

网络出版时间:2021/12/23 9:27 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20211221.0959.005.html

单肺通气诱发兔肺损伤时花生四烯酸代谢通路变化及丹参多酚酸盐的干预研究

陈 华¹, 张柏盛¹, 龙小平²

摘要 目的 探讨丹参多酚酸盐对单肺通气(OLV)致兔肺损伤后的保护作用及机制。方法 24只白兔随机分为3组:对照、模型和治疗组,每组8只。测定肺湿/干值(W/D值),通过HE染色及电镜观察肺组织变化;采用ELISA法检测兔肺组织中花生四烯酸(AA)、白三烯B₄(LTB₄)、血栓素A₂(TXA₂)和前列环素(PGI₂)含量;采用RT-qPCR法检测肺组织环氧酶-2(COX-2)和5-脂氧化酶(5-LOX)mRNA表达水平;采用Western blot法检测肺组织中COX-2、5-LOX、Clara细胞分泌蛋白(CCSP)和胞质型磷脂酶A₂(C-PLA₂)蛋白表达。结果 模型组肺W/D比值较对照组升高,而治疗后下降($P < 0.05$);HE染色显示,模型组毛细血管扩张充血,肺泡腔内有红色渗出物,肺泡壁增厚,炎性细胞浸润,而丹参多酚酸盐治疗后有所减轻;透射电镜下观察模型组线粒体肿胀,嵴断裂甚至消失,治疗组AT-I超微结构损伤较模型组明显改善;模型组和治疗组肺组织AA、LTB₄、TXA₂和PGI₂含量均高于对照组,经治疗后AA、LTB₄、TXA₂和PGI₂含量下降($P < 0.05$);RT-qPCR结果显示,模型组COX-2、5-LOX mRNA表达均高于对照组($P < 0.05$),而治疗后表达下降($P < 0.05$);Western blot结果显示,治疗组COX-2、5-LOX和C-PLA₂蛋白表达均低于模型组,而CCSP蛋白表达上升($P < 0.05$)。结论 丹参多酚酸盐具有保护OLV所致肺损伤的作用,其机制可能与下调COX-2、5-LOX和C-PLA₂表达,上调CCSP表达有关。

关键词 丹参多酚酸盐;单肺通气;环氧酶-2;5-脂氧化酶;Clara细胞分泌蛋白;胞质型磷脂酶A₂

中图分类号 R 392

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)01-0021-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.01.005

胸外科手术(如食管癌根治术、肺叶切除术等)的通气方式通常首选单肺通气(one lung ventilation, OLV)技术,通过隔离患侧肺,从而使气道通畅,避免

发生交叉感染,同时为手术治疗建立良好的操作环境^[1-2]。但是此技术会增加肺内分流与气道阻力,危及肺泡氧合机能与肺组织顺应性,造成急性肺损伤,对患者生命与术后恢复产生极大危害^[3-4]。

丹参多酚酸盐是从丹参中提取的一种水溶性有效成分,与传统丹参注射液相比,具有疗效稳定、毒副反应小、质量容易监控等优点,临床上主要用于冠心病的治疗^[5-6]。丹参多酚酸盐对急性肺损伤有保护作用,但对OLV诱发肺损伤的保护机制尚不清楚。该研究通过建立兔OLV模型,探讨丹参多酚酸盐对其所产生的效用以及可能机制,为后续研究提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 24只健康雌、雄性6月龄日本白兔,体质量2.2~2.5 kg,购自广东省医学科学院医学研究中心,许可证号:SCXK(粤)2015-0022。使用许可证号SYXK(湘)2017-0015。实验动物随机分为对照组、模型组、治疗组,每组8只;对照组:行假手术,暴露气管、左颈总动脉和右颈外静脉,经2~3个气管环行气管切开,置入气管(内径2.0 mm),双肺通气3 h;模型组:调整气管导管至右主支气管,行机械通气2 h,OLV 3 h;治疗组在OLV前给予丹参多酚酸盐30 mg/kg静脉滴注,其余与模型组相同。3组均采用容量通气模式,通气频率40次/min,OLVVT为12 ml,FiO₂ 100%。试验结束后2 h开胸取肺组织,部分于4%多聚甲醛中固定,剩余肺组织于液氮中保存。实验过程符合动物3R原则。

1.2 仪器与试剂 丹参多酚酸盐(上海绿谷药业);花生四烯酸(arachidonic acid, AA)、白三烯B₄(leukotriene B₄, LTB₄)、血栓素B₂(thromboxane B₂, TXB₂)和6-keto-PGF₁α检测ELISA试剂盒(上海樊克生物科技有限公司);环氧酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)、5-脂氧化酶(5-lipoxygenase, 5-LOX)、Clara细胞分泌蛋白(clara cell secretory protein, CCSP)和胞质型磷脂酶A₂(cytoplasmic phos-

2021-08-16 接收

基金项目:湖南省自然科学基金青年基金项目(编号:2018JJ3470)

作者单位:南华大学附属第一医院¹ 中医科、² 呼吸与危重医学科,衡阳 421001

作者简介:陈 华,男,硕士;

张柏盛,男,主治医师,硕士,责任作者,E-mail: fuyi1680@163.com

pholipase A2, C-PLA2) 抗体(美国 Sigma 公司);逆转录和 PCR 反应试剂(日本 Invitrogen 公司);TRIzol 试剂盒(美国 TaKaRa 公司);多功能麻醉机(美国 Datex Ohmeda 公司);H500 型透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司);9600PCR 扩增仪(美国 PE 公司)。

1.3 肺湿/干重值(wet / dry weight, W/D 值)

取右肺下叶组织称湿重,然后置于恒温烤箱中(80 ℃、72 h)烘烤,至恒重后称干重,计算肺湿/干重之比(W/D 值)。

1.4 肺组织学评分 取右肺组织,浸泡于4%多聚甲醛中固定24 h,常规脱水、石蜡包埋、二甲苯脱蜡、经各级乙醇溶液至水洗,然后 HE 染色,中性树胶封片,显微镜下观察。

1.5 透射电子显微镜 肺组织标本用2.5%戊二醛固定,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,再1%四氧化锇固定2 h,样品在室温下通过丙酮脱水,环氧树脂 Epon812 包埋,切片,用透射电镜检查。

1.6 ELISA 法检测肺组织中 AA、LTB₄、6-keto-PGF₁α 和 TXB₂ 含量 由于血栓素 A₂ (thromboxane A₂, TXA₂) 和前列环素(prostacyclin 2, PGI₂) 组织半衰期分别为30 s、3 min,因此判断浓度采用其稳定代谢产物 TXB₂ 和 6-酮-前列环素 F₁α(6-keto-PGF₁α)值作为指标。按照 ELISA 试剂盒说明书操作,检测兔肺中 AA、6-keto-PGF₁ 和 TXB₂ 的含量。

1.7 RT-qPCR 检测兔肺组织 COX-2、5-LOX mRNA 表达水平 取重约 50 mg 肺组织,置于 TRIzol 中提取总 RNA,并测定总 RNA 浓度。按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA,采用 SYBR Green MasterMix 试剂盒(美国 Kapa 公司)进行实时定量 PCR 实验。β-actin 作为内参,上游引物:5'-AGAGAACACCCAA GCCACT-3';下游引物:5'-GGCATCGGAAAGGCACA AACG-3'。5-LOX 上游引物:5'-GCCGTCTATGAACA CGCGTGT-3';下游引物:5'-GTCTCTAGATGAAGTTG

G-3'。COX-2 上游引物:5'-TCAGTCGATCAGGAGT-GA-3';下游引物:5'-CTAATGACAAGCCAGGGA-3'。以 2^{-ΔΔCt} 计算各样品表达量的相对值,对照组相对值均设为 1。

1.8 Western blot 法检测 AA 代谢途径相关蛋白表达 取肺组织 100 mg,加 1 ml 组织裂解液,匀浆后经 BCA 法测定蛋白浓度。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳、转膜、封闭后,加一抗、二抗孵育,用 TBST 漂洗 10 min × 3 次,室温下反应 1 h,采用 ECL 显影。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺 W/D 值 与对照组相比,模型组肺 W/D 值升高($P < 0.05$),而治疗组肺 W/D 值低于模型组($P < 0.05$),见图 1。

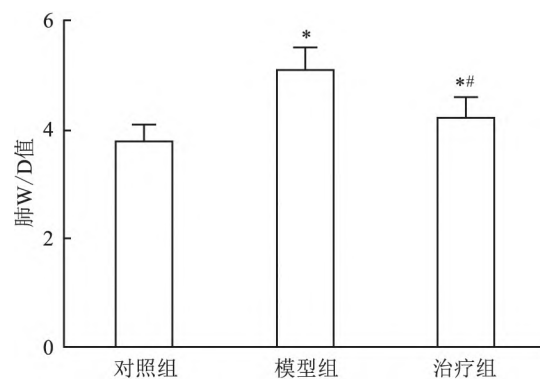


图 1 兔肺 W/D 值

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

2.2 肺组织 HE 染色及评分 对照组肺组织无明显病理改变;模型组毛细血管扩张充血,肺泡腔内有红色渗出物,肺泡壁增厚,炎性细胞浸润;治疗组部分肺泡破坏融合,肺间质有少量红细胞以及炎性细胞浸润,与模型组比较有所减轻,见图 2。

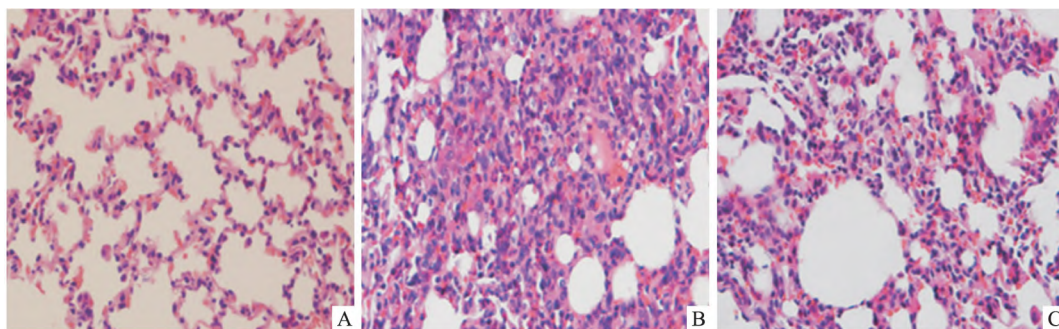


图 2 3 组肺组织 HE 染色 ×100

A: 对照组; B: 模型组; C: 治疗组

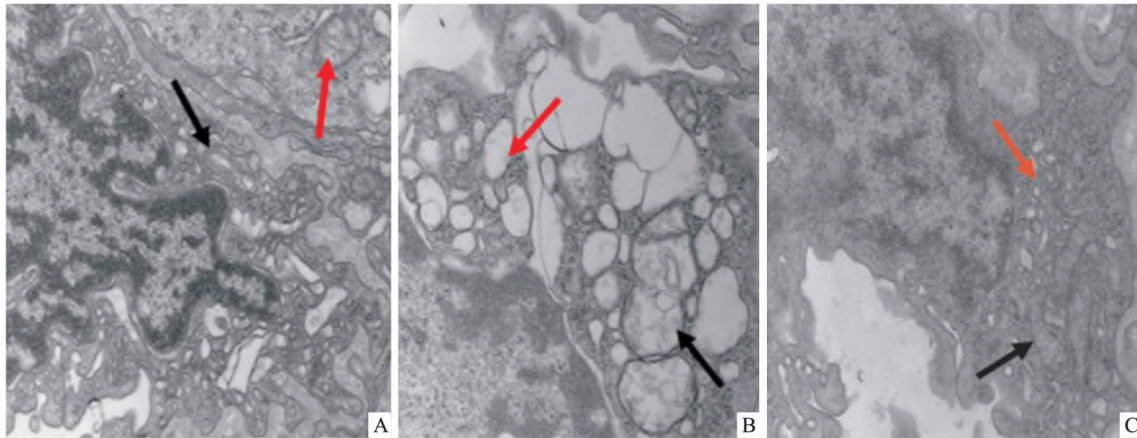


图3 各组肺组织超微结构的变化 ×50 000

A:对照组;B:模型组;C:治疗组;黑色箭头:线粒体;红色箭头:内质网

2.3 透射电镜观察肺组织病理学改变 对照组显示肺泡 I 型上皮细胞 (alveolar epithelial cell I, AT-I) 损伤较轻。而模型组线粒体肿胀,多数线粒体嵴断裂甚至消失空泡变性,内质网显著扩张,形成不同大小的液泡变性。治疗组 AT-I 超微结构损伤较模型组明显改善,见图 3。

2.4 各组肺组织中 AA、LTB4、TXA2、PGI2 含量比较 与对照组相比,模型组或治疗组肺组织中 AA、LTB4、TXA2 和 PGI2 含量上升 ($t = 6.39, 9.31, 5.98, 7.05, P < 0.05$; $t = 2.17, 9.01, 1.79, 6.33, P < 0.05$);与模型组相比,治疗组肺组织中 AA、LTB4、TXA2 和 PGI2 含量下降 ($t = 3.87, 2.76, 1.43, 2.22, P < 0.05$),见图 4。

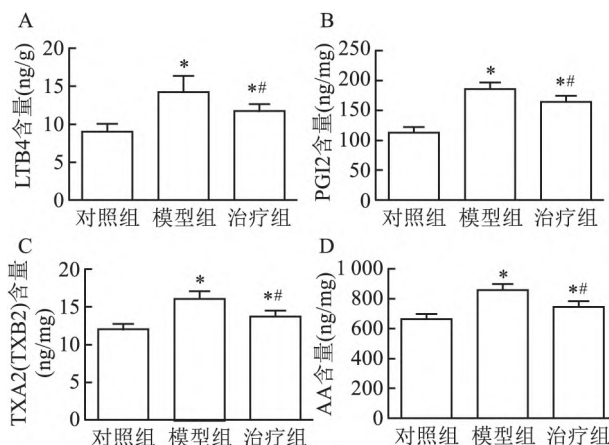


图4 各组肺组织中 LTB4、TXA2、PGI2、AA 含量

A: LTB4 含量;B: PGI2 (6-k-PGF1 α) 含量;C: TXA2 (TXB2) 含量;D: AA 含量;与对照组比较: * $P < 0.05$;与模型组比较: # $P < 0.05$

2.5 各组肺组织中 COX-2、5-LOX mRNA 表达水平 与对照组相比,模型组或治疗组兔肺组织中 5-

LOX、COX-2 mRNA 表达水平上升 ($t = 30.55, 27.89, P < 0.01$; $t = 77.31, 12.30, P < 0.01$),而与模型组相比,治疗组兔肺组织中 COX-2、5-LOX mRNA 表达水平下降 ($t = 18.16, 18.55, P < 0.01$),见图 5。

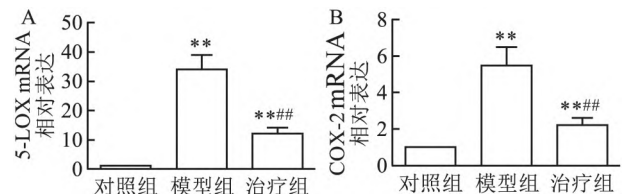


图5 肺组织中 COX-2、5-LOX 表达

A: 5-LOX mRNA 相对表达;B: COX-2 mRNA 相对表达;与对照组比较: ** $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.01$

2.6 各组肺组织 COX-2、5-LOX、CCSP 和 C-PLA2 蛋白表达 与对照组相比,模型组兔肺组织中 COX-2、5-LOX 和 C-PLA2 蛋白表达上升,而 CCSP 蛋白表达下降;与模型组相比,治疗组兔肺组织中 COX-2、5-LOX 和 C-PLA2 蛋白表达下降,而 CCSP 蛋白表达上升,见图 6。

3 讨论

OLV 拓展了胸科手术适应证,改善了手术条件,近年随着胸腔镜技术的成熟,其应用更加广泛。但这种通气方式属于非生理性通气,会提高气道阻力、减弱肺顺应性及肺泡局部通气机能,术中易发生低氧血症,使肺部缺血症状加剧,导致肺损伤更为严重^[7]。

经大量研究^[5]证实,丹参多酚酸盐具有多环节、多靶点的药理作用特点,不仅有抗心肌缺血、保护缺血-再灌注损伤、保护心肌等作用,还有保护肝

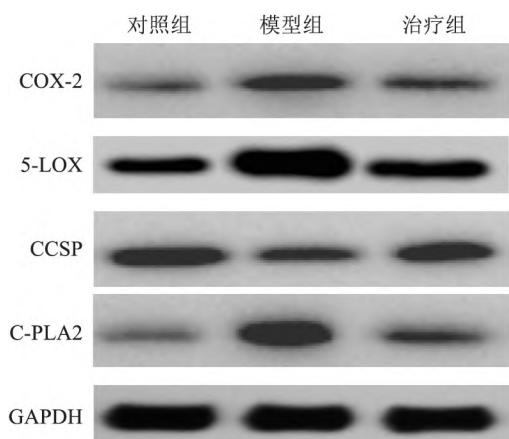


图6 各组肺组织中 COX-2、5-LOX、CCSP 和 C-PLA2 蛋白表达

胆、改善肾功能等作用。本研究拟评价经丹参多酚酸盐治疗后对 OLV 诱发肺损伤的效用及对 AA 代谢途径的影响,以期明确可能作用机制提供参考。

W/D 值结果显示:模型组 W/D 值高于对照组,而经丹参多酚酸盐治疗后 W/D 值下降。这说明 OLV 会诱发肺损伤,致使 W/D 值上升;透射电镜观察显示:对照组显示 AT-I 损伤较轻,而模型组线粒体肿胀,内质网显著扩张。治疗组 AT-I 超微结构损伤较模型组明显改善。这也证实 OLV 对肺组织产生损伤作用,而经丹参多酚酸盐治疗后能明显改善状况,具有保护作用。

AA 及其代谢物质如白三烯类 (LTs)、TXA₂、前列腺素类等是具有广泛生物学活性的重要炎性介质,在许多疾病的发生发展中起着重要作用^[8-10]。对于哺乳动物而言,AA 代谢途径主要有 2 类^[11-12]: ① 脂氧化酶 (LOX) 途径,大多源自 5-LOX 发挥致炎效能;② 环氧化酶 (COX) 途径。此途径可分泌 PGE₂、TXA₂、PGF₂ 与 PGI₂ 等生物活性物质。文献^[13]报道,众多的 AA 代谢产物中,对炎症反应影响最大的是 PGI₂,其抑制血小板聚集、舒张血管方面表现出强大作用;TXA₂ 具有很强的收缩血管作用,可诱发血栓及加速血小板聚集。在 LOX 途径中,5-LOX 是催化 AA 生成 LTs 物质的为主要途径^[14]。其中代谢产物 LTB₄ 对炎症反应影响较大,与多种疾病的炎症反应密切相关。ELISA 检测结果显示模型组肺组织中 AA、LTB₄、PGI₂、TXA₂ 含量均高于对照组,而丹参多酚酸盐治疗后上述含量较模型组均下降。这说明 OLV 诱发的肺损伤会引起 AA 代谢途径炎性物质的大量生成,而丹参多酚酸盐能起到抑制 AA 代谢途径的作用。

Western blot 和 RT-qPCR 结果显示,模型组肺

组织中 5-LOX、COX-2 蛋白和 mRNA 表达水平上升,出现急性肺损伤,而经丹参多酚酸盐治疗后 5-LOX、COX-2 蛋白和 mRNA 表达下降。这提示 OLV 能使 5-LOX 与 COX-2 这两条代谢途径活化,导致经其产生的 AA 代谢产物增加,出现肺损伤,而丹参多酚酸盐对 5-LOX 与 COX-2 这两条代谢途径均有抑制作用,因此能够起到减轻急性肺损伤作用;C-PLA₂ 广泛参与人体炎症反应,通过催化细胞内膜磷脂水解,产生以 AA 为主的游离脂肪酸和溶血磷脂,因此被认作是 AA 类产物生成及其所致后续炎症反应中最为重要的酶。而 Clara 细胞分泌蛋白是 Clara 细胞的主要分泌产物,被认为是 PLA₂ 强烈的内源性抑制剂,具有较强的抗炎作用。Western blot 结果还显示,与模型组相比,治疗组肺组织 C-PLA₂ 表达下降,而 CCSP 表达上升。这说明丹参多酚酸盐能够下调 C-PLA₂ 表达,上调 CCSP 表达,抑制 AA 等炎性产物生成,继而对 OLV 诱发的肺损伤起到保护功效。由上述结果推测,丹参多酚酸盐可能通过抑制 5-LOX,下调该途径主要产物 LTB₄ 表达,从而减少 TXA₂ 生成,起到炎症抑制作用。同时,丹参多酚酸盐还能通过抑制 COX-2 表达,从而减少代谢产物 PGI₂ 产生,进而下调 TXA₂ 生成。

综上,本研究证实 OLV 可激活 COX 和 5-LOX 途径导致 AA 代谢增加,而丹参多酚酸盐可能通过下调 5-LOX、COX-2、C-PLA₂ 表达,上调 CCSP 表达从而抑制 AA 代谢途径,对 OLV 诱发的肺损伤产生保护作用。

参考文献

- [1] 刘文雄,高敏,庞晓宏. 间断通气预处理对肺癌根治术中单肺通气时肺损伤以及 HIF-1 α /HO-1 表达的影响[J]. 海南医学院学报,2016,22(23): 2862-5.
- [2] Lohser J, Slinger P. Lung injury after one-lung ventilation: a review of the pathophysiologic mechanisms affecting the ventilated and the collapsed lung[J]. Anesth Analg,2015,121(2): 302-18.
- [3] Ferrando C, Mugarra A, Gutierrez A, et al. Setting individualized positive and expiratory pressure level with a positive end-expiratory pressure decrement trial after a recruitment maneuver improves oxygenation and lung mechanics during one-lung ventilation[J]. Anesth Analg,2014,118(3): 657-65.
- [4] Suga K, Kobayashi Y, Ochiai R. Impact of left heart bypass on arterial oxygenation during one-lung ventilation for thoracic aortic surgery[J]. J Cardiothorac Vasc Anesth,2017,31(4): 1197-202.
- [5] 任红微,于涛. 丹参多酚酸盐的研究进展及临床应用[J]. 天津中医药大学学报,2015,34(1): 59-63.

- [6] 陈成,邹襄谷,邱山东,等.丹参多酚酸盐对心力衰竭大鼠心肌肌球蛋白重链的影响[J].中国中西医结合杂志,2015,35(7):871-6.
- [7] Senturk M, Slinger P, Cohen E. Intraoperative mechanical ventilation strategies for one-lung ventilation[J]. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2015, 29(3):357-69.
- [8] 邵敏洁,池丽芬,金友雨,等.花生四烯酸代谢通路基因多态性与脑梗死及易损斑块交互作用研究[J].中华神经科杂志,2016,49(3):215-21.
- [9] 张怡,王勇,孟慧,等.复方丹参片调控AT1介导花生四烯酸PLA2-COX2/5-LOX代谢途径防治心力衰竭的机制研究[J].中国中药杂志,2018,43(12):2593-9.
- [10] 黄伟青,黄媛媛,牟宗霞,等.柠檬醛对花生四烯酸诱导血小板聚集抑制效果的影响[J].实用医学杂志,2017,33(21):3623-7.
- [11] Du J, Li X, Lin C, et al. Protective effects of arachidonic acid against paraquat-induced pulmonary injury [J]. *Inflammation*, 2015, 38(4):1458-63.
- [12] Serhan C N. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxins are the first lipid mediator of endogenous anti-inflammation and resolution [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2005, 73(3-4):141-62.
- [13] Kiyomiya K, Ohishi S. Involvement of arachidonic acid metabolites in acute inflammation: detection of 6-keto-PGF1 α , thromboxane B2 and PGD2 in rat pleurisy induced by phorbol myristate acetate [J]. *Jpn J Pharmacol*, 1985, 39:201-6.
- [14] Sala A, Zarini S, Bolla M. Leukotrienes: lipid bioeffectors of inflammatory reactions [J]. *Biochemistry (Mosc)*, 1998, 63:84-92.

Changes of arachidonic acid metabolic pathway and intervention effect of salvianolic acid salt in OLV induced lung injury in rabbits

Chen Hua¹, Zhang Bosheng¹, Long Xiaoping²

(¹Dept of Traditional Chinese Medicine, ²Pulmonary and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001)

Abstract Objective To explore the protective effect and mechanism of salvianolic acid salt on acute lung injury induced by one lung ventilation (OLV) in rabbits. **Methods** 24 rabbits were randomly divided into three groups: control group, model group and treatment group, with 8 rabbits in each group. The W/D value of lung was measured, and the morphological changes of lung tissue were observed by HE staining and electron microscopy; The contents of arachidonic acid (AA), leukotriene B4 (LTB4), thromboxane A2 (TXA2) and prostacyclin 2 (PGI2) in rabbit lung tissue were detected by ELISA; The expressions of cyclooxygenase-2 (COX-2), 5-lipoxygenase (5-LOX) in lung tissue were detected by RT-qPCR; The expressions of COX-2, 5-LOX, clara cell secretory protein (CCSP) and cytoplasmic phospholipase A2 (C-PLA2) in lung tissue were detected by Western blot. **Results** The W/D ratio of model group was higher than that of control group, but decreased after treatment ($P < 0.05$); HE staining showed that in the model group, the capillaries were dilated and congested, there were red exudates in the alveoli, the walls of alveoli were thickened, and inflammatory cells were infiltrated, but the treatment of salvianolic acid salt was relieved; The mitochondria swelling, crista breaking and even disappearing were observed by transmission electron microscope in the model group, and alveolar epithelial cell I (AT-I) ultrastructural damage in the treatment group significantly improved compared with that in the model group; The AA, LTB4, TXA2 and PGI2 contents in the treatment group were lower than those in the model group ($P < 0.05$). RT-qPCR showed that the expression of COX-2 and 5-LOX in model group was higher than that in control group ($P < 0.05$), while the expression of COX-2 and 5-LOX decreased after Salvianolic acid salt treatment ($P < 0.05$); Western blot showed that the expression of COX-2, 5-LOX and C-PLA2 in treatment group was lower than that in model group, while the expression of CCSP increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Salvianolic acid salt has protective effect on lung injury induced by one-lung ventilation. Its mechanism may be related to down-regulation of COX-2, 5-LOX and C-PLA2 expression, up-regulation of CCSP expression.

Key words salvianolic acid salt; one lung ventilation; cyclooxygenase-2; 5-lipoxygenase; Clara cell secretory protein; Cytoplasmic phospholipase A2