

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.06.005

七氟烷经不同途径吹入对体外循环犬肺组织呼吸功能和 Caspase-3 表达的影响^{*}

窦雪娇^{1,2}, 陈松^{1,2}, 张红^{1,2△}

(1. 遵义医学院附属医院麻醉科, 贵州遵义 563000; 2. 贵州省麻醉与器官保护
基础研究重点实验室, 贵州遵义 563000)

[摘要] **目的** 研究七氟烷经不同途径吹入对体外循环犬肺组织呼吸功能和 Caspase-3 表达及细胞凋亡的影响。**方法** 健康杂种犬 18 只, 分为对照组(C 组)、经气管插管吹入七氟烷组(I 组)、经膜肺吹入七氟烷组(II 组)。计算呼吸指数(RI)和氧合指数(OI), 光镜下观察肺组织病理学变化, 检测肺组织活化 Caspase-3 的表达及细胞凋亡情况。**结果** 随时间推移, 3 组犬 OI 逐渐降低, RI 逐渐增加($P<0.05$)。与 C 组相比, I、II 组 T_3 时点 OI 升高, RI 降低($P<0.05$), 肺组织见少量炎性细胞及红细胞浸润。3 组犬肺组织中活化 Caspase-3 表达及细胞凋亡指数逐渐升高, T_3 时点 I、II 组与 C 组比较活化 Caspase-3 表达及细胞凋亡指数则明显降低($P<0.05$)。I、II 组以上各项指标比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 七氟烷对体外循环犬肺组织有保护作用, 经不同途径吹入七氟烷对犬肺组织细胞凋亡及呼吸功能影响无差异。

[关键词] 七氟烷; 膜式氧合器; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3; 细胞凋亡

[中图法分类号] R614 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)06-0917-04

Effects of different pathways of sevoflurane insufflation on respiratory function and Caspase-3 expression of lung tissue in cardiopulmonary bypass of dogs^{*}

DOU Xuejiao^{1,2}, CHEN Song^{1,2}, ZHANG Hong^{1,2△}

(1. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. Guizhou Provincial Key Laboratory of Basic Research Anesthesia and Organ Protection, Zunyi, Guizhou 563000, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of different pathways of sevoflurane insufflation on the respiratory function and Caspase-3 expression as well as apoptosis of lung tissue in cardiopulmonary bypass (CPB) of dogs. **Methods** A total of 18 healthy mongrel dogs were randomly divided into the control group (group C), sevoflurane insufflation via trachea intubation group (group I), sevoflurane insufflation via membrane lung group (group II). The respiratory index (RI) and oxygenation index (OI) were calculated. The pathological changes of lung tissue were observed under the light microscope. Meanwhile, the expression of activated Caspase-3 in lung tissue and the apoptosis were detected. **Results** OI in the three groups was gradually decreased with the time lapse, while RI was gradually increased ($P<0.05$). Compared with the group C, OI at the T_3 time point in the group I and group II was increased, while RI was decreased ($P<0.05$). A small amount of inflammatory cells infiltration and red cells infiltration could be seen in the lung tissue. The expressions of activated Caspase-3 and apoptosis index in lung tissues of 3 groups were increased gradually. Moreover, compared with the group C, the expression of activated Caspase-3 and the apoptotic index at the T_3 time point in the group I and II were decreased obviously ($P<0.05$). The above indexes in the group I and group II had no obvious changes ($P>0.05$). **Conclusion** Sevoflurane has a protective effect on the lung tissue in dogs undergoing cardiopulmonary bypass. The effect of sevoflurane insufflation via different pathways on the cellular apoptosis and respiratory function of the dog lung tissue has no difference.

[Key words] sevoflurane; membrane oxygenation; Caspase-3; apoptosis

体外循环转流过程中麻醉医生或者体外循环灌注师会在不同的方式下给予多种麻醉药物及调节血

管活性、酸碱度的药物, 这种给药方式目前尚缺乏统一性和规范性, 不同给予方式是否会对机体产生不同

^{*} 基金项目: 贵州省科学技术基金(黔科合 LH 字[2014]7570 号)。 作者简介: 窦雪娇(1985—), 主治医师, 硕士, 主要从事体外循环器官保护的研究。 △ 通信作者, E-mail: hianzhang@tom.com。

表 1 各组实验犬不同时间点呼吸参数的变化($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	OI			RI		
	T ₁	T ₂	T ₃	T ₁	T ₂	T ₃
C 组	501.00±23.01	320.00±33.78 ^a	187.00±43.63 ^{ab}	0.22±0.13	1.01±0.23 ^a	2.20±0.34 ^{ab}
I 组	489.00±40.12	353.00±20.10 ^a	228.00±30.60 ^{abc}	0.13±0.21	0.71±0.38 ^a	1.38±0.23 ^{abc}
II 组	510.00±41.01	342.00±20.10 ^a	247.00±22.71 ^{abc}	0.23±0.09	0.67±0.22 ^a	1.24±0.25 ^{abc}

^a: $P<0.05$,与 T₁ 时点比较;^b: $P<0.05$,与 T₂ 时点比较;^c: $P>0.05$,与 C 组比较

影响鲜见文献报道。本文研究挥发性麻醉药七氟烷经膜式氧合器与气管插管两种途径吹入,探讨其对犬肺组织呼吸功能和细胞凋亡的影响,进一步指导七氟烷在临床体外循环过程中的使用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 健康杂种犬 18 只(由遵义医学院动物实验中心提供),体质量 10~15 kg,雌雄不限,分为 3 组,每组 6 只。3 组均开胸建立犬体外循环,左肺制造缺血再灌注模型,开放左肺门即刻经不同途径吹入七氟烷;C 组未做操作, I 组经气管插管吹入七氟烷, II 组经膜肺吹入七氟烷。

1.2 方法

1.2.1 实验准备 用乳酸林格氏液及羟乙基淀粉预充体外循环管道及希健婴儿型膜式氧合器(西安西京公司),充分排气后连接 WEL-1000HA 人工心肺机(天津汇康医用设备有限公司)待用。3 组犬均用 2.5%戊巴比妥钠 25 mg/kg 腹腔注射麻醉后固定,行双腔气管插管并机械通气,潮气量 12~15 mL/kg,呼吸频率每分钟 16 次, I:E=1:2。监测 ECG、舌黏膜氧饱和度,行股动静脉切开置管分别监测动脉血压(MAP)和中心静脉压(CVP)。

1.2.2 实验步骤 待犬生命体征相对稳定后,于正中开胸并切开心包暴露心脏,静脉注射肝素 3 mg/kg,待肝素化后行锁骨下动脉和右心耳插管,分别连接体外循环管道后分离左肺动静脉,待激活全血凝固时间(ACT)大于 480 s 后开始体外循环,10 min 后阻断左肺动静脉,同时行右侧单肺通气,调整呼吸参数(潮气量 8~10 mL/kg,呼吸频率每分钟 20~22 次)。阻断左肺动脉 60 min 后,开放左肺动静脉,并恢复双肺机械通气,继续转机 30 min 后停止体外循环,建立左肺体外循环缺血再灌注损伤模型。用鱼精蛋白中和肝素,同时用肾上腺素 0.01~0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 和多巴胺 2~10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ 静脉泵入,经股静脉输入回收的机血以维持循环稳定 2 h 后结束实验。实验中采用常温体外循环,术中维持灌注流量在 100~120 mL $\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$,平均动脉压维持在 50~80 mm Hg,术中通过动脉血气分析的结果调整酸碱及电解质平衡。I、II 组于开放左肺动静脉即刻分别经气管插管及膜肺吹入七氟烷持续 30 min,调节七氟烷呼气末浓度为 2%。

1.2.3 标本采集及指标检测 3 组犬分别于体外循

环前(T₁)、开放左肺动静脉后即刻(T₂)、停机后 2 h(T₃)取左肺组织及股动脉血行血气分析(i-stat 血气分析仪)。根据血气分析的结果计算呼吸指数(RI)和氧合指数(OI), $RI = P(A-a)O_2/PaO_2$, $OI = PaO_2/FiO_2$, 其中 $P(A-a)O_2 = (Pa - PH_2O) \times FiO_2 - PaO_2 - PaCO_2$, Pa 为标准状态下大气压 760 mm Hg, PH₂O 为标准状态下饱和水蒸气压 47 mm Hg, FiO₂(%)为 99%的吸入氧浓度。取出的肺组织一部分保存于甲醛中,用 HE 染色制作病理切片,光镜下观察组织病理变化;另一部分用 Western blot 检测组织中活化 Caspase-3 的表达;并用 TUNEL 法检测细胞凋亡的情况,光镜下观察切片染色情况,正常细胞呈蓝色,凋亡细胞胞质及胞膜呈棕黄色。选取 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,阳性细胞数/总细胞数即为凋亡指数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量资料的方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

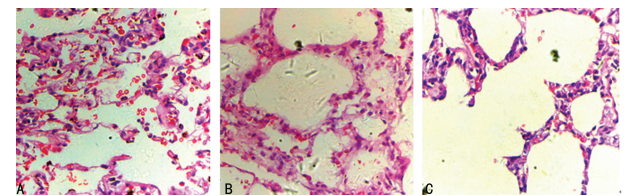
2.1 各组犬呼吸参数的变化 随时间推移 3 组犬 OI 逐渐降低,而 RI 逐渐升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。在 T₃ 时点, I、II 两组与 C 组比较, OI 明显升高, RI 明显降低($P<0.05$), I、II 两组 RI、OI 比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

2.2 各组犬肺组织光镜情况 T₁ 时 3 组犬左肺组织的结构正常。开放左肺动静脉后犬肺组织结构清晰,但肺泡腔内出现较多炎性细胞、红细胞浸润,可见肺泡间质局部轻度增宽。T₃ 时 C 组犬肺组织结构紊乱,可见肺泡腔塌陷及肺泡壁断裂,炎性细胞、红细胞浸润; I、II 组犬肺组织结构稍紊乱,有少量炎性细胞及红细胞浸润,见图 1。

2.3 各组犬肺组织活化 Caspase-3 表达情况 T₁ 时 3 组犬活化 Caspase-3 表达差异无统计学意义($P>0.05$),随时间推移活化 Caspase-3 表达逐渐增加($P<0.05$)。T₃ 时点 I、II 两组活化 Caspase-3 表达明显低于 C 组($P<0.05$), I 组与 II 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 2、图 2。

2.4 各组犬肺组织细胞凋亡情况 随时间推移 3 组犬肺组织凋亡细胞的阳性积分逐渐增加($P<0.05$)。在 T₃ 时点, I、II 组与 C 组比较,肺组织细胞凋亡指

数明显降低($P<0.05$), I 组与 II 组比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 3、图 3。



A: C 组; B: I 组; C: II 组
图 1 T_3 时点各组犬肺组织 HE 染色 ($\times 400$)

表 2 各组犬不同时点活化 Caspase-3 与 β -actin 蛋白质条带的比值($\bar{x}\pm s, n=6$)			
组别	T_1	T_2	T_3
C 组	0.15 ± 0.19	0.28 ± 0.31^a	0.53 ± 0.48^{ab}
I 组	0.16 ± 0.27	0.24 ± 0.56^a	0.35 ± 0.31^{abc}
II 组	0.13 ± 0.43	0.21 ± 0.43^a	0.29 ± 0.23^{abc}

$a: P<0.05$, 与 T_1 时点比较; $b: P<0.05$, 与 T_2 时点比较; $c: P>0.05$, 与 C 组比较

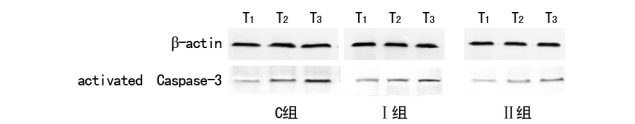
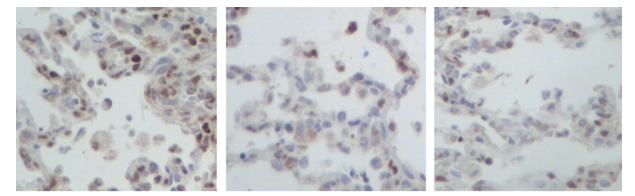


图 2 各组犬肺组织活化 Caspase-3 表达情况

表 3 3 组犬不同时点肺组织凋亡指数比较($\bar{x}\pm s, n=6$)			
组别	T_1	T_2	T_3
C 组	5.53 ± 0.27	15.41 ± 0.23^a	47.19 ± 0.32^{ab}
I 组	6.42 ± 0.23	18.90 ± 0.12^a	27.08 ± 0.21^{abc}
II 组	7.11 ± 0.18	16.09 ± 0.30^a	25.01 ± 0.33^{abc}

$a: P<0.05$, 与 T_1 时点比较; $b: P<0.05$, 与 T_2 时点比较; $c: P>0.05$, 与 C 组比较



A: C 组; B: I 组; C: II 组
图 3 T_3 时点各组犬肺组织细胞凋亡情况 ($\times 400$)

3 讨 论

七氟烷因其血/气分配系数低,脂溶性低,麻醉诱导苏醒速度快,对呼吸道刺激小并有较好的血流动力学稳定性等优点在临床工作中得到广泛应用。有研究报道,七氟烷预处理可以增加单肺通气患者 HO-1 的表达,保护肺组织,减轻氧化应激损伤^[1]。在猪自体肺移植模型中,运用七氟烷预处理可减轻猪因肺缺血再灌注损伤导致的内皮细胞损伤,减少白细胞趋化因子表达^[2]。CHO 等^[3]在瓣膜置换术中预先给以七氟烷,抑制了体外循环患者全身和肺部的炎症反应,对早期肺部损伤有保护作用。根据课题组前期实验

结果表明采用 2%七氟烷吸入 30 min 后处理,可以减轻体外循环犬肺缺血再灌注导致的肺损伤^[4],这可能与七氟烷通过 PI3K/AKT/NF- κ B 途径降低肺组织细胞凋亡有关。

OI 是衡量肺氧合功能的指标,与肺功能呈正相关。RI 指数是反映肺换气功能的指标,RI>1 表示肺换气功能明显减退,与肺功能呈负相关^[5]。本实验结果表明,体外循环后 3 组犬 RI 指数逐渐升高,OI 指数逐渐降低, T_3 时点光镜下见肺组织结构紊乱,部分肺泡腔塌陷,大量炎性细胞及红细胞浸润。I、II 组与 C 组比较, T_3 时点 RI 降低,OI 升高;I、II 组 RI、OI 比较无差异,光镜下可见肺组织结构部分紊乱,有少量炎性细胞及红细胞浸润。这说明,体外循环可导致犬肺组织损伤,呼吸功能受损,吸入七氟烷后可降低肺组织损伤的程度,改善体外循环犬肺呼吸功能。

几乎所有体外循环患者术后均有不同程度的急性肺损伤或肺功能障碍,约 2% 的成人患者发生急性呼吸窘迫综合征甚至急性呼吸衰竭,病死率高达 15%~72%^[6]。其机制主要是全身炎症反应综合征和肺缺血再灌注损伤。体外循环中超氧离子、肿瘤坏死因子(TNF)、白细胞介素(IL)及补体等直接参与肺损伤。氧化应激过度 and 缺血再灌注损伤后 Ca^{2+} 超载等均可以诱导线粒体内、外膜之间的线粒体通透性转变孔发生不可逆地过度开放,线粒体跨膜电位崩解,呼吸链解偶联,线粒体基质渗透压升高,内膜肿胀,位于线粒体膜间隙的细胞色素 C(Cytc)等促凋亡活性蛋白释放至胞质内,引发一系列级联反应,最终使 Caspase-3 活化,细胞进入不可逆的凋亡过程^[7]。活性 Caspase-3 是细胞凋亡蛋白酶级联反应的关键蛋白酶,是多种凋亡途径共同的下游效应部分,作用底物大多是细胞中的功能蛋白质,它们参与 DNA 修复、mRNA 裂解、类固醇合成及细胞骨架重建等过程^[8]。研究发现,JAK2 基因敲除的肝癌细胞,通过激活 Caspase-3 和其他信号通路,使肝癌细胞发生细胞凋亡和自我吞噬作用^[9];吸入 2.4%七氟烷 60 min,对小鼠脑缺血再灌注损伤有保护作用,可能与增加海马组织 TREK-2 表达、减少 Caspase-3 表达有关^[10]。WANG 等^[11]研究表明,七氟烷通过降低 Caspase-3、Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达,调节免疫稳态的角度减轻 LPS 导致的急性肺损伤^[12]。本实验研究表明:体外循环后活化 Caspase-3 表达逐渐升高,凋亡指数同时也升高;给予七氟烷后活化 Caspase-3 表达降低,凋亡指数也降低,且犬肺呼吸功能和肺组织损伤程度得到一定改善。有文献报道,七氟烷可以通过抑制炎症介质释放、减轻内毒素、抑制氧化应激反应、抑制细胞内 Ca^{2+} 超载及中性粒细胞聚集等多环节达到肺保护作用^[13]。体外循环期间, Ca^{2+} 超载是肺缺血再灌注损伤发生的重要机制,KOJIMA 等^[14]的研究认为,七氟烷可以通过阻断多个 Ca^{2+} 通道和转运蛋白减少心肌损

伤。吸入麻醉药不仅可以抑制气管平滑肌肌浆网中 Ca^{2+} 的渗漏,还可以抑制 Ca^{2+} 渗漏引发的 Ca^{2+} 内流。所以,七氟烷减轻体外循环犬肺缺血再灌注损伤可能与七氟烷抑制减少 Caspase-3 活化表达、降低肺组织细胞凋亡有关。

体外循环的本质是一种改良的人工心肺机,最核心的部分是膜肺和泵,起到人工肺和心的作用。血液通过膜肺吸收氧气,排出二氧化碳,经过气体交换的血,在泵的推动下重新回输到患者体内。膜肺的主要材料是聚丙烯中空纤维膜,表面有很多微孔,允许气体通过而不允许血浆通过。本实验通过膜肺和气管插管两种不同途径吹入七氟烷发现:活化 Caspase-3 的表达降低程度和凋亡指数并无差异。吸入麻醉药是通过血流分布全身,根据血液灌注程度不同,药物与血流丰富的组织在 10 min 左右可迅速达到平衡,药物最终在血液循环的推动下至中枢神经系统而产生麻醉效应^[15]。故在体外循环中不论是从气管插管还是从膜肺吹入七氟烷,对肺组织产生的保护作用大致相同。

膜式氧合器是一种人工肺,通过人工合成的高分子材料制备的生物膜进行气体交换氧合,是集储血、过滤、氧合、变温、回收血等功能于一体的人工脏器。虽然它的材料与正常肺组织完全不同,但是七氟烷从不同途径进入体内后对左肺组织呼吸功能及细胞凋亡的影响无明显差异,其具体机制可能与七氟烷均是溶解和弥散到血液当中,随血液循环到达全身相应的靶器官而产生作用有关。

七氟烷可使体外循环犬肺组织活化 Caspase-3 表达下降,细胞凋亡减少,具体调节机制不清,仍有待进一步研究,且不同途径吹入七氟烷在中枢神经系统产生的麻醉效能是否相同仍是一个疑问。

参考文献

- [1] FENG H, WANG G M, QIAO Y, et al. Effects of sevoflurane preconditioning on lung injury during one lung ventilation[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8): 13634-13638.
- [2] CASANOVA J, SIMON C, VARA E, et al. Sevoflurane anesthetic preconditioning protects the lung endothelial glycocalyx from ischemia reperfusion injury in an experimental lung autotransplant model[J]. *J Anesth*, 2016, 30(5): 755-762.
- [3] CHO E J, YOON J H, HONG S J, et al. The effects of sevoflurane on systemic and pulmonary inflammatory re-

sponses after cardiopulmonary bypass[J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2009, 23(5): 639-645.

- [4] ZHANG Y, LI D, LUO J, et al. Pharmacological preconditioning with sevoflurane activates PI3K/AKT signaling and attenuates cardiopulmonary bypass-induced lung injury in dog[J]. *Life Sci*, 2017, 173: 68-72.
- [5] 蒋维维, 钟玮, 李云, 等. 呼气末正压对保护性通气下泌尿外科后腹腔镜手术患者术中肺功能的影响[J]. *中华麻醉学杂志*, 2016, 36(3): 277-280.
- [6] XING Z, HAN J, HAO X, et al. Immature monocytes contribute to cardiopulmonary bypass-induced acute lung injury by generating inflammatory descendants[J]. *Thorax*, 2017, 72(3): 245-255.
- [7] 赵彦超, 顾耘. 细胞凋亡通路研究进展[J]. *现代医学*, 2013, 41(4): 285-288.
- [8] CHEN J, MEHTA J L, HAIDER N, et al. Role of caspases in ox-LDL-induced apoptotic cascade in human coronary artery endothelial cells[J]. *Circ Res*, 2004, 94(3): 370-376.
- [9] XU Y, LV S X. The effect of JAK2 knockout on inhibition of liver tumor growth by inducing apoptosis, autophagy and anti-proliferation via STATs and PI3K/AKT signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 84: 1202-1212.
- [10] 王民, 杨永安, 耿磊, 等. 七氟醚预处理对缺血再灌注损伤小鼠脑组织的保护作用及其机制探讨[J]. *山东医药*, 2016, 56(11): 25-27.
- [11] WANG L, YE Y, SU H B, et al. The anesthetic agent sevoflurane attenuates pulmonary acute lung injury by modulating apoptotic pathways[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2017, 50(3): e5747.
- [12] TANG Q F, FANG Z Y, SHI C H. The protective effect and mechanism of sevoflurane on LPS-induced acute lung injury in mice[J]. *Am J Transl Res*, 2017, 9(4): 1732-1742.
- [13] 唐茜茜, 彭艳华, 王寿勇. 体外循环中七氟烷的肺保护效应机制研究进展[J]. *重庆医学*, 2018, 47(11): 1498-1501.
- [14] KOJIMA A, KITAGAWA H, OMATSU-KANBE M, et al. Sevoflurane protects ventricular myocytes against oxidative stress-induced cellular Ca^{2+} overload and hypercontracture[J]. *Anesthesiology*, 2013, 119(3): 606-620.
- [15] 于布为, 薛庆生, 罗艳. 吸入麻醉药物的研究进展[J]. *继续医学教育*, 2006, 20(15): 26-36.

(收稿日期: 2018-10-10 修回日期: 2018-12-21)