

不同剂量丙泊酚对兔肺缺血再灌注损伤的保护作用

刘波, 张利佳, 郭宇峰, 高静

(榆林市第一医院麻醉科, 陕西 榆林 719000)

【摘要】目的: 分析不同剂量丙泊酚对兔肺缺血再灌注损伤的保护作用。**方法:** 根据 Eppinger 改良法建立兔肺缺血再灌注损伤模型。将建模成功的兔随机分为肺缺血再灌注损伤组 (IR 组, 肝素 50 U/kg)、丙泊酚低剂量组 (LD 组, 肝素 50 U/kg + 丙泊酚 5 mg/kg)、丙泊酚中剂量组 (MD 组, 肝素 50 U/kg + 丙泊酚 10 mg/kg) 和丙泊酚高剂量组 (HD 组, 肝素 50 U/kg + 丙泊酚 20 mg/kg), 每组 9 只, 另取 9 只兔作为假手术组 (C 组)。再灌注 2 h 后, 检测兔血液及肺组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 活性和丙二醛 (MDA) 含量、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)、IL-8 含量、肺组织湿干重比、肺组织细胞凋亡、肺泡灌洗液中中性粒细胞 (PMN) 百分比以及肺组织中 IL-6 mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达水平。**结果:** 与 C 组相比, IR 组兔血液及肺组织中 SOD 活性均降低 ($P < 0.05$), 兔血液及肺组织中 MDA 含量、肺组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 浓度、IL-6mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达量、肺组织湿干重比、肺组织细胞凋亡指数以及肺泡灌洗液中 PMN 百分比均升高 ($P < 0.05$)。与 IR 组相比, LD 组、MD 组和 HD 组兔血液及肺组织中 SOD 的活性均升高 ($P < 0.05$), 兔血液及肺组织中 MDA 含量、肺组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 浓度、IL-6 mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达量、肺组织湿干重比、肺组织细胞凋亡指数以及肺泡灌洗液中 PMN 百分比均降低 ($P < 0.05$); 且丙泊酚对以上观察指标的促进或抑制作用均随其浓度的增加而增强。**结论:** 丙泊酚对兔肺缺血再灌注损伤具有较好的保护作用, 且随着丙泊酚给药浓度增加, 保护作用呈增强趋势。

【关键词】 丙泊酚; 肺缺血再灌注损伤; 肝素; 湿干重比; 细胞凋亡; 灌洗液

【中图分类号】 R563 **【文献标志码】** A

Protective effects of propofol in different doses on pulmonary ischemia-reperfusion injury in rabbits

LIU Bo, ZHANG Li-jia, GUO Yu-feng, GAO Jing

(Department of Anesthesiology, the First Hospital of Yulin, Yulin 719000, Shaanxi, China)

【Abstract】 Objective: To analyze the protective effects of propofol in different doses on pulmonary ischemia-reperfusion injury in rabbits. **Methods:** A rabbit model of lung ischemia-reperfusion injury was established according to Eppinger's modified method. Successfully modeled rabbits were randomly divided into four groups: lung ischemia-reperfusion injury group (Group IR, Heparin 50 U/kg), propofol low-dose group (Group LD, Heparin 50 U/kg + Propofol 5mg/kg), propofol medium dose group (Group MD, Heparin 50 U/kg + Propofol 10mg/kg) and propofol high-dose group (Group HD, Heparin 50 U/kg + Propofol 20mg/kg), 9 rabbits in each group. Another 9 rabbits were taken as the sham operation group (Group C). 2 hours after reperfusion, the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of Malondialdehyde (MDA) in blood, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), IL-8 in lung tissue, the ratio of wet to dry weight of lung tissue, the apoptosis of lung tissue, the percentage of polymorphonuclear neutrophil (PMN) in alveolar lavage fluid and the expression of IL-6 mRNA and IL-1 β mRNA in lung tissue were analyzed. **Results:** Compared with group C, activities of SOD in the blood and lungs in the IR group decreased significantly ($P < 0.05$). The contents of MDA in the blood and lungs, the concentration of TNF- α , IL-6 and IL-8 in the lungs, the expression of IL-6 mRNA and IL-1 β mRNA, the ratio of wet to dry weight of the lung tissue, the apoptosis index of the lung group and the percentage of PMN in the alveolar lavage fluid increased significantly ($P < 0.05$). Compared with group IR, activities of SOD in the blood and lungs of LD group, MD group and HD group increased significantly ($P < 0.05$). Contents of MDA in the blood and lungs, concentration of TNF- α , IL-6 and IL-8 in the lungs, expression of IL-6 mRNA and IL-1 β mRNA, ratio of wet to dry weight of lungs, apoptosis index of lungs and PMN percentage in lung foam lavage fluid decreased significantly ($P < 0.05$), and the promotion or the inhibition effect of propofol on the above-mentioned indexes were enhanced with the increase of propofol concentration. **Conclusion:** Propofol has a better protective effect on pulmonary ischemia-reperfusion injury in rabbits, and the protective effect is increasing with the increase of propofol concentration.

【Key words】 Propofol; Pulmonary ischemia-reperfusion injury; Heparin; Wet dry weight ratio; Apoptosis; Irrigation solution

缺血是常见的病理生理表现,临床上局部组织器官缺血将会导致实质器官的损害,尽管血供的恢复可以使缺血器官和组织重新获得氧气供应,为其提供新陈代谢所必需的营养并清除某些代谢产物^[1]。但有研究^[2]发现,在某些情况下,缺血后血流恢复供应可进一步导致器官和组织发生损伤和功能障碍。肺缺血再灌注损伤(lung ischemia reperfusion injury, LIRI)指肺组织经过一段时间的缺血后,再次恢复血流时,肺组织由于缺血缺氧期间,肺血管阻力、肺毛细血管通透性、肺水肿和通气功能等发生障碍并未改善,反而进一步加重^[3-4]。LIRI 在肺移植、体外循环、肺动脉切除重建中较为常见,且研究^[5]显示,目前缺血再灌注损伤仍是此类手术后最常见的并发症。因此,对 LIRI 的机制研究及临床有效预防方法仍备受关注。另有相关研究^[6-7]显示,由自由基引起大量细胞因子的产生和各种信号通路的激活与早期急性肺损伤发生发展关系密切。

丙泊酚是一种常见的镇静催眠药、麻醉药,在临床上被广泛应用于各种麻醉。临床上常用的丙泊酚为乳剂,亲脂性很强,且易积聚在细胞脂质双分子膜上,从而形成一层保护膜,提高其抗氧化性^[8-9]。另外,丙泊酚可影响多种细胞因子和炎症反应通路,具有抗氧自由基、抗脂质过氧化、减轻炎症反应等功效^[10-11]。本研究旨在探讨分析不同剂量丙泊酚对兔肺缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和仪器 本实验中使用的主要试剂、仪器及其生产厂家见表 1。

1.1.2 实验动物选择和分组 (1)实验动物选择:SPF 级健康雄性新西兰大白兔 36 只,体重 2.0~2.5 kg,由陕西省医学实验动物中心提供,分笼于相同条件下饲养 1 周。(2)实验动物分组:将建模成功的 36 只动物随机分为 4 组,即肺缺血再灌注损伤组(ischemia reperfusion, IR 组)、丙泊酚低剂量组(low dose, LD 组)、丙泊酚中剂量组(medium dose, MD 组)和丙泊酚高剂量组(high dose, HD 组),每组各 9 只。另取 9 只兔作为假手术组(C 组)。

表 1 主要试剂、仪器及其生产厂家

主要试剂和仪器	生产厂家
戊巴比妥钠	北京岚泰化工科技有限公司
乳酸林格注射液	广东大冢制药有限公司
4% 多聚甲醛	北京索莱宝科技有限公司
氯化钾注射液	国药集团容生制药有限公司
肝素注射液	天津生物化学制药有限公司
丙泊酚注射液	四川国瑞药业有限责任公司
SOD 和 MDA 检测试剂盒	南京建成生物工程研究所
TNF- α 、IL-6 和 IL-8 试剂盒	武汉华美生物工程有限公司
TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒	北京 Promega 生物科技有限公司
总 RNA 提取试剂盒	Boehringer Mannheim 公司
心电监护仪	美国 OHMEDA 公司
酶标仪	济南赛福生物科技有限公司
冰箱	青岛海尔股份有限公司
光学显微镜	北京普瑞赛司仪器有限公司
荧光定量 PCR 仪	赛默飞世尔科技有限公司
高速冷冻离心机	贝克曼库尔特生命科学事业部

注:超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),丙二醛(malondialdehyde, MDA),肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α),白介素(interleukin, IL),原位末端标记(tdt-mediated uap nick end labeling, TUNEL),聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)

1.2 方法

1.2.1 建立大鼠缺血再灌注模型和给药处理 根据 Eppinger 改良法建立兔肺缺血再灌注损伤模型。采用戊巴比妥钠(40 mg/kg)经腹腔注射麻醉,仰卧位固定于手术台上。开放耳缘静脉,输入乳酸林格液 5 mL·kg⁻¹·h⁻¹,气管插管后连接动物呼吸机,吸入氧量为 1 L/min,呼吸频率为 30 次/min,潮气量为 10 mL/kg,吸呼比为 1:1.25。连接无创心电监护仪,若血氧饱和度 < 90%、肺再灌注时发生心律不齐且不能自行恢复或经处理后仍不能恢复者,则退出该实验。通过颈总动脉插管监测动脉血压,在平均动脉压(mean arterial pressure, MAP)低于或高于基础值的 30%,使用血管活性药、调节补液速度以维持血压稳定。经胸骨旁线切口开胸,暴露、游离并阻断左侧肺门。C 组开胸暴露左侧肺门后,不进行任何处理,在开胸术后 190 min,使用氯化钾处死受试动物。IR 组给予 50 U/kg 静脉肝素化后,利用无创血管钳阻断左肺门 60 min,再灌注 120 min,同样使用氯化钾处死。LD 组、MD 组和 HD 组阻断前 10 min 经耳缘静脉泵注丙泊酚后使用 50 U/kg 肝素阻断左肺门 60 min,再灌注 120 min 后氯化钾处死。

给药组丙泊酚剂量分别为 5 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg。

1.2.2 观察指标及评价方法 (1) 血液中 SOD 活性和 MDA 含量测定:再灌注 120 min 后,经耳缘静脉采集 5 mL 血液标本于室温下静置 1 h,3 500 rpm 离心 10 min,取上清液,放置于 -80 °C 冰箱中保存。各组血液标本收集完后按照试剂盒说明方法测定 SOD 活性、MDA 含量。(2) 肺组织匀浆指标测定:切取左上肺相同位置的部分肺组织,置液氮中速冻后制成 10% 的组织匀浆,立即 3 000 rpm 离心 10 min,取其上清液, -20 °C 保存;测定 SOD 的活力时,取次上清再用生理盐水稀释成 1% 的组织匀浆。按照 SOD、MDA、TNF- α 、IL-6 和 IL-8 试剂盒说明书方法进行检测。(3) 肺组织中 IL-6 mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达:取 100 mg 肺组织用 Trizol 提取液抽提总 RNA,用核酸蛋白测定仪测定其西光速 A260/A280 在 1.8 ~ 2.0 的样本进行后续试验。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH) 为内参,逆转录 (reverse transcription, RT)-PCR 法检测肺组织中 IL-6mRNA 和白介素-1 β (IL-1 β)mRNA 表达。(4) 肺组织湿干重比的测定:剩余的左肺组织,经 4 °C 生理盐水冲洗干净后,用滤纸吸干净肺组织表面的液体,使用分析天平称湿重,然后将其置入 80 °C 的烘箱中,24 h 后称干重,肺组织湿干重比 = 湿重/干重。(5) 肺组织细胞凋亡情况检测:取左肺相同部位的部分肺组织,甲醛液固定,24 h 后石蜡包埋。检测前,将石蜡切片常规脱蜡、脱水后,按照 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒说明书方法检测各组新西兰兔肺组织细胞凋亡情况。切片中,阳性凋亡细胞镜下呈棕黄色,其余细胞镜下呈蓝色。在 400 倍光学显微镜下每个样本随机选择 5 个视野,并记录视野下阳性细胞数量。平均百分率即为细胞凋亡指数。(6) 肺泡灌洗液中 PMN 百分比:开胸结扎左肺门后,右肺用生理盐水 2 min 做 2 次肺泡灌洗,以 1 500 rpm 离心 10 min,沉渣涂片瑞氏染色,自然风干后,于油镜下计数 300 个白细胞,计算中性粒细胞 (polymorphonuclear neutrophil, PMN) 百分比。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 one-way ANOVA 作差异显著性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量丙泊酚对血液中 SOD 活性和 MDA

含量的影响

与 C 组相比,IR 组兔血液中 SOD 活性明显降低 ($P < 0.05$),MDA 含量明显升高 ($P < 0.05$);与 IR 组相比,LD 组、MD 组和 HD 组兔血液中 SOD 活性均明显升高 ($P < 0.05$),MDA 含量均明显降低 ($P < 0.05$),且丙泊酚对兔血液中 SOD 活性的促进程度和对 MDA 表达的抑制程度均随着其浓度的增加而增强。见表 2。

表 2 不同剂量丙泊酚对血液中 SOD 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD 活性 (U/mL)	MDA 含量 (mmol/L)
C 组 ($n=9$)	135.8 \pm 11.1	1.44 \pm 0.10
IR 组 ($n=9$)	64.7 \pm 6.6 *	2.79 \pm 0.12 *
LD 组 ($n=9$)	96.7 \pm 11.3 #	2.19 \pm 0.08 #
MD 组 ($n=9$)	114.4 \pm 9.6 #	1.81 \pm 0.17 #
HD 组 ($n=9$)	132.7 \pm 12.3 #	1.50 \pm 0.07 #

* $P < 0.05$,与 C 组相比;# $P < 0.05$,与 IR 组相比。

2.2 不同剂量丙泊酚对肺组织中 SOD 活性和 MDA 含量的影响

与 C 组相比,IR 组兔肺组织中 SOD 的活性明显降低 ($P < 0.05$),MDA 含量明显升高 ($P < 0.05$);与 IR 组相比,LD 组、MD 组和 HD 组兔肺组织中 SOD 的活性均明显升高 ($P < 0.05$),MDA 含量均明显降低 ($P < 0.05$),且丙泊酚对兔肺组织中 SOD 活性的促进程度和对 MDA 表达的抑制程度均随其浓度的增加而增强。见表 3。

表 3 不同剂量丙泊酚对肺组织中 SOD 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	SOD 活性 (U/g)	MDA 含量 (mmol/g)
C 组 ($n=9$)	79.5 \pm 5.7	0.89 \pm 0.08
IR 组 ($n=9$)	41.8 \pm 1.3 *	2.36 \pm 0.08 *
LD 组 ($n=9$)	52.3 \pm 1.7 **	1.81 \pm 0.09 **
MD 组 ($n=9$)	60.1 \pm 1.6 **	2.03 \pm 0.09 **
HD 组 ($n=9$)	73.5 \pm 2.0 **	2.26 \pm 0.04 **

* $P < 0.05$,分别与 C 组和 IR 组相比;# $P < 0.05$ 与 IR 组相比。

2.3 不同剂量丙泊酚对肺组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 浓度的影响

与 C 组相比,IR 组兔肺组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 浓度明显升高 ($P < 0.05$);与 IR 组相比,LD 组、MD 组和 HD 组兔肺组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 浓度明显降低 ($P < 0.05$),且丙泊酚对兔肺组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 表达促进程度随其浓度的增加而增强。见表 4。

表 4 不同剂量丙泊酚对肺组织中 TNF- α 、IL-6 和 IL-8 浓度的影响 ($\bar{x} \pm s$, ng/mg)

组别	TNF- α	IL-6	IL-8
C 组 ($n=9$)	6.73 \pm 0.09	13.30 \pm 0.48	19.77 \pm 0.71
IR 组 ($n=9$)	10.35 \pm 0.36*	23.45 \pm 0.98*	37.93 \pm 0.69*
LD 组 ($n=9$)	10.04 \pm 0.07*#	20.03 \pm 0.46	33.60 \pm 0.64*#
MD 组 ($n=9$)	9.04 \pm 0.25*#	18.39 \pm 0.30*#	27.95 \pm 0.91*#
HD 组 ($n=9$)	7.15 \pm 0.11*#	14.24 \pm 0.25*#	21.06 \pm 1.16*#

* $P < 0.05$, 分别与 C 组和 IR 组相比; # $P < 0.05$ 与 IR 组相比。

2.4 不同剂量丙泊酚对肺组织中 IL-6mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达的影响

与 C 组相比, IR 组兔肺组织中 IL-6mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达量明显升高 ($P < 0.05$); 与 IR 组相比, LD 组、MD 组和 HD 组兔肺组织中 IL-6mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达量均明显降低 ($P < 0.05$), 且丙泊酚对兔肺组织中 IL-6mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达量的抑制程度均随其浓度的增加而增强。见表 5。

表 6 不同剂量丙泊酚对肺组织湿干重比的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	C 组 ($n=9$)	IR 组 ($n=9$)	LD 组 ($n=9$)	MD 组 ($n=9$)	HD 组 ($n=9$)
湿干重比 (%)	4.57 \pm 0.21	6.79 \pm 0.12*	6.17 \pm 0.08*#	5.71 \pm 0.09*#	4.98 \pm 0.21*#
凋亡指数	4.04 \pm 0.14	13.33 \pm 0.37*	9.17 \pm 0.10*#	7.15 \pm 0.06	4.47 \pm 0.13*#
PMN 百分比 (%)	5.89 \pm 0.50	56.89 \pm 2.42*	35.00 \pm 3.46*#	27.41 \pm 1.74*#	14.48 \pm 1.76*#

* $P < 0.05$, 分别与 C 组和 IR 组相比; # $P < 0.05$ 与 IR 组相比。

3 讨论

肺缺血再灌注引起的肺损伤是一种全身性系统性的炎症疾病的表现, 目前对于其发病机制尚不完全清楚。据统计报道, 原发性肺移植功能障碍发生率为 10% ~ 20%, 体外循环术后功能障碍的发生率高达 15% ~ 30%, 可直接影响患者术后愈合^[12]。肺缺血再灌注损伤可能与自由基的产生、细胞因子的释放、肺上皮细胞的凋亡以及中性粒细胞在肺内的聚集等因素有关, 但具体机制尚不完全清楚^[13]。自由基是人体氧化过程中产生的副产物, 病理状态下, 组织缺血再灌注可能导致大量的自由基产生和积累, 过多的自由基和细胞膜脂质发生过氧化反应, 从而导致细胞功能障碍最终造成细胞死亡。脂质过氧化反应的主要代谢产物是 MDA, 其含量直接反映了过氧化反应和细胞氧化损伤的程度。

丙泊酚是一种新型的酚类麻醉药, 大量研究表明其对缺血再灌注损伤具有一定的保护作用, 这种作用主要是因为丙泊酚可影响多种细胞因子和炎症反应通路, 具有抗氧自由基、抗脂质过氧化、减轻炎

表 5 不同剂量丙泊酚对肺组织中 IL-6mRNA 和 IL-1 β mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	IL-6 mRNA	IL-1 β mRNA
C 组 ($n=9$)	3.13 \pm 0.08	3.57 \pm 0.10
IR 组 ($n=9$)	5.74 \pm 0.10*	6.41 \pm 0.12*
LD 组 ($n=9$)	5.07 \pm 0.06*#	5.56 \pm 0.08*#
MD 组 ($n=9$)	4.24 \pm 0.07*#	4.81 \pm 0.07*#
HD 组 ($n=9$)	3.42 \pm 0.11*#	3.79 \pm 0.09*#

* $P < 0.05$, 分别与 C 组和 IR 组相比; # $P < 0.05$ 与 IR 组相比。

2.5 不同剂量丙泊酚对肺组织湿干重比的影响

与 C 组相比, IR 组兔肺组织湿干重比、细胞凋亡指数和肺泡灌洗液中 PMN 百分比明显升高 ($P < 0.05$); 与 IR 组相比, LD 组、MD 组和 HD 组兔肺组织湿干重比、细胞凋亡指数和肺泡灌洗液中 PMN 百分比均明显降低 ($P < 0.05$), 且丙泊酚对兔肺组织湿干重比、细胞凋亡指数和肺泡灌洗液中 PMN 百分比抑制程度随其浓度的增加而增强。见表 6。

症反应等功效^[14-15]。本研究对再灌注后血液及肺组织中的 SOD 活性和 MDA 含量检测结果表明, 丙泊酚可通过增强 SOD 的活力, 降低 MDA 的表达, 降低氧化反应对肺组织的损伤, 且丙泊酚的抗氧化功效随其浓度的增加而增强。

在肺缺血再灌注损伤中, 细胞因子等炎症介质的异常释放是重要环节, 如 IL-6、IL-8、TNF- α 等, 其中 TNF- α 是主要炎症介质, 主要通过增加血管的通透性, 使血管内液甚至红细胞渗出, 形成肺间质水肿, 影响气体交换, 减少肺表面活性物质分泌, 降低血氧分压, 增加肺凋亡细胞的数量^[16]。肺组织湿干比重直接反应出肺水肿程度。本研究通过对再灌注 2 h 后肺组织中炎症因子、肺组织湿干重比、肺组细胞凋亡指数以及肺泡灌洗液中 PMN 百分比检测结果显示, 丙泊酚对相关指标的刺激或抑制程度随其浓度的增加而增强, 且丙泊酚对兔肺组织湿干重比、细胞凋亡指数和肺泡灌洗液中 PMN 百分比抑制程度同样随其浓度的增加而增强。

(下转第 223 页)