

不同剂量促红细胞生成素对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用

李晓辉, 郭光伟, 温文, 孙国栋

山西医科大学第二医院心胸外科, 山西 太原 030001

摘要: **目的** 探讨不同剂量促红细胞生成素在大鼠肺缺血再灌注时对单核细胞趋化蛋白(MCP)-1 表达的影响, 研究大鼠肺缺血再灌注损伤的机制。**方法** 将 85 只健康的雄性 Wistar 大鼠随机分为 5 组($n = 17$):缺血再灌注组(L/R), 促红细胞生成素低剂量组(L 组)、中剂量组(M 组)、高剂量组(H 组), 假手术组(S 组)。缺血前 24 h, L、M、H 组分别腹腔注射重组促红细胞生成素 1 000、3 000 和 5 000 U/kg, L/R 组注射生理盐水; 该 4 组予以阻断左侧肺门部血流 60 min, 再灌注 90 min 后(S 组只开胸不断左肺门), 处死大鼠, 取左肺标本, 观察各组中肺脏颜色、有无出血点等, 测动脉血气分析, 测量肺的湿干重比(W/D), 制作石蜡切片, 苏木精-伊红(HE)染色电镜下观察肺组织病理变化, 免疫组化染色检测肺组织中 MCP-1 的含量。**结果** 与 S 组比较, 缺血再灌注各组肺组织 MCP-1 表达水平和 W/D 值均上升(P 均 < 0.01), 动脉血 PaO_2 值下降(P 均 < 0.01), 且均以 L/R 组明显; 促红细胞生成素不同剂量组间比较, M 组肺组织 MCP-1 表达水平较 L、H 组降低(P 均 < 0.05), W/D 值较 L、H 组降低(P 均 < 0.05), 动脉血 PaO_2 值较 L、H 组上升(P 均 < 0.05)。 **结论** 不同剂量促红细胞生成素对大鼠肺缺血再灌注损伤保护作用不同, 保护作用最佳剂量为 3 000 U/kg, 该保护作用可能是通过抑制 MCP-1 介导的过度炎症反应来实现的。

关键词: 肺缺血再灌注损伤; 促红细胞生成素; 单核细胞趋化蛋白-1; 动脉血氧分压; 肺湿干重比

中图分类号: R 655.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)02-0144-04

Protective effects of different doses of erythropoietin on lung ischemia-reperfusion injury in rats

LI Xiao-hui, GUO Guang-wei, WEN Wen, SUN Guo-dong

Department of Cardiothoracic Surgery, Second Affiliated Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China

Corresponding author: GUO Guang-wei, E-mail: guohome@sina.com

Abstract: Objective To study the effect of different doses of erythropoietin (EPO) on expression of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) when lung ischemia-reperfusion injury and explore the mechanism of lung ischemia-reperfusion injury in rats. **Methods** Eighty-five healthy male Wistar rats were randomly divided into five groups ($n = 17$ each): ischemia-reperfusion group (L/R group), low dose-EPO group (L group), middle dose-EPO group (M group), high dose-EPO group (H group) and sham-operation group (S group). At 24-hour before ischemia, human recombinant erythropoietin (rhEPO) was given by intraperitoneal injection in L, M and H groups (1 000, 3 000 and 5 000 U/kg, respectively), and normal saline was given by intraperitoneal injection in L/R group. The ischemia-reperfusion rat model was established by blocking the blood flow of left lung hilum for 60 minutes then reperfusion for 90 minutes in L/R, L, M and H group. No treatment except opening thorax was given in S group. The left lung samples were taken after killing rats. The arterial blood gas analysis was assayed, and the wet / dry weight ratio (W/D) of the lung was measured. After making paraffin section and haematoxylin-eosin (HE) staining, the pathological changes of the lung tissues were observed under electronic microscope. The MCP-1 content of lung tissues was assayed by immunohistochemical method. **Results** Compared with S group, the MCP-1 expression level and the value of W/D increased significantly (all $P < 0.01$), and the arterial partial pressure of oxygen (PaO_2) decreased significantly (all $P < 0.01$) in L/R, L, M and H groups especially in L/R group. Compared with L and H groups, the MCP-1 expression level and the value of W/D decreased (all $P < 0.05$), and PaO_2 increased (all $P < 0.05$) in M group. **Conclusion** The protective effects of different doses of EPO on lung ischemia-reperfusion injury in rats might be different, and the optimal dose is 3 000 U/kg. The protective effect is achieved possibly through inhibiting excessive inflam-

matory reaction mediated by MCP-1.

Key words: Ischemia-reperfusion injury; Erythropoietin; Monocyte chemotactic protein-1; Arterial oxygen partial pressure; Lung wet/dry weight ratio

肺缺血再灌注损伤常见于肺栓塞溶栓和介入治疗、肺移植及体外循环后^[1-2],如何减轻肺缺血再灌注损伤成为临床医师关注的焦点。研究表明单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein, MCP)-1 对单核细胞具有趋化活性,激活单核细胞和巨噬细胞,使其胞浆内 Ca^{2+} 浓度升高,超氧阴离子产生和释放,并释放溶菌酶,上调单核细胞和巨噬细胞粘附分子如 integrin 家族 $\beta 2$ 组和 $\alpha 4$ 分子的表达,促进细胞因子白细胞介素(IL)-1、IL-6 的产生,是嗜碱性粒细胞的激活剂和趋化剂^[3]。在肺缺血再灌注损伤中可引起过度的炎症反应,导致肺损伤^[4-5]。促红细胞生成素(erythropoietin)是一种糖蛋白类激素,除可促进红细胞增殖和分化外,还具有调节炎症反应的作用^[6],在肺缺血再灌注损伤方面可以抑制 MCP-1 的过度表达起到一定的肺保护作用。本研究探讨不同剂量促红细胞生成素在大鼠肺缺血再灌注时对 MCP-1 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠 85 只(山西医科大学生理实验室提供),体重(200 ± 20)g,饲料为山西医科大学生理实验室全价营养饲料。

1.2 主要试剂及仪器 注射用重组人促红细胞生成素(rhEPO)(成都地奥久泓制药厂,批号:国药准字 S19991005)、兔 MCP-1 抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号:Y-B2-07C16B)、羊抗兔 IgG 型 SABC 免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BA1127)、HX-300 型动物呼吸机(上海益联医学仪器发展有限公司)。

1.3 实验分组 健康雄性 Wistar 大鼠 85 只随机分为 5 组,每组 17 只。假手术组(S 组):开左胸,未阻断左肺门;缺血再灌注组(I/R 组):术前腹腔注射 0.3 ml 生理盐水,夹闭左肺门 60 min,再灌注 90 min;低剂量治疗组(L 组):术前 24 h 腹腔注射 rhEPO 1 000 U/kg;中剂量治疗组(M 组):术前 24 h 腹腔注射 rhEPO 3 000U/kg;高剂量治疗组(H 组):术前 24 h 腹腔注射 rhEPO 5 000 U/kg,以上三组其余处理均同 I/R 组。

1.4 动物模型建立 给予健康雄性 Wistar 大鼠腹腔注射 25% 乌拉坦 4 ml/kg,麻醉完全后,尾静脉注射肝素钠 100 U/kg。游离颈部气管并行气管插管,连

接动物呼吸机,设定参数为呼吸频率 60 次/min,潮气量 8 ~ 10 ml/kg,吸呼比为 1:2,机械通气约 5 min 后,依左侧第 5 肋间进胸,游离左肺门部血管并用无创血管夹夹闭,术野盐水纱布敷盖。60 min 后打开血管夹,恢复血流再灌注 90 min。

1.5 标本的采集和检测方法 再灌注完毕后颈椎脱臼处死大鼠,采集左肺为标本。(1)经胸主动脉取血 0.5 ml 行血气分析检查。(2)取左肺下叶测湿干重比(W/D)。取左肺下叶组织用分析天平称重为湿质量(W),置于 70℃ 电热恒温干燥箱中烤 48 h 后称重为干质量(D),二者之比即为 W/D。(3)取左肺上叶石蜡包埋并切片,进行苏木精-伊红(HE)染色,电镜下观察病理变化。(4)免疫组化检测左肺上叶组织 MCP-1,应用 BN-880A 病理图文分析系统(湖北贝诺医疗科技有限公司),测定图像 OD 值。

1.6 统计学处理 数据应用 SPSS 17.0 统计分析软件进行处理。测定结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数之间比较采用完全随机资料的方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

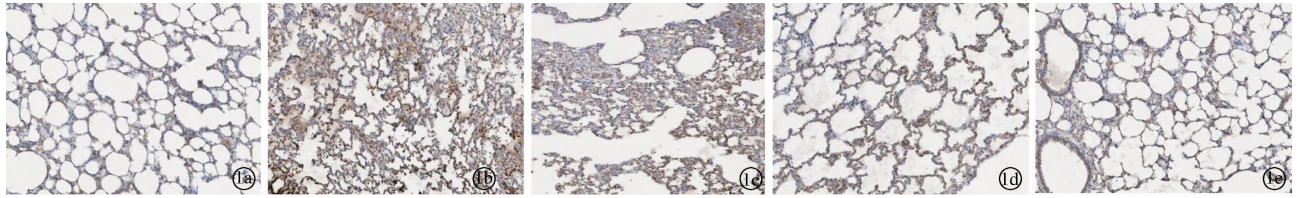
2 结果

2.1 大鼠动脉血气分析变化 缺血再灌注各组动脉血 PaO_2 降低;方差分析显示,5 组间 PaO_2 值比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。多重比较显示以 I/R 组 PaO_2 值降低最明显,S、L、M 组及 H 组 PaO_2 值明显高于 I/R 组(P 均 < 0.05);M 组高于 L 组、H 组(P 均 < 0.05);L 组与 H 组无差异($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 大鼠左肺组织 W/D 值 缺血再灌注各组肺组织水肿;方差分析显示,5 组间 W/D 值比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。多重比较显示以 I/R 组 W/D 值增高最明显,S、L、M 组及 H 组 W/D 值较 I/R 组下降(P 均 < 0.05);M 组较 L 组、H 组下降(P 均 < 0.05);L 组与 H 组无差异($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 大鼠左肺组织病理检查 S 组大鼠肺组织无明显改变;与 S 组比较,I/R 组大鼠肺间质水肿明显,毛细血管淤血严重,肺泡内可见大量红细胞,肺泡壁断裂严重,肺泡内、肺间质及毛细血管周围可见大量炎性细胞浸润;L、M 组及 H 组肺组织淤血、水肿、炎性细胞浸润较 I/R 组轻,M 组较 L、H 组上述改变更轻。

2.4 大鼠左肺组织 MCP-1 表达水平 各组免疫组化 MCP-1 表达情况见图 1。S 组可见棕色颗粒少量



注:1a:S组,MCP-1少量表达于胞浆,肺泡壁基本完整,渗出少;1b:I/R组,MCP-1大量表达于胞浆,肺泡破坏严重,渗出多;1c:L组,与I/R组相比MCP-1表达少,肺泡破坏及渗出较轻;1d:H组,与I/R组相比MCP-1表达少,肺泡轻度破坏;1e:M组,与I/R组相比MCP-1表达明显减少,肺泡较完整,渗出少。

图1 各组 MCP-1 表达情况(免疫组化染色,×100)

分布于肺泡上皮细胞、毛细血管内皮细胞及炎性细胞胞浆内;I/R组可见大量棕色颗粒分布于肺泡上皮细胞、支气管纤毛柱状上皮细胞、毛细血管内皮细胞及炎性细胞胞浆内;L、M、H组较I/R组棕色颗粒分布明显减少,其中M组较L、H组减少更为明显。缺血再灌注各组肺组织MCP-1(OD值)明显升高;5组间MCP-1表达水平比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。多重比较显示以I/R组升高最明显,S、L、M组及H组MCP-1表达水平较I/R组下降(P 均 < 0.05);M组较L组、H组下降明显(P 均 < 0.05);而L组与H组无差异($P > 0.05$)。见表1。

表1 各组肺组织 W/D 值、PaO₂ 值、MCP-1 的变化
($n = 17, \bar{x} \pm s$)

组别	W/D	PaO ₂ (mm Hg)	MCP-1 (OD 值)
S组	4.51 ± 0.11 ^a	97.47 ± 3.32 ^a	0.064 ± 0.007 ^a
I/R组	5.80 ± 0.03	68.20 ± 3.77	0.133 ± 0.012
L组	5.20 ± 0.09 ^{ab}	77.40 ± 4.72 ^{ab}	0.104 ± 0.007 ^{ab}
H组	5.19 ± 0.08 ^{ab}	77.60 ± 5.12 ^{ab}	0.106 ± 0.008 ^{ab}
M组	4.80 ± 0.08 ^a	84.50 ± 3.82 ^a	0.076 ± 0.005 ^a
<i>P</i> 值	<0.01	<0.01	<0.01

注:与I/R组比较,^a $P < 0.05$;与M组比较,^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

肺脏缺血再灌注损伤指手术中或出血性休克后,肺脏经过缺血一定时间后,再灌注血流引起的缺血性损伤加重的病理过程^[7]。损伤机制包括:氧自由基损伤,细胞内钙离子超载,炎性介质释放导致过度炎症反应等^[8]。肺组织损伤以肺毛细血管通透性增加,炎性渗出物增加,血管内皮、支气管内皮及肺泡上皮损伤,肺泡壁断裂为主,最终导致肺水肿,呼吸衰竭^[9]。促红细胞生成素是肾间质细胞生成的一种糖蛋白类激素,可促进红细胞的生成和释放。研究发现,它还可通过抗氧化凋亡、促进新生血管生成、抑制过度炎症反应的作用,在心、脑、肺、肾等脏器缺血再灌注损伤中起保护作用^[10-12]。但目前的研究并未表明对肺脏保护作用是否具有剂量相关性。MCP-1属于CC类趋化因子家族的成员,它对单核细胞、天然

杀伤细胞、树突状细胞、嗜碱性粒细胞和T淋巴细胞有趋化作用。人类MCP-1以包含23个氨基酸组成的信号肽分子的前体蛋白形式分泌,在翻译后加工过程中与信号肽解离后,完整的MCP-1由76个氨基酸残基构成。正常组织细胞中,MCP-1的来源是内皮细胞、成纤维细胞和单核细胞^[13]。实验证实,在心肌缺血再灌注损伤早期,MCP-1的表达可修复梗死的心肌,形成瘢痕组织。但随着缺血再灌注时间的推移,MCP-1可引起过度炎症反应,进而激发和加重缺血再灌注损伤。更多实验表明,MCP-1在大鼠肺缺血再灌注损伤中起重要的作用,促红细胞生成素干预后这种损伤明显减轻^[14-15]。

本实验研究表明,促红细胞生成素在大鼠肺缺血再灌注损伤过程中,可降低大鼠肺组织W/D值及MCP-1表达水平,提高PaO₂值,电镜下观察病理变化显示其可改善肺组织损伤程度;不同剂量比较,以中剂量组效果最佳。上述研究结果说明,促红细胞生成素改善大鼠肺缺血再灌注损伤,以3000 U/kg剂量最佳。可推测促红细胞生成素在肺缺血再灌注损伤保护方面,是通过抑制MCP-1介导的过度炎症反应来实现的。

参考文献

- [1] 苗锋,陈刚,陈志明,等. 乌司他丁对大鼠肺脏热缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 复旦学报(医学版),2010,37(4):434-436.
- [2] Young RW. Prevention of lung injury in cardiac surgery: a review [J]. J Extra Corpor Technol,2014,46(2):130-141.
- [3] 许春芳,吴爱荣,陈卫昌,等. 趋化因子MCP-1、MIP-2在急性胰腺炎相关肺损伤中的作用[J]. 中华急诊医学杂志,2008,17(3):271-275.
- [4] Granton J. Update of early respiratory failure in the lung transplant recipient [J]. Curr Opin Crit Care,2006,12(1):19-24.
- [5] de Perrot M, Liu M, Waddell TK, et al. Ischemia reperfusion-induced lung injury [J]. Am J Respir Crit Care Med,2003,167(4):490-511.
- [6] Wu H, Dong G, Liu H, et al. Erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion induced lung injury by inhibiting tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase-9 expression [J]. Eur J Pharmacol,2009,602(2-3):406-412.

- [7] Mohseni M, Ziaefard M, Abbasi Z. Protection against ischemia-reperfusion injury in prolonged resuscitation: a case report and review of literature[J]. ARYA Atheroscler, 2014, 10(4): 227-229.
- [8] 孙加源, 白春学. 肺移植后缺血再灌注损伤发病机制的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2006, 26(2): 129-133.
- [9] Zhao W, Zhou S, Yao W, et al. Propofol prevents lung injury after intestinal ischemia-reperfusion by inhibiting the interaction between mast cell activation and oxidative stress[J]. Life Sci, 2014, 108(2): 80-87.
- [10] Wang R, Wu X, Liang J, et al. Intra-artery infusion of recombinant human erythropoietin reduces blood-brain barrier disruption in rats following cerebral ischemia and reperfusion[J]. Int J Neurosci, 2014 Oct 22. [Epub ahead of print].
- [11] Shimoda M, Sawada T, Iwasaki Y, et al. Erythropoietin strongly protects the liver from ischemia-reperfusion injury in a pig model[J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56(90): 470-475.
- [12] Wu H, Ren B, Zhu J, et al. Pretreatment with recombinant human erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury in rats[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2006, 29(6): 902-907.
- [13] Bisschops L, van der Hoeven JG, Mollnes TE, et al. Seventy-two hours of mild hypothermia after cardiac arrest is associated with a lowered inflammatory response during rewarming in a prospective observational study[J]. Crit Care, 2014, 18(5): 546.
- [14] 丁璐, 吴本清, 黄进洁, 等. 重组人促红细胞生成素对新生大鼠高体积分数氧肺损伤的防治效果[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(6): 431-433.
- [15] Shang Y, Li X, Prasad PV, et al. Erythropoietin attenuates lung injury in lipopolysaccharide treated rats[J]. J Surg Res, 2009, 155(1): 104-110.

收稿日期: 2014-09-29 修回日期: 2014-10-15 编辑: 石嘉莹

(上接第 143 页)

- [8] 陈绪军, 肖琦, 艾中立, 等. 肝细胞损伤, 细胞凋亡及肝细胞保护(文献综述)[J]. 国外医学外科学分册, 2000, 27(1): 21-24.
- [9] Lancel S, Petillot P, Favory R, et al. Expression of apoptosis regulatory factors during myocardial dysfunction in endotoxemic rats[J]. Crit Care Med, 2005, 33(3): 492-496.
- [10] Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction[J]. Crit Care Med, 1999, 27(7): 1230-1251.
- [11] Sheridan RL, Prelack K, Yu YM, et al. Short-term enteral glutamine does not enhance protein accretion in burned children: a stable isotope study[J]. Surgery, 2004, 135(6): 671-678.
- [12] Wernerman J. Glutamine to intensive care unit patients[J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2003, 27(4): 302-303.
- [13] Yin HY, Wei JR, Zhang R, et al. Effect of Glutamine on caspase-3 mRNA and protein expression in the myocardium of rats with sepsis[J]. Am J Med Sci, 2014, 348(4): 315-318.
- [14] de Oliveira GP, Silva JD, de Araújo CC, et al. Intravenous glutamine administration reduces lung and distal organ injury in malnourished rats with sepsis[J]. Shock, 2014, 41(3): 222-232.
- [15] Hu YM, Yeh CL, Pai MH, et al. Glutamine administration modulates lung $\gamma\delta$ T lymphocyte expression in mice with polymicrobial sepsis[J]. Shock, 2014, 41(2): 115-122.
- [16] 付小兵, 杨银辉, 孙同柱, 等. 缺血-再灌注诱导 bcl-2 基因表达及其对肠道细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 459-461.

收稿日期: 2014-11-14 修回日期: 2014-11-26 编辑: 石嘉莹