

不同剂量瘦素对大鼠机械通气肺损伤的影响

李桂茹 隋炎炎 李秋杰 马福国 孙立新 时飞

【摘要】 目的 评价不同剂量瘦素对大鼠机械通气肺损伤的影响。方法 健康清洁级 SD 雄性大鼠 48 只, 6~8 周龄, 采用随机数字表法分为四组: 气管切开保留自主呼吸的假手术组(A 组)、机械通气模型组(B 组)、瘦素 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(C 组)和瘦素 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组(D 组), 每组 12 只。采用 10% 水合氯醛 3.5 ml/kg 麻醉大鼠, 疼痛反射消失后 C 组腹腔注射瘦素 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, D 组腹腔注射瘦素 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, A、B 组腹腔注射等容量生理盐水, 注射后即刻进行气管切开, 插管机械通气。A 组气管插管后保留自主呼吸, B、C、D 组机械通气建立 VILI 模型, 参数设置: V_T 20 ml/kg, RR 80 次/分, I:E 1:1, FiO_2 21%, PEEP 0 mmHg, 通气时间 4 h。分别于基础状态、通气结束时抽取股动脉血进行血气分析。通气结束后放血处死大鼠, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下取肺组织并收集支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF), 光镜下进行中性粒细胞计数, 采用 ELISA 法测定 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 浓度; 取肺组织称重, 计算肺湿干重比 (W/D); 观察肺组织病理改变并进行病理评分; 采用 Western blot 检测肺组织研磨液中 NF- κB p65 含量。结果 与 A 组比较, B、C、D 组 W/D、肺损伤评分、BALF 中性粒细胞计数、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 浓度及肺组织 NF- κB p65 含量明显升高 ($P < 0.01$)。与 B 组比较, C、D 组 BALF 中性粒细胞计数、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 浓度及肺组织肺损伤评分、NF- κB p65 含量明显降低 ($P < 0.05$)。与 C 组比较, D 组 BALF 中性粒细胞计数、TNF- α 、IL-6、IL-1 β 浓度及肺组织肺损伤评分、NF- κB p65 含量明显降低 ($P < 0.05$)。结论 瘦素可降低大鼠机械通气肺损伤中炎症因子的表达水平, 减轻肺损伤, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 较 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 作用明显。

【关键词】 瘦素; 呼吸; 机械通气肺损伤; 炎症

Effect of different doses of leptin on the ventilator-induced lung injury in rats LI Guiru, SUI Yan-yan, LI Qiujie, MA Fuguo, SUN Lixin, SHI Fei. Department of Anesthesiology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266071, China

Corresponding author: SHI Fei, Email: emilyxue0208@sina.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of leptin on ventilator-induced lung injury (VILI) in rats. **Methods** Forty eight pathogen-free adult male SD rats were randomized into four groups averagely: group A (spontaneous breathing), group B (VILI), group C (VILI + Leptin 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intraperitoneally), group D (VILI + leptin 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ intraperitoneally). The rats were mechanically ventilated for 4 h with the tidal volume of 20 ml/kg to establish VILI model. Mechanical ventilation parameter settings were as following: the tidal volume was 20 ml/kg, the ventilatory frequency was 80 times/min, I:E 1:1, FiO_2 was 21%, PEEP was 0 mmHg, time was 4 h. SD rats were anesthetized with intraperitoneal 10% chloral hydrate 3.5 ml/kg, after the pain disappeared, tracheostomized and mechanically ventilated. The control group retained the spontaneous breathing. Leptin was injected intraperitoneally after the rats were anesthetized in groups C and D, while the equal volume of normal saline was given instead in groups A and B. Blood samples were taken from the femoral artery at baseline state and 4 h of MV for detection of PaO_2 . At the end of mechanical ventilation animals were sacrificed by exsanguination. BALF was collected for neutrophils cell count, TNF- α , IL-6, IL-1 β . Lung specimens were obtained for determination of the wet/dry weight ratio (W/D) and examination of pathological changes which were scored. Western blot was used for determine the level of NF- κB p65 in lung tissue. **Results** Compared with group A, W/D ratio, examination of pathological changes which were scored and neutrophils cell count, TNF- α , IL-6, IL-1 β in BALF and the level of NF- κB p65 in lung tissue were significantly increased in groups B, C and D ($P < 0.01$). Compared with group B,

DOI: 10.12089/jca.2019.06.016

基金项目: 青岛市民生科技计划项目 (15-9-2-72-nsh)

作者单位: 266071 青岛市市立医院麻醉科 (李桂茹、李秋杰、马福国、孙立新、时飞); 山东第一医科大学研究生院 (隋炎炎)

通信作者: 时飞, Email: emilyxue0208@sina.com

examination of pathological changes which were scored and neutrophils cell count, TNF- α , IL-6, IL-1 β in BALF and the level of NF- κ B p65 in lung tissue were significantly decreased in groups C and D ($P < 0.05$). Compared with group C, examination of pathological changes which were scored and neutrophils cell count, TNF- α , IL-6, IL-1 β in BALF and the level of NF- κ B p65 in lung tissue were significantly decreased in group D ($P < 0.05$). **Conclusion** Leptin can inhibit the expression of inflammatory factors and reduce inflammatory responses, thus improving ventilator-induced lung injury in rats and high-dose effect is obvious.

【Key words】 Leptin; Respiration; Ventilator-Induced lung injury; Inflammation

机械通气作为一种重要的呼吸支持、治疗方法广泛应用于临床,而机械通气肺损伤(ventilator-induced lung injury, VILI)是机械通气常见的并发症。VILI 的病理生理机制为炎性细胞浸润、肺血管壁通透性增加,引起肺组织水肿、肺泡断裂,炎性细胞、炎症介质及细菌通过受损屏障释放入血,导致全身炎症反应^[1]。瘦素是由脂肪组织分泌的神经肽类物质,在炎症反应和免疫应答中起重要的调节作用^[2]。研究表明,瘦素预处理具有减轻小鼠心肌缺血-再灌注损伤的作用^[3],瘦素可降低兔急性肺栓塞后的炎性因子浓度^[4]。也有研究表明,瘦素缺乏的小鼠比普通小鼠对脂多糖诱导的肺损伤更敏感^[5]。本研究拟评价不同剂量瘦素对大鼠 VILI 的影响,探讨瘦素对 VILI 的作用及可能机制,为临床研究提供依据。

材料与方 法

实验动物与分组 清洁级雄性 SD 大鼠 48 只,6~8 周龄,体重(250±18)g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司[SCXK(鲁)2014-0007]。于恒温环境中饲养,自由饮水和进食,所有动物均按照实验动物管理和使用指南进行饲养和处理。采用随机数字表法将大鼠分为四组:假手术组(A组)、机械通气模型组(B组)、小剂量瘦素组(C组)、大剂量瘦素组(D组),每组 12 只。

VILI 模型制备 实验前禁食 12 h,自由饮水。腹腔注射 10%水合氯醛 3.5 ml/kg 麻醉大鼠,疼痛反射消失后,C 组腹腔注射瘦素 10 μ g/kg,D 组腹腔注射瘦素 50 μ g/kg,A 组和 B 组腹腔注射等容量生理盐水。注射后即刻进行气管切开,插入气管导管并固定,股动脉插管用于监测动脉压和采血,股静脉插管建立液体通道,间断腹腔注射水合氯醛维持麻醉。A 组气管插管后保留自主呼吸,B、C 和 D 组接小动物呼吸机进行机械通气。机械通气参照文献[6]介绍的方法制备 VILI 模型,参数设置: V_T 20 ml/kg,RR 80 次/分,I:E 1:1,PEEP 0 mmHg, FiO_2 21%,通气时间 4 h。通气过程中保持仰卧位,维持室温 26~28 $^{\circ}$ C。

动脉血气检测 于气管插管前即刻、通气结束后采集动脉血样,采用 AVL995 型全自动血气分析仪(瑞士)进行动脉血气分析,记录 PaO₂。

支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 浓度的检测 放血处死大鼠,立即开胸于 4 $^{\circ}$ C 下分离两侧肺组织,结扎右主支气管,5 ml 预冷的 PBS 分 3 次灌洗左肺,回收支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),回收率>80%,4 $^{\circ}$ C 下 3 000 r/min 离心 10 min,离心半径 16 cm,取上清液,-80 $^{\circ}$ C 保存。BALF 离心后回收沉淀物,用 1 ml 生理盐水重悬细胞,用于细胞分类计数。采用 ELISA 法检测 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 浓度。

肺组织病理学检测和肺损伤评估 取右肺上叶组织,经 10%中性甲醛固定、石蜡包埋、切片和 HE 染色,于光镜下观察肺组织病理学改变。观察肺间质水肿、肺泡水肿、中性粒细胞浸润和肺泡内充血 4 项指标进行肺损伤评分^[7]:0 分,无改变或非常轻微改变;1 分,轻度改变;2 分,中度改变;3 分,重度改变;4 分,极重度改变。4 项累计总分即为肺损伤评分。

肺组织湿重/干重比(W/D)的测定 取右肺中叶称取湿重(W),置于 70 $^{\circ}$ C 干燥箱中烘干至恒重,称取干重(D),计算 W/D 值。

肺组织 NF- κ B p65 蛋白含量的检测 取右肺下叶组织,-80 $^{\circ}$ C 冰冻保存。采用 Western blot 法检测 NF- κ B p65 含量。于冰盒上迅速取出肺组织研磨后加入蛋白裂解液,低温高速离心取上清,BCA 法进行蛋白定量,-80 $^{\circ}$ C 低温冰箱保存。根据蛋白定量结果,加入相应体积的总蛋白上样,SDS-PAGE 电泳。电泳结束后,将凝胶上分离到的蛋白条带通过转移电泳方式转印至固相支持物上,然后分别用非标记一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗对其进行孵育、检测。分离后的蛋白转至硝酸纤维素滤膜后加入一抗兔多克隆抗体 NF- κ B p65(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 过夜,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入羊抗兔二抗(1:3 000),孵育 30 min 后,用 TBST 洗膜 5 min \times 3 次。采用 Tanon1600,对胶片进行扫描,分析用软件为 Tanon Gis,然后括住每一个条带,系统自动生成

灰度值,即为结果。

统计分析 采用 SPSS 17.0 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,组内比较采用重复测量数据的方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

不同时点 PaO₂ 四组大鼠气管插管前即刻 PaO₂差异无统计学意义。与气管插管前即刻比较,通气结束后 B、C、D 组 PaO₂明显降低($P<0.01$)。与 A 组比较,通气结束后 B、C、D 组 PaO₂明显降低($P<0.01$)。通气结束后 B、C、D 组 PaO₂差异无统计学意义(表 1)。

表 1 四组大鼠不同时点 PaO₂的比较(mmHg, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	气管插管前即刻	通气结束后
A 组	12	90.3±5.0	90.5±5.0
B 组	12	90.7±6.2	50.2±6.1 ^{ab}
C 组	12	90.5±4.0	60.6±7.0 ^{ab}
D 组	12	90.3±5.1	60.7±8.9 ^{ab}

注:与 A 组比较,^a $P<0.01$;与气管插管前即刻比较,^b $P<0.01$

BALF 中性粒细胞计数和 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 浓度 与 A 组比较,B、C、D 组 BALF 中性粒细胞计数、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 浓度明显升高($P<0.01$)。与 B 组比较,C、D 组 BALF 中性粒细胞计数、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 浓度明显降低($P<0.01$)。与 C 组比较,D 组 BALF 中性粒细胞计数、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 浓度明显降低($P<0.05$)(表 2)。

表 2 四组大鼠 BALF 中性粒细胞计数、TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 浓度的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	只数	中性粒细胞计数($\times 10^5/L$)	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-1 β (pg/ml)
A 组	12	1.0±0.3	32.1±7.2	44.7±5.0	30.5±8.1
B 组	12	9.5±1.0 ^a	155.1±14.3 ^a	123.0±11.2 ^a	104.1±14.0 ^a
C 组	12	8.1±0.7 ^{ab}	125.3±10.2 ^{ab}	106.3±12.4 ^{ab}	90.1±10.0 ^{ab}
D 组	12	7.3±0.7 ^{abc}	109.7±11.8 ^{abc}	98.4±10.2 ^{abc}	78.3±9.2 ^{abc}

注:与 A 组比较,^a $P<0.01$;与 B 组比较,^b $P<0.01$;与 C 组比较,^c $P<0.05$

光镜下肺组织病理学改变 光镜下显示, A 组

肺组织结构未见明显异常;B 组肺泡及间质内可见明显的渗出性水肿,肺间质有大量炎症细胞浸润,肺泡腔可见多量红细胞,肺泡间隔明显增宽甚至断裂,局灶的肺泡塌陷和肺不张;C 组肺泡间隔增宽,肺泡腔少量红细胞,间质炎性细胞浸润,肺组织水肿减轻;D 组病理改变较 B、C 组减轻(图 1)。

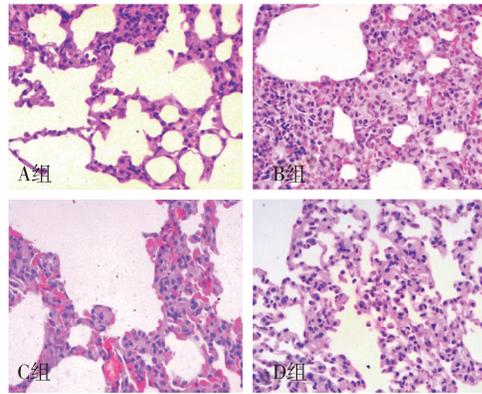


图 1 四组大鼠肺组织光镜检查($\times 200$)

肺组织肺损伤评分和 W/D 值 与 A 组比较, B、C、D 组肺损伤评分、W/D 值明显升高($P<0.01$)。与 B 组比较,C、D 组肺损伤评分明显降低($P<0.05$)。与 C 组比较,D 组肺损伤评分明显降低($P<0.05$)。B、C、D 组 W/D 值差异无统计学意义(表 3)。

表 3 四组大鼠肺组织肺损伤评分和 W/D 值的比较($\bar{x}\pm s$)

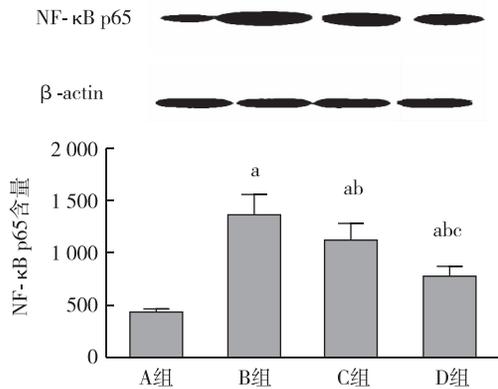
组别	只数	肺损伤评分(分)	W/D 值
A 组	12	1.9±0.5	3.6±0.7
B 组	12	14.2±1.2 ^a	7.8±1.5 ^a
C 组	12	11.9±0.9 ^{ab}	7.2±1.8 ^a
D 组	12	9.5±1.1 ^{abc}	6.9±2.1 ^a

注:与 A 组比较,^a $P<0.01$;与 B 组比较,^b $P<0.01$;与 C 组比较,^c $P<0.05$

肺组织 NF- κ B p65 含量 与 A 组比较,B、C、D 组肺组织 NF- κ B p65 含量明显升高($P<0.01$)。与 B 组比较,C、D 组肺组织 NF- κ B p65 含量明显降低($P<0.01$)。与 C 组比较,D 组肺组织 NF- κ B p65 含量明显降低($P<0.05$)(图 2)。

讨 论

本研究结果显示,与 A 组比较,B 组大鼠肺组织 W/D 值明显升高,中性粒细胞计数明显增多, BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 浓度明显升高;B 组病



注:与 A 组比较,^a $P < 0.01$;与 B 组比较,^b $P < 0.05$;与 C 组比较,^c $P < 0.05$

图 2 四组大鼠肺组织 NF-κB p65 含量的比较

理学结果肺损伤明显,炎性细胞聚集,肺泡腔可见出血、渗出,提示模型制备成功。本研究结果显示,大潮气量可介导炎性细胞因子表达,白细胞在肺组织“募集”,造成肺部急性炎性损伤。

机械通气除可造成不同程度的气压伤、容量伤和萎陷伤等机械性损伤外,其最后的共同途径是诱发细胞和炎症介质介导的炎症反应;机械信号转导机制方面的研究认为,机械力作用于细胞可激活细胞内炎症信号转导通路,活化炎性细胞,导致大量炎症介质的释放,加重炎症反应,即机械力转化为生物伤^[8]。机械力刺激可诱发细胞内炎性介质 NF-κB 的激活, NF-κB 的活化可导致下游炎性介质如 TNF-α、一氧化氮合酶 (iNOS) 等基因的表达上调,炎性因子 TNF-α、IL-1β、IL-6 等表达增多,促进中性粒细胞的聚集与活化,进一步加重机械性肺损伤的发生^[9]。本研究显示,大潮气量机械通气肺组织中 NF-κB 表达上调, TNF-α 等炎性因子水平升高。

瘦素是通过脂肪组织 mRNA 表达的蛋白质激素,它由 166 或 167 个氨基酸组成,分泌入血时去除 N 端信号肽,形成分子质量为 16 ku 的单体形式^[10]。瘦素与胰岛素、甲状腺激素、生长激素的分泌关系密切,还具有提高交感神经活性和机体免疫功能的作用,可通过激活瘦素受体发挥作用^[11]。研究发现,瘦素在肺中也有表达^[12],其受体主要分布在支气管、肺泡上皮细胞,支气管平滑肌细胞和支气管黏膜^[13],同时有研究表明,脂多糖可增加 BALF 中瘦素水平^[14]。以上研究提示,肺组织可能是瘦素信号的靶器官之一。本研究结果显示,瘦素可明显减轻大鼠机械通气后的 VILI,抑制 NF-κB 和 TNF-α、IL-6 等炎性因子表达水平,降低肺组织中性粒细胞

的聚集、浸润,减轻炎症反应。提示瘦素可能通过抑制 NF-κB 途径,抑制肺内炎性因子释放和中性粒细胞浸润,改善大鼠 VILI。

综上,本研究显示,较大剂量瘦素 (50 μg/kg) 可明显减少 VILI 的炎性因子释放,肺组织炎症水肿明显减轻,提示瘦素可降低大鼠机械通气肺损伤中炎性因子表达水平,减轻肺损伤,较大剂量作用明显,但其肺保护作用的最适剂量及发挥作用的具体机制有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Slutsky AS, Ranieri VM. Ventilator-induced lung injury. N Engl J Med, 2014, 370(10): 980.
- [2] Shufen Li. Leptin in normal physiology and leptin resistance. Science Bulletin, 2016, 61(19): 1480-1488.
- [3] 吕祥威, 徐彤彤, 武琦, 等. 瘦素预处理对小鼠心肌冷/热缺血再灌注损伤的差异性. 中国老年学杂志, 2012, 10(32): 4436-4473.
- [4] 姚艳敏, 王希柱, 宋巧凤, 等. 瘦素在兔急性肺栓塞后并发肺损伤的作用机制. 国际生物医学工程杂志, 2013, 36(2): 108-110.
- [5] Dong HY, Xu M, Ji ZY, et al. Leptin attenuates lipopolysaccharide or oleic acid induced acute lung injury in mice. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013, 49(6): 1057-1063.
- [6] 陶缘发, 李宏宾, 王广志, 等. 脂氧素受体激动剂 BML-111 减轻大鼠机械通气肺损伤. 临床麻醉学杂志, 2014, 30(3): 279-282.
- [7] Kozian A, Schilling T, Freden F, et al. One-lung ventilation induces hyperperfusion and alveolar damage in the ventilated lung: an experimental study. Br J Anaesth, 2008, 100(4): 549-559.
- [8] Umbrello M, Formenti P. Ventilator-induced lung injury. 2017. http://doi.org/10.1007/978-3-319-41852-0_13
- [9] Huang CS, Kawamura T, Peng X, et al. Hydrogen inhalation reduced epithelial apoptosis in ventilator-induced lung injury via a mechanism involving nuclear factor-kappa B activation. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 408(2): 253-258.
- [10] Farr OM, Gavrieli A, Mantzoros CS. Leptin applications in 2015: what have we learned about leptin and obesity? Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2015, 22(5): 353-359.
- [11] La Cava A. Leptin in inflammation and autoimmunity. Cytokine, 2017, 98(1): 51-58.
- [12] Zheng XJ, Yang ZX, Dong YJ, et al. Downregulation of leptin inhibits growth and induces apoptosis of lung cancer cells via the Notch and JAK/STAT3 signaling pathways. Biol Open, 2016, 5(6): 794-800.
- [13] Ali Assad N, Sood A. Leptin, adiponectin and pulmonary diseases. Biochimie, 2012, 94(10): 2180-2189.
- [14] Ubags ND, Vernooij JH, Burg E, et al. The role of leptin in the development of pulmonary neutrophilia in infection and acute lung injury. Critical Care Medicine, 2014, 42(2): e143-e151.

(收稿日期:2018-09-01)