

· 基础研究 ·

## 山莨菪碱减轻兔肺缺血再灌注后肺水肿的实验研究

贾智博<sup>1</sup>, 周 钢<sup>3</sup>, 王丽平<sup>2\*</sup>, 田 海<sup>1</sup>, 刘开宇<sup>1</sup>, 蒋树林<sup>1</sup>

(哈尔滨医科大学附属第二医院:<sup>1</sup>心外科,<sup>2</sup>老年病科, 哈尔滨 150086;<sup>3</sup>佳木斯大学附属第一医院胸心外科, 佳木斯 154002)

**【摘要】目的** 观察山莨菪碱减轻兔肺缺血再灌注后肺水肿的作用并探讨其可能的机制。**方法** 建立在兔肺缺血再灌注动物模型。10~12周龄健康家兔24只,雌雄不拘,体重2.2~2.6kg,随机分为3组,每组8只。山莨菪碱组于左肺缺血再灌注处理前静脉给予山莨菪碱3mg/kg预处理,对照组进行左肺缺血再灌注处理,假手术组只开胸并套带,不行缺血再灌注处理。各组左肺缺血1h并再灌注3h后结扎并切取左肺下叶,部分行组织学观察,部分通过测量肺湿干重的方法计算肺含水量,余肺组织按试剂盒说明书检测组织髓过氧化物酶(MPO)含量。最后经兔股静脉注射2%伊文思兰(1.5ml/kg),然后取左肺上叶,比较3组肺血管通透性。**结果** 缺血再灌注处理后,对照组肺含水量、MPO含量及伊文思兰含量分别为(6.6±0.5)g/g干组织、(1.16±0.14)U/g蛋白质和(173±16)μg/g湿组织,明显高于假手术组的(4.3±0.4)g/g干组织、(0.53±0.09)U/g蛋白质和(103±11)μg/g湿组织( $P<0.05$ ),组织损伤严重并可见严重的肺水肿;山莨菪碱组上述指标水平分别为(5.6±0.4)g/g干组织、(0.82±0.11)U/g蛋白质和(124±18)μg/g湿组织,较对照组明显下降( $P<0.05$ ),组织损伤轻微,肺水肿程度很轻。**结论** 山莨菪碱通过抑制中性粒细胞生成、降低肺血管通透性等作用显著减轻了肺缺血再灌注后肺水肿的程度。

**【关键词】**兔;山莨菪碱;肺;再灌注损伤;肺水肿

**【中图分类号】**R563.9

**【文献标识码】**A

**【DOI】**10.3724/SP.J.1264.2011.00015

## Effect of anisodamine on lung edema after ischemia-reperfusion in rabbits

JIA Zhibo<sup>1</sup>, ZHOU Gang<sup>2</sup>, WANG Liping<sup>2\*</sup>, TIAN Hai<sup>1</sup>, LIU Kaiyu<sup>1</sup>, JIANG Shulin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiovascular Surgery, <sup>2</sup>Department of Geriatrics, Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China; <sup>3</sup>Department of Cardiothoracic Surgery, First Affiliated Hospital, Jiamusi University, Jiamusi 154002, China)

**【Abstract】Objective** To investigate the protective efficacy of anisodamine against lung edema after ischemia-reperfusion in rabbits, and to explore the possible mechanism. **Methods** *In vivo* lung ischemia-reperfusion model of rabbit was developed. Twenty-four Chinese rabbits of either gender, aged 10-12 weeks, weighing 2200-2600 g, were divided into 3 groups randomly: anisodamine group, control group and sham group, with 8 rabbits in each group. In anisodamine group, the left pulmonary hilum was occluded for 1 hour and then released for 3 hours, and anisodamine (3 mg/kg) was given by intravenously injection before occlusion. In control group, only ischemia-reperfusion was performed. In sham group, left lung received no ischemia-reperfusion. Left lung tissue in each group was harvested for histopathological analysis, lung water content determination and myeloperoxidase (MPO) level detection. Also, 2% Evens blue (1.5 ml/kg) was injected into femoral venous to measure lung vascular permeability. **Results** After ischemia-reperfusion, the lung tissue water content, MPO level and Evens blue level in control group were (6.6±0.5) g/g dry tissue, (1.16±0.14) U/g protein and (173±16) μg/g wet tissue respectively, significantly higher than those in sham group [(4.3±0.4) g/g dry tissue, (0.53±0.09) U/g protein and (103±11) μg/g wet tissue,  $P<0.05$ ]. These indices in anisodamine group were (5.6±0.4) g/g dry tissue, (0.82±0.11) U/g protein and (124±18) μg/g wet tissue, obviously lower than those in control group ( $P<0.05$ ). Left lung displayed prominent edema, septal swelling, hemorrhage and neutrophil infiltration in control group, while which was significantly improved in anisodamine group. **Conclusion** Anisodamine can significantly prevent lung edema after ischemia-reperfusion in rabbits. The mechanism may be ascribed to inhibition of neutrophil infiltration and decrease in vascular permeability.

**【Key words】** rabbits; anisodamine; lung; reperfusion injury; edema, pulmonary

体外循环心脏外科手术、心肺联合移植、肺移植手术在临床上已成为常规手术,但是术后肺脏经

历缺血再灌注后常出现肺水肿,影响患者的呼吸功能<sup>[1]</sup>。山莨菪碱因具有保护细胞膜、抑制炎症介质

生成等作用<sup>[2,3]</sup>, 现已用于减轻心、脑、肠等器官的缺血再灌注损伤的实验研究<sup>[4-6]</sup>。本研究旨在通过在兔肺缺血再灌注动物模型, 观察山莨菪碱对肺脏缺血再灌注后肺水肿的减轻作用, 并探讨其可能的作用机制, 为临床肺保护提供新路径。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

10~12 周龄健康家兔 24 只, 雌雄不拘, 体重 2.2~2.6 kg, 购于佳木斯大学动物实验中心。

### 1.2 主要材料与仪器

683 型容积小动物呼吸机 (哈佛大学), 山莨菪碱注射液 (唐山市渤海制药厂), 髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。

### 1.3 动物模型制备及分组

参照 Yamashita 等<sup>[7,8]</sup>报道的方法并加以改进建立在兔肺缺血再灌注损伤模型。实验动物称重, 耳缘静脉注射氯胺酮 50 mg/kg 麻醉; 颈正中切开皮肤, 游离气管, 在气管上做 T 型切口, 4.5F 气管插管, 丝线结扎固定, 静脉给予维库溴胺 0.04 mg/kg 维持肌松, 连接小动物呼吸机给予机械通气, 呼吸频率 30/min, 生理盐水 0.5 ml/min 持续静滴; 胸部正中切口, 劈开胸骨, 置小动物开胸器撑开胸骨, 切开左侧胸膜, 切断左下肺韧带, 于降主动脉和肺门交界处游离肺门后, 以 7 号丝线为阻断带将左肺门套带以备阻断左肺门用; 肝素 300 IU/kg 肝素化。

实验动物随机分 3 组, 每组 8 只动物。山莨菪碱组, 于呼气末时用阻断器阻断左肺门造成左肺缺血 1 h 后开放阻断器, 左肺恢复灌注并复张后观察 3 h, 阻断左肺门前 5 min 经耳缘静脉给予山莨菪碱 3 mg/kg 静推, 2 min 内推注完; 对照组, 阻断左肺门 1 h 后开放阻断器, 左肺恢复灌注并复张后观察 3 h; 假手术组, 开胸后仅游离左肺门并套带, 不阻断肺门, 观察 4 h。

## 1.4 检测指标

1.4.1 组织学观察 山莨菪碱组和对照组在缺血 1 h、再灌注 3 h, 假手术组在开胸 4 h, 于近肺门处结扎并切取部分左肺下叶肺组织, 10% 甲醛溶液固定, 乙醇脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色, 光镜下观察肺组织结构破坏、肺间质水肿及炎性细胞浸润程度。

1.4.2 肺含水量测定 上述方法取部分左肺下叶组织, 通过测量肺湿干重的方法计算肺含水量: 肺组织称重, 70℃ 干燥箱中烘干 72 h 后称干重, 通过公式算出肺含水量。肺含水量 (g/g 干组织) = (湿重 - 干重) / 干重

1.4.3 MPO 含量测定 上述方法留取部分左肺下叶组织冻存, 按试剂盒说明书检测肺组织 MPO 含量。

1.4.4 肺血管通透性比较 结束手术前, 各组经股静脉注射 2% 伊文思兰 (1.5 ml/kg), 然后取左肺上叶, 参照 Udaka 的方法<sup>[9]</sup>比较肺血管通透性差异。左肺上叶肺组织约 200~400 mg, 吸干血液, 按每 100 mg 湿重组织用 2 ml 甲酰胺的比例置入 45℃ 水浴中, 抽提离心后, 于波长 632 nm 处测吸光度, 计算出伊文思兰含量 (μg/g 湿组织)。

## 1.5 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计学分析。实验所得数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用 ANOVA 方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肺组织学观察

对照组缺血 1 h、再灌注 3 h 后, 动物左肺可见肺血管扩张充血, 肺间质水肿, 肺泡腔内有浆液性渗出, 并有大量红细胞漏出, 中性粒细胞浸润明显。山莨菪碱组动物左肺损伤很轻, 肺泡结构完整, 肺水肿程度较对照组明显减轻, 肺泡腔内仅有少量红细胞漏出, 中性粒细胞浸润很少。假手术组动物左肺组织无破坏征象, 肺泡壁完整, 肺间质无水肿, 无中性粒细胞浸润 (图 1)。

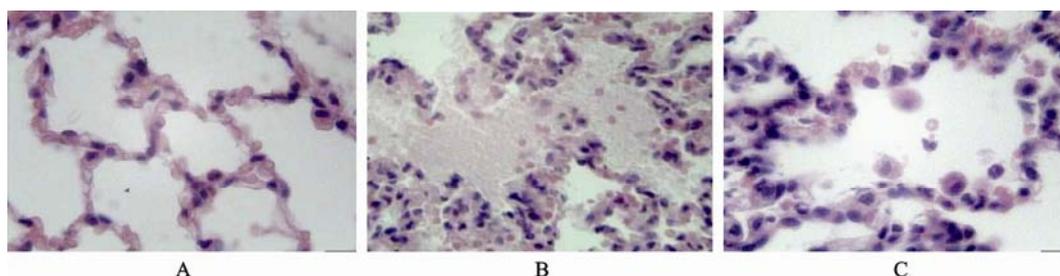


图 1 各组左肺缺血 1 h、再灌注 3 h 后组织学观察 (HE ×400)

A: 假手术组肺泡壁完整, 肺间质无水肿; B: 对照组可见肺间质水肿, 肺泡腔内有浆液性渗出, 并有大量红细胞漏出, 中性粒细胞浸润明显; C: 山莨菪碱组肺泡结构完整, 肺水肿轻, 肺泡腔内少量红细胞漏出, 中性粒细胞浸润很少

## 2.2 肺含水量测定

山莨菪碱组和对照组左肺含水量均显著高于假手术组 ( $P < 0.05$ ), 山莨菪碱组肺含水量则明显低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 表 1)。

## 2.3 肺组织中 MPO 含量检测

山莨菪碱组和对照组左肺组织中 MPO 含量均明显高于假手术组 ( $P < 0.05$ ), 而山莨菪碱组左肺组织中 MPO 含量低于对照组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ; 表 1)。

## 2.4 肺血管通透性比较

山莨菪碱组和对照组左肺组织中伊文思兰含量明显高于假手术组 ( $P < 0.05$ ), 而山莨菪碱组肺组织中伊文思兰含量明显低于对照组 ( $P < 0.05$ ; 表 1)。

表 1 3组左肺缺血 1 h, 再灌注 3 h 肺含水量、MPO 含量和伊文思兰含量比较 ( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	含水量 (g/g 干组织)	MPO 含量 (U/g 蛋白质)	伊文思兰含量 ( $\mu\text{g/g}$ 湿组织)
假手术组	$4.3 \pm 0.4$	$0.53 \pm 0.09$	$103 \pm 11$
对照组	$6.6 \pm 0.5^*$	$1.16 \pm 0.14^*$	$173 \pm 16^*$
山莨菪碱组	$5.6 \pm 0.4^{*#}$	$0.82 \pm 0.11^{*#}$	$124 \pm 18^{*#}$

注: 与假手术组比较\* $P < 0.05$ ; 与对照组比较, # $P < 0.05$

## 3 讨论

目前, 缺血再灌注损伤的发病机制尚未彻底阐明, 可能是多种因素共同作用的结果。这些因素包括 ATP 生成减少、钙超载、氧自由基生成、微血管损伤以及白细胞的作用等<sup>[10]</sup>。其中中性粒细胞的大量生成、激活及释放多种炎性介质引起的微血管损伤是缺血再灌注损伤的重要发病机制之一<sup>[11]</sup>。研究表明, 肺脏经历缺血再灌注后, 中性粒细胞的激活及黏附可引起微血管通透性增高, 细胞间质水肿, 肺含水量增多, 是引起患者呼吸功能下降的主要原因<sup>[12]</sup>。我们在建立兔肺缺血再灌注动物模型的基础上发现对照组兔肺组织经历缺血再灌注后与假手术组相比可见肺血管扩张充血, 中性粒细胞浸润, 肺泡腔内有大量浆液性渗出及红细胞漏出, 表明发生了严重的肺水肿。这与前面研究结果一致。因此寻找抑制中性粒细胞浸润及聚集、减轻肺水肿等改善缺血再灌注后肺功能的方法是当前亟待解决的难题。

山莨菪碱是一种生物碱, 通常作为毒蕈碱型乙酰胆碱拮抗剂用于缓解平滑肌痉挛<sup>[13]</sup>。现已有实验应用山莨菪碱来减轻心脏、肝脏<sup>[6,14]</sup>等组织缺血再灌注损伤的研究。本实验在实验组家兔缺血再灌注前给予山莨菪碱预处理, 结果发现, 与对照组相比,

经过山莨菪碱预处理的动物左肺损伤很轻, 肺泡结构完整, 肺泡腔内仅有少量红细胞漏出, 中性粒细胞浸润很少, 肺水肿程度明显减轻。肺含水量测定结果也证实山莨菪碱组肺组织含水量与肺含水量异常增高的对照组相比, 其数值明显下降, 表明山莨菪碱具有减轻肺缺血再灌注后肺水肿的作用。

中性粒细胞中存在有 MPO, 每个细胞所含该酶的量是一定的, 约占细胞干重的 5%, 通过分析该酶活力可以间接测定中性粒细胞的数量<sup>[15]</sup>。本实验发现对照组肺组织中 MPO 含量显著高于假手术组, 而山莨菪碱组该酶含量明显低于对照组, 该结果进一步证实了前述组织学观察的结果, 即山莨菪碱明显减少了中性粒细胞的生成, 推测可能是通过该作用发挥了减轻肺水肿的作用。同时我们又间接对各组左肺组织肺血管通透性进行了比较, 结果表明, 对照组经过静脉注射 2% 的伊文思兰后肺组织中伊文思兰含量明显高于假手术组, 表明对照组左肺在经历了缺血再灌注后肺血管通透性明显增高, 而山莨菪碱组肺组织中伊文思兰含量明显低于对照组, 提示经过山莨菪碱预处理的实验组肺血管通透性得到了明显的改善。以上结果表明, 山莨菪碱抑制了中性粒细胞分泌, 降低了血管通透性。

总之, 山莨菪碱通过抑制炎性介质的合成、改善血管通透性作用, 减轻了缺血再灌注引起的肺水肿, 达到了肺保护作用。

### 【参考文献】

- [1] 胡克俭, 叶 磊, 姜 桢, 等. 体外循环中急性肺水肿分析[J]. 上海生物医学工程, 2002, 23(1): 6-7, 10.
- [2] Poupko JM, Baskin SI, Moore E. The pharmacological properties of anisodamine[J]. J Appl Toxicol, 2007, 27(2): 116-121.
- [3] Zhang HM, Ou ZL, Gondaira F, et al. Protective effect of anisodamine against Shiga toxin-1: inhibition of cytokine production and increase in the survival of mice[J]. J Lab Clin Med, 2001, 137(2): 93-100.
- [4] Hu S, Sheng ZY. The effects of anisodamine and dobutamine on gut mucosal blood flow during gut ischemia/reperfusion[J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(3): 555-557.
- [5] Chen Q, Zeng Y. Anisodamine protects against neuronal death following cerebral ischemia in gerbils[J]. Chin Med J(Engl), 2000, 113(7): 636-639.
- [6] 谷新顺, 王荣英, 马 宁, 等. 山莨菪碱对小型猪缺血/再灌注心肌的保护作用[J]. 中国急救医学, 2006, 26(3): 197-199.
- [7] Yamashita H, Akamine S, Sumida Y, et al. Inhaled nitric oxide attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion injury of

- the rabbit lung[J]. *Ann Thorac Surg*, 2004, 78(1): 292-297.
- [8] Esme H, Fidan H, Koken T, *et al*. Effect of lung ischemia-reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2006, 29(3): 294-298.
- [9] Udaka K, Takeuchi Y, Movat HZ. Simple method for quantitation of enhanced vascular permeability[J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1970, 133(4): 1384-1387.
- [10] Tapuria N, Kumar Y, Habib MM, *et al*. Remote ischemic preconditioning: a novel protective method from ischemia reperfusion injury-a review[J]. *J Surg Res*, 2008, 150(2): 304-330.
- [11] Van der Kaaij NP, Kluin J, Haitsma JJ, *et al*. Ischemia of the lung causes extensive long-term pulmonary injury: an experimental study[J]. *Respir Res*, 2008, 9(1): 28.
- [12] de Perrot M, Liu M, Waddell TK, *et al*. Ischemia-reperfusion-induced lung injury[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(4): 490-511.
- [13] 杨丽敏, 钮因尧, 朱亮, 等. 山莨菪碱的结构修饰与构效关系[J]. *中国药学杂志*, 2008, 43(7): 496-498.
- [14] 王保才. 山莨菪碱在肝病治疗中的作用[J]. *河北医药*, 2007, 29(10): 1138-1139.
- [15] Lu YT, Hellewell PG, Evans TW, *et al*. Ischemia-reperfusion lung injury: contribution of ischemia, neutrophils and hydrostatic pressure[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273 (1 Pt 1): L46-54.
- (编辑: 王雪萍)

## · 消息 ·

### 《中华老年多器官疾病杂志》征稿启事

《中华老年多器官疾病杂志》是由中国人民解放军总医院主管、解放军总医院老年心血管病研究所主办的医学期刊,创办于2002年,由王士雯院士任总编辑。本刊是国内外唯一的一本反映老年多器官疾病的期刊,主要交流老年心血管疾病,尤其是老年心血管疾病合并其他疾病,老年两个以上器官疾病及其他老年多发疾病的诊治经验与发病机制的研究成果。开设的栏目有述评、综述、临床研究、基础研究等。

本刊热忱欢迎从事心脏病学及其相关领域的专家学者踊跃投稿,我们真诚期待您的关注和参与。

地址:100853 北京市复兴路28号,解放军总医院老年心血管病研究所

100088 北京市西城区德胜门外大街83号德胜国际中心B座301室,北京中科期刊出版有限公司

联系人:王雪萍、任开环

电话:010-66936756;010-59790736-8087

传真:010-59790736-8092

电子邮箱:mode@mail.sciencep.com

在线投稿:<http://www.mode301.cn/ch/author/login.aspx>