

# 地塞米松对肠缺血再灌注后继发肺损伤的保护作用

宋伟峰<sup>1</sup>, 朱琼芳<sup>2</sup>, 李瑞珍<sup>1</sup>, 张政<sup>3</sup>

(中山大学 1.附属第三医院药剂科, 广东 广州 510630; 2.附属第一医院麻醉科恢复室, 广东 广州 510080;

3.附属第三医院麻醉科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】探讨地塞米松对肠缺血再灌注肺损伤的保护作用。【方法】35只雄性昆明鼠随机平均分为5组, 每组7只, 分别是假手术组(S); 模型组(IL/R); 模型+地塞米松预处理组(IL/R+DP); 模型+地塞米松缺血时处理组(IL/R+DI); 模型+地塞米松再灌注即刻处理组(IL/R+DR)。每组实验结束之后留取肺标本, 以待进行肺组织病理检测、MDA含量和SOD活性检测、TNF- $\alpha$ 检测、NO含量测定、iNOS活性测定。【结果】肠缺血再灌注过程显著地造成了急性肺损伤, 体现在病理积分显著降低( $P < 0.05$ , IL/R vs. S), MDA、TNF- $\alpha$ 、NO的含量以及SOD和iNOS活性的上升( $P < 0.05$ , IL/R vs. S), 地塞米松预处理能减轻肠缺血再灌注肺损伤( $P < 0.05$ , IL/R+DP vs. IL/R), 而地塞米松缺血期和再灌注即刻处理对肺无明显保护作用。【结论】地塞米松预处理能减轻肠缺血再灌注继发性损伤, 缺血期和再灌注即刻用药则无保护作用。

**关键词:** 地塞米松; 肠缺血; 再灌注; 肺损伤

中图分类号: R459.1

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2012)05-0614-05

## Protective Effect of Dexamethasone on Lung Injury Secondary to Intestinal Ischemia-reperfusion

SONG Wei-feng<sup>1</sup>, ZHU Qiong-fang<sup>2</sup>, LI Rui-zhen<sup>1</sup>, ZHANG Zheng<sup>3</sup>

(1. Pharmacy of the Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China; 2. PACU, Department of Anesthesiology, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Anesthesiology, The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the protective effect of dexamethasone on lung injury secondary to intestinal ischemia-reperfusion. 【Method】 Thirty-five male rats weighting 20~24 g were randomized into sham group, sole IIR group (IIR), or IIR and preconditioning with dexamethasone (IL/R+DP), or IL/R+DI group (respectively treated with dexamethasone after ischemia began), or IL/R+DR group (respectively treated with dexamethasone as soon as reperfusion). At the end of experiment, lung tissue was obtained for histologic assessment and for the measurement of the levels of MDA, SOD, TNF- $\alpha$ , NO, and iNOS. 【Result】 IIR resulted in lung injury evidenced as significant decreases in lung histological scores ( $P < 0.05$ , IIR vs. S), accompanied with concomitant increases of the levels of MDA, SOD, TNF- $\alpha$ , NO and the activity of iNOS ( $P < 0.05$ , IL/R vs. S). Preconditioning with dexamethasone attenuate IIR mediates lung injury ( $P < 0.05$ , IL/R+DP vs. IL/R), while treated with dexamethasone during the ischemia and reperfusion period were unprofitable to lung. 【Conclusion】 Preconditioning with dexamethasone attenuate IIR mediates lung injury, while treated with dexamethasone during the ischemia and reperfusion period were unprofitable to lung.

**Key words:** dexamethasone; intestinal ischemia; reperfusion; lung injury

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2012, 33(5):614-618]

肠缺血再灌注(intestinal ischemia reperfusion, IL/R)除引起肠道局部损伤外, 还将引起远隔脏器损伤, 其中肺脏就是容易受损的器官之一, 继发的

急性肺损伤和呼吸窘迫综合征是 IL/R 主要死亡原因<sup>[1]</sup>。Schoots 等<sup>[2]</sup>回顾性分析了 3 692 例急性肠系膜缺血患者, 其病死率为 32.1% ~ 77.4%, 其中

收稿日期: 2012-04-28

基金项目: 广东省科技计划项目(2011A080504003)

作者简介: 宋伟峰, 主管药师, E-mail: swfsys@163.com

急性肺损伤是主要原因;虽然肠缺血再灌注急性肺损伤的机制取得了很大进展,但临床治疗效果仍无明显提高<sup>[3]</sup>。地塞米松是临床广泛使用的糖皮质激素,能稳定细胞膜,减少炎症因子及介质的产生和释放<sup>[4]</sup>。地塞米松现已应用缺血再灌注中的器官保护,如心、肺和肾等缺血再灌注损伤<sup>[5]</sup>。根据缺血再灌注不同阶段,药物处理分为缺血前预处理、缺血期处理和再灌注后处理,其中缺血前预处理是目前研究最多<sup>[6]</sup>。Vieira等<sup>[7]</sup>研究发现地塞米松预处理产生抗肠缺血损伤作用,是否同样能减轻肠缺血再灌注肺损伤尚不清楚。药物预处理适用小肠肠移植,而肠缺血再灌注损伤多为急重症,一般只能采用缺血期和再灌注后药物处理的方式,而缺血期和再灌注期应用地塞米松能否减轻肠缺血再灌注肺损伤尚不明确。本研究的主要目的通过复制昆明小鼠肠缺血-再灌注模型,探讨在不同时期地塞米松应用对肠缺血-再灌注过程中肺损伤的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂

色甘酸钠(ICN公司,美国),酮替酚(Sigma公司,美国),Compound 48/80(Sigma公司,美国),TNF- $\alpha$ 和组胺Elisa试剂盒(R&D公司,美国)。MCP-5和PAR2抗体(Santa Cruz,美国)。

### 1.2 实验分组和动物模型建立

35只清洁级雄性昆明小鼠,(广东省实验动物中心提供,合格证号:SCXK(粤)2008-0002),体质量20~24 g。按基础饲料饲养1周,所有动物均于术前16 h禁食,自由饮水。动物按随机分为5组,每组7只。假手术组(S);模型组(II/R);模型+地塞米松预处理组(II/R+DP,缺血前30 min给予地塞米松10 mg/kg);模型+地塞米松缺血时处理组(II/R+DI,地塞米松在缺血时5 min给予地塞米松10 mg/kg);模型+地塞米松再灌注即刻处理组(II/R+DR,地塞米松在再灌注即刻给予地塞米松10 mg/kg)。

所有动物腹腔注射100 mg/L水合氯醛3.5 mL/kg麻醉后,仰卧位固定,消毒铺巾,腹部正中切口进腹,分离肠系膜上动脉。假手术组只分离肠系膜上动脉,不阻断;其余各组用无损伤动脉夹夹闭肠系膜上动脉根部,阻断30 min后移开动脉夹

恢复肠道血流。模型复制成功的标准为缺血处肠系膜微动脉搏动消失;且再灌注前肠道淤黑、肿胀;动脉夹松开后缺血处肠系膜微动脉恢复搏动。腹腔内给予含有160 U的庆大霉素的9 g/L生理盐水0.1 mL,然后缝合腹膜、肌肉和皮肤。再灌注3 h后断颈,处死动物,留取肺标本待检测。

### 1.3 标本处理及指标检测

**1.3.1 肺组织病理检测** 石蜡包埋的肺组织样本横断面连续4  $\mu$ m切片,常规脱蜡至水,HE染色。采用双盲法在光镜下观察其病理学变化,每个标本随机取5个视野取平均值作为每个标本的评分值。参照Derks等的方法对肺损伤进行病理形态学评分:根据肺间质水肿、肺泡水肿、炎性细胞浸润、肺泡出血、透明膜形成、肺不张改变的等级,依其程度的“无、轻、中、重”分别计“0、1、2、3”分,以累计总分作为其病理形态学积分。

**1.3.2 肺组织丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性检测** 肺组织匀浆采用硫代巴比妥酸反应法测定MDA含量。肺组织匀浆采用黄嘌呤氧化酶法测定SOD活性。

**1.3.3 肺组织肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )检测** 采用酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒测定肺组织匀浆TNF- $\alpha$ 、IL-8和IL-10浓度。在酶标包被板上分别加入对应标准品、待测样品,37  $^{\circ}$ C温育30 min,甩干后依次加入洗涤液、酶标试剂、显色剂、终止液,以空白孔调零,在450 nm波长下测量各孔的吸光度值( $D$ 值)。根据标准品的浓度及对应的 $D$ 值计算出标准曲线的直线回归方程,再根据样品的 $D$ 值在回归方程上计算出对应的样品浓度。样品的实际浓度应该乘以总稀释倍数(5倍)。

**1.3.4 小肠一氧化氮(NO)含量测定** 按照NO试剂盒说明配制各试剂及标准品,小肠组织研磨制成组织匀浆后,离心取上清液,采用硝酸还原酶法测定NO的含量。在550 nm波长处测定 $D$ 值,并按试剂说明书公式计算得NO含量。

**1.3.5 小肠诱导一氧化氮合酶(iNOS)活性测定** 取小肠黏膜组织冰浴中匀浆,离心取上清液于iNOS测定管,空白管加等量双蒸水,按顺序后加试剂并水浴后加终止液和透明剂混匀,室温下静止后用分光光度计测定并计算得出iNOS活性。

### 1.4 统计学处理

所有数据均采用SPSS 12.0软件处理。对数据进行正态性检验、方差齐性检验。正态分布的计量

资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用方差分析进行分析。等级资料以中位数(Median)表示,组间比较采用秩和检验。 $P < 0.05$  判断其差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 肠缺血再灌注肺病理变化

光镜观察:S 组肺组织未见明显形态学异常,肺泡结构完整,肺泡壁薄,肺泡内未见明显的充血、水肿;M 组、DI 和 DR 肺组织间隔明显增厚,间质水肿,大量中性粒细胞浸润,毛细血管扩张充血、伴有肺不张并有中量出血;DP 组表现为肺组织充血、水肿减轻,组织间隔较模型组变窄,仍可见炎细胞浸润,(图 1A~E)。与 S 组相比,各组病理

积分均明显增高( $P < 0.05$ );与 M 组相比,DP 组的病理积分明显降低( $P < 0.05$ ),M、DI 和 DR 组的病理积分无明显差别( $P > 0.05$ )。

### 2.2 地塞米松处理后肺内 MDA 水平和 SOD 活性变化

缺血再灌注各组 MDA 水平增高,但缺血再灌注和处理组之间无统计差异。模型组 SOD 活性低于假手术组,地塞米松处理预处理组 SOD 活性高于模型组( $P < 0.05$ ),缺血期处理组和再灌注即刻处理组有增高趋势但无统计学差异( $P > 0.05$ ;图 2B、C)。

### 2.3 地塞米松处理后肺内 TNF- $\alpha$ 浓度的变化

缺血再灌注后各组肺内 TNF- $\alpha$  水平明显增加( $P < 0.05$ );地米缺血期和再灌注即刻处理组肺内 TNF- $\alpha$  水平高于模型组和预处理组( $P < 0.05$ ,图 2D)。

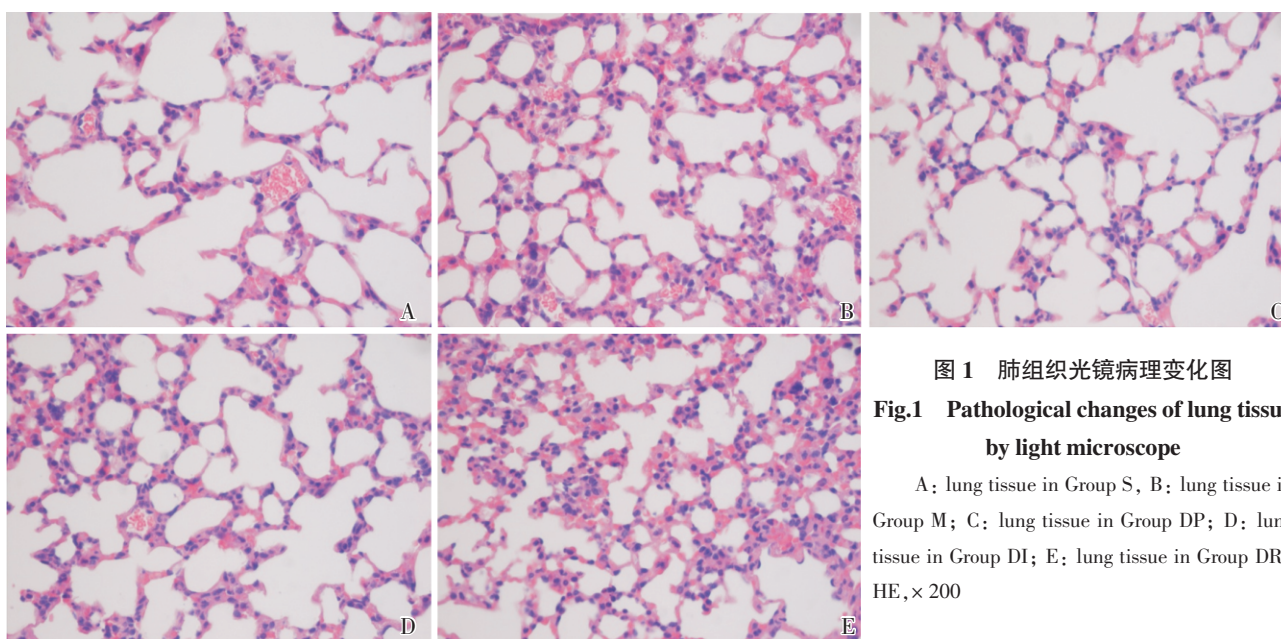


图 1 肺组织光镜病理变化图

Fig.1 Pathological changes of lung tissue by light microscope

A: lung tissue in Group S; B: lung tissue in Group M; C: lung tissue in Group DP; D: lung tissue in Group DI; E: lung tissue in Group DR; HE,  $\times 200$

### 2.4 小肠组织 NO 浓度和 iNOS 活性的变化

与 S 组相比,M、F、G 组小肠组织 NO 浓度明显增加( $P < 0.05$ );与 M 组相比,E 组小肠组织 NO 浓度明显降低( $P < 0.05$ );而 G 组的小肠组织 NO 浓度虽有升高,但无明显差异( $P > 0.05$ );与 E 组相比,G 组小肠组织 NO 浓度明显升高( $P < 0.05$ ;图 2E、F)。与 S 组相比,M、F、G 组小肠组织 iNOS 活性明显增加( $P < 0.05$ );与 M 组相比,E 组小肠组织 iNOS 活性明显降低( $P < 0.05$ );而 G 组的小肠组织 iNOS 活性虽有升高,但无明显差异( $P > 0.05$ );与 E 组相比,G 组小肠组织 iNOS 活性明显

升高( $P < 0.05$ )。

## 3 讨 论

肠缺血再灌注损伤多为急重症,药物预处理临床并不适用,一般只能采取缺血期和再灌注期应用药物进行保护<sup>[8]</sup>。地塞米松是一种常用糖皮质激素,目前已被广泛作为器官损伤的保护性药物<sup>[9]</sup>,研究已证实地塞米松预处理能减轻肠缺血再灌注损伤和继发性肺损伤<sup>[10]</sup>,但尚不清楚地塞米松肠缺血期和再灌注期处理是否更有利于减轻



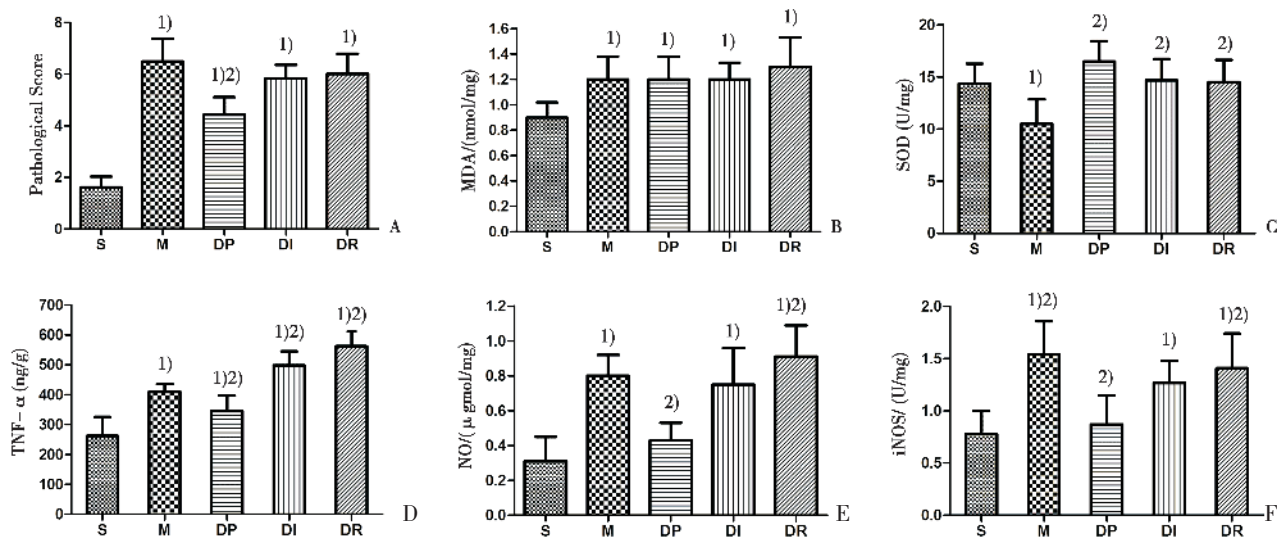


图2 地塞米松处理后肺病理评分、肺内MDA、SOD、TNF- $\alpha$ 、NO、iNOS含量变化图

Fig.2 Changes of lung pathological score and the oxidative and inflammatory mediators after dexamethasone injection

Notes: compared with Group S, 1)  $P < 0.05$ ; compared with Group M, 2)  $P < 0.05$ ; compared with Group DP, 3)  $P < 0.05$ . A: Changes of the pathological scores in different group; B: Changes of the levels of MDA in different group; C: Changes of the activities of SOD in different group; D: Changes of the levels of TNF- $\alpha$  in different group; E: Changes of the levels of NO in different group; F: Changes of the activities of iNOS in different group.

肠缺血再灌注继发性损伤。地塞米松生物半衰期约为 190 min<sup>[11]</sup>, 我们分别选择在缺血前 30 min、缺血 5 min 和再灌注即刻 3 个时点给予地塞米松干预, 药效能持续到再灌注 3 h, 药物剂量参照 Vieira 等<sup>[7]</sup>研究, 为临床中剂量。本组研究结果显示地塞米松预处理减轻肠缺血再灌注肺损伤, 而地塞米松缺血期和再灌注即刻处理无明显肺保护作用, 肺损伤有加重趋势, 这些结果提示地塞米松缺血期和再灌注即刻处理不适宜作为肠缺血再灌注继发性肺损伤时保护手段。

现已明确活性氧引起的氧化损伤是引起急性肺损伤的主要机制之一<sup>[12]</sup>; 在大鼠肠缺血再灌注肺损伤模型应用抗氧化剂和自由基清除剂可明显降低肺损伤<sup>[13]</sup>。SOD 活性反映组织的抗氧化能力, MDA 代表组织的脂质过氧化水平。本次研究中我们发现相对于模型组, 地塞米松预处理、缺血期处理和再灌注即刻处理使肺组织 SOD 活性增加而对 MDA 水平无明显影响, 提示地塞米松虽能一定程度提高肺组织的抗氧化能力但尚不足以抑制脂质过氧化反应。

急性肺损伤本质是肺局部炎症失控, 过度的炎症反应是引起急性肺损伤的主要原因, 众多的

炎症因子中 TNF- $\alpha$  发挥着核心作用<sup>[14]</sup>, TNF- $\alpha$  水平反映肺炎症反应程度。我们的研究结果显示, 相对于模型组, 地塞米松预处理可降低 TNF- $\alpha$  水平, 与 Vieira 等<sup>[7]</sup>研究相符, 而缺血期和再灌注即刻使用地塞米松反而促进了 TNF- $\alpha$  生成, 加重了 II/R 所致的肺部炎症反应。

NO 是一种具有多种生物活性的气体分子, 它不仅是细胞间及细胞内重要的信使分子, 也是重要的炎症因子<sup>[15]</sup>; 研究证实肠缺血再灌注损伤和继发性肺损伤中发挥着重要作用<sup>[16]</sup>。Zhao 等<sup>[17]</sup>发现 iNOS 基因敲除小鼠更能耐受肺缺血再灌注损伤; 应用白藜芦醇抑制 iNOS 活性, 减少 NO 产生, 能减轻内毒素诱导的急性肺损伤<sup>[18]</sup>, 这些研究都说明 iNOS 活性增高和 NO 生成在急性肺损伤中起着重要作用。我们发现地塞米松预处理能够降低肠道组织中 iNOS 的活性, 减少 NO 的产生, 而缺血期地塞米松处理 NO 水平和 iNOS 活性有增高趋势; 再灌注后即刻给予地塞米松处理, 造成了肠道 iNOS 活性和 NO 水平增加。这些结果显示肠道组织 iNOS 活性和 NO 水平的差异可能是不同时期应用地塞米松对效应差异的重要原因。

地塞米松预处理能减轻肠缺血再灌注继发性

损伤,缺血期和再灌注即刻用药无保护作用,药效的差异可能与它们对 TNF- $\alpha$  和 NO 生成产生不同影响有关。

#### 参考文献:

- [1] Huang P, Liu D, Gan X, et al. Mast cells activation contribute to small intestinal ischemia reperfusion induced acute lung injury in rats[J]. *Injury*, 2012, 43(8): 1250-1256.
- [2] Schoots IG, Koffeman GI, Legemate DA, et al. Systematic review of survival after acute mesenteric ischaemia according to disease aetiology[J]. *Br J Surg*, 2004, 91(1): 17-27.
- [3] Guzel A, Kanter M, Guzel A, et al. Protective effect of curcumin on acute lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion[J]. *Toxicol Ind Health*, 2012, 28(6): 483-491.
- [4] Gotoh M, Okubo K, Okuda M, et al. Clinical pharmacology study of the corticosteroid nasal spray dexamethasone cipeclate (NS-126): examination of the durability of efficacy in the nasal induction test [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010, 19(12): 1475-1486.
- [5] Xu B, Strom J, Chen QM. Dexamethasone induces transcriptional activation of Bcl-xL gene and inhibits cardiac injury by myocardial ischemia [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 668(1-2): 194-200.
- [6] Deveci E. Role of allopurinol, verapamil, dexamethasone and trifluoperazine as prophylactic agents in intestinal ischemia-reperfusion[J]. *Anal Quant Cytol Histol*, 2008, 30(2): 99-104.
- [7] Vieira AT, Pinho V, Lepsch LB, et al. Mechanisms of the anti-inflammatory effects of the natural secosteroids physalins in a model of intestinal ischaemia and reperfusion injury[J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 146(2): 244-251.
- [8] Mallick IH, Yang W, Winslet MC, et al. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury[J]. *Dig Dis Sci*, 2004, 49(9): 1359-1377.
- [9] Kumar S, Allen DA, Kieswich JE, et al. Dexamethasone ameliorates renal ischemia-reperfusion injury[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(11): 2412-2425.
- [10] Morariu AM, Loeff BG, Aarts LP, et al. Dexamethasone: benefit and prejudice for patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting: a study on myocardial, pulmonary, renal, intestinal, and hepatic injury[J]. *Chest*, 2005, 128(4): 2677-2687.
- [11] 陈新谦, 金有豫, 汤光. 新编药理学[M]. 17 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 616.
- [12] Ishii H, Takada K. Bleomycin induces E-selectin expression in cultured umbilical vein endothelial cells by increasing its mRNA levels through activation of NF-kappaB/Rel[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 184(2): 88-97.
- [13] Gao C, Sun X, Zhang G, et al. Hyperoxygenated solution preconditioning attenuates lung injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rabbits[J]. *J Surg Res*, 2008, 146(1): 24-31.
- [14] Shimizu M, Hasegawa N, Nishimura T, et al. Effects of TNF-alpha-converting enzyme inhibition on acute lung injury induced by endotoxin in the rat[J]. *Shock*, 2009, 32(5): 535-540.
- [15] Förstermann U. Nitric oxide and oxidative stress in vascular disease[J]. *Pflügers Arch*, 2010, 459(6): 923-939.
- [16] Katada K, Bihari A, Badhwar A, et al. Hindlimb ischemia/reperfusion-induced remote injury to the small intestine: role of inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2009, 329(3): 919-927.
- [17] Zhao H, Ma JK, Barger MW, et al. Reactive oxygen species- and nitric oxide-mediated lung inflammation and mitochondrial dysfunction in wild-type and iNOS-deficient mice exposed to diesel exhaust particles[J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2009, 72(8): 560-570.
- [18] Zaslaver M, Offer S, Kerem Z, et al. Natural compounds derived from foods modulate nitric oxide production and oxidative status in epithelial lung cells[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(26): 9934-9939.

(编辑 徐杰)