

丙泊酚对大鼠肠缺血-再灌注后肺细胞间黏附分子-1 蛋白表达的影响

胡晓敏 吕阳 姚尚龙

【摘要】目的 研究丙泊酚对大鼠肠缺血-再灌注(I/R)后肺细胞间黏附分子-1(ICAM-1)蛋白表达的影响。**方法** SD大鼠随机分为4组($n=8$):①I/R组:暴露腹腔后夹闭肠系膜上动脉(SMA)1 h,开放再灌注2 h;②丙泊酚预处理组(P1组):肠缺血前10 min给予丙泊酚;③丙泊酚治疗组(P2组):肠再灌注前10 min给予丙泊酚;④假手术组:仅暴露SMA,不行肠I/R及丙泊酚输注。丙泊酚剂量为首剂10 mg/kg,然后以 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 持续输注。所有动物于再灌注2 h处死,检测血浆和肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)及肺组织MPO含量,免疫组化染色检测肺组织ICAM-1蛋白的表达。**结果** 肠I/R后动物血浆和肺组织TNF- α 含量及肺组织MPO含量、ICAM-1蛋白表达均增加。丙泊酚可以抑制上述改变,以P1组效果最明显,其中血浆TNF- α 及肺组织ICAM-1表达在I/R组和P1组间存在显著性差异(P 均 <0.05),而P2组上述各指标显著高于假手术组。**结论** ICAM-1在肠I/R后肺损伤的发生中发挥重要作用。肠I/R早期应用丙泊酚可减少肺组织ICAM-1表达,在一定程度上减轻肺损伤。

【关键词】 缺血-再灌注损伤; 肠; 肺损伤; 凋亡; 细胞间黏附分子; 细胞因子; 丙泊酚

Propofol reduces intercellular adhesion molecular - 1 expression in lung injury following intestinal ischemia/reperfusion in rats HU Xiao-min, LÜ Yang, YAO Shang-long. Department of Anesthesiology, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, Hubei, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of propofol on intercellular adhesion molecular - 1 (ICAM-1) expression in the lung tissue following intestinal ischemia/reperfusion(I/R) in rats. **Methods** SD rats were randomly divided into 4 groups ($n=8$ in each group). ①Group I/R in which rats were subjected to 1 hour of occlusion of the superior mesenteric artery (SMA), followed by 2 hours of reperfusion. ②Early treatment group (group P1), rats were subjected to the same procedure as group I/R with the additional administration of propofol beginning 10 minutes before ischemia with 10 mg/kg loading dose, followed by continuous infusion at $10 \text{ mg}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. ③Treatment group (group P2), rats were subjected identical insult as in group I/R with the administration of propofol started 10 minutes before reperfusion with 10 mg/kg loading dose, followed by continuous infusion at $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. ④Sham-operation group, rats were subjected to laparotomy only, but received normal saline at $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. At the end of reperfusion, all animals were sacrificed. The activity of myeloperoxidase (MPO) and the content of tumor necrosis factor - α (TNF - α) were determined in the lung tissue, and plasma TNF - α content was also quantified. The ICAM - 1 expression in pulmonary endothelium was assessed by histochemical staining. **Results** All animals subjected to intestinal I/R demonstrated an increase in TNF - α in plasma and lung tissue, MPO activity and ICAM - 1 expression in lung tissue. It was much more pronounced in I/R group. Plasma TNF - α content was increased significantly in group I/R and P2. All the increase was less in quantity in the early treatment group of propofol than the other two groups, and there was significant difference in contents of plasma TNF - α and ICAM - 1 expression in lung between group I/R and group P1 (both $P < 0.05$). **Conclusion** ICAM - 1 plays an important role in lung injury after intestinal I/R. The early treatment of propofol before intestinal I/R may be beneficial by reducing ICAM - 1 expression in lung injury.

【Key words】 intestinal ischemia/reperfusion; lung injury; apoptosis; intercellular adhesion molecular - 1; cytokines; propofol

肠缺血-再灌注(I/R)损伤普遍存在于创伤救

治过程中^[1]。肠道缺血除损伤肠组织本身外,还对远隔器官如肺、肾、肝、脑等造成继发损害,其机制错综复杂。目前普遍认为,白细胞-内皮细胞黏附造成微血管损伤是I/R后发生多器官功能障碍的主要原因^[2,3]。黏附分子在多型核白细胞(PMN)与血管内皮细胞相互作用中起重要作用,细胞间黏附分子-1

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271255)

作者单位:430022 武汉,华中科技大学同济医学院附属协和医院麻醉科

作者简介:胡晓敏(1971-),女(汉族),湖北省大冶人,医学硕士,主治医师,主要从事麻醉及重症监护治疗与复苏临床和相关研究。

(ICAM-1)是参与白细胞与血管内皮细胞黏附的主要黏附分子。本研究拟通过夹闭大鼠肠系膜上动脉(SMA),复制大鼠肠 I/R 模型,研究丙泊酚是否对肺组织血管内皮细胞上 ICAM-1 蛋白表达和肺组织 PMN 浸润聚集产生影响。

1 材料和方法

1.1 试剂:丙泊酚注射液(10 mg/ml,英国阿斯利康公司),ICAM-1 单克隆抗体(美国 Santa cruz 公司),过氧化物酶标记的链霉卵白素(streptavidin/ peroxidation, SP)染色试剂盒及 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(北京中山生物技术公司),髓过氧化物酶(MPO)及考马斯亮蓝试剂盒(南京建成生物工程研究所),肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附(ELISA)试剂盒(深圳晶美生物工程有限公司),其他试剂均为进口分装生物学级或国产分析纯试剂。

1.2 动物模型建立:以质量分数为 20%的乌拉坦 1 g/kg 腹腔注射麻醉后,仰卧固定于操作板上,分别暴露左侧颈内动脉及右侧颈内静脉。行颈内动脉穿刺监测平均动脉压,颈内静脉穿刺置管用于输液。肝素(2 mg/kg)全身抗凝。无菌操作开腹,分离 SMA 15 min 后,用小动物血管夹夹闭 SMA 1 h,然后开放 SMA,开放后 2 h 活杀。

1.3 动物分组:SD 大鼠 32 只,雌雄各半,体重为 230~300 g,手术前禁食 12 h,自由饮水。大鼠随机分为 4 组,每组 8 只:①肠 I/R 组:肠缺血 1 h,再灌注 2 h;②丙泊酚预处理组(P1 组):大鼠肠 I/R 前 10 min 静注丙泊酚 10 mg/kg,后持续静注丙泊酚 10 mg·kg⁻¹·h⁻¹,余处理同肠 I/R 组;③丙泊酚治疗组(P2 组):大鼠肠再灌注前 10 min 静注丙泊酚 10 mg/kg,后持续静注 10 mg·kg⁻¹·h⁻¹,余处理同肠 I/R 组;④假手术组:仅暴露腹腔,不行 SMA 夹闭,余处理同 I/R 组。在实验过程中,所有大鼠均以生理盐水 10 mg·kg⁻¹·h⁻¹持续输注。

1.4 标本制备:抽取全血,4℃、10 000 r/min 离心 5 min 后保留血浆待测。动物处死后立即打开胸腔,切取部分右下肺组织,冰盐水漂净,滤纸吸干,部分立即分装液氮冻存,部分经体积分数为 4%的中性多聚甲醛固定后行免疫组化染色,检测 ICAM-1 蛋白的表达。

1.5 检测指标

1.5.1 肺组织蛋白、MPO 的测定:操作严格按试剂盒说明书进行。

1.5.2 血浆及肺组织 TNF- α 含量的测定:采用双

抗夹心 ELISA 法,按照试剂盒说明书进行,结果以每克蛋白所含 TNF- α 含量表示。肺组织 TNF- α 含量(ng/g)=组织匀浆 TNF- α 含量/组织匀浆蛋白含量。

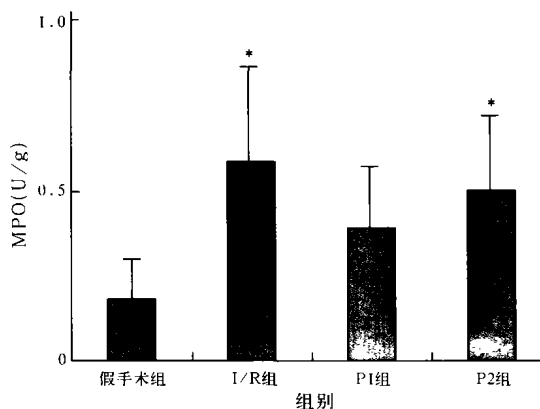
1.5.3 肺组织 ICAM-1 蛋白的表达:采用免疫组化染色法。石蜡切片脱蜡入水,质量分数为 3%的过氧化氢孵育,37℃、10 min,以消除内源性过氧化物酶的活性;蒸馏水冲洗,用磷酸盐缓冲液(PBS)浸泡 5 min;滴加封闭用正常血清工作液,室温孵育 15 min,倾去;滴加 1:50 稀释的抗大鼠 ICAM-1 单克隆抗体,4℃过夜;PBS 冲洗,3 min,3 次;滴加生物素化二抗工作液,37℃孵育 15 min,PBS 冲洗,3 min,3 次;滴加辣根酶标记的 SP 工作液,PBS 冲洗,3 min,3 次;DAB 显色,自来水冲洗,复染,封片,在光镜下观察。以 PBS 代替一抗进行孵育作为阴性对照。

结果判断:显微镜下观察,胞浆呈棕黄色着色为 ICAM-1 表达阳性的内皮细胞。20×15 光镜下进行光学显微摄影。20×20 光镜下随机选取 5 个非重叠视野计数阳性细胞,取其平均值。

1.6 统计学分析:采用 SPSS 11.0 统计软件进行统计学处理。所有数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示采用单因素方差分析(one-way ANOVA)比较组间差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 MPO 含量(图 1):与假手术组相比,模型动物肠 I/R 后肺组织 MPO 含量增加,在 I/R 组和 P2 组有显著性差异。丙泊酚能降低 MPO 含量,以 P1 组效果明显。



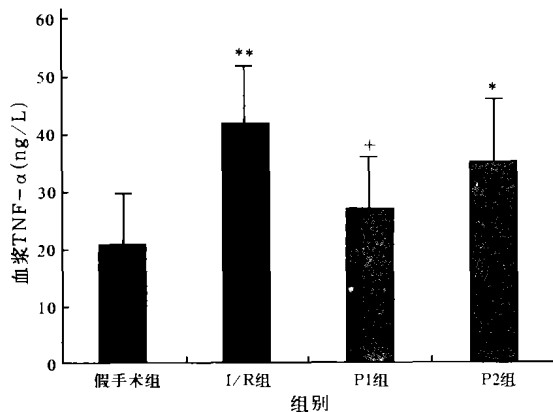
注:与假手术组比较;* $P<0.01$

图 1 各组肺组织 MPO 含量

Figure 1 Content of MPO in lung tissue in each group

2.2 血浆及肺组织 TNF- α 水平(图 2,图 3):与假手术组相比,模型动物肠 I/R 后血浆和肺组织中

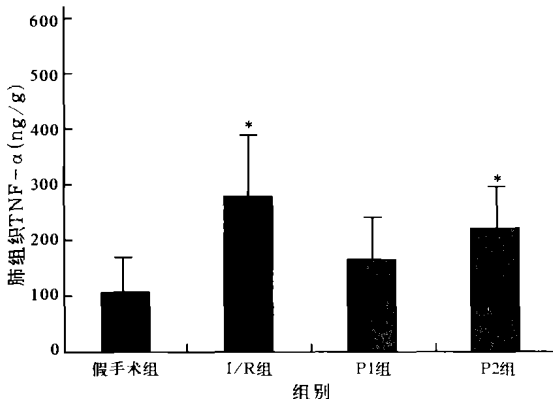
TNF- α 含量均增加,在 I/R 组和 P2 组均有显著性差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。使用丙泊酚后血浆 TNF- α 含量有所下降,其中 P1 组效果最明显,与 I/R 组比较差异有显著性($P < 0.05$)。



注:与假手术组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;
与 I/R 组比较: + $P < 0.05$

图 2 各组血浆 TNF- α 水平

Figure 2 Contents of plasma TNF- α in each group



注:与假手术组比较: * $P < 0.05$

图 3 各组肺组织 TNF- α 含量

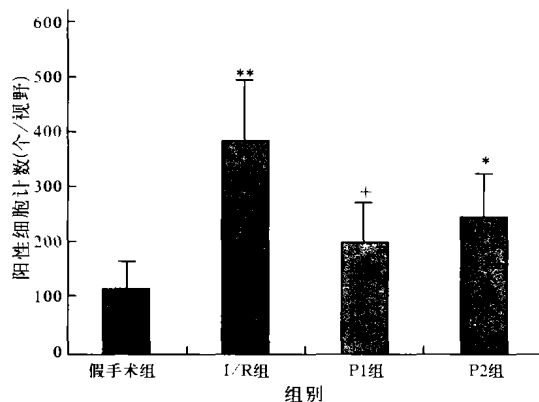
Figure 3 Contents of TNF- α in lung tissues in each group

2.3 肺组织 ICAM-1 蛋白的表达(图 4, 彩色插图 5):显微镜下观察,对照组极少见胞浆呈棕黄色着色的 ICAM-1 蛋白表达阳性内皮细胞。肠 I/R 后肺组织 ICAM-1 蛋白表达阳性的内皮数量明显增加,与假手术组比较,I/R 组和 P2 组有显著性差异,但 P1 组差异不显著,且 P1 组较 I/R 组显著降低。说明 P1 组降低 ICAM-1 蛋白表达效果显著。

3 讨论

MPO 是中性粒细胞特有的还原酶,细胞内含量稳定,通过分析单位肺组织的 MPO 活性,可间接反映中性粒细胞的数量。本研究发现,肠 I/R 后大鼠肺组织 MPO 活性较对照组显著增加,说明肠 I/R 后中性粒细胞在肺内的数量明显增加。

肠 I/R 损伤是常见的外科情况,且普遍存在于



注:与假手术组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;
与 I/R 组比较: + $P < 0.05$

图 4 肺组织 ICAM-1 蛋白表达阳性细胞计数

Figure 4 ICAM-1 positive cell number in lung tissue

各种危重症的救治过程中。肠道是创伤后全身炎症反应的始动器官,肠道黏膜是创伤的易损靶器官,创伤后肠道屏障的损害可以引发肠道菌群移位和内毒素血症,产生全身炎症反应综合征,还可能对其他脏器造成继发性损伤,甚至导致多器官功能衰竭,使创伤后感染率和病死率增加。肠 I/R 后产生局部及远隔器官损害,其中最常见的是肺损伤,且往往出现较早^[3]。关于肺损伤发生的机制仍未完全阐明,其中激活的白细胞在肺内大量聚集是导致肺损伤性炎症反应发生发展中的重要步骤。在白细胞炎性部位浸润过程中,细胞黏附分子的作用是人们研究的重点,其中免疫球蛋白超家族中的重要黏附分子 ICAM-1 在白细胞-内皮细胞的黏附中就发挥了重要的作用,其与白细胞表面的淋巴细胞功能相关抗原-1 结合后,可以使白细胞牢固地黏附于内皮细胞上,为白细胞移行创造条件。本研究结果显示,肠 I/R 后动物肺组织表达 ICAM-1 显著增加,说明此时肺损伤与 ICAM-1 上调有关。

白细胞-内皮细胞的黏附所造成的微血管损伤是 I/R 后器官损伤的关键^[4]。白细胞通过花生四烯酸代谢产物等大量活性物质损伤肺毛细血管内皮,使毛细血管通透性增加,间质水肿,造成广泛而严重的肺损伤。PMN 还可以通过诱导释放炎症介质而激活补体、凝血和纤维蛋白溶解系统,诱发炎症介质的释放,产生瀑布级联反应,造成恶性循环。

本研究中肠 I/R 动物使用丙泊酚后,肺组织 ICAM-1 蛋白表达降低,MPO 含量减少,在肠 I/R 前给予丙泊酚效果更明显。提示使用丙泊酚,尤其是早期使用丙泊酚,可减少肺组织内皮细胞 ICAM-1 的产生,抑制白细胞与内皮细胞的黏附,减少肺组织

中性粒细胞的浸润聚集。

各种原因导致的氧自由基(ROS)增加可通过 ROS 敏感性转录因子来上调 ICAM-1 的基因表达^[5]。研究证实丙泊酚具有较强的抗氧化作用^[6,7], 可能通过减轻肠 I/R 后肠及肺组织过度氧化应激, 降低肺组织中由于 ROS 增加所致的 ICAM-1 基因表达上调, 从而减轻由于白细胞-内皮细胞黏附所造成的组织损伤。

本研究结果还显示, 大鼠肠 I/R 后血及肺组织中 TNF- α 显著增加, 丙泊酚可减轻这种变化。TNF- α 是机体产生的早期炎症反应细胞因子之一, TNF- α 与其受体结合后通过多种细胞通路激活转录因子, 使单核-巨噬细胞分泌大量炎症细胞因子, 出现细胞因子的级联反应。同时, TNF- α 可促进内皮细胞表达黏附分子, 使中性粒细胞出现吞噬活性, 释放蛋白水解酶和 ROS, 造成血管内皮损伤^[8,9]。Koksoy 等^[2]研究发现, 注射 TNF- α 单克隆抗体可减少肺 ICAM-1 表达, 减轻肠 I/R 后肺损伤。我们推测, 使用丙泊酚后能使肠 I/R 动物肺 ICAM-1 表达下降的原因与丙泊酚能够有效抑制 TNF- α 的升高有关。

肠 I/R 后肠损伤导致内毒素移位, 内毒素大量进入血循环后可刺激肺巨噬细胞释放炎症细胞因子^[10]。使用丙泊酚可减轻肠 I/R 后肠损伤, 减少内毒素移位, 避免内毒素大量进入血循环后刺激肺巨噬细胞释放白细胞介素-1(IL-1)、TNF- α 等炎症细胞因子, 从而抑制肠 I/R 后肺组织中 ICAM-1 的表达增加, 减轻中性粒细胞在肺内浸润聚集所造成的炎症损伤。

参考文献:

- 1 常建星, 陈双, 符玉茹, 等. 大鼠失血性休克复苏早期肠黏膜损伤与修复的形态学观察[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16, 477-480.
- 2 Koksoy C, Kuzu M A, Kuzu I, et al. Role of tumor necrosis factor in lung injury caused by intestinal ischemia-reperfusion[J]. Br J Surg, 2001, 88: 464-468.
- 3 Adams C A Jr, Sambol J T, Xu D Z, et al. Hemorrhagic shock induced up-regulation of P-selectin expression is mediated by factors in mesenteric lymph and blunted by mesenteric lymph duct interruption[J]. J Trauma, 2001, 51: 625-631.
- 4 Seekamp A, Warren J S, Remick D G, et al. Requirements for tumor necrosis factor- α and interleukin-1 in limb ischemia/reperfusion injury and associated lung injury[J]. Am J Pathol, 1993, 143: 453-463.
- 5 Kwo-Yih Y, Mary Y, Jinathan G, et al. Rapid activation of NF- κ B and AP-1 and target gene expression in postischemic rat intestine[J]. Gastroenterology, 2000, 118: 525-534.
- 6 Yoo K, Yang S Y, Lee J. Intracoronary propofol attenuates myocardial but not coronary endothelial dysfunction after brief ischemia and reperfusion in dogs[J]. Br J Anaesth, 1999, 82: 90-96.
- 7 Javadov S A, Lim K H, Kerr P M, et al. Protection of hearts from reperfusion injury by propofol is associated with inhibition of the mitochondrial permeability transition[J]. Cardiovasc Res, 2000, 45: 360-369.
- 8 Sedgwick J D, Riminton D S, Cyster J G, et al. Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement[J]. Immunol Today, 2000, 21: 110-113.
- 9 姜小国, 胡森, 石德光, 等. 卡巴胆碱对肠缺血-再灌注大鼠血浆肿瘤坏死因子- α 和白介素-10 含量的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 167-169.
- 10 Schoefle U, Pelz K, Haring R U, et al. Inflammatory consequences of the endotoxin to mesenteric lymph nodes[J]. Am J Surg, 2000, 180: 65-72.

(收稿日期: 2004-08-10 修回日期: 2004-12-24)

(本文编辑: 李银平)

• 启事 •

第十次全国中西医结合危重病急救医学学术会议征文通知

中国中西医结合学会急救医学专业委员会与《中国中西医结合急救杂志》拟于 2005 年 6 月在广东省广州市(增城, 暂定)联合召开第十次全国中西医结合危重病急救医学学术会议。本届学术会议主要内容: ①国内脓毒症诊断及中西医结合治疗现状; ②介绍国内外脓毒症研究的新进展; ③讨论和交流脓毒症中西医结合治疗成果; ④介绍国内外危重病急救医学研究的新动态。

1 征文内容: 西医、中医、中西医结合有关内、外、儿、妇、神经、麻醉、检验、影像、窥镜、创伤、灼伤、护理等各学科基础与临床研究的论文, 感染性、非感染性全身炎症反应综合征并发症、多器官功能障碍综合征、临床监测新技术、急救药物等, 以及急诊、ICU 质控标准和医疗管理。

2 征文要求: 全文 3 000 字以内(附 500 字摘要, 包括目的、方法、结果、结论), 用稿纸正楷书写, 标点符号要准确, 著者要顺序排列, 随寄软盘(Word 排版)和单位介绍信。请自留底稿, 恕不退稿。

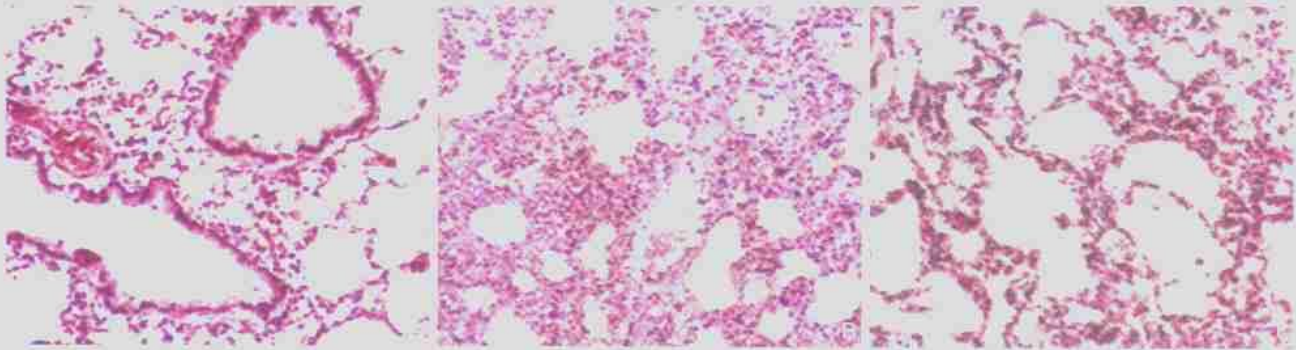
3 寄稿地址: 天津市和平区睦南道 122 号天津市天和医院急救医学中心夏欣华收, 邮编: 300050。

传真: (022)23114748, 电话(022)23042084。

(中国中西医结合学会急救医学专业委员会)

乌司他丁对创伤失血性休克兔肺损伤的保护作用

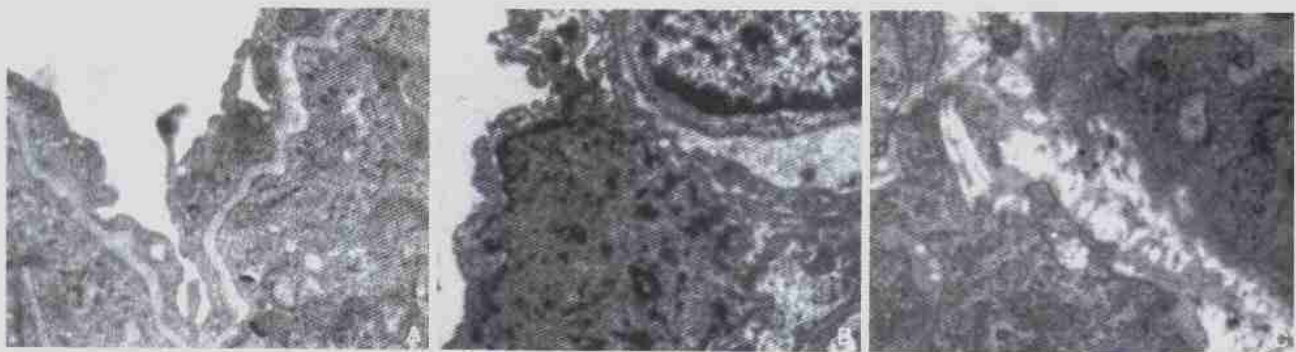
(正文见36页)



注：A为对照组正常肺组织；B为休克组肺组织，肺泡间隔明显增宽，有大量炎性细胞浸润，可见肺充血，间质水肿；C为乌司他丁组肺组织，肺泡间隔略有增宽，少量炎性细胞浸润，肺充血及间质水肿较休克组明显减轻。

图1 光镜下肺叶组织的病理学改变(HE, x200)

Figure 1 Examination of pulmonary tissue through light microscope (HE, x 200)



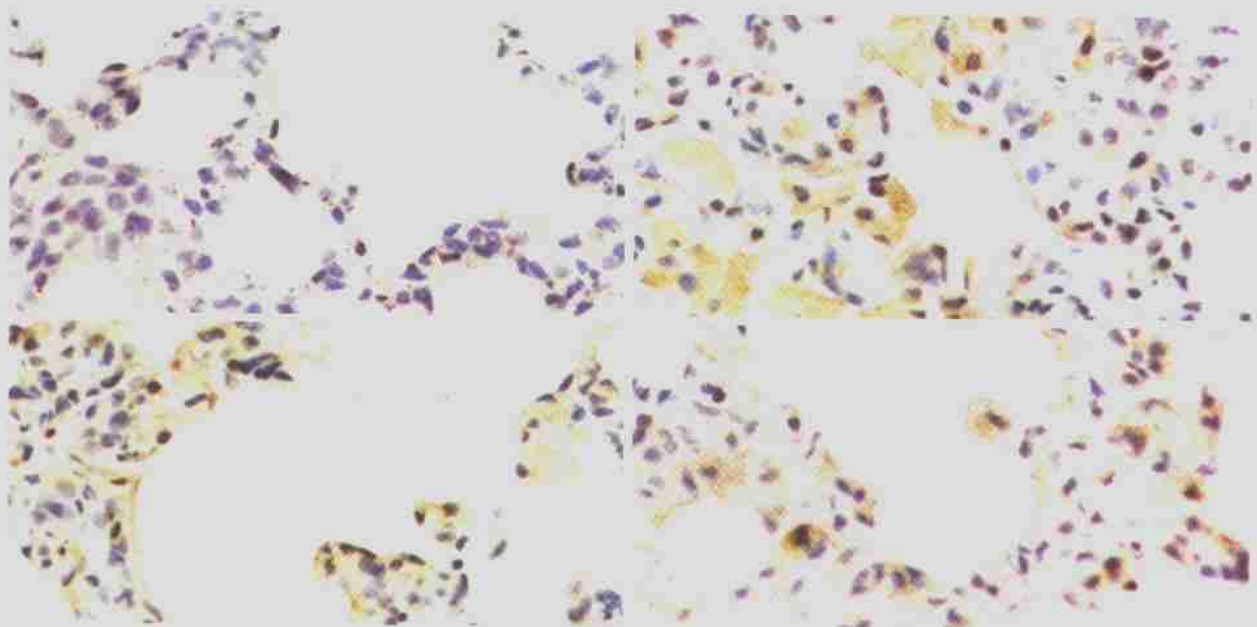
注：A为对照组正常肺组织；B为休克组肺组织，内皮细胞肿胀甚至崩溃，胞内大量吞饮小泡，细胞器肿胀，有的呈空泡状；C为乌司他丁组肺组织，内皮细胞略有肿胀，胞内较多吞饮小泡，细胞器肿胀，少数线粒体保留有完整的嵴

图2 电镜下肺叶组织的病理学改变(钨酸, x10 000)

Figure 2 Examination of pulmonary tissue through electric microscope(osmicate, x 10 000)

丙泊酚对大鼠肠缺血-再灌注后肺细胞间黏附分子-1蛋白表达的影响

(正文见53页)



注：A为对照组，B为I/R组，C为P1组，D为P2组

图5 各组肺组织ICAM-1蛋白表达(免疫组化, x300)

Figure 5 Expression of ICAM-1 protein in lung tissue in each group (immunohistochemical, x 300)