

去铁胺对高氧机械通气大鼠肺表面活性蛋白 D 和抗氧化酶的影响

沙小兰 李玉兰 王晓霞 王晶晶 陈苏衡

【摘要】 目的 研究去铁胺(DFO)对高氧机械通气大鼠肺表面活性蛋白 D(SP-D)和抗氧化酶的影响。方法 雄性 SD 大鼠 24 只,体重 180~220 g。随机分为三组:空气组(M 组)、高氧组(H 组)和 DFO 组(D 组),每组 8 只。麻醉状态下,M 组行空气($FiO_2 = 21\%$)机械通气,H 组和 D 组行高氧($FiO_2 = 90\%$)机械通气。M 组和 H 组尾静脉输注生理盐水 1 ml/h,D 组尾静脉输注等容量 DFO(200 mg/kg,1 ml/h)。机械通气 4 h 后取左肺制备支气管肺泡灌洗液(BALF),取右肺组织制备肺组织匀浆、计算湿干重比(W/D)并制备病理切片、行病理损伤评分。采用 ELISA 法测定 BALF 和肺组织匀浆中 SP-D 含量、谷胱甘肽还原酶(GR)和黄嘌呤氧化酶(XOD)活性。**结果** H 组和 D 组 BALF 和肺组织匀浆中 SP-D 含量明显低于 M 组($P < 0.05$),GR 活性明显弱于 M 组($P < 0.05$),XOD 活性明显强于 M 组($P < 0.05$),W/D 和病理损伤评分明显高于 M 组($P < 0.05$)。D 组 SP-D 含量明显高于 H 组($P < 0.05$),GR 活性明显强于 H 组($P < 0.05$),XOD 活性明显弱于 H 组($P < 0.05$),W/D 和病理损伤评分明显低于 H 组($P < 0.05$)。**结论** 高氧机械通气 4 h 可造成明显的肺损伤和肺组织 SP-D 含量降低,去铁胺可增加 SP-D 含量、减轻肺损伤,其机制与增强肺组织 GR 活性和降低 XOD 活性有关。

【关键词】 去铁胺;肺表面活性蛋白 D;高氧;机械通气;肺损伤

Effect of deferoxamine on pulmonary surfactant protein D and antioxidant enzymes in rats exposed to hyperoxia ventilation SHA Xiaolan, LI Yulan, WANG Xiaoxia, WANG Jingjing, CHEN Suheng. Department of Anesthesiology, the First Medical College of Lanzhou University, Lanzhou 730000, China Corresponding author: LI Yulan, Email: jasm@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of deferoxamine (DFO) on pulmonary surfactant protein D (SP-D) and antioxidant enzymes in rats exposed to hyperoxia ventilation. **Methods** Twenty-four male sprague dawley rats, weighing 180–220 g, were randomly divided into 3 groups ($n = 8$): air group (group M), hyperoxia group (group H) and DFO group (group D). The rats in group M were ventilated with air ($FiO_2 = 21\%$) and the rats in groups H and D were ventilated with oxygen ($FiO_2 = 90\%$) for 4 h. Meanwhile, normal saline 1 ml/h was infused via tail vein in groups M and H. The rats in group D were infused intravenously with the same volume of DFO (200 mg/kg, 1 ml/h). Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was prepared in left lung after 4 h of ventilation. The right lung was taken to make tissue homogenate, the wet/dry weight (W/D) ratio was measured, the pathological changes was observed and the injury level was evaluated. The content of pulmonary surfactant protein D (SP-D), the activity of glutathione reductase (GR) and xanthine oxidase (XOD) were detected in BALF and lung homogenate by ELISA. **Results** The content of SP-D and the activity of GR in groups H and D were much lower than those in group M ($P < 0.05$). The activity of XOD, lung W/D and pathological evaluation in groups H and D were much higher than those in group M ($P < 0.05$). The content of SP-D and the activity of GR in group D were higher than those in group H ($P < 0.05$). Meanwhile, the activity of XOD, lung W/D and pathological evaluation in group D were significantly lower than those in group H ($P < 0.05$). **Conclusion** Four hours of hyperoxia ventilation causes significant lung injury and SP-D content reduction in lung tissue. Deroxamine infusion has an effect of increasing SP-D content and alleviating lung injury, and the mechanism is related to the increased GR and decreased XOD activity.

【Key words】 Deroxamine; Pulmonary surfactant protein D; Hyperoxia; Ventilation; Lung injury

DOI:10.12089/jca.2019.10.016

作者单位:730000 兰州大学第一临床医学院麻醉学专业(沙小兰、王晓霞、陈苏衡);兰州大学第一医院麻醉科(李玉兰、王晶晶)

通信作者:李玉兰, Email: jasm@sina.com

机械通气和供氧是维持全麻患者生命安全必不可少的措施,但全麻过程中患者经常出现高氧血症,严重者 PaO_2 可高达 180 mmHg 以上^[1]。高氧可通过激活氧化应激、增加自由基的产生等机制造成肺损伤^[2]。去铁胺(DFO)是一种铁离子螯合剂,可通过清除体内的游离铁减少氧自由基的产生。DFO 可通过减少肺泡巨噬细胞氧自由基的产生起到肺保护作用^[3],但 DFO 对高氧机械通气肺损伤的影响及其机制目前未见相关报道。本实验拟建立大鼠高氧机械通气肺损伤模型,探讨 DFO 对高氧机械通气肺损伤的作用及机制。

材料与方 法

实验动物与分组 健康清洁级雄性 SD 大鼠,体重 180~220 g,由兰州大学实验动物中心提供。饲养环境温度 21 ℃,湿度 40%~50%,食、水不限。随机分为三组:空气组(M组)、高氧组(H组)和 DFO 组(D组)。

模型建立 麻醉状态下, M 组行空气($\text{FiO}_2 = 21\%$)机械通气, H 组行高氧($\text{FiO}_2 = 90\%$)机械通气, D 组行高氧($\text{FiO}_2 = 90\%$)机械通气。24 只大鼠以 10%水合氯醛(HO4000035) 3 ml/kg 腹腔注射麻醉。尾静脉及左侧颈动脉穿刺置 24 G 留置针妥善固定后,行气管切开,置入改良的 24 G 留置针,接小动物呼吸机行机械通气,呼吸参数设置:RR 40~50 次/分, V_T 10 ml/kg, I:E 1:1,持续时间 4 h, Powerlab/16sp AD Instruments 监测 ECG。M 组和 H 组大鼠尾静脉微量泵输入生理盐水 1 ml/h, D 组大鼠尾静脉输注 DFO(200 mg/kg, 1 ml/h)^[3]。

术中依据 ECG 变化(大鼠 HR 较基础值增快幅度超过 30%)间断腹腔注射 10%水合氯醛初始剂量的 1/3~1/4 量和芬太尼 12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 维持麻醉。分别于机械通气 2、4 h 时采颈动脉血行血气分析,记录 PaO_2 、 PaCO_2 , 计算氧合指数(OI)。M 组将 PaO_2 控制在 80~120 mmHg, H 组和 D 组控制在 180~220 mmHg^[4], 根据血气分析结果弃去不达标者并补充样本。通气结束后立即结扎右侧支气管行左肺肺泡灌洗,留取支气管肺泡灌洗液(BALF),同时取右肺组织待检。

标本制备 机械通气 4 h 后先结扎右侧支气管,用磷酸盐(PBS)行左肺灌洗,每次 2.5 ml,充分回收,重复 2 次,回收率 >80% 为灌洗成功^[5],将 BALF 于常温下 3 000 r/min 离心 10 min,留取上清液。同时,取右肺前叶组织固定于 10%福尔马林液

中,送本院病理科制作石蜡包埋切片,常规 HE 染色,做病理形态学观察。后叶肺组织以滤纸沾干表面水分称量湿重,中叶肺组织用 4 ℃冷藏 PBS 漂洗、剔杂、称重,加入 9 倍组织质量的 PBS 液,冰水浴条件下用匀浆机充分研磨,制备肺组织匀浆,在 4 ℃恒温下 3 000 r/min 离心 15 min,留取上清液。

BALF 和肺组织匀浆中肺表面活性蛋白 D(SP-D)含量、谷胱甘肽还原酶(GR)和黄嘌呤氧化酶(XOD)活性测定 将 BALF 和肺组织匀浆离心后取上清液,按照 ELISA 试剂盒操作说明书,测定 SP-D 含量和 GR 和 XOD 活性。

肺湿干重比(W/D) 机械通气 4 h 处死大鼠后,取大鼠右肺后叶组织,以滤纸沾干表面水分,精密称量湿重(W)后置于 80 ℃干燥箱中干燥 72 h 后再称重,直至最后 3 次称重结果恒定即为干重(D),计算 W/D^[6]。

肺组织病理损伤评分 取右肺前叶组织制备病理切片,在 400 倍光镜下观察肺组织学变化并进行病理损伤评分,评分人员不知切片分组情况。评分方法^[7]: 0 分,肺血管、肺泡、间质及支气管均正常; 1 分,间质少量炎性细胞,间质及肺泡腔出血、水肿范围 <25%; 2 分,间质及部分肺泡腔有较多炎性细胞,间质增宽,毛细血管淤血,肺泡腔出血及水肿的范围在 25%~50%; 3 分,大部分肺泡和间质有炎性细胞聚集成团,间质明显增宽,肺泡腔出血和水肿的范围在 50%~75%。

统计分析 采用 SPSS 22.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 SNK 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

动脉血气分析和 OI 机械通气 2、4 h 时 H 组和 D 组 OI 明显低于 M 组($P < 0.05$)。H 组和 D 组 OI 差异无统计学意义。三组不同时点 OI 差异无统计学意义(表 1)。

表 1 三组大鼠不同时点 OI 的比较(mmHg, $\bar{x}\pm s$)

组别	只数	机械通气 2 h	机械通气 4 h
M 组	8	414.3±8.9	409.7±6.3
H 组	8	229.4±8.9 ^a	233.3±8.1 ^a
D 组	8	220.3±12.1	226.5±10.9

注:与 M 组比较,^a $P < 0.05$

BALF 中 SP-D 含量、GR 和 XOD 活性 H 组和 D 组 BALF 中 SP-D 含量明显低于 M 组 ($P < 0.05$), GR 活性明显弱于 M 组 ($P < 0.05$), XOD 活性明显强于 M 组 ($P < 0.05$)。D 组 SP-D 含量明显高于 H 组 ($P < 0.05$), GR 活性明显强于 H 组 ($P < 0.05$), XOD 活性明显弱于 H 组 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 三组大鼠机械通气后 BALF 中 SP-D 含量及 GR 和 XOD 活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	SP-D (pg/ml)	GR (U/L)	XOD (U/L)
M 组	8	39.7 ± 0.3	254.8 ± 2.7	3.7 ± 0.1
H 组	8	35.4 ± 0.9 ^a	226.8 ± 3.2 ^a	4.2 ± 0.1 ^a
D 组	8	37.4 ± 0.8 ^{ab}	245.6 ± 4.1 ^{ab}	3.9 ± 0.1 ^{ab}

注:与 M 组比较,^a $P < 0.05$;与 H 组比较,^b $P < 0.05$

肺组织匀浆中 SP-D 含量及 GR 和 XOD 活性 H 组和 D 组肺组织匀浆中 SP-D 含量明显低于 M 组 ($P < 0.05$), GR 活性明显弱于 M 组 ($P < 0.05$), XOD 活性明显强于 M 组 ($P < 0.05$)。D 组 SP-D 含量明显高于 H 组 ($P < 0.05$), GR 活性明显强于 H 组 ($P < 0.05$), XOD 活性明显弱于 H 组 ($P < 0.05$) (表 3)。

表 3 三组大鼠机械通气后肺组织匀浆中 SP-D 含量及 GR 和 XOD 活性的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	SP-D (pg/ml)	GR (U/L)	XOD (U/L)
M 组	8	45.3 ± 0.5	280.1 ± 2.8	4.1 ± 0.1
H 组	8	41.6 ± 0.3 ^a	249.9 ± 3.6 ^a	4.8 ± 0.1 ^a
D 组	8	43.8 ± 0.4 ^{ab}	268.3 ± 4.7 ^{ab}	4.4 ± 0.1 ^{ab}

注:与 M 组比较,^a $P < 0.05$;与 H 组比较,^b $P < 0.05$

W/D 和肺组织病理损伤评分 H 组和 D 组 W/D 值明显高于 M 组 ($P < 0.05$), D 组 W/D 值明显低于 H 组 ($P < 0.05$)。H 组和 D 组病理损伤评分明显高于 M 组 ($P < 0.05$); D 组病理损伤评分明显低于 H 组 ($P < 0.05$) (表 4)。

肺组织 HE 染色 与 H 组比较, D 组肺泡结构、形态、大小、炎性细胞的渗出程度等损伤明显减轻。

M 组肺泡结构基本完整,肺泡壁光滑,腔内未见明显渗出,肺泡间隔均匀一致。H 组肺泡壁断裂、破坏明显,肺泡间隔明显增厚,伴炎性细胞的渗出 (图 1)。

表 4 三组大鼠 W/D 和病理损伤评分的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	W/D	病理评分 (分)
M 组	8	3.8 ± 0.1	0.6 ± 0.5
H 组	8	4.4 ± 0.1 ^a	2.8 ± 0.5 ^a
D 组	8	4.0 ± 0.1 ^{ab}	1.6 ± 0.6 ^{ab}

注:与 M 组比较,^a $P < 0.05$;与 H 组比较,^b $P < 0.05$

讨 论

研究表明,将哺乳动物长时间暴露于高氧环境会引起氧化应激和炎性细胞活化,产生大量氧自由基,从而造成肺损伤,但高氧肺损伤的具体机制尚不明确^[8]。本实验中,根据大鼠血气分析、OI 值、肺组织病理损伤评分和 W/D 结果,可见短时间高氧机械通气造成明显肺损伤, DFO 处理后大鼠肺损伤程度有所减轻。同时,短时间高氧机械通气后大鼠 BALF 和肺组织匀浆中 SP-D 含量明显降低, GR 活性明显减弱, XOD 活性明显增强; DFO 静脉输注后, SP-D 含量明显增加, GR 活性明显增强, XOD 的活性明显降低。

目前认为高氧肺损伤的主要机制是肺组织的氧化应激^[9-10],当肺组织处于氧化应激状态时,一方面,可通过增强 XOD 的活性,催化黄嘌呤氧化,产生大量的氧自由基;另一方面,通过激活中性粒细胞,使其耗氧增加,导致脂质过氧化、DNA 损伤和细胞凋亡坏死。研究发现 SP-D 可阻断氧自由基的形成或传播,充当脂质过氧化的抑制剂^[11],但肺组织中的氧化应激与 SP-D 含量的降低是否有关尚不明确。临床上, SP-D 基因缺陷的患儿肺功能受损的几率明显大于正常儿童,提示 SP-D 缺乏可造成一定程度的肺损伤^[12]。本实验中短时间高氧机械通气后大鼠肺组织 SP-D 的含量明显降低, DFO 处理后

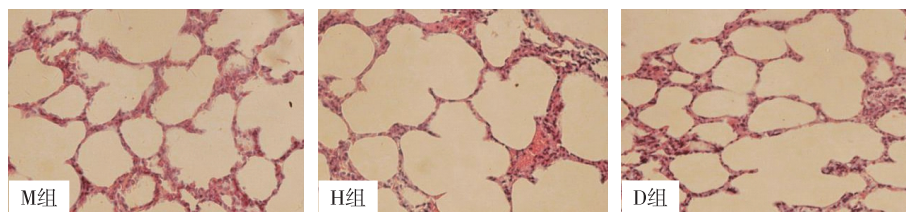


图 1 三组大鼠右肺组织病理学 HE 染色图 (×400)

明显回升,证明高氧机械通气肺损伤的机制可能与肺组织 SP-D 的含量降低有关,DFO 处理可减轻高氧肺损伤的机制可能与减轻其降低程度有关。

XOD 和 GR 是氧自由基代谢过程中的关键酶^[13-14],其中 XOD 可通过催化黄嘌呤氧化产生大量氧自由基,GR 可促进氧化型谷胱甘肽(GSSG)向还原型谷胱甘肽(GSH)转换,加速 GSH 清除氧自由基,故 XOD 和 GR 的活性变化可反映体内氧自由基的变化。本实验中短时间高氧机械通气后大鼠 BALF 和肺组织匀浆中 XOD 活性明显增强,GR 的活性明显减弱,表明短时间机械通气后大鼠肺组织氧自由基产生过多、氧化-抗氧化系统失衡可能是高氧肺损伤的主要原因。

近年来,抗氧化剂治疗高氧肺损伤的作用逐渐被认可,DFO 作为一种铁离子螯合剂,可通过清除铁离子抑制其参与的 Fenton/Haber-Weiss 反应,减少氧自由基的产生并抑制脂质过氧化^[15]。本实验发现,DFO 可通过减弱 XOD 活性,增强 GR 活性,加速氧自由基的清除,使大鼠肺组织氧化应激水平降低,减轻高氧引起的肺损伤。

综上所述,高氧机械通气引起的肺损伤可能与大鼠肺组织中 SP-D 含量降低有关,DFO 静脉输注可减轻高氧机械通气肺损伤,其机制可能与大鼠肺组织中 SP-D 含量升高、GR 活性增强和 XOD 活性减弱有关。DFO 对高氧机械通气肺损伤的预防和治疗有一定的临床价值。高氧机械通气及去铁胺对肺泡 II 型上皮细胞的具体影响还有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Egi M, Kataoka J, Ito T, et al. Oxygen management in mechanically ventilated patients; a multicenter prospective observational study. *J Crit Care*, 2018, 46: 1-5.
- [2] Kawaguchi T, Yanagihara T, Yokoyama T, et al. Probucol attenuates hyperoxia-induced lung injury in mice. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175129.
- [3] Zhu W, Huang Y, Ye Y, et al. Deferoxamine preconditioning ameliorates mechanical ventilation-induced lung injury in rat model via ROS in alveolar macrophages; a randomized controlled study. *BMC Anesthesiol*, 2018, 18(1): 116.
- [4] Page D, Ablordeppey E, Wessman BT, et al. Emergency department hyperoxia is associated with increased mortality in mechanically ventilated patients; a cohort study. *Crit Care*, 2018, 22(1): 9.
- [5] Fukuhara K, Nakashima T, Abe M, et al. Suplatast tosilate protects the lung against hyperoxic lung injury by scavenging hydroxyl radicals. *Free Radic Biol Med*, 2017, 106: 1-9.
- [6] 孙亚林, 李廷伸, 吕帅国, 等. 盐酸戊乙奎醚对新生大鼠内毒素性急性肺损伤时肺氧化应激和细胞凋亡的影响. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(7): 701-704.
- [7] Ozdemir R, Demirtas G, Parlakpinar H, et al. Dexpanthenol therapy reduces lung damage in a hyperoxic lung injury in neonatal rats. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2016, 29(11): 1801-7.
- [8] Lv R, Zheng J, Ye Z, et al. Advances in the therapy of hyperoxia-induced lung injury: findings from animal models. *Undersea Hyperb Med*, 2014, 41(3): 183-202.
- [9] Ye Y, Lin P, Zhang W, et al. DNA repair interacts with autophagy to regulate inflammatory responses to pulmonary hyperoxia. *J Immunol*, 2017, 198(7): 2844-2853.
- [10] Veith AC, Bou AB, Jiang W, et al. Mice lacking the cytochrome P450 1B1 gene are less susceptible to hyperoxic lung injury than wild type. *Toxicol Sci*, 2018, 165(2): 462-474.
- [11] Wu NC, Liao FT, Cheng HM, et al. Intravenous superoxide dismutase as a protective agent to prevent impairment of lung function induced by high tidal volume ventilation. *BMC Pulm Med*, 2017, 17(1): 105.
- [12] 徐丽, 谭榜宪, 李华. 表面活性蛋白 D 基因多态性与肺部疾病易感性的研究进展. *现代预防医学*, 2018, 45(11): 2043-2046.
- [13] Wang B, Yang RN, Zhu YR, et al. Involvement of xanthine oxidase and paraoxonase I in the process of oxidative stress in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Med Rep*, 2017, 15(1): 387-395.
- [14] Zhu Z, Du S, Du Y, et al. Glutathione reductase mediates drug resistance in glioblastoma cells by regulating redox homeostasis. *J Neurochem*, 2018, 144(1): 93-104.
- [15] 苏松, 向证文, 贺凯, 等. 铁离子螯合剂对肝细胞冷缺血再灌注损伤的保护机制研究. *中国现代医学杂志*, 2014, 24(31): 21-25.

(收稿日期:2019-01-31)