0.765
	T_1	51.774 $\pm$ 1.615* # Δ	248.702 $\pm$ 1.004* # Δ
	T_2	105.331 $\pm$ 1.587* # Δ	374.222 $\pm$ 1.339* # Δ
	T_3	104.992 $\pm$ 1.167* # Δ	375.917 $\pm$ 1.319* # Δ

与 A 组比较: * $P < 0.05$; 与 B 组比较: # $P < 0.05$; 与 C 组比较: $\Delta P < 0.05$

2.2 子宫内膜光镜下变化 D 组子宫内膜组织细胞及间质明显水肿, 渗出增加, 肌纤维排列紊乱, 部分溶解, 可见较多炎细胞浸润和充血; C 组子宫内膜组织细胞及间质肿胀, 肌纤维排列尚整齐, 部分细胞及间质可见炎细胞浸润减少, 明显轻于 D 组; A 组和 B 组子宫内膜组织细胞及间质、肌纤维结构清

晰,内膜子宫腺体几乎无炎细胞浸润。见图1。

2.3 免疫组织化学 SP 法检测组织 TLR4、NF- κ B/p65 蛋白的表达 免疫组织化学 SP 法结果显示,相对于未阻断血流的 A 组,TLR4 阳性染色结果在 B、C、D 3 组表达较高,且随着缺血时间的延长,TLR4 阳性染色表达呈现正相关趋势,阳性表达由子宫腺间质逐渐向肌间结缔组织弥散,见图2; NF- κ B/p65 阳性染色结果与 TLR4 相类似,相对于未阻断血流的 A 组,NF- κ B/p65 阳性染色表达在 B、C、D 3 组中随着缺血时间的延长,呈现正相关趋势,而对照 A 组表达明显降低。见图3。

2.4 Western blot 检测子宫肌组织中 TLR4、NF- κ B/p65 蛋白表达情况 Western blot 结果显示,正常对照组子宫组织中 TLR4、NF- κ B/p65 蛋白低表达,而腹主动脉阻断后的 B、C、D 3 组 TLR4、NF- κ B 蛋白表达升高,且随着阻断时间的延长,C 组、D 组

TLR4、NF- κ B 蛋白表达较正常对照明显升高;应用 Image J 软件比较灰度比值,C 组和 D 组子宫肌组织中 TLR4/ β -actin、NF- κ B/ β -actin 较对照组升高,差异有统计学意义($F=5.037, P<0.05$),见图4。

3 讨论

剖宫产术后,再次妊娠孕妇中胎盘植入患者明显增多,为减少剖宫产术中出血,常常需要阻断腹主动脉,但阻断血流时间过长,复灌时会发生平滑肌 I/RI^[1]。同时,在缺血/再灌注过程中,炎症反应被证实多种器官或组织的损伤中发挥重要作用^[2]。在缺血阶段,炎症细胞向肌肉组织及间质浸润以及产生氧化应激,加剧缺血损伤,导致子宫平滑肌收缩功能障碍。在剖宫产术应用腹主动脉阻断术中,部分患者再次恢复血流后出现子宫瘫软,收缩不佳,子宫血管窦不能闭合导致大量出血,严重威胁患者的

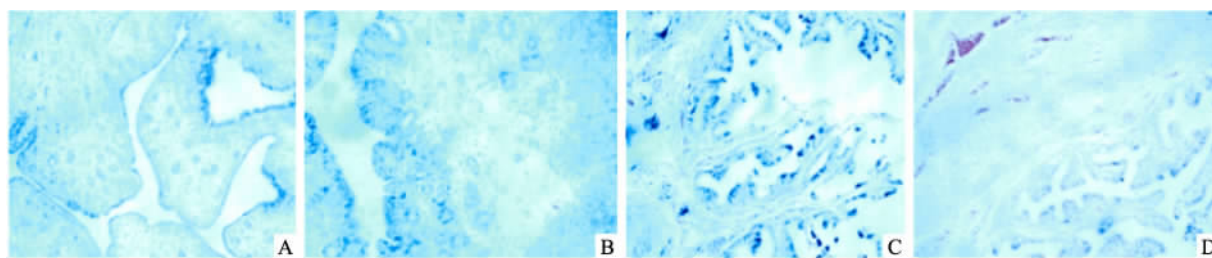


图1 4组兔子宫内膜光镜表现 HE $\times 100$

A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组

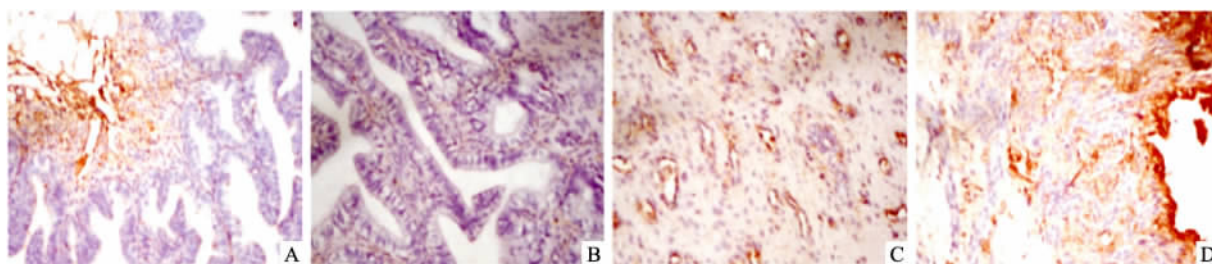


图2 4组兔子宫组织 TLR4 阳性表达情况 SP $\times 200$

A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组

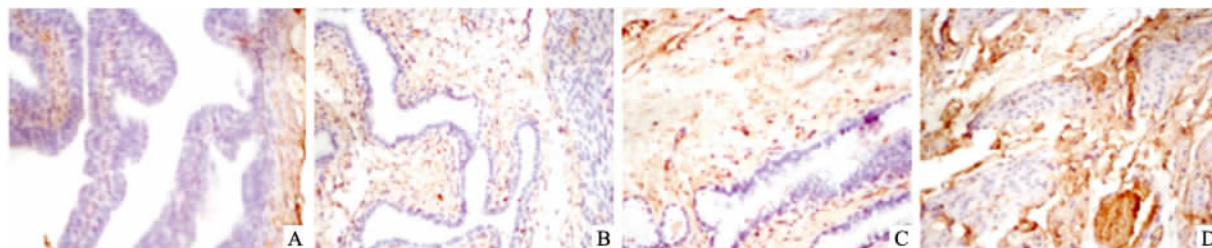


图3 4组兔子宫组织 NF- κ B/p65 阳性表达情况 SP $\times 200$

A: A 组; B: B 组; C: C 组; D: D 组

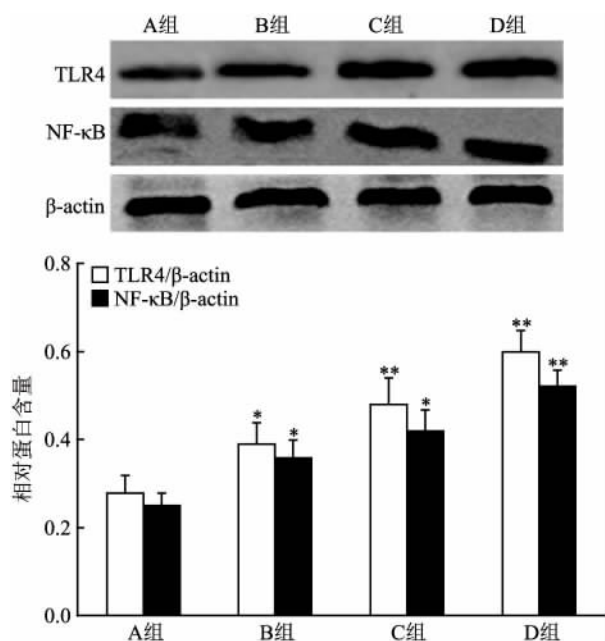


图4 子宫组织中 TLR4、NF-κB/p65 蛋白表达情况
与 A 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

生命安全。目前对于腹主动脉阻断的安全时限的探讨都以临床表现为依据,无客观实验验证。本研究通过不同时间阻断家兔腹主动脉,观察子宫内膜和平滑肌的损伤程度,结果表明,在 20 min 内的腹主动脉阻断中,子宫内膜间质水肿和炎细胞浸润不明显,是较为理想的阻断腹主动脉安全时间点。

炎症反应在 I/RI 中越来越受到重视, Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs) 与炎症反应有关,其中 TLR4 是 TLRs 家族的重要亚型之一,近年研究^[4]显示 I/RI 与 TLR4 信号通路的激活有关, TLR4 活化后可以上调 TNF-α、IL-6 等炎症因子的表达。TNF-α 主要由单核-巨噬细胞分泌,激活血管内的炎性细胞,诱导产生 IL-6 等炎症因子的释放,严重缺血时可诱使多形核白细胞堵塞小毛细血管,加重组织缺血损伤^[5]。本研究中, T_0 时, 各组血清 TNF-α、IL-6 浓度处于较低水平; 腹主动脉阻断后 B 组在 T_1 、 T_2 、 T_3 3 个时间点血清 TNF-α、IL-6 浓度升高不明显,但随着腹主动脉阻断时间延长, C 组和 D 组在再灌注后血清 TNF-α、IL-6 浓度均升高,炎症反应加重,且 D 组再灌注损伤最明显,其在再灌注后各时间点 TNF-α、IL-6 浓度均较其他 3 组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

NF-κB 是 TLR 下游信号通路居中心地位的转录因子,抑制 TLR 下游级联反应中的 NF-κB 可以减轻炎症反应^[6]。NF-κB 能与多种基因启动子或增强子上的 κB 位点发生特异性结合并促使基因转录,

参与调节炎症过程中多种细胞因子和细胞黏附因子表达,在感染性疾病和自身免疫性疾病的发病中可能发挥重要作用^[7]。在哺乳类细胞中有 5 种 NF-κB 家族成员,其中 p65 是 NF-κB 家族中的一个重要亚基,在炎症反应中的作用明确^[8]。研究^[9]表明,子宫 I/RI 可导致能量代谢障碍,引起氧化应激,促进炎症细胞浸润。本实验同时检测了各组雌兔血清 TNF-α、IL-6 和子宫平滑肌 TLR4、NF-κB/p65 的表达情况,结果表明,对照组各时点血清及子宫平滑肌组织中各指标含量差异无统计学意义,提示缺血/再灌注造成了子宫平滑肌损伤。有研究^[10]表明,缺血/再灌注的大鼠子宫存在氧自由基和炎症因子大量产生的病理状态,推测子宫缺血导致能量代谢障碍,局部细胞因子、炎症介质激活导致自由基产生,再灌注后,子宫释放大自由基和炎症因子导致子宫肌纤维损伤。通过减轻 I/RI 过程中的炎症反应可能起到保护子宫 I/RI 的作用,缺血的时间直接影响再灌注损伤的严重程度。本研究显示,缺血再灌注后各时点血清 TNF-α、IL-6 含量均升高,随着缺血时间以及再灌注时间的延长, TNF-α、IL-6 表达呈上升趋势。B 组血清中 TNF-α 及 IL-6 浓度随着再灌注时间的延长都略有升高,但与缺血前比较差异无统计学意义,且 B 组子宫平滑肌中 TLR4、NF-κB/p65 表达较少,因此可以推断腹主动脉阻断 20 min 内是安全的。C 组在再灌注后血清 TNF-α 及 IL-6 浓度明显升高,但升高程度均小于 D 组,在光镜下, C 组子宫平滑肌损伤较轻,呈现可逆性损伤,因此腹主动脉阻断 40 min 造成的 I/RI 较轻。

综上所述,本动物实验验证阻断 20 min 是阻断兔腹主动脉的安全时效,在必要情况下可延长至 40 min,对机体损伤较小。此安全时效可为临床使用腹主动脉球囊阻断技术提供参考依据,但本研究仅仅检测部分器官缺血再灌注损伤情况,仍需进一步实验检测多脏器以更全面地验证其安全性。

参考文献

- [1] 陈二峰, 谈启松, 马春春, 等. 局灶性脑缺血/再灌注损伤对小鼠脑组织平滑肌细胞 α-SMA 表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(1): 58-62.
- [2] Olthof P B, van Golen R F, Meijer B, et al. Warm ischemia time-dependent variation in liver damage, inflammation, and function in hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2017, 1863(2): 375-85.
- [3] Williams T M, Wise A F, Layton D S, et al. Phenotype and influx kinetics of leukocytes and inflammatory cytokine production in

- kidney ischemia/reperfusion injury [J]. *Nephrology (Carlton)*, 2018, 23(1): 75–85.
- [4] Zhu Q, He G, Wang J, et al. Down-regulation of toll-like receptor 4 alleviates intestinal ischemia reperfusion injury and acute lung injury in mice [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(8): 13678–89.
- [5] Nunes K P, Bomfim G F, Toque H A, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) impairs nitric oxide contributing to Angiotensin II-induced cavernosal dysfunction [J]. *Life Sci*, 2017, 191: 219–26.
- [6] Qu Z, Xiao G. Systematic detection of noncanonical NF- κ B activation [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1280: 121–54.
- [7] Tian J, Zhang F J, Lei G H. Role of integrins and their ligands in osteoarthritic cartilage [J]. *Rheumatol Int*, 2015, 35(5): 787–98.
- [8] 王金海, 张婷卓, 赵敏, 等. 头穴针刺调控局灶性脑缺血大鼠海马旁回 NF- κ B p65 mRNA、I κ B mRNA 表达的实验研究 [J]. 针刺研究, 2018, 43(9): 556–61.
- [9] Miura M, Fu X, Zhang Q W, et al. Neutralization of Gro α and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury [J]. *Am J Pathol*, 2010, 159(6): 2137–45.
- [10] Kisu I, Umene K, Adachi M, et al. Allowable warm ischemic time and morphological and biochemical changes in uterine ischemia/reperfusion injury in cynomolgus macaque: a basic study for uterus transplantation [J]. *Hum Reprod*, 2017, 32(10): 2026–35.

Effect of rabbit lower abdominal aortic occlusion on uterine ischemia/reperfusion injury

Wang Haixia, Chen Xianxia, Lu Xiaoqian, et al

(*Dept of Critical Obstetrics, Affiliated Maternal and Child Health Care Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001*)

Abstract Objective To observe the changes of serum cytokines and uterine reperfusion injury after blocking the infrarenal abdominal aorta in rabbits for different time, and to explore the safety of abdominal aortic occlusion.

Methods 40 rabbits were randomly divided into 4 groups: lower extremity abdominal aorta blockade for 20 min (B), 40 min (C), 60 min (D) group and sham operation group (A), with 10 rats in each group. The sham operation group was not blocked, and the other 3 groups were treated with reperfusion after renal lower abdominal aorta occlusion. Ulgular vein blood was taken before surgery (T_0), reperfusion for 10 min (T_1), reperfusion for 40 min (T_2), and reperfusion for 90 min (T_3). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect changes in the concentration of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) in serum. After 90 min of reperfusion, the rabbits were sacrificed and the uterus tissue was taken to observe the changes of myometrial tissue under light microscopy. The expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor- κ B/p65 (NF- κ B/p65) in uterine muscle tissue was detected by immunohistochemistry SP and Western blot, also with correlation analysis.

Results ① The concentration of IL-6 in group C was higher than that in group A and group B at T_1 time point. The concentrations of TNF- α and IL-6 in group C were higher than those in group A and group B at the T_2 and T_3 time points ($P < 0.05$). The serum levels of TNF- α and IL-6 were higher than those of the other three groups at each time point after reperfusion ($P < 0.05$). ② As the uterine myenteric tissue structure became normal in group A, group B, group C and group D. The blood time prolonged, the inflammatory cell infiltration gradually increased, and the interstitial swelling was obvious. ③ The expression of TLR4 and NF- κ B/p65 protein in the myometrium was significantly increased in the B, C, and D groups, and with the prolongation of ischemia time, an upward trend appeared, especially in group C and group D ($P < 0.05$).

Conclusion With the prolongation of the inferior abdominal aorta in rabbits, the reperfusion injury becomes more serious. Abdominal aorta occlusion for 20 min is a safe aging, 40 min blocking internal injury is relatively small and relatively safe.

Key words ischemia-reperfusion injury; abdominal aortic occlusion; NF- κ B/p65; TLR4