

· 论 著 ·

# 外源性阿片肽预处理对体外循环后猪肺缺血再灌注损伤的保护作用

王亚华<sup>1</sup>, 石学银<sup>1\*</sup>, 孙继雄<sup>2</sup>, 朱秋峰<sup>1</sup>, 徐海涛<sup>1</sup>, 吉玉龙<sup>1</sup>, 袁红斌<sup>1</sup>, 何星颖<sup>1</sup>

(1. 第二军医大学长征医院麻醉科, 上海 200003; 2. 同济大学东方医院麻醉科, 上海 200120)

[摘要] 目的:观察外源性阿片肽(DADLE)对体外循环(CPB, cardiopulmonary bypass)后猪肺缺血再灌注损伤的保护作用, 探讨其可能的保护机制。方法:选取28只雄性幼猪, 随机分为4组( $n=7$ ), 分别为假手术组(Sham组)、体外循环模型组(CPB模型组)、DADLE预处理组(DADLE组)和ATP敏感钾离子通道阻断剂(Glibenclamide)阻断组( $K_{ATP}$ 阻断组)。Sham组仅予以开胸和主动脉及上下腔静脉插管操作, 其余3组均建立CPB模型, 并给予各自不同的预处理。CPB术前及再灌注不同时间点(10、30、60 min)比较各组动物气道峰压(peak inspiratory pressure, PIP)、动脉血氧分压( $PaO_2$ )、血清中丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。CPB术前及再灌注60 min各组取相同部位肺组织测定肺湿干重比(wet/dry weight ratio, W/D);再灌注60 min时处死动物, 计算肺损伤程度(lung tissue damage, LTD)并观察肺泡上皮超微结构的改变。结果:CPB术前各组间 $PaO_2$ 、PIP、MDA和W/D无显著差异;Sham组各时间点上上述指标无明显变化。再灌注60 min, CPB模型组和 $K_{ATP}$ 阻断组 $PaO_2$ 明显低于Sham组和DADLE组, 而PIP、MDA、W/D和LTD显著高于Sham组和DADLE组( $P<0.05$ 或 $0.01$ );DADLE组LTD高于Sham组( $P<0.05$ ), 其余指标无明显差异;CPB模型组和 $K_{ATP}$ 阻断组间上述指标无显著差异。肺泡上皮超微结构观察发现CPB模型组和 $K_{ATP}$ 阻断组肺泡上皮细胞损伤重于Sham组和DADLE组。结论:外源性阿片肽预处理可能通过促进ATP敏感钾通道的开放保护肺功能, 从而减轻CPB术后的肺缺血再灌注损伤。

[关键词] 体外循环;再灌注损伤;肺;阿片肽

[中图分类号] R 619 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)11-1196-04

## Exogenous opioid peptide preconditioning in prevention of pulmonary ischemia-reperfusion injury in pigs after cardiopulmonary bypass

WANG Ya-hua<sup>1</sup>, SHI Xue-yin<sup>1\*</sup>, SUN Ji-xiong<sup>2</sup>, ZHU Qiu-feng<sup>1</sup>, XU Hai-tao<sup>1</sup>, JI Yu-long<sup>1</sup>, YUAN Hong-bin<sup>1</sup>, HE Xing-ying<sup>1</sup> (1. Department of Anesthesiology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Anesthesiology, Eastern Hospital, Tongji University, Shanghai 200120)

[ABSTRACT] Objective: To evaluate the protective effect of  $\mu$ -opioid peptide, [D-Ala<sup>2</sup>-D-Leu<sup>5</sup>]-enkephaline (DADLE), on pulmonary ischemia-reperfusion (FR) injury after cardiopulmonary bypass (CPB), and to discuss the possible mechanism. Methods: Twenty-eight male pigs were evenly randomized divided into 4 groups, namely, the sham-operation group, the CPB group (only subjected to CPB), the DADLE pretreatment group (received DADLE 1 mg · kg<sup>-1</sup> before CPB), and the Glibenclamide group (received DADLE 1 mg · kg<sup>-1</sup> and glibenclamide 1 mg · kg<sup>-1</sup> before CPB). Peak inspiratory pressure (PIP),  $PaO_2$ , and the plasma malondialdehyde (MDA) concentration were measured in each group before CPB and 10 min, 30 min, and 60 min after reperfusion. The changes of lung tissue wet weight/dry weight ratio (W/D) were calculated before CPB and 60 min after reperfusion. The animals were sacrificed 60 min after reperfusion to observe the ultrastructural changes of the lungs and to quantitatively assess lung tissue damage (LTD). Results: There were no significant differences among the 4 groups before CPB and the parameters in sham-operation group had no changes at all specified time points. One hour after reperfusion, the PIP, MDA, W/D, and LTD values in Glibenclamide and CPB groups were significantly higher than those in sham-operation and DADLE groups while the  $PaO_2$  was significantly lower ( $P<0.05$  or  $0.01$ ). There were no significant differences between parameters of sham-operation and DADLE groups except for LTD ( $P<0.05$ ). There were no significant differences between parameters of Glibenclamide and CPB groups. Histological examination demonstrated that the degree of lung injuries in sham-operation and DADLE groups were slighter than those in Glibenclamide and CPB groups. Conclusion: It suggests that DADLE may exert its protective effect on the lung through opening ATP-sensitive  $K^+$  channels, so as to alleviate the lung FR injury after CPB.

[KEY WORDS] cardiopulmonary bypass; reperfusion injury; lung; opioid

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(11): 1196-1199]

肺功能减退是体外循环(CPB)术后的主要并发症之一, 轻者影响手术疗效, 严重者威胁患者生命。肺缺血再灌注损伤是导致CPB术后肺功能下降的

[作者简介] 王亚华, 硕士, 讲师, 主治医师。

E-mail: tengdady@yahoo.com.cn

\*Corresponding author. E-mail: shixueyin1128@yahoo.com.cn



主要原因之一,因此减轻 CPB 术后肺缺血再灌注损伤是目前临床关注的重要课题之一。Murry 等<sup>[1]</sup>发现缺血预适应(ischemic precondition, IPC)能够减轻缺血再灌注损伤,而 Okubo 等<sup>[2]</sup>发现阿片肽是缺血预适应中的有益介质,且阿片肽能模拟缺血预适应的效果,因此应用外源性阿片肽(DADLE)模拟 IPC 来减轻组织的再灌注损伤得到关注。目前大部分关于 DADLE 保护作用的研究集中于心脏,国内外未见 DADLE 对在体情况下肺保护的研究。

本实验拟通过观察 DADLE 对幼猪 CPB 模型术后气道峰压(peak inspiratory pressure, PIP)、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)、血清中 MDA 含量、肺湿干重比(W/D)、肺损伤程度(lung tissue damage, L TD)以及肺泡上皮超微结构的影响,分析 DADLE 对 CPB 术后肺缺血再灌注损伤是否具有保护作用,并探讨其可能的保护机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 动物分组及处理

健康雄性幼猪 28 只,体重 25~35 kg,随机分为 4 组,每组 7 只,假手术组(Sham 组)只开胸予以主动脉及上下腔静脉插管,但不体外转流;体外循环组(CPB 模型组)除开胸建立体外循环转流外,不予任何预处理;DADLE 预处理组(DADLE 组)建立体外循环之前 1 h 给予静脉注射 DADLE 1 mg/kg,建立体外循环模型同上;Glibenclamide 阻断组(K<sub>ATP</sub>阻断组)在建立体外循环前 1 h 给予 Glibenclamide(A TP 敏感钾离子通道阻断剂)和 DADLE 各 1 mg/kg,其余同上。静脉麻醉后气管切开接呼吸机控制呼吸,纯氧吸入,呼吸参数 V<sub>T</sub> 15~20 ml/kg、RR 15 次/min,参考血气分析调节参数,丙泊酚和阿曲库铵维持麻醉。血流动力学采用 MPA 心功能分析系统监测,各组体外循环期间动脉压控制在 90 mmHg(1 mmHg=0.133 kPa)左右,CPB 模型组、DADLE 组、K<sub>ATP</sub>阻断组动物采用鼓泡式氧合器建立 CPB 模型,从心脏停跳开始计肺缺血时间,从停体外循环心脏复跳开始计肺再灌注时间,严格控制各组肺缺血和再灌注时间在 60 min。各组体外循环前后并行时间也控制在 20 min 左右。所有动物围术期体温控制在 36~38 。

### 1.2 观察指标

#### 1.2.1 动脉压(ABP)、PIP、PaO<sub>2</sub>和血清中 MDA 含量的测定

MPA 心功能监测系统监测动脉压 ABP 和心功能,于 CPB 前、再灌注 10、30、60 min 时点记录机械通气的 PIP,各组于 PIP 监测相同时间点采

集相应的动脉血标本以作血气 PaO<sub>2</sub>和血清 MDA 测定。

#### 1.2.2 肺湿干重比(W/D)

各组于 CPB 前和再灌注 60 min 时,取左肺下叶相同部位肺组织约 500 mg,称湿重后置于 60 电热恒温干燥箱内,1 周后再称取其质量,并记录 2 次结果之比。

#### 1.2.3 肺损伤程度 L TD 的计算和肺上皮细胞超微结构的观察

再灌注 60 min,取右肺下叶相同部位肺组织,置于 10%中性甲醛溶液中固定 24 h 后,行石蜡包埋切片,HE 染色后,每组随机取 5 个标本,采用双盲法,由专人在光镜下连续观察 10 个视野( $\times 100$ )的肺泡总数,肺泡中的细胞总数(红、白细胞)超过 2 个以上视为肺泡损伤,以肺泡损伤个数与肺泡总数的比值为肺泡损伤程度(L TD)的定量评价指标。同时取右肺上叶相同部位肺组织,切成 1 mm $\times$ 1 mm $\times$ 1 mm 大小,浸于电镜标本固定液中,备电镜观察肺上皮细胞超微结构。

### 1.3 统计学处理

所有测定结果采用  $\bar{x} \pm s$  描述,组间比较采用方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 ABP 和 PIP

各组 CPB 术前和再灌注后 ABP 无显著性差异。如表 1 所示,各组 CPB 术前 PIP 无显著差异,Sham 组各时间点均无显著差异;再灌注后 CPB 模型组 PIP 较 Sham 组升高( $P < 0.05$ ),DADLE 组 PIP 虽呈升高趋势但与 Sham 组无显著差异,K<sub>ATP</sub>阻断组明显高于 DADLE 组、Sham 组( $P < 0.05$ )。

### 2.2 PaO<sub>2</sub>和肺静脉血 MDA 含量

CPB 前各组间 PaO<sub>2</sub>无显著性差异,再灌注后 CPB 模型组和 K<sub>ATP</sub>阻断组均较体外循环前明显降低,明显低于 Sham 组和 DADLE 组( $P < 0.05$ ,表 1)。

肺缺血再灌注 30 min 时,CPB 模型组、DADLE 组和 K<sub>ATP</sub>阻断组的 MDA 含量与 CPB 前相比均有升高趋势。DADLE 组 MDA 的升高明显低于 CPB 模型组和 K<sub>ATP</sub>阻断组( $P < 0.05$ ),但与 Sham 组相比无显著差异。CPB 模型组与 K<sub>ATP</sub>阻断组再灌注后与 CPB 前相比差异显著,明显高于 Sham 组和 DADLE 组( $P < 0.05$ ,表 1)。

### 2.3 肺损伤程度(L TD)和肺组织湿干重比(W/D)

Sham 组几无肺损伤,DADLE 组 L TD (%)较 Sham 组严重( $15.3 \pm 4.8$  vs  $2.6 \pm 1.5$ ,  $P < 0.05$ ),但明显较 CPB 模型组( $78.2 \pm 12.6$ )和 K<sub>ATP</sub>阻断组( $75.7 \pm 10.6$ )轻( $P < 0.01$ );CPB 模型组和 K<sub>ATP</sub>阻断组之间无显著差异。

表 1 不同时间 PaO<sub>2</sub>、PIP 和 MDA 变化  
Tab 1 Changes of PaO<sub>2</sub>, PIP and MDA at different time points

(n = 7,  $\bar{x} \pm s$ )

Group	Before CPB	Reperfusion (t/ min)		
		10	30	60
Sham				
PIP (p/ mmHg)	12.50 ± 1.6	12.80 ± 1.9	12.80 ± 2.5	13.10 ± 2.0
PaO <sub>2</sub> (p/ mmHg)	537.40 ± 23.1	533.20 ± 22.9	537.50 ± 27.5	538.60 ± 23.8
MDA (CB/ nmol · ml <sup>-1</sup> )	4.15 ± 0.38	4.15 ± 0.62	4.18 ± 0.81	4.19 ± 0.85
CPB model				
PIP (p/ mmHg)	12.40 ± 1.1	18.60 ± 2.4 *	22.60 ± 3.7 *	29.50 ± 3.0 *
PaO <sub>2</sub> (p/ mmHg)	530.50 ± 22.2	256.40 ± 18.0 *	258.30 ± 21.5 *	195.80 ± 30.1 *
MDA (CB/ nmol · ml <sup>-1</sup> )	4.24 ± 0.52	4.76 ± 0.60	5.97 ± 1.10 *	9.60 ± 2.32 *
DADLE				
PIP (p/ mmHg)	13.50 ± 1.6	13.70 ± 1.5	13.90 ± 2.4	14.10 ± 2.5
PaO <sub>2</sub> (p/ mmHg)	538.00 ± 24.0	530.60 ± 20.4	525.40 ± 24.0	510.60 ± 30.6
MDA (CB/ nmol · ml <sup>-1</sup> )	4.00 ± 0.60	4.05 ± 0.92	4.25 ± 0.60	4.88 ± 0.85
Glibenclamide				
PIP (p/ mmHg)	12.10 ± 1.0	17.90 ± 2.0 *	21.90 ± 2.6 *	28.60 ± 3.0 *
PaO <sub>2</sub> (p/ mmHg)	520.40 ± 25.5	196.30 ± 22.6 *	154.80 ± 20.4 *	105.90 ± 21.6 *
MDA (CB/ nmol · ml <sup>-1</sup> )	4.31 ± 0.38	4.85 ± 0.60	5.80 ± 1.10	9.58 ± 2.10 *

\* P < 0.05 vs sham group; P < 0.05 vs Before CPB

各组转流前 W/D 无显著差异, Sham 组各时间点无显著差异。再灌注 60 min, DADLE 组的 W/D 虽然略高于 Sham 组, 但无统计学意义 (5.35 ± 0.20 vs 5.12 ± 0.14), 而 CPB 模型组 (6.85 ± 0.25) 与 K<sub>ATP</sub> 阻断组 (6.76 ± 0.28) 较 Sham 组和 DADLE 组也明显升高 (P < 0.05)。

2.4 肺上皮细胞超微结构变化 CPB 模型组和

K<sub>ATP</sub> 阻断组肺泡 Ⅱ 型细胞胞质疏松, 线粒体轻度肿胀, 部分线粒体嵴消失, 板层小体数目减少, 排空增多。而 DADLE 组肺泡 Ⅱ 型细胞染色正常, 线粒体改变不明显, 少部分板层小体排空增多, 明显轻于 CPB 模型组和 K<sub>ATP</sub> 阻断组。Sham 组肺泡 Ⅱ 型细胞染色正常, 线粒体、板层小体正常。见图 1。

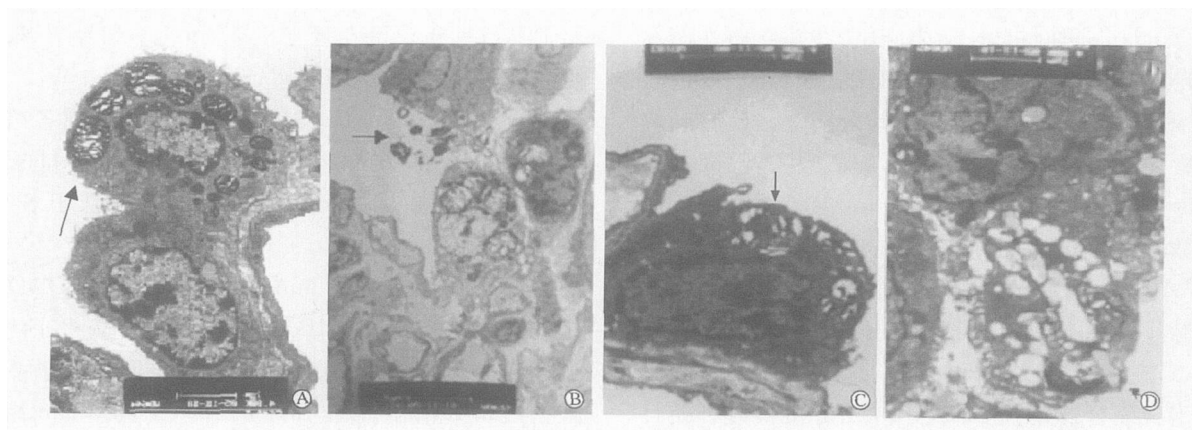


图 1 不同组肺组织透射电镜检查

Fig 1 Electron microscopic observation of pulmonary epithelial cells

A: Sham operation group (x7200); B: CPB group (x3000); C: DADLE pretreatment group (x9700); D: Glibenclamide group (x7200). Arrows indicate pulmonary epithelial cells of different groups

3 讨论

随着体外循环技术和外科学技术的进步, 体外转流后肺损伤导致术后呼吸功能减退的发生率有了明

显的下降, 但缺血再灌注损伤这一导致肺损伤的主要原因仍未能得到足够的重视, 因而预防和处理肺缺血再灌注损伤成为预防体外转流后肺损伤的主要方向。近年来发现 IPC (ischemic-precondition) 能够

减轻心、肝、肾、肌肉等组织的缺血再灌注损伤<sup>[3-5]</sup>。Murry 等<sup>[1]</sup>和 Okubo 等<sup>[2]</sup>发现 IPC 能够对缺血的器官和组织提供保护作用,且能降低 ATP 的代谢率,阿片肽可能介导了这一过程。因此采用阿片肽预处理来模拟 IPC 的类似效果受到关注。

本实验采用幼猪体外转流肺再灌注损伤模型,应用 DADLE ( $\delta_1$ -阿片受体激动剂) 预处理,探讨 DADLE 对体外转流后肺缺血再灌注损伤的作用,以摸索预防体外转流后肺再灌注损伤新途径。有研究<sup>[6]</sup>表明阿片肽的细胞保护作用可能是 ATP 敏感钾通道依赖性的,因此本研究同时观察加用 ATP 敏感钾通道阻断剂 (Glibenclamide) 后的效果,以明确 ATP 敏感钾通道与 DADLE 保护作用间的关系。

MDA 是脂质过氧化降解产物,肺缺血再灌注损伤中,氧自由基引发的脂质过氧化是肺再灌注损伤的主要因素之一<sup>[7]</sup>。本研究发现,CPB 模型组和  $K_{ATP}$  阻断组再灌注后 MDA 含量明显高于 Sham 组和 DADLE 预处理组。这可能是由于 DADLE 预处理导致 MDA 产生减少,减轻了氧自由基介导的肺损伤;而应用 Glibenclamide 后 MDA 含量升高可能是由于其关闭了 ATP 敏感钾通道而阻断了 DADLE 对肺的保护作用。这表明 ATP 敏感钾通道在 DADLE 保护作用过程中可能起重要作用。

肺组织湿干比值 (W/D) 是常用评价肺水含量及反映肺微血管损伤的指标。本实验中再灌注 60 min 后 CPB 模型组和  $K_{ATP}$  阻断组 W/D 值升高,显著高于 Sham 组和 DADLE 预处理组。这表明 CPB 模型组肺微血管通透性增加,肺损伤严重,DADLE 预处理组肺损伤轻于 CPB 模型组,DADLE 预处理能够减轻肺再灌注微血管损伤。 $K_{ATP}$  阻断组肺损伤重于 DADLE 组,提示 Glibenclamide 不同程度地阻断了 DADLE 对肺损伤的保护作用。LTD 即单位视野下渗出有红细胞和中性粒细胞的肺泡计数。本研究结果表明,DADLE 组 LTD 明显小于 CPB 模型组,DADLE 组细胞浸润轻于 CPB 模型组,而  $K_{ATP}$  阻断组在同时伍用 Glibenclamide 和 DADLE 的情况下 LTD 大于 DADLE 组, $K_{ATP}$  阻断组细胞浸润重于 DADLE 组。同时 DADLE 组肺上皮细胞超微结构改变也轻于 CPB 模型组和  $K_{ATP}$  阻断组。这些结果表明体外循环前外源性阿片肽受体激动剂 (DADLE) 预处理激动  $\delta_1$ -阿片受体 (G 蛋白耦联受体) 可能通过 G 蛋白与关联的 ATP 敏感钾通道相互作用,导致 ATP 敏感钾通道开放,从而产生肺保护作用,包括减轻缺血再灌注损伤的肺微血管通透性的增加,减少肺泡中渗出和细胞浸润。这与 Kakk

等<sup>[8]</sup>和 Grimm 等<sup>[9]</sup>研究结果一致。

本研究中 DADLE 组  $PaO_2$  明显高于 CPB 模型组和  $K_{ATP}$  阻断组而与 Sham 组相近,PIP 升高轻于 CPB 模型组而和假手术组无明显差异。这些结果提示 DADLE 可以减轻体外转流后肺缺血再灌注损伤,通过降低再灌注损伤的肺微血管通透性,减少肺泡中渗出和细胞浸润,改善肺部血液的氧合及肺顺应性,Glibenclamide 阻断了  $\delta_1$ -阿片受体依赖的 ATP 敏感钾通道,所以 DADLE 组肺顺应性和  $PaO_2$  均既明显高于 CPB 模型组和  $K_{ATP}$  阻断组。

综上所述,本研究发现通过体外循环前  $\delta_1$ -阿片受体激动剂预处理来达到预防围体外循环期间的肺损伤是一个可行的方法。DADLE 预处理可以减少肺渗出,改善肺的顺应性和血液的氧合,对体外循环后肺再灌注损伤具有保护作用,其机制可能与 ATP 敏感钾通道有关,具体机制尚待进一步探讨。

#### [参考文献]

- [1] Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium [J]. *Circulation*, 1986, 74: 1124-1136.
- [2] Okubo S, Tanabe Y, Takeda K, et al. Ischemic preconditioning and morphine attenuate myocardial apoptosis and infarction after ischemia-reperfusion in rabbits: role of delta-opioid receptor [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287: H1786-H1791.
- [3] Jassem W, Fuggle SV, Cerundolo L, et al. Ischemic preconditioning of cadaver donor livers protects allografts following transplantation [J]. *Transplantation*, 2006, 81: 169-174.
- [4] Zhu B, Min S, Long C, et al. Ischemic preconditioning in immature hearts: mechanism and compatibility with cardioplegia [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2003, 116: 253-257.
- [5] Lee HT, Emala CW. Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A(1) and A(3) receptors [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2000, 278: F380-F387.
- [6] Seymour EM, Wu SY, Kovach MA, et al. HL-1 myocytes exhibit PKC and  $K_{ATP}$  channel-dependent delta opioid preconditioning [J]. *J Surg Res*, 2003, 114: 187-194.
- [7] Yamanouchi K, Yanaga K, Okudaira S, et al. [*D*-Ala<sup>2</sup>, *D*-Leu<sup>5</sup>] enkephalin (DADLE) protects liver against ischemia-reperfusion injury in the rat [J]. *J Surg Res*, 2003, 114: 72-77.
- [8] Kakkak AK, Lefer DJ. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4: 154-158.
- [9] Grimm MC, Ben-Baruch A, Taub DD, et al. Opiate inhibition of chemokine-induced chemotaxis [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 840: 9-20.

[收稿日期] 2006-03-16

[修回日期] 2006-09-12

[本文编辑] 贾泽军