

• 研究报告 •

血红素加氧酶-1 过表达对模拟肺移植后犬肺功能的作用研究

石纁 毕建立 宋志鸿 刘亚宁

【关键词】 血红素加氧酶； 肺移植； 犬

血红素加氧酶-1(HO-1)是血红素分解代谢的限速酶,可将血红素降解为胆绿素、一氧化碳(CO)和游离 Fe²⁺,多种因素如重金属、血红素、低氧、高温及紫外线照射均可诱导 HO-1 大量表达。因此,HO-1 属于应激反应蛋白,是机体调节和抵抗氧化应激反应的重要生物分子。HO-1 作为一种对伤害性刺激的适应性和保护性反应蛋白,与临床上某些疾病如器官移植、缺血/再灌注(I/R)损伤等过程密切相关。本研究通过制备犬离体肺移植再灌注模型,模拟肺移植后的循环过程,预先诱导犬肺 HO-1 表达,观察过表达的 HO-1 对模拟移植后犬肺功能的影响。

1 材料与与方法

1.1 动物与试剂:健康杂种犬 12 只,雌雄不限,体重 12~20 kg,由空军总医院实验动物中心提供。美国 Medtronic 公司生产的膜肺, Sarns7400 滚压泵。速眠新 I 注射液由军事医学科学院军事兽医研究所制造,盐酸氟胺酮注射液为江苏恒瑞医药股份有限公司产品,肝素钠为北京双鹤药业股份有限公司产品,乳酸钠注射液为天津金耀氨基酸有限公司产品,锌原卟啉(ZnPP)为美国 Sigma 公司产品。其余化学试剂均为分析纯,购自北京化学试剂商店。引物由北京赛百盛公司合成,2×聚合酶链反应(PCR)Mix 为广州东盛公司产品。

1.2 Celsior 液的配置:Celsior 液是一种细胞保护液,通常在心脏移植术中用于心脏的保护,近年也用于肺移植术的肺保护。组成:C₂H₅NaO₃ 80 mmol/L, CaCl₂ 0.26 mmol/L, 谷胱甘肽 3 mmol/L, 组氨酸 30 mmol/L, KCl 15 mmol/L, MgCl₂ 13 mmol/L, 谷氨酸钠 20 mmol/L, 甘露

醇 60 mmol/L。配置后 4℃ 保存备用。

1.3 动物模型制备:实验犬术前 12 h 禁食、禁水,实验开始前肌肉注射(肌注)阿托品 0.5 mg, 30 min 后肌注速眠新 I 0.1 mg/kg 及氟胺酮 15 mg/kg, 麻醉平稳后使用呼吸机控制呼吸,潮气量 15~20 ml/kg, 频率 28 次/min, 吸入氧浓度(FiO₂)1.00, 麻醉期间行心电图监护。分离股静脉,注射肝素钠 3 mg/kg 抗凝。经股动脉穿刺放血约 800~1 000 ml 后,心跳停跳,肺呈热缺血状态。剪开胸骨,经纵膈进入胸腔,游离两侧肺下韧带、上下腔静脉、气管、升主动脉,分别结扎切断升主动脉及上下腔静脉,气管拔管前膨胀肺,在 2/3 膨胀状态下切断整体心肺块。热缺血 60 min 后切开心包,分离肺动脉主干、左右肺动脉、升主动脉,距肺动脉起始部远端约 1.5 cm 处插入静脉穿刺套管针,用于监测肺动脉压力和排气。肺动脉灌注管直接经上腔静脉插入右心房内,腔静脉引流管自主动脉插入至左心室,灌注管及引流管分别连接再灌注装置的滚压泵。热缺血 60 min 后经肺动脉测压针排气,以 4℃ Celsior 液自上腔静脉内灌注左心房冲洗肺内残余血液,灌注量 60 ml/kg, 测压针监测肺动脉灌注压力为 20 mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa), 经左心室插管引流灌注液。5~10 min 后,肺表面迅速呈粉红色一粉白色一白色,此期间未使用呼吸机支持,内置 4℃ Celsior 液 120 min, 肺组织为冷缺血状态。冷缺血 120 min 后连接肺再灌注系统。氧合器自身循环升温至 37℃ 后,经上腔静脉插管进行温血热灌注,连续灌注左肺 120 min, 同时监测血气、肺动脉压等指标。120 min 后取肺组织测定丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)。

1.4 实验分组:按随机数字表法将动物分为 3 组, 每组 4 只。①模型组:单纯肺 I/R, 术前 48 h 腹腔注射生理盐水 20 ml, 每日 2 次。②诱导剂组:术前 48 h 腹腔注射氯化血红素 5 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 每日 2 次。③抑制剂组:术前 48 h 腹腔注

射氯化血红素(剂量同上);肺离体灌注前向灌注液加入 ZnPP 10 mg/L。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 血气分析:分别于术后 30 min 和 120 min 取动脉血检测血气。

1.5.2 MDA、SOD 测定:术后立即取小块肺组织,以 9 倍体积的 4℃ 生理盐水研磨肺组织,制成体积分数为 10% 的组织匀浆液,离心 10 min 取上清液,测定 MDA;再以生理盐水将组织匀浆上清液稀释至 1%,测定 SOD 活性。

1.5.3 肺组织 HO-1 mRNA 检测:采用 Trizol Reagent 提取肺组织总 RNA,经 Super-Script™ preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen)将 RNA 反转录成 cDNA,操作按试剂盒说明书要求。以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作为内参照。从 GenBank 中取犬 HO-1 及 GAPDH cDNA 序列,自行设计引物。HO-1 上游引物:5'-GCCGAGTTCATGAAGAAC-3', 下游引物:5'-GAGCTGGGCAGGTCCAGG-3', 扩增产物长度为 388 bp;GAPDH 上游引物:5'-GCCAAAAGGGTCATCATCTC-3', 下游引物:5'-GGGGCCA TCCACAGTCTTCT-3', 扩增产物长度为 228 bp。反应体系:反转录产物 1 μl, 2×PCR Mix 10 μl, 引物 (5 μmol/L) 1 μl, H₂O 8 μl。反应条件:94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s;退火温度由 60℃ 降至 51℃, 每个循环退火温度降低 1℃, 共 10 个循环;再以 94℃ 30 s, 57℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环后结束反应。HO-1 与 GAPDH 反应条件相同。PCR 产物经质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶图像分析系统扫描测定 DNA 条带灰度值。

1.6 统计学处理:所测数值用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 t 检验和单因素方差分析, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血气分析结果(表 1):模拟移植后 30 min, 3 组动脉血氧分压(PaO₂)和动

作者单位:100036 北京, 空军总医院中心实验室(石纁, 刘亚宁), 心胸外科(毕建立), 麻醉科(宋志鸿)

作者简介:石纁(1970-), 女(汉族), 山东省人, 医学博士, 副主任医师, Email: kjsyiyi@yahoo.com.cn.

脉血二氧化碳分压(PaCO₂)比较差异均无统计学意义(P均>0.05);模拟移植120 min后,诱导剂组 PaO₂ 明显高于模型组和抑制剂组,PaCO₂ 明显低于模型组和抑制剂组(P均<0.05),而模型组与抑制剂组间 PaO₂ 和 PaCO₂ 比较差异均无统计学意义(P均>0.05)。

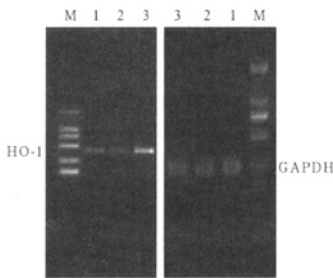
2.2 肺动脉压比较(表 2):模拟移植后 3 组肺动脉压均呈先增高后降低趋势,模拟移植后 30 min 达到高峰,3 组间比较差异无统计学意义(P均>0.05)。

2.3 SOD、MDA 测定结果(表 1):模拟移植后 120 min,3 组 MDA 含量均升高,但诱导剂组升高水平不及模型组和抑制剂组显著,3 组间比较差异有统计学意义(P均<0.05);3 组 SOD 活性均下降,但诱导剂组 SOD 活性下降程度不及模型组和抑制剂组,3 组间比较差异有统计学意义(P均<0.05)。

2.4 HO-1 mRNA 的表达(图 1):半定量逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)结果显示,模型组、诱导剂组和抑制剂组 HO-1 mRNA 灰度值分别为 1.57±0.04、0.47±0.03 和 0.49±0.02,诱导剂组 HO-1 mRNA 水平明显高于模型组和抑制剂组,3 组间比较差异有统计学意义(P均<0.01)。

3 讨论

器官移植中供体器官由于缺血、缺氧,通常于移植后发生不同程度的组织损伤,而液体复苏或侧支循环代偿等可使循环得以改善,但血供恢复后使原有损伤加重。I/R 损伤是器官移植后造成急性器官衰竭及延迟性器官功能障碍的重要原因,SOD、维生素 E、维生素 C 等都有一定拮抗作用,但都不能完全消除 I/R 对组织器官的影响。



M:Marker;1~3 依次为模型组、抑制剂组、诱导剂组

图 1 HO-1 在模拟移植后犬肺组织中的表达

HO 最早由 Tenhunen 等^[1]于 1968 年在动物肝脏微粒体中发现,是血红素分解代谢的主要酶类,有 HO-1、HO-2、HO-3 共 3 种同工异构酶,分别由不同基因所编码。HO-1 多分布于脾脏和肝脏,是诱导型酶,相对分子质量为 32 000,又被称为热休克蛋白 32(HSP32)^[2]。HO-1 是血红素降解的起始酶和限速酶,主要功能是代谢血红素形成胆绿素、CO 和游离 Fe²⁺^[3-4]。目前认为 HO-1 除能降解血红素外,尚有许多生物学作用,如胆绿素、胆红素均是体内强抗氧化剂^[5]。CO 是机体内源性 CO 的主要来源,具有扩张血管和抗血小板聚集的特性,可维持微循环稳定,它还是一种气体信使分子,在神经元信息传递和血管紧张度调节中起重要作用^[6],在感染性休克时,内源性 CO 增加可能对器官起到保护作用^[7]。而 Fe²⁺是体内具有多种生物学活性的金属离子,可减少活性氧的产生^[8]。有研究表明,诱导 HO-1 过表达可通过抗凋亡途径保护大鼠心脏组织抵御低温^[9]。在 I/R 引起心肌梗死的动物模型中,过表达

HO-1 的转基因鼠的心肌梗死面积为 14.7%,远低于野生型的 56.5%,且心功能恢复较好^[10];而且 HO-1 过表达能保护缺血脏器的功能^[11]。

本研究发现,给予 HO-1 诱导剂氯化血红素预先诱导 HO-1 过表达,能够明显改善模拟移植后的犬肺功能,表现在诱导剂组 PaO₂ 明显高于模型组和抑制剂组,而 PaCO₂ 则明显低于其他两组,表明 HO-1 过表达具有保护模拟移植后犬肺功能的作用。肺动脉压是反映肺血管阻力的重要指标,移植肺恢复血供后,犬的肺动脉压均呈先增高后降低的趋势,模拟移植后 30 min 左右肺动脉压达到高峰,但 3 组间差异不大。氧自由基是 I/R 损伤的主要病理生理机制之一,本研究中用 SOD 和 MDA 含量的变化来反映 HO-1 对模拟移植过程中氧自由基的影响,结果提示,模拟移植后各组 SOD 活性均减少,MDA 含量均增加,但是诱导剂组较模型组和抑制剂组 SOD 活性明显升高而 MDA 水平明显降低,表明 HO-1 过表达可增强肺组织抵抗氧化应激损伤的能力。

参考文献

[1] Tenhunen R, Marver H S, Schmid R. Microsomal heme oxygenase, characterization of the enzyme [J]. J Biol Chem, 1969, 244(23): 6388-6394.
 [2] Shibahara S, Müller R M, Taguchi H. Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock [J]. J Biol Chem, 1987, 262(27): 12889-12892.
 [3] Otterbein L E, Choi A M. Heme oxygenase, colors of defense against cellular stress [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(6): L1029-L1037.
 [4] Maines M D. The heme oxygenase sys-

表 1 3 组动物模拟移植前后动脉血气及肺组织 SOD、MDA 的变化(̄x±s)

组别	动物数	术前		术后 30 min		术后 120 min			
		SOD(NU)	MDA(μmol/g)	PaO ₂ (mm Hg)	PaCO ₂ (mm Hg)	PaO ₂ (mm Hg)	PaCO ₂ (mm Hg)	SOD(NU)	MDA(μmol/g)
模型组	4	31.15±1.33	6.15±0.68	164.33±8.16	46.80±7.94	61.10±13.85 ^a	76.45±25.30 ^a	21.15±0.57	7.96±0.77
诱导剂组	4	31.44±1.15	6.20±0.62	199.23±26.68	44.83±7.33	133.45±15.13 ^{abc}	40.03±5.02 ^{bc}	25.09±0.80 ^{bc}	6.71±0.52 ^{bc}
抑制剂组	4	31.24±0.74	6.59±0.51	189.68±51.28	41.00±8.87	73.73±13.16 ^a	51.48±10.68	23.13±0.83	8.01±0.50

注:与本组模拟移植后 30 min 比较, ^aP<0.05;与模型组同期比较, ^bP<0.05;与抑制剂组同期比较, ^cP<0.05

表 2 3 组动物模拟移植后肺动脉压的动态变化(̄x±s)

组别	动物数	mm Hg					
		术后 5 min	术后 15 min	术后 30 min	术后 60 min	术后 90 min	术后 120 min
模型组	4	23.50±1.29	23.25±1.71	30.25±1.70	25.73±2.21	26.50±1.29	26.75±1.26
诱导剂组	4	21.00±0.82	23.00±0.82	24.50±1.29	22.00±0.82	20.75±1.71	20.75±0.96
抑制剂组	4	21.75±0.96	23.25±2.22	26.50±1.29	23.00±1.83	24.25±2.50	25.75±0.96

tem; a regulator of second messenger gases [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1997, 37: 517-554.

[5] Doré S, Takahashi M, Ferris C D, et al. Bilirubin, formed by activation of heme oxygenase-2, protects neurons against oxidative stress injury [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96 (5): 2445-2450.

[6] Verma A, Hirsch D J, Glatt C E, et al. Carbon monoxide: a putative neural messenger [J]. *Science*, 1993, 259 (5093): 381-384.

[7] 索晓华, 丁春华, 谭家庆, 等. 内源性一氧化氮对感染性休克大鼠器官保护作用及机制研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2007, 19 (5): 306-310.

[8] Balla J, Nath K A, Balla G, et al. Endothelial cell heme oxygenase and ferritin induction in rat lung by hemoglobin in vivo [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268 (2 pt 1): L321-L327.

[9] Katori M, Buelow R, Ke B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway [J]. *Transplantation*, 2002, 73 (2): 287-292.

[10] Yet S F, Perrella M A, Layne M D, et al. Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103 (8): R23-29.

[11] 高新跃, 任从才, 张欣, 等. 血红素加氧酶-1 重组乳酸杆菌灌胃对失血性休克大鼠肠黏膜屏障的保护作用 [J]. *中国危重病急救医学*, 2007, 19 (4): 225-228.

(收稿日期: 2007-11-23)
(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

以惊厥为主要表现的氟乙酰胺中毒 32 例救治体会

梁水翠 马彩玉

【关键词】 中毒, 氟乙酰胺; 惊厥; 乙酰胺; 硝西泮

2006 年 1 月—2007 年 12 月我科共收治氟乙酰胺中毒患儿 32 例, 积累了一定经验, 现报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料: 32 例患儿中, 男 20 例, 女 12 例; 年龄 1.5~11.0 岁, 6 岁以下 29 例, 6 岁以上 3 例。

1.2 临床表现: 轻度中毒表现为腹痛、恶心、呕吐; 较大儿童自诉头痛、头晕、乏力, 双眼凝视或频繁眨眼, 全身阵发性抽搐、肢体小抽动, 间歇性意识障碍。中重度以上中毒发作急促, 90% 以上在服毒后 30 min 即出现频繁抽搐, 多呈强直-阵挛性癫痫样抽搐, 发作时呼吸急促或节律不整, 心动过速, 瞳孔散大, 口吐白沫, 发绀明显, 大小便失禁, 躁动不安。

1.3 实验室检查: 8 例肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 增高; 18 例白细胞及中性粒细胞升高; 肝、肾功能及尿、粪常规正常。

1.4 急救措施: 清除毒物, 洗胃, 导泻, 更换污染衣服, 肥皂水清洁皮肤; 控制惊厥, 以苯巴比妥为首选, 每次肌肉注射 (肌注) 5~8 mg/kg, 严重者加体积分数为 5% 的水合氯醛 50 mg/kg 灌肠; 交替使用地西洋 0.1~0.3 mg/kg 静脉注射 (有呼吸抑制者禁用), 给予特效拮抗剂

乙酰胺 0.1~0.3 mg · kg⁻¹ · d⁻¹, 分两次肌注, 可连续注射 5~7 d; 输入大剂量维生素 C、能量合剂, 维持电解质平衡, 预防性应用抗生素, 给予利尿、甘露醇减轻脑水肿; 有心肌损害者给予 1, 6-二磷酸果糖营养心肌; 对症治疗, 生命体征支持和内环境监护。

1.5 预后: 32 例患儿中治愈 31 例, 其中抽搐控制后有不定时癫痫样抽搐发作 4 例, 在常规治疗无效时给予口服硝西泮, 症状控制, 随访 0.5~1.0 年无复发; 死亡 1 例。

2 讨论

氟乙酰胺为神经毒素, 有机氟本身对神经系统也有强大的诱发痉挛作用, 故中毒后可致患者出现神经精神症状。

中毒抢救成功的关键是早诊断、早治疗。氟乙酰胺中毒的诊断难易差别很大, 主要靠询问病史及结合临床中毒症状。本组患者多数入院时病史不清。我们的经验是, 临床上凡遇病史不清, 突然以频繁抽搐起病 (尤其是能单独行走的农村学龄前儿童), 不伴发热, 无外伤史、无癫痫史、无过敏史, 临床症状不能用某种疾病来解释者, 应首先考虑氟乙酰胺中毒, 并尽早、尽快洗胃, 彻底清除毒物。近年来我们正是以此诊断原则为宗旨, 抓住了最佳抢救时机, 使抢救成功率达 90%。

在所有抢救措施中, 洗胃为首要措施, 为减少毒物对机体的损害, 洗胃时患

儿取左侧卧位, 注意出入液量平衡, 避免呕吐物吸入引起窒息。对所有患者采取清水洗胃 (清水适用于各类毒物, 在病情不清时不会增强毒物毒性), 原则上不受中毒时间限制, 只要有毒物中毒表现均给予洗胃治疗, 直至洗出液清亮为止。同时给予控制惊厥治疗, 我们的经验是苯巴比妥效果较好, 可能是因为苯巴比妥为氧自由基清除剂, 能阻断中毒引起的强直持续性抽搐所致脑损伤, 促进意识恢复, 减少后遗症。其次, 要边抢救边进一步询问病史, 详细查体, 一旦确诊, 立即用乙酰胺治疗。乙酰胺是氟乙酰胺中毒的特效解毒剂; 对无心肌损害者还应及早使用钙剂, 除可与氟乙酰胺生成的氟乙酸结合为氟乙酸钙而解毒外, 又能改善患儿因血钙降低而引起的抽搐^[1]。

对中毒后致癫痫样发作者, 我们在给予常规镇静抗惊厥治疗无明显效果时改用硝西泮口服, 癫痫样症状很快消失, 可能在于该药口服吸收率高、血浆高峰浓度到达快、半衰期长以及抗惊厥、催眠作用及抗焦虑作用较强的缘故^[2]。

参考文献

[1] 黎月华, 李颖. 有机氟农药急性中毒 11 例 [J]. *实用儿科临床杂志*, 1993, 8 (4): 336.

[2] 中山医学院. *药理学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1979: 68.

(收稿日期: 2008-01-15)
(本文编辑: 李银平)

作者单位: 044400 山西夏县人民医院儿科
作者简介: 梁水翠 (1964-), 女 (汉族), 山西省人, 副主任医师, Email: liangshuicui-428@sina.com.