

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.15.006

## 盐酸戊乙奎醚与右美托咪定在内毒素致大鼠急性肺损伤的保护性作用比较\*

孟志鹏<sup>1</sup>, 刘静<sup>2△</sup>, 胡四平<sup>1</sup>, 童飞<sup>1</sup>, 龚浩杰<sup>1</sup>

(1. 浙江省湖州市中心医院麻醉科 313000; 2. 浙江省湖州市妇幼保健院麻醉科 313000)

**[摘要]** **目的** 比较盐酸戊乙奎醚(PHC)及右美托咪定(DEX)对内毒素脂多糖(LPS)致大鼠急性肺损伤(ALI)的保护性作用。**方法** 40只成年SD大鼠,按照随机数字表法分为4组( $n=10$ ):0.9%生理盐水对照组(对照组)、LPS致ALI模型组(LPS组)、DEX治疗组(L+D组)、PHC治疗组(L+P组)。除对照组外,实验组采用LPS建立大鼠ALI模型。治疗组在LPS注射后静脉注射DEX或PHC,随后泵入,直到实验结束。对照组注入等量0.9%生理盐水。测定血浆肿瘤坏死因子(TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 及IL-6水平;计算肺湿/干重(W/D)比值;取右肺上叶,进行弥漫性肺泡损伤标准(DAD)评分;左肺支气管灌洗,采集肺泡灌洗液(BALF),测定TNF- $\alpha$ 、IL-6、总蛋白(TP)水平。**结果** 与对照组比较,ALI组、L+D组、L+P组炎症因子、W/D比值、DAD评分及BALF中TP均升高( $P<0.05$ );与ALI组比较,L+D组、L+P组上述各项观察指标均降低( $P<0.05$ );L+P组与L+D组各项观察指标比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** PHC和DEX均可减轻LPS致大鼠ALI。

**[关键词]** 内毒素血症;右美托咪定;盐酸戊乙奎醚;急性肺损伤**[中图分类号]** R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)15-2541-04

### Comparison of the protective effects of pentyl hydrochloride and dexmedetomidine on acute lung injury induced by endotoxin in rats\*

MENG Zhipeng<sup>1</sup>, LIU Jing<sup>2△</sup>, HU Siping<sup>1</sup>, TONG Fei<sup>1</sup>, GONG Haojie<sup>1</sup>

(1. Department of Anesthesiology, the Central Hospital of Huzhou, Huzhou, Zhejiang 313000, China; 2. Department of Anesthesiology, the Huzhou Maternal and Child Health Hospital, Huzhou, Zhejiang 313000, China)

**[Abstract]** **Objective** To compare the protective effects of pentyl hydrochloride (PHC) and dexmedetomidine (DEX) on acute lung injury (ALI) induced by endotoxin lipopolysaccharide (LPS) in rats. **Methods** A total of 40 adult SD rats were randomly divided into four groups ( $n=10$ ) according to the random number table: the 0.9% saline control group (control group), the LPS induced ALI model group (LPS group), the DEX treatment group (L+D Group) and the PHC treatment group (L+P group). Except for the control group, ALI rats models were established with the way of administering intravenous injections of LPS in all experimental groups. The plasma tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$  and IL-6 levels were measured, the lung wet/dry weight (W/D) ratio was calculated, the right lung upper lobe was taken for evaluating diffuse alveolar damage standard (DAD) score, and left lung bronchial lavage bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was collected to determine the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and total protein (TP). **Results** Compared with the control group, the inflammatory factors levels, W/D ratio, DAD score and TP level in BALF were increased in the ALI group, the L+D group and the L+P group ( $P<0.05$ ). Compared with the ALI group, all observation indexes mentioned above in the L+D group and the L+P group were decreased ( $P<0.05$ ). There was no significant difference in all observation indexes between the L+P group and the L+D group ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The PHC and DEX both can alleviate LPS-induced ALI in rats.

**[Key words]** endotoxemia; dexmedetomidine; penethylidene hydrochloride; acute lung injury

脓毒症可导致全身多器官损伤,而肺脏因其独特的结构与功能,成为最早、最易受累且病情最重的器

\* 基金项目:浙江省湖州市重点公益类项目(2015GZ17)。 作者简介:孟志鹏(1981-),副主任医师,本科,主要从事围术期肺保护方面的研究。 △ 通信作者, E-mail: 849796799@qq.com。

官之一<sup>[1]</sup>,常表现为高病死率的急性肺损伤(ALI)/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)等危重症,炎症反应失衡是 ALI 的根本原因之一,尽管学者们对 ALI 的防治及肺保护研究已取得巨大进展,但其病死率仍高达 30%~40%<sup>[2]</sup>,临床亟须寻求脓毒症肺损伤的预防方案和治疗药物。右美托咪定(DEX)是一种高选择性  $\alpha_2$  肾上腺素能受体激动剂,研究证实 DEX 因具有抗氧化、抗炎等独特作用能减轻大鼠急性肺损伤<sup>[3]</sup>,特别是在脓症患者 ALI 呼吸机支持治疗时能减轻呼吸机相关性肺损伤或肾缺血再灌注肺损伤<sup>[4-5]</sup>。近年来,随着对祖国医学的重视及对 ALI/ARDS 的不断研究,有学者发现我国自主研发的传统医药盐酸戊乙奎醚(PHC)因作用于支气管平滑肌和肺组织  $M_1$ 、 $M_3$  受体,使支气管平滑肌痉挛得到解除,肺顺应性增加,肺通气得到改善,同时 PHC 是一种高选择性的新型抗胆碱药物<sup>[6]</sup>,能够稳定各种细胞器的膜结构,降低毛细血管通透性,缓解急性微循环功能障碍,还能抑制呼吸道腺体分泌,降低分泌物对肺部的感染,从而减轻肺组织损伤<sup>[7]</sup>,也有研究表明 PHC 抑制 Toll 样受体-4 表达,抑制大量炎性因子在肺内聚集和浸润,减轻肺部炎症反应,发挥一定的肺保护作用<sup>[8]</sup>。本研究通过比较 PHC 与右美托咪定对内毒素脂多糖(LPS)致大鼠 ALI 的保护性作用,探讨 PHC 临床治疗 ALI 的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 成年雄性健康清洁级 SD 大鼠 40 只,8 周龄,体质量 250~300g,由浙江省医学科学院动物实验中心提供[动物使用许可证号:SYXK(浙)2014-0001],分组分笼每笼 3~4 只,安静环境、室温 22~24 °C 下适应性喂养 1 周,自由饮食、饮水,模拟昼夜交替 12 h。

## 1.2 方法

**1.2.1 模型制备与分组** 术前大鼠自由饮水,禁食 12 h。腹腔注射 10%水合氯醛 400 mg/kg 麻醉后,仰卧位固定于操作台上称重,行右股静脉、右颈内动脉穿刺、置管。术中保留自主呼吸。按随机数字表法将大鼠分为 4 组,每组 10 只。(1)LPS 模型组(LPS 组):右股静脉注射 LPS(*Escherichia coli* O111:B4,美国 Sigma 公司)6 mg/kg;(2)DEX 治疗组(L+D 组):LPS 作用 30 min 后 2 min 内右股静脉注射 DEX 50  $\mu$ g/kg(江苏恒瑞医药公司,批号:16060132),随后以 5  $\mu$ g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  h<sup>-1</sup>微泵泵入;(3)PHC 治疗组(L+P 组):LPS 作用 30 min 后 2 min 内右股静脉注射 PHC 1 mg/kg(成都力思特制药股份有限公司,批号:H20080606),随后以 1  $\mu$ g  $\cdot$  kg<sup>-1</sup>  $\cdot$  h<sup>-1</sup>微泵泵入。(4)0.9%生理盐水对照组(对照组):经右股静脉给予等量 0.9%生理盐水。

**1.2.2 标本采集与标本检测** 注射 0.9%生理盐水或 LPS 6 h 后,右颈动脉采血 2 mL 后放血处死,血标本用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素(IL)-1 $\beta$  及 IL-6 水平。取右肺上叶 5 mm $\times$ 5 mm 组织,甲醛溶液固定 48 h,石蜡包埋,切片(厚度约 5  $\mu$ m),苏木素-伊红(HE)染色,光镜下行肺组织病理学检查,并从中性粒细胞浸润、肺泡间隔增宽、肺泡腔内出血、肺泡腔渗出 4 个方面按严重程度行弥漫性肺泡损伤标准(DAD)评分:正常为 0 分,轻度为 1 分,中度为 2 分,重度为 3 分<sup>[9]</sup>;取右肺中叶组织,滤纸吸尽表面水分及血液,称湿重(W),然后置 80 °C 电热干燥箱内烘烤 24 h 左右,待质量恒定后称干重(D),计算肺组织湿/干重(W/D)比值。分离气管,夹闭右支气管,分 3 次用 4 °C 0.9%生理盐水按 20 mL/kg 行左支气管肺泡灌洗,并回收左支气管肺泡灌洗液(BALF),离心后用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定 BALF 的 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平,用二喹啉甲酸(BCA)法测定 BALF 中总蛋白(TP)水平。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,正态分布计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,计数资料以例数或百分比表示,比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 4 组血清炎性因子水平比较** 与对照组比较,LPS 组、L+D 组、L+P 组炎性因子水平升高( $P < 0.05$ );与 LPS 组比较,两个治疗组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 水平明显下降( $P < 0.05$ );L+P 组与 L+D 组 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 1。

表 1 各组血清炎性因子水平比较( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

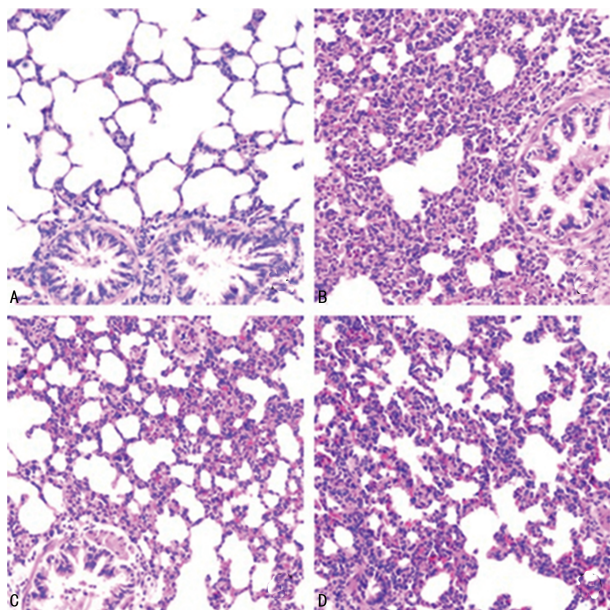
组别	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-1 $\beta$ (pg/mL)	IL-6(pg/mL)
对照组	69.82 $\pm$ 5.62	25.6 $\pm$ 0.5	30.41 $\pm$ 2.08
LPS 组	425.70 $\pm$ 127.51*	81.3 $\pm$ 5.6*	79.37 $\pm$ 17.04*
L+D 组	256.36 $\pm$ 52.18*#	49.8 $\pm$ 2.6*#	53.07 $\pm$ 7.73*#
L+P 组	254.01 $\pm$ 56.89*#	48.9 $\pm$ 2.4*#	52.91 $\pm$ 7.63*#

\*: $P < 0.05$ ,与对照组比较;#: $P < 0.05$ ,与 LPS 组比较

**2.2 光镜下观察肺组织病理学改变** 光镜下,对照组中性粒细胞聚集、浸润少,肺组织结构无明显损伤(图 1A);LPS 组可见大量以中性粒细胞为主的炎性细胞聚集、浸润,肺泡结构紊乱,破坏严重,肺泡间隔水肿、增宽明显,肺泡腔大量渗出且伴有明显出血(图 1B);L+D 组、L+P 组肺组织损伤程度较 LPS 组轻,病理学改变程度较 LPS 组轻,L+D 组与 L+P 组比较无明显差异(图 1C、D)。

**2.3 4 组肺组织 DAD 评分和 W/D 比值比较** 与对照组比较,其余 3 组 DAD 评分及 W/D 比值均明显升

高( $P < 0.05$ );与 LPS 组比较,两个治疗组 DAD 评分及 W/D 比值均明显下降( $P < 0.05$ );L+P 组与 L+D 组 DAD 评分及 W/D 比值比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。



A: 对照组; B: LPS 组; C: L+D 组; D: L+P 组

图 1 各组肺组织病理学改变(HE 染色,  $\times 200$ )

表 2 各组 DAD 评分和肺组织 W/D 比值比较( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	DAD 评分(分)	W/D 比值
对照组	0.5 ± 0.2	4.1 ± 0.2
LPS 组	8.0 ± 1.4*	6.6 ± 0.9*
L+D 组	4.8 ± 1.2*#	5.1 ± 0.2*#
L+P 组	4.9 ± 1.4*#	5.0 ± 0.3*#

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 LPS 组比较

2.4 4 组 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 TP 水平比较与对照组比较,其余 3 组 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 TP 水平明显升高( $P < 0.05$ );与 LPS 组比较,两个治疗组 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 TP 水平均下降( $P < 0.05$ );L+P 组与 L+D 组 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 TP 水平比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 3。

表 3 各组 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 TP 表达水平比较( $n=10, \bar{x} \pm s$ )

组别	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	IL-6(pg/mL)	TP(mg/mL)
对照组	64.81 ± 21.87	37.76 ± 13.00	0.22 ± 0.03
LPS 组	158.99 ± 45.18*	88.10 ± 9.37*	0.43 ± 0.14*
L+D 组	119.18 ± 14.25*#	60.02 ± 3.76*#	0.29 ± 0.07*#
L+P 组	120.39 ± 15.09*#	57.97 ± 12.90*#	0.28 ± 0.15*#

\*:  $P < 0.05$ , 与对照组比较; #:  $P < 0.05$ , 与 LPS 组比较

### 3 讨论

通过实验,笔者发现静脉注射 DEX、PHC 对 LPS

导致的大鼠 ALI 有保护作用。DEX、PHC 注射可以显著降低大鼠血清中炎症因子水平、BALF 中炎症因子及 TP 水平,减轻由于 LPS 导致的肺部水肿损伤。DEX、PHC 可以通过抗炎对 LPS 导致的 ALI 起到早期保护作用。脓毒症是临床工作中常见的一种急危重症,常引起全身多器官损伤,其中肺损伤病情重,发生早,常表现为 ALI 或者 ARDS,是导致患者病死率居高不下的主要原因<sup>[10]</sup>。革兰阴性菌细胞壁的主要成分是 LPS,是引起脓毒症性 ALI 的重要物质,LPS 水平与脓毒症性 ALI 密切相关,因此,本实验选择股静脉注射 6 mg/kg LPS 制备大鼠 ALI 模型<sup>[11]</sup>。笔者发现大鼠经 LPS 处理后,HE 染色和光镜下显示出显著特征性肺组织病理学改变,包括大量中性粒细胞浸润、肺泡壁变薄、肺泡腔内液体渗出、出血,肺组织 DAD 评分升高、W/D 比值显著升高,BALF 中炎症细胞数量增多,TP 水平明显升高等特征,表明制备大鼠 ALI 模型成功。

ALI 的发病机制为肺部炎症反应,也是 ALI 的中心环节。肺组织内的炎症因子、趋化因子被激活后产生级联免疫反应。研究表明 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  是 ALI 早期炎症反应中较早升高的炎症因子,也作为 ALI 时炎症介质的始动因素诱发多种炎症因子的表达,并在 ALI 的进展中起到了重要作用<sup>[12]</sup>。其中, TNF- $\alpha$  是应激反应中最早产生的促炎因子,在 ALI 发生、发展中起到核心作用<sup>[13]</sup>。IL-1 $\beta$  是由单核巨噬细胞产生的一种多功能促炎因子,大量聚集、浸润于 ALI 肺泡液中,诱导早期蛋白的合成,在 ALI 的发生、发展中起到促进作用;IL-6 是由单核巨噬细胞、上皮细胞等多种细胞产生的炎症因子,与 TNF- $\alpha$  协同作用于 ALI 的进程中,可比较准确地反映肺组织的炎症反应强度,其表达水平与 ALI 严重程度密切相关。其表达与 ALI 轻重程度一致<sup>[14]</sup>。因此,抑制炎症反应是减轻 LPS 致 ALI 的有效方法之一。

DEX 是一种新型高选择性  $\alpha_2$  肾上腺素受体激动剂,因具有镇痛、镇静、催眠、不抑制呼吸等独特的优点被广泛应用于临床。张琳等<sup>[15]</sup>研究发现,脓毒症大鼠经 DEX 处理后炎症因子释放被抑制,炎症反应程度减轻,脓毒症大鼠的死亡率大大降低。随着研究的深入,发现 DEX 可以增加抗炎因子的表达,抑制中性粒细胞的浸润,对脑、心、肺、肾等重要脏器具有一定的保护作用,其中,DEX 的肺保护作用逐渐得到临床研究者的重视<sup>[16]</sup>。

肺部组织中富含大量的 M<sub>1</sub>、M<sub>3</sub> 胆碱能受体,而 PHC 是一种新型抗胆碱药,选择性作用于 M<sub>1</sub>、M<sub>3</sub> 受体,减少腺体分泌,降低气道阻力,增加肺顺应性,解除支气管平滑肌和肺毛细血管痉挛,减轻肺水肿,改善肺功能。此外,PHC 还能稳定细胞膜及溶酶体、线

粒体等细胞器的膜结构,抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-6 等促炎因子释放,减轻炎症反应<sup>[8]</sup>。

本实验中大鼠静脉注射 LPS 后,血清和 BALF 中上述炎症因子水平均有不同程度升高,出现明显的炎症反应。说明 LPS 打破了大鼠体内的促炎和抗炎动态平衡,炎症因子过度表达并向失控方向发展。TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  大量生成和释放。给予 DEX 或 PHC 治疗后,血清和 BALF 中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 $\beta$  明显降低,表明二者的干预可以抑制脓毒症大鼠炎症因子的释放,减轻炎症细胞的浸润,缓解 LPS 导致的肺组织炎症反应,且二者治疗效果没有明显差异。本实验结果还表明,大鼠经 LPS 干扰后,光镜下肺组织病理学改变提示肺组织出现不定程度的损伤,肺组织 DAD 评分、W/D 比值及 BALF 中的 TP 均有升高,给予 DEX 或 PHC 干预后,光镜下观察病理切片结果提示肺损伤情况较 LPS 组有明显好转,肺组织 DAD 评分、W/D 比值及 BALF 中 TP 水平出现下降,表明肺泡水肿程度经 DEX 或 PHC 治疗后得到明显改善,二者对 LPS 致 ALI 具有一定的保护作用,且二者疗效无明显差异。

综上所述,本实验证明了 DEX 和 PHC 均可通过抗炎作用从而有效减轻肺组织的级联炎症反应及肺泡水肿程度,对 LPS 致大鼠早期 ALI 有一定的保护作用。但是本研究发现在明显抑制炎症因子表达的情况下,ALI 只是减轻,未全部缓解,推测 ALI 仍存在 DEX 和 PHC 作用以外的分子机制。其他可能的分子机制及二者能否改善 ALI 大鼠的最终预后有待进一步研究证实。

## 参考文献

- [1] LIU Y Y, CHANG C H, HUANG S C, et al. Hypoxia-preconditioned mesenchymal stem cells ameliorate ischemia/reperfusion -induced lung injury [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187637.
- [2] RUSH B, MCDERMID R C, CELI L A, et al. Association between chronic exposure to air pollution and mortality in the acute respiratory distress syndrome[J]. *Environ Pollut*, 2017, 224: 352-356.
- [3] 黄天丰, 方向志, 张杨, 等. 右美托咪定对小鼠内毒素性急性肺损伤时 JAK2/STAT3 信号通路的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2016, 36(1): 97-100.
- [4] 邓娟, 李亚春, 朱涛. 右美托咪定对脂多糖诱导的脓毒症大鼠全身炎症反应和肺损伤的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(9): 899-903.
- [5] 黄海燕, 陈克研, 孙莹杰, 等. 右美托咪定对大鼠肾缺血再灌注诱发肺损伤的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2014, 34(2): 230-232.
- [6] 邱丽丽, 邓芳, 朱荣涛. 盐酸戊乙奎醚在大鼠急性重症胰腺炎相关肺损伤中的作用[J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(9): 894-898.
- [7] WU G M, MOU M, MO L Q, et al. Penehyclidine hydrochloride postconditioning on lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibition of inflammatory factors in a rodent model[J]. *J Surg Res*, 2015, 195(1): 219-227.
- [8] 于金贵, 马虹, 王东信, 等. 盐酸戊乙奎醚用于围术期气道管理的专家共识[J]. *临床麻醉学杂志*, 2015, 31(6): 621-623.
- [9] SHMYGALEV S, DAMM M, KNELS L, et al. IgM-enriched solution BT086 improves host defense capacity and energy store preservation in a rabbit model of endotoxemia[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2016, 60(4): 502-512.
- [10] HUANG Y, PETTITT S J, GUO G, et al. Isolation of homozygous mutant mouse embryonic stem cells using a dual selection system[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(3): e21.
- [11] BRAUER R B, GEGENFURTNER C, NEUMANN B, et al. Endotoxin-induced lung inflammation is Independent of the complement membrane attack complex[J]. *Infect Immun*, 2000, 68(3): 1626-1632.
- [12] BHATIA M, MOOCHHALA S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome[J]. *J Pathol*, 2004, 202(2): 145-156.
- [13] 杨进国, 杨光, 包红梅, 等. 盐酸戊乙奎醚对大鼠内毒素急性肺损伤晚期糖基化终末产物受体表达的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2013, 30(7): 1487-1489.
- [14] YANG S, YU Z, WANG L, et al. The natural product bergenin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by inhibiting NF-kappaB activation[J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 200: 147-155.
- [15] 张琳, 张加强, 孟凡民, 等. 右美托咪定对脓毒症大鼠肺损伤时 HMGB 1/TLRs 信号通路的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2018, 38(2): 238-240.
- [16] SHIN J S, LEE K G, LEE H H, et al.  $\alpha$ -Solanine isolated from solanum tuberosum L. cv jayoungabrogates LPS-induced inflammatory responses via NF- $\kappa$ B inactivation in RAW 264. 7 macrophages and endotoxin-induced shock model in mice[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(10): 2327-2339.

(收稿日期: 2019-03-18 修回日期: 2019-04-30)