

## 基础研究 ·

# 缺血预处理对家兔肢体缺血再灌注后肺抗氧化系统的影响

陈雷<sup>1</sup>, 金可可<sup>2</sup>, 潘景业<sup>1</sup>, 金广健<sup>1</sup>, 王健<sup>1</sup>, 许益笑<sup>2</sup>

(1. 温州医学院附属第一医院骨科, 浙江 温州 325000; 2. 温州医学院病理生理教研室)

**摘要** 目的: 观察肢体缺血预处理对家兔肢体缺血再灌注后肺损伤时肺抗氧化系统的影响并探讨其机制。方法: 健康家兔 30 只, 随机分为假手术对照组(SC)、缺血再灌注组(IR)和缺血预处理组(IPC), 每组 10 只。实验结束时, 取肺组织测定超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、黄嘌呤氧化酶(XOD)活性和丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)含量, 同时计算肺系数及进行肺病理学检查。结果: 肢体缺血再灌注后肺组织 SOD、GSH-PX 活性和 NO 含量显著下降, XOD 活性和 MDA 含量明显增高, 肺系数升高, 肺组织病变明显, 肢体缺血预处理可明显缓解上述变化。结论: 家兔肢体缺血再灌注后, 肺抗氧化功能下降参与肺脏的损伤过程, 肢体缺血预处理对这种肺损伤有明显的保护作用。

**关键词** 缺血预处理; 肺; 再灌注损伤; 抗氧化系统

**Effect of ischemic preconditioning of limb on anti-oxidative system in the development of lung injury associated with limb ischemia-reperfusion in rabbits** CHEN Lei<sup>\*</sup>, JIN Ke-ke, PAN Jing-ye, JIN Guang-jian, WANG Jian, XU Yi-xiao. <sup>\*</sup> Department of Orthopaedics, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

**Abstract** **Objective**: To investigate the effect of ischemic preconditioning on anti-oxidative system in the development of lung injury associated with limb ischemia-reperfusion in rabbits. **Methods**: 30 rabbits were randomly divided into three groups: Sham-operated control (SC) group, ischemia reperfusion (IR) group (4 hours of bilateral hindlimb ischemia and 4 hours of reperfusion), and ischemic preconditioning (IPC) group (three cycles of 5-minute ischemia followed by 5-minute reperfusion prior to IR). At the end of the experiment, the contents of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), xanthine oxidase (XOD) activity, MDA and NO in lung tissue were detected. Meanwhile, lung index was measured and the pathological change in the lung was observed. **Results**: In the IR group, NO content and the activities of SOD and GSH-PX of the lung tissue were significantly decrease; the XOD activity, MDA level and lung index of the lung tissue were obviously increased. In the IPC group, the changes of the parameters mentioned above were obviously attenuated. **Conclusion**: Limb IPC protects the lung from the injury associated with limb ischemia-reperfusion via elevating the functions of anti-oxidation anti-peroxidative reaction of lipids.

**Key words** Ischemic preconditioning; Lung; Reperfusion injury; Antioxidation system

肢体缺血-再灌注损伤是骨科领域常见的病理过程, 如外伤后骨筋膜室综合征、四肢手术和血管损伤时止血带止血、断肢移植、游离肌瓣转移等。肢体缺血再灌注不仅可以引起局部缺血组织的损伤, 还可以导致远隔部位器官损伤, 肺脏是容易受累器官之一, 主要表现为急性肺损伤, 严重时可导致急性呼吸窘迫综合征。近年来研究表明, 这种损伤与氧自由基有关<sup>[1]</sup>。缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)是一种内源性的保护机制<sup>[2]</sup>, 其确切机制尚无定论。研究表明, 缺血预

处理对肢体缺血再灌注引起肺损伤有保护作用, Harkin 等<sup>[3]</sup>认为此主要与肢体缺血预处理抑制炎症反应有关。缺血预处理对肺部抗氧化系统的影响未见报道。本实验通过观察肢体缺血预处理对家兔肢体缺血再灌注后引起的肺损伤时肺部抗氧化系统的影响, 并探讨其机制, 以期为临床治疗提供实验依据。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物及模型复制** 成年健康日本大耳白兔 30 只, 雌雄不限, 体重 2.0~2.5 kg, 由本校实验动物中心提供。动物随机分为 3 组: 假手术对照组(sham control, SC)、缺血再灌注组(ischemia reperfusion, IR)和缺血预处理组(ischemic pre-

conditioning, IPC), 每组 10 只。实验前禁食 12 h, 可自由饮水。家兔称重后用 25% 乌拉坦 (4 ml/kg) 耳缘静脉麻醉, IR 组先夹闭两侧髂外动脉, 再以橡皮带扎紧双后肢根部阻断血流, 4 h 后放开动脉夹, 松开橡皮带, 恢复血流灌注 4 h; IPC 组先阻断双后肢血流 5 min, 然后恢复血流灌注 5 min, 如此反复 3 次, 其后操作同 IR 组; SC 组两侧髂外动脉不结扎, 只予家兔双后肢松绕橡皮带, 模拟捆扎。

1.2 检测方法

1.2.1 肺系数测定 实验结束时, 夹闭气管处死动物, 在气管分叉处结扎, 在结扎处以上切断气管, 取出肺, 用滤纸吸去肺表面的水分后称肺重, 计算肺系数, 肺系数 = 肺重量 (g) / 体重 (kg)。

1.2.2 抗氧化指标测定 取肺组织制备匀浆 (按照南京建成生物工程研究所提供的组织匀浆制备方法), 用邻苯三酚自氧化法检测肺组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 用化学比色法测定谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 活性和黄嘌呤氧化酶

(XOD) 活性, 以硫代巴比妥酸法测定丙二醛 (MDA) 含量, 硝酸还原酶法测定一氧化氮 (NO) 含量, 以上试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 检测方法按说明书操作。

1.2.3 组织病理学检查 4% 多聚甲醛中固定肺组织, 石蜡包埋切片, HE 染色后光镜下观察。

1.3 统计学处理方法 结果以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 SPSS 软件处理实验数据, 组间比较用 One-Way ANOVA 分析后, 采用 Student-Newmann-Keuls 检验,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

2 结果

2.1 肺系数 单纯缺血再灌注动物的肺系数为  $12.01 \pm 1.86$ , 明显大于缺血预处理组 ( $7.35 \pm 0.76, P < 0.01$ ) 和对照组 ( $4.65 \pm 0.69, P < 0.01$ )。

2.2 肺组织抗氧化指标 缺血预处理动物肺组织中 SOD、GSH-PX 活性和 NO 含量明显高于单纯缺血再灌注组, XOD 活性及 MDA 含量低于单纯缺血再灌注组, 见表 1。

表 1 3 组家兔肺组织 SOD、GSH-PX、XOD 活性及 MDA、NO 含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of the activities of the SOD, GSH-PX and XOD and the content of MDA and NO in rabbits of three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

Groups	n	SOD (U/mgprot)	GSH-PX (U/mgprot)	XOD (U/gprot)	MDA (mmol/mgprot)	NO ( $\mu$ mol/gprot)
SC	10	$5.10 \pm 1.02$	$0.78 \pm 0.14$	$8.12 \pm 1.04$	$5.55 \pm 1.30$	$93.74 \pm 11.80$
IR	10	$3.24 \pm 0.96^{**}$	$0.24 \pm 0.08^{**}$	$10.79 \pm 1.72^{**}$	$17.26 \pm 2.76^{**}$	$52.45 \pm 10.57^{**}$
IPC	10	$4.15 \pm 0.76^{* \#}$	$0.49 \pm 0.15^{* \# \#}$	$9.47 \pm 1.14^{* \#}$	$14.84 \pm 2.42^{* \# \#}$	$75.08 \pm 10.20^{* \# \#}$

注: 与 SC 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 IR 组比较, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

Note: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  as compare with SC group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  as compare with IR group

2.3 肺组织病理学改变 IR 组家兔肺组织病变明显, 肺组织切面有淡红色泡沫液体流出, 光镜下可见肺泡隔明显加宽, 毛细血管扩张充血, 可见大量中性粒细胞聚集、附壁, 伴有局

部肺不张。IPC 组家兔肺组织的病变明显轻于 IR 组, SC 组家兔肺组织无明显变化 (图 1)。

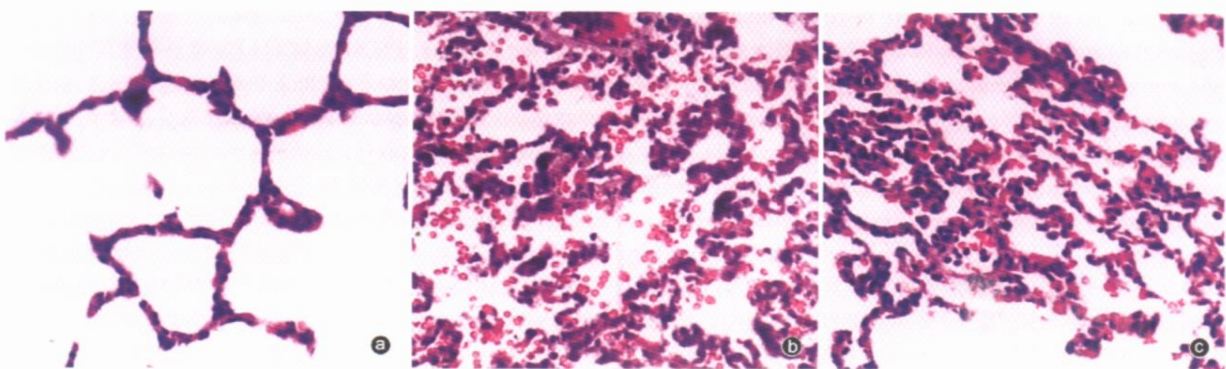


图 1 各组家兔肺组织学变化 (HE 染色  $10 \times 20$ ) ④ 假手术对照组 ⑤ 缺血再灌注组 ⑥ 缺血预处理组

Fig. 1 Lung histo-pathological change of the rabbits in the three groups ④ Sham-operated control group ⑤ Ischemia reperfusion group ⑥ Ischemic preconditioning group

3 讨论

肢体缺血再灌注损伤是临床上较常见的病理过程。研究表明, 肢体缺血再灌注后不仅加重局部组织的损伤, 有时易引起急性肺损伤<sup>[3-5]</sup>, 有人认为, 这种肺损伤与抗氧化功能降

低, 氧自由基增多有关, 肢体缺血再灌注时, 通过黄嘌呤氧化酶、中性粒细胞的呼吸爆发、线粒体功能损伤和儿茶酚胺的自身氧化等途径产生大量的自由基, 自由基可通过血流转移至肺, 经其中间代谢产物不断扩展生成新的自由基, 形成连锁反

应。自由基可与各种细胞成分,如膜磷脂、蛋白质、核酸等发生反应,造成急性肺损伤<sup>[6]</sup>。实验表明,肢体缺血再灌注继发肺损伤时,肺组织中脂质过氧化产物明显增多,而抗氧化能力降低<sup>[1,7]</sup>。本实验观察到,肢体缺血再灌注后,动物肺系数增加,出现明显的肺水肿,肺组织病变严重,肺部抗氧化酶活性降低,产生自由基的酶活性增加,脂质过氧化增强,本实验进一步证实了以上文献报道。

近年的研究发现多次短暂缺血预处理可以增强细胞对缺血的耐受性,是调动机体内源性保护机制的有效措施<sup>[8]</sup>。本实验发现,在恢复肢体血流前,先进行 30 min 的缺血预处理,可使肺组织的 SOD、GSH-PX 活性明显升高, XOD 活性和 MDA 含量下降,肺系数降低,提示肺部的抗氧化酶活性增高,合成自由基的酶活性下降,脂质过氧化程度减弱,肺水肿减轻,且病理学检查示肺组织的病变明显轻于单纯缺血再灌注动物,表明肢体缺血预处理对肢体缺血再灌注引起的肺损伤有良好的保护作用。缺血预处理对于同一组织的缺血再灌注损伤具有保护作用已达成共识,其机制与能量代谢、氧自由基、热休克蛋白、细胞膜 ATP 敏感钾离子通道有关,其中对递质和受体作用的研究较广泛和深入。有研究者发现,肺门血管的缺血预处理可减轻兔肺常温缺血再灌注诱导的脂质过氧化反应<sup>[9]</sup>。然而局部 IPC 对远隔脏器的保护效应目前尚处于探索阶段,这种保护作用据称与 IPC 的延迟保护作用有关,已有实验揭示和神经-体液机制有很大关系<sup>[10]</sup>。

本实验观察到单纯缺血再灌注组和缺血预处理组肺组织 NO 含量下降,尤其以单纯缺血再灌注组更加明显。NO 对机体有双重作用,适量的 NO 对机体有利作用:降低外周血管的反应性以维持组织器官的灌注;抑制血小板聚集及中性粒细胞黏附于血管内皮而具有抗血栓作用;对中性粒细胞呼吸爆发及在肺内的扣押发挥非特异性的免疫作用;清除氧自由基而抑制脂质过氧化。而当 NO 产生过多超过一定的限度时也会给机体造成有害的影响,如加重低血压;形成毒性更强的过氧亚硝基化合物与氧自由基协同而加重缺血再灌注损伤;损伤自身细胞的 DNA 和能量代谢等。当 NO 产生不足时也会给机体带来不利作用:表现为肺动脉高压;肺间质中性粒细胞

浸润增多;过氧化物产生过多;可溶性黏附分子增多、促进中性粒细胞的黏附和活化;释放大量的氧自由基、细胞因子和蛋白酶等而加重缺血再灌注损伤。本实验中肢体缺血再灌注后肺组织中 NO 明显减少,可能是大量的 NO 与氧自由基迅速产生反应生成更具细胞毒性的自由基 ONOO(过氧化亚硝基)等,也可能由于脂质过氧化使内源性 NO 合成减少,而在肢体恢复血流前实行缺血预处理,可增加肺组织的 NO 含量,其具体机制有待于进一步研究。

#### 参考文献

- 1 周跃,梅芳瑞,高峰,等.高原肢体缺血再灌注致急性肺损伤的实验研究.中华创伤杂志,1997,13(1):41-42.
- 2 石应康.急性肺损伤的研究进展.中华创伤杂志,2000,16(11):645-647.
- 3 Harkin DW,Barros D 'Sa AA,McCallion K,et al. Ischemic preconditioning before lower limb ischemia-reperfusion protects against acute lung injury. J Vasc Surg,2002,35(6):1264-1273.
- 4 Cohen SM,Siddiqi FA,Darakchiev B,et al. Attenuation of acute lung injury caused by hind-limb ischemia-reperfusion injury by butyrolactone anti-inflammatory agent FL1003. J Trauma,1997,43(2):247-251.
- 5 Harkin DW,Barros D 'Sa AA,McCallion K,et al. Bactericidal/permeability-increasing protein attenuates systemic inflammation and acute lung injury in porcine lower limb ischemia-reperfusion injury. Ann Surg,2001,234(2):233-244.
- 6 Soong CV,Young IS,Lightbody JH,et al. Reduction of free radical generation minimizes lower limb swelling following femoropopliteal bypass surgery. Eur J Vasc Surg,1994,8(4):435-440.
- 7 Sun JS,Lu FJ,Huang WC,et al. Antioxidant status following acute ischemic limb injury: A rabbit model. Free Radic Res,1999,31(1):9-21.
- 8 Kloner RA,Jennings RB. Consequences of brief ischemia: Stunning preconditioning, and their clinical implications: Part 1. Circ,2001,104(24):2981-2989.
- 9 罗万俊,陈胜喜,胡佳心,等.缺血预处理对肺再灌注损伤脂质过氧化的影响.中国病理生理杂志,1999,15(9):841-843.
- 10 杨秀红,张连元,孙树勋.一氧化氮与肢体缺血再灌注后肺损伤.国外医学:呼吸系统分册,2002,22(2):60-62.

(收稿日期:2005-02-02 本文编辑:王宏)

## 《中国骨伤》2006 年开设“继续教育园地”栏目的通知

为了更好地贯彻、执行我刊的理论与实践、提高与普及相结合的办刊方针,进一步提高广大骨伤科医师的临床诊疗能力和学术水平,加强中西医之间的学术和技术的交流,经中国中西医结合学会同意,《中国骨伤》编辑委员会将于 2006 年在本刊开办“继续教育园地”栏目。该栏目将邀请中西医骨伤科界学术造诣较深并富有临床经验的专家出题和主讲,每期以专题测试试卷和讲座答题等形式开展继续教育活动。凡订阅 2006 年全年 12 期杂志,完成每期“继续教育园地”的答题,连续 6 期答题合格者或全年参与半数以上(含半数)答题者可获国家级类继续教学学分 6 分。每半年办理一次继续教育学分证书。欢迎广大读者踊跃参加。

本刊编辑部