

盐酸纳美芬对肺缺血-再灌注损伤大鼠肺组织 β -内啡肽及 IL-17 的影响*

徐标,曾昆,孟祥平

(华中科技大学同济医学院附属普爱医院急诊部,武汉 430035)

摘要 目的 研究盐酸纳美芬对缺血-再灌注损伤肺的保护作用及其机制。方法 将40只大鼠随机分为模型对照组、盐酸纳美芬大剂量组、盐酸纳美芬小剂量组、假手术组,每组10只。除假手术组外,其他各组以左肺门阻断法建立肺缺血-再灌注模型。盐酸纳美芬大、小剂量组大鼠分别于阻断左肺门前10 min尾静脉注射盐酸纳美芬20,10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。假手术组不阻断肺门,不予任何治疗。各组大鼠于再灌注2 h后检测动脉血气值,留取左肺上叶组织观察肺组织损伤程度,检测肺组织湿/干重比值以及 β -内啡肽、白细胞介素17(IL-17)表达。结果 与模型对照组比较,盐酸纳美芬小剂量组动脉血二氧化碳分压(PCO_2)、肺组织损伤程度、湿/干重比值以及 β -内啡肽、IL-17表达均显著降低($P < 0.01$),动脉血氧分压(PO_2)显著升高($P < 0.01$)。与盐酸纳美芬小剂量组比较,盐酸纳美芬大剂量组动脉血 PCO_2 、肺组织损伤程度、湿/干重比值以及 β -内啡肽、IL-17表达均显著降低($P < 0.01$),动脉血 PO_2 显著升高($P < 0.01$)。结论 盐酸纳美芬可通过减少肺组织内 β -内啡肽生成、抑制IL-17表达而发挥预防肺缺血-再灌注损伤作用,其作用呈剂量依赖性。

关键词 纳美芬;盐酸;损伤,肺缺血-再灌注; β -内啡肽;白细胞介素-17

中图分类号 R285.5;R965

文献标识码 A

文章编号 1004-0781(2017)03-0272-04

DOI 10.3870/j.issn.1004-0781.2017.03.009

Effect of Nalmefene Hydrochloride on Expressions of Pulmonary β -endorphin and Interleukin-17 in Rats with Lung Ischemia-reperfusion Injury

XU Biao, ZENG Kun, MENG Xiangping (Department of Emergency Clinic, Puai Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430035, China)

ABSTRACT Objective To study the protective effect of nalmefene hydrochloride on lung ischemia-reperfusion injury and its mechanism. **Methods** 40 rats were randomly divided into model group, high dose of nalmefene group, low dose nalmefene group and sham operation group equally ($n = 10$). The lung ischemia-reperfusion model was established by occlusion of the left pulmonary hilum. The intravenous injection of nalmefene (20, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) was applied at 10 minutes before occlusion of the left pulmonary hilum in the high dose of nalmefene group and the low dose of nalmefene group, respectively. The sham operation group without occlusion of the left pulmonary hilum was not given any treatment. At 2 h after reperfusion, all rats were detected arterial blood gas value and then sacrificed. The specimens from the upper lobe of the left lung tissue were preserved to observe pulmonary lesions, detect the ratio of wet / dry weight and the expressions of β -endorphin and interleukin (IL)-17.

Results Compared with the model group, the value of PCO_2 , the degree of pulmonary lesions, the ratio of wet / dry weight and the expressions of β -endorphin and IL-17 in lung tissue were significantly decreased ($P < 0.01$), while the value of PO_2 was significantly increased ($P < 0.01$) in the low dose of nalmefene group. Compared with the low dose of nalmefene group, the value of PCO_2 , the degree of pulmonary lesions, the ratio of wet/dry weight and the expressions of β -endorphin and IL-17 in lung tissue were significantly decreased ($P < 0.01$), while the value of PO_2 was significantly increased ($P < 0.01$) in the high dose of nalmefene group. **Conclusion** Nalmefene hydrochloride may prevent lung ischemia-reperfusion injury in a dose dependent manner by reducing the production of β -endorphin and inhibiting the expression of IL-17 in lung tissue.

KEY WORDS Nalmefene, hydrochloride; Injury, lung ischemia-reperfusion; β -endorphin; Interleukin-17

收稿日期 2015-12-20 修回日期 2016-02-12

基金项目 *武汉市卫计委科研项目(WX14C58)

作者简介 徐标(1979-),男,湖北武汉人,副主任医师,硕士,研究方向:常见危急重症防治。电话:027-68831420, E-mail: xubiao110@126.com。

通信作者 曾昆(1971-),男,湖北武汉人,主任医师,硕士,研究方向:呼吸系统、心血管系统危重症防治。电话:027-68831420, E-mail: zengkun1971@163.com

肺缺血-再灌注损伤(lung ischemia-reperfusion injury, LIRI)是急性呼吸窘迫综合征发生、发展的关键途径^[1]。研究发现,阿片肽与肺毛细血管内皮细胞表面受体的相互作用在急性肺损伤发生、发展过程中发挥重要作用^[2]。盐酸纳美芬作为新一代阿片肽受体拮抗药,具有减轻肺淤血等作用^[3],但笔者尚未见其预防肺缺血-再灌注损伤的报道。笔者在本研究以盐酸纳美芬预防性应用于肺缺血-再灌注损伤模型大鼠,

探讨其保护肺缺血-再灌注损伤的作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠,体质量 (250 ± 30) g,购自同济医学院实验动物中心,动物生产许可证号:SCXK(鄂)2010-0009,在洁净动物饲养室内以普通饲料饲养。动物饲养室温度 20 ~ 25 ℃,相对湿度 45% ~ 70%,保持门窗密闭,使用空气净化系统。

1.2 主要药物试剂与仪器 盐酸纳美芬注射液(商品名:乐萌,成都天台山制药有限公司产品,规格:1 mL:0.1 mg,批准文号:国药准字 H20080645,批号:150810)。兔抗大鼠 β-内啡肽(货号:sc-71044)、白细胞介素-17(IL-17,货号:sc-7927)单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)试剂盒(货号:AR0146)购自武汉博士德生物工程有限公司。DYCZ—25D 电泳仪(北京六一仪器厂),GS800 光密度扫描仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 动物模型的建立、分组与给药 采用随机数字表法将 40 只大鼠随机均分为 4 组,每组 10 只。模型对照组参考文献[4]方法开胸游离左肺门,夹闭 45 min 后解除阻断,观察 5 min 后肺组织膨胀情况,颜色恢复表明成功建立肺缺血-再灌注模型,继续再灌注 2 h,经右颈总动脉采血,留取血标本后处死大鼠,留取左肺上叶组织待检。盐酸纳美芬大剂量组参考文献[5]方法,于阻断左肺门前 10 min 尾静脉注射盐酸纳美芬(20 μg·kg⁻¹),余处理同模型对照组。盐酸纳美芬小剂量组于阻断左肺门前 10 min 时尾静脉注射盐酸纳美芬(10 μg·kg⁻¹),余处理同模型对照组。假手术组开胸游离左肺门,不夹闭,各组在相同时间点尾静脉注射等体积 0.9% 氯化钠溶液,处死大鼠。

1.4 动脉血气分析 取大鼠动脉血,罗氏 cobas b 221 血气分析仪(瑞士罗氏公司)检测动脉血氧分压(PO₂)、二氧化碳分压(PCO₂)。

1.5 肺组织湿/干重(W/D)测定 取左肺上叶组织,滤纸吸干其表面水分后称重,计为湿重(W);置 60 ℃ 恒温箱,烘烤 72 h 至恒重后称重,计为干重(D);计算肺组织 W/D。

1.6 肺组织病理观察 取左肺上叶组织,10% 甲醛溶液固定 48 h 后常规切成厚 5 μm 石蜡切片,苏木精-伊红(HE)染色后光镜下观察肺组织病理形态变化。

1.7 肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构观察 剪取 0.5 cm × 0.5 cm × 0.3 cm 左肺上叶组织,日立 HT7700 透射电镜(日本日立公司)观察肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构改变。

1.8 Western blotting 检测肺组织 β-内啡肽、IL-17 表

达 取大鼠肺组织,每份 100 mg,匀浆后加入适量组织蛋白裂解液,离心后吸取上清液,按照 BCA 蛋白定量试剂盒操作。样品经 15% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis,SDS-PAGE)分离后,转移于硝酸纤维素膜上。以 1:1 000 兔抗大鼠 β-内啡肽、IL-17 单克隆一抗 4 ℃ 静置孵育过夜,再以 1:10 000 过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗室温孵育 2 h,用 ECL 试剂盒发光显影,同时检测甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase,GAPDH)的表达作为内参对照。图片经 GS800 光密度图像扫描仪(美国 Bio-Rad 公司)扫描,以 Quantity One 软件对结果进行分析,检测各组大鼠肺组织 β-内啡肽、IL-17 与 GAPDH 表达灰度的比值。

1.9 统计学方法 采用 SAS 9.0 版软件行方差分析。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组均数比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠动脉血气分析及肺组织湿/干重比值与模型对照组比较,盐酸纳美芬小剂量组 W/D(*t* = 31.17, *P* < 0.01)、PCO₂(*t* = 26.51, *P* < 0.01)均显著降低,PO₂显著升高(*t* = 28.71, *P* < 0.01)。与盐酸纳美芬小剂量组比较,盐酸纳美芬大剂量组 W/D(*t* = 9.67, *P* < 0.01)、PCO₂值(*t* = 11.05, *P* < 0.01)均显著降低,PO₂显著升高(*t* = 15.09, *P* < 0.01)。

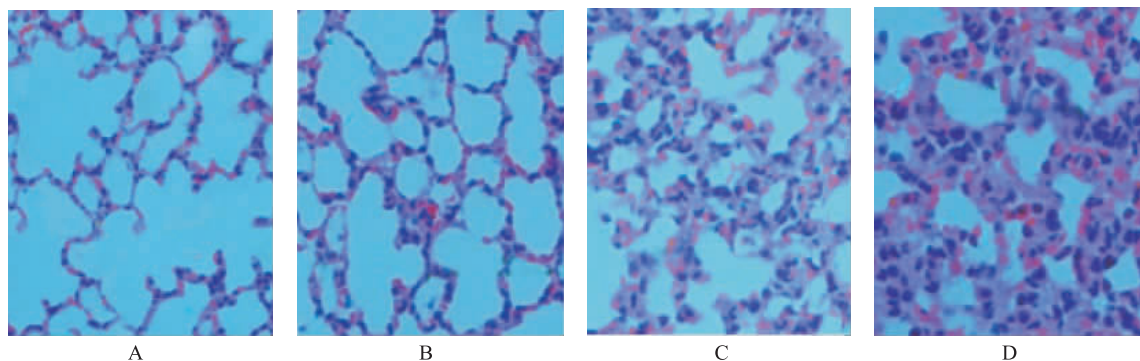
表 1 4 组大鼠动脉血气分析及肺组织 W/D
Tab.1 Analysis of arterial blood gas and the ratio of wet/dry weight of lung tissue in four groups of rats

| $\bar{x} \pm s, n = 10, \text{kPa}$ | | | |
|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 组别 | PO ₂ | PCO ₂ | W/D |
| 假手术组 | 13.52 ± 0.11 | 3.02 ± 0.19 | 3.04 ± 0.17 |
| 模型对照组 | 6.32 ± 0.15 ^{*1} | 8.29 ± 0.22 ^{*1} | 8.91 ± 0.28 ^{*1} |
| 纳美芬大剂量组 | 9.96 ± 0.28 ^{*2*3} | 4.06 ± 0.26 ^{*2*3} | 4.15 ± 0.24 ^{*2*3} |
| 纳美芬小剂量组 | 8.59 ± 0.20 ^{*2} | 5.37 ± 0.27 ^{*2} | 5.21 ± 0.25 ^{*2} |

与假手术组比较,^{*1}*P* < 0.01;与模型对照组比较,^{*2}*P* < 0.01;与盐酸纳美芬小剂量组比较,^{*3}*P* < 0.01

Compared with sham operation group, ^{*1}*P* < 0.01; Compared with model control group, ^{*2}*P* < 0.01; compared with low-dose nalmefene hydrochloride group, ^{*3}*P* < 0.01

2.2 大鼠肺组织病理变化 见图 1。假手术组肺组织结构完整清晰,肺泡腔内无炎症细胞浸润,肺间质无渗出;模型对照组及盐酸纳美芬大剂量、小剂量组均可见肺泡大小不等,部分肺泡壁断裂呈气肿状,部分肺泡



A. 假手术组; B. 盐酸纳美芬大剂量组; C. 盐酸纳美芬小剂量组; D. 模型对照组
A. sham operation group; B. high-dose nalmefene group; C. low-dose nalmefene group; D. model control group

图1 4组大鼠肺组织病理特征(HE, ×400)

Fig.1 Pathological feature of lung tissue in four groups of rats (HE, ×400)

萎陷,肺泡壁增宽,肺泡毛细血管扩张,肺间质见多形核炎症细胞浸润。在病变程度和病变范围上,盐酸纳美芬小剂量组明显较模型对照组减轻,盐酸纳美芬大剂量组较小剂量组减轻。

2.3 透射电镜下大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞病变 见图2。假手术组肺组织结构基本正常,肺泡Ⅱ型上皮细胞微绒毛排列整齐,细胞质内有大量板层小体和线粒体,板层小体结构清晰,基膜完整。盐酸纳美芬大剂量组病变明显减轻,可见大量板层小体和线粒体,板层小体结构轻微混乱。盐酸纳美芬小剂量组线粒体出现空泡化,板层小体轻微空泡化。模型对照组肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤,纤毛轻微断裂、融合,板层小体空泡化,嗜碱性板层小体排空。盐酸纳美芬小剂量组比模型对照组病变程度和病变范围明显减轻,盐酸纳美芬大剂量组比小剂量组明显减轻。

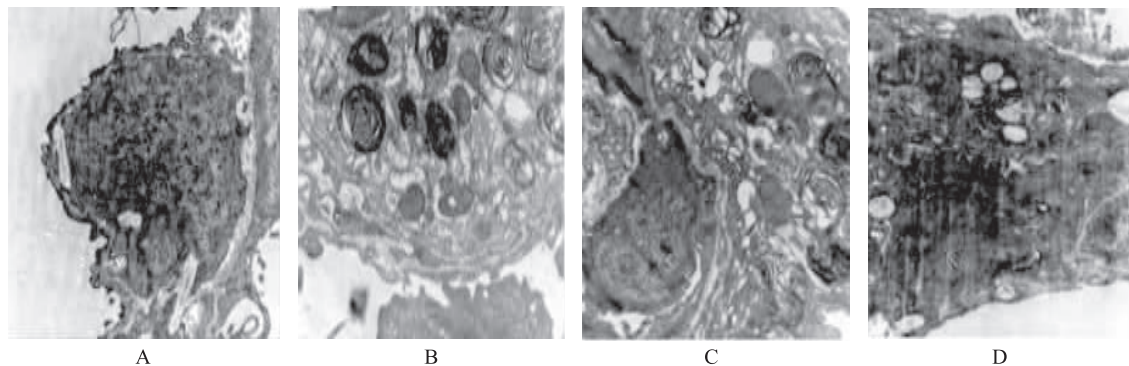
2.4 4组大鼠肺组织β-内啡肽、IL-17表达水平 与

模型对照组比较,盐酸纳美芬小剂量组β-内啡肽($t = 27.01, P < 0.01$)、IL-17($t = 21.83, P < 0.01$)表达均显著降低。与盐酸纳美芬小剂量组比较,盐酸纳美芬大剂量组β-内啡肽($t = 4.86, P < 0.01$)、IL-17($t = 7.02, P < 0.01$)表达均显著降低。见图3,4,表2。

3 讨论

研究发现,肺缺血-再灌注损伤病理变化表现为肺泡-毛细血管屏障通透性增高,间质水肿及炎症细胞浸润,细胞损伤及凋亡,最终导致换气功能障碍、肺水肿、呼吸衰竭^[6]。其具体发病机制尚未明了,可能与大量炎症细胞因子产生、自由基、蛋白水解酶释放、钙离子超载、能量代谢异常及微循环障碍等有关^[7]。

研究发现,内源性阿片肽物质中活性最强、分布最广的是β-内啡肽^[8]。阿片肽及其受体广泛存在于Ⅰ、Ⅱ型肺泡细胞、毛细血管内皮细胞表面^[9]。实验发现,急性肺损伤时大量阿片肽与肺毛细血管内皮细胞



A. 假手术组; B. 盐酸纳美芬大剂量组; C. 盐酸纳美芬小剂量组; D. 模型对照组
A. sham operation group; B. high-dose nalmefene group; C. low-dose nalmefene group; D. model control group

图2 4组大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤变化(×12 000)

Fig.2 Lesions of alveolar type II epithelial cells in four groups of rats(×12 000)

表面受体结合后可损伤细胞溶酶体膜结构、导致细胞膜通透性增加,诱导细胞凋亡,导致肺毛细血管通透性增加、肺间质水肿^[10]。IL-17 是多种炎症因子的起始因子,具有广泛的促炎作用,是强有力的中性粒细胞趋化及激活因子,可早期特异性地出现在炎症部位,在肺组织炎症启动中发挥主要作用。在急性肺缺血-再灌注损伤中,IL-17 可趋化巨噬细胞、中性粒细胞大量聚集,诱导炎症反应发生,导致肺组织损伤。随着肺组织损伤加重,肺组织中 IL-17 表达明显升高^[11]。

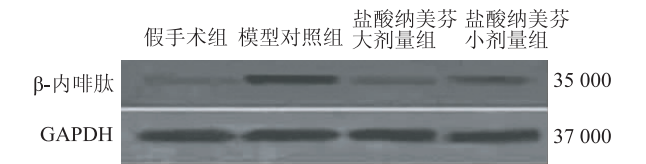


图 3 4 组大鼠肺组织 β-内啡肽表达 (Western blotting)
Fig. 3 β-EP expression of lung tissue in four groups of rats (Western blotting)

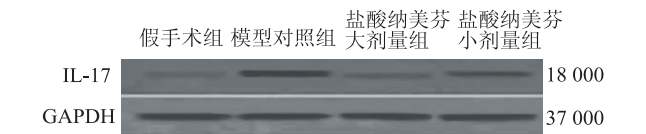


图 4 4 组大鼠肺组织 IL-17 表达 (Western blotting)
Fig. 4 Expression of IL-17 of lung tissue in four groups of rats (Western blotting)

表 2 4 组大鼠肺组织 β-内啡肽与 IL-17 表达水平
Tab. 2 Expressions of β-EP and IL-17 of lung tissue in four groups of rats

| 组别 | β-内啡肽 | IL-17 |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|
| 假手术组 | 0.06 ± 0.03 | 0.04 ± 0.02 |
| 模型对照组 | 0.89 ± 0.02 ^{*1} | 0.83 ± 0.01 ^{*1} |
| 盐酸纳美芬大剂量组 | 0.31 ± 0.06 ^{*2*3} | 0.25 ± 0.04 ^{*2*3} |
| 盐酸纳美芬小剂量组 | 0.43 ± 0.05 ^{*2} | 0.41 ± 0.06 ^{*2} |

与假手术组比较, ^{*1}*P* < 0.01; 与模型对照组比较, ^{*2}*P* < 0.01; 与盐酸纳美芬小剂量组比较, ^{*3}*P* < 0.01

Compared with sham operation group, ^{*1}*P* < 0.01; Compared with model control group, ^{*2}*P* < 0.01; compared with low-dose nalmefene group, ^{*3}*P* < 0.01

本研究发现,模型对照组大鼠肺泡组织炎症反应、肺功能损害(表现为血 PO₂ 下降、PCO₂ 升高)明显加重,肺组织 β-内啡肽、IL-17 明显升高,表明肺组织 β-内啡肽、IL-17 过度表达在肺缺血-再灌注损伤后炎症反应发生、发展及肺功能损害过程中发挥重要作用。盐酸纳美芬能竞争性抑制拮抗其作用,加速阿片肽物质失活、降解^[12]。小剂量预防性应用盐酸纳美芬后,肺缺血-再灌注后损伤及肺功能损害程度伴随肺组织

中 β-内啡肽、IL-17 水平明显下降,表明盐酸纳美芬预防肺缺血-再灌注损伤的机制可能与加速 β-内啡肽失活、降解、抑制 IL-17 表达、减轻炎症反应有关。加大盐酸纳美芬剂量后,β-内啡肽、IL-17 水平进一步下降,保护肺组织作用更强,表明纳美芬预防肺缺血-再灌注损伤的作用可呈剂量依赖性。

盐酸纳美芬较之传统药物如纳洛酮,其拮抗阿片受体的作用时间更长,膜通透性更强,生物利用度更高,且不良反应小^[13]。本研究发现不同剂量盐酸纳美芬预防性应用于肺缺血-再灌注损伤模型,可减轻肺缺血-再灌注损伤后肺组织损伤及炎症反应,改善肺功能。

参考文献

[1] WEYKER P D, WEBB C A, KIAMANESH D, et al. Lung ischemia reperfusion injury: a bench-to-bedside review [J]. Semin Cardiothorac Vasc Anesth, 2013, 17(1): 28 - 43.

[2] MAHLER D A. Opioids for refractory dyspnea [J]. Exp Rev Respir Med, 2013, 7(2): 123 - 135.

[3] 王洪亮, 于凯江, 刘海涛. 纳美芬治疗感染性休克的临床疗效观察 [J]. 中华危重病急救医学, 2010, 22(6): 351 - 353.

[4] ZHENG Z K, WANG J J, HU H, et al. Short-term inhalation of nitric oxide inhibits activations of toll-like receptor 2 and 4 in the lung after ischemia-reperfusion injury in mice [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2013, 33(2): 219 - 223.

[5] SALIMI V, HENNUS M P, MOKHTARI-AZAD T, et al. Opioid receptors control viral replication in the airways [J]. Crit Care Med, 2013, 41(1): 205 - 214.

[6] 赵立芳, 江锐, 基鹏, 等. 降钙素基因相关肽受体对大鼠肺缺血再灌注损伤中核因子-κB 表达的影响 [J]. 四川大学学报(医学版), 2012, 43(5): 666 - 669.

[7] TSOULFAS G, SVORONOS C. Lung ischemia-reperfusion injury: when NO (nitric oxide) does not always mean no [J]. J Surg Res, 2013, S0022-4804(13): 309 - 310.

[8] BODNAR R J. Endogenous opiates and behavior: 2011 [J]. Peptides, 2012, 38(2): 463 - 522.

[9] GONZALEZ-NUNEZ V, JIMENEZ Z G A, BARRETO-VALER K, et al. In vivo regulation of the μ opioid receptor: role of the endogenous opioid agents [J]. Mol Med, 2013, 19(1): 7 - 17.

[10] PENG J, SARKAR S, CHANG S L, et al. Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR [J]. Drug Alcohol Depend, 2012, 124(3): 223 - 228.

[11] LAN C C, PENG C K, HUANG S F, et al. Activated protein C attenuates ischemia-reperfusion-induced acute lung injury [J]. Exp Lung Res, 2015, 41(5): 241 - 250.

[12] OSBORN M D, LOWERY J J, SKORPUT A G, et al. In vivo characterization of the opioid antagonist nalmefene in mice [J]. Life Sci, 2010, 86(15/16): 624 - 630.

[13] 姜齐宏, 陈艳, 肖政. 盐酸纳美芬联合地塞米松治疗双硫仑样反应 41 例 [J]. 医药导报, 2013, 32(7): 899 - 901.