

· 实验研究 ·

尼可地尔对单肺通气中塌陷肺组织缺氧诱导因子 1 α 的影响

王春光 曹苏 柏文 陈俊杰 卞小翠 嵇富海

【摘要】 目的 尼可地尔对单肺通气中塌陷肺组织缺氧诱导因子(hypoxia-inducible factor, HIF)-1 α (HTF-1 α)表达的影响。方法 选用清洁级新西兰白兔 24 只,随机分为 sham 组(S 组,双肺通气+开胸)、阴性对照组(C 组,单肺通气+开胸+生理盐水)、尼可地尔组(N 组,单肺通气+开胸+尼可地尔)、拮抗剂组(J 组,单肺通气+开胸+尼可地尔+格列苯脲),每组 6 只。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。S 组仅麻醉手术,不单肺通气,其他三组均有单肺通气,并在手术开始前输注干预药物。N 组在单肺通气前由静脉输入尼可地尔 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,输注 1 h。C 组输注等量生理盐水。J 组在实施单肺通气前由静脉输入格列苯脲 75 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 及尼可地尔 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,输注 1 h。取非通气肺保存处理,测湿/干重比(W/D)和 SOD 活性。采用 Western blot 法检测非通气肺组织 HIF-1 α 蛋白含量,实时定量 PCR(qRT-PCR)法检测非通气肺组织 HIF-1 α mRNA 表达量。结果 C 组和 J 组非通气侧肺 W/D 明显高于,SOD 活性明显低于 S 组和 N 组($P < 0.05$)。C 组、N 组和 J 组 HIF-1 α 蛋白和 HIF-1 α mRNA 表达量明显高于 S 组,且 N 组明显高于 C 组和 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有保护作用,减少氧化应激,并且作用于 mito KATP,通过上调 HIF-1 α 发挥作用。

【关键词】 尼可地尔;单肺通气;肺保护;超氧化物歧化酶;缺氧诱导因子-1 α

Effects of nicorandil on the expression of hypoxia-inducible factor 1 α in lung tissue of one-lung ventilation WANG Chunguang, CAO Su, BAI Wen, CHEN Junjie, 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 of nicorandil on hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α mRNA and protein in lung tissue of one-lung ventilation. **Methods** Twenty-four clean New Zealand white 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+glibenclamide) equally. The implementation of mechanical ventilation depended on 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. The implementation of thoracic surgery was simulated through one-lung and two-lung ventilation by auscultation, bubble test and direct observation. Group S was given anaesthesia only, no one-lung ventilation group S, the other three groups had single lung ventilation, and the drug was injected before the operation. Group N was infused nicorandil 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ before the implementation of single lung ventilation for 1 h. Group C was injected with the same amount of normal saline. Group J was intravenous infusion of glibenclamide 75 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ and nicorandil 100 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ the implementation of single lung ventilation for 1 h. Then wet and dry weight ratio(W/D) and superoxide dismutase (SOD) activity were measured after non-ventilatory lung was processed and preserved. The expression of HIF-1 α protein of non-ventilatory lung tissue was detected by Western-blot in the four groups. The transcription of HIF-1 α mRNA was detected by real-time quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in all groups. **Results** W/D in groups C and J were significantly higher compared with that of groups S and N ($P < 0.05$). The activ-

DOI:10.12089/jca.2018.01.018

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、陈俊杰、卞小翠);南通大学医学院(柏文)

通信作者:嵇富海,Email: jifuhai@suda.edu.cn

ity of SOD in groups C and J was significantly lower compared with groups S and N ($P < 0.05$). The expression of HIF-1 α protein and transcription of HIF-1 α mRNA in groups C, N and J were significantly higher than those in group S, and that of group N was significantly higher than those of groups C and J ($P < 0.05$). **Conclusion** Nicorandil has a protective effect on the collapse and inflation of non-ventilatory lung in rabbit with one-lung ventilation, reducing oxidative stress by SOD, acting on mito KATP and coming into play by up-regulation of HIF-1 α .

【Key words】 Nicorandil; one-lung ventilation; lung protection; Superoxide dismutase; Hypoxia-inducible factor-1 α

单肺通气 (OLV) 在胸科麻醉中可以防止患侧肺分泌物和血液手术期间流向通气侧, 保证呼吸道通畅、避免交叉感染和扩散^[1]。OLV 会存在低氧性肺血管收缩 (HPV) 受抑制、低氧血症、氧自由基的生成、缺血-再灌注损伤和炎症反应, 并且主要在术侧肺, 导致肺损伤。研究表明, 线粒体是缺血-再灌注损伤后的主要靶点^[2], 同时线粒体三磷酸腺苷 (ATP) 敏感性钾通道 (mito KATP) 位于心、脑、肺等重要脏器的线粒体内膜, 在肺的缺血-再灌注损伤中发挥重要的作用。尼可地尔作为一种 mito KATP 特异性开放剂, 能激活 mito KATP 开放保护细胞。缺氧诱导因子 (HIF)-1 是一种核转录因子, 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 组成的二聚体; 其中 HIF-1 α 的表达受氧浓度调节, 是 HIF-1 发挥功能的重要亚基, 常氧条件下其被迅速降解, 低氧条件下其降解受阻, 表达开始增加, 并通过调控下游众多基因蛋白发挥作用。本研究采用成熟的模拟临床的家兔 OLV 模型, 观察尼可地尔肺保护效果, 并探寻是否存在对 HIF-1 α 的影响。

材料与方法

实验材料与方法 本研究经南通大学实验动物保护和伦理委员会批准。清洁级新西兰白兔 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。

实验分组与处理 动物随机分为 sham 组 (S 组, 双肺通气 + 开胸)、阴性对照组 (C 组, 单肺通气 + 开胸 + 生理盐水)、尼可地尔组 (N 组, 单肺通气 + 开胸 + 尼可地尔)、拮抗剂组 (J 组, 单肺通气 + 开胸 + 尼可地尔 + 格列苯脲), 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, 维持丙泊酚 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。置动物于仰卧位。右侧颈总动脉置管监测动脉血压并采集动脉血标本; 行气管切开并插入自制双腔气管导管实施机械通气, 呼吸机通气参数为: FiO₂ 1.0, RR 40 次/分, V_T 10 ml/kg。在给予维库溴铵

250 μ g/kg 后, 气管切开并插入自制双腔气管导管行机械通气。静注复方乳酸钠 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。S 组仅麻醉手术, 不行 OLV, 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 OLV 前由静脉输入尼可地尔 100 μ g · kg⁻¹ · h⁻¹, 输注 1 h。C 组输注等量生理盐水。J 组在实施 OLV 前由静脉输入格列苯脲 75 μ g · kg⁻¹ · h⁻¹ 及尼可地尔 100 μ g · kg⁻¹ · h⁻¹, 输注 1 h。留取非通气侧肺处理保存待检测。

动脉血气分析 在尼可地尔等使用前 (T₁)、OLV 后 30 min (T₂) 和恢复双肺通气 30 min (T₃) 测动脉血气分析。

非通气肺湿/干重比 (W/D) 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 W/D。

超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性 组织匀浆 SOD 活性的定义为每毫克组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个亚硝酸盐单位。检测方法是先准确称取肺组织重量并匀浆, 其后所有步骤均严格按照试剂盒进行。最后用化学比色法检测 SOD 的活性。

Western blot 法检测 HIF-1 α 蛋白含量 将实验样本剪碎后置于装有 1 000 μ l 组织裂解液的 1.5 ml 离心管中, 在冰上进行电动匀浆, 静置 30 min, 4℃ 下 15 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液, 得到蛋白溶液。将 30 μ g 蛋白上样于 5%-10% Bis-Tris 胶, 电泳后转于 0.2 μ m 聚偏二氟乙烯膜。含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭液 37 封闭 2 h, 然后用相应一抗 (抗 β -actin、抗 HIF-1 α 抗体, 1:1 000 稀释) 孵育, 4℃ 过夜, TBST 洗涤 10 min, 重复 3 次。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), 37℃ 孵育 2 h, TBST 洗涤 10 min ×

3 次。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 值比各组内参蛋白 β -actin 的 A 值表示各组目的蛋白的相对表达量。

实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, qRT-PCR)检测 HIF-1 α mRNA 转录 采用 Trizol 提取液提取细胞总 RNA,采用 PTC-200 DNA 扩增仪,利用两步法 RT-PCR 试剂盒合成 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。引物序列:(1)HIF-1 α : 上游引物:5'-CATCTCCACCTTCTACCC-3',下游引物:5'-TCCAAGAAAGCGACATAG-3',产物为 336 bp。扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,56 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,32 个循环。GAPDH: 上游引物:5'-GTTCAACGGCACAGTCAA-3',下游引物:5'-CAGATCCACAACGGATACA-3',产物为 571 bp。扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,32 个循环。SYBR Green PCR Master Mix 与其结合产生荧光,荧光实时定量 PCR 仪测得的荧光强度累加后与 S 组进行比值。

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 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

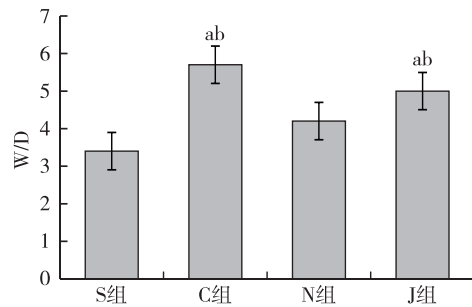
T_2 、 T_3 时 C 组和 J 组 SaO_2 和 PaO_2 明显低于 S 组和 N 组($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 四组白兔不同时点 SaO_2 和 PaO_2 的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	T_1	T_2	T_3
SaO_2 (%)	S 组	6	98.0 \pm 1.8	98.0 \pm 1.5	97.0 \pm 1.6
	C 组	6	97.0 \pm 2.3	93.0 \pm 2.0 ^{ab}	95.0 \pm 2.1 ^{ab}
	N 组	6	97.0 \pm 1.7	98.0 \pm 1.5	98.0 \pm 1.4
	J 组	6	97.0 \pm 1.8	94.0 \pm 2.2 ^{ab}	95.0 \pm 2.3 ^{ab}
PaO_2 (mm Hg)	S 组	6	332 \pm 41	329 \pm 45	331 \pm 44
	C 组	6	324 \pm 48	121 \pm 46 ^{ab}	213 \pm 50 ^{ab}
	N 组	6	327 \pm 46	325 \pm 49	336 \pm 42
	J 组	6	323 \pm 47	137 \pm 45 ^{ab}	235 \pm 46 ^{ab}

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

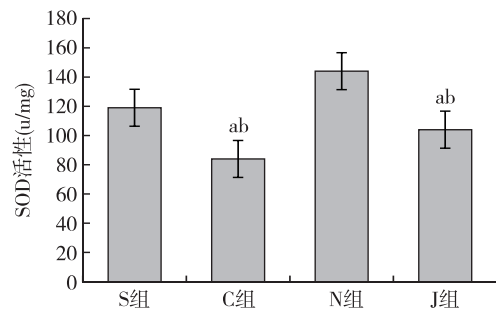
C 组和 J 组非通气侧肺 W/D 明显高于 S 组和 N 组($P < 0.05$)。C 组和 J 组 W/D 差异无统计学意义(图 1)。



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

图 1 四组白兔 W/D 的比较

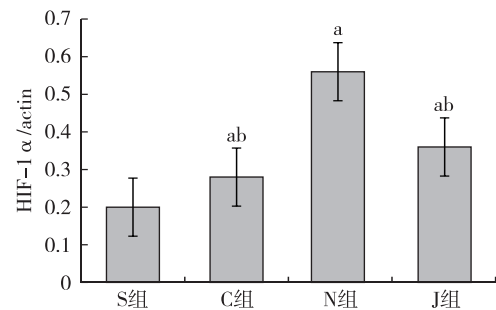
C 组和 J 组 SOD 活性明显低于 S 组和 N 组($P < 0.05$)。C 组和 J 组 SOD 活性差异无统计学意义(图 2)。



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

图 2 四组白兔 SOD 活性的比较

与 S 组比较,C 组、N 组和 J 组 HIF-1 α 蛋白含量和 HIF-1 α mRNA 表达量明显升高($P < 0.05$);与 N 组比较,C 组和 J 组 HIF-1 α 蛋白含量和 HIF-1 α mRNA 表达量明显降低($P < 0.05$)(图 3,4)。

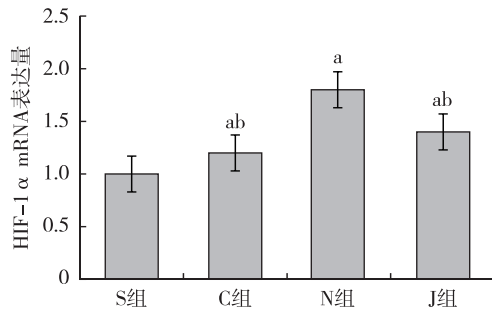


注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 N 组比较,^b $P < 0.05$

图 3 四组白兔 HIF-1 α 蛋白含量的比较

讨 论

OLV 的病理生理改变的机制是多因素的,为了研究其机制,必须建立合适的动物模型。本研究先



注:与 S 组比较, ^a*P*<0.05;与 N 组比较, ^b*P*<0.05

图 4 四组白兔 HIF-1α mRNA 表达量的比较

于临床研究,采用的是家兔单肺通气模型^[3]。该兔单肺通气模型已经被证明成熟且最为接近临床操作流程,动物是来源广泛,操作相对简单,研究 OLV 的理想模型。

胸科手术时单肺通气会存在急性肺损伤(ALI),包含缺血-再灌注损伤的多重损伤。ALI 的影响因素较多,缺血-再灌注损伤和氧化应激是主要方面。SOD 能消除生物体在缺血-再灌注损伤过程中产生的活性氧,在抗缺血-再灌注损伤中发挥重要作用。Chen 等^[4]发现 SOD 在心肌缺血-再灌注损伤中具有很好的保护作用,主要归功于氧化应激的减轻。同时,研究表明 HIF-1α 的表达受氧浓度调节,是在缺氧状态下特异性发挥活性的核转录因子,是内源性保护机制的始动因子和共同途径^[5]。Zhao 等^[6]的研究表明,应用 HIF-1α 稳定剂 DMOG 后,肺动脉 NO 和 iNOS 水平升高,肺损伤减轻,认为 HIF-1α 是肺缺血-再灌注损伤的重要机制之一。研究表明,新生鼠大脑神经元缺氧缺血时,磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路被激活,促进 HIF-1α 的高表达^[7]。Kakinuma 等^[8]的研究结果表明,PI3K/Akt/HIF-1α 通路参与了乙酰胆碱和迷走神经刺激对心肌缺血、缺氧的保护作用。通过不同方法和药物提高 HIF-1α 的高表达来增强组织耐缺氧能力可减轻缺血-再灌注损伤。研究表明 mito KATP 位于心、脑、肺等重要脏器的线粒体内膜,与缺血-再灌注损伤中的氧化应激密切相关,在肺的缺血-再灌注损伤中发挥重要的作用。尼可地尔作为一种 mito KATP 特异性开放剂,能激活 mito KATP 的开放,对缺血-再灌注损伤细胞具有保护作用。实验结果证明,尼可地尔能够明显改善单肺通气时及单肺通气后的肺氧合, SaO₂ 和 PaO₂ 均有明显改变。mito KATP 特异性阻断剂使用后的指标逆转证明了尼可地尔的肺保护作用,并

且是通过 mito KATP 发挥作用。W/D 和 SOD 活力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,氧化应激明显减轻,也证明了尼可地尔的保护作用机制,SOD 清除氧自由基的作用得到了极大的体现。N 组静脉输入尼可地尔 1 h 后 HIF-1α 蛋白表达和核酸转录增高,并且能被格列苯脲逆转,说明尼可地尔作用于 mitoKATP 后,通过上调 HIF-1α 发挥了作用,减轻了氧化应激和缺血-再灌注损伤,抑制了细胞的凋亡,保护了单肺通气时非通气侧肺组织和肺功能。此结果与 Wan 等^[9]的结果有部分的一致性。

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,通过 SOD 减少氧化应激,并且作用于 mito KATP,通过上调 HIF-1α 发挥作用。但二者之间是如何联系的,是否存在量效关系且呈正相关,仍需要进一步研究。

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] 游志坚,姚尚龙,周子超,等. 单肺通气所致肺损伤中核因子 κB 的作用. *临床麻醉学杂志*, 2008, 24(7): 611-613.
- [4] Chen C, Lu W, Wu G, et al. Cardioprotective effects of combined therapy with diltiazem and superoxide dismutase on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Life Sci*, 2017, 183: 50-59.
- [5] 葛万运,潘灵辉,林飞. 单肺通气时肺组织缺氧诱导因子 1α 和葡萄糖转运蛋白 1 的表达. *临床麻醉学杂志*, 2012, 28 (8): 765-766.
- [6] Zhao X, Jin Y, Li H, et al. Hypoxia-inducible factor 1 alpha contributes to pulmonary vascular dysfunction in lung ischemia-reperfusion injury. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(6): 3081-3088.
- [7] 李丽华,屈艺,毛萌,等. 新生鼠缺氧缺血性脑损伤时三磷酸肌醇激酶信号通路与缺氧诱导因子 1α 的调节. *中国修复重建外科杂志*, 2008, 22(9): 1102-1107.
- [8] Kakinuma Y, Ando M, Kuwabara M, et al. Acetylcholine from vagal stimulation protects cardiomyocytes against ischemia and hypoxia involving additive non-hypoxic induction of hif-1alpha. *FEBS Lett*, 2005, 579(10): 2111-2118.
- [9] Wan J, Wu W, Chen Y, et al. Insufficient radiofrequency ablation promotes the growth of non-small cell lung cancer cells through PI3K/Akt/HIF-1α signals. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2016, 48(4): 371-377.

(收稿日期:2017-10-12)