

## • 研究报告 •

## 左旋精氨酸对实验性肺缺血-再灌注损伤中内皮素和降钙素基因相关肽的影响

王万铁 徐正衿 吴成云 涂军伟 陈锡文 方周溪

【关键词】 缺血-再灌注损伤,肺; 内皮素; 降钙素基因相关肽; 左旋精氨酸

本实验拟在建立兔肺缺血-再灌注损伤 (pulmonary ischemia/reperfusion injury, PIRI) 动物模型上, 观察血浆内皮素 (endothelin, ET) 含量、降钙素基因相关肽 (calcitonin gene related peptide, CGRP) 水平及肺组织形态学的改变, 了解左旋精氨酸 (L-arginine, L-Arg) 对它们的影响, 以探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方

1.1 动物模型制备: 雄性日本大耳白兔 30 只, 体重 2.0~2.8 kg。氨基甲酸乙酯 1.0 g/kg 静脉麻醉, 气管切开插管呼吸机给纯氧, 通气频率 30~40 次/min, 潮气量在双侧肺通气时为 15~20 ml/kg, 单侧肺通气时为 8~10 ml/kg, 吸:呼为 1:1.25。分离一侧颈外静脉并插管, 生理盐水 0.5~1.5 ml/min 静脉滴注 (静滴) 维持。在左侧第 4 肋和第 5 肋间开胸, 左肺门游离后留置阻断带, 静脉注射肝素抗凝。按 Sekido 等<sup>[1]</sup> 方法复制在体兔肺缺血-再灌注模型, 即用结扎法完全阻断左肺门血管和支气管, 一定时间后恢复其血供和通气。

1.2 实验分组: 随机将实验兔分为 3 组 (n=10)。①假手术对照组 (Sham, S 组); 左肺门游离后过阻断带, 观察 150 min; ②肺缺血-再灌注组 (I/R 组), 过阻断带后观察 30 min, 继而阻断左肺门 60 min, 然后开放再灌注 60 min; ③肺缺血-再

灌注加 L-Arg 治疗组 (L-Arg 组), 于缺血前 20 min 静脉给予 L-Arg 溶液 100 mg/kg (50 mg/ml, Sigma 公司), 余同 I/R 组。

1.3 指标检测及方法: 3 组动物分别在开胸前 (T0)、缺血 60 min (T1) 及再灌注 60 min (T2) 自颈外静脉取血, 采用放射免疫法测定 ET 含量和 CGRP 水平。两种试剂盒分别购自解放军总医院东亚免疫技术研究所及北京北免东雅生物技术研究所, 测定步骤按试剂盒说明书要求。

1.4 肺组织形态学检查: 取左肺下叶约 1 cm×1 cm×1 cm 大小组织块, 用体积分数为 4% 的多聚甲醛固定, 予常规石蜡包埋、切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色, 光镜下观察。用体积分数为 2.5% 的戊二醛固定, 体积分数为 1% 的锇酸后固定, 乙醇-丙酮系列梯度脱水后用 Epon 812 包埋, LKB-V 型超薄切片机制片, H-600 型透射电镜观察。

1.5 统计学处理: 所有数据以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用方差分析及 t 检验, P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 3 组动物 PIRI 时血浆 ET 含量变化 (表 1): 缺血前 3 组血浆 ET 含量差异均无显著性。PIRI 期间, I/R 组 ET 明显升高, 与 S 组相应时间点各值比较, 差异均有显著性 (P 均<0.01); L-Arg 组

ET 轻度增高, 与 S 组相应时间点各值比较, 差异均无显著性 (P 均>0.05), 与 I/R 组相应时间点各值比较, 差异也均有显著性 (P 均<0.01)。

2.2 3 组动物 PIRI 时血浆 CGRP 水平变化 (表 1): 缺血前 3 组动物血浆 CGRP 水平差异均无显著性。PIRI 期间, I/R 组 CGRP 明显下降, 与 S 组相应时间点各值比较, 差异均有显著性 (P 均<0.05); L-Arg 组 CGRP 无明显变化, 与 S 组相应时间点各值比较, 差异均无显著性 (P 均>0.05), 与 I/R 组相应时间点各值比较, 差异也均有显著性 (P 均<0.05)。

2.3 3 组动物 PIRI 时血浆 CGRP 与 ET 间的关系: 直线相关分析显示, 开胸前、肺缺血 60 min 及再灌注 60 min, CGRP 与 ET 之间存在着明显负相关关系 ( $r_1 = -0.367, P < 0.05; r_2 = -0.456, P < 0.05; r_3 = -0.572, P < 0.01$ )。

## 2.4 肺组织形态学改变

2.4.1 光镜: S 组肺间质及肺泡较完整, 未见炎症细胞浸润; I/R 组肺不张伴肺气肿, 肺间质增宽水肿, 炎症细胞浸润, 肺泡内有较多血液成分渗出, 损伤明显; L-Arg 组肺损伤明显减轻, 炎症细胞浸润少, 肺泡较完整。

2.4.2 电镜: I/R 组肺内微小动脉内皮细胞胞浆内吞饮小泡增多, 线粒体水肿甚至空泡化, 内膜下基底膜水肿、空泡变

表 1 3 组动物 PIRI 时血浆 ET 和 CGRP 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物数 (只)	ET (ng/L)			CGRP (mg/L)		
		T0	T1	T2	T0	T1	T2
S 组	10	93.31±22.26	93.60±22.07	92.12±13.89	35.06±10.52	36.43±10.13	35.48±8.77
I/R 组	10	91.87±15.58	147.20±26.36**	142.00±24.98**△△	34.48±5.36	25.08±8.38**△	24.06±7.14**△
L-Arg 组	10	92.60±15.10	110.21±26.73*▲▲	106.57±24.88▲▲	35.52±6.15	38.18±12.26▲	33.78±13.76▲

注: 与本组 T0 比较: \*P<0.05, \*\*P<0.01; 与 S 组相应时间点比较: △P<0.05, △△P<0.01; 与 I/R 组相应时间点比较: ▲P<0.05, ▲▲P<0.01

基金项目: 浙江省跨世纪学术和技术带头人培养基金资助 (992086); 温州市“551 人才工程”培养基金 (98113); 浙江省教育厅科研基金资助项目 (20000670)

作者单位: 325027 浙江 温州, 温州医学院病理生理学教研室 (王万铁, 徐正衿, 吴成云, 涂军伟); 实验动物中心 (陈锡文); 电镜室 (方周溪)

作者简介: 王万铁 (1963-), 男 (汉族), 浙江省温州市人, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事脏器缺血-再灌注损伤发生机制及防治的研究, 著书 2 部, 发表科研论文 120 余篇, 曾获浙江省科技优秀奖, 中医药科技进步一等奖, 教育厅科技进步二、三等奖, 卫生厅科技进步二、三等奖, 温州市科技进步二等奖及全国医药卫生优秀成果一等奖等。

性,内皮细胞悬空,毛细血管腔内中性粒细胞堵塞,Ⅱ型上皮细胞线粒体肿胀,板层小体减少(图1)。L-Arg 组肺内微小动脉内皮结构基本正常,内皮外基底膜完整,内皮细胞间连接致密,Ⅱ型上皮细胞形态结构无异常,微绒毛无脱落,肺泡隔内未见中性粒细胞浸润,毛细血管腔内有少许中性粒细胞黏附和浸润(图2)。



图1 I/R 组左肺组织超微结构的改变  
(醋酸铀-柠檬酸铅双染,×12 000)



图2 L-Arg 组左肺组织超微结构的改变  
(醋酸铀-柠檬酸铅双染,×10 000)

### 3 讨论

本研究结果显示,I/R 组肺组织形态学结构发生明显异常改变;用 L-Arg 后,肺组织形态学异常改变显著减轻。表明 L-Arg 对 PIRI 肺具有一定的保护作用。ET 和 CGRP 作为内皮系统依赖的收缩和舒张因子,在生理条件下处于动态平衡,病理情况下其分泌量发生变化,从而介导了病理过程。从表 1 得知,PIRI 期间血浆 ET 水平明显升高,同时伴随 CGRP 水平显著降低,显著高于及低于 S 组;且 ET 与 CGRP 呈显著负相关,并随时间延长其相关性逐渐增强。反映 PIRI 后机体产生了大量的 ET,并且消耗机体原有的一部分 CGRP 以拮抗 ET。提示 ET 是机体在某些病理状态下产生的一种内源性损伤因子,而 CGRP 是内源性 ET 拮抗剂<sup>[2]</sup>。

同时还发现,使用 L-Arg 后动物血浆 ET 值明显降低,CGRP 含量显著增高,与 I/R 组比较差异有显著性。表明 L-Arg 能促使 PIRI 机体分泌 CGRP,并抑制 ET 生成,即 L-Arg 具有 ET 拮抗效应<sup>[3]</sup>。我们认为 L-Arg 可刺激组织细胞释放大量 CGRP 进入血液循环,同时减少 ET 的合成与分泌,阻断 ET 与 CGRP 比例失衡,改善肺循环障碍。当然,L-Arg 尚可通过提高机体一氧化氮(NO)水平<sup>[4]</sup>,间接抑制中性粒细胞及血小板黏附、聚集<sup>[5,6]</sup>;或间接抑制黄嘌呤氧化酶,减少超氧阴离子产生<sup>[7]</sup>;或使其与超氧阴离子等结合,形成无毒代谢产物 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>,从而使肺组织避免氧自由基的损害,有效地减轻 PIRI;或通过直接抑制肺组织脂质过氧化反应<sup>[8,9]</sup>,有效地防治 PIRI。

### 参考文献:

- 1 Sekido N, Mukaida N, Harada A, et al. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by amonoclonal antibody against interleukin - 8 [J]. Nature, 1993, 365: 654 - 657.
- 2 谭敦勇,姚兴海,赵东,等.降钙素基因相关肽对内皮素释放的影响[J].中国病理生理杂志,1994,19:545 - 547.
- 3 曾志羽,易忠,李醒三,等.左旋精氨酸冠状静脉逆行灌注对猪心肌缺血损伤的保护作用[J].心肺血管病杂志,2001,20: 109 - 112.
- 4 吴成云,徐正价,王万铁,等.左旋精氨酸对兔肺缺血-再灌注损伤的保护作用[J].温州医学院学报,2003,33:85 - 88.
- 5 Kubes P, Suzuki M, Granger D N. Nitric oxide, an endogenous modulator of leukocyte adhesion [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 4651 - 4655.
- 6 王万铁,林丽娜,潘雪蓉,等.左旋精氨酸对肝缺血-再灌注损伤时血小板聚集功能的影响[J].中国危重病急救医学,2004, 16: 49 - 51.
- 7 Fukabori M, Ichimori K, Ishida H, et al. Nitric oxide reversibly suppresses xanthine oxidase activity [J]. Free Radical Res, 1994, 21: 203 - 212.
- 8 Rubbo H, Radi R, Trujillo M, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives [J]. J Biol Chem 1994, 269: 26066 - 26075.
- 9 王万铁,王卫,徐正价,等.肝缺血-再灌注损伤中脂质过氧化反应及左旋精氨酸的干预作用[J].中国危重病急救医学,2003, 15: 91 - 93.

(收稿日期:2004-11-30)

修回日期:2005-05-23)

(本文编辑:李银平)

### • 启事 •

## 第一届亚太急危重症学术大会会议通知

第一届亚太急危重症学术大会(APCEC)由亚太急危重症学术联盟、全军急救医学专业委员会、北京医学会急诊医学专业委员会联合主办,中华急诊医学杂志社、中国急救医学杂志社、中国危重病急救医学杂志社、中国全科医学杂志社、岭南急诊医学杂志社协办,将于2005年7月9-11日在北京中苑宾馆(暂定)召开。本次大会将成为2005年亚太地区急危重症领域的一次高水平盛会,邵孝铨、王一镗、王佩燕、樊寻梅、沈洪、Peter M. Hill 等专家将在大会上针对本学科的新进展、新技术进行讲座和演示,同时进行广泛深入的学术及经验交流。内容主要涉及心脑血管急症、外伤、危重症监护、中毒、灾害、感染、院前急救等5个专题的40个热点问题,充分体现互动性,突出实用性、可操作性。参加此次大会的代表将获得国家级 I 类继续医学教育学分。

大会组委会联系人:白雪;地址:北京市丰台区芳城园一区17号楼A座1603室(组委会);邮编:100078;电话:8610-58075088、58075099-101或102;传真:8610-58075138;电子信箱:APCEC\_essay@163.com

(全军急救医学专业委员会,亚太急危重症学术大会组委会)