

· 实验研究 ·

高碳酸血症预处理对肺缺血-再灌注损伤
早期炎症反应的影响

曲良超 闫小强 蒋章颖 宋志平 赵为禄

【摘要】 目的 观察不同程度高碳酸血症预处理对大鼠肺缺血-再灌注损伤(lung ischemia reperfusion injury, LIRI)的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 50 只, 2~3 月龄, 随机分为五组, 每组 10 只。假手术组(S 组): 开胸后游离左侧肺门, 不予其他处理; IR 组: 采用左肺原位缺血 45 min, 再灌注 180 min 建立大鼠左肺 IR 模型; L、M、H 组: 通过调节 RR, 使 $P_{ET}CO_2$ 分别达到 46~55 mmHg(L 组)、56~65 mmHg(M 组)、66~75 mmHg(H 组), 预处理 5 min, 然后同 IR 组处理建立大鼠左肺 IR 模型。缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, IR) 180 min 后, 采用 ELISA 法检测血清 IL-8 和 IL-10 浓度; 处死大鼠, 取肺组织标本, 采用考马斯亮蓝染色法检测肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF)中总蛋白(TP)含量, 肺组织湿/干重比(W/D)、丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)活性, 观察肺组织病理学变化及 TNF- α 蛋白阳性细胞面积。**结果** 与 S 组比较, IR、L、M、H 组血清 IL-8 浓度、肺组织病理学评分、肺组织 W/D、MDA 含量, 以及 TNF- α 蛋白阳性细胞面积百分比明显升高($P < 0.05$), SOD 活性明显降低($P < 0.05$)。与 IR 组比较, L、M、H 组血清 IL-8 浓度、肺组织病理学评分、肺组织 W/D、MDA 含量, 以及 TNF- α 蛋白阳性细胞面积百分比、SOD 活性明显降低($P < 0.05$)。与 L 组比较, H 组以上各项指标均明显降低($P < 0.05$)。IR 组血清 IL-10 浓度明显高于 S 组($P < 0.05$)。**结论** 通过改变呼吸模式造成高碳酸血症预处理, 可以抑制大鼠 LIRI 后氧自由基爆发和促炎细胞因子生成, 降低早期炎症反应水平, 减少炎症渗出, 对减轻 LIRI 起到一定的作用, 而且在 $P_{ET}CO_2$ 46~75 mmHg 内, 随着 $P_{ET}CO_2$ 升高, 作用越强。

【关键词】 高碳酸血症; 预处理; 肺缺血-再灌注损伤

Effects of hypercapnia pretreatment on inflammatory response of lung ischemia-reperfusion injury QU Liangchao, YAN Xiaoliang, JIANG Zhangjie, SONG Zhiping, ZHAO Weilu. Department of Anesthesia, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China
Corresponding author: ZHAO Weilu, Email: ferry7@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effects of hypercapnia pretreatment on lung ischemia-reperfusion (IR) injury. **Methods** Fifty male Sprague Dawley rats, aged 2-3 months, were randomly divided into five groups. Control group (group S) was continuously perfused without ischemia after free left hilar; group IR was performed occlusion of the left pulmonary hilum for 45 min, followed by reperfusion 180 min; preconditioning group was adjusted respiratory rate to maintain $P_{ET}CO_2$ at 46-55 mmHg (group L), 56-65 mmHg (group M) and 66-75 mmHg (group H), respectively, and then treated in a way same as group IR was. After 180 min of IR, serum IL-8 and IL-10 concentrations were measured by ELISA; rats were sacrificed and lung tissue samples were taken to detect total protein (TP) content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) by coomassie blue staining; wet/dry weight ratio (W/D), malondialdehyde (MDA), the concentrations of IL-8 and IL-10, and the activity of superoxide dismutase (SOD) were measured. The pathological changes of lung tissue and the expression of TNF- α immunoreactive substance were observed. **Results** Compared with group S, the concentration of IL-8 in serum, lung histopathological score, W/D, MDA concentration, and TNF- α protein positive cell area percentage were significantly increased in groups IR, L, M and H ($P < 0.05$), SOD activity was significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with group IR, the all indexes of groups L, M and H decreased ($P < 0.05$). Among the groups L, M and H, the indicators of group H were lower than group L ($P < 0.05$). The concentration of IL-10 in group IR was significantly higher

DOI:10.12089/jca.2018.06.016

基金项目: 江西省重点研发计划(20171BBG70054)

作者单位: 330006 南昌大学第一附属医院麻醉科(曲良超、蒋章颖、宋志平、赵为禄); 开封市中心医院麻醉科(闫小强)

通信作者: 赵为禄, Email: ferry7@163.com

compared with group S ($P < 0.05$). **Conclusion** Hypercapnia pretreatment can be achieved by changing the breathing pattern. It can inhibit the generation of oxygen free radicals and proinflammatory cytokines, and reduce the level of early inflammatory reaction and the inflammatory exudation on LIRI in rats. The protective effect increases along with $P_{ET}CO_2$ increasing.

【Key words】 Hypercapnia; Pretreatment; Lung ischemia-reperfusion injury

从保护性通气策略到容许性高碳酸血症, $PaCO_2$ 的适度升高已逐渐被临床接受^[1]。外源性增加 CO_2 吸入量以提高 $PaCO_2$ 具有一定的治疗作用, 称为治疗性高碳酸血症^[2]。与外源性吸入 CO_2 比较, 通过调节 RR 使内源性 CO_2 升高即呼吸性酸中毒, 操作简单而且容易控制。本研究在肺缺血-再灌注(ischemia-reperfusion, IR)之前, 通过调控 RR, 造成不同程度的呼吸性酸中毒对大鼠肺组织进行预处理, 检测该方法对减轻 LIRI 的作用, 旨在探讨高碳酸血症预处理对于减轻肺缺血-再灌注损伤(lung ischemia reperfusion injury, LIRI)的作用及其可能机制, 以期为临床提供简单有效的减轻 LIRI 的方法, 便于临床操作推广。

材料与方法

实验动物与分组 雄性 SD 大鼠 50 只, 2~3 月龄, 体重 250~300 g, 随机分为五组: 假手术组(S 组)、IR 组、 $P_{ET}CO_2$ 46~55 mmHg 预处理组(L 组)、 $P_{ET}CO_2$ 56~65 mmHg 预处理组(M 组)、 $P_{ET}CO_2$ 66~75 mmHg 预处理组(H 组), 每组 10 只。

S 组: 开胸后游离左侧肺门, 不予其他处理。IR 组: 10%水合氯醛 5 ml/kg 腹腔注射麻醉后, 气管插管接小动物呼吸机(HX-300), RR 70 次/分, I:E 1:2, V_T 10~12 ml/kg, Datex 气体检测仪检测 $P_{ET}CO_2$, 采用 Datex 专用校气瓶(CO_2 显示数值为 5.0)校准。麻醉维持静脉泵入瑞芬太尼 $0.1 \mu g \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$, 间隔 40 min 静脉注射顺苯磺酸阿曲库铵维持肌松, 术中静脉输注生理盐水 0.5 ml/h。参照文献[3]建立大鼠左肺 IR 模型。于左前胸第 5 肋间开胸, 游离左肺门, 生理盐水稀释 50 U 肝素至 500 μl 经尾静脉注射, 10 min 后于肺充盈末用无创微血管夹夹闭左肺门, 45 min 后松开, 再灌注 180 min。L、M、H 组: 游离左肺门稳定后, 调节呼吸参数, 使 $P_{ET}CO_2$ 分别达到 46~55 mmHg (L 组)、56~65 mmHg (M 组) 和 66~75 mmHg (H 组) 并维持 5 min, 然后同 IR 组处理建立大鼠左肺 IR 模型。

标本采集 实验结束后, 经左心房用 5 ml 抗

凝注射器抽取血液标本 2 ml, 然后左心房放血处死大鼠, 切开胸腔取下整个左肺组织。10 ml 无菌生理盐水分 3~4 次注入左肺支气管内冲洗, 压力不超过 15 mmH₂O, 每次注入量不超过 3 ml, 回收灌洗液到离心管中, 提取左支气管肺泡灌洗液(bronchial alveolar lavage fluid, BALF)。血标本需室温静置 1 h, 使其凝固, 3 500 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 放置于 -80℃ 低温冰箱中保存。

血清与肺组织生化 按照 ELISA 试剂盒说明操作, 测定血清 IL-8 和 IL-10 浓度。采用考马斯亮蓝染色法测定 BALF 中总蛋白(total protein, TP)含量。肺组织标本分为 3 份, 一份用于测定肺组织湿/干重比(W/D); 一份采用比色法检测丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性, 实验步骤按照试剂盒说明操作; 一份以 10% 中性福尔马林内浸泡、固定、石蜡包埋, HE 染色固定做病理切片。进行肺组织病理评分, 主要依据 5 方面内容: (1)肺泡腔出血情况; (2)透明膜形成情况; (3)间质水肿情况; (4)呼吸道上皮损伤程度; (5)中性粒细胞浸润情况。每个项目按照 0~4 分来评分: 0 分, 正常; 1 分, 极少量变化; 2 分, 轻微变化; 3 分, 中度变化; 4 分, 严重变化。以上得分相加用于评价肺组织损伤程度, 满分为 20 分。所有标本评分均由两位有经验的病理医师独立单盲条件下完成, 取两者平均分为最终得分。

肺组织免疫组织化学 采用过氧化物酶标记的链酶卵白素法(SP 法)测定肺组织 TNF- α 蛋白含量。实验步骤严格按照试剂盒说明书进行操作。TNF- α 免疫反应阳性物质表达在细胞胞浆, 呈棕黄色至深棕黄色颗粒, 切片染色后细胞胞浆内出现均一的棕黄色细颗粒者为 TNF- α 阳性细胞。图像定量分析: 每张切片在 10×40 倍显微镜下取 5 个视野, 采用计算机图像分析系统 Image Pro Plus 5.0 分析软件分别统计各视野阳性面积百分比(阳性染色面积÷该视野总面积×100%)。

统计分析 采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计分析。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, 组内比较采用重复测量方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

结 果

血清与肺组织生化 L、M、H 组血清 IL-8 浓度、肺组织 TP 含量、W/D、MDA 含量明显低于 IR 组,明显高于 S 组($P<0.05$);L 组血清 IL-8 浓度明显低于 H 组,肺组织 TP 含量、W/D、MDA 含量明显高于 H 组($P<0.05$)。IR 组血清 IL-10 浓度明显高于 S 组($P<0.05$)。L、M、H 组肺组织 SOD 活性明显高于 IR 组,明显低于 S 组($P<0.05$);L 组肺组织 SOD 活性明显低于 H 组($P<0.05$)(表 1)。

肺组织病理结构 S 组肺泡、肺间质基本接近于正长肺组织结构,仅有少量炎症细胞和肺间质轻度水肿;IR 组肺组织结构不清,肺泡腔、间质及支气管腔有大量炎症细胞浸润和红细胞漏出,水肿明显,肺泡间隔破坏;L、M、H 组肺泡壁增厚和水肿程度较 IR 组减轻,有部分炎性细胞浸润。与 S 组比较, L、M、H 组肺泡壁增厚和水肿程度较大(图 1)。

肺组织病理学评分 S、IR、L、M、H 组肺组织病理学评分分别为(4.21 ± 1.22)、(13.31 ± 2.82)、(9.74 ± 1.72)、(7.89 ± 1.66)、(6.53 ± 1.79)分。L、M、H 组肺组织病理学评分明显低于 IR 组,明显高于 S 组($P<0.05$), L 组肺组织病理学评分明显高于 H 组($P<0.05$)。

肺组织免疫组织化学 S 组 TNF- α 蛋白基因表达较局限,胞浆棕黄色,局限性、散在性上色,范围最小;IR 组胞浆弥漫性、广泛性着色,深棕黄色,基因表达强阳性。L、M、H 组胞浆棕黄色,上色范围较局限,呈阳性表达,上色范围表达依次减小(图 2)。S、IR、L、M、H 组肺组织肺 TNF- α 蛋白阳性细胞面积百分比分别为 $4.24\%\pm 1.02\%$ 、 $8.79\%\pm 1.98\%$ 、 $7.58\%\pm 1.01\%$ 、 $7.12\%\pm 1.12\%$ 、 $6.95\%\pm 1.54\%$ 。L、M、H 组 TNF- α 蛋白阳性细胞面积百

分比明显低于 IR 组,明显高于 S 组($P<0.05$)。L 组 TNF- α 蛋白阳性细胞面积百分比明显高于 H 组($P<0.05$)。

讨 论

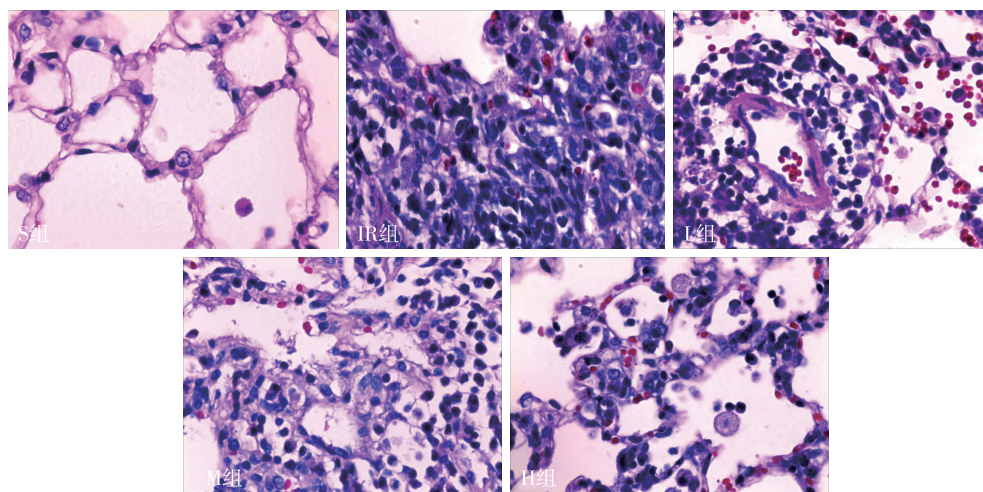
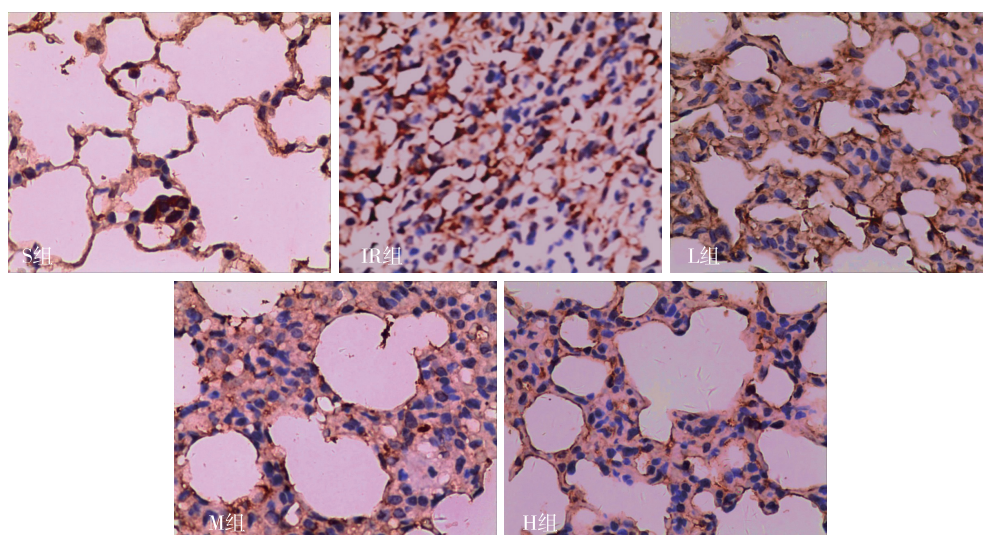
保护性通气策略可减轻机械通气肺损伤,被临床广泛应用以改善患者预后。自 Darioli 等^[4]以来,大量基础以及临床研究都证明,低通气治疗能显著降低死亡率。这种通气方式被称作容许性高碳酸血症,人为地让患者存在一定程度的高碳酸血症,以期达到减少肺损伤、降低死亡率的目的。起初,容许性高碳酸血症保护性通气策略的保护作用被认为和低通气治疗降低肺的张力有关,这种通气策略仅仅是通过减轻肺牵拉引起的机械性损伤,达到肺损伤减轻的目的^[5]。后来 Shibata 等^[6]发现高碳酸血症可以降低肺毛细血管通透性和氧自由基的损伤。Laffey 等^[7]研究也表明,在使用碱性药物中和低潮气量通气所致的碳酸中毒后,这一作用消失,表明酸化才是容许性高碳酸血症减轻肺损伤的关键因素,适当的低潮气量不会对肺机械通气损伤产生明显影响^[8-9]。临床研究表明,健康自愿者在 10~20 min 内吸入 7%~14% CO_2 , PaCO_2 最高达 101 mmHg。当 $\text{PaCO}_2>80$ mmHg 时,多数自愿者意识丧失,但在高碳酸血症期间及恢复到正常状态,皆未发现心血管不稳定及严重心律失常^[10]。

本研究通过改变通气策略使内源性 CO_2 增加,从而产生高碳酸血症内环境,达到酸化预处理的目的。本实验应用肌松药,可以有效减轻自主呼吸与机械通气的对抗,最大程度地减轻机械通气引起的肺损伤,同时镇痛药有效减轻手术过程中的应激,避免因应激反应引起的损伤和体液因子的改变,使结果更可信。本研究结果提示,不同程度高碳酸血症预处理均可以降低 LIRI 后 MDA 和炎性因子 IL-

表 1 五组大鼠血清与肺组织生化指标的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	IL-8 (ng/L)	IL-10 (ng/L)	TP (g/L)	W/D	MDA (nmol·mg ⁻¹ ·prot ⁻¹)	SOD (U·mg ⁻¹ ·prot ⁻¹)
S 组	10	50.63±6.91	44.37±3.96	0.14±0.02	4.45±0.23	0.81±0.06	19.91±1.19
IR 组	10	77.62±9.19 ^a	50.63±5.48 ^a	0.37±0.04 ^a	5.75±0.37 ^a	1.31±0.08 ^a	12.35±1.15 ^a
L 组	10	70.38±7.17 ^{ab}	0.28±0.03 ^{ab}	5.43±0.30 ^{ab}	1.08±0.09 ^a	48.50±4.75	13.72±1.01 ^{ab}
M 组	10	66.62±6.95 ^{ab}	46.90±3.44	0.25±0.04 ^{ab}	5.27±0.28 ^{ab}	0.98±0.09 ^{ab}	15.08±1.07 ^{ab}
H 组	10	63.25±6.45 ^{abc}	46.62±3.07	0.21±0.02 ^{abc}	5.07±0.10 ^{abc}	0.95±0.10 ^{abc}	15.13±1.15 ^{abc}

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

图 1 五组大鼠肺组织 HE 染色图 ($\times 400$)图 2 五组大鼠肺组织 TNF- α 蛋白免疫组织化学染色图 ($\times 400$)

8 浓度, 和既往外源性 CO_2 对肺损伤的作用一致^[11-12]。

内皮细胞的损伤是 LIRI 特征性病变, 其主要表现为肺毛细血管扩张和肺泡上皮细胞壁断裂, 使内皮细胞通透性增加, 血管内水和蛋白漏出, 炎症细胞的迁移与聚集, 最终导致肺水肿。本研究显示, 高碳酸血症预处理对 LIRI, 病理切片结果显示肺 IR 组织结构不清, 肺泡腔、间质及支气管腔有大量炎症细胞浸润和红细胞漏出, 水肿明显, 肺泡间隔破坏; 不同程度高碳酸血症预处理组和 IR 组比较, 肺泡、肺间质水肿、炎症浸润明显减轻, TP 含量和 W/D 值均明显下降, 这说明通过高碳酸血症预处理, 能够明显改善 LIRI 后炎症渗出^[13-15]。炎性介质的大量释放、氧自由基的爆发、内皮细胞的

损伤等机制在 LIRI 中起重要作用^[16]。本研究显示, 高碳酸血症预处理 LIRI 后, 肺组织 MDA 含量明显下降, SOD 活性下降程度则有所减轻, 充分证明高碳酸血症处理能够抑制 LIRI 后的氧自由基爆发。

IL-10 是对炎症起负性调节作用的抑炎因子, 炎症反应的增加进一步刺激 IL-10 的增加, 其高峰出现比促炎因子晚^[17-19]。本研究中高碳酸血症预处理 LIRI 后, 虽然 IL-10 浓度有所升高, 但并未显示明显差异, 这可能是 LIRI 后早期炎症抑炎因子上升较晚有关。TNF- α 来自肺泡巨噬细胞, 是 LIRI 后最早释放的细胞因子, 随着炎症加重 TNF- α 浓度逐渐升高, 直接导致肺组织毛细血管内皮细胞的损伤。本研究显示, 高碳酸血症预处理组的

TNF- α 蛋白阳性细胞面积百分比有所降低,说明高碳酸血症预处理能够有效减轻大鼠肺 IR 损伤后炎症反应水平。

综上所述,通过改变呼吸模式造成高碳酸血症预处理,可以抑制大鼠 LIRI 后氧自由基爆发和促炎细胞因子生成,降低早期炎症反应水平,减少炎症渗出,对减轻 LIRI 起到一定的作用,而且这种作用在 $P_{ET}CO_2$ 46~75 mmHg 内,随着 $P_{ET}CO_2$ 升高而增强。

参 考 文 献

- [1] Ryu J, Haddad G, Carlo WA. Clinical effectiveness and safety of permissive hypercapnia. *Clin Perinatol*, 2012, 39 (3): 603-612.
- [2] Hummler HD, Banke K, Wolfson MR, et al. The effects of lung protective ventilation or hypercapnic acidosis on gas exchange and lung injury in surfactant deficient rabbits. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0147807.
- [3] Tanaka S, Chen-Yoshikawa TF, Kajiwara M, et al. Protective effects of imatinib on ischemia/reperfusion injury in rat lung. *Ann Thorac Surg*, 2016, 102(5): 1717-1724.
- [4] Darioli R, Perret C. Mechanical controlled hypoventilation in status asthmaticus. *Am Rev Respir Dis*, 1984, 129 (3): 385-387.
- [5] Hegeman MA, Hemmes SN, Kuipers MT, et al. The extent of ventilator-induced lung injury in mice partly depends on duration of mechanical ventilation. *Crit Care Res Pract*, 2013 (8): 435236.
- [6] Shibata K, Cregg N, Engelberts D, et al. Hypercapnic acidosis may attenuate acute lung injury by inhibition of endogenous xanthine oxidase. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998, 158(5 Pt1): 1578-1584.
- [7] Laffey JG, Engel Berds D, Kavanagh BP. Buffering hypercapnic acidosis worsens acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 161(1): 141-146.
- [8] Kapitsinou PP, Haase VH. Molecular mechanisms of ischemic preconditioning in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015, 309 (10): F821-F834.
- [9] Maslov LN, Lishmanov IuB, Kolar F, et al. Hypoxic preconditioning-a phenomenon increasing the tolerance of cardiomyocytes to hypoxia-reoxygenation. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 2010, 96(12): 1170-1189.
- [10] Gillette MA, Hess DR. Ventilator-induced lung injury and the evolution of lung-protective strategies in acute respiratory distress syndrome. *Respir Care*, 2001, 46(2): 130-148.
- [11] Wu XD, Zhang ZY, Sun S, et al. Hypoxic preconditioning protects microvascular endothelial cells against hypoxia/reoxygenation injury by attenuating endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis*, 2013, 18 (1): 85-98.
- [12] Horie S, Ansari B, Masterson C, et al. Hypercapnic acidosis attenuates pulmonary epithelial stretch-induced injury via inhibition of the canonical NF- κ B pathway. *Intensive Care Med Exp*, 2016, 4(1): 8.
- [13] Kosieradzki M, Pratschke J, Kupiec-Węgliński J, et al. Ischemia/reperfusion injury, its mechanisms, and prevention. *J Transplant*, 2012, 2012: 610370.
- [14] Lv X, Tan J, Liu D, et al. Intratracheal administration of p38 α short-hairpin RNA plasmid ameliorates lung ischemia-reperfusion injury in rats. *J Heart Lung Transplant*, 2012, 31 (6): 655-662.
- [15] 邱晓晓, 戴雍月, 宋张娟, 等. SP600125 对大鼠肺缺血/再灌注损伤的保护作用及机制. *中国应用生理学杂志*, 2012, 28 (3): 255-258.
- [16] Li XH, Liu ZH, Ma HB, et al. Effect of sevoflurane on tissue permeability of lung ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian Pac J Trop Med*, 2014, 7(4): 276-279.
- [17] Zhu B, Yang JR, Chen SF, et al. The attenuation of lung ischemia reperfusion injury by oxymatrine. *Cell Biochem Biophys*, 2014, 70(1): 333-336.
- [18] Guler L, Tavlasoglu M, Yucel O, et al. Taurine attenuates lung ischemia-reperfusion injury after lung transplantation in rats. *J Anesth*, 2014, 28(3): 347-353.
- [19] Jong WM, Ten Cate H, Linnenbank AC, et al. Reduced acute myocardial ischemia-reperfusion injury in IL-6-deficient mice employing a closed-chest model. *Inflamm Res*, 2016, 65 (6): 489-499.

(收稿日期: 2017-09-25)