

· 实验研究 ·

依达拉奉对大鼠小肠缺血-再灌注所致肺损伤的保护作用

邹锋 郭乃良 马国平 刘松 赵邦娥

【摘要】 目的 探讨依达拉奉对大鼠小肠缺血-再灌注所致肺损伤的保护作用。**方法** 雄性 SD 大鼠 18 只,随机均分为假手术组(Sham 组),缺血-再灌注组(IR 组)和依达拉奉组(E 组)。Sham 组只分离肠系膜上动脉,不做其他处理;IR 组分离肠系膜上动脉,从大鼠尾静脉注射与 E 组等量的生理盐水后,用无创动脉夹夹闭 120 min 后移去动脉夹,再灌注 120 min;E 组在缺血-再灌注前静脉注射依达拉奉 6 mg/kg。再灌注 120 min 后采集标本。肺组织 HE 染色后病理学检测,采集腹主动脉血液检测大鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 浓度,取肺组织检测髓过氧化物酶(MPO)活性和丙二醛(MDA)浓度。**结果** 与 Sham 组比较,IR 组肺泡上皮细胞广泛水肿、炎性细胞浸润、肺泡肺萎陷、肺毛细血管扩张出血;E 组肺组织病理改变较 IR 组明显改善,肺泡炎性渗出减少;E 组病理评分为(2.1 \pm 0.7)分,明显低于 IR 组的(5.7 \pm 1.1)分,IR 组病理评分明显高于 Sham 组的(1.5 \pm 0.2)分($P < 0.01$);血清中 TNF- α 和 IL-6 的浓度明显少于 IR 组,肺组织中 MPO 活性和 MDA 浓度明显低于 IR 组($P < 0.01$)。**结论** 依达拉奉能够明显改善小肠缺血-再灌注性肺损伤。

【关键词】 小肠;缺血-再灌注损伤;肺;依达拉奉

Edaravone protects against lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rat ZOU Feng, GUO Nailiang, MA Guoping, LIU Song, ZHAO Bang'e. Department of Anesthesiology, Shanghai Pudong New District Zhoupu Hospital, Shanghai 201318, China

Corresponding author: MA Guoping, Email: zoufengsh@126.com

【Abstract】 Objective Intestinal ischemia-reperfusion (I-R) is a critical and triggering event in the development of distal organ dysfunction, frequently involving the lungs. In this study we investigated the effects of edaravone on the prevention of lung injury induced by intestinal I-R in rats. **Methods** Eighteen male SD rats were randomly divided into 3 groups: Sham operation group (group Sham), I-R group (group IR) and edaravone group (group E). After injecting 6 mg of edaravone or the same volume of 0.9% sodium chloride, the anterior mesenteric artery was clamped with a noninvasive microvascular clip for 120 min and then reperfusion for 120 min. Sham-operated animals underwent the same surgical procedures without clamping. Lung tissues were collected for pathology tested by HE dyed, blood as collected for the analysis of TNF- α and IL-6 concentration by ELISA, small lung tissues were collected for the analysis of lung myeloperoxidase (MPO) activity and malonaldehyde (MDA) concentration. **Results** Compared with group Sham, the alveolar epithelial cells in group IR was widespread edema, inflammatory cell infiltration, atelectasis, disruption of alveolar, and pulmonary capillary hemorrhage. The pathological changes of lung tissue in group E were significantly improved compared with those in group IR, and that of alveolar inflammatory exudate was decreased. Pathological scoring of group E (2.1 \pm 0.7), which was significantly lower than that of group IR (5.7 \pm 1.1) and group sham (1.5 \pm 0.2) score ($P < 0.05$), so the concentration of TNF- α , IL-6, MPO activity and MDA concentration of group E were less than those of group IR ($P < 0.01$). **Conclusion** Edaravone ameliorated the lung injury induced by intestinal I-R.

【Key words】 Intestine; Ischemia-reperfusion; Lung; Edaravone

小肠缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, I-R)损伤后呼吸衰竭是导致患者出现并发症和死亡的最常见原因^[1],氧自由基、各种细胞因子(如 TNF- α

和 IL-6)、内源性毒素、血小板激活因子及嗜中性粒细胞在小肠 I-R 损伤的病理生理中发挥了很重要的作用^[2]。临床研究和动物实验表明,肠 I-R 损伤后,肺组织产生各种细胞因子及嗜中性粒细胞,诱发大量氧自由基的产生进一步损伤肺组织^[3,4]。依达拉奉是一种分子量较小的氧自由基清除剂,有抗氧化和抑制脂质过氧化的作用,因此,可推测依达拉

基金项目:上海市浦东新区科技发展基金(PKJ2015-Y40);上海市浦东新区卫生系统学科带头人培养计划(PWRd2014-19)
作者单位:201318 上海市浦东新区周浦医院医院麻醉科
通信作者:马国平,Email: xiangdi_Yu@163.com

奉可通过清除氧自由基,达到对组织器官的保护作用。本实验将探讨依达拉奉对小肠 I-R 损伤性肺损伤的保护作用。

材料与方 法

一般材料 雄性 SD 大鼠 18 只,体重 220~250 g,由上海交通大学医学院实验动物中心提供。

肠 I-R 损伤模型建立 术前禁食 12 h,自由饮水。参照文献[5]的方法,腹腔注射 1%戊巴比妥 50 mg/kg 麻醉后,仰卧位固定于手术台上,暴露肠系膜上动脉,夹闭 120 min 后,恢复肠道血供;假手术组仅暴露肠系膜上动脉。

动物分组 将 SD 大鼠随机分为 3 组:假手术组(Sham 组),I-R 组(IR 组)和依达拉奉组(E 组)。Sham 组只分离肠系膜上动脉,不做其他处理;IR 组分离肠系膜上动脉,在 I-R 前从大鼠尾静脉注射等量的生理盐水后,其余同 E 组;E 组分离肠系膜上动脉,在 I-R 前静脉注射依达拉奉 6 mg/kg,用无创动脉夹夹闭 120 min 后移去动脉夹,再灌注 120 min。

HE 染色 再灌注 120 min 后,取大鼠肺组织,用 HE 染色的方法观察肺组织病理学变化:每张切片观察 3 个视野,采用 Koxsel 法^[6]进行评分。

TNF- α 和 IL-6 浓度的测定 采集腹主动脉血液,离心后取上清液,参照说明书采用 ELISA 法检测大鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 的浓度。

髓过氧化物酶(MPO)活性和丙二醛(MDA)浓度的测定 取大鼠肺组织,制备匀浆,参照说明书,采用 H₂O₂ 法检测肺组织匀浆 MPO 活性。采用硫代巴比妥酸比色分析法测定肺组织匀浆 MDA 的浓度。

统计分析 采用 SPSS 16.0 统计分析软件统计分析。正态分布计量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

肺组织的病理学变化及评分 Sham 组肺泡结构

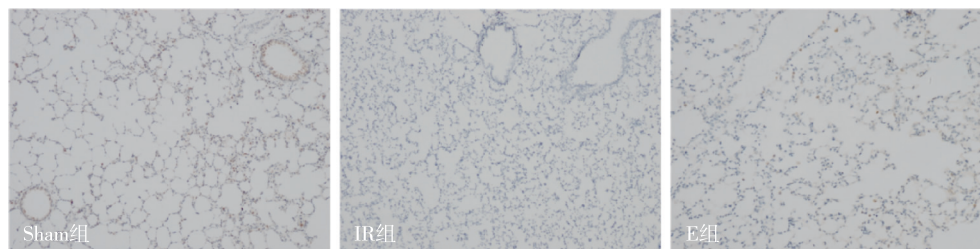


图 1 三组大鼠小肠缺血-再灌注所致肺损伤后肺组织 HE 染色

正常,肺泡内未见渗出,毛细血管结构正常;IR 组肺泡组织广泛水肿、炎性细胞浸润、肺泡萎陷、肺泡结构紊乱;E 组肺组织的病理学改变较 IR 组明显改善,肺泡结构破坏明显减少,但仍见少部分肺毛细血管破坏及炎性细胞浸润(图 1)。三组肺组织病理学评分与 HE 染色结果趋势一致。IR 组病理评分为(5.7±1.1)分,明显高于 Sham 组的(1.5±0.2)分($P < 0.01$);E 组病理评分为(2.1±0.7)分,明显低于 IR 组($P < 0.01$)(图 1)。

血清中 TNF- α 和 IL-6 浓度 与 Sham 组比较,IR 组血清中 TNF- α 和 IL-6 浓度明显升高($P < 0.01$);E 组大鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 浓度明显少于 IR 组($P < 0.01$)(表 1)。

肺组织中 MPO 活性和 MDA 浓度 与 Sham 组比较,IR 组 MPO 活性和 MDA 浓度明显升高($P < 0.01$);E 组 MPO 活性和 MDA 活性明显低于 IR 组($P < 0.01$)(表 2)。

讨 论

在胃肠道外科手术中,难免会出现肠 I-R 损伤。临床中小肠 I-R 损伤常常会出现急性肺损伤。因此,寻找有效的方法阻止这一过程的发生有重要的临床意义。本研究发现依达拉奉能有效减轻循环中 TNF- α 和 IL-6 浓度,抑制肺组织中 MPO 活性和 MDA 浓度,明显改善小肠 I-R 引发的肺损伤。

小肠缺血引起肠黏膜屏障的损害,导致再灌注时肠道细菌和内源性毒素进入循环系统,从而引发全身炎症反应和肺损伤;同时,缺血过程中产生的氧自由基和释放的大量炎症因子(如 TNF- α 和 IL-6)也随着循环的恢复进入循环,已有相关研究表明远隔的肺损伤仅仅发生在小肠恢复再灌注的过程中^[7]。小肠 I-R 后肺损伤的机制目前还不十分清楚,临床研究和动物实验表明活性氧自由基、补体系统的激活、细胞因子的产生及中性粒细胞的活化均参与这一过程^[8,9]。I-R 过程中会产生大量的氧自由基,随着循环到达肺部份氧自由基与细胞膜中

表 1 三组大鼠血清中 TNF- α 和 IL-6 浓度的比较 (pg/dl, $\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | TNF- α | IL-6 |
|--------|----|---------------------------------|---------------------------------|
| Sham 组 | 6 | 50.12 \pm 8.11 | 268.78 \pm 75.34 |
| IR 组 | 6 | 583.04 \pm 51.65 ^a | 567.78 \pm 70.21 ^a |
| E 组 | 6 | 144.56 \pm 15.75 ^b | 261.45 \pm 58.43 ^b |

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 IR 组比较,^b $P < 0.01$

表 2 三组大鼠肺组织中 MPO 活性和 MDA 浓度的比较 ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 只数 | MPO(U/mg) | MDA(nmol/mg) |
|--------|----|------------------------------|------------------------------|
| Sham 组 | 6 | 1.97 \pm 0.23 | 1.15 \pm 0.34 |
| IR 组 | 6 | 4.63 \pm 1.75 ^a | 1.78 \pm 0.25 ^a |
| E 组 | 6 | 2.26 \pm 0.95 ^b | 1.05 \pm 0.23 ^b |

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.01$;与 IR 组比较,^b $P < 0.01$

不饱和脂肪酸发生反应,导致肺泡膜的破坏;同时,氧自由基还诱导大量的中性粒细胞在肺部聚集,在黏附分子的作用下进一步与血管内皮细胞黏附,加重肺泡毛细血管的破坏;另外,氧自由基还可以诱发肥大细胞脱颗粒产生大量炎症因子,炎症介质可进一步加重肺泡毛细血管的损伤^[10]。因此,抑制并清除氧自由基可能会有效地减轻小肠 I-R 所引起的肺损伤。

依达拉奉是一种氧自由基清除剂,最初发现它对急性脑梗死患者有明显的脑保护作用,能够清除氧自由基、抑制脂质过氧化,从而抑制脑细胞、内皮细胞、神经细胞的氧化损伤^[11]。进一步研究显示依达拉奉可以淬灭 I-R 过程中产生的 H₂O₂ 和 OH⁻,阻止了活性氧对脂质细胞膜的攻击及其他生物学效应^[12]。

本研究结果显示依达拉奉能够改善小肠 I-R 性肺损伤,进一步观察发现依达拉奉治疗组循环中 TNF- α 和 IL-6 浓度明显减少,肺组织中 MPO 活性和 MDA 浓度明显降低。已有研究表明依达拉奉清除氧自由基的作用与抑制 TNF- α 和 IL-6 的释放有关^[13]。以上结果表明,活性氧自由基在小肠 I-R 性肺损伤中起了关键作用;依达拉奉可减少小肠 I-R 后氧自由基的产生,从而减轻肺泡细胞膜的脂质过氧化、抑制肥大细胞脱颗粒并产生炎症介质,阻止中性粒细胞在肺泡毛细血管中的聚集,进而达到对小肠 I-R 性肺损伤的保护作用。

本研究首次表明依达拉奉对小肠 I-R 性肺损伤

有明显的保护作用。将依达拉奉应用于小肠 I-R 性肺损伤的动物模型中,取得了预期的实验结果;依达拉奉可以成为治疗小肠移植和肠道手术后的急性肺损伤的有效药物之一。

参 考 文 献

[1] Hirano Y, Aziz M, Yang WL, et al. Neutralization of osteopontin ameliorates acute lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion. Shock, 2016, 46(4): 431-438.

[2] Lenaerts K, Ceulemans LJ, Hundscheid IH, et al. New insights in intestinal ischemia-reperfusion injury: implications for intestinal transplantation. Curr Opin Organ Transplant, 2013, 18(3):298-303.

[3] 唐福波,李雨梦,张文华,等. 丁酸钠对大鼠肠缺血/再灌注后急性肺损伤的保护作用研究. 中国临床药理学杂志, 2016, 532(10): 901-904.

[4] 刘克玄,李毅,李云胜,等. 肠缺血后处理抑制大鼠缺血再灌注所致的急性肺损伤. 中国病理生理杂志, 2009, 25(9): 1715-1719.

[5] Tarhan OR, Ceylan BG, Kapucuoglu N, et al. Activated protein C and normal saline infusion might prevent deleterious effects of remote acute lung injury caused by intestinal ischemia-reperfusion; an experimental study in the rat model. J Surg Res, 2011, 168(1): e81-e86.

[6] Wu XT, Li JS, Zhao XF, et al. Modified techniques of heterotopic total small intestinal transplantation in rats. World J Gastroenterol, 2002, 8(6): 758-762.

[7] Zhu Q, He G, Wang J, et al. Protective effects of fenofibrate against acute lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in mice. Sci Rep, 2016, 6(3): 22044.

[8] He XH, Li QW, Wang YL, et al. Transduced PEP-1-heme oxygenase-1 fusion protein reduces remote organ injury induced by intestinal ischemia/reperfusion. Med Sci Monit, 2015, 21: 1057-1065.

[9] Zhang F, Li ZL, Xu XM, et al. Protective effects of icarlin-mediated SIRT1/FOXO3 signaling pathway on intestinal ischemia/reperfusion induced acute lung injury. Mol Med Rep, 2015, 11(1): 269-276.

[10] Ferrari RS, Andrade CF. Oxidative stress and lung ischemia-reperfusion injury. Oxid Cell Longev, 2015, 2015: 590987.

[11] 李平,汪波. 依达拉奉联合溶栓治疗急性脑梗死的疗效及对氧自由基清除效果的影响. 中国现代医学杂志, 2015, 25(28): 49-52.

[12] Ren Y, Wei B, Song X, et al. Edaravone's free radical scavenging mechanisms of neuroprotection against cerebral ischemia: review of the literature. Int J Neurosci, 2015, 125(8): 555-565.

[13] Wang Z, Ji Y, Wang S, et al. Protective effect of intestinal ischemic preconditioning on ischemia reperfusion-caused lung injury in rats. Inflammation, 2015, 38(1): 424-432.

(收稿日期:2016-08-30)