DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.08.011
第22卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 8
2000年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2000

文章编号:1000-5404(2000)08-0737-03

论著

己酮可可碱对肺缺血再灌注后粘附分子表达的影响

牛会军,范士志,蒋耀光,陈建民,李志平,向明章 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所胸心外科,重庆 400042)

提 要:目的 探讨己酮可可碱对肺缺血再灌注损伤后中性粒细胞(PMN)表面CD18、肺组织ICAM-1表达的影响。方法 72只大鼠随机化方法分为假手术组、缺血再灌注组、PTX组。采用肺在体温缺血再灌注损伤模型,于缺血45 min、再灌注1、2、4 h测定肺组织含水量、支气管肺泡灌洗液(BALF)白蛋白含量、肺组织及BALF髓过氧化物酶(MPO)活性、流式细胞仪测定CD18-FITC标记的PMN阳性细胞百分率,肺组织ICAM-1免疫组化染色,并进行图像分析。结果 缺血再灌注组再灌注后各时相点肺含水量、BALF白蛋白含量、左肺组织及BALF MPO活性及CD18、ICAM-1表达均有非常显著的升高($P<0.01$),PTX则可以明显抑制这种变化。结论 PTX可能通过降低肺缺血再灌注引起的CD11/CD18及ICAM-1的表达,而减轻PMN在肺内的聚集、活化,从而防治肺缺血再灌注损伤。

关键词:缺血再灌注;肺损伤;己酮可可碱;中性粒细胞;CD18;ICAM-1
中图法分类号:R967;R619.9 文献标识码:A

Effects of pentoxifylline on adhesion molecules expression in lung ischemia-reperfusion injury in rats

NIU Hui-jun, FAN Shi-zhi, JIANG Yao-guang, CHEN Jian-min, LI Zhi-ping, XIANG Ming-zhang (Department of Thoracic Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the effect of pentoxifylline on the expression of the CD18 and ICAM-1 after lung ischemia/reperfusion injury in rats. Methods The rat model of lung ischemia was estaleished with occlusion of left pulmonary hilus for 45 min. Seventy-two rats were divided into 3 groups: ① Sham operation group (Group Ⅰ, $n=24$); ②Ischemia-reperfusion injury group (Group Ⅱ, $n=24$); ③Pentoxifylline treatment group (Group Ⅲ, $n=24$). Pentoxifylline was injected intravenously 5 min before and 45 min after normothermic ischemia. The changes of water content of lung, MPO and BALF albumin were studied 1 h, 2 h, 4 h during reperfusion after 45 min pulmonary ischemia. Flow cytometric analysis and immunohistochemistry were used to assess the expression of the CD18 on the polymorphonuclear neutrophil (PMN) and ICAM-1 on lung tissue. Results In group Ⅱ, water content of lung, MPO and BALF albumin were increased evidently ($P<0.05$), the expression of CD18 and ICAM-1 were up-regulated. In group Ⅲ, the changes were ameliorated as compared with group Ⅱ. Conclusion Pentoxifylline can reduce the aggregation and activation of PMNs in the lungs through its effect to inhibit the expression of CD11/CD18 and ICAM-1 after pulmonary ischemia-reperfusion. Consequently pulmonary ischemia-repefusion injury is prevented.

Key words: ischemia-reperfusion; lung injury; neutrophil; pentoxifylline; CD18; ICAM-17

中性粒细胞(Polymorphonuclear neutrophil, PMN)在肺内聚积是肺缺血再灌注损伤的重要特征之一,PMN在肺缺血再灌注损伤中起着至关重要的作用,白细胞粘附于血管内皮细胞是其发挥损伤作用关键步骤[1]。白细胞粘附有赖于白细胞和内皮细胞膜上粘附分子的介导。最近国外研究报道[2]己酮可可碱(Pentoxifylline,

作者简介:牛会军(1969—),男,天津市宁河县人,硕士,医师,主要从事肺缺血再灌注损伤方面的研究。电话:(023)68757081

收稿日期:2000-01-12;修回日期:2000-05-24

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

PTX)可以减轻肺缺血再灌注损伤,但具体机制尚不明确,PTX对肺缺血再灌注中粘附分子表达的影响尚未见报道。本研究采用在体大鼠肺缺血再灌注损伤模型,借助流式细胞仪和免疫组织化学技术,观察分析了PTX对肺缺血再灌注损伤后PMN表面CD18、肺组织ICAM-1表达的影响,并对其意义进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

雄性Wistar大鼠72只,体重200~250 g,随机分为:Ⅰ组:假手术组,仅行开胸,未行缺血及再灌注处理;Ⅱ组:缺血再灌注组,行左肺缺血和再灌注处理;Ⅲ组:PTX组,行左肺缺血和再灌注处理,且于缺血前5 min颈静脉注射PTX 20 mg/kg,并以6 mg·kg^{-1}·h^{-1}维持(Ⅰ组和Ⅱ组给予等量生理盐水)。

1.2 试剂

鼠ICAM-1单克隆抗体(R&D公司,美国),鼠CD18-FITC单克隆抗体(Sigma公司,美国),Percoll细胞分离液(Pharmacia公司,瑞典)

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型复制 3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射麻醉,气管内插管连接DH-140B型动物人工呼吸机控制呼吸;右侧颈动脉插管,用于采集标本、监测动脉血压;右侧颈静脉插管,微量注射泵持续补液,补液速度为4 ml·kg^{-1}·h^{-1}。经左第5肋间进入胸腔,游离左侧肺门,Ⅱ及Ⅲ组采用Okada等大鼠肺缺血再灌注损伤模型,静脉注射50 U肝素5 min后,肺充气状态下用无损伤动脉钳夹闭左侧肺门,阻断45 min后松开动脉夹,形成再灌注。各组分别于缺血45 min、再灌注1、2、4 h动脉放血处死动物(n=6)、留取标本。

1.3.2 检测指标和方法 肺组织含水量用干湿重法测定,支气管肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)白蛋白含量用常规法检测,肺组织、BALF髓过氧化物酶(Myeloperoxidase, MPO)活性参照罗武生等[3]方法测定;Percoll液分离大鼠血PMN,流式细胞仪测定CD18-FITC标记的PMN阳性细胞百分率,代表CD11/CD18的表达水平;肺组织ICAM-1免疫组织化学采用S-P法,并进行图像分析。

1.3.3 统计学分析 数据以$\bar{x}\pm s$表示,采用t检验。

2 结果

Ⅱ组再灌注后各时相点肺含水量、BALF白蛋白含量、左肺组织及BALF MPO活性均较Ⅰ组有非常显著的升高($P<0.01$),Ⅲ组则显著($P<0.05$)或非常显著($P<0.01$)低于Ⅱ组,见表1。缺血后Ⅱ组及Ⅲ组PMN表达CD18差异不明显,再灌注1 h后Ⅱ组CD18表达率非常显著地高于Ⅰ组($P<0.01$);Ⅲ组虽仍显著地高于Ⅰ组,但较Ⅱ组以有非常显著的下调($P<0.01$),见表2。ICAM-1免疫组织化学显示Ⅰ组肺部组织仅见少数血管内皮棕褐色的阳性着色分布,且染色较浅淡;Ⅱ组再灌注2 h以后阳性着色明显增多,分布区域也更为广泛,各级血管的内皮细胞、肺泡上皮细胞及支气管粘膜层均可见较多的棕褐色分布,染色较深,再灌注4 h变化更为明显,图像分析证明再灌注2 h及4 h积分光密度非常显著升高($P<0.01$);Ⅲ组再灌注2、4 h阳性着色较Ⅱ组对应的时相点有所下降,图像分析积分光密度非常显著降低($P<0.01$),见表2。

表1 左肺含水量、BALF白蛋白、左肺组织及BALF MPO活性的变化(n=6)

Tab 1 Changes of water content, MPO of left lung and BALF albumin, BALF MPO of lung tissues(n=6)

		Left lung water content(ml/g)	BALF albumin(mg/ml)	Left lung MPO(U/g)	BALF MPO(U/ml)
GroupⅠ		3.29±0.17	2.52±0.31	6.14±1.14	0.35±0.091
GroupⅡ	1 h during reperfusion	3.75±0.21**	3.57±0.56**	10.67±1.29**	1.01±0.13**
	2 h during reperfusion	4.08±0.29**	3.96±0.62**	13.67±2.15**	1.57±0.44**
	4 h during reperfusion	4.13±0.29**	4.08±0.41**	13.69±1.89**	2.23±0.56**
GroupⅢ	1 h during reperfusion	3.38±0.16#	2.82±0.45#	6.57±0.83##	0.51±0.12##
	2 h during reperfusion	3.54±0.26#	2.86±0.50#	8.44±2.03##	0.54±0.10**##
	4 h during reperfusion	3.61±0.27*#	3.04±0.42#	8.56±1.85	0.62±0.09**##

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* groupⅠ; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* groupⅡ

表2 PMN CD18荧光阳性标记率和左肺ICAM-1免疫组化积分光密度变化

Tab 2 Changes of fluorescent positive rate of PMN CD18 and integral immunohistochemical optical density of ICAM-1

	Fluorescent positive rate of PMN CD18			Integral optical density of ICAM-1		
	Group Ⅰ	Group Ⅱ	Group Ⅲ	Group Ⅰ	Group Ⅱ	Group Ⅲ
Ischemia 45 min	16.13±3.93	18.26±2.10	17.99±4.11	0.27±0.05	0.35±0.05	0.28±0.08
1 h during reperfusion	17.02±3.23	47.55±6.16**	31.11±6.50**##	0.27±0.05	1.27±0.4**	0.92±0.33**
2 h during reperfusion	17.06±2.37	66.03±8.56**	48.52±5.22**##	0.27±0.05	8.43±1.11**	3.22±1.48**##
4 h during reperfusion	19.32±3.57	56.02±9.45**	40.26±5.84**##	0.27±0.05	11.93±2.42**	6.8 ±1.43**##

**: $P<0.01$ *vs* groupⅠ; ##: $P<0.01$ *vs* groupⅡ

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3　讨论

PMN 是炎性反应的早期现象, 也是机体防御反应极为重要的组成部分。PMN 膜上的整合素 CD11/CD18 和内皮细胞上的 ICAM-1 是介导 PMN 与内皮细胞粘附的主要粘附分子。肺缺血再灌注后外周血 PMN CD18 和内皮细胞 ICAM-1 明显增高, 造成 PMN 大量肺内聚积, 造成血管内皮、组织损伤[4]。

PTX 是甲基黄嘌呤衍生物, 是一种非选择性磷酸二脂酶抑制剂。作为血管扩张剂, 曾广泛地应用于治疗周围性血管疾病。因发现其具有显著的抗炎作用, 因而用于治疗急性肺损伤。最近也有了用于治疗肺缺血再灌注损伤的报道[2,5], 但其作用机制尚未完全阐明。PMN 在肺缺血再灌注损伤中起着关键性作用, CD11/CD18 在 PMN 粘附及其功能发挥中起着至关重要的作用[6]。本实验结果表明, PTX 可以有效地防治肺微血管通透性的增加, 减轻肺水肿的形成。

II组各时相点肺组织匀浆和血浆中 MDA 含量均显著地低于 II 组, 说明 PTX 减轻了肺组织乃至整个动物体内的脂质过氧化。肺缺血再灌注后 II 组肺组织及 BALF 内 MPO 活性显著升高, II组 MPO 活性非常显著地降低, 表明 PTX 明显减轻了肺组织内 PMN 聚集及渗出。

本研究发现缺血再灌注后各时相点 CD11/CD18 的表达量均明显高于 I 组, 肺缺血再灌注后 ICAM-1 的表达增强。CD11/CD18 的表达量升高与组织 MPO 升高一致, 表明肺内 PMN 聚集可能与 CD11/CD18 表达增多有关。CD11/CD18 的配体是免疫球蛋白超家族的 ICAM-1、ICAM-2, PMN 细胞膜上 CD11/CD18 与 ICAM 相互作用促使PMN 牢固地粘附于内皮细胞表面, 进而在 IL-8 的介导下游出, 释放毒性物质, 发挥其损伤作用[7]。但在正常情况下, ICAM-1 呈低表达, 在细胞因子如白细胞介素-1、TFN-γ、INF-α、PAF 等作用下, 其表达可快速、大量增加[8]。实验结果表明, III 组肺缺血再灌注后 PMN 表面 CD18 及肺组织 ICAM-1 表达均较 II 组明显下调。PTX 抑制粘附分子表达上调的机制尚不清楚, 既可能由 PTX 直接引起[9] 也是可能通过细胞因子作用如 TNFα 等完成的[10,11]。肺缺血再灌注后, IL-1、IL-2、IL-6、IL-8、TNFα、IFNγ 等细胞因子生成增多[8], PTX 可以抑制这些细胞因子生成而抑制 PMN 表面的 CD11/CD18[10]、内皮细胞表面 ICAM-1[11] 表达上调。

因此, 作者推测 PTX 可能通过降低肺缺血再灌注引起的 CD11/CD18 及 ICAM-1 的上调, 而减少 PMN 在肺内的聚集、活化, 而减轻肺缺血再灌注损伤。

参考文献:

[1] Bread M A, Hall T S, Stuart R S, *et al*. Twenty-four hour lung preservation by hypothermia and leukocyte depletion[J]. J Heart Lung Transplant, 1985, 4(3): 325—329.

[2] Chapelier A, Reignier J, Mazmanian M, *et al*. Pentoxifylline and lung ischemia-reperfusion injury: application to lung transplantation[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1995, 25(Suppl 2): S130—S133.

[3] 罗武生. 用髓过氧化物酶定量测定心肌组织中的中性白细胞[J]. 中国药理学通报, 1990, 6(4): 264—266.

[4] Moore T M, Khimenko P, Adkins W K, *et al*. Adhesion molecules contribute to ischemia and reperfusion-induced injury in the isolated rat lung[J]. J Appl Physiol, 1995, 78(6): 2 245—2 252.

[5] Schmid R A, Yamashita M. Effect of pentoxifylline in a canine and porcine model of pulmonary allograft reperfusion injury[J]. J Heart Lung Transplant, 1997, 16(3): 366—367.

[6] Larson R S, Spinger T A. Structure and function of leukocyte integrins[J]. Immunol Rev, 1990, 114(1): 181—217.

[7] Sekido N, Mukaida N, Harada A, *et al*. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8[J]. Nature, 1993, 365(6 447): 654—657.

[8] Serrick C, La Franchesca S, Giaid A, *et al*. Cytokine interleukin-2, tumor necrosis factor-alpha, and interferon-gamma release after ischemia/reperfusion injury in a novel lung autograft animal model [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995, 152(1): 277—282.

[9] Sullivan G W, Carper H T, Mandell G L. Pentoxifylline modulates activation of human neutrophils by amphotericin B *in vitro* [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1992, 36(2): 408—416.

[10] Fossat C, Fabre D, Alimi Y, *et al*. Leukocyte activation study during occlusive arterial disease of the lower limb: Effect of pentoxifylline infusion[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 1995, 25(Suppl 2): S96—100.

[11] Neuner P, Klosner G, Pourmojib M, *et al*. Pentoxifylline *in vivo* and *in vitro* down-regulates the expression of the intercellular adhesion molecule-1 in monocytes[J]. Immunology, 1997, 90(3): 435—439.

（编辑　冯崇英）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net