

· 实验研究 ·

冷缺血期一氧化碳和氢气联合膨肺对肺移植后大鼠肺损伤的影响

刘思同 郭力甲 孟超 康继宇 蔡振华

【摘要】 目的 观察冷缺血期一氧化碳(CO)和氢气(H₂)联合膨肺对大鼠移植肺脏炎症反应的影响及机制。**方法** 选择成年 SPF 级雄性 SD 大鼠 80 只,40 只供体和 40 只受体,8~10 周龄,体重 250~280 g。采用随机数字表法将大鼠分为四组:O₂ 膨肺组(O₂ 组)、CO 膨肺组(CO 组)、H₂ 膨肺组(H₂ 组)和 CO 和 H₂ 联合膨肺组(CH 组),每组 10 对(每对 1 只供体和 1 只受体)。供体大鼠切取左肺后,于冷缺血期进行气体膨肺,O₂ 组采用 40% O₂ + 60% N₂ 膨肺,CO 组采用 0.05% CO + 40% O₂ + 59.95% N₂ 膨肺,H₂ 组采用 3% H₂ + 40% O₂ + 57% N₂ 膨肺,CH 组采用 0.05% CO + 3% H₂ + 40% O₂ + 56.95% N₂ 膨肺,四组体积均为 5 ml/kg,每 30 分钟使用气密针置换气体 1 次,180 min 后行肺移植。受体大鼠于移植前即刻、再灌注后 3、60、120、180 min 进行血气分析,记录 PaO₂/FiO₂、pH 和碱剩余(BE)。再灌注后 180 min 处死受体大鼠,测定移植肺组织湿/干重比(W/D),采用 ELISA 法检测移植肺组织白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-1β(IL-1β)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)浓度及髓过氧化物酶(MPO)含量。检测移植肺组织支气管肺泡灌洗液(BALF)中性粒细胞百分比,采用高效液相色谱法检测 BALF 中大聚积体(LA)、小聚积体(SA)和 LA/SA。采用 Western blot 法检测移植肺组织表面活性蛋白 A(SP-A)和核转录因子-κB(NF-κB)蛋白含量。采用 HE 染色法观察移植肺组织病理形态并进行肺组织损伤评分(LIS)。**结果** 与 O₂ 组比较,CO 组、H₂ 组和 CH 组受体大鼠再灌注后 60、120、180 min PaO₂/FiO₂、pH、BE 均明显升高($P < 0.05$),移植肺组织 W/D、IL-6、IL-1β、TNF-α 浓度、MPO 含量、中性粒细胞百分比、SA、NF-κB 蛋白含量和 LIS 均明显降低($P < 0.05$),IL-10 浓度、LA、LA/SA 和 SP-A 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)。与 CO 组比较,H₂ 组和 CH 组受体大鼠再灌注后 120、180 min PaO₂/FiO₂、pH、BE 均明显升高($P < 0.05$),CH 组移植肺组织 W/D、IL-6、IL-1β、TNF-α 浓度、MPO 含量、中性粒细胞比、SA、NF-κB 蛋白含量和 LIS 明显降低($P < 0.05$),IL-10 浓度、LA、LA/SA 和 SP-A 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)。与 H₂ 组比较,CH 组受体大鼠再灌注后 120、180 min PaO₂/FiO₂、pH、BE 均明显升高($P < 0.05$),移植肺组织 W/D、IL-6、IL-1β、TNF-α 浓度、MPO 含量、中性粒细胞百分比、SA、NF-κB 蛋白含量和 LIS 均明显降低($P < 0.05$),IL-10 浓度、LA、LA/SA 和 SP-A 蛋白含量明显升高($P < 0.05$)。**结论** 冷缺血期 CO 和 H₂ 联合膨肺抑制移植肺脏炎症反应,降低 NF-κB 蛋白含量、升高 SP-A 蛋白含量、维持肺泡表面活性物质稳定。

【关键词】 一氧化碳;氢气;联合膨肺;冷缺血期;肺移植;肺损伤;大鼠

Effects of lung inflation with carbon monoxide and hydrogen during the cold ischemia phase on rats lung injury after lung transplantation LIU Sitong, GUO Lijia, MENG Chao, KANG Jiyu, CAI Zhenhua. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

Corresponding author: GUO Lijia, Email: guolijia314@163.com

【Abstract】 Objective To observe the effect and mechanism of lung inflation with both carbon monoxide (CO) and hydrogen (H₂) during the cold ischemia phase (CIP) on the inflammatory response in a model of rat lung transplantation. **Methods** Eighty SPF SD rats, aged 8–10 weeks, weighing 250–280 g, including donors and recipients, were randomly divided into four groups: O₂ inflation group (group O₂), CO inflation group (group CO), H₂ inflation group (group H₂), and CO combined H₂ inflation group (group CH), 10 pairs of rats in each group (one donor and one recipient in each pair). After the donor lungs harvested, they were inflated during the CIP with 40% O₂ + 60% N₂, 0.05% CO + 40% O₂ + 59.95%

DOI:10.12089/jca.2024.04.012

作者单位:150001 哈尔滨医科大学附属第一医院麻醉科(刘思同、郭力甲);哈尔滨医科大学附属第二医院疼痛科(孟超、蔡振华);哈尔滨医科大学附属第四医院疼痛科(康继宇)

通信作者:郭力甲,Email: guolijia314@163.com

N_2 , 3% H_2 + 40% O_2 + 57% N_2 , or 0.05% CO + 3% H_2 + 40% O_2 + 56.95% N_2 , respectively (5 ml/kg). The mixed gas was replaced every 30 minutes, and lung transplantation was performed 180 minutes later. The blood gas analysis such as PaO_2/FiO_2 , pH, and base excess (BE) was performed before transplantation and 3, 60, 120, and 180 minutes after reperfusion in the recipient. The lung wet/dry ratio (W/D), the myeloperoxidase (MPO), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10), interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) in lung tissues detected by ELISA, the percentage of neutrophil in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), the large surfactant aggregate (LA), small surfactant aggregate (SA), and LA/SA were detected by high-performance liquid chromatography, the pulmonary surfactant associated protein (SP)-A and nuclear factor- κ B (NF- κ B) protein expression were detected by western blot, and the lung injury score (LIS) were measured by HE 180 minutes after reperfusion. **Results** Compared with group O_2 , the PaO_2/FiO_2 , pH, and BE 60, 120, and 180 minutes after reperfusion in recipients were significantly increased ($P < 0.05$), transplanted lung tissue W/D, the concentration of IL-6, IL-1 β , TNF- α , and MPO, neutrophil percentage, SA, NF- κ B protein content, and LIS were significantly decreased ($P < 0.05$), while the concentration of IL-10, LA, LA/SA, and SP-A protein content were significantly increased in groups CO , H_2 , and CH ($P < 0.05$). Compared with group CO , the PaO_2/FiO_2 , pH, and BE 120, and 180 minutes after reperfusion in recipients were significantly increased in groups H_2 and CH ($P < 0.05$), transplanted lung tissue W/D, the concentration of IL-6, IL-1 β , TNF- α , and MPO, neutrophil percentage, SA, NF- κ B protein content, and LIS were significantly decreased in group CH ($P < 0.05$), while the concentration of IL-10, LA, LA/SA, and SP-A protein content were significantly increased in group CH ($P < 0.05$). Compared with group H_2 , the PaO_2/FiO_2 , pH, and BE 120, and 180 minutes after reperfusion in recipients were significantly increased ($P < 0.05$), transplanted lung tissue W/D, the concentration of IL-6, IL-1 β , TNF- α , and MPO, neutrophil percentage, SA, NF- κ B protein content, and LIS were significantly decreased ($P < 0.05$), while the concentration of IL-10, LA, LA/SA, and SP-A protein content were significantly increased in group CH ($P < 0.05$). **Conclusion** The combination of CO and H_2 inflation during CIP inhibits the lung graft inflammatory response, and also decreases the NF- κ B protein content, increases the SP-A protein content, and maintains the pulmonary surfactant stability.

【Key words】 Carbon monoxide; Hydrogen; Combination inflation; Cold ischemia; Lung transplantation; Lung injury; Rats

肺移植是肺疾病终末期患者的最佳选择,而供体质量是制约肺移植发展的重要因素之一,因此改善供体质量一直是研究者的工作重心^[1]。一氧化碳(carbon monoxide, CO)属于第二信使信号分子,本课题组前期研究^[2-4]表明,冷缺血期 CO 、氢气(hydrogen, H_2)膨肺能够明显减轻移植肺组织的炎症反应。在大鼠肺移植模型中联合应用 CO 和 H_2 膨肺抗炎能力强于单独应用 CO 或 H_2 膨肺^[5],移植后肺功能明显改善。前期研究仅对保护性效果进行了初步研究,其机制以及肺泡表面活性物质在其中的变化情况仍未明确。因此,本实验研究探讨冷缺血期 CO 和 H_2 联合膨肺对大鼠移植肺脏炎症反应及肺泡表面活性物质的影响。

材料与方法

实验动物 选择成年 SPF 级雄性近交系 SD 大鼠 80 只,8~10 周龄,体重 250~280 g,经动物伦理委员会批准(HRBMU20201321),实验动物许可证号:SCXK(吉)2020-0002。本研究中所有动物均饲养于恒温恒湿、12 h/12 h 光照/黑暗交替、无特殊病原菌环境中,自由饮水,标准饲料喂养。

实验分组与处理 选择 40 对大鼠作为供体和受体,采用随机数字表将大鼠分为四组: O_2 膨肺组(O_2 组)、 CO 膨肺组(CO 组)、 H_2 膨肺组(H_2 组)和 CO 和 H_2 联合膨肺组(CH 组),每组 10 对(每对 1 只供体和 1 只受体)。供鼠经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠诱导麻醉后行气管切开,连接小动物呼吸机,设置 V_T 8 ml/kg,RR 60 次/分。自左股静脉给予肝素钠 200 U/kg,5 min 后沿正中中线开胸,剪破左、右心耳及右心室,自肺动脉灌注 4 °C LPD 液 20 ml,灌注压为 20 cmH₂O,随后取下左肺,放入 4 °C LPD 液中保存 180 min。期间 O_2 组采用 40% O_2 + 60% N_2 膨肺, CO 组采用 0.05% CO + 40% O_2 + 59.95% N_2 膨肺, H_2 组采用 3% H_2 + 40% O_2 + 57% N_2 膨肺,CH 组采用 0.05% CO + 3% H_2 + 40% O_2 + 56.95% N_2 膨肺,四组体积均为 5 ml/kg,每 30 分钟使用气密针置换气体 1 次。

肺移植 选择四组中对应的受体大鼠完成左肺移植操作,每组 10 只。受体大鼠麻醉、气管插管、股动脉置管后,持续进行生命体征监测。大鼠取右侧卧位,开胸后充分暴露左肺门,切除左肺,显微镜下通过“cuff”技术^[6]依次吻合左肺动脉、左主支气

管、左肺静脉。设置 V_T 8 ml/kg, $P_{ET}CO_2$ 3 cmH₂O, RR 依据血中 $PaCO_2$ 调节,维持 $PaCO_2$ 35~45 mmHg,并通过腹腔注射戊巴比妥钠 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 和哌库溴铵 $0.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 维持麻醉深度。再灌注 180 min 后进行相关检测。移植成功是指移植后血管无出血、肺脏灌注良好、气管无漏气、膨肺顺利等^[5]。本实验研究中移植成功率为 100%。

血气分析 受体大鼠于移植前即刻、再灌注后 3、60、120、180 min 采集股动脉血液样本,行血气分析,记录 PaO_2/FiO_2 、pH 和 BE。

移植肺组织湿/干重比 再灌注 180 min 后,处死受体大鼠,取左肺上叶用电子天平称重,记录为湿重(W)。随后于 80 °C 干燥箱中干燥 72 h,称重记录为干重(D),计算湿/干重比(W/D)。

ELISA 法 再灌注 180 min 后,每组取 5 只受体大鼠,处死后取左肺下叶制成组织匀浆,采用 ELISA 试剂盒通过标准品绘制标准曲线,计算肺组织白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-10(interleukin-10, IL-10)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)含量。

高效液相色谱法 再灌注 180 min 后,每组取 5 只受体大鼠,处死后取下左肺,经气管插管缓慢注入 4 °C 生理盐水 5 ml,反复抽吸 2 次,共进行 4 轮。其中移植肺组织肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)10 ml 进行 3 000 r/min 离心 15 min,将沉淀进行涂片,显微镜下记录总细胞数及中性粒细胞数,并计算中性粒细胞百分比。另取 BALF 10 ml 进行 10 000 r/min 离心 15 min,沉淀物含大聚积体(large surfactant aggregate, LA)、上清液含小聚积体(small surfactant aggregate, SA)^[7],通过高效液相色谱法检测磷脂(LA、SA)含量^[8],记录 LA、SA 和 LA/SA。

Western blot 法 再灌注 180 min 后,每组选择 5 只受体大鼠,处死后取左肺下叶称重,加入液氮研磨至粉末状,再加入 RIPA 裂解液(强)提取总蛋白。根据标准蛋白曲线计算样品蛋白浓度,每个样本上样量为 80 μg ,经过 SDS-PAGE 凝胶电泳、转 PVDF 膜,5%脱脂奶粉封闭后,加入表面活性蛋白 A(surfactant associated protein A, SP-A)一抗(1:2 000)、核转录因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB)一抗(1:2 000)、 β -肌动蛋白(β -actin)一抗,并在 4 °C 下孵育 10 h, TBST 冲洗 3 次,每次 10 min,再给予二抗(1:

5 000)室温下孵育 1 h,最后给予二氨基联苯胺,在成像仪下显影照相。采用 ImageJ 软件计算 SP-A 和 NF- κB 蛋白的相对含量。

HE 染色 再灌注 180 min 后,每组选择 5 只受体大鼠,处死后取左肺中叶并用 10%福尔马林溶液固定,石蜡包埋后切片,经 HE 染色,记录肺组织损伤评分(lung injury score, LIS)。LIS 包括中性粒细胞浸润、间质水肿、气道上皮细胞破坏、透明膜形成和出血五个指标,每个指标无病变为 0 分,轻度病变为 1 分,中度病变为 2 分,严重病变为 3 分, LIS 为以上各项指标评分之和^[3,10]。

统计分析 采用 SPSS 20.0 统计学软件进行分析。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或重复测量方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

血气分析 与 O_2 组比较,再灌注后 60、120、180 min CO 组、 H_2 组和 CH 组 PaO_2/FiO_2 、pH、BE 均明显升高($P < 0.05$)。与 CO 组比较,再灌注后 120、180 min CH 组 PaO_2/FiO_2 、pH、BE 均明显升高($P < 0.05$)。与 H_2 组比较,再灌注后 120、180 min CH 组 PaO_2/FiO_2 、pH、BE 均明显升高($P < 0.05$)。再灌注后 120、180 min 时 CO 组和 H_2 组 PaO_2/FiO_2 、pH、BE 差异无统计学意义(表 1)。

移植肺组织 W/D 与 O_2 组比较, CO 组、 H_2 组和 CH 组移植肺组织 W/D 均明显降低($P < 0.05$)。与 CO 组比较, CH 组移植肺组织 W/D 明显降低($P < 0.05$)。与 H_2 组比较, CH 组移植肺组织 W/D 明显降低($P < 0.05$)。 CO 组和 H_2 组移植肺组织 W/D 差异无统计学意义(图 1)。

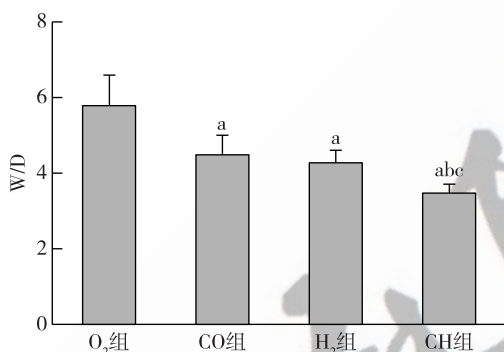
移植肺组织 IL-6、IL-10、IL-1 β 、TNF- α 浓度和 MPO 含量 与 O_2 组比较, CO 组、 H_2 组和 CH 组移植肺组织 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 浓度和 MPO 含量均明显降低($P < 0.05$), IL-10 浓度明显升高($P < 0.05$)。与 CO 组比较, CH 组移植肺组织 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 浓度和 MPO 含量均明显降低($P < 0.05$), IL-10 浓度明显升高($P < 0.05$)。与 H_2 组比较, CH 组移植肺组织 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 浓度和 MPO 含量均明显降低($P < 0.05$), IL-10 浓度明显升高($P < 0.05$)。 CO 组和 H_2 组移植肺组织 IL-6、IL-10、IL-1 β 、TNF- α 浓度和 MPO 含量差异均无统计学意义(表 2)。

移植肺表面活性物质 与 O_2 组比较, CO 组、

表 1 四组受体大鼠不同时点血气分析结果的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	肺移植前即刻	再灌注后 3 min	再灌注后 60 min	再灌注后 120 min	再灌注后 180 min
PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	O ₂ 组	10	437.2±23.1	418.5±39.2	320.0±22.3	305.4±22.2	295.1±13.2
	CO 组	10	431.8±34.0	426.3±14.7	351.9±33.3 ^a	343.2±19.1 ^a	336.7±17.2 ^a
	H ₂ 组	10	440.5±34.1	433.6±27.2	354.8±28.2 ^a	344.1±20.9 ^a	339.4±18.6 ^a
	CH 组	10	439.4±28.8	441.6±12.0	377.9±14.2 ^a	368.4±16.7 ^{abc}	364.3±28.7 ^{abc}
pH	O ₂ 组	10	7.40±0.01	7.39±0.01	7.31±0.03	7.26±0.04	7.22±0.03
	CO 组	10	7.38±0.03	7.39±0.02	7.36±0.02 ^a	7.31±0.02 ^a	7.32±0.04 ^a
	H ₂ 组	10	7.39±0.02	7.39±0.02	7.35±0.02 ^a	7.32±0.03 ^a	7.32±0.03 ^a
	CH 组	10	7.40±0.01	7.39±0.02	7.37±0.03 ^a	7.36±0.04 ^{abc}	7.37±0.04 ^{abc}
BE(mmol/L)	O ₂ 组	10	0.07±0.03	0.06±0.03	-2.69±0.10	-3.03±0.14	-3.20±0.37
	CO 组	10	0.07±0.03	0.04±0.04	-2.24±0.23 ^a	-2.56±0.18 ^a	-2.56±0.27 ^a
	H ₂ 组	10	0.08±0.02	0.08±0.04	-2.17±0.23 ^a	-2.41±0.27 ^a	-2.65±0.17 ^a
	CH 组	10	0.09±0.04	0.07±0.04	-0.71±0.18 ^{abc}	-1.25±0.24 ^{abc}	-1.29±0.29 ^{abc}

注:与 O₂ 组比较,^a $P<0.05$;与 CO 组比较,^b $P<0.05$;与 H₂ 组比较,^c $P<0.05$ 。



注:与 O₂ 组比较,^a $P<0.05$;与 CO 组比较,^b $P<0.05$;与 H₂ 组比较,^c $P<0.05$ 。

图 1 四组受体大鼠移植肺组织 W/D 的比较

H₂ 组和 CH 组移植肺中性粒细胞百分比、SA 明显降低 ($P<0.05$), LA、LA/SA 明显升高 ($P<0.05$)。与 CO 组比较,CH 组移植肺中性粒细胞百分比、SA 明显降低 ($P<0.05$), LA、LA/SA 明显升高 ($P<$

0.05)。与 H₂ 组比较,CH 组移植肺中性粒细胞百分比、SA 明显降低 ($P<0.05$), LA、LA/SA 明显升高 ($P<0.05$)。CO 组和 H₂ 组移植肺中性粒细胞百分比、LA、SA 和 LA/SA 差异均无统计学意义 (表 3)。

移植肺组织 SP-A 和 NF- κ B 蛋白含量 与 O₂ 组比较,CO 组、H₂ 组和 CH 组移植肺组织 SP-A 蛋白含量明显升高, NF- κ B 蛋白含量明显降低 ($P<0.05$)。与 CO 组比较,CH 组移植肺组织 SP-A 蛋白含量明显升高, NF- κ B 蛋白含量明显降低 ($P<0.05$)。与 H₂ 组比较,CH 组移植肺组织 SP-A 蛋白含量明显升高, NF- κ B 蛋白含量明显降低 ($P<0.05$)。CO 组和 H₂ 组移植肺组织 SP-A 和 NF- κ B 蛋白含量差异均无统计学意义 (图 2—3)。

移植肺组织病理 O₂ 组可见移植肺组织肺泡壁破裂,肺泡融合,大量中性粒细胞浸润,严重的肺泡内出血及水肿。CO 组和 H₂ 组移植肺组织肺泡

表 2 四组受体大鼠移植肺组织炎症因子浓度和 MPO 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

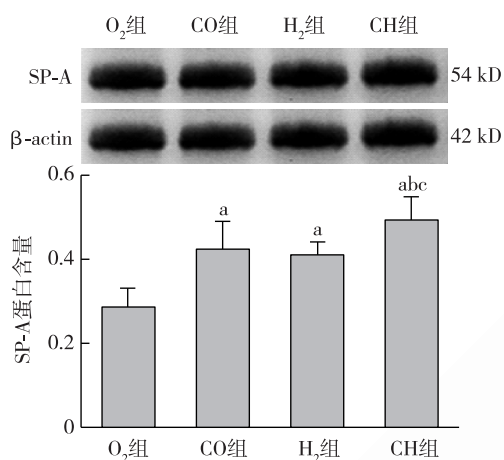
组别	只数	IL-6 (ng/ml)	IL-10 (ng/ml)	IL-1 β (ng/ml)	TNF- α (ng/ml)	MPO (U/g)
O ₂ 组	5	45.9±3.1	301.4±65.3	329.1±27.5	140.4±30.3	1.21±0.25
CO 组	5	26.0±2.8 ^a	417.6±53.8 ^a	249.3±9.2 ^a	95.0±14.1 ^a	0.81±0.25 ^a
H ₂ 组	5	27.5±2.8 ^a	396.9±50.3 ^a	244.7±19.9 ^a	88.8±33.6 ^a	0.82±0.18 ^a
CH 组	5	14.4±3.7 ^{abc}	570.4±55.7 ^{abc}	171.0±53.4 ^{abc}	49.5±17.3 ^{abc}	0.53±0.10 ^{abc}

注:与 O₂ 组比较,^a $P<0.05$;与 CO 组比较,^b $P<0.05$;与 H₂ 组比较,^c $P<0.05$ 。

表 3 四组受体大鼠移植肺表面活性物质指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)

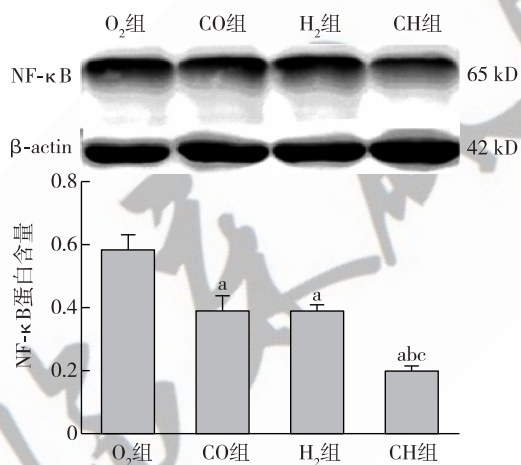
组别	只数	中性粒细胞百分比 (%)	LA (mg/kg)	SA (mg/kg)	LA/SA
O ₂ 组	5	50.2±3.3	0.28±0.06	0.67±0.03	0.31±0.03
CO 组	5	36.4±2.7 ^a	0.43±0.03 ^a	0.55±0.06 ^a	0.47±0.05 ^a
H ₂ 组	5	35.7±4.7 ^a	0.42±0.06 ^a	0.50±0.09 ^a	0.49±0.05 ^a
CH 组	5	24.5±2.7 ^{abc}	0.53±0.06 ^{abc}	0.33±0.03 ^{abc}	0.64±0.07 ^{abc}

注:与 O₂ 组比较,^a $P<0.05$;与 CO 组比较,^b $P<0.05$;与 H₂ 组比较,^c $P<0.05$ 。



注:与 O₂ 组比较,^a $P<0.05$;与 CO 组比较,^b $P<0.05$;与 H₂ 组比较,^c $P<0.05$ 。

图 2 四组受体大鼠移植肺组织 SP-A 蛋白含量的比较



注:与 O₂ 组比较,^a $P<0.05$;与 CO 组比较,^b $P<0.05$;与 H₂ 组比较,^c $P<0.05$ 。

图 3 四组受体大鼠移植肺组织 NF-κB 蛋白含量的比较

壁结构正常,少量中性粒细胞浸润,轻度肺泡内出血。CH 组上述病理改变明显减轻,轻度肺间质水肿,中性粒细胞浸润减少,可见少量透明膜形成(图 4)。

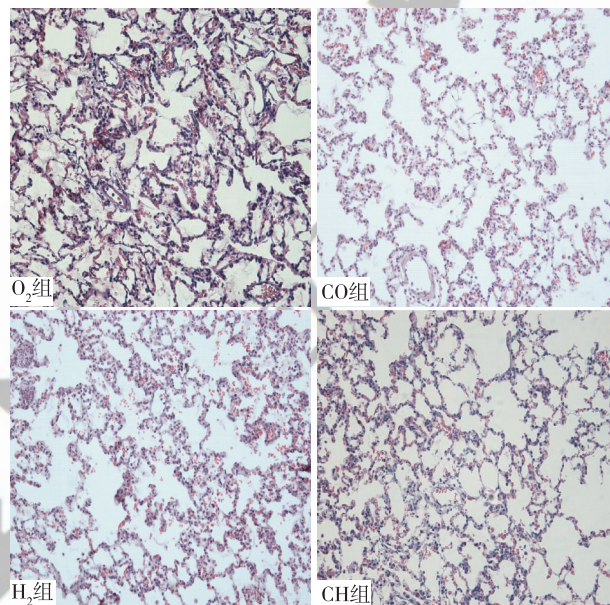
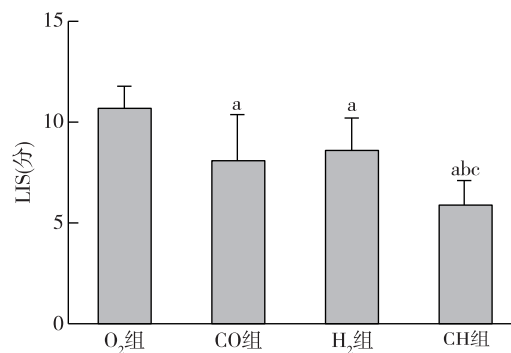


图 4 四组受体大鼠移植肺组织 HE 染色图(×10 倍)

移植肺组织 LIS 与 O₂ 组比较,CO 组、H₂ 组和 CH 组移植肺组织 LIS 明显降低($P<0.05$)。与 CO 组比较,CH 组移植肺组织 LIS 明显降低($P<0.05$)。与 H₂ 组比较,CH 组移植肺组织 LIS 明显降低($P<0.05$)。CO 组和 H₂ 组移植肺组织 LIS 差异均无统计学意义(图 5)。



注:与 O₂ 组比较,^a $P<0.05$;与 CO 组比较,^b $P<0.05$;与 H₂ 组比较,^c $P<0.05$ 。

图 5 四组受体大鼠移植肺组织 LIS 的比较

讨 论

CO 和 H₂ 是重要的信号分子,能够缓解不同器官的缺血-再灌注损伤,而二者均能够自由地透过肺泡膜,为气体膨肺的施行提供了理论依据^[10-11]。通过 30 min 置换气体,能够维持 CO 浓度在 250~500 ppm,维持 H₂ 浓度在 1.5%~3.0%^[5],而该浓度范围为有效的保护性浓度^[12-13]。因此,本实验研究选择 0.05%浓度的 CO 和 3%浓度的 H₂ 进行膨肺,能够维持在有效的保护性范围。

炎症反应在缺血-再灌注损伤中起重要作用,并伴随其全过程,减轻肺移植过程中的炎症反应是提高移植后生存率、减轻缺血-再灌注损伤的重要措施^[14]。IL-6 由巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等多种细胞产生,也是参与急性期炎症反应的 Th2 类细胞因子,具有趋化、活化中性粒细胞、加重局部炎症反应的作用^[15]。IL-1 β 是炎性细胞的强烈趋化因子,广泛参与了组织破坏、水肿形成,能诱导和促进炎症介质的损伤作用,并激活中性粒细胞^[15]。TNF- α 主要是由活化的单核巨噬细胞分泌,是重要的炎症因子,能够促进 T 淋巴细胞产生各种炎症因子,进而促进炎症反应的发生,还可以诱导 IL-6 的产生^[15]。IL-10 是一种抗炎因子,发挥下调炎症反应、拮抗炎性介质的作用,其还参与调解移植排异反应,表达水平与移植物存活时间呈正相关^[16]。MPO 是中性粒细胞的功能标志和激活标志,参与调节炎症反应的许多过程,造成炎症部位组织细胞损伤。本实验研究结果显示,冷缺血期 CO 或者 H₂ 膨肺可以降低移植肺组织 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 浓度、MPO 含量及 BALF 中性粒细胞百分比,升高 IL-10 浓度,减轻了炎症反应,CO 和 H₂ 联合膨肺时上述指标改变更加明显。Yamamoto 等^[17]研究表明,在大鼠肺移植模型中,吸入 CO 能够升高移植肺脏 IL-10 浓度,减轻炎症反应。Du 等^[18]在大鼠热休克肺损伤模型中发现,氢气水能够降低肺组织中 IL-6、TNF- α 浓度、MPO 含量,升高 IL-10 浓度,进而减轻肺脏炎症反应。可见,CO、H₂ 对于肺脏损伤引起的炎症反应具有明确的抑制作用,与前期多项研究^[19-21]结果一致。CO 和 H₂ 联合应用不能够理解为简单的重叠作用,肺脏在冷缺血期间膨肺时,气体的体积是固定的(5 ml/kg),CO 作为一种毒性气体,浓度的增加可能会引起毒性反应;而对于 H₂ 而言,尽管 66%浓度的 H₂ 也具有一定的保护性作用,但是高、低浓度

H₂ 效应的比较目前未见报道。在明确 CO、H₂ 的保护性浓度范围的基础上,结合本课题组前期 CO 和 H₂ 联合膨肺的初步研究结果,本研究提出将 CO 和 H₂ 联合应用。

本实验研究结果显示,CO 或 H₂ 膨肺能够升高移植肺 BALF 中 LA、LA/SA 和移植肺组织 SP-A 蛋白含量,降低移植肺 BALF 中 SA 和移植肺组织 NF- κ B 蛋白含量,CO 和 H₂ 联合膨肺时上述作用更为明显。肺表面活性物质在 II 型肺泡上皮细胞的内质网中合成,在维持肺泡表面张力、维持肺脏顺应性上起到了重要作用。其重要组成部分表面活性蛋白按密度可分为有活性的 LA 和非活性的 SA。LA 是 SA 的代谢前体,肺表面活性物质的组成和代谢被认为是肺缺血-再灌注损伤的重要因素^[22-23]。LA 主要包含 SP-A,其不仅通过抑制肺细胞凋亡来维持上皮细胞的完整性,而且还能通过抑制炎症因子,如 IL-8、TNF- α 和 IL-1 β ,进而控制炎症反应^[24]。NF- κ B 首先在 B 淋巴细胞中发现,调节 T、B 淋巴细胞的增殖和分化,诱导多种细胞因子表达,促进炎症反应。CO 能够抑制大鼠移植肺脏、脓毒症小鼠肺脏的 NF- κ B 通路^[19,25],从而减轻炎症损伤。H₂ 能够降低肺脏缺血-再灌注损伤大鼠、胰腺炎引起肺损伤大鼠的 NF- κ B 蛋白表达水平^[26-27],与本实验研究结果相似。本实验研究结果还显示,CO 和 H₂ 联合应用明显改善了肺组织的结构和功能,无论是肺泡壁结构、肺间质水肿等情况均显著好转,LIS 明显降低。

本实验研究存在一定局限性:(1)观察时间有限,仅对气体的短时影响进行了检测,而长期影响需在将来的研究中进一步观察;(2)未使用抑制剂或激活剂,对相关通路的影响需进一步研究;(3)体外细胞研究和其他潜在靶点也是后续研究的重点。

综上所述,冷缺血期 CO 和 H₂ 联合膨肺可以降低 MPO 含量、SA 和 NF- κ B 蛋白含量,升高肺脏的氧合功能、LA 和 SP-A 蛋白含量,减轻炎症反应,改善移植肺组织结构,降低 LIS,维持肺泡表面活性物质稳定。

参 考 文 献

- [1] Minqiang L, Xiaoshan L, Bo X, et al. A retrospective analysis for risk factors and early prognosis of delayed withdrawal extracorporeal membrane oxygenation after lung transplantation. *Transplantation*, 2021, 105(4): 867-875.
- [2] Meng C, Ma L, Liu J, et al. Inflation with carbon monoxide in rat donor lung during cold ischemia phase ameliorates graft injury.

- Exp Biol Med (Maywood), 2016, 241(3): 246-254.
- [3] Zheng P, Kang J, Xing E, et al. Lung inflation with hydrogen during the cold ischemia phase alleviates lung ischemia-reperfusion injury by inhibiting pyroptosis in rats. *Front Physiol*, 2021, 12: 699344.
 - [4] Liu R, Fang X, Meng C, et al. Lung inflation with hydrogen during the cold ischemia phase decreases lung graft injury in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2015, 240(9): 1214-1222.
 - [5] Meng C, Ma L, Niu L, et al. Protection of donor lung inflation in the setting of cold ischemia against ischemia-reperfusion injury with carbon monoxide, hydrogen, or both in rats. *Life Sci*, 2016, 151: 199-206.
 - [6] 郑盼盼, 全莉妮, 邢恩桐, 等. 冷缺血期氢气膨胀对大鼠移植肺 NLRP3 炎症小体活性的影响. *中华麻醉学杂志*, 2020, 40(12): 1499-1502.
 - [7] Zhang B, Tian X, Li G, et al. Methane inhalation protects against lung ischemia-reperfusion injury in rats by regulating pulmonary surfactant via the Nrf2 pathway. *Front Physiol*, 2021, 12: 615974.
 - [8] 李永晓, 徐波, 安志芳, 等. 高原鼯鼠、高原鼠兔和大鼠肺表面活性物质组成和含量的比较. *生理学报*, 2021, 73(1): 51-61.
 - [9] Wang X, Zhang B, Li G, et al. Dexmedetomidine alleviates lung oxidative stress injury induced by ischemia-reperfusion in diabetic rats via the Nrf2-sulfinadione pathway. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 5584733.
 - [10] Fu Z, Zhang J, Zhang Y. Role of molecular hydrogen in ageing and ageing-related diseases. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2249749.
 - [11] Greening C, Grinter R. Microbial oxidation of atmospheric trace gases. *Nat Rev Microbiol*, 2022, 20(9): 513-528.
 - [12] Zhou HC, Ding WG, Cui XG, et al. Carbon monoxide inhalation ameliorates conditions of lung grafts from rat brain death donors. *Chin Med J (Engl)*, 2008, 121(15): 1411-1419.
 - [13] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat Med*, 2007, 13(6): 688-694.
 - [14] Roesel MJ, Sharma NS, Schroeter A, et al. Primary graft dysfunction: the role of aging in lung ischemia-reperfusion injury. *Front Immunol*, 2022, 13: 891564.
 - [15] Hasenauer A, Bédar B, Parapanov R, et al. Effects of cold or warm ischemia and ex-vivo lung perfusion on the release of damage associated molecular patterns and inflammatory cytokines in experimental lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*, 2021, 40(9): 905-916.
 - [16] Wang X, Parapanov R, Debonneville A, et al. Treatment with 3-aminobenzamide during ex vivo lung perfusion of damaged rat lungs reduces graft injury and dysfunction after transplantation. *Am J Transplant*, 2020, 20(4): 967-976.
 - [17] Yamamoto S, Okazaki M, Yamane M, et al. Peculiar mechanisms of graft recovery through anti-inflammatory responses after rat lung transplantation from donation after cardiac death. *Transpl Immunol*, 2012, 26(2-3): 133-139.
 - [18] Du Z, Jia H, Liu J, et al. Effects of three hydrogen-rich liquids on hemorrhagic shock in rats. *J Surg Res*, 2015, 193(1): 377-382.
 - [19] Dong B, Stewart PW, Egan TM. Postmortem and ex vivo carbon monoxide ventilation reduces injury in rat lungs transplanted from non-heart-beating donors. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2013, 146(2): 429-436.
 - [20] Mitchell LA, Channell MM, Royer CM, et al. Evaluation of inhaled carbon monoxide as an anti-inflammatory therapy in a non-human primate model of lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299(6): 891-897.
 - [21] Diao M, Zhang S, Wu L, et al. Hydrogen gas inhalation attenuates seawater instillation-induced acute lung injury via the Nrf2 pathway in rabbits. *Inflammation*, 2016, 39(6): 2029-2039.
 - [22] 邵鹏飞, 吕洁萍, 安晓丽, 等. 七氟醚缺血早期和再灌注早期处理对 CPB 后肺损伤的保护作用. *山西医科大学学报*, 2017, 48(3): 292-295.
 - [23] 赵嘉涵, 贾雨涵, 汤雅婷, 等. 参麦注射液对肠缺血/再灌注肺损伤大鼠肺组织 p38MAPK 及凋亡相关基因表达的影响. *中国应用生理学杂志*, 2019, 35(1): 65-68.
 - [24] Yang Y, Li Q, Tan F, et al. Mechanism of IL-8-induced acute lung injury through pulmonary surfactant proteins A and B. *Exp Ther Med*, 2020, 19(1): 287-293.
 - [25] Qin W, Zhang J, Lv W, et al. Effect of carbon monoxide-releasing molecules II-liberated CO on suppressing inflammatory response in sepsis by interfering with nuclear factor kappa B activation. *PLoS One*, 2013, 8(10): e75840.
 - [26] Zhang J, Zhou H, Liu J, et al. Protective effects of hydrogen inhalation during the warm ischemia phase against lung ischemia-reperfusion injury in rat donors after cardiac death. *Microvasc Res*, 2019, 125: 103885.
 - [27] 滕娜, 孙明洁, 李会. 吸入氢气对重症急性胰腺炎大鼠肺损伤的影响. *中国医药导报*, 2020, 17(15): 26-28

(收稿日期: 2023-02-23)