

乳化异氟醚预处理对大鼠内毒素所致急性肺损伤的作用

徐文敏, 张璟瑜, 刘 进[△]

四川大学华西医院 麻醉科(成都 610041)

【摘要】 目的 研究乳化异氟醚(EISO)预处理对大鼠内毒素(LPS)所致急性肺损伤是否具有保护作用。方法 健康雄性 SD 大鼠,分为急性肺损伤模型组(LPS组, $n=10$)、乳化异氟醚组(EISO组, $n=10$)、脂肪乳组(INT组, $n=10$)和对照组(CON组, $n=5$),按分组分别静脉泵注 2 mL 生理盐水、EISO 4 mL/(kg·h)、脂肪乳(INT)、生理盐水 2 mL 预处理 30 min,然后 LPS 组、EISO 组和 INT 组静脉注入 LPS 8 mg/kg, CON 组静脉注入生理盐水。监测动脉血压和心率。5 h 后,测动脉血气分析;测量血浆肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白介素-6(IL-6)水平;测量肺湿干重比值(W/D);测量肺组织髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平。结果 与 CON 组相比,其余 3 组氧合指数降低,肺 W/D 增加,血浆 TNF- α 、IL-6 浓度升高,肺组织 MPO 活性增加,MDA 含量增加,SOD 活性降低($P<0.05$);与 LPS 组相比,EISO 组氧合指数升高,肺 W/D 降低,血浆 TNF- α 、IL-6 浓度降低,肺组织 MPO 活性降低,MDA 含量减少,SOD 活性增加($P<0.05$)。结论 乳化异氟醚预处理可以减轻大鼠 LPS 所致急性肺损伤。

【关键词】 乳化异氟醚 内毒素 急性肺损伤

Effects of Emulsified Isoflurane Preconditioning on LPS-induced Acute Lung Injury in Rats XU Wen-min, ZHANG Jing-yu, LIU Jin[△]. Department of Anesthesiology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: scujinliu@foxmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of emulsified isoflurane preconditioning on LPS-induced acute lung injury in rats. **Methods** Acute lung injury was induced by the administration of LPS 8 mg/kg intravenously in male Sprague-Dawley rats. The rats were randomly assigned to 4 groups: LPS-induced acute lung injury group (LPS, $n=10$); emulsified Isoflurane Preconditioning group (EISO, $n=10$); Intralipid pre-treated group (INT, $n=10$), and saline pre-treated control group (CON, $n=5$). In the later 3 groups, 2 mL/kg NS, IL and EISO were infused intravenously for 30 min before the administration of LPS respectively. The animals were then observed for 5 hours. The mean arterial blood pressure(MAP) and heart rate(HR) were monitored hourly. Arterial blood gas (ABG) was measured for oxygenation index(OI) at the end of 5h. The blood samples were taken for the measurements of plasma tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6). The lungs were removed for the measurements of wet/dry (W/D) weight ratio, as well as the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase(SOD), myeloperoxidase(MPO). **Results** The OI of group CON was 435 ± 30 , group LPS 225 ± 49 , group EISO 367 ± 41 , and group INT 267 ± 41 . Compared with group CON, OI and pulmonary SOD activity significantly decreased while plasma TNF- α , IL-6 concentration and pulmonary MDA level, MPO activity increased in LPS, EISO and INT groups. The plasma TNF- α , IL-6 concentration, pulmonary MDA level and pulmonary MPO activity of group EISO were lower while OI and pulmonary SOD activity were higher than those of group LPS. **Conclusion** The emulsified isoflurane pretreatment can ameliorate LPS-induced acute lung injury in rats.

【Key words】 Emulsified isoflurane Lipopolysaccharide Acute lung injury

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)是重症监护室(ICU)患者死亡的主要原因^[1]。肺通常是 MODS 发展过程中首先累及的器官。吸入麻醉药异氟醚在临床上广泛运用于麻醉诱导和维持,研究表明,异氟

醚除了麻醉作用外,还具有抗炎作用,如降低脂多糖刺激导致的细胞因子释放,提高内毒素血症和 MODS 动物存活率和减轻器官损伤^[2-6]。近年来,有将吸入麻醉药用于 ICU 患者镇静的报道^[7]。但因为使用吸入麻醉药需要特殊的挥发罐装置和麻醉机,使得在病房使用吸入麻醉药受到限制。而将液态的吸入麻醉药直接经静脉注射于动物或人,都引

[△] 通讯作者, E-mail: scujinliu@foxmail.com

起了严重的组织器官损害,甚至死亡^[8,9]。乳化异氟醚是一种新型乳化挥发性麻醉药,动物实验显示,静脉注射乳化异氟醚能产生有效、安全的镇静催眠作用,且入睡和苏醒极为迅速,对重要器官无明显不良反应^[10]。同时,胡朝阳等^[11]发现乳化异氟醚预处理可减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤。本研究拟探索乳化异氟醚预处理对大鼠内毒素(LPS)所致急性肺损伤的作用,为扩大其临床运用范围提供动物实验证据。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂及仪器

120 mg/mL 乳化异氟醚(含液态异氟醚体积比为8%),是四川大学华西医院麻醉与危重病医学研究室研制的二类新药(专利号 991114655),由宜昌人福药业有限责任公司提供。30%脂肪乳(江苏华瑞制药有限公司,5 mL)。大肠杆菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)血清型 O111:B4,由美国 Sigma 公司提供。大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)试剂盒(R&D ELISA Kit),大鼠白介素-6(IL-6)试剂盒(R&D ELISA Kit);丙二醛(MDA)试剂盒,超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,髓过氧化物酶(MPO)试剂盒均由南京建成生物制品研究所提供。Biolap 410E+多通道生理记录仪、HX-100E小动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司),低温高速离心机 Biofuge Stratos(Heraeus,德国),酶标仪 MR-96A(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司),微量注射泵 WZ-50S(浙江大学医学器械厂)。

1.2 实验动物

健康雄性 SD 大鼠 35 只,由四川省医学科学院实验动物研究所提供,体质量 250~300 g,实验动物近两个月无用药史,体温正常。实验前所有实验动物均在实验室喂养 3 d 以适应实验室环境(温度:20~28 °C,湿度:40%~60%),实验前禁食 12 h,自由饮水。

1.3 实验方法

大鼠以 20 g/L 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,仰卧位固定于平板,予以气管切开并置管(静脉留置针 12G,美国 BD),连接小动物呼吸机,机控呼吸。根据预实验中血气分析结果,设定呼吸机参数为频率 65 次/min,呼吸比 5:4,潮气量 13 mL/kg,吸入氧浓度 FiO₂ 100%。然后分别予股动、静脉置管(静脉留置针 24G,美国 BD)。操作完毕后平衡 30 min,从股动脉置管处取动脉血测基础动脉血气。

按数字表法,将大鼠随机分为 4 组。急性肺损伤模型组(LPS 组, $n=10$)从股静脉置管处泵入生理盐水 4 mL/(kg·h),持续 30 min,然后股静脉缓慢推注 4 mg/mL 的 LPS 2 mL/kg(即 8 mg/kg)。乳化异氟醚组(EISO 组, $n=10$)股静脉泵入乳化异氟醚 4 mL/(kg·h),脂肪乳组(INT 组, $n=10$)股静脉泵入脂肪乳 4 mL/(kg·h),然后股静脉缓慢推注 4 mg/mL LPS 2 mL/kg。对照组(CON 组, $n=5$)股静脉泵入生理盐水 4 mL/(kg·h),持续 30 min,然后从股静脉缓慢推注生理盐水 2 mL/kg。随后各组均通过股动脉置管连接生理记录仪,持续检测大鼠平均动脉压(MAP)和心率(HR)5 h,以 2 mg/mL 戊巴比妥钠,4 mL/(kg·h)股静脉输注维持麻醉,必要时戊巴比妥钠 15 mg/kg 腹腔注射加深麻醉。

5 h 后从股动脉处取动脉血样,0.2 mL 进行动脉血气分析(ABG)。4 mL 动脉血置于含乙二胺四乙酸(EDTA)的离心管中,混匀后 4 °C,3 000 r/min 离心 15 min 分离血浆,吸取上清液移入 EP 管, -20 °C 冰箱保存。采用酶联免疫法(ELISA),用大鼠 TNF- α 和 IL-6 ELISA 试剂盒,按照操作说明书测定血浆 TNF- α 、IL-6 含量。

动脉取血后,放血法处死大鼠,打开胸腔取其肺脏,左肺立即称量得出湿重,放入 60 °C 烤箱放置 72 h 后,再次称量得出干重,计算肺干湿重比值(W/D);取右肺上叶同一部位 1 块大小约为 1 cm×1 cm×0.5 cm 肺组织,在室温下固定于 10% 甲醛 24 h,常规脱水、石蜡包埋、切片(厚度 4 μ m)、HE 染色,在光镜下观察并作病理形态学积分,积分方法^[12]主要依据肺间质水肿、肺泡水肿、炎细胞浸润、肺泡出血、透明膜形成、肺不张改变的等级,按程度的“无、轻、中、重”分别计“0、1、2、3 分”,然后累计总分;其余右肺组织用冰生理盐水电动匀浆制成 10% 肺组织匀浆,使用超声碎细胞仪破碎细胞后,在 4 °C 经 1 000 r/min 离心 15 min,取上清液移入 EP 管, -80 °C 冰箱保存,按照相应试剂盒操作说明书测定肺组织匀浆 MPO、SOD 活性和 MDA 含量。

1.4 统计学方法

计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺病理学形态学比较

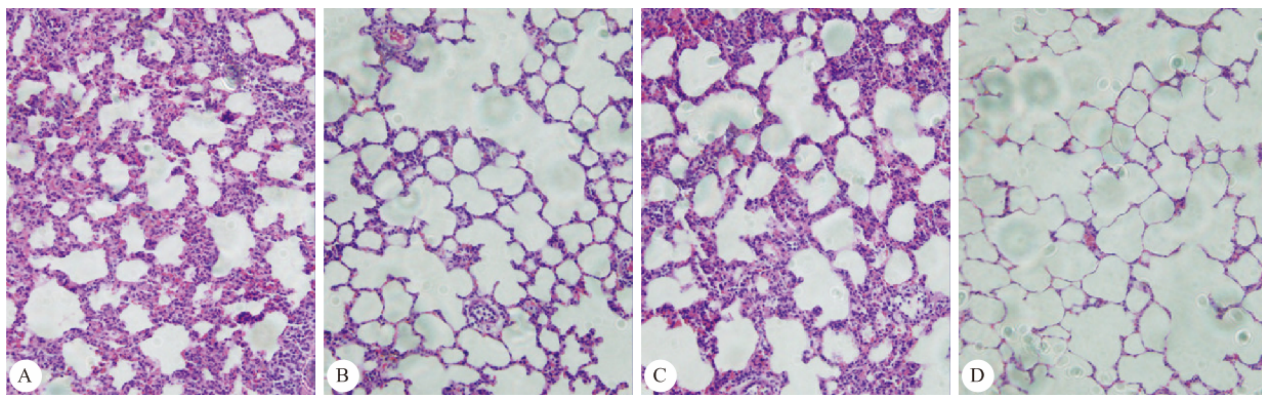
光镜下,LPS 组水肿严重、较多炎细胞浸润并

出血,伴局灶性肺不张和肺气肿,可见微血栓及透明膜形成;EISO 组肺泡隔轻度增宽、少量炎细胞浸润、组织结构较为完整;INT 组可见渗出、间质增宽及肺泡内带状、片状水肿,间质炎细胞浸润;CON 组肺组织结构完整,肺泡腔清晰,肺泡隔无水肿、炎症等特殊改变。见附图。说明急性肺损伤模型建立成功。LPS、EISO 和 INT 组肺病理形态学积分较 CON 组升高(P 为 <0.05),EISO 组低于 LPS 和 INT 组(P 均 <0.05),见附表。

2.2 各组大鼠氧合指数,肺 W/D,血浆 TNF- α 、IL-

6 浓度和肺组织 MDA、SOD、MPO 含量的比较

结果见附表。与 CON 组比较,LPS 组、EISO 组和 INT 组氧合指数降低,肺 W/D 升高,血浆 TNF- α 、IL-6 浓度升高,肺组织 MPO 活性增加,MDA 含量升高,SOD 活性降低($P < 0.05$);与 LPS 组比较,EISO 组氧合指数升高,肺 W/D 降低,血浆 TNF- α 、IL-6 浓度降低,肺组织 MPO 活性降低,MDA 含量降低,SOD 活性升高($P < 0.05$);LPS 组和 INT 组间各项指标比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。



附图 各组大鼠肺病理组织切片。HE $\times 200$

Fig Lung histopathologic slide of rats. HE $\times 200$

A,B,C,D; LPS, EISO, INT and CON group, respectively

附表 各组大鼠肺病理形态学积分,氧合指数,肺 W/D,血浆 TNF- α 、IL-6 浓度和肺组织 MDA、SOD、MPO 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

Table Comparisons of pathomorphological integration of lung oxygenation index, W/D, TNF- α , IL-6 of plasma and MDA, SOD, MPO of the lung tissues in rats ($\bar{x} \pm s$)

	LPS group (n=10)	EISO group (n=10)	INT group (n=10)	CON group (n=5)
Pathomorphological integration of lung	13.4 \pm 3.4*	8.2 \pm 2.1* \cdot Δ	12.8 \pm 2.9*	1.8 \pm 1.1
Oxygenation index	225.00 \pm 49.00*	367.00 \pm 41.00* \cdot Δ	267.00 \pm 41.00*	435.00 \pm 30.00
W/D (%)	5.12 \pm 0.13*	4.82 \pm 0.14* \cdot Δ	5.02 \pm 0.13*	4.30 \pm 0.13
TNF- α (ng/mL)	518.00 \pm 44.00*	247.00 \pm 47.00* \cdot Δ	495.00 \pm 55.00*	53.00 \pm 4.00
IL-6 (ng/mL)	5030.00 \pm 134.00*	3041.00 \pm 133.00* \cdot Δ	4998.00 \pm 137.00*	238.00 \pm 21.00
MPO (U/gprot)	0.63 \pm 0.05*	0.39 \pm 0.06* \cdot Δ	0.63 \pm 0.06*	0.25 \pm 0.03
MDA (nmol/mgprot)	0.80 \pm 0.09*	0.54 \pm 0.07* \cdot Δ	0.81 \pm 0.10*	0.34 \pm 0.02
SOD (U/mgprot)	9.98 \pm 2.44*	15.36 \pm 2.21* \cdot Δ	12.12 \pm 2.43*	24.81 \pm 5.15

* $P < 0.05$, vs. CON group; Δ $P < 0.05$, vs. LPS and INT groups

3 讨论

LPS 是革兰氏阴性细菌外膜的主要成分,静脉注射可复制急性肺损伤的动物模型^[13]。本实验采用静脉注射 LPS 8 mg/kg 的方法制备大鼠急性肺损伤模型,5 h 后,结果显示相较 CON 组,LPS 组氧合指数降低,光镜下肺病理形态学积分升高,肺 W/D 升高,同时血浆 TNF- α 和 IL-6 浓度升高,提示模型制备成功。参照预实验结果,本研究于制备模型

前 30 min 股静脉泵注乳化异氟醚 2 mL/kg 进行预处理。由于乳化异氟醚制作过程是以 30% 脂肪乳为载体,本实验为消除脂肪乳对实验结果的影响,设立了单独静脉泵注脂肪乳预处理的实验组,结果提示脂肪乳并不能减轻 LPS 导致的肺损伤,说明乳化异氟醚发挥肺保护作用主要是其中异氟醚的作用,与脂肪乳关系不大。相较于 LPS 组,EISO 组氧合指数升高,肺 W/D 降低,提示 EISO 组肺水肿程度减轻,肺功能得到明显改善。

LPS 导致急性肺损伤 (ALI) 时, 多核中性粒细胞 (PMN) 等炎症细胞在肺内聚集、激活, 产生大量的炎症介质, 如 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等。TNF- α 在炎症瀑布反应中起主导作用, 可进一步诱导自身和其它细胞因子 (如 IL-1 β 、IL-6、IL-8 等) 的产生和释放。MPO 是 PMN 的标志性酶, 每个 PMN 中 MPO 含量相对较为恒定, 测定肺 MPO 活性可定量推断组织中 PMN 含量。EISO 组 MPO 活性低于 LPS 组 MPO 活性; EISO 组血浆 TNF- α 和 IL-6 浓度低于 LPS 组。说明 EISO 组肺内 PMN 聚集量减少, 同时活化 PMN 释放入血的 TNF- α 和 IL-6 炎症介质减少。

当机体由于炎症反应引起 ALI 时, PMN 释放氧自由基, 自由基损伤细胞膜后, 引起脂质氧化, MDA 为细胞膜脂质氧化的终产物, 其浓度间接反映出细胞膜损伤程度。SOD 具有清除氧自由基和抗氧自由基损伤的作用, 当自由基增加时, SOD 消耗也增加, 活性降低。EISO 组肺组织 MDA 浓度低于 LPS 组 MDA 浓度; EISO 组肺组织 SOD 活性高于 LPS 组 SOD 活性。提示 EISO 组肺组织细胞膜损伤程度降低。

急性肺损伤的发病机制尚未完全阐明。除有些致病因素对肺泡膜的直接损伤外, 更重要的是多种炎症细胞 (巨噬细胞、中性粒细胞、血小板) 及其释放的炎症介质和细胞因子间接介导的肺炎症反应, 最终引起肺泡膜损伤、通透性增加和微血栓形成; 并可造成肺泡上皮损伤, 表面活性物质减少或消失, 加重肺水肿和肺不张, 从而引起肺的氧合功能障碍, 导致顽固性低氧血症^[14]。实验结果显示, 乳化异氟醚预处理能减少 LPS 所致肺内 PMN 的聚集, 同时减少其释放炎症介质和氧自由基, 减轻肺炎症反应和肺泡上皮损伤, 以减轻肺水肿程度, 改善肺氧合功能, 纠正低氧血症。

近年来, 众多离体和在体研究^[11, 15, 16] 显示乳化异氟醚能够改善缺血再灌注的心功能而具有心肌保护作用, 并认为这种心肌保护作用与异氟醚本身的心肌保护作用有关。但尚未有乳化异氟醚对肺损伤作用的研究。本研究结果显示乳化异氟醚预处理可以改善大鼠 LPS 所致急性肺损伤, 为扩大乳化异氟醚临床运用范围提供了动物实验依据, 将来也许可以将乳化异氟醚用于重症监护室患者镇静, 预防脓毒血症患者继发的急性肺损伤。乳化异氟醚肺损伤保护作用似乎与抑制炎症细胞在肺内聚集、活化及

其释放的细胞因子介导的炎症反应有关, 但其具体机制尚待进一步深入研究。

综上所述, 乳化异氟醚预处理可以改善大鼠 LPS 所致急性肺损伤, 其机制尚待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Martin GS, Mannino DM, Eaton S, *et al.* The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 2003; 348(3): 1546-1554.
- 2 Fuentes JM, Talamini MA, Fulton WB, *et al.* General anesthesia delays the inflammatory response and increases survival for mice with endotoxic shock. *Clin Vaccine Immunol*, 2006; 13(2): 281-288.
- 3 Lee HT, Emala CW, Joo JD, *et al.* Isoflurane improves survival and protects against renal and hepatic injury in murine septic peritonitis. *Shock*, 2007; 27(4): 373-379.
- 4 Flondor M, Hofstetter C, Boost KA, *et al.* Isoflurane inhalation after induction of endotoxemia in rats attenuates the systemic cytokine response. *Eur Surg Res*, 2008; 40(1): 1-6.
- 5 Li Q, Zhu Y, Jiang H, *et al.* Isoflurane preconditioning ameliorates endotoxin-induced acute lung injury and mortality in rats. *Anesth Analg*, 2009; 109(5): 1591-1597.
- 6 Plachinta RV, Hayes JK, Cerilli LA, *et al.* Isoflurane pretreatment inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rats. *Anesthesiology*, 2003; 98(1): 89-95.
- 7 Sackey PV, Martling CR, Granath F, *et al.* Prolonged isoflurane sedation of intensive care unit patients with the anesthetic conserving device. *Crit Care Med*, 2004; 32(11): 2241-2246.
- 8 Sandison JW, Sivapragasarn S, Hayes JA, *et al.* An experimental study of pulmonary damage associated with intravenous injection of halothane in dogs. *Br J Anaesth*, 1970; 42(5): 419-424.
- 9 Dwyer R, Coppel DL. Intravenous injection of liquid halothane. *Anesth Analg*, 1989; 69(2): 250-255.
- 10 Zhou J, Luo N, Liu J, *et al.* The efficacy and safety of intravenous emulsified isoflurane in rats. *Anesth Analg*, 2006; 102(1): 129-134.
- 11 胡朝阳, 刘进. 乳化异氟醚预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤时炎症反应的影响. *中华麻醉学杂志*, 2012; 32(5): 589-591.
- 12 Sun D, Zhao M, Ma D, *et al.* Protective effect of interleukin-1 receptor antagonist on oleic acid-induced lung injury. *Chin Med J (Engl)*, 1996; 109(7): 522-526.
- 13 李琦, 钱桂生, 张青等. 递增剂量脂多糖致伤对大鼠 SIRS-肺损伤的影响. *第三军医大学学报*, 2001; 23(11): 1264-1266.
- 14 王辰. 急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征. 见: 叶任高, 陆再英主编. *内科学*. 第6版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 144-145.
- 15 Rao Y, Wang Y, Zhang W, *et al.* Emulsified isoflurane produces cardiac protection after ischemia-reperfusion injury in rabbits. *Anesth Analg*, 2008; 106(5): 1353-1359.
- 16 陈永权, 金孝岷, 戴泽平等. 乳化异氟醚预处理对兔缺血再灌注心肌血流动力学的影响. *国际麻醉学与复苏杂志*, 2006; 27(4): 224-226.

(2013-01-07 收稿, 2013-03-07 修回)

编辑 沈进