

基础研究

DOI: 10.11699/cyxb20130722

改良 LPD 液、硝普钠对犬肺缺血/再灌注损伤内皮素-1 的影响

刘公哲, 王磊, 齐海, 李元明, 高双庆, 马爱国

(新疆医科大学第二附属医院胸外科, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】目的:采用犬单肺原位常温缺血/再灌注模型,探讨及研究改良 LPD 液(low potassium dextra glucose,LPD),改良 LPD 液+硝普钠 2 种保护液对犬肺缺血/再灌注损伤时血浆及肺组织匀浆中内皮素-1(endothelin-1,ET-1)的影响有无差异。**方法:**选用健康成年杂种犬 12 只,随机分成 2 组,每组 6 只,A 组以常温 LPD 液行左肺灌洗,灌注量 50~60 ml/kg,灌注压力<40 mmHg;B 组以常温 LPD 液+硝普钠行左肺灌洗,其余同 A 组。2 组采用酶联免疫吸附法分别于再灌注后 0、2、4 h 测定血浆、肺组织匀浆中 ET-1 的含量以及实验结束时称取肺湿、干重,计算肺湿/干比重。**结果:**2 组血浆、肺组织匀浆中的 ET-1 含量无差异($P>0.05$),肺湿/干比重比较有变化($P<0.05$)。**结论:**改良的 LPD 液可能通过减少 ET-1 的表达水平,降低肺湿/干比重,减轻肺缺血/再灌注损伤,但在改良的 LPD 液基础上加上硝普钠,对 ET-1 的表达水平及肺湿/干比重无明显影响。

【关键词】改良 LPD 液;硝普钠;肺缺血/再灌注损伤;内皮素-1;肺

【中国图书分类法分类号】R655.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-06-10

Effects of modified low potassium dextran solution and sodium nitroprusside on endothelin-1 during ischemia-reperfusion injury in dogs

LIU Gongzhe, WANG Lei, QI Hai, LI Yuanming, GAO Shuangqing, MA Aiguo

(Department of Thoracic Surgery, the Second Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University)

【Abstract】Objective: To study effects of modified low potassium dextran (LPD) solution combined with sodium nitroprusside on endothelin-1 (ET-1) in plasma and lung homogenate during ischemia-reperfusion injury of dogs. **Methods:** A total of 12 healthy adult hybrid dogs were randomly divided into two groups with six dogs in each group. In group A, left lungs were flushed with 50~60 ml/kg of hepatic modified LPD solution at a pressure of less than 40 mmHg. In group B, left lungs were flushed with hepatic modified LPD solution and sodium nitroprusside with other measures the same as group A. Changes of ET-1 content in plasma and lung homogenate at 0, 2 h and 4 h after reperfusion were observed by ELISA. At the end of the experiment, the variation of lung wet/dry weight ratio was calculated. **Results:** ET-1 contents in plasma and lung homogenate were not significantly different ($P>0.05$) and wet/dry weight ratio in two groups had significant changes ($P<0.05$). **Conclusions:** Modified LPD solution can reduce ET-1 expression level and wet/dry weight ratio and relieve ischemia-reperfusion injury, however, modified LPD solution combined with sodium nitroprusside has no effect on ET-1 expression level and wet/dry weight ratio.

【Key words】modified low potassium dextran solution; sodium nitroprusside; ischemia-reperfusion injury; endothelin-1; lung

肺移植的缺血/再灌注损伤(ischemia reperfusion injur, IRI)一直是国内外研究的热点。它对肺的损伤表现在肺移植后 72 h 内肺泡组织的非特异性损伤、肺水肿、低氧血症,严重时可导致移植肺失败。LPD

(low potassium dextra glucose, LPD)液在血管内可产生 15~19 mmHg 的胶体渗透压,具有改善微循环、减少细胞聚集、保护血管内皮细胞的作用^[1]。硝普钠被称做外源性 NO 的提供者,有人在冷缺血模型中研究过硝普钠的作用;正如对于 NO 治疗作用存在争论一样,硝普钠对于移植肺的保护作用以及合理的治疗方案并没有定论。

本次实验拟采用犬单肺原位常温缺血/再灌注

作者介绍:刘公哲,Email:gongzhe2004@sina.com,

研究方向:肺保护。

通信作者:齐海,Email:cxju_qh@126.com。

基金项目:新疆维吾尔自治区高校科研计划科学研究重点资助项目
(编号:XJEDU2007123)。

模型,探索性研究改良 LPD 液、改良 LPD 液+硝普钠 2 种不同保护液对犬肺 IRI 时血浆及肺组织匀浆中内皮素-1(endothelin,ET-1)的影响,从而为肺移植的成功提供新的理论根据。

1 材料与方法

1.1 材料

采用健康成年杂交犬 12 只,体质量 18~25 kg,雌雄不限,犬龄 12~18 月(由新疆医科大学动物实验中心提供),进入实验前观察 1 周,术晨禁食、水。全部实验方案经过新疆医科大学第二附属医院实验动物伦理委员会审查并批准,所有实验动物得到人道关怀。离心机(80-2 上海医疗器械厂),Ependorf 加样枪(100 μ l、200 μ l,德国),-80 $^{\circ}$ C 冰箱(Therom Forma),微量振荡器(MM-2 中国·江苏),电热恒温培养箱(DNP-9082 中国·上海),BioRad 酶标仪(xMARK 美国),电脑(Acer 中国·台湾),电子分析天平(AEU-210 上海天平仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 分组 采用随机排列表方法进行分组,随机分成 A、B 2 组,每组 6 只,A 组以常温 LPD 液行左肺灌洗,灌注量 50~60 ml/kg,灌注压力<40 mmH₂O;B 组以常温 LPD 液+硝普钠(10 mg/1 000 ml)行左肺灌洗,其余同 A 组。进入实验前观察 1 周,术晨禁食、水。

1.2.2 改良 LPD 溶液的配制 参照文献[2],由本院药剂科配制,主要成分包括:低分子右旋糖酐 50 g/L、Na⁺ 138 mmol/L、K⁺ 6 mmol/L、Cl⁻ 142 mmol/L、Mg²⁺ 0.8 mmol/L、PO₄³⁻ 0.8 mmol/L、SO₄²⁻ 0.8 mmol/L、PEG 167 μ g/L、葡萄糖 5 g/L、氨基丁醇 0.09 g/L、甲基强的松龙 167 mg/L。

1.2.3 单肺原位常温缺血/再灌注模型的建立 采用芬太尼(10 μ g/kg)、丙泊酚(2 mg/kg)静脉麻醉,麻醉生效后行气管插管,维持颈静脉、股动脉压力等在正常范围内。同时吸入 0.5%氟烷与氧混合以维持麻醉。仰卧位,消毒,铺巾,取双侧第 4 或 5 肋间横行切口,左侧肋间肌切开约 10~15 cm,右侧肋间肌切开约 5~7 cm,横断胸骨。心包切开右侧悬吊,左侧部分悬吊;充分暴露肺动脉主干及左右主支,充分暴露左肺静脉上中下各支及左房袖部。周围静脉注入肝素 1 mg/kg 肝素化。血液各项生化指标对照值标本留置。右肺动脉绕带备阻断。主肺动脉荷包缝合,并置入测压管。连续记录犬体循环动脉压及主肺动脉压。左肺动脉阻断,左心房袖阻断,左主支

气管阻断。左肺动脉、左心房袖造口,常温 LPD 液、LPD 液+硝普钠进行灌洗,灌洗量按 50~60 ml/kg 计算。灌注结束后缝合肺动脉、左心房袖造口。左肺缺血 2 h 后,用灌注液冲洗左肺血管,然后开放左肺循环及支气管,于再灌注 2、4 h,分别采集各项标本,进行相应检测。左侧肺动脉压测定采取间歇测定法,每 30 min 测定 1 次,测定时右肺动脉阻断。

1.2.4 标本的收集 A、B 2 组分别于缺血前,缺血 2 h(再灌注即刻),再灌注 2、4 h 颈动脉取血,肝素抗凝,1 500 r/min 离心 10 min,分离血浆,-20 $^{\circ}$ C 保存,待测。实验毕,取左肺适量新鲜活组织先于液氮罐中保存,后快速称取 100 mg,置组织匀浆机中,加无水乙醇 0.1 ml 研磨,再加生理盐水 0.9 ml 充分研磨制成匀浆,-20 $^{\circ}$ C 以下保存;测定前 4 $^{\circ}$ C,1 500 r/min 离心 10 min,取上清,待测。

1.2.5 血清及肺组织匀浆中 ET-1 水平测定 用 ELISA 法检测血浆及肺组织匀浆中 ET-1 的水平,操作均按试剂盒说明进行。

1.2.6 肺湿重/干重(wet/dry, W/D) 实验结束后处死动物,立即取左肺,吸干,称重。然后置 80 $^{\circ}$ C 烤箱中干燥 24 h 后再次称重,计算肺 W/D。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。血浆及肺组织血浆中 ET-1 含量的比较采用重复测量方差分析进行,肺 W/D 变化采用两独立样本 *t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 血浆及肺组织匀浆中 ET-1 的含量变化

12 只犬单肺原位常温缺血/再灌注模型均获成功。重复测量方差分析的结论为,处理因素对血浆及肺组织匀浆中 ET-1 含量的影响无统计学意义,*F* 值分别为 0.08、3.18,*P* 值分别为 0.79、0.08;时间因素对肺组织匀浆中 ET-1 含量的影响无统计学意义,*F* 值为 0.66,*P* 值为 0.53;时间因素对血浆中 ET-1 含量的影响有统计学意义,*F* 值为 6.60,*P* 值为 0.01,且处理因素与时间因素之间不存在交互作用,*F* 值为 0.65,*P* 值为 0.53。与 LPD 组比较,LPD+硝普钠组于再灌注 0、2、4 h 时,血浆及肺组织匀浆中 ET-1 的含量无明显变化(*P*>0.05),在不同时间点各组肺组织匀浆中 ET-1 含量无明显变化(*P*>0.05),在不同时间点各组血浆中 ET-1 的含量有差异(*P*<0.05),再灌注 0 h 时含量最高。结果见表 1。

表 1 2 组不同时间血浆及肺组织匀浆 ET-1 含量的变化的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Comparison on ET-1 content in plasma and lung homogenate between two groups($\bar{x} \pm s$)

组别	样本(只)	血浆			肺组织匀浆		
		0 h	2 h	4 h	0 h	2 h	4 h
LPD组	6	55.49 $\pm$ 38.68	42.07 $\pm$ 26.55	35.79 $\pm$ 14.77	28.39 $\pm$ 5.29	28.11 $\pm$ 5.79	33.04 $\pm$ 7.84
LPD+硝普钠组	6	56.60 $\pm$ 29.85	42.64 $\pm$ 17.54	45.64 $\pm$ 21.87	36.33 $\pm$ 11.03	36.78 $\pm$ 7.85	37.42 $\pm$ 11.03

2.2 肺 W/D 值变化

B 组与 A 组比较, B 组的肺 W/D 值有变化 ($t=4.081, P<0.05$), 结果见表 2。

表 2 2 组肺组织 W/D 值变化的比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.2 Comparison on lung tissue W/D value between two groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本 (只)	W/D 值
LPD 组	6	4.95 ± 0.14
LPD+硝普钠组	6	5.48 ± 0.28
t 值		-4.081
P 值		0.002

3 讨 论

肺 IRI 主要指肺移植、体外循环手术时, 肺缺血后重新灌注引起的对肺的损伤不但没有减轻, 反而加重的现象。IRI 的具体机制至今尚未完全阐明, 目前普遍认为 IRI 是炎症反应过程, 包括黏附分子表达, 促炎性因子释放, 白细胞激活, 内皮细胞激活, 血小板黏附、聚集、活化, 细胞内钙超载及氧自由基的释放等。如何预防 IRI 是决定肺移植成功与否的关键, 它已成为目前国内外研究的热点。

研究发现^[3], 预处理能减轻肺 IRI 导致的中性粒细胞浸润、肺毛细血管通透性增高、平均动脉压和动脉血氧分压的下降程度等, 表明预处理起到减轻肺 IRI 对肺移植的影响、降低早期移植物功能障碍发生率及减轻 IRI 等作用。LPD 液是一种细胞外液型保存液, 目前国际上普遍用于临床的标准肺保护液, 低钾和右旋糖苷 40 是其关键成分。低钾可以保持内皮细胞结构和功能的完整性、减轻肺血管的收缩; 右旋糖苷通过适当提高胶体渗透压, 可减轻肺组织水肿和改善微循环^[4]; LPD 液还可通过氧化应激作用在肺缺血/再灌注模型中起到保护作用^[5]。Arnaoutakis 等^[6]研究发现 LPD 保护液在高风险肺移植患者的保护作用尤为显著。研究发现^[7]用常温灌洗对肺血管床的灌洗更均匀, 可以更好地保护肺功能。硝普钠作为外源性 NO 的提供者, 对于移植肺的保护作用以及合理的治疗方案并没有定论, 可能通过其抗炎、抗

氧化和抗凋亡等作用机制减轻移植后供肺 IRI, 改善移植肺早期的功能。

目前, 国内外通过大动物肺常温移植模型来进行肺移植的相关研究较少, 因此本实验拟采用犬单肺原位常温缺血/再灌注模型, 来探讨改良 LPD 液与硝普钠联合作用对肺 IRI 的影响。通过 ELISA 法检测 ET-1 的含量及称取肺 W/D 值的变化, 结果均表明改良 LPD 液与硝普钠联合作用对 IRI 中肺的保护无明显影响, 其作用的具体机制以及对肺移植的作用有待于进一步研究。通过预处理对 IRI 影响的深入研究, 将为肺移植的成功提供新的靶方向。

参 考 文 献

- [1] Strtiber M, Wilhelmi M, Harringer W, et al. Flush perfusion with low potassium dextan solution improves early graft function in clinical lung transplantation[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2001, 19(2): 190-194.
- [2] Fischer S, Matte-Martyn A, De Perrot M, et al. Low-potassium dextran preservation solution improves lung function after human lung transplantation[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 121(3): 594-596.
- [3] Delbin M A, Moraes C, Camargo E, et al. Influence of physical preconditioning on the responsiveness of rat pulmonary artery after pulmonary ischemia/reperfusion[J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2007, 147(3): 793-798.
- [4] 胡 滨, 侯生才, 李 辉, 等. LPD 液对无心跳供体肺的保护作用[J]. 中华胸心外科杂志, 2007, 23(3): 199-201.
- [5] Hu B, Hou S C, Li H, et al. Histopathological investigation of protective effects of low potassium dextran glucose solution on non-heart-beating donor lungs[J]. Chin J Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 23(3): 199-201.
- [6] Torres R L, Beló-Klein A, Andrade C F, et al. Effect of systemically administered low potassium dextran solution on oxidative stress in a rat model of lung ischemia[J]. Interact Cardiovasc Thorac Surg, 2009, 8(1): 3-6.
- [7] Arnaoutakis G J, Allen J G, Merlo C A, et al. Low potassium dextran is superior to University of Wisconsin solution in high-risk lung transplant recipients[J]. J Heart Lung Transplant, 2010, 29(12): 1380-1387.
- [8] Wittwer T, Wahlers T, Fehrenbaeh A, et al. Combined use of prostacyclin and higher perfusate temperatures further enhances the superior lung preservation by Celsior solution in the isolated rat lung[J]. J Heart Lung Transplant, 1999, 18(7): 684-692.

(责任编辑: 冉明会)