

· 实验研究 ·

雷帕霉素预处理对大鼠肢体缺血-再灌注诱发肺损伤的影响

黄丹 肖凡 郑小兰 罗振中 徐国海 唐斌

【摘要】 目的 探讨雷帕霉素预处理对大鼠肢体缺血-再灌注诱发肺损伤的影响及相关机制。**方法** 健康雄性 SD 大鼠 60 只, 4~5 月龄, 体重 250~300 g, 采用随机数字表法分为五组: 假手术组 (S 组)、肢体缺血-再灌注组 (IR 组)、雷帕霉素 1、5、10 mg/kg 预处理组 (R1、R5 和 R10 组), 每组 12 只。采用肢体缺血 2 h 再灌注 3 h 的方法制备肢体缺血-再灌注损伤模型。检测各组血清超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、丙二醛 (MDA)、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的浓度; 取肺组织, 光镜下观察肺组织病理学结果, 并测定肺组织湿干比重 (W/D)。**结果** IR、R1 和 R5 组 SOD 活性明显低于 S 组 ($P < 0.05$); R1、R5 和 R10 组 SOD 活性明显高于 IR 组, 且 R5 和 R10 组明显高于 R1 组, R10 组明显高于 R5 组 ($P < 0.05$)。IR、R1 和 R5 组血清 MDA、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 浓度和肺 W/D 明显升高 ($P < 0.05$); R1、R5 和 R10 组血清 MDA、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 浓度和肺 W/D 明显降低, 且 R5 和 R10 组明显低于 R1 组, R10 组明显低于 R5 组 ($P < 0.05$)。与 S 组比较, IR 组肺组织病理学损伤加重; 与 IR 组比较, R1、R5 和 R10 组肺组织病理学损伤逐渐减轻。**结论** 雷帕霉素预处理可减轻大鼠肢体缺血-再灌注诱发的肺损伤, 并且呈剂量依赖性, 剂量越大, 其减轻肢体缺血-再灌注诱发肺损伤的作用越强, 其机制可能与抗氧化应激和抗炎反应有关。

【关键词】 雷帕霉素; 再灌注损伤; 呼吸窘迫综合征; 预处理; SD 大鼠

Effects of rapamycin preconditioning on lung injury induced by limb ischemia-reperfusion in rats

HUANG Dan, XIAO Fan, ZHENG Xiaolan, LUO Zhenzhong, XU Guohai, TANG Bin. Department of Anesthesiology, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

Corresponding author: TANG Bin, Email: tangb1983@163.com

【Abstract】 Objective To discuss the effects and related mechanisms of rapamycin preconditioning on lung injury induced by limb ischemia-reperfusion (IR) in rats. **Methods** Sixty healthy male SD rats, aged 4-5 months, weighing 250-300 g, were randomly divided into 5 groups ($n=12$ each) using a random number table: sham operation group (group S); limb ischemia-reperfusion group (group IR); rapamycin 1, 5, 10 mg/kg pretreatment groups (groups R1, R5 and R10). Ischemia-reperfusion of limb was produced by occlusion of bilateral femoral arteries for 2 h followed by 3 h reperfusion. Blood samples were collected to determine serum superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) concentrations, lungs were removed for microscopic examination and for determination of wet/dry lung weight ratio. **Results** The activity of SOD in groups IR, R1 and R5 was significantly lower than that in group S ($P < 0.05$). The activity of SOD in groups R1, R5 and R10 was significantly higher than that in group IR, that in groups R5 and R10 was significantly higher than that in group R1, that in group R10 was significantly higher than that in the group R5 ($P < 0.05$). Serum MDA, IL-1 β , IL-6, TNF- α concentrations and wet/dry lung weight ratio were significantly increased in groups IR, R1 and R5 ($P < 0.05$). Serum MDA, IL-1 β , IL-6, TNF- α concentrations and wet/dry lung weight ratio were lower in groups R1, R5 and R10, those in groups R5 and R10 were significantly lower than those in group R1, those in group R10 was significantly lower than those in group R5 ($P < 0.05$). Compared with group S, the lung tissue injured more significantly in group IR. Compared with group IR, the lung tissue injury gradually reduced in groups R1, R5 and R10. **Conclusion** Rapamycin pretreatment can reduce lung injury caused by limb ischemia-reperfusion injury in rats in a dose-dependent manner, the greater the dose, the stronger the effect of reducing lung injury caused by limb ischemia-reperfu-

基金项目: 江西省卫生计生委科技计划 (20165283)

作者单位: 330006 南昌大学第二附属医院麻醉科 (黄丹、肖凡、郑小兰、罗振中、徐国海); 江西省人民医院急诊科 (唐斌)

通信作者: 唐斌, Email: tangb1983@163.com

sion injury. The mechanisms may involve attenuating oxidative stress and inhibiting inflammatory response.

【Key words】 Rapamycin; Reperfusion injury; Respiratory distress syndrome; Pretreatment; SD rats

肢体缺血-再灌注是临床外科常见的病理过程,肢体的缺血-再灌注不仅可引起局部缺血组织的损伤,亦可引起其它远隔器官的损伤^[1],甚至多器官功能障碍^[2],其中肺因其高灌注、与外界接触面积大和对缺血-再灌注损伤产生的氧自由基等炎性介质非常敏感而最易受累,严重时表现为急性呼吸窘迫综合征^[3,4]。临床常见于四肢大血管栓塞或损伤、断肢再植、严重肢体挤压伤及长时间应用止血带等恢复血流灌注后引起的肺功能障碍。雷帕霉素是一种强有力的免疫抑制剂,临床上已逐渐应用于肾移植的患者。而其对肺损伤的影响如何,目前报道较少。因此,本实验主要探讨雷帕霉素预处理对肢体缺血-再灌注大鼠肺损伤的影响,为临床肢体缺血损伤的治疗提供参考。

材料与方法

实验动物与分组 健康雄性 SD 大鼠 60 只,4~5 月龄,体重 200~250 g,由南昌大学实验动物科学部提供。采用随机数字表法将大鼠分为五组:假手术组(S 组)、肢体缺血-再灌注组(IR 组)、雷帕霉素 1、5、10 mg/kg 预处理组(R1、R5 和 R10 组),每组 12 只。

动物模型制备与实验方法 参照文献^[4]的方法建立肢体缺血-再灌注肺损伤模型。所有实验大鼠缺血前 12 h 禁食,自由饮水。腹腔注射 10%水合氯醛 3~4 ml/kg 后,在右侧股三角区切开皮肤,暴露股动脉、股静脉。S 组仅分离股动、静脉,不做任何操作,每日清晨给予 1 ml 生理盐水灌胃 1 次,连续 3 d,最后一次于术前 2 h 灌胃。IR、R1、R5 和 R10 组用无损伤微动脉夹闭近端股动、静脉,并用张力带环扎肢体阻断侧支循环,阻断下肢血流 2 h 后,松开无损伤微动脉夹及张力带,恢复下肢血流进行再灌注 3 h,应用超声血流仪监测血流,采用未监测到血流为缺血、监测到血流为再灌注的标准。R1、R5 和 R10 组分别于每日清晨将雷帕霉素 1、5、10 mg/kg 溶于 1 ml 蒸馏水灌胃 1 次,连续 3 d,最后一次于术前 2 h 灌胃,IR 组给予等量生理盐水,作为阴性对照。

观察指标 于再灌注 3 h 经下腔静脉穿刺抽血 2 ml,离心,取血清,采用黄嘌呤氧化酶法测定超氧

化物歧化酶(SOD)活性、硫代巴比妥法测定丙二醛(MDA)的浓度,采用 ELISA 法测定 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的浓度。取右肺上叶组织 HE 染色观察肺组织病理学变化。取右肺下叶组织测定肺湿/干重比值(W/D)。

统计分析 采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析。正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 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

IR、R1 和 R5 组 SOD 活性明显低于 S 组($P < 0.05$);R1、R5 和 R10 组 SOD 活性明显高于 IR 组,且 R5 和 R10 组明显高于 R1 组,R10 组明显高于 R5 组($P < 0.05$)。IR、R1 和 R5 组血清 MDA、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 浓度和肺 W/D 明显高于 S 组($P < 0.05$);R1、R5 和 R10 组、血清 MDA、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 浓度和肺 W/D 明显低于 IR 组,且 R5 和 R10 组明显低于 R1 组,R10 组明显低于 R5 组($P < 0.05$) (表 1)。

光镜下 S 组大鼠的肺组织结构完整,肺泡间隔均匀一致,可见少量炎性细胞浸润,肺泡腔清晰;与 S 组比较,IR 组肺组织病理学损伤加重,IR 组大鼠肺泡上皮细胞增生,肺间质明显增生,肺泡壁增厚,可见大量的炎性细胞浸润,毛细血管明显扩张充血,肺泡壁及肺泡间质中可见大量中性粒细胞;与 IR 组比较,R1、R5 和 R10 组肺组织病理学损伤逐渐减轻,炎性细胞浸润逐渐减少,R10 组只有少量红细胞渗出及肺泡间隔轻度增宽,基本接近于正常肺组织(图 1)。

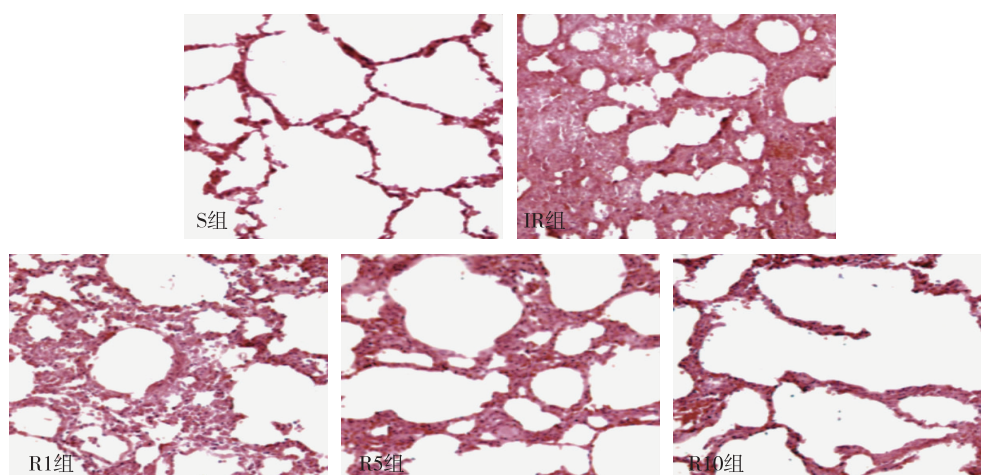
讨 论

本研究参照 Kyriakides 等^[4]的方法复制肢体缺血-再灌注致肺损伤动物模型,结果显示,与对照组比较,肢体缺血-再灌注后大鼠肺泡结构严重破坏,毛细血管明显扩张充血,肺泡壁及肺泡间质中可见大量中性粒细胞,肺组织含水量明显增加,提示肢体缺血-再灌注诱发肺损伤模型制备成功。这与孙晓峰等^[5]在观察舒芬太尼预处理对大鼠肢体缺血-再灌注肺损伤的影响中的研究结果一致。

表 1 五组大鼠血清 SOD 活性、MDA、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 浓度、肺组织 W/D 的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	SOD (U/ml)	MDA (nmol/ml)	IL-1 β (pg/ml)	IL-6 (ng/ml)	TNF- α (ng/ml)	W/D
S 组	12	72.31 $\pm$ 4.22	5.12 $\pm$ 1.24	285 $\pm$ 37	231 $\pm$ 19	275 $\pm$ 29	3.12 $\pm$ 0.53
IR 组	12	46.36 $\pm$ 3.40 ^a	13.43 $\pm$ 1.34 ^a	902 $\pm$ 89 ^a	876 $\pm$ 82 ^a	922 $\pm$ 123 ^a	7.07 $\pm$ 1.14 ^a
R1 组	12	50.37 $\pm$ 3.79 ^{ab}	10.26 $\pm$ 3.07 ^{ab}	737 $\pm$ 61 ^{ab}	706 $\pm$ 78 ^{ab}	773 $\pm$ 83 ^{ab}	5.87 $\pm$ 0.86 ^{ab}
R5 组	12	57.63 $\pm$ 4.34 ^{abc}	7.89 $\pm$ 2.31 ^{abc}	545 $\pm$ 52 ^{abc}	517 $\pm$ 59 ^{abc}	588 $\pm$ 62 ^{abc}	4.63 $\pm$ 0.75 ^{abc}
R10 组	12	67.55 $\pm$ 4.13 ^{bcd}	6.10 $\pm$ 2.12 ^{bcd}	322 $\pm$ 27 ^{bcd}	310 $\pm$ 36 ^{bcd}	315 $\pm$ 40 ^{bcd}	3.84 $\pm$ 0.65 ^{bcd}

注:与 S 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 IR 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 R1 组比较, ^c $P < 0.05$; 与 R5 组比较, ^d $P < 0.05$

图 1 五组大鼠肺组织病理结构 (HE $\times$ 200)

研究表明氧化应激和炎症反应是介导肢体缺血-再灌注致肺损伤的重要机制^[6],氧自由基的大量释放、中性粒细胞的激活和炎性因子的释放等同时作用于肺毛细血管内皮细胞,破坏肺泡毛细血管的完整性,增加血管通透性,引起肺组织水肿和换气功能的障碍^[7]。

MDA 是脂质过氧化代谢产物,可间接反映氧自由基对组织细胞的损伤程度^[8],此外 MDA 还可以通过激活补体,损伤内皮细胞结构的完整性,增加微血管通透性,引起远隔器官肺组织的病理改变^[9]。SOD 是体内清除氧自由基最主要的一种酶,其活性可反映机体清除氧自由基的能力,在对机体的氧化和抗氧化平衡中起着至关重要的作用^[10]。本研究结果显示,肢体缺血-再灌注后 MDA 浓度明显升高、SOD 活性下降,而使用雷帕霉素的各组则剂量依赖性地明显减轻上述指标的变化,表明雷帕霉素预处理可能通过降低肺氧化应激反应,减少再

灌注时氧自由基的产生,并刺激抗氧化酶和自由基清除剂的释放,从而减轻肺损伤。

此外,炎性因子过度反应是肢体缺血-再灌注诱发肺损伤发生的重要因素。大量研究表明 IL-1 β 与 TNF- α 是介导肺损伤的炎性反应中产生最早并起到核心作用的重要细胞因子,IL-1 β 与 TNF- α 共同启动炎症反应,还可调节 IL-6 的合成和释放,引起大量的中性粒细胞激活并聚集于肺泡毛细血管内皮,释放氧自由基、脂质、代谢产物和炎症介质,形成级联放大的瀑布样连锁反应,诱导过度炎症反应的发生,引起血管渗出增加,导致肺水肿^[11]。

前期研究结果显示,在大鼠肢体缺血-再灌注肺损伤前给予雷帕霉素 1 mg/kg 干预,可以减轻肺脏损伤,本研究在前期研究的基础上,增加雷帕霉素剂量,进一步探索不同剂量雷帕霉素在肢体缺血-再灌注肺损伤中的影响及可能的机制,以期为临床肢体缺血损伤的治疗提供理论依据。本研究结果显

示,大鼠肢体缺血-再灌注时血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 浓度明显升高,提示肢体缺血-再灌注时释放的大量炎性因子随血液循环进入了肺组织,诱发了肺损伤。徐倩等^[12]研究显示雷帕霉素预处理可使肝脏冷缺血-再灌注大鼠肺组织 IL-6 和 TNF- α 浓度明显降低,本研究结果与其一致。本研究组之前的研究亦显示雷帕霉素 10 mg/kg 预处理可使肾脏缺血-再灌注大鼠的肺组织中 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 浓度明显降低^[13],而本研究进一步显示缺血前给予 10 mg/kg 雷帕霉素干预,则血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 浓度较 IR 组明显降低,且 R10 组肺组织只有少量红细胞渗出及肺泡间隔轻度增宽,基本接近于正常肺组织,提示该剂量的雷帕霉素能够减轻肢体缺血-再灌注所致的肺损伤。同时,R1、R5 和 R10 组血清 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 浓度均明显低于 IR 组,且 R5 组明显低于 R1 组,显示雷帕霉素预处理可以通过降低促炎因子的水平来减轻下肢缺血-再灌注所致的肺损伤,并且呈剂量依赖性,但具体的信号传导通路仍待进一步研究。

综上所述,雷帕霉素预处理可减轻肢体缺血-再灌注诱发肺损伤,并且呈剂量依赖性,剂量越大,其减轻肢体缺血-再灌注诱发肺损伤的作用越强。其机制可能与减少氧化应激和降低促炎因子有关。

参 考 文 献

- [1] Szijártó A, Turóczy Z, Szabó J, et al. Rapidly progressing fatal reperfusion syndrome caused by acute critical ischemia of the lower limb. *Cardiovasc Pathol*, 2013, 22 (6): 493-500.
- [2] Budic I, Pavlovic D, Kitic D, et al. Tourniquet-induced ischemia-reperfusion injuries during extremity surgery at children's age: impact of anesthetic chemical structure. *Redox Rep*, 2013, 18 (1): 20-26.
- [3] Zhang J, Wu Y, Weng Z, et al. Glycyrrhizin protects brain against ischemia-reperfusion injury in mice through HMGB1-TLR4-IL-17A signaling pathway. *Brain Res*, 2014, 1582 (5): 176-186.
- [4] Kyriakides C, Austen WG Jr, Wang Y, et al. Neutrophil mediated remote organ injury after lower torso ischemia and reperfusion is selectin and complement dependent. *J Trauma*, 2000, 48 (1): 32-38.
- [5] 孙晓峰, 赵宏, 舒芬太尼预处理对大鼠肢体缺血-再灌注肺损伤的影响. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31 (1): 63-66.
- [6] Estebe JP, Davies JM, Richebe P. The pneumatic tourniquet: mechanical, ischemia-reperfusion and systemic effects. *Eur J Anaesthesiol*, 2011, 28 (6): 404-411.
- [7] Wang L, Yuan R, Yao C, et al. Effects of resolvin D1 on inflammatory responses and oxidative stress of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127 (5): 803-809.
- [8] García-de-la-Asunción J, Perez-Solaz A, Carrau M, et al. Different oxidative stress marker levels in blood from the operated knee or the antecubital vein in patients undergoing knee surgery: a tourniquet-induced ischemia-reperfusion model. *Redox Rep*, 2012, 17 (5): 194-199.
- [9] Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-latscha B, et al. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest*, 2000, 80 (5): 617-653.
- [10] Hassoun HT, Kozar RA, Kone BC, et al. Intraischemic hypothermia differentially modulates oxidative stress proteins during mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery*, 2002, 132 (2): 369-376.
- [11] Weng TI, Wu TY, Chen BL, et al. C/EBP homologous protein deficiency aggravates acute pancreatitis and associated lung injury. *World J Gastroenterol*, 2013, 19 (41): 7097-7105.
- [12] 徐倩, 杜洪印, 喻文立, 等. 雷帕霉素预先给药对肝脏冷缺血再灌注大鼠肺损伤的影响. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34 (1): 59-61.
- [13] 黄丹, 唐斌, 罗振中. 雷帕霉素预处理对大鼠肾缺血再灌注诱发肺损伤的影响. *南昌大学学报: 医学版*, 2014, 54 (12): 25-27.

(收稿日期:2016-06-06)