

前列地尔预处理对犬失血性休克肺损伤的影响

李清梅 田仁斌 秦榜勇

【摘要】目的 通过观察前列地尔对犬失血性休克致肺损伤肺组织前 B 细胞集落增强因子 (pre-B-cell colony-enhancing factor, PBEF) 以及血清细胞因子的影响来探讨前列地尔肺保护的机制。**方法** 实验用杂种犬 24 只, 随机均分为四组: 对照组 (C 组)、失血性休克组 (S 组)、前列地尔 30 ng 组 (P₁ 组)、前列地尔 60 ng 组 (P₂ 组)。C 组仅行动静脉插管不流血, S 组股动脉放血, MAP 降至 (40 ± 5) mm Hg, 制备失血性休克急性肺损伤 (ALI) 模型, 间断回输或放血维持此 MAP 90 min, 然后股静脉回输全部失血, 维持 MAP 休克前水平。P₁、P₂ 组分别股静脉持续泵注前列地尔 30 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ (P₁ 组)、60 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ (P₂ 组) 维持 30 min, 预处理 1 h 后建立失血性休克 ALI 模型。分别于休克前 (T₀)、休克 90 min (T₁)、复苏 4 h (T₄) 取动脉血, 行动脉血气分析计算氧合指数 (OI), 取肺组织采用 RT-PCR 技术检测 PBEF mRNA 表达情况; 并于 T₀、T₁、复苏 1 h (T₂)、复苏 2 h (T₃)、T₄ 时取 2 ml 静脉血通过 ELISA 法检测 TNF-α、IL-1β、IL-10、PBEF 的浓度。**结果** 与 C 组比较, T₁、T₄ 时 S、P₁ 和 P₂ 组 OI 明显降低, IL-1β、TNF-α、IL-10、PBEF 浓度和 PBEF mRNA 表达明显升高 (P < 0.05); 与 S 组比较, T₁、T₄ 时 P₁ 和 P₂ 组 OI 明显升高, IL-1β、TNF-α、IL-10、PBEF 浓度和 PBEF mRNA 表达明显降低 (P < 0.05)。**结论** 前列地尔可能通过下调 PBEF 的基因表达, 抑制炎症因子 IL-1β、TNF-α、IL-10 的释放, 从而减轻失血性休克肺损伤。

【关键词】 前列地尔; 失血性休克; 肺损伤; 前 B 细胞集落增强因子; 细胞因子

Protective effects of alprostadil pretreatment on lung injury in dogs with hemorrhagic shock LI Qingmei, TIAN Renbin, QIN Bangyong. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi 563003, China

Corresponding author: QIN Bangyong, Email: qbyzy@163.com

【Abstract】Objective To explore the protective mechanism of alprostadil pretreatment in dogs with hemorrhagic shock by observing the variations of pre-B-cell colony-enhancing factor (PBEF) in lung tissue and serum cytokines of the animal. **Methods** Twenty-four dogs were randomly divided into four groups (n=6), control group (group C), hemorrhagic shock group (group S), group P₁ and group P₂ received alprostadil 30 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ and 60 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ respectively. In group C, an indwelling catheter were placed in femoral artery and vein of the dog, but no blood was removed from the catheter. Acute lung injury model of hemorrhagic shock was built in group S by removing blood from the femoral artery, and the MAP was maintained at (40 ± 5) mm Hg for 90 min by removing or transfusing blood. MAP was maintained to preoperative level by blood reinfusion through femoral vein. Alprostadil was continuously infused at the rate of 30 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ and 60 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ in groups P₁ and P₂ respectively for 30 min before hemorrhagic shock. Samples of arterial blood and lung tissue were obtained before shock (T₀), 90 min after shock (T₁), and 4 h after recovery (T₄). Oxygenation index (OI) was calculated in samples of arterial blood. The histopathological change was observed by light microscope, and the PBEF mRNA level was detected by real-time PCR in lung tissue. Samples of venous blood were taken at T₀, T₁, T₂ (1 hour after recovery), T₃ (2 hour after recovery), T₄. The concentration of TNF-α, IL-1β, IL-10 and PBEF were measured by ELISA in these samples. **Results** Compared with group C, OI was significantly decreased at T₁, T₄, the serum concentrations of IL-1β, TNF-α, IL-10, PBEF and the level of PBEF mRNA expression were significantly increased at T₁, T₄ in groups S, P₁ and P₂ (P < 0.05); Compared with group S, OI was significantly increased at T₁, T₄, the serum concentrations of IL-1β, TNF-α, IL-10, PBEF and the level of PBEF mRNA expression were significantly decreased at T₁, T₄ in groups P₁ and P₂ (P < 0.05). **Conclusion** Alprostadil may reduce lung injury of hemorrhagic shock

by decreasing PBEF gene expression and by restraining the release of IL-1 β , TNF- α and IL-10.

【Key words】 Alprostadi; Hemorrhagic shock; Lung injury; Pre-B-cell colony-enhancing factor; Cell factor

前列地尔又名前列腺素 E₁ (prostaglandin E₁, PGE₁), 对肺保护的作用机理为抑制中性粒细胞 (PMN) 在肺内聚集和活化; 前列地尔通过提高 PMN 细胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 水平, 抑制 TNF- α 、IL-6、IL-8 等炎症因子的表达, 起到对肺损伤的保护作用^[1]。失血性休克后 PMN 被大量激活, 肺内大量 PMN 聚集, 从而造成肺损伤和肺水肿^[2], 而前 B 细胞集落刺激因子 (pre-B-cell colony-enhancing factor, PBEF) 通过介导炎症因子产生、抑制 PMN 凋亡、调控肺血管内皮细胞和上皮细胞的通透性等, 在急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 中起十分重要的作用^[3]。本研究探讨前列地尔对失血性休克犬 ALI 是否可能通过下调 PBEF 的基因表达, 抑制促炎症因子释放, 从而减轻肺损伤, 为其可能合理应用于临床失血性休克肺损伤患者提供理论依据。

材料与方 法

实验动物及分组 健康成年杂种犬 24 只, 体重 11~13 kg, 雌雄不限, 由遵义医学院动物实验中心提供。采用随机数字表法, 将其随机均分为四组: 对照组 (C 组): 即仅用 2.5% 戊巴比妥钠 1ml/kg 基础麻醉; 失血性休克组 (S 组) 建立失血性休克肺损伤模型; 前列地尔预处理组分别给予前列地尔 30 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ (P₁ 组)、60 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ (P₂ 组) 输注 30 min, 预处理 1 h 后建立失血性休克模型。

实验方法 四组动物均腹腔内注射 2.5% 戊巴比妥钠 1 ml/kg, 麻醉生效后, 仰卧位固定, 监测 ECG、舌黏膜 SpO₂、P_{ET}CO₂, 左侧股动脉插管用于放血, 右侧股动、静脉插管, 分别用于接压力换能器监测 MAP 及 CVP, 回输血液和给药。静注维库溴铵 0.1 mg/kg 后气管插管, 开胸行机械通气 (维持 V_T 12~15 ml/kg, RR 16 次/分, I:E 1:2)。术中间断追加戊巴比妥钠、维库溴铵维持麻醉。

采用 Wiggers 改良法制作可逆性休克模型: 2.5% 戊巴比妥钠 1 ml/kg 腹腔注射麻醉犬后, 切开左侧腹股沟皮肤及筋膜暴露股动静脉, 行股动脉穿刺置管测压, 犬肝素化 (3 mg/kg), 5 min 后经股动脉穿刺置管并放血, 急性放血至 MAP 降至 35~45 mm Hg, 其间根据 MAP 的升高或降低, 分别

给予抽血或输血, 并维持此 MAP 90 min。随后将用肝素保存的自体温血从股静脉回输, 维持 MAP 术前水平 4 h 后实验结束。P₁、P₂ 组在失血性休克 60 min 前, 分别持续泵入前列地尔 30 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ (P₁ 组)、60 ng · kg⁻¹ · min⁻¹ (P₂ 组), 其它步骤均与 S 组相同。

检测指标 分别于休克前 (T₀)、休克 90 min (T₁)、复苏 4 h (T₄) 时抽取股动脉血 1 ml, 行血气分析并利用公式计算各时点氧合指数 (oxygenation index, OI), 取右肺下叶部分组织, 采用 RT-PCR 检测肺组织中 PBEF mRNA 表达 (试剂盒由大连 Takara 生物工程公司提供); 分别于 T₀、T₁、复苏 1 h (T₂)、复苏 2 h (T₃)、T₄ 时抽取股静脉血 2 ml, 离心取血清采用 ELISA 检测 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、PBEF 含量。

统计分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 组内比较采用重复测量设计的方差分析。

结 果

呼吸参数 OI 及 PBEF mRNA 表达量的变化

T₁、T₄ 时 S、P₁ 和 P₂ 组 OI 值明显低于, PBEF mRNA 表达量明显高于 C 组和 T₀ 时 ($P < 0.05$); T₁、T₄ 时 S 组 OI 值明显低于, PBEF mRNA 表达量明显高于 P₁、P₂ 组 ($P < 0.05$)。T₄ 时 S、P₁ 和 P₂ 组 OI 值明显高于, PBEF mRNA 表达量明显低于 T₁ 时 ($P < 0.05$) (表 1)。

TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、PBEF 浓度的变化 T₁~T₄ 时 S、P₁ 和 P₂ 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、PBEF 浓度明显高于 C 组和 T₀ 时 ($P < 0.05$); T₁~T₄ 时 P₁、P₂ 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、PBEF 浓度明显低于 S 组 ($P < 0.05$)。T₂~T₄ 时 S、P₁ 和 P₂ 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、PBEF 浓度明显低于 T₁ 时 ($P < 0.05$) (表 2)。

讨 论

失血性休克可引起全身多器官功能障碍, 肺是其损伤的首要靶器官之一。研究认为失血性休克后急性肺损伤是由肺部炎症反应所导致的肺部毛细血管的损伤, 多种细胞因子在此过程中起重要作

表 1 四组实验犬不同时点 OI、PBEF mRNA 表达量的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	T ₀	T ₁	T ₄
OI	C 组	6	431.99±16.76	435.39±27.35	419.78±23.53
	S 组	6	443.84±22.69	196.90±22.68 ^{ac}	270.35±34.56 ^{acd}
	P ₁ 组	6	453.99±25.47	270.00±12.99 ^{abc}	291.94±19.15 ^{abcd}
	P ₂ 组	6	442.73±34.50	262.74±18.45 ^{abc}	290.98±16.92 ^{abcd}
PBEF mRNA 表达量	C 组	6	0.73±0.13	0.78±0.11	0.78±0.11
	S 组	6	0.76±0.11	5.46±0.4 ^{ac}	4.24±0.34 ^{acd}
	P ₁ 组	6	0.74±0.17	4.05±0.28 ^{abc}	3.52±0.22 ^{abcd}
	P ₂ 组	6	0.75±0.05	4.08±0.27 ^{abc}	3.52±0.25 ^{abcd}

注:与 C 组比较,^aP<0.05;与 S 组比较,^bP<0.05;与 T₀ 比较,^cP<0.05;与 T₁ 比较,^dP<0.05

表 2 四组实验犬不同时点 TNF-α、IL-1β、IL-10 和 PBEF 浓度的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
TNF-α (ng/L)	C 组	6	317.95±7.88	319.07±13.88	321.80±5.43	320.73±12.27	320.78±13.15
	S 组	6	315.08±7.66	550.65±36.18 ^{ac}	398.77±16.11 ^{acd}	386.10±14.00 ^{acd}	409.90±31.42 ^{acd}
	P ₁ 组	6	316.83±7.02	472.20±28.56 ^{abc}	373.08±11.77 ^{abcd}	344.25±12.70 ^{abcd}	352.90±9.91 ^{abcd}
	P ₂ 组	6	314.50±9.98	485.55±22.74 ^{abc}	362.92±9.29 ^{abcd}	344.32±12.51 ^{abcd}	352.67±19.47 ^{abcd}
IL-1β (pg/ml)	C 组	6	29.46±2.85	29.31±2.88	30.04±1.77	26.79±1.79	27.76±0.79
	S 组	6	28.89±2.19	38.41±0.72 ^{ac}	33.89±1.04 ^{acd}	31.53±1.70 ^{acd}	35.80±0.81 ^{acd}
	P ₁ 组	6	28.35±2.23	34.72±1.17 ^{abc}	31.89±0.97 ^{abcd}	31.00±0.32 ^{acd}	32.41±0.62 ^{abcd}
	P ₂ 组	6	27.38±2.21	35.42±1.20 ^{abc}	32.11±1.60 ^{abcd}	30.35±0.53 ^{acd}	32.17±0.42 ^{acd}
IL-10 (ng/L)	C 组	6	82.84±3.07	83.94±3.82	83.94±3.82	82.20±2.20	84.32±3.68
	S 组	6	88.65±6.57	170.31±14.02 ^{ac}	130.99±7.77 ^{acd}	135.42±7.67 ^{acd}	134.8±7.67 ^{acd}
	P ₁ 组	6	86.15±5.26	136.43±7.28 ^{abc}	116.09±6.97 ^{abcd}	119.56±7.65 ^{abcd}	114.31±7.76 ^{abcd}
	P ₂ 组	6	89.17±7.02	136.96±6.85 ^{abc}	118.35±6.10 ^{abcd}	119.44±4.77 ^{abcd}	116.25±6.43 ^{abcd}
PBEF (pg/ml)	C 组	6	1 756.35±125.95	1 770.01±229.00	1 834.97±167.55	1 728.59±205.69	1 869.13±150.36
	S 组	6	1 818.74±105.57	4 046.95±1 290.86 ^{ac}	3 465.93±189.61 ^{acd}	3 569.42±172.31 ^{acd}	3 659.54±108.83 ^{acd}
	P ₁ 组	6	1 839.34±101.58	3 680.92±149.86 ^{abc}	2 968.60±195.88 ^{abcd}	2 770.13±186.94 ^{abcd}	2 456.46±192.49 ^{acd}
	P ₂ 组	6	1 789.09±129.15	3 608.73±191.31 ^{abc}	3 096.39±88.12 ^{abcd}	2 767.71±172.11 ^{abcd}	2 840.34±624.66 ^{abcd}

注:与 C 组比较,^aP<0.05;与 S 组比较,^bP<0.05;与 T₀ 比较,^cP<0.05;与 T₁ 比较,^dP<0.05

用^[4]。Ye 等^[5] 研究结果提示 PBEF 与肺损伤有密切关系,是反映肺损伤早期的生物指标。PBEF 在 ALI 中起十分重要的作用,主要途径是介导炎症因子产生、抑制 PMN 凋亡、调控肺血管内皮细胞和上皮细胞的通透性等,但机制还未阐明;其中很多炎症因子也可影响 PBEF 基因表达,彼此之间形成一个网络^[3]。前列地尔是一种自体活性物质,吴进福

等^[6] 研究中发现前列地尔可以降低血清中 TNF-α 及 IL-6 的浓度,在基因水平下调 TNF-α 和高迁移率族蛋白 B1(HMGB1) 等的表达,抑制炎症反应,减轻大鼠急性肺损伤。

本实验通过成功建立可逆性失血性休克肺损伤模型,结果显示:S、P₁、P₂ 组犬在 T₁、T₄ 时 OI 明显低于 C 组,失血性休克后可导致犬肺功能下降,

而前列地尔预处理 P_1 、 P_2 组犬在 T_1 、 T_4 时 OI 值明显高于 S 组,表明前列地尔可增加氧合改善肺通气,改善肺功能。

Ming 等^[7]研究数据提示 PBEF 促进炎症因子 IL-1 β 、IL-6、IL-8 等的表达,在急性肺损伤的发病机制中起着重要的作用。曾源等^[8]研究表明 PBEF 通过 MAPK/P13K-Akt/VEGF 信号通路来增加心肺转流术后肺血管内皮通透性,从而在肺损伤中发挥作用。本实验结果显示:在 S、 P_1 、 P_2 组同时点血清中 PBEF 浓度及肺组织中 PBEF 基因表达量明显高于 C 组,这一结果提示犬失血性休克导致肺损伤时,血清 PBEF 浓度以及肺组织 PBEF mRNA 表达增加。提示 PBEF 可能参与了失血性休克肺损伤的机制。其机制可能是 PBEF 致 ALI 患者肺血管通透性增加,同时在抑制中性粒细胞凋亡过程中发挥必要作用,参与炎症反应的维持^[9]。本实验结果显示 P_1 、 P_2 组同时点血清中 PBEF 浓度及肺组织中 PBEF 基因表达量较 S 组降低,提示前列地尔预处理可以降低血清 PBEF 浓度并且从基因水平抑制 PBEF 的过度表达来减轻出血性休克犬 ALI,并且前列地尔无剂量依赖性。

Camp 等^[10]研究显示 PBEF 作为肺先天性免疫途径中的一个生物学标记物,可能通过诱发 NF- κ B 通路、激活 TLR-4 与机械通气性肺损伤密切相关。同时 Ming 等^[7]研究结果表明,PBEF 促进人肺微血管内皮细胞中的 IL-1 β 、IL-6、IL-8 等的表达,在肺部炎症以及肺血管内皮以及肺泡上皮细胞屏障功能的调节中发挥着重要的功能。本实验结果显示在 S、 P_1 、 P_2 组同时点血清中 TNF- α 、IL-1 β 浓度明显高于 C 组, P_1 、 P_2 组同时点血清中 TNF- α 、IL-1 β 浓度较 S 组降低与 PBEF 变化相一致。提示犬失血性休克导致肺损伤时,血清 TNF- α 、IL-1 β 浓度增加。前列地尔预处理后,血清中 TNF- α 浓度较休克模型组明显降低,可能是由于前列地尔激活腺苷酸环化酶,上调内源性 cAMP 的水平,cAMP 通过下调 NF- κ B 的活性,抑制炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 等的表达,从而减轻失血性休克犬急性肺损伤。

综上所述,前列地尔预处理能减轻犬失血性休克肺损伤,其机制可能是前列地尔通过下调 PBEF 的基因表达,抑制促炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 释放,从而减轻失血性休克肺损伤。

参 考 文 献

- [1] 谢云霞,郭晓光,李胜云,等.前列地尔联合乌司他丁对非体外循环下心脏搭桥术中鱼精蛋白诱发肺损伤的影响.中华实验外科杂志,2015,32(3):632-635.
- [2] Jeong KY, Suh GJ, Kwon WY, et al. The therapeutic effect and mechanism of niacin on acute lung injury in a rat model of hemorrhagic shock: Down-regulation of the reactive oxygen species-dependent nuclear factor κ B pathway. J Trauma Acute Care Surg, 2015, 79(2):247-255.
- [3] Ming GF, Ma XH, Xu DM, et al. PBEF promotes the apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells and regulates the expression of inflammatory factors and AQP1 through the MAPK pathways. Int J Mol Med, 2015, 36(3): 890-896.
- [4] 王棣馨,但伶,谢先丰.盐酸戊乙奎醚对大鼠失血性休克致肺损伤肺组织 CD40 和 CD40L 表达的影响.临床麻醉学杂志,2015,31(1):79-82.
- [5] Ye SQ, Zhang LQ, Adyshev D, et al. Pre-B-cell-colony-enhancing factor is critically involved in thrombin-induced lung endothelial cell barrier dysregulation. Microvasc Res, 2005, 70(3):142-151.
- [6] 吴进福,葛胜辉,姜丽华,等.前列地尔对脓毒症大鼠急性肺损伤的影响.中华麻醉学杂志,2015,35(12):1501-1503.
- [7] Ming GF, Ma XH, Xu DM, et al. PBEF promotes the apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells and regulates the expression of inflammatory factors and AQP1 through the MAPK pathways. Int J Mol Med, 2015, 36(3): 890-896.
- [8] 曾源,杨威,张小强,等.前 B 细胞克隆增强因子在体外循环术后肺血管内皮通透性增加中的机制研究.重庆医学,2013,42(28):3388-3392.
- [9] 高伟,施毅.急性肺损伤的发病机制:前 B 细胞集落增强因子是潜在的新靶点.国际呼吸杂志,2011,31(2):129-133.
- [10] Camp SM, Ceco E, Evenoski CL, et al. Unique Toll-like receptor 4 activation by NAMPT/PBEF induces NF κ B signaling and inflammatory lung injury. Sci Rep, 2015, 5:13135.

(收稿日期:2016-04-06)