

· 实验研究 ·

尼可地尔抑制塌陷肺损伤的作用

王春光 曹苏 张玮洵 王佩文 卞小翠 嵇富海

【摘要】 目的 探讨尼可地尔抑制单肺通气时塌陷肺损伤的作用及可能机制。方法 选用清洁级日本大耳白兔 24 只。随机分为 S 组(双肺通气+开胸)、C 组(单肺通气+开胸+生理盐水)、N 组(单肺通气+开胸+尼可地尔)和 J 组(单肺通气+开胸+尼可地尔+格列苯脲), 每组 6 只。予静脉麻醉诱导后, 行气管切开置入自制双腔气管导管实施机械通气。配合听诊法、气泡试验法和直接观察法将动物进行单肺通气和双肺通气, 模拟开胸手术。取非通气肺保存处理, 测湿/干重比(W/D)和丙二醛(MDA)浓度。采用 Western blot 法检测非通气侧肺组织蛋白激酶 B(Akt)、p-Akt 和 NF- κ B 蛋白含量。结果 N 组、C 组和 J 组的 W/D 和 MDA 浓度明显高于 S 组($P < 0.05$), 但 N 组明显低于 C 组($P < 0.05$), J 组明显高于 N 组($P < 0.05$)。N 组 p-Akt 蛋白含量和 p-Akt/Akt 明显高于 S 组、C 组和 J 组($P < 0.05$)。C 组 NF- κ B 蛋白含量明显高于 S 组和 N 组($P < 0.05$), N 组明显低于 J 组($P < 0.05$)。结论 尼可地尔在家兔单肺通气时对非通气侧肺的塌陷及复张有保护作用, 可能通过 PI3K/Akt 通路发挥作用, 并且通过下调 NF- κ B 减轻肺损伤。

【关键词】 尼可地尔; 单肺通气; 肺保护; 丙二醛; 磷脂酰肌醇-3-激酶

Effects of nicorandil on lung injury induced by collapse WANG Chunguang, CAO Su, ZHANG Weixun, WANG Peiwen, BIAN Xiaocui, JI Fuhai. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: JI Fuhai, Email: jifuhai@suda.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects and possible mechanisms of nicorandil on lung injury of the collapsed lung in one-lung ventilation. Methods Twenty-four clean Japanese big-ear rabbits were randomly divided into sham group (group S) (two-lung ventilation + thoracotomy), negative control group (group C) (one-lung ventilation + thoracotomy + saline), nicorandil group (group N) (one-lung ventilation + thoracotomy + nicorandil) and antagonist group (group J) (one-lung ventilation + thoracotomy + nicorandil + glyburide) equally. Mechanical ventilation was implemented through self-made double-lumen endotracheal tube after intravenous induction through ear marginal vein. Intravenous maintenance medicine was infused by trace injection pump after anesthesia induction. Thoracic surgery was simulated through one-lung or two-lung ventilation determined by auscultation, bubble test and direct observation. Then wet and dry weight ratio (W/D) and content of MDA were measured after non-ventilatory lung was processed and preserved. The expression of Akt, p-Akt and NF- κ B protein in non-ventilatory lung tissue were detected by Western-blot in all groups. Results In respects of W/D and content of MDA, the other three groups had significant differences compared with group S ($P < 0.05$). It was significantly lower in group N than in group C ($P < 0.05$), and it was significantly higher in group J than in group N ($P < 0.05$). The expressions of p-Akt protein and p-Akt/Akt in group N were significantly higher than those in group S and group C ($P < 0.05$). Those of group J were significantly lower than group N ($P < 0.05$). Compared with group S, the expression of NF- κ B protein in group C was significantly higher ($P < 0.05$). That of group N was significantly lower than that of group C ($P < 0.05$). But that in group J was higher than that in group N ($P < 0.05$). Conclusion Nicorandil has a protective effect on the collapse and inflation of non-ventilatory lung in rabbits under one-lung ventilation, acting on mitoKATP through PI3K/Akt, and down-regulating NF- κ B to reduce IR-induced lung injury.

【Key words】 Nicorandil; One-lung ventilation; Lung protection; MDA; PI3K

作者单位: 215006 苏州大学附属第一医院麻醉科(王春光、嵇富海); 南通大学附属医院麻醉科(曹苏、卞小翠); 南通大学医学院(张玮洵、王佩文)

通信作者: 嵇富海, Email: jifuhai@suda.edu.cn

单肺通气(one-lung ventilation, OLV)广泛应用于胸腔镜手术^[1]。但 OLV 会存在低氧性肺血管收缩(HPV)受抑制、低氧血症、缺血-再灌注(IR)损伤和炎症反应,并且主要在术侧肺,从而导致肺损伤。研究表明,线粒体是 IR 后的主要靶点^[2,3],同时线粒体三磷酸腺苷(ATP)敏感性钾通道(mitoK_{ATP})位于心、脑、肺等重要脏器的线粒体内膜,在肺 IR 损伤中发挥重要的作用,是触发因子和终末效应因子。尼可地尔作为一种 mitoK_{ATP} 特异性开放剂,能激活 mitoK_{ATP} 保护细胞。研究表明^[4]它对心肌有很好的保护作用,但缺乏对肺保护的研究。本研究采用家兔单肺通气模型,观察尼可地尔抑制肺损伤的效果,并探寻其机制。

材料与方 法

实验材料 本研究经南通大学实验动物保护和伦理委员会批准。清洁级日本大耳白兔 24 只[南通大学实验动物中心,许可证号:SYXX(苏)2012-0030],雌雄各半,体重(2.4±0.2)kg。动物人工呼吸机 DH-150(浙江大学医学仪器有限公司),多功能监护仪(Spacelabs,美国),微量注射泵 WZS-50F2(浙江大学医学仪器有限公司),酶联免疫检测仪(BioTek 公司,美国),凝胶成像分析系统(北京原平皓生物技术有限公司),电泳及转膜系统(Bio-Rad Laboratories 公司,美国),电动匀浆器(Bio-spec-Products INC 公司,美国)。蛋白激酶 B(Akt),磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)和转录因子 NF-κB 抗体(MerckMillipore 公司,美国),辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔和小鼠 IgG(Bioworld 公司,美国),Western blot 试剂盒(碧云天生物技术有限公司),丙二醛(MDA)检测试剂盒(武汉博士德生物公司)。电子天平(上海梅特勒-托利多公司,型号 AB104-N)、超低温冰箱(三洋公司,日本)、754 型紫外可见分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

实验方法 动物随机分为四组,每组 6 只。兔耳缘静脉建立静脉通道,注射 2%戊巴比妥钠 20 mg/kg 麻醉,丙泊酚 5 mg·kg⁻¹·h⁻¹、每 30 分钟戊巴比妥钠 4 mg/kg 和维库溴铵 0.25 mg·kg⁻¹·h⁻¹ 维持。右侧颈总动脉置管监测动脉血压;行气管切开并插入自制双腔气管导管实施机械通气,通气参数为:FiO₂ 100%,RR 40 次/分,V_T 10 ml/kg。静滴复方乳酸钠 7 ml·kg⁻¹·h⁻¹。以听诊法仔细调整自制双腔气管导管位置,并采用气泡试验法检测气管的密闭效果。将动物调整为右侧卧位后,开放

左侧胸腔建立右侧单肺通气模型,并开胸直接观察左侧肺叶呼吸运动是否停止并萎陷。单肺通气 1 h 后,恢复双肺通气 30 min。模拟开胸手术。S 组仅麻醉手术,不单肺通气,其他三组均有单双肺通气,并在手术开始前就输注干预药物。N 组在实施单肺通气前由静脉输入尼可地尔 100 μg·kg⁻¹·h⁻¹,输注 1 h;C 组则输注等量生理盐水;J 组在实施单肺通气前由静脉输入格列苯脲 75 μg·kg⁻¹·h⁻¹及尼可地尔 100 μg·kg⁻¹·h⁻¹,输注 1 h。取非通气肺保存处理待检测。

检测指标 取下左肺,称湿重后放入烤箱(80℃,48 h)中烘烤至恒重,再称干重,计算湿/干重比(W/D)。MDA 检测用荧光法进行微量测定。Akt、p-Akt、NF-κB 蛋白含量检测用组织裂解液离心提取蛋白溶液,将蛋白上样于浓缩-分离胶,电泳后转膜。TBST 封闭液封闭后用相应一抗(抗 β-actin、抗 Akt 抗体,1:1 000 稀释)孵育过夜后,再根据一抗的来源孵育相应的二抗(辣根过氧化物酶标记,1:2 000 稀释)。用 BIO-RAD 电泳仪化学发光成像系统显影、曝光,并用凝胶成像分析系统灰度扫描来定量检测蛋白质的平均吸光度 A 值,用各组目的蛋白 A 值比内参蛋白 β-actin 的 A 值表示各组目的蛋白含量。同法测 p-Akt 和 NF-κB 蛋白含量,选用抗 p-Akt 抗体和抗 NF-κB 抗体。

统计分析 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

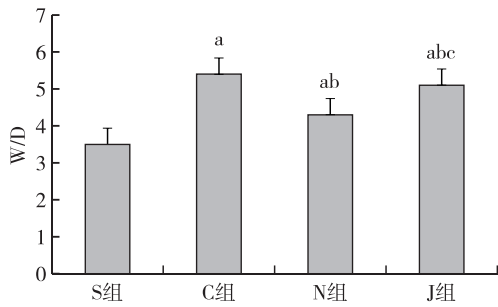
结 果

N 组、C 组和 J 组的 W/D 和 MDA 浓度明显高于 S 组($P < 0.05$),但 N 组明显低于 C 组($P < 0.05$),J 组明显高于 N 组($P < 0.05$)(图 1, 2)。

N 组 p-Akt 蛋白含量和 p-Akt/Akt 明显高于 S 组、C 组和 J 组($P < 0.05$)。C 组 NF-κB 蛋白含量明显高于 S 组和 N 组($P < 0.05$),N 组明显低于 J 组($P < 0.05$)(图 3, 4)。

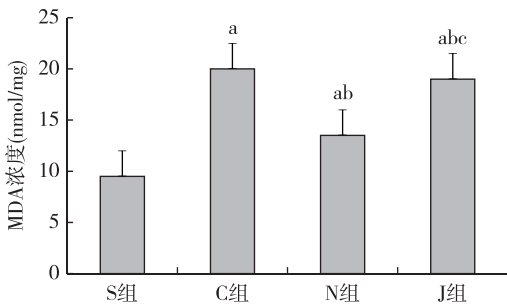
讨 论

研究 OLV 的病理生理改变的机制必须选择合适的动物模型。本研究采用的是家兔单肺通气模型^[5],模型已经被证明成熟且最为接近临床操作流程。双腔气管导管的左支外径最大处为 3.0 mm,与兔左支气管的内径相符。管道长度为 20 cm,较



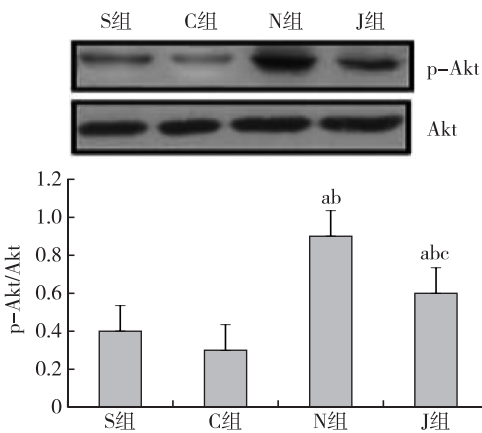
注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$; 与 C 组比较,^b $P < 0.05$; 与 N 组比较,^c $P < 0.05$

图 1 四组 W/D 的比较



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$; 与 C 组比较,^b $P < 0.05$; 与 N 组比较,^c $P < 0.05$

图 2 四组 MDA 浓度的比较

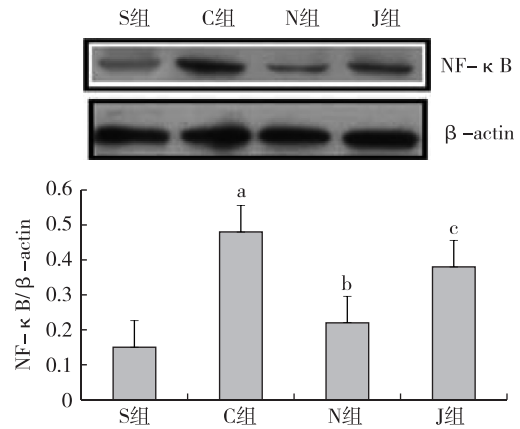


注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$; 与 C 组比较,^b $P < 0.05$; 与 N 组比较,^c $P < 0.05$

图 3 四组 p-Akt/Akt 比值的比较

为合适。左侧管腔长出 1.0 cm, 与左支气管长度相称, 塑形为略向左翘且斜口向右, 利于进入左支气管, 这是保证双腔气管导管放置一次成功率的关键。

OLV 是胸腔镜手术的必备技术。但 OLV 时



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$; 与 C 组比较,^b $P < 0.05$; 与 N 组比较,^c $P < 0.05$

图 4 四组 NF-κB 蛋白含量的比较

HPV 受到抑制、通气/血流(V/Q)比例失调, 并有 IR 和炎症反应。Szegedi 等^[6]认为重力作用影响 V/Q 匹配, 不依赖 HPV, 因此术侧氧化应激更重。Misthos 等^[7]回顾了 2001~2003 年 212 位病例, 认为肺复张可以激活严重的氧化应激, 氧自由基产生与 OLV 的时间相关。研究表明 mitoK_{ATP} 位于心、脑、肺等重要脏器的线粒体内膜, 与氧化应激密切相关, 在肺 IR 中发挥重要的作用。磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路是参与细胞增殖、分化、凋亡的经典通路。Akt 是 PI3K 下游主要效应物, 活化的 Akt(p-Akt)通过下游多种途径对靶蛋白进行磷酸化而发挥抗凋亡作用。Wu 等^[8]发现尼可地尔保护心肌, 治疗 IR 后损伤是通过 PI3K/Akt 途径的。p-Akt 可激活 IκB 激酶, 导致 NF-κB 的抑制剂 IκB 的降解, 生理状态下 NF-κB 从细胞质中释放出来经核转位, 激活其靶基因促进细胞的存活。但是 IR 损伤之后的 NF-κB 的增加又具有双面性, 它可以促进下游基因转录更多的细胞因子。参与炎症反应各阶段的许多分子都受 NF-κB 的调控, 包括 TNF-α、IL-1β、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧化酶 2(COX₂)等。此外, 锌指蛋白 A20、血红素加氧酶-1(HO-1)等一些抗炎和与细胞凋亡有关的分子如: 抗细胞凋亡的蛋白-1 和-2(inhibitor of apoptosis 1/2, IAP₁/IAP₂), TNF 受体相关因子(receptor-associated factors, TRAF₁/TRAF₂)也都受 NF-κB 的调控。急性肺损伤本质上是一种炎症反应, 其中 NF-κB 作为重要的转录因子, 在肺部炎症的细胞信号转导调控中起核心作用。在机械通气肺损伤中, NF-κB 被激活, 可产生

大量的趋化因子和细胞因子并募集中性粒细胞、单核、巨噬细胞和淋巴细胞, 引发肺部炎症反应^[9]。研究中发现尼可地尔能够明显改善单肺通气时及单肺通气后肺的氧合。W/D 和 MDA 结果反映了尼可地尔使用后能很好保护呼吸膜, 肺内的水分明显减少, 氧化应激明显减少。mitoK_{ATP} 特异性阻断剂格列苯脲使用后的指标逆转证明了通过 mitoK_{ATP} 发挥肺保护作用。本研究表明, 尼可地尔作用于 mitoK_{ATP} 后, 通过 PI3K/Akt 途径发挥作用, 抑制了细胞的凋亡, 保证了细胞的最大限度的存活。同时, 与炎症反应密切相关的 NF- κ B 在尼可地尔使用时受到了下调, 并也可被格列苯脲逆转, 证实了尼可地尔依赖 NF- κ B 消除 IR 损伤机制的存在。此结果与 Wang 等^[10]和 Xu 等^[11]的结果有一定的一致性, 认为从肺血管内皮细胞开始作用, 开放线粒体钾通道后抑制 NF- κ B 通路和线粒体凋亡通路。单肺通气时的低氧和缺血再灌注都会导致细胞内钙超载。当摄入到线粒体内的 Ca²⁺ 超过其转运限度时也会引起线粒体钙超载, 从而激发线粒体膜通透性转换孔(mPTP)开放。mPTP 开放会引起线粒体呼吸链解偶联、膜电位崩溃、细胞色素 C 及其他凋亡因子的释放, 通过这些改变最终导致细胞死亡^[12]。应该是尼可地尔使用后线粒体钙超载受到了抑制, 从而促发了 PI3K/Akt 途径的激活, mPTP 开放减少, 保证了细胞存活, 发挥了保护作用。

综上所述, 尼可地尔在家兔单肺通气时对非通气侧肺的塌陷及复张有保护作用, 作用于 mitoK_{ATP}, 通过 PI3K/Akt 发挥作用, 并且下调 NF- κ B 减轻 IR 所致肺损伤。但是, 此类保护作用的主体细胞是什么细胞, 是否存在量效依赖关系, 是否存在其他通路机制, 是否可转化在临床麻醉中运用, 需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Bernasconi F, Piccioni F. One-lung ventilation for thoracic surgery: current perspectives. *Tumori*, 2017, 103 (6): 495-503.
- [2] Liu B, Tewari AK, Zhang L, et al. Proteomic analysis of protein tyrosine nitration after ischemia reperfusion injury: Mitochondria as the major target. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1794(3): 476-485.
- [3] Shiva S, Sack MN, Greer JJ, et al. Nitrite augments tolerance to ischemia/reperfusion injury via the modulation of mitochondrial electron transfer. *J Exp Med*, 2007, 204(9): 2089-2102.
- [4] Saha KK, Kumar A, Deval MM, et al. Nicorandil infusion during off-pump coronary artery bypass grafting reduces incidence of intra-aortic balloon pump insertion. *Innovations*, 2016, 11(2): 123-127.
- [5] 游志坚, 姚尚龙, 周子超, 等. 单肺通气所致肺损伤中核因子 κ B 的作用. *临床麻醉学杂志*, 2008, 24(7): 611-613.
- [6] Szegei LL, D'Hollander AA, Vermassen FE, et al. Gravity is an important determinant of oxygenation during one-lung ventilation. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2010, 54(6): 744-750.
- [7] Misthos P, Katsaragakis S, Milingos N, et al. Postresectional pulmonary oxidative stress in lung cancer patients. The role of one-lung ventilation. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2005, 27(3): 379-382.
- [8] Wu H, Ye M, Yang J, et al. Nicorandil protects the heart from ischemia/reperfusion injury by attenuating endoplasmic reticulum response-induced apoptosis through pi3k/akt signaling pathway. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35 (6): 2320-2332.
- [9] Suzuki T, Yamashita K, Jomen W, et al. The novel nf-kappa-pap inhibitor, dehydroxymethylepoxyquinomicin, prevents local and remote organ injury following intestinal ischemia/reperfusion in rats. *J Surg Res*, 2008, 149(1): 69-75.
- [10] Wang H, Zuo X, Wang Q, et al. Nicorandil inhibits hypoxia-induced apoptosis in human pulmonary artery endothelial cells through activation of mitokatp and regulation of enos and the nf-kappa-pap pathway. *Int J Mol Med*, 2013, 32(1): 187-194.
- [11] Xu CQ, Liu BJ, Wu JF, et al. Icarin attenuates lps-induced acute inflammatory responses: Involvement of pi3k/akt and nf-kappa-pap signaling pathway. *Eur J Pharmacol*, 2010, 642(1-3): 146-153.
- [12] Gomez L, Li B, Mewton N, et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: Translation to patients. *Cardiovasc Res*, 2009, 83(2): 226-233.

(收稿日期: 2017-06-23)