

· 实验研究 ·

氨力农对大鼠在体肺缺血再灌注损伤的保护作用

宫素岗, 刘锦铭

(上海市肺科医院呼吸科, 上海 200433)

[摘要] 目的 探讨氨力农对在体肺缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用。方法 夹闭大鼠左肺门1.5 h, 再灌注2 h, 建立在体缺血再灌注模型。将24只SD大鼠随机分成假手术组, 缺血再灌注组(I/R组)和氨力农组(AMR组), AMR组缺血前30 min给予颈静脉注射氨力农10 mg/kg, 再灌注前5 min颈静脉注射氨力农10 mg/kg。再灌注2 h后采颈动脉血检测血气、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-8(IL-8)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α); 摘取左肺测湿干比、超氧化物歧化酶(SOD)活力、丙二醛(MDA)含量并行病理学检查。结果 再灌注2 h后, 动脉血氧分压和二氧化碳分压3组间差异无显著性; I/R组肺湿干比和MDA(nmol/mg prot)含量分别为 5.3 ± 0.5 和 0.66 ± 0.16 , 显著高于假手术组, AMR组上述指标降低至 4.8 ± 0.2 和 0.51 ± 0.09 ; SOD(U/mg prot)在I/R组为 39.3 ± 3.0 , AMR组为 54.7 ± 6.8 , 较I/R组升高; I/R组血清IL-1 β (pg/mL)、IL-8(pg/mL)、TNF- α (pg/mL)含量分别为 22.08 ± 3.85 , 21.92 ± 5.56 , 30.50 ± 3.77 较假手术组显著升高, AMR组上述指标为 16.66 ± 3.02 , 14.73 ± 2.75 和 22.48 ± 3.82 , 较I/R组低。病理学结果显示: 三组动物肺组织结构基本正常, 假手术组和AMR组无充血, I/R组充血明显且较其他两组炎症细胞明显增多。结论 氨力农对肺缺血再灌注损伤具有保护作用, 可能与其抗氧化和抑制炎症因子分泌有关。

[中国当代儿科杂志, 2007, 9(3): 233-236]

[关键词] 氨力农; 肺; 缺血再灌注; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2007)03-0233-04

Protection of amrinone against lung injury induced by ischemia/reperfusion in rats

GONG Su-Gang, LIU Jing-Ming. Department of Respiratory, Shanghai Pneumology Hospital, Shanghai 200433, China (Email: jinningliu@hotmail.com)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of amrinone against experimental lung ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** Twenty-four Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3 groups ($n = 8$ each): sham-operated group, I/R group, and amrinone-treated I/R group (AMR group). The left lung of rats was subjected to ischemia for 90 minutes, followed by reperfusion for 2 hrs, to induce an I/R lung injury model. The rats of the AMR group received amrinone (10 mg/kg) intravenously 30 minutes before ischemia and 5 minutes before reperfusion. After 2 hrs of reperfusion, carotid artery blood was collected for blood-gas analysis and detection of serum levels of IL-1 β , IL-8 and TNF- α . The left lung was removed for detection of the lung wet/dry ratio, the erythrocyte superoxide dismutase (SOD) activity and the malonaldehyde (MDA) content as well as the pathological changes. **Results** After 2 hrs of reperfusion, there were no significant differences in artery partial pressure of oxygen (PO_2) and partial pressure of carbon dioxide (PCO_2) among the three groups. The lung wet/dry ratio (5.3 ± 0.5 vs 4.8 ± 0.1) and the MDA content (0.66 ± 0.16 nmol/mg prot vs 0.47 ± 0.06 nmol/mg prot) in the I/R group were significantly higher than those of the sham-operated group ($P < 0.05$). The administration of amrinone markedly reduced the lung wet/dry ratio (4.8 ± 0.2) and the MDA content (0.51 ± 0.09 nmol/mg prot) and increased the SOD activity (54.7 ± 6.8 vs 39.3 ± 3.0 U/mg prot) when comparing the I/R group ($P < 0.05$). The serum levels of IL-1 β , IL-8 and TNF- α in the I/R group were 22.08 ± 3.85 , 21.92 ± 5.56 and 30.50 ± 3.77 pg/mL respectively, which were significantly higher than those of the sham-operated group. The AMR group showed lower serum levels of IL-1 β , IL-8 and TNF- α (16.66 ± 3.02 , 14.73 ± 2.75 and 22.48 ± 3.82 pg/mL, respectively) compared with the I/R group ($P < 0.01$). The pathologic examination displayed that the lung tissue structure was normal and there was no hyperemia in the sham-operated and the AMR groups. The lung tissue structure of the I/R group was nearly normal but there were hyperemia and more inflammatory cells than the sham-operated and the AMR groups. **Conclusions** Amrinone has protections against lung I/R injury, possibly through its anti-oxidation effects and an inhibition of inflammation factors releasing.

[Chin J Contemp Pediatr, 2007, 9(3): 233-236]

[收稿日期] 2006-09-05; [修回日期] 2006-10-27

[基金资助] 上海市卫生局科技基金资助项目(034021)。

[作者简介] 宫素岗, 男, 硕士, 医师。主攻方向: 肺缺血再灌注损伤的保护。

[通讯作者] 刘锦铭, 教授, 上海市肺科医院呼吸科, 邮编: 200433

Key words: Amrinone; Lung ischemia / reperfusion injury; Rats

氨力农 (amrinone) 属于磷酸二酯酶抑制剂, 其能改变细胞内外钙离子的转运, 松弛血管平滑肌, 降低肺循环血管阻力, 降低肺动脉平均压及肺毛细血管楔压。近年来的研究发现氨力农还可以减低核因子- κ B (NF- κ B)、维持组织细胞 cAMP 水平, 减轻心肌的缺血再灌注损伤^[1], 研究报道^[2] 同类药物米力农能清除氧自由基, 具有较强的抗氧化性, 减轻肺的再灌注损伤。Chanani^[3] 的一项研究中发现氨力农可以减少 NF- κ B 的表达以及限制前炎症细胞活素的产生 (米力农无此作用), 而这些物质是缺血再灌注损伤中的重要介导因素, 可以放大炎症反应, 协同自由基的氧化损伤。因此我们推测氨力农可以在肺缺血再灌注损伤中发挥积极的保护作用。我们参照张松林^[4] 的实验模型加以修改, 建立大鼠在体肺缺血再灌注模型, 用氨力农预处理及经历缺血后在再灌注前加用氨力农, 观察氨力农是否对肺缺血再灌注损伤具有保护效果。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级雄性 SD 大鼠 (中国科学院上海实验动物中心提供) 24 只, 体重 250 ~ 300 g; 注射用氨力农 (齐鲁制药有限公司); 自动血气分析仪 (ABL5 型, 丹麦 Radiometer 公司); IL-1 β , IL-8, TNF- α 试剂盒 (上海钰森生物技术有限公司); 超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、丙二醛 (MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及模型建立 24 只 8 ~ 10 周 (250 ~ 300g) 雄性 SD 大鼠随机分成 3 组: 假手术组、缺血再灌注组 (I/R 组)、氨力农组 (AMR 组), 每组 8 只。3 组均用戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉, 手术过程可适量追加戊巴比妥钠, 每次 5 mg。左颈动、静脉插管。气管插管接动物呼吸机 (调节呼吸频率 70 ~ 80 次, 潮气量 2.5 ~ 3.5 mL), 左侧第 5 肋间开胸, 撑开器暴露左肺组织, 颈静脉注射 100 U 肝素 5 min 后, 用刀柄轻轻翻开左肺, 暴露肺门。游离左肺动脉、左主支气管和左肺静脉, 备阻断。I/R 组机械通气, 在肺充气状态下无损伤微血管夹依次阻断左肺动脉、左主支气管和左肺静脉。阻断 90 min 后去血管夹, 依次开放左肺动脉、左主支气管和左肺静脉。左肺通气再灌注 2 h。AMR 组

手术前颈静脉注射氨力农 10 mg/kg, 去血管夹前再次肺静脉注射氨力农 10 mg/kg, 其余操作同 I/R 组。假手术组机械通气, 游离左肺动脉、左主支气管和左肺静脉后, 并不阻断, 观察 3.5 h。

模型制作过程中, 接触肺组织时动作务必轻柔, 以免造成肺出血、水肿。去血管夹后, 肺组织颜色逐渐变红, 且随着呼吸动作肺顺应性较好, 无明显不张、出血和水肿, 表示模型建立成功。

1.2.2 血气分析及 IL-1 β , IL-8, TNF- α 的测定

实验结束后, 从颈动脉取血, 部分行血气分析, 测动脉血氧分压 (PO₂) 和二氧化碳分压 (PCO₂)。其余离心制成血清, 置 -20℃ 保存。待所有动物实验结束后, 采用双抗体夹心 ELISA 法检测血清 IL-1 β , IL-8, TNF- α 含量, 操作按照试剂盒说明进行。

1.2.3 肺组织湿干比及 SOD, MDA 的检测 取左肺组织, 用锋利的刀片切取下 1/3, 滤纸吸净表面液体, 以分析天平称取湿重, 再置入 80℃ 的烤箱中, 48 h 后称取干重, 二者之比为肺湿干比。其余左肺组织置 -80℃ 保存。待所有动物实验结束后, 将肺组织剪碎匀浆, 分别取肺组织匀浆液 0.1 mL, 考马斯亮蓝蛋白测定法检测肺组织匀浆液中蛋白浓度, 按照试剂盒说明操作, 分别测定总 SOD 活力, 以 U/mg prot 表示, MDA 含量, 以 nmol/mg prot 表示。

1.2.4 病理组织切片 实验结束后, 动物正中开胸, 分离肺动脉, 插管, 剪开左心耳。由肺动脉行 4% 甲醛灌洗, 固定肺组织, 灌洗完毕后, 取出左肺, 丝线扎紧肺门, 将肺组织放入 4% 甲醛中固定, 送病理科做苏木精-伊红染色切片。

1.3 统计学处理

采用 SAS6.0 统计软件进行统计学处理, $P < 0.05$ 为具有显著性意义。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 行 t 检验分析。

2 结果

2.1 3 组的血气分析及湿干比结果

本研究发现假手术组、AMR 组的 PO₂ 高于 I/R 组, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。3 组之间的 PCO₂ 相似, 差异也无统计学意义 ($P > 0.05$)。假手术组、AMR 组的湿干比显著低于 I/R 组 ($P < 0.01$)。见表 1。

2.2 氨力农对左肺组织的 SOD 活力、MDA 含量的影响

本研究发现假手术组、AMR 组的组织匀浆上清中的 SOD 活力显著高于 I/R 组,MDA 含量均显著低于 I/R 组,差异均有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。见表 2。

表 1 3 组的血气分析及湿干比 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	PO ₂ (mmHg)	PCO ₂ (mmHg)	湿干比
假手术组	102.9 ± 13.1	30.0 ± 4.6	4.8 ± 0.1
I/R 组	97.4 ± 9.2	28.1 ± 6.5	5.3 ± 0.5
AMR 组	103.6 ± 24.5	25.9 ± 8.4	4.8 ± 0.2 ^a

a 与 I/R 组比较 $t=2.84$ $P < 0.01$

表 2 左肺组织的 SOD 活力、MDA 含量 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
假手术组	60.2 ± 13.9 ^a	0.47 ± 0.06 ^a
I/R 组	39.3 ± 3.0	0.66 ± 0.16
AMR 组	54.7 ± 6.8 ^a	0.51 ± 0.09 ^b

a 与 I/R 组比较 $P < 0.01$; b $P < 0.05$

2.3 氨力农对血清中 IL-1 β , IL-8, TNF- α 含量的影响

假手术组,AMR 组的血清中 IL-1 β , IL-8, TNF- α 含量均显著低于 I/R 组 (均 $P < 0.01$)。见表 3。

表 3 3 组动物血清中的 IL-1 β , IL-8, TNF- α 含量

($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β (pg/mL)	IL-8 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
假手术组	14.70 ± 2.92 ^a	11.94 ± 4.90 ^a	21.18 ± 2.21 ^a
I/R 组	22.08 ± 3.85	21.92 ± 5.56	30.50 ± 3.77
AMR 组	16.66 ± 3.02 ^a	14.73 ± 2.75	22.48 ± 3.82 ^a

a 与 I/R 组比较,均 $P < 0.01$

2.4 苏木精-伊红染色的病理学组织切片结果

假手术组肺组织及间质基本正常,毛细血管内无充血,炎性细胞浸润不明显;AMR 组肺组织结构正常,无充血,炎细胞浸润很少;I/R 组肺组织结构基本正常,血管内充血明显,炎细胞浸润较其他两组明显增多。见图 1。

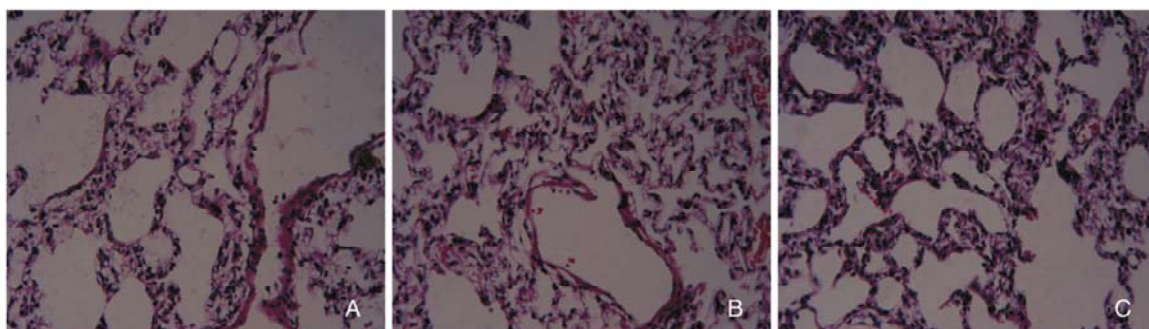


图 1 肺组织病理学切片 (苏木精-伊红染色 $\times 400$) A:假手术组,肺组织及间质基本正常,毛细血管内无充血,炎性细胞浸润不明显(少量中性白细胞);B:AMR 组,肺组织结构正常,无充血,炎细胞浸润很少(少量的中性细胞及浆细胞);C:I/R 组,缺血再灌注肺组织结构基本正常,血管内充血明显,炎细胞浸润较其他两组明显增多(中性细胞及浆细胞为主)。

3 讨论

缺血再灌注损伤可发生于很多情况下,如成人肺移植,小儿活体肺叶移植,心肺转流,肺水肿及气胸后肺复张。近年研究发现氨力农有清除自由基和调节炎症反应的作用。本实验于缺血前及再灌注前分别给予大鼠 10 mg/kg 氨力农注射,发现其在一定程度上减轻了缺血再灌注后的肺损伤。

肺缺血再灌注损伤时肺毛细血管通透性增高,导致血管内液渗出增多,大量蛋白漏出,肺湿干重比增加,肺通透性指数与血清中蛋白浓度之比增高,因此,肺湿干重比及肺通透性指数是常用评价肺缺血

再灌注损伤的重要指标。本研究发现 I/R 组的肺湿干重比较假手术组明显增高,而给予大鼠氨力农处理可明显减小肺湿干重比,减轻缺血再灌注肺损伤。缺血再灌注损伤时,机体通过酶系统和非酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用,并因此形成脂质过氧化物。MDA 就是众多脂质过氧化物中的一种。而 SOD 对机体的氧化和抗氧化平衡起着至关重要的作用,此酶能清除超氧阴离子 O_2^- ,保护细胞免受损伤。再灌注时大量生成的氧自由基使细胞膜不饱和脂肪酸和磷脂过氧化反应加剧,MDA 大量产生,而 SOD 的含量则急剧下降,造成组织脂质过氧化损伤。本研究结果表明,氨力农的应用可以明显提高

肺组织中 SOD 的活性,MDA 的水平也较 I/R 组明显降低,提示细胞的损伤明显减轻。氨力农是一种磷酸二酯酶抑制剂,它能改变细胞内外钙离子转运,使钙离子依赖性蛋白酶活性减弱,从而使氧自由基生成减少。氨力农还可以增加细胞内一氧化氮含量,一氧化氮是内皮细胞重要的保护性物质^[2],是钙和钙调节蛋白的依赖酶,能够清除氧自由基,保护内皮细胞。

过度的炎症反应是缺血再灌注损伤的另一重要机制,TNF- α ,IL-1 β 和 IL-8 是参与炎症反应的主要细胞因子,在肺脏炎症的级联放大反应中起重要作用。其中 TNF- α 是最主要的致炎因子^[5],既可直接损伤血管内皮细胞,又可刺激其他细胞因子产生。缺血再灌注损伤后,TNF- α 的释放可促进中性粒细胞聚集到再灌注组织,加重缺血组织局部的炎症反应,激活间质组织释放蛋白水解酶,使细胞膜损伤和细胞自融,这是引起肺缺血再灌注损伤的主要原因之一。IL-1 β 也是炎症反应早期最具影响的介质,它可与 TNF- α 一起刺激其他炎症细胞因子的产生。IL-8 是一种强有力的中性粒细胞趋化及激活因子,特异性地出现在炎症部位,其水平升高一般与局部浸润的单核细胞和中性粒细胞数量平行^[6]。我们的研究结果证实 I/R 组的上述三种细胞因子均显著高于假手术组。本研究采用缺血前及再灌注前给予大鼠静脉注射氨力农,发现 AMR 组上述三种因子较 I/R 组显著下降。说明氨力农能够抑制缺血再灌注损伤诱导的 TNF- α ,IL-1 β ,IL-8 释放,减轻炎症反应对肺组织的损伤作用。在病理切片图像中,我们可以直观地看到 AMR 组肺组织血管内充血及炎症细胞浸润较 I/R 组明显减少,说明氨力农对炎症细胞的抑制作用至少一部分是由于其对致炎因子,尤其是对 TNF- α 释放的抑制实现的。Chanani 等^[3]的研究发现氨力农可以减少培养器中鼠心肌细胞,冠状动脉内皮细胞或巨噬细胞中 NF- κ B,诱导型一氧化氮合酶和 TNF- α 的含量。提示氨力农可减轻 NF- κ B 的活性,限制促炎性介质的产生。目前氨力农的免疫调理机制仍未完全研究清楚,可能与抑制环核苷酸(cAMP 和 cGMP)的水解作用有关。

根据缺血再灌注引起的过氧化和炎性损伤,可以致肺气体交换功能受到影响,表现为血气分析指标的异常。然而在我们的研究中,血气分析结果显示 3 组动物的动脉 PO₂ 和 PCO₂ 之间无统计学差

异。其原因可能为:①左肺缺血再灌注损伤引起的炎性细胞因子渗出,使得左肺血管收缩,多余的血液流入功能良好得右肺。氧化和炎性损伤使左肺呼吸道阻力增大,相对来说进出右肺的气体较多,加上机械通气潮气量较大,因此左肺气体交换的异常完全可以得到代偿。②根据 Hashimoto 等^[7]的研究,在取动脉血测血气前,先用血管夹夹住右肺动脉 5 min,这样血液的气体交换完全是在左肺进行的,而本研究测出的是经过右肺代偿的血气。③动脉血因实验步骤未能及时送检,也可能是其中的一个原因。

本研究结果表明,氨力农对大鼠缺血再灌注损伤具有保护作用,其机制可能是氨力农通过对氧化和抗氧化平衡的调节,以及对 TNF- α ,IL-1 β ,IL-8 等炎症因子分泌的抑制实现的。另外,小儿急性肺损伤和呼吸窘迫综合征都可导致肺间质和肺泡水肿,炎症因子如 TNF- α ,IL-6 等的释放,因此推测氨力农可能是防止小儿急性肺损伤和呼吸窘迫综合征有效方法之一,值得实验和临床上进一步研究和验证。

[参 考 文 献]

- [1] Salman AE, Gaudette GR, Levitsky S, Krukenkamp IB. Amrinone preconditioning in the isolated perfused rabbit heart[J]. Ann Thorac Surg, 2000, 70(2): 609-613.
- [2] 王永剑,彭品贤,张本固,梁建辉. Milrinone 在离体肺保护中应用的实验研究[J]. 广州医学院学报,2003,31(1):11-13.
- [3] Chanani NK, Cowan DB, Takeuchi K, Poutias DN, Garcia LM, del Nido PJ, et al. Differential effects of amrinone and milrinone upon myocardial inflammatory signaling[J]. Circulation, 2002,106(12 Suppl 1):284-289.
- [4] 张松林,黄杰,涂仲凡. 大鼠在体肺低温缺血再灌注损伤模型的建立[J]. 中国现代医学杂志,2003,13(19):12-14.
- [5] Yao YM, Yu Y, Wu Y, Hall J. The role of gut as a cytokine-generating organ in remote organ dysfunction after intestinal ischemia and reperfusion[J]. Chin Med J, 1998, 111(6):514-518.
- [6] Serrik Cyril, Saverio LA, Adel Giaid. Cytokine interleukine-2, tumor necrosis factor- α and interferon- γ release after ischemia/reperfusion injury in a novel lung autograft animal model[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 152(1):277-282.
- [7] Hashimoto N, Takeyoshi I, Yoshinari D, Tsutsumi H, Tokumine M, Totsuka O, et al. Effects of a p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor as an additive to Euro-Collins solution on reperfusion injury in canine lung transplantation[J]. Transplantation, 2002, 74(3):320-326.

(本文编辑:吉耕中)