

硫化氢对肝缺血再灌注损伤动物模型保护作用的 Meta 分析

王健欣, 于海, 于树娜, 张明, 蒋吉英

(潍坊医学院人体解剖学教研室, 山东 潍坊 261053)

摘要:目的 系统评价硫化氢对肝缺血再灌注损伤动物模型的保护作用。方法 计算机检索中国知网 CNKI、万方 Data、PubMed 和 Cochrane Library, 查找硫化氢对肝缺血再灌注损伤保护作用研究的动物实验。研究者独立地按照纳入与排除标准筛选文献、提取资料, 然后通过 Quadas 质量评价标准评估纳入文献质量。采用 RevMan 5.3 软件进行 Meta 分析。结果 最终纳入 7 篇文献, 包括 48 只大鼠。Meta 分析结果显示: 缺血组丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平高于假手术组[SMD = -5.49, 95% CI 为(-7.46 ~ -3.53), $P=0.001$]; 硫化氢组 ALT 水平低于缺血组[SMD = -3.69, 95% CI 为(-5.36 ~ -2.02), $P=0.000\ 01$]; 硫化氢组 ALT 水平高于假手术组[SMD = 1.80, 95% CI 为(1.26 ~ 2.35), $P=0.000\ 01$], 以上 ALT 比较均差异有统计学意义。结论 根据现有的资料显示, 硫化氢对肝缺血再灌注损伤有保护作用。但受纳入研究样本量所限, 该结论尚需更多高质量实验来验证。

关键词: 硫化氢; 肝缺血再灌注损伤; Meta 分析; 动物实验

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2017.09.010

A meta analysis on the protective effect of hydrogen sulfide on the animal models suffering from hepatic ischemia-reperfusion injury

WANG Jianxin, YU Hai, YU Shuna, ZHANG Ming, JIANG Jiying

(Department of Anatomy, Weifang Medical College, Weifang, Shandong 261053, China)

Abstract: Objective To systematically evaluate the protective effect of hydrogen sulfide on the animal models suffering from hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI). **Methods** The experiments were searched for the protective effect of hydrogen sulfide on the hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI) in CNKI, Wanfang database, PubMed and Cochrane Library. The authors independently screened and collected the data in accordance with inclusion and exclusion criteria, then evaluated the quality of included documents according to the Quadas quality evaluation standard. It adopted the software of RevMan 5.3 to conduct the Meta analysis. **Results** Seven documents were subsequently included, including 48 rats. The level of ALT in IR group was higher than that in sham group [SMD = -5.49, 95% CI (-7.46 to -3.53), $P=0.001$]; the level of ALT in IR group was higher than that in H₂S group [SMD = -3.69, 95% CI (-5.36 to -2.02), $P=0.000\ 01$]; the level of ALT in H₂S group was higher than that in sham group [SMD = 1.80, 95% CI (1.26 to 2.35), $P=0.000\ 01$]. The levels of ALT had statistical significances. **Conclusions** The existing evidences show that hydrogen sulfide has exerted protective effect on the hepatic ischemia-reperfusion injury (HIRI). Due to limited quantities of included research samples, this conclusion should be further verified by more high-quality experiments.

Key words: Hydrogen sulfide; Hepatic ischemia-reperfusion injury; Meta-analysis; Animal experiment

基金项目: 山东省自然科学基金(ZR2010HM006, ZR2014HL020, ZR2014HL021); 山东省教育厅资助课题(J11LF14); 山东省医药卫生科技发展计划资助课题(2014WS0464); 潍坊医学院科技创新研究基金(K1301001)

通信作者: 蒋吉英, 女, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肝损伤, E-mail: jiangjiying2002@163.com

- [11] RIZZO S, LODDER EM, VERKERK AO, et al. Intercalated disc abnormalities, reduced Na⁺ current density, and conduction slowing in desmoglein-2 mutant mice prior to cardiomyopathic changes[J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 95(4): 409-418.
- [12] KRUSCHE CA, HOLTHÖFER B, HOFÉ V, et al. Desmoglein 2 mutant mice develop cardiac fibrosis and dilation[J]. *Basic Res Cardiol*, 2011, 106(4): 617-633.
- [13] DUBASH AD, KAM CY, AGUADO BA, et al. Plakophilin-2 loss promotes TGF- β 1/p38 MAPK-dependent fibrotic gene expression in cardiomyocytes[J]. *J Cell Biol*, 2016, 212(4): 425-438.
- [14] YU CC, YU CH, HSUEH CH, et al. Arrhythmogenic right ventricu-

lar dysplasia: clinical characteristics and identification of novel desmosome gene mutations[J]. *J Formos Med Assoc*, 2008, 107(7): 548-558.

- [15] RASMUSSEN TB, PALMFELDT J, NISSEN PH, et al. Mutated desmoglein-2 proteins are incorporated into desmosomes and exhibit dominant-negative effects in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy[J]. *Hum Mutat*, 2013, 34(5): 697-705.
- [16] BIERNACKA A, DOBACZEWSKI M, FRANGOGIANNIS NG. TGF- β signaling in fibrosis[J]. *Growth Factors*, 2011, 29(5): 196-202.

(收稿日期: 2017-03-08, 修回日期: 2017-03-26)

肝脏缺血再灌注损伤(HIRI)是一种常见的临床病理生理过程,休克、感染、肝脏外伤、肝叶切除及肝移植所致的肝脏功能损害、衰竭都与之有关,HIRI 机制复杂,目前尚未完全认识清楚,大量研究显示主要与缺血再灌注过程中氧自由基释放、肝脏能量代谢障碍、细胞内钙离子超载、微循环功能障碍、细胞因子、线粒体功能异常、Kupffer 细胞激活及中性粒细胞的活化因素有关^[1]。目前对于 HIRI 的发生机制以及影响因素众说纷纭,临床上提出了许多药物可以对缺血再灌注损伤产生保护作用,但大多也未被证实;近几年,有学者^[1]提出了硫化氢作为气体信号分子对于缺血再灌注损伤产生保护作用的实验结论,但无充分的研究证据证实;相关实验^[2]证明大鼠肝缺血再灌注后可造成肝脏损伤,内源性硫化氢作为气体信号分子在大鼠 HIRI 过程中能降低胰岛素样生长因子 I、核转录因子-κB、肿瘤坏死因子-α 表达水平,具有保护肝细胞的作用。有学者认为丙氨酸氨基转移酶(ALT)水平可直接反映 HIRI 的程度,损伤程度越重,ALT 水平越高,故可将 ALT 作为 HIRI 程度的判定指标^[3]。因此本研究拟从近 20 年国内外开展 HIRI 的动物实验入手,系统评价硫化氢对 HIRI 动物模型的有效性,为硫化氢对于 HIRI 的保护作用提供证据支持,为进一步的临床治疗提供有力保障。

1 资料与方法

1.1 纳入与排除标准

1.1.1 研究类型 随机对照动物实验研究。

1.1.2 研究对象 (1)假手术组:仅暴露肝门,不夹闭动、静脉;(2)缺血再灌注组:建立 HIRI 模型,夹闭动静脉 45 min 后恢复血供;(3)硫化氢组:建立 HIRI 模型,于再灌注前 5 min 在大鼠的腹腔注射硫化氢。

1.1.3 结局指标 考察三个组别大鼠血液中的 ALT 含量。

1.1.4 排除标准 (1)文献中 HIRI 模型为非肝损害;(2)重复发表的文献;(3)检测指标中无 ALT 指标;(4)实验分组中无对照组。

1.2 检索策略 计算机检索中国知网 CNKI、万方 Data、PubMed 和 Cochrane Library 数据库,检索时限均为从建库至 2016 年 7 月 10 日,同时追溯纳入研究的参考文献,查找硫化氢与 HIRI 的动物实验^[4]。中文检索词包括硫化氢,肝脏缺血再灌注损伤,保护作用,大鼠;英文检索词包括 hydrogen sulfide,hepatic ischemia-reperfusion injury in rats,protective effects, rat。

1.3 纳入研究的基本特征 纳入研究的基本特征见表 1。

1.4 纳入研究的质量评价及发表偏倚评分 纳入研究的质量评价及发表偏倚评分结果见表 2。

2 结果

2.1 文献筛选及结果 从搜索到的 182 篇文献中剔除重复发表的文献后,共筛选出 134 篇文献;阅读题目之后,与本研究相关的有 52 篇文献;阅读全文后进一步筛选为 12 篇,最后根据排除条件:(1)重复发表;(2)干预措施;(3)是否有对照;(4)HIRI 不是其他器官;(5)检测标准为 ALT 水平;(6)缺血再灌注时间尽量一致,最终纳入 7 篇研究^[4-10]。

2.2 ALT 含量结果 Meta 分析森林图见图 1~3。从图 1 中可以看出,Heterogeneity: $Chi^2 = 22.50, df = 6 (P = 0.0010); I^2 = 73\%$,因 $I^2 > 50\%$ 故采用随机效应模型。结果显示,提取资料总的合并效应量 $SMD = -5.49, 95\% CI$ 为 $(-7.46 \sim -3.53)$,对总的模型进行检验得出差异有统计学意义 $(Z = 5.47, P < 0.001)$ 。结果提示缺血组的 ALT 水平高于假手术组,肝脏损伤严重。从图 2 中可以看出,

表 1 纳入研究的基本特征

第一作者	年份	种系品系	假手术组 样本量/只	缺血再灌注 组样本量/只	硫化氢组 样本量/只	造模法	麻醉药物名称	盲法	随机
Kang ^[4]	2009	SD 雄性大鼠	6	6	6	结扎肝动静脉和胆管	1% 苯巴比妥钠	未提及	随机数字法
杜津 ^[5]	2012	SD 雄性大鼠	6	6	6	结扎肝动静脉和胆管	10% 水合氯醛	未提及	随机数字法
陈亮 ^[6]	2014	SD 雄雌大鼠	7	7	7	Pringle 法	10% 水合氯醛	未提及	仅提及
魏来 ^[7]	2016	SD 雄性大鼠	8	8	8	结扎肝动静脉和胆管	0.3% 戊巴比妥钠 1 mL/100 g	未提及	仅提及
黄红钰 ^[8]	2015	SD 雄性大鼠	8	8	8	结扎肝动静脉,不结扎胆管	6.5% 水合氯醛	未提及	仅提及
Shimada ^[9]	2015	Wistar 雄性大鼠	8	8	8	Pringle 法	10% 水合氯醛	提及	随机数字法
Bos ^[10]	2012	Wistar 雄性大鼠	5	5	5	Pringle 法	10% 水合氯醛	未提及	随机数字法

表 2 质量评价及发表偏倚评分

第一作者	年份	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩	评分
Kang ^[4]	2009	有	有	有	无	无	有	有	有	无	无	6
杜津 ^[5]	2012	有	有	有	无	无	有	有	有	无	无	6
陈亮 ^[6]	2014	有	无	无	无	无	有	有	有	无	无	4
魏来 ^[7]	2016	有	无	无	无	无	有	有	有	无	无	4
黄红钰 ^[8]	2015	有	无	有	无	无	有	有	有	无	无	5
Shimada ^[9]	2015	有	有	有	有	有	有	有	有	无	无	8
Bos ^[10]	2012	有	有	有	无	无	有	有	有	无	无	6

注:①论文经同行评审后发表;②有温度控制的说明;③用数字表或其他方法随机分组;④盲法;⑤结果的盲法评估;⑥应用无明显影响 ALT 的麻醉药;⑦动物模型(HIRI);⑧样本量计算;⑨符合动物福利法规;⑩声明有潜在的利益冲突时,观察补充材料。

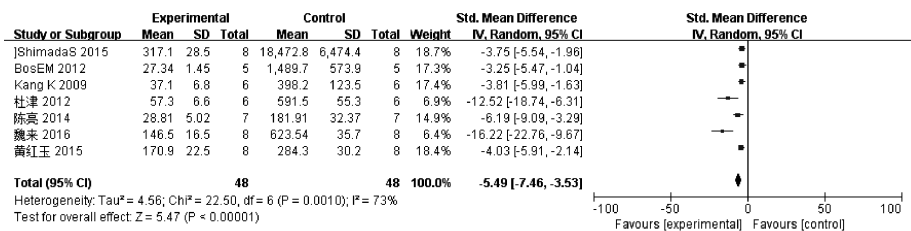


图 1 缺血再灌注组与假手术组 ALT 含量的 Meta 分析森林图

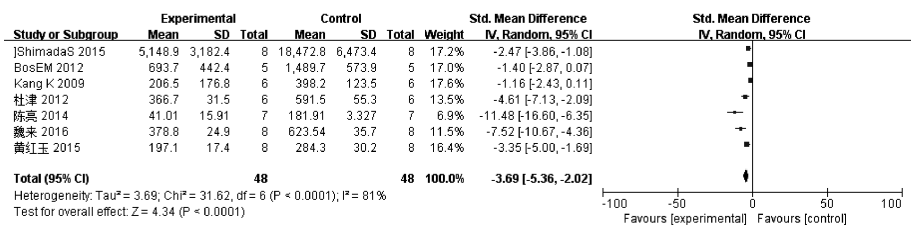


图 2 缺血再灌注组与硫化氢组 ALT 含量的 Meta 分析森林图

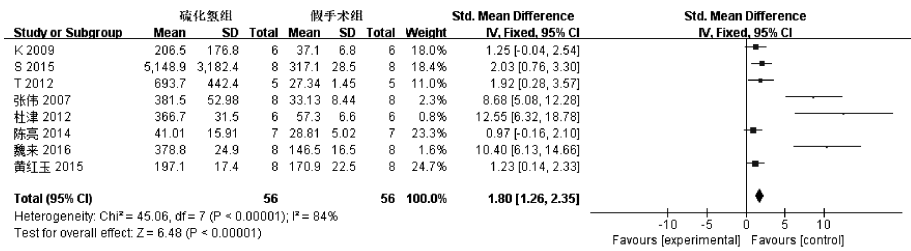


图 3 硫化氢组与假手术组 ALT 含量的 Meta 分析森林图

Heterogeneity: $Chi^2 = 31.62, df = 6 (P < 0.0010)$; $I^2 = 81\%$, 因 $I^2 > 50\%$ 故采用随机效应模型。结果显示,提取资料总的合并效应量 $SMD = -3.69$, $95\% CI$ 为 $(-5.36 \sim -2.02)$,对总的模型进行检验得出差异有统计学意义 ($Z = 4.34, P < 0.001$)。结

果为硫化氢组的 ALT 水平低于缺血组,提示硫化氢对肝脏具有保护作用。从图 3 中可以看出,各研究之间有统计学异质性[Heterogeneity: $Chi^2 = 45.06, df = 7 (P < 0.001)$; $I^2 = 84\%$],因 $I^2 > 50\%$ 故采用随机效应模型。结果显示,提取资料总的合并效应量

SMD = 1.80, 95% CI 为 (1.26 ~ 2.35), 对总的模型进行检验得出差异有统计学意义 ($Z = 6.48, P < 0.001$)。结果显示硫化氢组的 ALT 水平高于假手术组, 提示若硫化氢对损伤的肝脏具有保护作用, 但其保护效果可能与硫化氢剂量有关。

2.3 发表偏倚及敏感性分析 根据缺血再灌注组与假手术组的 ALT 含量所做的漏斗图 (图 4) 来看。所纳入文献大部分分布一致, 但仍有部分不对称, 仍有发表偏倚存在。从图 5 上看, 所纳入的 7 篇文章异质性比较大, 所以采用 SMD 法以及随机效应模型; 最后经过亚组分析之后表明缺血再灌注的时间、实验室的温度、随机分组的方法以及选用动物雌雄及健康状况均不同, 此为异质性较大的原因; 部分实验未能按照规定选用实验动物, 实验造模的手段用药也有差别, 使用不同的西药作为麻醉药以及测量 ALT 的时间和方式不同; 注射硫化氢的剂量不同均可能给 Meta 分析结果带来异质性, 从而会在一定程度上影响 Meta 分析结果的可靠性。因此, 在后续研究中应更严格遵循动物实验相关规范^[2], 提高研究质量。

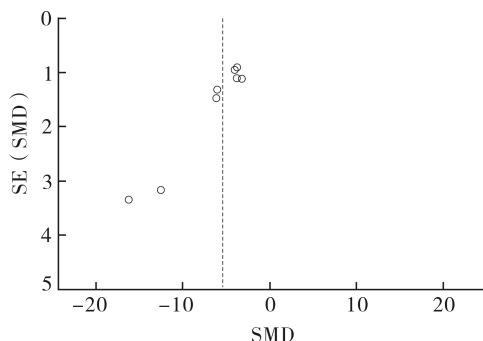


图 4 缺血再灌注组与假手术组的 ALT 含量漏斗图

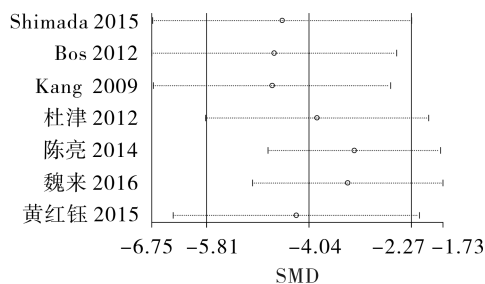


图 5 敏感性分析图

3 讨论

在 HIRI 研究领域开展动物研究的 Meta 分析是一次尝试。目前, 对缺血再灌注损伤机制的认识虽

取得了一些进展, 但并无多大的突破, 对其的研究绝大部分是在实验动物身上进行的^[12]。因此, 对于像 HIRI 这类发生发展机制十分复杂的疾病来说, 动物实验的研究可以更加推动临床治疗的发展。动物实验在基础研究中开展的非常多, 但是经过系统评价过的实验并不多, 所以对于动物实验也要经历严格的系统评价。

综上所述, 现有证据显示, 硫化氢组与缺血组差异有统计学意义, 证明硫化氢对于 HIRI 有保护作用, 但上述结论尚需开展更多高质量研究尤其是临床研究加以证实^[3], 还需要更多的严谨的统计分析。

参考文献

- [1] 王海久, 任利, 邓勇, 等. 硫化氢增加肝脏缺血再灌注损伤模型大鼠胰岛素样生长因子 I、核转录因子 κ B、肿瘤坏死因子 α 的表达 [J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(31): 5823-5827.
- [2] 耿亚松, 杜津. 反映 H_2S 在肝缺血再灌注损伤中保护作用的检测指标研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(22): 2739-2741.
- [3] 元文勇, 余伟平, 叶启发, 等. 大鼠肝脏缺血再灌注损伤程度判定指标的选择 [J]. 中国普通外科杂志, 2008, 17(7): 650-653.
- [4] KANG K, ZHAO M, JIANG H, et al. Role of hydrogen sulfide in hepatic ischemia-reperfusion-induced injury in rat [J]. Liver Transpl, 2009, 15(10): 1306-1314.
- [5] 杜津, 王倩, 李庆明, 等. 硫氧还蛋白系统在硫化氢抗大鼠肝缺血再灌注损伤中的变化 [J]. 中华医学杂志, 2012, 92(37): 2607-2610.
- [6] 陈亮. 硫化氢抑制 ATF6-CHOP 基因表达对大鼠肝脏缺血再灌注损伤的保护作用 [D]. 西宁: 青海大学, 2014: 1-31.
- [7] 魏来, 陈文雁, 邹毅, 等. 硫化氢抑制自噬减轻肝硬化大鼠肝缺血再灌注损伤 [J]. 中国普通外科杂志, 2016, 25(1): 97-102.
- [8] 黄红钰. 硫化氢预处理对巧纤维化大鼠肝缺血再灌注损伤的作用及其相关机制 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2015: 1-42.
- [9] SHIMADA S, FUKAI M, WAKAYAMA K, et al. Hydrogen sulfide augments survival signals in warm ischemia and reperfusion of the mouse liver [J]. Surg Today, 2015, 45(7): 892-903.
- [10] BOS EM, SNIJDER PM, JEKEL H, et al. Beneficial effects of gaseous hydrogen sulfide in hepatic ischemia/reperfusion injury [J]. Transpl Int, 2012, 25(8): 897-908.
- [11] 刘迈兰, 李成文, 汪厚莲, 等. 电针对高脂血症动物模型有效性和安全性的 Meta 分析 [J]. 中国循证医学杂志, 2015, 15(3): 353-357.
- [12] 何剑戈, 任爱红, 施懿诚, 等. 肝缺血再灌注损伤的机制及其预防 [J]. 河南科技大学学报 (医学版), 2015, 30(3): 235-237.

(收稿日期: 2016-08-04, 修回日期: 2016-12-04)