

氧控制性再灌注抗犬体外循环肺缺血再灌注早期损伤

荣 健¹, 王治平^{2*}, 吴钟凯², 陈光献², 梁孟亚², 刘 海²
(中山大学附属第一医院 1.麻醉科, 2.心脏外科, 广东 广州 510080)

摘 要:【目的】探讨氧控制性再灌注(OCR)对体外循环肺缺血再灌注(I/R)早期损伤的作用。【方法】14只健康犬随机分为对照组(I/R, $n = 7$)和实验组(OCR, $n = 7$)。对照组全程 FiO_2 80%;实验组在主动脉开放即刻调整 FiO_2 至 40%,随后每 5 min 依次上调 10%,最后达 80%,其余时段均维持 FiO_2 80%。检测动脉血气,观察两组犬在麻醉后、主动脉开放前、开放后 5、10、15、20、25 min 以及停机前动脉血氧分压的变化。在开胸后即刻(T1)、主动脉开放 25 min(T2)、主动脉开放 90 min(T3)分别留取血液标本及肺标本。酶联免疫吸附法检测血清白介素 6 和肿瘤坏死因子 α 含量;检测肺组织干湿重比;比色法检测肺组织髓过氧化物酶活性、丙二醛含量;Western Blot 检测肺组织核因子 κ B 蛋白含量;光镜观察并盲法评分比较肺组织病理学变化。【结果】实验组动脉血氧分压在主动脉开放后 5、10、15、20 min 均明显低于对照组($P < 0.05$)。两组相比,实验组血清白介素 6 和肿瘤坏死因子 α 含量在 T2 和 T3 时点较对照组降低($P < 0.05$)。实验组肺组织干湿重比、髓过氧化物酶活性、丙二醛含量和核因子 κ B 蛋白表达在 T2 和 T3 时点较对照组降低($P < 0.05$)。实验组肺损伤评分在 T2 和 T3 时点低于对照组($P < 0.05$)。【结论】氧控制性再灌注可抑制体外循环肺缺血再灌注早期炎症细胞浸润,抑制核因子 κ B 蛋白表达。提示氧控制性再灌注对体外循环肺缺血再灌注早期损伤具有一定的保护作用。

关键词: 氧控制性再灌注; 体外循环肺缺血再灌注损伤; 白细胞介素 6; 肿瘤坏死因子 α ; 肺干湿比; 髓过氧化物酶; 丙二醛; 核因子 κ B

中图分类号: R654.1 文献标识码: A 文章编号: 1672-3554(2009)06-0686-05

Protective Effect of Oxygen Controlled Reperfusion on Lung Ischemic Reperfusion with Cardiopulmonary Bypass

RONG Jian¹, WANG Zhi-ping^{2*}, WU Zhong-kai², CHEN Guang-xian², LIANG Meng-ya², LIU Hai²

(1. Department of Anesthesiology, 2. Department of Cardiac Surgery, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】To observe the protective effects of oxygen controlled reperfusion(OCR) on lung ischemic reperfusion(I/R) with cardiopulmonary bypass(CPB). 【Methods】Fourteen canines were randomized into two groups: group I/R (ischemic reperfusion, $n = 7$) and group OCR (oxygen controlled reperfusion, $n = 7$). All animals received CPB as clinical practice. In group I/R, the animals received 80 % of the FiO_2 ; In group OCR, the animals received 40%, 50%, 60%, 70%, and 80% of the FiO_2 with CPB immediately after declamping sequently, each oxygen concentration lasted for 5 minutes, other procedures were the same with group I/R. Arterial blood gas was analyzed after anesthesia, before aortic declamping, 5, 10, 15, 20, and 25 min after aortic declamping. Lung tissue and blood samples were collected at T1 (just after sternotomy), T2 (25 min after aortic declamping), and T3 (before weaning off). The level of IL-6 and TNF- α in serum, the dry/wet weight (D/W) of the lung tissues, the level of MPO activity and MDA in the lung tissue, NF- κ B expressions and pathological changes of the lung tissues were examined. The level of IL-6 and TNF- α , MPO activity and MDA, the expression of NF- κ B were measured by enzyme-linked-immunosorbent assay (ELISA), colorimetry and western blot as intrgrated optic density, respectively. Pathological changes of the lung tissue were examined and scored with light microscope. 【Results】Arterial oxygen pressure (PaO_2) was

收稿日期: 2009-06-18

基金项目: 国家杰出青年科学基金(30525020)

作者简介: 荣健, 博士, 主治医师, 研究方向: 器官保护, E-mail: sanzi3398@163.com; * 通信作者: 王治平, 教授, 博士生导师, E-mail: wangzhip12345@yahoo.com.cn

significantly lower in the OCR group at 5, 10, 15, and 20 min after aortic declamping ($P < 0.05$). IL-6 and TNF- α levels in serum in OCR group at T2 and T3 were significantly lower than those in I/R group. D/W, MPO activity, MDA levels and NF- κ B expression in the lung tissues in OCR group at T2 and T3 were significantly lower than those in I/R group ($P < 0.05$). Pathological scores in OCR group at T2 and T3 were significantly lower than those in I/R group ($P < 0.05$). 【Conclusion】Oxygen controlled reperfusion can inhibit inflammatory response and expression of NF- κ B of the lung during early reperfusion with CPB. It suggests that oxygen controlled reperfusion is protective in lung I/R during CPB.

Key words: oxygen controlled reperfusion; lung ischemic reperfusion injury with CPB; IL-6; TNF- α ; D/W; MPO; MDA; NF- κ B

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(6): 686-690]

肺缺血再灌注损伤(ischemia reperfusion injury, IRI)引起的肺功能障碍,是体外循环(cardiopulmonary bypass, CPB)心脏手术后最常见的并发症和导致死亡的主要原因之一^[1]。氧控制性再灌注(oxygen controlled reperfusion, OCR)是近年来提出的围缺血期器官保护措施之一,具有抗缺血再灌注损伤作用^[2]。但对体外循环肺缺血再灌注损伤早期的效果及其可能的机制尚未不清楚。我们应用犬模型探讨氧控制性再灌注对体外循环肺缺血再灌注(I/R)早期损伤的作用及可能的机制,寻求体外循环肺缺血再灌注损伤的保护措施。

1 材料与方法

1.1 实验动物

平均体质量 19.2 ($S = 3.09$) kg 的健康犬 14 只(广州白云区穗北实验动物养殖场提供),雌雄不限,依据体外循环中吸入氧浓度方案的不同随机分为对照组和实验组,每组 7 只。对照组全程 FiO_2 80%;实验组在主动脉开放即刻调整吸氧浓度(FiO_2)至 40%,随后每 5 min 依次上调 10%,最后达 80%,其余时段均维持 FiO_2 80%。

1.2 麻醉方法及手术过程

肌肉注射氯胺酮 40 mg/kg 和芬太尼 2 μ g/kg,静脉注射维库溴铵 0.1 mg/kg 行气管插管,呼吸机维持机械呼吸(潮气量 13 ~ 15 mL/kg,呼吸频率 12 ~ 16 次/min),股动、静脉分别插管测平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)及中心静脉压(central venous pressure, CVP)。胸骨正中劈开,切开心包,右心房内注射肝素 3 mg/kg,主动脉和上下腔静脉分别插入 16F 和 18F 插管,连接人工心肺机。升主动脉根部插入并固定 16 号针头,连接灌注装置。采用 3M 人工心肺机,Medtronic 膜肺,Sarns 变温水箱以及东莞科威医疗仪器厂的塑

料管道。两组均以犬血部分预充。

1.3 CPB 管理

两组犬 CPB 开始后,维持流量 50 ~ 80 mL $\cdot$ min⁻¹ $\cdot$ kg⁻¹,并体循环 10 min,阻断升主动脉后在主动脉根部灌注 4 $^{\circ}$ C 改良 ST.Tomas 停跳液 15 mL/kg,阻断升主动脉 60 min 后开放升主动脉,开放后辅助循环 90 min。开放主动脉后如心脏出现室颤者使用交流电除颤复跳。

1.4 标本采集及指标检测

两组在麻醉后、主动脉开放前、开放后 5、10、15、20、25 min 以及停机前抽取动脉血检测动脉血气。在开胸后即刻(T1)、主动脉开放 25 min(T2)、主动脉开放 90 min(T3)分别留取血液标本及肺标本。ELISA 法(美国 MDI 公司)测定血浆 IF-6 和 TNF- α 含量。肺组织于 4 $^{\circ}$ C 生理盐水中漂洗,剔除结缔组织,滤纸吸干表面水分,分析天平称湿质量,然后置 80 $^{\circ}$ C 温箱内,48 h 后称干质量,计算两者比值 m_D/m_W 。取肺组织 100 ~ 200 μ g,加 9 倍生理盐水制成 10% 组织匀浆,测定组织髓过氧化物酶(MPO)活力、丙二醛(MDA)含量(南京建成生物工程研究所)。提取肺组织总蛋白,Western blot 检测肺组织 NF- κ B 蛋白表达,以 β -actin 蛋白表达做为内参,成像系统进行分析和扫描,结果以光密度比值 NF- κ B/ β -actin 表示。肺组织以中性甲醛固定,HE 染色,石蜡切片,光镜下观察。

1.5 统计分析

所有计量数据运用均数 $\pm$ 标准差进行统计描述分析;计数数据运用百分位数进行统计描述分析。为检验组间差异,对计数数据(discrete variable)组间比较,采用多个独立样本非参数检验(K Independent samples test);对计量数据(measurement data),采用单因素方差分析(ANOVA)。对重复测量数据比较采用重复测量数据的方差分析(repeated measures analysis of variance)。 $P <$

0.05 认为有统计学差异。

2 结 果

2.1 动脉血氧分压变化

实验组 PaO₂ 在主动脉开放后 5、10、15、20 min 明显低于对照组 ($P < 0.05$, 图 1)。

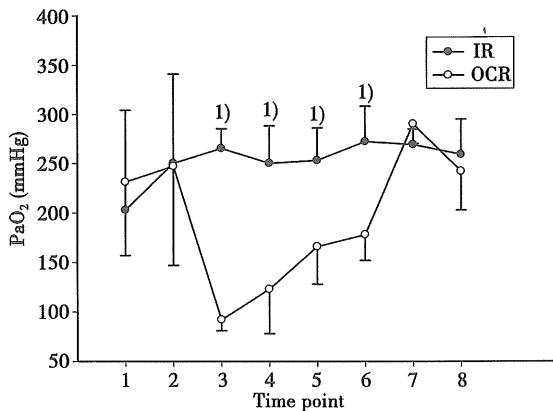


图 1 两组动脉血氧分压

Fig.1 PaO₂ of two groups

1) compared between two groups, $P < 0.05$; Time point 1: after anesthesia; Time point 2: 60 min after CPB; Time point 3: 5 min after declamping; Time point 4: 10 min after declamping; Time point 5: 15 min after declamping; Time point 6: 20 min after declamping; Time point 7: 25 min after declamping; Time point 8: 90 min after declamping

2.2 血浆 IL-6 和 TNF- α 含量

与 T1 相比, 对照组和实验组 IL-6 在 T2、T3

时点明显升高 ($P < 0.05$); 两组相比, 实验组 IL-6 在 T2、T3 时点明显低于对照组相应时点 ($P < 0.05$)。TNF- α 的变化与 IL-6 类似, 与 T1 相比, 对照组和实验组 TNF- α 在 T2、T3 时点明显升高 ($P < 0.05$); 两组相比, 对照组和实验组 TNF- α 在 T2、T3 时点明显低于对照组相应时点 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 两组血浆 IL-6 和 TNF- α
Table 1 IL-6 and TNF- α of two groups

($n = 7$, pg/mL)

Time	IL-6		TNF- α	
	IR	OCR	IR	OCR
T1	139 ± 10	133 ± 5	67 ± 5	62 ± 2
T2	1088 ± 300 ¹⁾	167 ± 28 ¹⁾²⁾	504 ± 144 ¹⁾	75 ± 6 ¹⁾²⁾
T3	1052 ± 315 ¹⁾	168 ± 24 ¹⁾²⁾	451 ± 130 ¹⁾	73 ± 6 ¹⁾²⁾

1) compared with T1 in group, $P < 0.05$; 2) compared between two groups, $P < 0.05$; T1: after anesthesia; T2: 25 min after declamping; T3: 90 min after declamping

2.3 肺组织 D/W、MPO 活性和 MDA 含量

与 T1 相比, 对照组和实验组干湿质量比在 T2、T3 时点明显升高 ($P < 0.05$); 两组相比, 实验组干湿质量比在 T2、T3 时点明显高于对照组相应时点 ($P < 0.05$)。与 T1 相比, 对照组和实验组 MPO 活性、MDA 含量在 T2、T3 时点明显升高 ($P < 0.05$); 两组相比, 实验组 MPO 活性、MDA 含量在 T2、T3 时点明显低于对照组相应时点 ($P < 0.05$, 表 2)。

表 2 两组肺干湿质量、MPO 活性和 MDA 含量

Table 2 Mass, MPO activity, and MDA of the two groups

($n = 7$)

Time point	$m_{\text{Dry}}/m_{\text{Wet}}$		MDA ($\mu\text{mol/g}$)		MPO (U/g)	
	IR	OCR	IR	OCR	IR	OCR
T1	2.4 ± 0.4	2.5 ± 0.3	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	2.7 ± 0.5	3.1 ± 1
T2	3.1 ± 0.3 ¹⁾	4.3 ± 0.4 ¹⁾²⁾	0.7 ± 0.2 ¹⁾	0.6 ± 0.2 ¹⁾²⁾	5.3 ± 0.4 ¹⁾	4.3 ± 0.9 ¹⁾²⁾
T3	3.5 ± 0.4 ¹⁾	5.3 ± 0.4 ¹⁾²⁾	1.0 ± 0.1 ¹⁾	0.4 ± 0.1 ¹⁾²⁾	7.8 ± 1 ¹⁾	5.3 ± 1.1 ¹⁾²⁾

1) compared with T1 in group, $P < 0.05$; 2) compared between two groups, $P < 0.05$; T1: after anesthesia; T2: 25 min after declamping; T3: 90 min after declamping

2.4 Western blot 检测 NF- κ B 蛋白表达

与 T1 相比, 两组 NF- κ B 在 T2、T3 明显升高; 两组相比, 实验组 NF- κ B 在再灌注期 T2、T3 的表达明显低于实验组 (0.321 ± 0.116 vs. 0.547 ± 0.067 , $P < 0.05$; 0.318 ± 0.071 vs. 0.525 ± 0.025 , $P < 0.05$)。详见图 2。

2.5 光学显微镜检查

我们按 Arold^[3]方法对肺损伤进行进行五级分类: 0 = 最小损伤; 1 = 轻度损伤; 2 = 中度损伤; 3 = 严重损伤; 4 = 极度损伤。400 倍光镜下任取 10 个视野, 计算平均每个视野所得均值代表损伤程度。两组犬肺组织在主动脉开放后均出

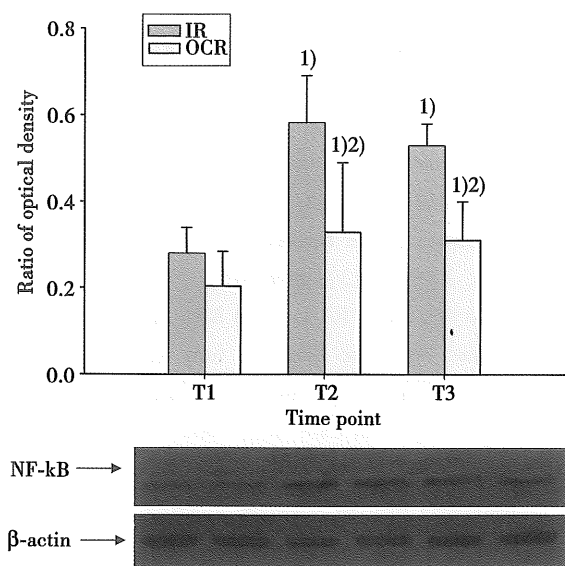


图2 两组犬肺组织 NF-κB 比较

Fig.2 NF-κB expression of the two groups

1) compared with T1 in group, $P < 0.05$; 2) compared between two groups, $P < 0.05$; T1: after anesthesia; T2: 25 min after declamping; T3: 90 min after declamping; (Western blot)

现炎性细胞渗出、肺间质水肿、肺间隔增厚等病理改变,但实验组组织病理学损伤程度相对较轻。T2 时点两组肺损伤评分: 3.8 ± 0.5 vs. 2.0 ± 0.7 , $P < 0.05$; T3 时点两组肺损伤评分: 4.2 ± 0.8 vs. 2.6 ± 0.6 , $P < 0.05$ (图3)。

3 讨论

3.1 氧控制性再灌注的肺保护作用

肺损伤是临床体外循环术后最主要的并发症之一,其发病率高达 15% ~ 30%^[4]。虽然体外循环本身可导致肺损伤^[5],但肺缺血再灌注是体外循环肺损伤主要原因之一^[1]。再灌注后氧供突然增加,在线粒体细胞色素 P450 系统作用下产生大量毒性氧代谢产物;并且缺氧通过 p38 MAPK 途径激活的黄嘌呤氧化酶在再灌注大量氧供下产生大量 ROS。这些活性氧代谢产物导致器官损伤。因此再灌注期逐渐恢复氧供可减少 ROS 的产生,具有器官保护作用。有研究报道,氧控制性再

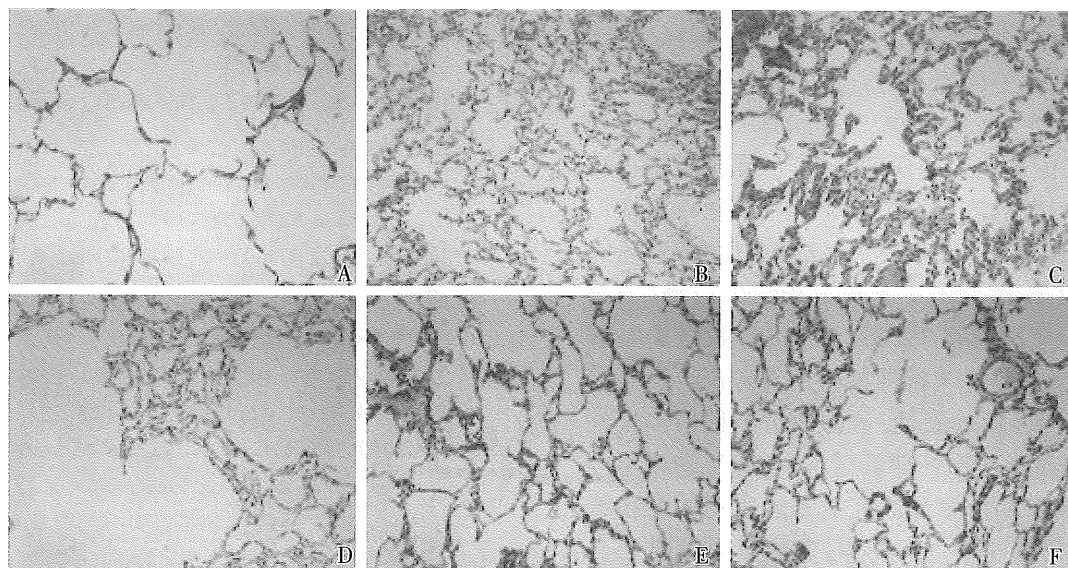


图3 两组肺损伤比较

Fig.3 Lung injury of the two groups

A: IR T1; B: IR T2; C: IR T3; D: OCR T1; E: OCR T2; F: OCR T3; (HE stain, $\times 200$)

灌注可保护肺血管内皮功能,减轻全身缺血再灌注导致的急性肺损伤^[2];减轻脑^[6]、小肠^[7]缺血再灌注损伤,抑制炎症反应;维持全身缺血再灌注时血流动力学的稳定^[8]。本实验将氧控制性再灌注应用于犬体外循环肺缺血再灌注模型,通过观察肺微血管通透性、氧化反应、炎性细胞和炎性

因子动员的变化来评价其作用,发现氧控制性再灌注可减轻体外循环肺缺血再灌注早期肺组织渗出,抑制过氧化反应,抑制中性粒细胞和炎性因子的动员。提示再灌注早期控制氧供可改善肺损伤严重程度,但实施方案及远期效果有待进一步的研究。

3.2 氧控制性再灌注方式选择

对离体肺仅供给 N_2 , 其脂质过氧化产物量明显降低^[9]; 心脏复灌之前 3 min 将 $p(O_2)$ 从 600 mmHg 降低至 150 mmHg 可减少线粒体自由基产物^[10]; Douzinas 等^[2]在研究中将氧控制在 $p(O_2)$ 35 ~ 40 mm Hg。我们在预实验中发现, 如果按照序贯性供氧方式, 在灌注即刻 FiO_2 低于 40%, $p(O_2)$ 达 35 ~ 40 mmHg 时, 实验犬基本不能停止体外循环。因此在本实验中, 我们选择 40% 做为 FiO_2 的下限, 维持最低 $p(O_2)$ 在正常范围内。

3.3 氧控制性再灌注肺保护机制探讨

肺缺血再灌注损伤中, 各种诱导因素、炎性介质、效应细胞、效应因子构成复杂的网络, NF- κ B 在上游调控炎症, 成为调节枢纽。NF- κ B 参与调控中性粒细胞凋亡; 调节内皮细胞功能; 促进肺泡巨噬细胞分泌各种炎性介质, 从而激活肺组织内其他细胞的 NF- κ B, 参与再灌注炎症信号的级联反应。因此, 影响 NF- κ B 的表达则可在转录水平影响多种炎性介质的转录, 从而对组织的再灌注损伤产生影响。本实验结果显示两组 NF- κ B 蛋白表达在 T2 时点达到高峰, T3 时点有小幅回落。与 Ishii^[11]的研究结果相符。提示再灌注早期的诱导因素可促进 NF- κ B 的激活, 同时引起炎症信号的正反馈, 促进终末的病理表现, 可能与组织再灌注后氧自由基的产生有关。而氧控制性再灌注可使实验组 NF- κ B 蛋白表达在 T2 和 T3 时点明显降低, 同时 IL-6 和 TNF- α 表现出相同的趋势(与对照组相比, 实验组在 T2、T3 时点以倍数级关系降低), 提示氧控制性再灌注的应用可抑制再灌注早期肺组织 NF- κ B 的表达, 进而通过抑制诸多炎性介质, 减轻再灌注损伤期肺组织中 PMN 的聚集浸润。当然氧控制性再灌注究竟是通过何种途径或机制影响再灌注期 NF- κ B 的表达, 尚需进一步探讨。

总之, 氧控制性再灌注对体外循环缺血再灌注导致的早期肺损伤具有一定的保护作用, 可能的作用机制与其抑制 NF- κ B 的表达, 减少炎性细胞浸润有关。

参考文献:

- [1] Egan JR, Butler TL, Cole AD, et al. Myocardial ischemia is more important than the effects of cardiopulmonary bypass on myocardial water handling and postoperative dysfunction: a pediatric animal model [J]. J Thorac Cardiovasc Sur, 2008, 136 (5): 1265-1273.
- [2] Douzinas EE, Orfanos SE, Livaditi O, et al. Hypoxemic resuscitation prevents pulmonary capillary endothelial dysfunction induced by normoxemic resuscitation from hemorrhagic shock [J]. Crit Care Med, 2009, 37(3): 869-875.
- [3] Arold SP, Mora R, Lutchen KR, et al. Variable tidal volume ventilation improves lung mechanics and gas exchange in a rodent model of acute lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(3): 366-371.
- [4] Messent M, Sullivan K, Keogh BF, et al. Adult respiratory distress syndrome following cardiopulmonary bypass: incidence and prediction [J]. Anesthesia, 1992, 47(3): 267-268.
- [5] 周成斌, 张镜方, 肖营凯, 等. 体外循环中低流量肺动脉灌注对肺功能的影响 [J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2006, 27(3): 289-292.
- [6] Douzinas EE, Patsouris E, Kyriades EM, et al. Hypoxaemic reperfusion ameliorates the histopathological changes in the pig brain after a severe global cerebral ischaemic insult [J]. Intensive Care Med, 2001, 27 (5): 905-910.
- [7] Douzinas EE, Kollias S, Tiniakos D, et al. Hypoxemic reperfusion after 120 min of intestinal ischemia attenuates the histopathologic and inflammatory response [J]. Crit Care Med, 2004, 32(11): 2279-2283.
- [8] Douzinas EE, Livaditi O, Andrianakis I, et al. The effect of hypoxemic resuscitation from hemorrhagic shock on blood pressure restoration and on oxidative and inflammatory responses [J]. Intensive Care Med, 2008, 34(6): 1133-1141.
- [9] Fisher AB, Dodia C, Tan ZT, et al. Oxygen dependent lipid peroxidation during lung ischemia [J]. J Clin Invest, 1991, 88(2): 674-679.
- [10] Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, et al. Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxyde production and glutathione depletion [J]. FASEB J, 2005, 19(3): 354-361.
- [11] Ishii M, Suzuki Y, Takeshitak, et al. Inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase activity improves ischemia/reperfusion injury in rat lungs [J]. J Immunol, 2004, 172(4): 2569-2577.

(编辑 刘清海)