

## · 基础研究 ·

# 高压氧对大鼠肢体缺血再灌注致心肺损伤的作用

原标 高春锦 王国忠 陈大志

**【摘要】目的** 探讨高压氧(HBO)对大鼠肢体缺血再灌注(I/R)致心、肺损伤的作用及其机制。**方法** 复制 I 2 h/R 1 h 模型,分为假手术组、I/R 模型组、HBO 治疗组。将心、肺组织行电镜病理检查;记录血清血小板膜糖蛋白 CD31、CD61 平均荧光强度和 CD62p 的阳性率。**结果** 与 I/R 模型组比较,HBO 治疗组心、肺组织病理改变减轻。与假手术组比较,I/R 模型组 CD31、CD61 及 CD62p 均有升高,其中 CD31 和 CD62p 升高显著( $P < 0.05$ );与 I/R 模型组比较,HBO 治疗组 CD31、CD61 及 CD62p 均有下降趋势,其中 CD31 和 CD62p 下降尤为显著( $P < 0.05$ )。**结论** 早期行 HBO 治疗可显著减少急性下肢 I/R 大鼠模型血小板膜糖蛋白 CD31 和 CD62p 的表达,可能有助于减轻下肢 I/R 继发的心、肺损伤。

**【关键词】** 高压氧; 缺血再灌注; 激光多普勒; 血小板膜糖蛋白

**Effects of hyperbaric oxygen on cardiac and pulmonary impairment caused by rat hind limb ischemia/reperfusion** YUAN Biao\*, GAO Chun-jin, WANG Guo-zhong, CHEN Da-zhi. \* Department of Vascular Surgery, Beijing Chaoyang Hospital, Beijing 100020, China

**【Abstract】Objective** To explore the potential protective effect of HBO on cardiac and pulmonary impairment associated with hind limb ischemia/reperfusion in rat model and the underlying mechanisms. **Methods** Thirty Adult male Sprague-Dawley rats weighing 220 ~ 250 g were used in the study. Bilateral hind limb ischemia was induced by applying an atraumatic clamp at the end of abdominal aorta adjacent to junction site of bilateral femoral arteries. At the end of the ischemic period, reperfusion of the limbs was achieved by releasing the clamp. The experimental animals were randomly divided into three groups: a sham surgical group, a ischemia/reperfusion (I/R) group and a hyperbaric oxygen (HBO) group. The ultrastructural histopathological changes in heart and lungs were studied. The mean immunofluorescence intensity of CD31, CD61 or positive percentage of CD62p were measured by the flow cytometry. **Results** In I/R group, extensive ultrastructural histopathological impairment of heart and lung were observed. The ultrastructural histopathological changes in HBO group were significantly alleviated. Compared with sham surgical group, the expression of platelet membrane glycoprotein CD31 and CD62p in the I/R group was much higher ( $P < 0.05$ ). The expression of CD31, CD62p in HBO group was much lower than that in I/R group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** HBO can significantly alleviate the pathological changes in heart and lungs caused by hind limb ischemia/reperfusion in the rat model.

**【Key words】** Hyperbaric oxygen; Ischemia/Reperfusion; Platelet membrane glycoprotein

急性肢体缺血是当今血管外科医生所面对的有挑战性的问题之一,其年发病率约为 1.7/10 000,总死亡率和截肢率分别高达 26% 和 37%。急性下肢缺血再灌注(ischemia/reperfusion, I/R)可致远隔器官如心、肺、肾、消化道和血液系统的组织学及功能损伤,并可能导致多器官功能不全综合征,危及生命<sup>[1]</sup>。其中心、肺是重要的受累靶器官,临床表现为心律失常、血压变化、肺水肿甚至循环功能和呼吸功能障碍<sup>[2]</sup>。

大量临床实践和实验研究表明,高压氧(hyperbaric oxygen, HBO)对治疗 I/R 损伤有益,其作用机制同

时涉及多个与 I/R 相关的因素,但其对急性下肢 I/R 致心、肺等远隔器官损伤的作用迄今鲜见报道。有鉴于此,本研究对大鼠肢体 I/R 模型进行观察,进一步探讨 HBO 对急性下肢 I/R 致心、肺损伤的作用及其相关机制。

## 材料与方法

### 一、仪器

CMA/150 型体温控制系统,瑞典 Stockholm CMA 公司;DWC150-300 型动物实验舱,上海 701 所;HA-DECO ES-1000SPM 型袖珍多普勒血流仪,瑞典 Stockholm CMA 公司;FACS Calibur 流式细胞仪美国 BECTON DICKSON 公司。

基金项目:北京市首都医学发展基金(2002-1027)

作者单位:100020 北京,北京朝阳医院血管外科(原标),高压氧科(高春锦、王国忠),普外科(陈大志)

## 二、动物模型与分组

按照 Cohen 等<sup>[3]</sup>提供的方法复制动物模型。健康成年雄性 SD 大鼠(首都医科大学实验动物中心提供,动物号:医动字 D03-3084) 30 只,体重( $250 \pm 30$ )g,术前常规禁食 12 h,自由饮水。以 20% 乌拉坦( $1\ 000\text{ mg/kg}$ 体重)行腹腔内注射麻醉,保持平稳胸式呼吸视为麻醉成功标志。将大鼠仰卧固定于 37℃ 的 CMA/150 型体温控制系统恒温操作台上。入腹后,游离肾动脉分出以远与髂总动脉分出前之间的腹主动脉约 10 mm,以哈巴狗无创血管阻断钳夹闭腹主动脉,用 HADECO ES-1000SPM 型袖珍多普勒血流仪确认双侧腹股沟及双下肢无血流。2 h 后行第 2 次开腹,移除血管钳。

将 30 只大鼠随机分为假手术组、I/R 模型组及 HBO 治疗组,每组 10 只。假手术组采用上述方法麻醉与手术,但未行腹主动脉夹闭;I/R 模型组麻醉与手术方法同假手术组,然后行腹主动脉夹闭致下肢缺血 2 h,再灌注时间为 1 h;HBO 治疗组麻醉与手术方法同假手术组,行腹主动脉夹闭致下肢缺血 2 h 后,移除血管钳关闭腹腔,立即将大鼠送入 DWC150-300 型动物实验高压氧舱。纯氧洗舱 5 min,升压 5 min 至 0.2 MPa 后稳压,吸纯氧 60 min,减压 15 min。处理过程中保持持续通风,氧流量 2 L/min。假手术组和 I/R 模型组则处于常压空气中。

## 三、检测指标和方法

1. 大鼠血清血小板膜糖蛋白 CD31、CD61 及 CD62p 等指标的测定:HBO 治疗组大鼠在出舱后立即取血,假手术组与 I/R 模型组同时取血。采用 FACSCalibur 流式细胞仪检测,记录血小板膜糖蛋白 CD31、CD61 的平均荧光强度及 CD62p 的阳性率。

2. 大鼠透射电镜标本制备及观察:HBO 治疗组大鼠在取血后立即断头处死取标本,假手术组和 I/R 模型组大鼠同时采用相同的方法取标本,分别切取 1 块  $1 \sim 2\text{ mm}^3$  大小的心肌、肺脏等组织块制备超薄切片,经铅-铀双染色,在日立 JEOL-1200 透射电镜下观察超微结构的变化。

## 四、统计学分析

在检测符合正态分布的前提下,各组所有数据的统计学分析均采用 SPSS 11.0 软件进行。实验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间均数比较采用方差分析及  $q$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

一、3 组大鼠血清 CD31、CD61 及 CD62p 指标的变化

与假手术组比较,I/R 模型组 CD31、CD61 及

CD62p 均有升高,其中 CD31 和 CD61 升高显著( $P < 0.05$ );与 I/R 模型组比较,HBO 治疗组 CD31、CD61 及 CD62p 均有下降趋势,其中 CD31 和 CD62p 下降显著( $P < 0.05$ )。详见表 1。

表 1 3 组大鼠血液 CD31、CD61 及 CD62p 等指标的变化( $\bar{x} \pm s$ )

| 组 别     | n  | CD31                | CD61             | CD62p               |
|---------|----|---------------------|------------------|---------------------|
| 假手术组    | 10 | $25.60 \pm 10.25^a$ | $31.35 \pm 7.55$ | $52.93 \pm 12.71^a$ |
| I/R 模型组 | 10 | $36.45 \pm 6.37$    | $32.99 \pm 7.43$ | $68.98 \pm 8.73$    |
| HBO 治疗组 | 10 | $26.67 \pm 6.07^a$  | $25.56 \pm 7.04$ | $53.24 \pm 14.24^a$ |

注:与 I/R 模型组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$

二、3 组大鼠心肌、肺脏等组织透射电镜标本观察  
透射电镜下观察组心、肺脏等组织变化轻微,接近正常组织表现;I/R 模型组心肌组织半数线粒体高度肿胀,肌丝退行性变,肌节不清,肺组织基底膜厚度不均,有肺泡细胞-Ⅱ型脱颗粒改变,肺泡细胞-I 型及基底膜;HBO 治疗组心肌组织部分线粒体肿胀,肺组织,可见肺泡细胞,Ⅱ型脱颗粒未见明显异常改变。详见图 1~4。由于上述各脏器组织病理改变未行定量观察,所以未行统计学分析。

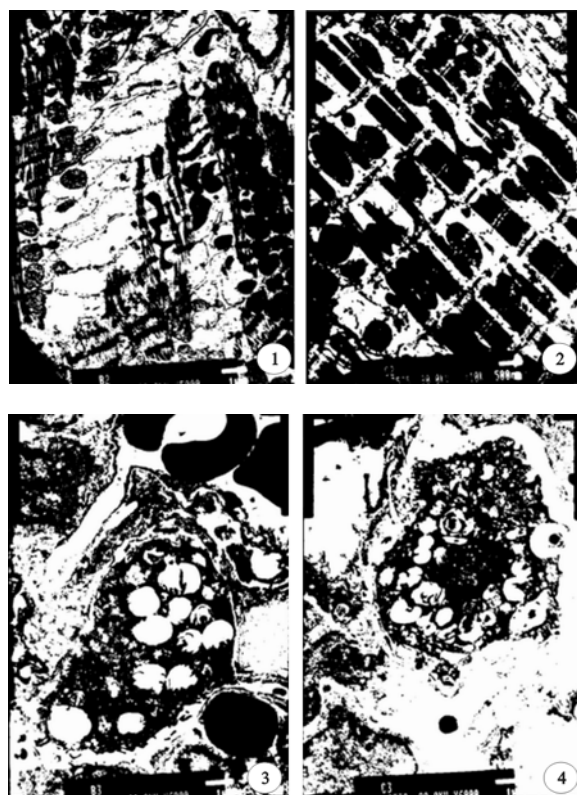


图 1 I/R 模型组心肌组织(铅-铀双染色,  $\times 5\ 000$ )

图 2 HBO 治疗组心肌组织(铅-铀双染色,  $\times 5\ 000$ )

图 3 HBO 治疗组肺组织(铅-铀双染色,  $\times 6\ 000$ )

图 4 I/R 模型组肺组织(铅-铀双染色,  $\times 6\ 000$ )

## 讨 论

随着外科技术的发展,血管手术、器官移植手术等造成医源性器官 I/R 损伤的机会大为增加,其中,急性下肢 I/R 引起远隔器官的组织、功能损伤更是造成术后并发症的重要原因之一。本研究以腹主动脉阻断建立双下肢 I/R 模型,发现其能造成心、肺等远隔脏器组织和功能损伤。

一、HBO 对下肢 I/R 损伤致心、肺器官电镜改变的影响

本研究进一步证实,肢体 I/R 对心、肺器官组织有损伤作用,即 I/R 模型组心、肺组织均存在胞膜溶解、线粒体膜及嵴溶解变性、细胞核异常、染色质局灶性溶解等损害,并可见大的、成群髓样小体,与李红梅等<sup>[4]</sup>的研究结果类似;其机制可能涉及心、肺组织在 I/R 时是受累器官,即肢体缺血期生成酸性代谢物、血栓素 A<sub>2</sub> 及微血栓,再灌注期又形成大量氧自由基,回流至心肺后能造成心肌、肺表面细胞损伤<sup>[2]</sup>。本研究结果显示,HBO 治疗组上述脏器组织损伤较 I/R 模型组病变局限,且程度轻。表明给予 HBO 治疗可减轻上述脏器病变。

二、HBO 在大鼠肢体 I/R 致心、肺等远隔器官损伤治疗中的作用

急性腹主动脉闭塞的缺血范围广泛,发生再灌注之后对全身影响明显,病情很可能进一步加重,积聚于患肢的代谢产物和毒素入血后可被远隔器官广泛吸收,由此引发 I/R 损伤。肢体 I/R 继发远隔器官损伤的发生机制涉及广泛,包括黄嘌呤氧化酶、中性粒细胞及其炎症介质、花生四烯酸类产物等诸多因素,这些因素共同作用,激发一系列炎症反应,使机体处于一种无法控制的过渡炎症反应状态,即导致全身炎症反应综合征,最终引发多器官功能不全综合征<sup>[1]</sup>。目前倾向认为中性粒细胞的激活、黏附及其产生的毒性物质是造成此症的中心环节,而从再灌注组织中释放入血的代谢产物和炎症介质是使中性粒细胞激活及其在远隔器官中聚集的必要物质。

血小板膜糖蛋白(属于细胞黏附分子家族,又称血小板黏附分子)与血小板的黏附、聚集等反应相关,在血小板活化中占有重要地位,其中 CD31、CD61、CD62p 是较重要的 3 种膜糖蛋白。目前认为肢体 I/R 损伤与血小板的功能状态有重要关系,即肢体 I/R 早期出现的血小板活化是再灌注损伤的重要机制之一<sup>[5]</sup>。血小板活化和聚集性增高可加重血栓素 A<sub>2</sub> 和前列环素的平衡紊乱,进一步促进中性粒细胞的活化和黏附,加重其在 I/R 损伤中的作用<sup>[6]</sup>。本研究显示,下肢 I/R 可显著增加 CD31、CD61 及

CD62p 在血小板膜上的表达,提示血小板活化反应增强。早期行 HBO 治疗可显著减少急性下肢 I/R 大鼠模型血小板膜糖蛋白 CD31 和 CD62p 的表达,这样从一定程度上抑制了血小板活化反应引发的中性粒细胞的激活及其黏附分子过度表达,阻断了中性粒细胞与内皮细胞黏附及其产生的毒性物质,中断继发的一系列炎症反应,抑制了全身炎症反应综合征,从而最终改善 I/R 原发组织和继发远隔器官组织微循环紊乱及其受损程度。

传统的抑制缺血再灌注损伤的方法(如降低缺血区域组织温度,应用抗氧化剂或输注高张、高渗盐水等)能有效改善损伤的程度,但对远隔器官的损伤却难以奏效<sup>[7]</sup>,或因技术原因无法实施。因此,我们认为,若能尽快去除致病因素,并采用一些有效防治措施,这种改变有可能逆转;若致病因素作用过猛或持续时间较长,靠受伤机体本身去清除有害致病物质,短时间内很难实现,病变有可能进一步发展成为典型的多器官功能不全综合征。目前临床上对肢体缺血的治疗重点仍主要放在恢复肢体血液循环上,而对恢复血流后的远隔器官组织再灌注损伤则重视不够。因此,临床实践中,在有潜在血管功能障碍如高血压、动脉粥样硬化、肺动脉高压等心血管疾病时,应用 HBO 综合治疗急性下肢 I/R 后继发的心、肺等远隔器官损伤有益。

## 参 考 文 献

- [1] Yassin MM, Harkin DW, Barros D'sa AA, et al. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg*, 2002, 26:115-121.
- [2] 崔和勤, 李占军, 杨秋, 等. 黄芩对肠缺血再灌注损伤过程中肺表面活性物质及 LPO 含量的影响. *中国新药与临床杂志*, 2000, 19:270-272.
- [3] Cohen SM, Siddigi 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, 43:247-252.
- [4] 李红梅, 崔乃杰, 崔德健, 等. 灯盏花素在肢体缺血再灌注致远隔多器官损伤的预防作用. *中华老年多器官疾病杂志*, 2003, 2:49-52.
- [5] Loucks EB, Symersky P, Qayumi AK. Platelet-activating factor antagonism: a new concept in the management of regional myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Invest Surg*, 1997, 10:321-338.
- [6] Qayumi AK, English JC, Godin DV, et al. The role of Platelet-activating factor in regional myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, 1998, 65:1690-1697.
- [7] Waagstein LM, Jivegard L, Waljamae H. Hypertonic saline infusion with or without dextran 70 in the reperfusion phase of experimental acute limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 1997, 13: 285-295.

(修回日期:2007-04-15)

(本文编辑:阮仕衡)