

# 高压氧对疲劳大鼠肝损伤的保护作用\*

滕进忠<sup>1</sup> 袁春华<sup>2,3</sup> 黄春玲<sup>1</sup> 邹丽丽<sup>1</sup> 杨博<sup>1</sup>

## 摘要

**目的:**探讨高压氧暴露对疲劳大鼠肝脏损伤的保护作用及机制。

**方法:**4周龄健康雄性(Sprague Dawley, SD)大鼠30只,随机分为3组:对照组、疲劳模型组、疲劳高压氧暴露组,每组10只。建立大鼠游泳致力竭疲劳模型并通过高压氧暴露进行恢复;8周实验后取每只大鼠两块肝脏组织,其中一块取每只大鼠的肝脏相同部位,光镜观察肝脏组织的病理变化;另一块取肝右叶5g,制备成10%的肝组织匀浆,检测匀浆液的丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量的变化。

**结果:**①疲劳高压氧暴露组大鼠游泳时间明显长于疲劳模型组( $P < 0.05$ )。②对照组、疲劳模型组和疲劳高压氧暴露组大鼠肝脏组织MDA含量存在显著性差异( $P < 0.01$ ),进一步两两比较显示,疲劳模型组MDA含量显著高于其他两组( $P < 0.01$ );并且三组肝脏组织SOD活性存在显著性差异( $P < 0.01$ ),进一步两两比较发现,疲劳模型组SOD活性显著低于其他两组( $P < 0.01$ )。③对照组肝组织结构正常,疲劳模型组肝索断裂明显,肝窦变窄,中央静脉结构紊乱,肝小叶内轮廓不清,肝细胞肿胀,核变大,胞浆空淡明显可见,部分肝小叶中出现散在的点灶状坏死肝细胞,经高压氧治疗后,疲劳高压氧暴露组中央静脉仍然扩张并伴有淤血,但结构完整,肝索断裂呈散在分布,较疲劳模型组稍有缓解。

**结论:**高压氧暴露能有效加长大鼠游泳时间,降低疲劳大鼠肝脏MDA含量,提高SOD活性,改善肝脏组织的病理变化,从而对疲劳大鼠肝脏损伤起到保护作用。

**关键词** 运动疲劳;高压氧;肝脏;丙二醛;超氧化物歧化酶

中图分类号:R575, R459.6 文献标识码:A 文章编号:1001-1242(2013)-05-0409-04

A study on the protective role of hyperbaric oxygen on liver injury in fatigue rats/TENG Jinzhong, YU-AN Chunhua, HUANG Chunling, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2013, 28(5): 409—412

## Abstract

**Objective:** To explore the protective role and mechanism of hyperbaric oxygen(HBO) exposure on liver injury in fatigue rats.

**Method:** Thirty healthy male SD rats at 4 weeks of age, were randomly divided into 3 groups: control group, fatigue model group, fatigue model HBO exposure group, each group of 10. Rat models of exhaust swimming to fatigue were established and applied to HBO exposure. After 8 week experiment two blocks of liver tissue were taken from each rat. Of which one block was taken from the same part of rats' livers and pathological changes of liver tissues were observed under light microscopic. The other block was taken from the right lobe of liver and was prepared for 10% liver homogenate to detect the content of MDA and the activity of SOD.

**Result:** ①The swimming time of rats in HBO exposure group was significantly longer than that in fatigue model group ( $P < 0.05$ ); ②The content of MDA of rats liver tissue in three groups had significant differences( $P < 0.01$ ). Further comparison showed that the content of MDA in fatigue model group was significantly higher than that in

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2013.05.005

\*基金项目:南京军区医学科研“十一五”计划项目(09MA056);江西省卫生厅科技项目(20113141)

1 解放军第九四医院康复科,南昌,330002; 2 江西科技师范学院体育学院; 3 通讯作者

作者简介:滕进忠,男,副主任医师; 收稿日期:2012-07-10

the other two groups ( $P < 0.01$ ). The activity of SOD in three groups had also significant differences ( $P < 0.01$ ), and activity of SOD in fatigue model group was also significantly lower than that in the other two groups ( $P < 0.01$ ); ③ The hepatic tissue structure was normal in control group, while in fatigue model group, the hepatic cord ruptured, hepatic sinusoidal narrowed, central venous disordered, hepatic lobule contour were not clear, liver cell swelled, nuclear enlarged, cytoplasm became pale obviously, and scattering points of focal necrosis of liver cells appeared in a part of liver lobules. After HBO therapy, although central venous still dilatated and associated with congestion, the structures remained intact and hepatic cord rupture were scattered. So morphological structure of hepatic tissue in HBO group improved compared with the fatigue model group.

**Conclusion:** HBO exposure could effectively lengthen the rat's swimming time, reduce the content of MDA and elevate the activity of SOD of fatigue rat's liver, improve pathological changes of liver tissue. This proved that HBO exposure could effectively protect the damaged liver of fatigue rat.

**Author's address** Department of Rehabilitation, The 94th Hospital of the PLA, Nanchang, 330002

**Key word** exercise-induced fatigue; hyperbaric oxygen; liver; malondialdehyde; superoxide dismutase

肝脏作为机体代谢的重要器官,对疲劳机体物质和能量代谢起着至关重要的作用。机体力竭运动导致疲劳后,缺氧是重要特征之一<sup>[1]</sup>,肝脏的耗氧量仅次于大脑,对缺氧极为敏感,严重缺氧可影响肝脏的代谢和功能,进而加重疲劳的症状<sup>[2]</sup>。高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)治疗,是指在高于一个大气压的环境里吸入纯氧治疗疾病的方法,目前多用于各种急、慢性缺血缺氧性疾病,可有效改善脑缺血、脑血栓、心肺复苏后脑功能障碍等<sup>[3]</sup>。但关于HBO对疲劳大鼠肝脏损伤保护作用的研究国内外报道尚少,本文在建立大鼠游泳疲劳模型的基础上,采用高压氧暴露对疲劳大鼠进行恢复治疗,从运动时间、肝脏氧自由基指标及肝脏组织病理变化着手,观察高压氧对大鼠疲劳肝损害的保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

4周龄健康雄性SD大鼠30只,体重180—220g,由南昌大学医学院动物科学部提供(动物许可证编号:赣实动管第96021号),于中国人民解放军第九四医院动物实验中心进行实验。国家标准啮齿动物饲料分笼喂养,每笼5只,自由饮水和进食,饲养环境为室温22—24℃,相对湿度40%—55%,自然光照。

大鼠适应性饲养3d后,以每天30min的运动量进行适应性游泳3d,然后随机分为3组:对照组、疲劳模型组、疲劳高压氧暴露组,每组10只。

### 1.2 实验仪器和试剂

主要仪器有TDL252A型低速离心机、JY92-ZD超声粉碎匀浆机、游泳池、GYQ32型医用空气加压氧舱、鼠兔两用解剖台、TSJ-Q型全自动封闭式组织脱水机、YBL-Ⅲ型生物组织冷冻包埋机、LEI-CARM2016切片机、YT-6生物组织摊烤片机、光学显微镜及OLYMPUS BX52 VIEWER显微图像采集系统。主要试剂有丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量测定试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒,均由南京建成生物工程研究所提供。

### 1.3 运动训练方案

运动方式为游泳,游泳池直径150cm,水深80cm,水温36℃。正式开始实验前,先将大鼠称重,按体重的6%负重,以后每周周日上午称重1次,负重方法为每只大鼠尾根部缠绕相对重量的铝丝。疲劳模型组和疲劳高压氧暴露组均于每天下午5:00开始游泳直到大鼠力竭,力竭的标准是:大鼠游泳动作明显失调,沉入水底超过5s不能回到水面,力竭大鼠捞起后腹部紧贴地面,四肢颤抖,呼吸急促,从入水至力竭记录为游泳力竭时间,参照汶希等<sup>[4]</sup>运动性疲劳模型建立的方案,每日1次,共8周。

### 1.4 高压氧暴露方案

每天大鼠力竭后,疲劳模型组放回笼中休息,疲劳高压氧暴露组立即放入高压氧舱中进行高压氧恢复,对照组不游泳、不加高压氧。HBO暴露方案参照彭兆云等<sup>[5]</sup>方案结合实际略加调整,高压氧舱底置新鲜钠石灰,以0.01MPa/min的速率加压15min至0.25MPa(绝对压),高压停留60min(期间舱内一直

通氧,使舱内CO<sub>2</sub>浓度 < 0.05%, O<sub>2</sub>浓度 > 98%, 舱内温度 22—24℃), 暴露结束后, 匀速减压 15min 至常压出舱。每日 1 次, 连续暴露 8 周。

### 1.5 取材、肝组织匀浆制备及指标检测方法

于末次运动后, 用 3% 戊巴比妥钠 (0.25ml/100g) 腹腔注射麻醉, 3mm 后将大鼠仰卧固定于解剖台上, 剪开腹腔将大鼠肝脏暴露, 完整取出肝脏。肝组织匀浆制备称取 5g 肝组织, 用生理盐水作为匀浆介质, 按组织重量(g)/生理盐水(ml) = 1:9 将组织制备成 10% 组织匀浆: 将组织用眼科剪剪碎, 放入含有所需总量一半生理盐水的试管中, 将试管垂直插入盛有冰水的器皿中, 上下转动研磨数十次, 使组织充分匀浆化, 再将剩余的一半生理盐水倒入试管中, 最后将制备好的 10% 匀浆移入离心管内, 3000r/min 离心 10min, 取上清液待测。

按 MDA 含量测定试剂盒、SOD 活性检测试剂盒的方法检测并计算肝组织中 MDA、SOD 的含量。每只大鼠在取肝脏组织制备肝组织匀浆的同时, 于相同部位取肝组织一块, 立即投入 4% 多聚甲醛溶液中固定, 24h 后切成 1cm × 1cm × 3cm 大小, 常规石蜡包埋, 每个蜡块连续切片 5 张, 每张厚 5μm, 行 HE 染色。具体过程如下: 二甲苯脱蜡 → 梯度酒精脱水 → 苏木素染色 → 1% 盐酸酒精分化 → 1% 氨水水溶液返蓝 → 90% 伊红醇溶液染色 → 梯度酒精脱水 → 二甲苯透明 → 中性树胶封片 → 光镜观察并采集图片。

### 1.6 统计学分析

实验数据以均数 ± 标准差表示, 数据经 SPSS 10.0 软件包处理分析, 两个独立样本的计量资料采用 *t* 检验; 多个样本的计量资料采用单因素 ANOVA 法, 组间的多重比较如方差齐性时采用 LSD 法, 方差不齐时采用 Dunnett T3 法。

## 2 结果

### 2.1 高压氧暴露对游泳大鼠力竭时间的影响

疲劳高压氧暴露组平均游泳至力竭时间为 (8.38 ± 1.92) min, 疲劳模型组平均游泳至力竭时间为 (5.88 ± 1.55) min, 两组间存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。

### 2.2 高压氧暴露对大鼠肝脏 MDA、SOD 含量的影响

对照组、疲劳模型组和疲劳高压氧暴露组大鼠肝脏组织 MDA 含量存在显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 进一步两两比较显示, 疲劳模型组 MDA 含量显著高于其他两组 ( $P < 0.01$ ); 并且三组肝脏组织 SOD 活性也存在显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 进一步两两比较发现, 疲劳模型组 SOD 活性显著低于其他两组 ( $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 三组大鼠肝脏 MDA 及 SOD 含量的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

项目	对照组	疲劳模型组	疲劳高压氧暴露组
MDA 含量(nmol/mgprot)	22.48 ± 5.01	42.83 ± 9.86 <sup>①</sup>	27.43 ± 4.96 <sup>②</sup>
SOD 活性(U/mgprot)	119.74 ± 12.69	93.87 ± 8.73 <sup>①</sup>	113.95 ± 11.26 <sup>②</sup>

①与对照组比较  $P < 0.01$ ; ②与疲劳模型组比较  $P < 0.01$ 。

### 2.3 高压氧暴露对大鼠骨骼肌组织形态结构影响

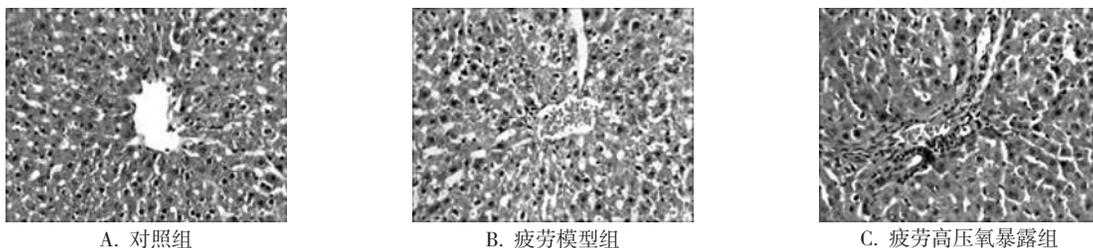
肝脏组织形态结构显示: 对照组中央静脉结构完整, 肝小叶结构清晰, 呈放射状排列, 肝窦明显可见, 未见坏死肝细胞 (图 1-A), 疲劳模型组肝索断裂明显, 肝窦变窄, 中央静脉结构紊乱, 肝小叶内轮廓不清, 肝细胞肿胀, 核变大, 胞浆空淡明显可见, 部分肝小叶中出现散在的点灶状坏死肝细胞 (图 1-B), 经高压氧治疗后, 疲劳高压氧暴露组中央静脉仍然扩张并伴有淤血, 但结构完整, 肝索断裂呈散在分布, 较疲劳模型组稍有缓解 (图 1-C)。

## 3 讨论

肝脏是机体的重要器官, 是机体物质代谢的中

图 1 三组大鼠肝脏组织

(HE, × 400)



A. 对照组

B. 疲劳模型组

C. 疲劳高压氧暴露组

心。剧烈运动时,机体血流量重新分配,造成肝脏出现缺血状态,进而损伤肝脏组织,而高压氧可有效改善机体缺血状态,促进机体组织的恢复。有研究<sup>[4]</sup>发现,缺血时间越长,肝脏损伤越严重:肝动脉结扎手术后第1天,肝细胞出现肿胀,出现大块肝梗死灶;手术后第3天,中央静脉周围细胞肿胀加重,部分成空泡样变性;手术后第7天,中央静脉附近细胞成大面积坏死;手术后第14天,大量炎细胞浸润,肝周坏死。经高压氧治疗后,肝脏损伤开始恢复,治疗时间越长,恢复效果越明显,手术后第7天,肝细胞肿胀基本恢复,手术后第14天,发现肝周血管再生,研究者认为,高压氧对急性缺血缺氧所造成的肝脏损害有一定的治疗作用。

有关高压氧治疗结扎肝动脉造成的急性肝损伤,一氧化碳中毒肝损伤,以及模拟高原急性缺氧条件下大鼠肝损伤的试验研究显示<sup>[5]</sup>,高压氧对这类肝损伤都有一定的保护作用,对疲劳大鼠肝损伤的保护作用的研究尚少见。高压氧对疲劳后肝脏损伤的保护机制可能与以下原因有关:①高压氧可提高肝脏组织的血氧分压,增加肝脏细胞病变区域氧的供应,加速病变细胞的修复。有研究指出<sup>[6-7]</sup>,高压氧能改善肝组织的血流量,提高组织氧储备,从而改变炎症病灶区域氧的供应,加快肝脏损伤的恢复。②高压氧可减少自由基的生成,同时通过提高机体抗氧化酶的活性,加快自由基的消除。一般情况下,高能磷酸化合物分解很慢,生成的氧自由基数量也很少,并能及时的被氧化分解,对细胞没有损害,但缺氧时,次黄嘌呤大量蓄积,使黄嘌呤脱氢酶迅速转化为黄嘌呤氧化酶,产生大量的自由基,损伤肝细胞。有研究发现<sup>[8]</sup>,运动后肝细胞膜出现空泡化溶解断裂现象,肝组织SOD活性升高、肝组织MDA含量下降,该研究者认为,肝组织自由基的数量和抗氧化能力,与肝组织的损伤存在明显的相关性。又有研究<sup>[9]</sup>发现,力竭次数越多,自由基含量越多,肝脏损伤也越明显,1次力竭运动后,小鼠肝组织MDA含量明显下降,并出现滑面内质网扩张的现象;7次力竭运动后,小鼠肝组织MDA含量呈现非常显著性下降,部分肝细胞破裂,粗面和滑面内质网均出现扩张断裂现象。有研究证实<sup>[10-11]</sup>,高压氧可通过改善组织细胞的缺氧状态,减少自由基的生成,减轻细胞炎

症反应。可见高压氧提供了肝组织进行有氧代谢所需的氧,抑制了无氧代谢系统,ATP生成增多,自由基生成减少,从而保护细胞膜结构。

本研究利用显微镜观察肝脏组织形态结构,结果发现,对照组中央静脉结构完整,肝小叶结构清晰,呈放射状排列,肝窦明显可见,未见坏死肝细胞;疲劳模型组肝索断裂明显,肝窦变窄,中央静脉结构紊乱,肝小叶内轮廓不清,肝细胞肿胀,核变大,胞浆空淡明显可见,部分肝小叶中出现散在的点灶状坏死肝细胞;经高压氧治疗后,疲劳高压氧恢复组中央静脉仍然扩张并伴有淤血,但结构完整,肝索断裂呈散在分布,较疲劳模型组稍有缓解。本研究显示疲劳模型组大鼠肝脏组织MDA含量显著高于对照组和疲劳高压氧暴露组,而SOD活性显著低于其他两组。实验结果提示高压氧对大鼠肝脏的保护作用可能与调节肝脏内MDA含量和SOD活性有关。

高压氧暴露能有效提高大鼠游泳时间,降低疲劳大鼠肝脏MDA含量,提高SOD含量,改善肝脏组织的病理变化,从而对疲劳大鼠肝脏损伤起到保护作用。

## 参考文献

- [1] Nybo L, Rasmussen P. Inadequate cerebral oxygen delivery and central fatigue during strenuous exercise[J]. *Exerc Sport Sci Rev*, 2007, 35(3):110—118.
- [2] 邱宝安,杨英祥.肝脏急性缺血性损害时高压氧的地位与作用[J]. *山东医药*, 2008, 48(9):51—52.
- [3] 蔡宏斌,葛朝明,张兰芳,等.不同压力高压氧预处理对大鼠局灶性脑缺血一再灌注自由基损伤的保护作用[J]. *中国康复医学杂志*, 2011, 26(9):803—806.
- [4] 汶希,潘华山,冯毅翀.大鼠运动性疲劳模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(5):368—372.
- [5] 刘科,田伏洲,李可洲,等.高压氧对模拟高原急性缺氧条件下脓毒症大鼠肝损伤的保护作用[J]. *解放军医学杂志*, 2011, 36(2):153—157.
- [6] 彭兆云,杜晶,孙学军,等.高压氧预处理对小鼠运动耐力的影响[J]. *第二军医大学学报*, 2006, 27(1):62—64.
- [7] Niinikoski JH. Clinical hyperbaric oxygen therapy, wound perfusion, and transcutaneous oximetry[J]. *World J Surg*, 2004, 28(3):307—311.
- [8] Oter S, Edremitlioglu M, Korkmaz A, et al. Effects of hyperbaric oxygen treatment on liver functions, oxidative status and histology in septic rats[J]. *Intensive Care Med*, 2005, 31(9):1262—1268.
- [9] 唐量,熊正英,芦荟对运动训练小鼠肝组织自由基代谢及超微结构影响的实验研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2002, 21(6):607—609.
- [10] Bitterman H, Muth CM. Hyperbaric oxygen in systemic inflammatory response[J]. *Intensive Care Med*, 2004, 30(6):1011—1013.
- [11] 潘兴时.高压氧对运动后大鼠血清抗氧化系统的影响[J]. *中国当代医药*, 2010, 17(5):165—166.