

## · 基础与危重医学 ·

## 异氟烷后处理减轻大鼠盲肠结扎穿孔所致急性肺损伤

吕 翔 董 翔 李启芳 姜 虹 朱也森

**【摘要】** 目的 研究异氟烷后处理对大鼠盲肠结扎穿孔(CLP)所致急性肺损伤(ALI)的保护作用。方法 将 48 只 Sprague-Dawley 雄性大鼠随机分为 4 组,每组 12 只:正常对照组,不做任何处理;假手术组,单纯行开腹关腹术;CLP 组,行 CLP 建立大鼠 ALI 模型;异氟烷组,CLP 模型建立后 4 h,使大鼠吸入体积分数为 0.014 的异氟烷 2 h。分别在实验后 6 和 24 h,每组各处死 6 只大鼠作为 6 h 亚组和 24 h 亚组。取腹主动脉血行动脉血气分析,取左肺测定肺组织湿/干重比(W/D),取心脏血测定血清肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-6 浓度,取右肺行苏木精-伊红(H-E)染色观察肺组织病理学变化、免疫组织化学染色观察核转录因子(NF)- $\kappa$ B 的表达。结果 假手术组大鼠的动脉血氧分压( $p_aO_2$ )、肺组织 W/D 及血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平与正常对照组的差异均无统计学意义( $P$  值均 $>0.05$ )。CLP 组和异氟烷组的  $p_aO_2$  均较正常对照组显著降低( $P$  值均 $<0.05$ ),肺组织 W/D 均较正常对照组显著增大( $P$  值均 $<0.05$ ),血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平均较正常对照组显著升高( $P$  值均 $<0.05$ );但异氟烷组上述指标的变化均较 CLP 组小,与 CLP 组比较的差异均有统计学意义( $P$  值均 $<0.05$ )。正常对照组和假手术组大鼠的肺组织无明显损伤;CLP 组大鼠的肺组织损伤严重,24 h 亚组的损伤更为明显;异氟烷组大鼠的肺组织损伤较 CLP 组轻。正常对照组和假手术组偶见 NF- $\kappa$ B 表达阳性细胞,CLP 组见大量 NF- $\kappa$ B 表达阳性细胞,异氟烷组的 NF- $\kappa$ B 阳性细胞数目较 CLP 组减少。结论 异氟烷后处理对脓毒症 ALI 具有保护作用,这种保护作用可能部分是通过抑制炎症因子和 NF- $\kappa$ B 的表达实现的。

**【关键词】** 异氟烷;急性肺损伤;盲肠结扎穿孔;后处理;核转录因子- $\kappa$ B

Postconditioning with isoflurane reduces acute lung injury induced by cecal ligation and perforation in rats LÜ Xiang, DONG Xiang, LI Qifang, JIANG Hong, ZHU Yesen. Department of Anesthesiology, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200011, China  
Corresponding author: JIANG Hong

**【Abstract】** Objective To study the protective effects of isoflurane postcondition on acute lung injury (ALI) induced by cecal ligation and perforation (CLP) in rats. Methods A total of 48 male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups ( $n=12$ ): normal group, without any treatment; sham operation group, with incision and closure of abdomen; CLP group, the CLP model was used to induce ALI; and isoflurane group, rats were anesthetized with 1.4% isoflurane at 4 h after CLP modeling for 2 h. Then 6 rats in each group were randomly killed by decapitation 6 h and 24 h after pretreatment. Blood samples of abdominal aorta were taken for arterial blood gas analysis. The tissues of left lung were taken for the determination of lung wet/dry (W/D) ratio. Tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) levels were measured with blood sample of heart. Histopathological changes of the right lung and the expression of nuclear factor (NF)- $\kappa$ B were observed by H-E staining and immunohistochemical staining, respectively. Results There were no significant differences in arterial oxygen partial pressure ( $p_aO_2$ ), the ratio of W/D or serum concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 between sham operation group and normal group ( $P>0.05$ ). The  $p_aO_2$  in CLP group and isoflurane group was significantly lower than that in the normal group, while the ratio of W/D and serum concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-6 in CLP group and isoflurane group were significantly higher than those in the normal group ( $P<0.05$ ). There were significant differences in above mentioned parameters between isoflurane group and CLP group ( $P<0.05$ ). There was no obvious lung injury in normal group or sham operation group. The rats in CLP group suffered more serious lung

作者单位: 200011 上海,上海交通大学医学院附属第九人民医院麻醉科  
通信作者: 姜虹

injury as compared with isoflurane group, and the lung injury at 24 h after precondition was much severe than that at 6 h after precondition. The cells with NF- $\kappa$ B expression were occasionally seen in normal group and sham operation group, while a large number of such cells were seen in CLP group. The cells with NF- $\kappa$ B expression were less in isoflurane group than in CLP group. Conclusion Postconditioning with isoflurane can ameliorate acute lung injury in sepsis in rats. The anti-inflammatory protection seems to be mediated partly through inhibition of the proinflammatory factors and the expression of NF- $\kappa$ B. (Shanghai Med J, 2012, 35: 867-870)

【Key words】 Isoflurane; Acute lung injury; Cecal ligation and puncture; Postconditioning; Nuclear factor- $\kappa$ B

脓毒症是临床常见的危重症之一,是由严重感染引起的不可控制的全身炎症反应综合征(SIRS),可迅速发展为脓毒性休克和多器官功能障碍综合征(MODS)。肺脏因其解剖、组织学特点而成为 SIRS 损伤的首位靶器官,主要表现为急性肺损伤(ALI),其最严重的阶段为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)<sup>[1]</sup>。虽然根据循证医学的方法提出了对脓毒症所致 ALI/ARDS 进行“综合性集束化治疗”的观点,包括控制原发病、适度的液体复苏、保护性机械通气和充分肺复张、应用小剂量激素、严格控制血糖、应用人体活化蛋白 C、营养支持等,但脓毒症 ALI 的治疗效果仍不满意,是导致重症监护病房(ICU)患者死亡的重要病因之一。异氟烷是目前临床上最常用的吸入麻醉药物,具有诱导苏醒迅速、血流动力学平稳等优点。近年来研究发现,一定剂量的异氟烷可发挥肺保护作用,并能提高 ALI 大鼠的存活率<sup>[2-3]</sup>。在内毒素血症肺损伤大鼠模型中,吸入异氟烷可显著降低血浆中肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 和白细胞介素(IL)- $\beta$ 水平,从而减轻大鼠肺损伤的程度<sup>[4]</sup>。此外,另有研究表明,异氟烷预处理对脓毒症致大鼠肝、肾损伤也具有一定的保护作用。由此可见,异氟烷的脏器保护作用确实存在<sup>[5]</sup>。关于异氟烷肺保护作用的研究多集中在预处理阶段,与临床诊疗过程不符,本研究采用异氟烷后处理的方式干预脓毒症 ALI 的进程,以期更贴近临床治疗过程。采用盲肠结扎穿孔(CLP)建立脓毒症致 ALI 大鼠模型,主要基于该模型更符合临床麻醉及 ICU 中腹膜炎患者 ALI 的病理生理改变的考虑。通过观察肺组织的病理学改变、检测炎症因子水平及行动脉血气分析等,探讨异氟烷后处理对 ALI 的保护作用。

## 1 材料与方 法

1.1 实验动物及模型制备 雄性 Sprague-Dawley 大鼠 48 只,体重 200~250 g,由上海西普

尔必凯实验动物有限公司提供。大鼠入住动物实验室后以标准饲料适应性喂养 3 d,所有大鼠均按无特定病原体(SPF)级动物饲养,饮用纯净水,24 h 通风,室温(23±2)℃。大鼠术前禁食 12 h,自由饮水。参照经典 CLP 模型的制备方法,建立脓毒症 ALI 大鼠模型:大鼠称重后,腹腔内注射 10%水合氯醛 350 mg/kg 麻醉后,固定大鼠,手术区备皮,常规消毒铺巾,沿腹正中线作长约 2 cm 的切口,开腹后暴露并分离盲肠,轻微分离盲肠根部系膜后在盲肠 1/2 处行环形结扎,然后用口径为 18 G 静脉留置针(德国贝朗医疗股份公司)在盲肠结扎处远端对穿 2 次,并自穿孔处挤出粪便约 0.1 mL 入腹腔,然后将肠管放回腹腔原位,并逐层关闭腹腔。术毕给大鼠皮下注射 0.9%氯化钠溶液 30 mL/kg,以补充术中丢失的液体。大鼠麻醉清醒后可予自由进食和饮水。

1.2 实验分组及方法 将大鼠随机分为 4 组,每组 12 只:正常对照组,不做任何处理;假手术组,单纯行开腹关腹术;CLP 组,行 CLP 建立大鼠 ALI 模型;异氟烷组,CLP 模型建立后 4 h 将大鼠放入一密封容器,容器上打有两孔,分别连接麻醉呼吸机的进气端及呼气端,呼气端接有麻醉气体浓度监测仪(智能麻醉气体监测模块,英国 GE 医疗公司),打开异氟烷挥发罐,调节麻醉气体浓度,使呼气端监测仪的异氟烷体积分数显示为 0.014,持续吸入异氟烷 2 h。分别在实验后 6 和 24 h 采用颈椎脱臼法每组各处死 6 只大鼠,作为 6 h 亚组和 24 h 亚组。

1.3 检测指标 ① 动脉血气分析:大鼠处死即刻取腹主动脉血 0.3 mL 进行动脉血气分析。② 肺组织湿/干重比(W/D)测定:大鼠处死后立即取左肺称湿重并记录,再置于 60℃烘箱烘干 72 h 致恒重后称干重,计算肺组织 W/D。③ 血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平测定:大鼠处死即刻采集心脏血 1 mL,于室温下静置 1 h 后离心(1 000×g, 15 min, 4℃),取上清液,置于-20℃保存备用,采用双抗

体夹心亲合素-生物素复合物法(ABC)-酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 TNF- $\alpha$  及 IL-6 水平,按照试剂盒(上海冠泰生物技术有限公司)说明书操作。

④ 肺组织病理学观察:取右肺下叶置于 4% 多甲醛溶液中固定 24 h,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片,苏木精-伊红(H-E)染色,于光学显微镜下观察病理形态学变化。⑤ 核转录因子(NF)- $\kappa$ B 观察:将大鼠肺组织固定于中性甲醛溶液中,常规石蜡包埋,连续作厚度为 5  $\mu$ m 的切片,采用免疫组织化学染色二氨基联苯胺(DAB)法,其中 NF- $\kappa$ B p65(兔抗大鼠 NF- $\kappa$ B p65 多克隆抗体,上海蓝基生物工程有限公司)的稀释度为 1:400,用磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照,细胞核或细胞质中出现明确棕色染色为阳性细胞。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计学软件。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK 法。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 动脉血气分析指标比较 假手术组大鼠的动脉血氧分压( $p_aO_2$ )与正常对照组的差异无统计

学意义( $P$  值  $> 0.05$ )。CLP 组和异氟烷组的  $p_aO_2$  均较正常对照组显著降低( $P$  值均  $< 0.05$ ),其中 24 h 亚组下降更为明显,均显著低于同组 6 h 亚组( $P$  值均  $< 0.05$ ),CLP 组 24 h 亚组已呈严重的缺氧状态。异氟烷组的  $p_aO_2$  均较 CLP 组显著升高( $P$  值均  $< 0.05$ )。见表 1。

2.2 肺组织 W/D 比较 假手术组大鼠的肺组织 W/D 与正常对照组的差异无统计学意义( $P$  值  $> 0.05$ )。CLP 组和异氟烷组的肺组织 W/D 均较正常对照组显著增大( $P$  值均  $< 0.05$ ),其中 24 h 亚组增大更为明显,均显著大于同组 6 h 亚组( $P$  值均  $< 0.05$ )。异氟烷组的肺组织 W/D 均较 CLP 组显著减小( $P$  值均  $< 0.05$ )。见表 1。

2.3 血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平比较 假手术组大鼠的血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平与正常对照组的差异均无统计学意义( $P$  值均  $> 0.05$ )。CLP 组和异氟烷组的血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平均较正常对照组显著升高( $P$  值均  $< 0.05$ ),但 24 h 亚组均显著低于同组 6 h 亚组( $P$  值均  $< 0.05$ )。异氟烷组 6 h 亚组的血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平均显著低于 CLP 组 6 h 亚组( $P$  值均  $< 0.05$ )。见表 1。

表 1 各组  $p_aO_2$ 、肺组织 W/D、血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平比较

( $n=6, \bar{x} \pm s$ )					
组别	亚组	$p_aO_2$ mmHg	W/D	TNF- $\alpha$ pg/mL	IL-6 pg/mL
正常对照	6 h	96.2 $\pm$ 3.7	4.12 $\pm$ 0.08	12.4 $\pm$ 3.6	23.6 $\pm$ 5.9
	24 h	94.4 $\pm$ 3.9	4.15 $\pm$ 0.10	13.3 $\pm$ 3.9	26.3 $\pm$ 7.1
假手术	6 h	93.2 $\pm$ 4.1	4.13 $\pm$ 0.11	15.4 $\pm$ 4.9	28.9 $\pm$ 10.3
	24 h	92.6 $\pm$ 4.9	4.14 $\pm$ 0.13	16.4 $\pm$ 5.7	31.2 $\pm$ 13.5
CLP	6 h	75.4 $\pm$ 5.7 <sup>①</sup>	5.32 $\pm$ 0.30 <sup>①</sup>	60.6 $\pm$ 10.7 <sup>①</sup>	85.4 $\pm$ 15.4 <sup>①</sup>
	24 h	58.8 $\pm$ 7.5 <sup>①②</sup>	6.29 $\pm$ 0.98 <sup>①②</sup>	29.4 $\pm$ 11.6 <sup>①②</sup>	45.7 $\pm$ 19.3 <sup>①②</sup>
异氟烷	6 h	85.3 $\pm$ 4.1 <sup>②</sup>	4.75 $\pm$ 0.43 <sup>②</sup>	39.5 $\pm$ 13.1 <sup>②</sup>	53.4 $\pm$ 11.5 <sup>②</sup>
	24 h	72.4 $\pm$ 6.4 <sup>②③</sup>	5.43 $\pm$ 0.62 <sup>②③</sup>	22.8 $\pm$ 9.4 <sup>②③</sup>	35.6 $\pm$ 14.5 <sup>②③</sup>

1 mmHg=0.133kPa;与正常对照组同亚组比较:① $P < 0.05$ ;与 CLP 组同亚组比较:② $P < 0.05$ ;与同组 6 h 亚组比较:③ $P < 0.05$

2.4 肺组织病理学变化 光学显微镜下,正常对照组和假手术组大鼠的肺组织结构完整,肺泡隔无水肿、无炎症,肺泡腔清晰。CLP 组大鼠的肺泡隔增宽,部分肺泡内见渗出、水肿、出血,肺间质见大量炎性细胞浸润,24 h 亚组的变化更为明显。异氟烷组大鼠的肺组织肺泡隔略有增宽,部分肺泡内见渗出、水肿、出血,肺间质见少量炎性细胞浸润。见图 1(见插页)。

2.5 NF- $\kappa$ B 变化 光学显微镜下,正常对照组和假手术组的细胞质染色浅,偶见细胞核染色。

CLP 组的细胞核和细胞质染色呈棕黄色。异氟烷组可见细胞质染色呈棕黄色,偶见细胞核染色,与 CLP 组比较,染色减淡,阳性细胞数目有所减少。见图 2(见插页)。

## 3 讨论

本研究采用经典 CLP 法建立大鼠 ALI 模型,进一步探讨异氟烷后处理在 ALI 中的保护作用。该模型模拟了临床腹膜炎患者 ALI 发病的病程,更贴近临床实际。前期研究发现,CLP 造模大鼠

术后 4 h 活动度明显下降, 并出现萎靡、厌食、竖毛、眼角分泌物增多、呼吸急促、腹泻、对外界反应淡漠等表现, 术后 12 h 后更为明显。术后 24 h 处死大鼠, 剖腹见腹腔血性腹水渗出明显, 带恶臭; 肠系膜充血、肠管显著扩张、结扎盲肠坏死; 肝脏明显肿大、肺表面充血明显等。肺组织病理学观察也可见 CLP 组大鼠肺泡隔增宽, 部分肺泡内见渗出、水肿、出血, 肺间质见大量炎性细胞浸润, 而正常对照组和假手术组大鼠均无相关表现。同时发现, 异氟烷组大鼠的术后行为学及肺部病理学改变程度均轻于 CLP 组。可见异氟烷后处理与本课题组前期研究<sup>[6]</sup>的预处理结果一样, 能减轻脓毒症 ALI, 为临床治疗提供新的思路。

脓毒症早期, 机体产生大量的炎性介质, 形成炎症“瀑布效应”, 可使炎症反应扩大甚至失控, 其中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 被普遍认为是引起机体损伤和死亡的早期炎性介质中的核心因子, 并对判断脓毒症的严重程度及预后起着重要作用<sup>[7]</sup>。TNF- $\alpha$  是炎症反应中最早出现的细胞因子之一, 可能在内毒素诱发的炎性介质“瀑布效应”中起枢纽作用。IL-6 由多种活性细胞产生, 是产生急性相蛋白和聚集炎性细胞的主要效应物, 是继发于 TNF- $\alpha$  后组织损伤的敏感标志, 可以用于评价全身性感染患者炎症反应的程度, 可作为监测炎症治疗效果的指标<sup>[8]</sup>。NF- $\kappa$ B 是一个核转录因子, 脓毒症时 NF- $\kappa$ B 的过度活化可刺激多种炎性介质表达, 同时多种炎性介质也可刺激 NF- $\kappa$ B 的表达, 形成一个自我维持的炎症反应循环通路。生理情况下, 细胞因子对机体具有防御作用, 但由于脓毒症时细胞因子的过量生成, 可导致炎症反应失控, 并造成组织细胞结构和功能损伤。本研究发现, 异氟烷能降低炎性因子 TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 NF- $\kappa$ B 的表达, 从而产生抗炎作用。国外研究<sup>[9]</sup>也证实, 经内毒素诱导的离体细胞暴露于吸入麻醉气体中能减少细胞内炎性因子的释放。

异氟烷作为临床常用的麻醉气体被广泛应用于全身麻醉手术中, 其与肺表面直接接触, 通过肺部气-血交换产生镇静镇痛作用。目前国外已有报道, 在 ICU 中以小剂量异氟烷吸入镇静比静脉用药镇静对血流动力学的影响更小, 国外 ICU 中已开始应用带异氟烷挥发罐的呼吸机<sup>[10-11]</sup>。这些都为异氟烷用于临床治疗脓毒症 ALI 提供了客观的物质条件。

综上所述, 对脓毒症所致 ALI 大鼠应用体积分数为 0.014 的异氟烷后处理能明显减轻 ALI 的程度, 并降低致死率。异氟烷后处理对肺脏的保护作用部分是通过抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6 以及核转录因子 NF- $\kappa$ B 产生的。

#### 参 考 文 献

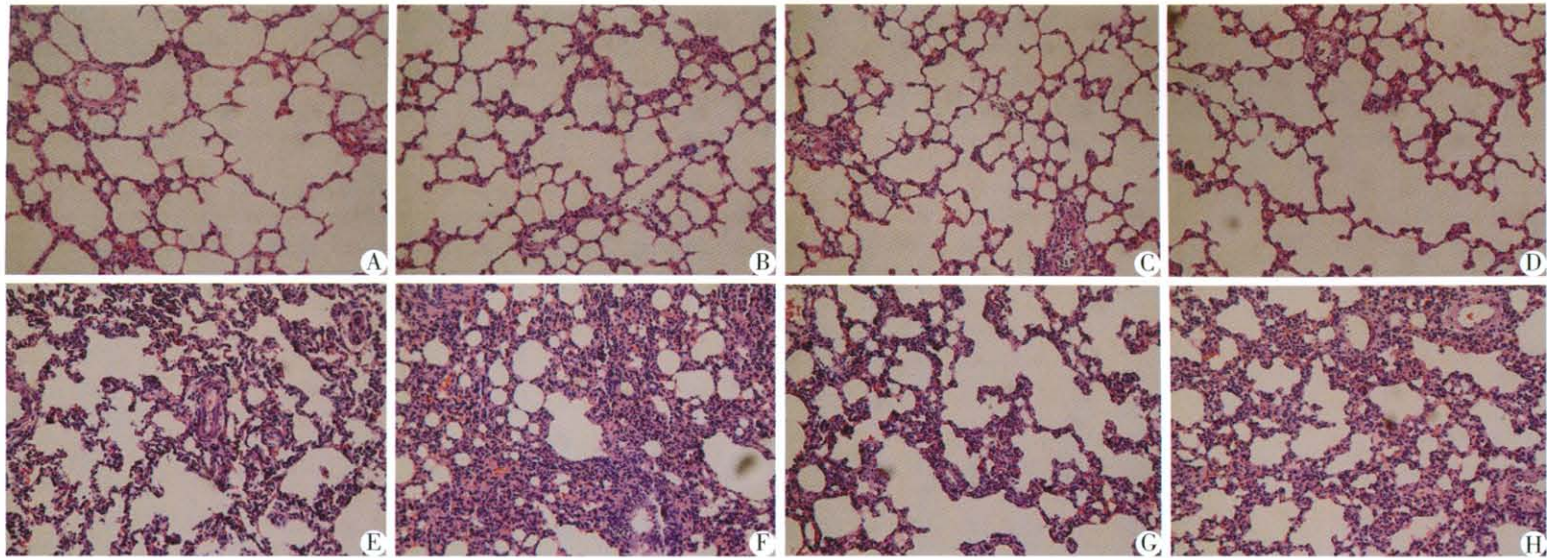
- 1 BASTARACHE J A, WARE L B, BERNARD G R. The role of the coagulation cascade in the continuum of sepsis and acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2006, 27(4): 365-376.
- 2 孙敏莉, 缪长虹, 薛张纲. 不同浓度异氟醚预处理对内毒素性急性肺损伤肺泡毛细血管通透性的影响[J]. *中国临床医学*, 2008, 15(2): 255-257.
- 3 LEE H T, EMALA C W, JOO J D, et al. Isoflurane improves survival and protects against renal and hepatic injury in murine septic peritonitis[J]. *Shock*, 2007, 27(4): 373-379.
- 4 PLACHINTA R V, HAYES J K, CERILLI L A, et al. Isoflurane pretreatment inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in rats[J]. *Anesthesiology*, 2003, 98(1): 89-95.
- 5 MU J, XIE K, HOU L, et al. Subanesthetic dose of isoflurane protects against zymosan-induced generalized inflammation and its associated acute lung injury in mice[J]. *Shock*, 2010, 34(2): 183-189.
- 6 LI Q F, ZHU Y S, JIANG H, et al. Isoflurane preconditioning ameliorates endotoxin-induced acute lung injury and mortality in rats[J]. *Anesth Analg*, 2009, 109(5): 1591-1597.
- 7 MARSH C B, WEWERS M D. The pathogenesis of sepsis. Factors that modulate the response to gram-negative bacterial infection[J]. *Clin Chest Med*, 1996, 17(2): 183-197.
- 8 卞建明, 王书奎, 江 滨, 等. 多种细胞因子监测对严重感染患者的意义[J]. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(6): 353-355.
- 9 YUE T, ROTH Z'GRAGGEN B, BLUMENTHAL S, et al. Postconditioning with a volatile anaesthetic in alveolar epithelial cells in vitro[J]. *Eur Respir J*, 2008, 31(1): 118-125.
- 10 L'HER E, DY L, PILI R, et al. Feasibility and potential cost/benefit of routine isoflurane sedation using an anesthetic conserving device: a prospective observational study [J]. *Respir Care*, 2008, 53(10): 1295-1303.
- 11 SACKY P V, MARTLING C R, GRANATH F, et al. Prolonged isoflurane sedation of intensive care unit patients with the Anesthetic Conserving Device[J]. *Crit Care Med*, 2004, 32(11): 2241-2246.

(收稿日期: 2011-12-11)

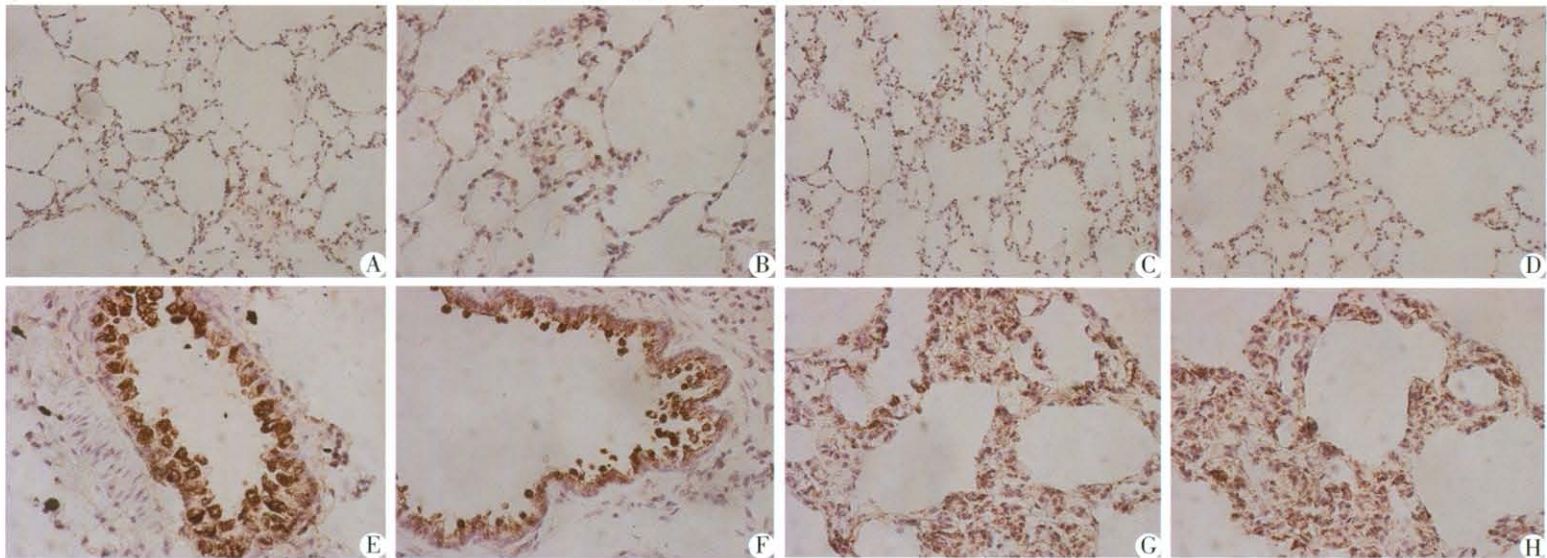
(本文编辑: 唐清蓉)

# 异氟烷后处理减轻大鼠盲肠结扎穿孔所致急性肺损伤

吕翔, 董翔, 李启芳, 等 (正文见第867页)



A: 正常对照组6 h亚组; B: 正常对照组24 h亚组; C: 假手术组6 h亚组; D: 假手术组24 h亚组; E: CLP组6 h亚组; F: CLP组24 h亚组; G: 异氟烷组6 h亚组; H: 异氟烷组24 h亚组  
图1 各组肺组织切片病理学观察结果 (H-E染色, ×200)



A: 正常对照组6 h亚组; B: 正常对照组24 h亚组; C: 假手术组6 h亚组; D: 假手术组24 h亚组; E: CLP组6 h亚组; F: CLP组24 h亚组; G: 异氟烷组6 h亚组; H: 异氟烷组24 h亚组  
图2 各组肺组织NF-κB观察结果 (免疫组织化学染色DAB法, ×400)

# 寰枢关节脱位术后内固定断裂困难气道处理

唐李隽, 左苏宁, 陈莲华, 等 (正文见第891页)



图1 患者正面和背面照片, 显示明显困难气道特征 图2 X线片和CT检查三维重建示内固定断端位于寰枢