DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.06.001

碳酸酐酶、带 3蛋白在肺气体交换中作用的实验研究*

论著

宁晓滨** 钱桂生 杨晓静 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆,400037

提 要 目的:探讨细胞膜带 3蛋白介导的 HCO_3^-/Cl^- 交换和碳酸酐酶(CA)催化的 HCO_3^- 脱水化反应在肺气体交换中的作用。方法:通过对麻醉犬右心房适时地灌注 4,4′-二硫氰基-2,2′-二磺基芪(DIDS)抑制带 3蛋白、乙酰唑胺(ACTZ)抑制红细胞和肺组织 CA活性来完成。结果:① DIDS可导致灌注后 15~30 min的 CO_2 产量($\dot{V}_{CO_2}$)较灌注前显著减少($P<0.05$)、心输出量(Q)显著地增高($P<0.05$),1 h后完全恢复正常。② ACTZ除出现上述变化且程度较重外,尚出现了灌注后 15~30 min的耗氧量($\dot{V}_{O_2}$)较灌注前显著减少($P<0.05$)等改变。其变化在 1 h后完全恢复正常。③ DIDS和 ACTZ两者之间在 $\dot{V}_{CO_2}$减少、血 P_{CO_2}增高、pH下降等方面存在协同效应。④ 正常犬红细胞阴离子交换速率 k值在 10℃、pH 7.41、红细胞数为 8.0×10^8个/ml介质液为盐酸盐的条件下为(2.22±0.2) h^{-1}。结论:CA和/或带 3蛋白是影响肺气体交换的重要因素,二者在肺气体交换过程中可能存在某种程度的协同作用。

关键词 带 3蛋白;HCO_3^-/Cl^- 交换;碳酸酐酶;4,4′-二硫氰基-2,2′-二磺基芪;乙酰唑胺;肺气体交换
中图法分类号 R563-02

近年来,关于碳酸酐酶(Carbonic anhydrase, CA)、带 3蛋白(Band 3 protein)在肺气体交换中的作用受到了国内外学者的广泛研究与重视[1,2]。但大多数都是在体外、离肺灌注及肺模型模拟等条件下进行的[3]。到目前为止,用 CA抑制剂、带 3蛋白抑制剂在整体水平对 CA及带 3蛋白在肺气体交换中作用的研究,国内尚未见报道,国外报道甚少。本实验在整体动物水平,观察了带 3蛋白和 CA抑制剂对肺气体交换的影响,试图探讨带 3蛋白介导的 HCO_3^-/Cl^- 交换和 CA催化的 HCO_3^- 脱水化反应在肺气体交换中的作用。

1 材料与方法

1.1 动物分组

健康成年杂种犬 20只,体重 10~19 kg 随机分为 4组,每组 5只。Ⅰ组:对照组,灌注 5%葡萄糖液;Ⅱ组:DIDS液(红细胞膜带 3蛋白专一抑制剂)0.1 mmol/kg体重;Ⅲ组:灌注 ACTZ液(非选择性红细胞内、外 CA抑制剂)25 mg/kg体重;Ⅳ组:灌注 DIDS液 0.1 mmol/kg体重及 ACTZ液 25 mg/kg体重。

1.2 实验方法

本实验采用 Cain[4]和 Brahm等[5]建立的麻醉犬肺气体交换模型。将犬用 3%戊巴比妥钠 1 ml/kg体重静脉注射全麻后,固定于手术台上。行气管插管,连接呼吸机(SC-Ⅱ,上海产),调整呼吸机指标,使动物血气保持基础状态。然后经右侧颈外静脉切开置入 Swan-Ganz热稀释漂浮导管(Gould SF)达肺动脉,连接多导生理记录仪(Nihon Kohden Co. Japan)。再行右侧股动、静脉切开,分别留置导管。用热稀释法测定心输出量,每次注射冰生理盐水 5 ml 记录心率、肺动脉压、主动脉压、心电图等。将 300 ml乙炔气体(C_2H_2)与 300 ml 5%葡萄糖液混合装入 500 ml真空瓶中经恒流泵以 6 ml/min速率,在药物灌注实验开始前 30 min从股静脉导管持续灌注,以保持稳定状态下的实验条件。然后按分组方法经 Swan-Ganz导管近侧孔以 40 ml/min速率灌注不同的溶液。隔绝空气经股动、静脉适时抽取肝素化的动、静脉全血。呼出气体用水活瓣装置适时收集。

1.3 检测指标

所有指标均在实验灌注开始前(0 min)、开始后 15~30 min、1~2 h采集标本进行测定。

1.3.1 红细胞阴离子交换速率 k值测定 基本参照 Wieth[6]的同位素($^{34}Cl^-$)法进行测定。

1.3.2 呼出气体 O_2、CO_2浓度测定 用 IL-1303型血气分析仪测定。

1.3.3 呼出气体 C_2H_2浓度测定 参照魏巨菊等[7]用气相色谱法测定。

1.3.4 血气分析 用 IL-1303型血气分析仪测定动、静脉全血 pH、P_{O_2}、P_{CO_2}、HCO_3^-、SO_2。并通过下列公式计算:① CO_2 产量或排出量 $(\dot{V}_{CO_2}) = F_ECO_2 \times \dot{V}_E$;② 耗氧量 $(\dot{V}_{O_2}) = \dot{V}_E \cdot (F_IO_2 - F_IO_2 \cdot F_ECO_2 - F_EO_2)/(1 - F_IO_2)$;③ 肺内分流量占心排出量百分比 $(\dot{Q}s/\dot{Q}t) = P(A-a)O_2 \times 0.0031/P(A-a)O_2 \times 0.0031 + (CaO_2 - C\bar{v}O_2)$。($P_IO_2$为吸入气 O_2 分压 = 9.82 kPa (149 mmHg),F_IO_2为吸入气 O_2 浓度 = 20.95%,R为呼吸商取

* 国家自然科学基金资助项目,No. 39470306
** 宁晓滨,男,33岁,主治医师,硕士
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

0.80,重庆地区大气压 PB为 98.42 kPa(740 mm Hg), 39℃水蒸气压 P_{AH_2O}取 6.26 kPa(47.1 mm Hg)。

1.3.5 每分钟呼出气量 V_E 测定直接通过水活瓣装置测出。

1.3.6 心输出量 Q、心率 HR及肺动脉压 Ppa等的测定 Q用热稀释法测定(L/min), HR(min^{-1})、Ppa(ρ/kPa)等通过多导生理记录仪读出。

1.3.7 红细胞压积 Hct及血红蛋白 Hb的测定 Hct(%)用常规离心法测定, Hb(g/dl)用氰化正铁血红蛋白法测定。

1.4 统计学处理

各组资料采用双因素方差分析,多重比较用 q检验或 FLSD检验,个别用药前后的资料比较采用 t检验,部分数据采用简单线型回归分析。结果以 $\bar{x}\pm s$表示。

2 结果

2.1 红细胞阴离子交换速率 k值

10℃、pH7.41、红细胞(RBC)数为 8.0×10^8个/ml时,正常犬血 RBC在含有 120 mmol/L NaCl介质液中的 k值为 2.22±0.02 h^{-1}。Ⅱ组和Ⅳ组灌注后 15、30 min的 k值非常显著地低于灌注前及对照组同时相点($P<0.01$),见图 1。

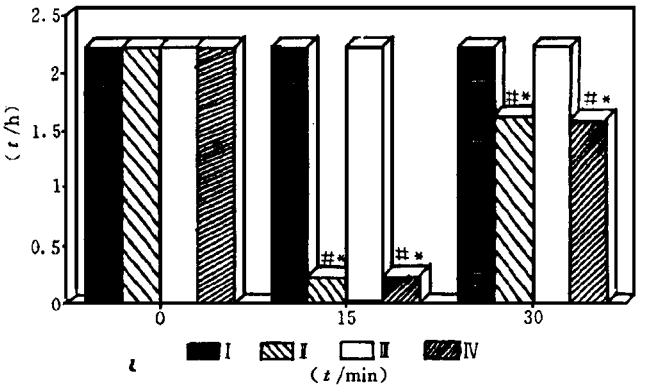


图 1 各组 RBC阴离子交换速率(k)结果

Fig 1 The anion exchange rate of RBC

2.2 血气分析与肺气体交换,见表 1、2

表 1 血液动力学、通气和代谢等指标的结果比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Comparison of parameters of blood kinetics, ventilation and metabolize ($\bar{x}\pm s$)

	Ⅰ			Ⅱ			Ⅲ			Ⅳ		
	0	15 min	30 min	0	15 min	30 min	0	15 min	30 min	0	15 min	30 min
Ppa(ρ/kPa)	2.6±0.3	22.6±0.3	22.6±0.3	22.6±0.2	22.6±0.3	22.6±0.2	22.6±0.3	22.6±0.3	22.6±0.3	22.5±0.3	22.5±0.3	22.5±0.3
HR(min-1)	148±4	147±5	146±5	150±5	154±5	157±6	151±5	156±6	154±6	148±4	153±5	151±6
Q(L/min)	1.75±0.4	1.74±0.3	1.75±0.4	1.72±0.4	2.22±0.3*	2.28±0.3*	1.74±0.4	2.42±0.3*	2.43±0.4*	1.71±0.4	2.66±0.3▲*	2.68±0.4▲*
$\dot{V}_E$(ml/min)	4200±50	4250±50	4150±50	4250±50	4150±50	4200±50	4150±50	4260±60	4210±60	4250±50	4200±50	4160±60
$\dot{V}_{O_2}$(ml/min)	196±4.6	193±4.3	194±4.5	194±4.5	196±4.6	191±4.1	191±4.1	184±3.6*▲	183±3.6*▲	193±4.3	185±3.7*▲	184±3.7*▲
$\dot{V}_{CO_2}$(ml/min)	157±4.6	160±5.1	156±5.0	158±5.1	141±4.6*	142±4.5*	162±4.8	104±4.9**	108±4.6**	161±4.8	94±4.7▲**	93±4.9▲**
C_2H_2(μmol·kg-1·min-1)	23.8±2.8	23.6±2.7	23.4±2.8	24.9±2.7	24.6±2.6	24.8±2.6	25.6±2.9	25.7±3.0	25.6±2.9	24.6±2.6	24.7±2.7	24.7±2.8
Hct(%)	39.5±0.5	39.5±0.5	39.5±0.5	40±0.5	40.5±0.5	40±0.5	40±0.5	40.5±0.5	40.5±0.5	40.5±0.5	40.5±0.5	40±0.5
$\dot{Q}s/\dot{Q}t$(%)	1.98±0.64	1.84±0.75	1.94±0.81	1.84±0.70	1.89±0.74	2.0±0.84	1.96±0.73	2.21±0.97	2.16±0.92	2.02±0.92	2.23±0.91	2.27±0.93

*: $P<0.05$,**: $P<0.05$ *vs* before infusing;▲: $P<0.05$ *vs* other groups

表 2 肺气体交换结果比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of parameters of pulmonary gas exchange ($\bar{x}\pm s$)

	Ⅰ			Ⅱ			Ⅲ			Ⅳ		
	0	15 min	30 min	0	15 min	30 min	0	15 min	30 min	0	15 min	30 min
PaO_2(ρ/kPa)	11.91±0.6	12.01±0.6	12.17±0.6	11.69±0.6	11.54±0.6	11.61±0.6	11.96±0.6	11.01±0.5	10.75±0.5	11.55±0.5	10.48±0.5	10.45±0.5
$PaCO_2$±ρ/kPa)	4.89±0.2	4.86±0.2	4.88±0.2	5.02±0.2	5.44±0.2	5.57±0.2	5.02±0.2	6.12±0.2	6.12±0.2	4.97±0.2	6.65±0.2	6.66±0.2
pHa	7.36±0.02	7.36±0.02	7.36±0.02	7.35±0.02	7.30±0.03*	7.31±0.03*	7.37±0.02	7.26±0.03**	7.24±0.03**	7.34±0.03	7.21±0.02▲*	7.20±0.02▲*
HCO_3^-(CB/mmol·L-1)	19.6±0.6	18.9±0.8	19.1±0.6	20.5±0.7	20.1±0.7	20.2±0.7	20.2±0.7	18.7±0.6*	18.9±0.6*	20.5±0.5	18.9±0.7*	18.4±0.7*
P_vO_2(ρ/kPa)	6.64±0.6	6.78±0.6	6.89±0.6	6.74±0.6	7.00±0.6	7.04±0.6	6.72±0.6	7.70±0.5*	7.72±0.5*	6.77±0.6	7.65±0.5*	7.80±0.5*
P_vCO_2(ρ/kPa)	5.52±0.3	5.42±0.3	5.72±0.3	5.84±0.3	6.30±0.3*	6.52±0.3*	5.71±0.3	7.04±0.3**	7.19±0.4**	5.57±0.3	7.49±0.3**	7.65±0.3**
pHv	7.26±0.02	7.26±0.03	7.25±0.02	7.25±0.03	7.20±0.03*	7.19±0.02*	7.25±0.02	7.16±0.03**	7.15±0.03**	7.26±0.02	7.1±0.03▲*	7.10±0.03▲*

*: $P<0.05$,**: $P<0.05$ *vs* before infusing;▲: $P<0.05$ *vs* other groups

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

Ⅲ组和Ⅳ组灌注后 15及 30 min的 PaO_2、HCO_3^-、$\dot{V}O_2$均显著低于灌注前($P<0.05$);Ⅱ组及Ⅰ组上述指标灌注后各时相点与灌注前比较差异不显著($P>0.05$)。Ⅱ组灌注后 15及 30 min的 pHa、pHv及 $\dot{V}CO_2$均显著地低于灌注前,而 $PaCO_2$、$PvCO_2$则显著地高于灌注前($P<0.05$);Ⅲ组和Ⅳ组上述指标相同时相点之间的相互比较,相差非常显著($P<0.01$)。同时,Ⅳ组灌注后 15及 30 min的 pHa、pHv、$\dot{V}CO_2$显著地低于Ⅱ组和Ⅲ组相同时相点($P<0.05$);而 $PaCO_2$、$PvCO_2$则显著地高于Ⅱ和Ⅲ组相同时相点($P<0.05$)。各组灌注前后 Qs/Qt比较差异不显著($P>0.05$)。

2.3 $\dot{V}_E$及呼出气 C_2H_2浓度

各组灌注前与灌注后各时相点之间比较 $\dot{V}_E$及呼出气体 C_2H_2浓度差异均不显著($P>0.05$),见表 1。

2.4 HR、Ppa及 Q

各组灌注前与灌注后各时点之间比较 HR、Ppa差异均不显著($P>0.05$)。Ⅱ组和Ⅲ组灌注后 15及 30 min的 Q显著地高于灌注前($P<0.05$)。Ⅳ组灌注后 15及 30 min的 Q非常显著地高于灌注前($P<0.01$),显著地高于Ⅱ、Ⅲ两组同时相点($P<0.05$),见表 1。

2.5 Hct

各组 Hct灌注后各时相点与灌注前比较差异不显著($P>0.05$),见表 1。

3 讨论

3.1 实验程序和动物模型的评价

本实验所选择的动物模型是由 Cain[4]和 Brahm等[5]建立起来的麻醉犬肺气体交换模型,但他们所用的通气方式是经气管切开术后的自发呼吸室内空气的方式。由于此方式存在麻醉深浅程度、时相等对肺气体交换的影响以及在 CA和/或带 3蛋白抑制后存在呼吸系统与心血管系统并存的代偿调节机理等问题,难以定量研究 CA和/或带 3蛋白在肺气体交换中的作用。因此,本实验参照了 Swenson等[1,8]的方法,对实验用麻醉犬进行机械通气。所得结果与 Cain和 Brahm的报道一致。

3.2 带 3蛋白介导的 HCO_3^-/Cl^-交换在肺气体交换中的作用

本研究结果表明,灌注 DIDS后 15~ 30 min $\dot{V}CO_2$比灌注前减少 11%左右,低于 Crandall等[9]用 DIDS进行的离体肺灌注实验结果(16.2%)及 Swenson等[1]晚近用单次延长呼吸技术研究的实验结果(15%)。同时还观察到,灌注后 15~ 30 min的 Q较灌注前增加了 29%~ 32.6%($P<0.05$)。因此,我们认为麻醉犬通过 Q增加的代偿调节机理削弱了 DIDS对肺气体交换的抑制作用(主要是使 $\dot{V}CO_2$减少)以及机体重建较高的混合静脉血-肺泡 P_{CO_2}差,从而使机体恢复平衡。DIDS对 $\dot{V}O_2$无明显影响($P>0.05$)。

3.3 RBC内外 CA的作用

本实验结果显示,我们选用的非选择性 CA抑制剂-ACTZ完全抑制 RBC内 CA和肺组织 CA后,使灌注后 15、30 min的 $\dot{V}CO_2$较灌注前分别减少 35.8%和 33.3%;使灌注后 15、30 min的 $\dot{V}O_2$较灌注前分别减少 3.7%和 4.2%;同时也使灌注后 15、30 min的 Q较灌注前分别增加 38.4%及 39.7%。说明 RBC内外 CA不仅对 $\dot{V}CO_2$改变起着重要作用,而且在肺毛细血管 O_2转移过程中通过波尔效应影响小部分 $\dot{V}O_2$的变化。同时,机体还通过 Q明显增加的代偿调节机理使其适应 CA抑制后的状态,并逐渐使机体在灌注 ACTZ 1 h后其 $\dot{V}CO_2$及 $\dot{V}O_2$等变化恢复正常。

3.4 CA和带 3蛋白在肺气体交换中的协同作用

Kifor等[10]通过实验研究提出,RBC内 CA的高活性形式 CAⅡ分子的拷贝数与 RBC膜上带 3蛋白分子的拷贝数基本相等,约为($1.0\sim 1.2$)$\times 10^6$拷贝数/细胞,两者之间存在着某种必然的联系。我们在整体水平的研究结果显示,灌注 DIDS和 ACTZ后,比单纯给予 DIDS时,$\dot{V}CO_2$进一步减少了 31%左右(灌注后 15及 30 min);比单纯给予 ACTZ $\dot{V}CO_2$进一步减少了 6%(灌注后 15 min)及 8.9%(灌注后 30 min)。同时,Ⅳ组灌注后 15、30 min Q的增加也显著地高于Ⅱ、Ⅲ两组同时相点。因此,我们首次提出在麻醉犬机械通气、呼吸室内空气等条件下,RBC内外 CA与带 3蛋白在肺气体交换过程中可能存在某种程度的协同作用。其作用机理有待进一步研究。

3.5 RBC阴离子交换速率及 DIDS的抑制效应

本研究结果表明,10℃,pH7.41,RBC数为 8.0×10^6个/ml,介质液中含有 120 mmol/L NaCl时,RBC阴离子交换速率为 2.22± 0.02 h^{-1},这意味着此条件下 HCO_3^-/Cl^-交换的半反应时间($t_{1/2}$)为 15.5 min。灌注 DIDS后 15~ 30 min可非常明显地抑制 RBC HCO_3^-/Cl^-交换($P<0.01$),抑制率达 99%以上。灌注后 30 min k值开始恢复至 1 h后完全恢复正常。国内外尚未见类似报道,值得今后进一步观察、研究。

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

参考文献

1 Swenson E R, Gronlund J, Ohlsson J *et al*. *In vivo* quantitation of carbonic anhydrase and band 3 protein contributions to pulmonary gas exchange. J Appl Physiol, 1993, 74(2): 838

2 Heming T A, Stabenqu E K, Vanoge C G *et al*. Roles of intra-and extracellular carbonic anhydrase in alveolar-capillary CO_2 equilibration. J Appl physiol, 1994, 77(3): 697

3 Heming T A, Geers C, Gros G *et al*. Effects of dextran-bovnd inhibitors on carbonic anhydrase activity in isolated rat lungs. J Appl physiol, 1986, 61(4): 1849

4 Cain S M, Otis A B. Carbon dioxide trarnsport in anesthetized dogs during carbonic anhydrase inhibition. J Appl physiol, 1961, 16(2): 1023

5 Brahm J. Effect of *in vivo* inhibition of red cell anion exchange and haldane effect on carbon dioxide output (V_{CO_2}) in the dog lung. J Physiol (Lond), 1987, 390: 2459

6 Wieth J O. Effect of some monovalent anions on chloride and sulphate permeability of human red cells. J Physiol, 1970, 207(6): 581

7 魏巨菊.呼出气体中烃类物质含量测定.四川医学, 1988, 6(9): 355

8 Hughson R L. Coupling of ventilation and gas exchange during transitions in work rate by humans. Can- Respir Physiol, 1995, 101(1): 87

9 Crandall E D, Mathew S J, Fleischer R S *et al*. Effects of inhibition of RBC HCO_3^-/Cl^- exchange on CO_2 excretion and downstream pH disequilibrium in isolated rat lungs. J Clin Invest, 1981, 68(15): 853

10 Kifor G, Toon M R, Janoshazi A *et al*. Interaction between red cell membrane band 3 and cytosolic carbonic anhydrase. J Membrane Biol, 1993, 134(1): 169

(收稿: 1997-07-09;修回: 1997-10-21)

(编辑 汪勤俭)

Role of carbonic anhydrase and band 3 protein in pulmonary gas exchange in canines*

Nin Xiaobin, Qian Guisheng, Yang Xiaojing (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract **Objective**: To explore the role of band 3 protein-mediated HCO_3/CL^- exchange and carbonic anhydrase (CA)-catalyzed HCO_3 dehydration in the pulmonary gas exchange. **Methods**: The experiment was conducted by appropriately timed atrial infusion of 4, 4'-di-isothiocyanostilbene-2, 2'-disulphonate (DIDS) to inhibit band 3 protein and that of acetazolamide (ACTZ) to inhibit the activity of CA in the pulmonary tissue and RBCs. **Results**: 1) In the 15th and 30th min after infusion of DIDS, CO_2 production (V_{CO_2}) was significantly reduced but cardiac output (Q) markedly increased while O_2 consumption (V_{O_2}) did not show any change. 2) Inhibition of the activity of CA in the pulmonary tissue and RBCs by ACTZ caused similar changes and a significant reduction in V_{O_2} ($P < 0.05$) at the same time phases. These changes restored to normal within 1 h. 3) There were some combined effects between DIDS and ACTZ as for the reduction in V_{CO_2}, increase in P_{CO_2} and decrease in pH and so on. 4) At 10℃, pH 7.41 and RBC count 8.0×10^3/ml, the anion exchange rate of the RBCs in a medium containing 120 mmol/L NaCl was $2.22\pm0.02\ h^{-1}$. **Conclusion**: 1) The pulmonary gas exchange model in mechanically ventilated anesthetized canines can be used for the study of the role of CA and band 3 protein in pulmonary gas exchange. 2) CA and band 3 protein are important factors affecting pulmonary gas exchange. In the presence of intact ventilation and cardiac reserve, the complete inhibition of erythrocytic anion exchange or/and intra-and extracellular CA activity in normal animals can be compensated with minor increments in alveolar ventilation or somewhat larger increments in cardiac output.

Key words band 3 protein; bicarbonate-chloride exchange; carbonic anhydrase; acetazolamide; 4, 4'-di-isothiocyanostilbene-2, 2'-disulphonate; pulmonary gas exchange; canine

* Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 39470306

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