DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.01.020

尼群地平对大鼠肺缺血再灌注损伤后 TNF-α、IL-6和 IL-8变化的影响

向明章* (第三军医大学附属新桥医院胸外科) 重庆,400037
蒋耀光 王如文 范士志 (第三军医大学附属大坪医院胸外科) 重庆,400042

提 要 目的: 观察尼群地平(Nitrendipine)对大鼠早期肺缺血再灌注损伤的防治作用和可能的机制。方法: 将 72只大鼠随机分为手术对照组(OC)、肺缺血再灌注损伤组(IR)和尼群地平处理组(NT),采用肺在体缺血再灌注模型,动态测定肺组织和血浆肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、肺组织总钙、肺组织干/湿重比值(D/W)和肺静态顺应性(Cst)变化。结果: 肺缺血再灌注损伤早期肺组织总钙水平升高,肺组织 TNF-α、IL-6和 IL-8相继释放增加并与肺 D/W、肺 Cst下降呈显著相关性。尼群地平处理后,肺组织总钙和 TNF-α、IL-6 IL-8水平显著降低($P<0.05$和 $P<0.01$),肺 D/W升高,肺 Cst改善。结论: 尼群地平可通过阻滞钙通道,减少细胞钙内流,抑制炎性细胞因子释放,减轻肺缺血再灌注损伤。

关键词 肺损伤;缺血再灌注损伤;细胞因子;钙超载;肺静态顺应性;尼群地平
中图法分类号 R563

细胞内钙超载和炎性细胞因子的参与是引起缺血再灌注损伤的重要环节。钙通道阻滞剂(Calcium channel blockers, CCBs)可改善保存肺功能,减轻肺缺血再灌注损伤[1]。CCBs能否减少肺缺血再灌注损伤早期炎性细胞因子的释放,尚未见报道。本研究观察了尼群地平(Nitrendipine, NT)对大鼠肺在体缺血再灌注早期肺和血浆 TNF-α、IL-6和 IL-8的影响,探讨其防治作用和可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

按文献[2]建立肺缺血再灌注损伤模型后,将 72只成年健康 Wistar大鼠随机分成 3组:① 手术对照组(OC, $n=24$): 开胸后不阻断肺门;② 肺缺血再灌注损伤组(IR, $n=24$): 开胸阻断肺门 45 min后放开行再灌注;③ 尼群地平处理组(NT, $n=24$): 按 0.5 mg/kg体重于肺门阻断前 30 min和再灌注前分别经静脉注射 0.01% NT1/2量。OC组和 IR组同法注射等量 Ringer氏液。各组分 4个时相点各处死 6只动物,留取标本,进行检测。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 左肺组织和血浆肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)含量 采用放免法检测 TNF-α(药盒由 301医院东亚免疫技术研究所提供),酶联免疫吸附法测定 IL-6和 IL-8(药盒由第四军医大学免疫学教研室提供)。Lowry法测定肺匀浆蛋白质浓度。

1.2.2 左肺组织总钙水平 采用原子吸收光谱法测定。

1.2.3 左肺组织干/湿重比值(D/W) 采用干湿重法测定。

1.2.4 左肺静态顺应性(Cst) 参照文献[3]测定和计算单位体重的总肺顺应性($C_{2.94}$)、低容量肺顺应性($C_{0.49}$)和肺扩张指数(EI)。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用 t 检验,有关数据作相关性分析。

2 结果

2.1 TNF-α 含量变化

结果见表 1,缺血再灌注后,IR组肺组织 TNF-α含量呈进行性升高,NT组各时相肺组织 TNF-α含量较 IR组递减,除再灌注 4h仍显著高于 OC组外,其余各时相已接近于OC组水平。

表 1 肺组织和血浆 TNF-α 含量变化($n=6, \bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes in TNF-α content of lung tissue and plasma($n=6, \bar{x}\pm s$)

	Time	Lung tissue(W_B/ng·mg^{-1})			Plasma(ρ_B/ng·ml^{-1})		
		OC	IR	NT	OC	IR	NT
Post-ischemia		6.40±1.01	7.79±1.02	6.60±1.21	1.23±0.17	1.58±0.13	1.53±0.12
Post-reperfusion	1 h	6.75±0.84	9.07±0.87*	7.88±0.78△	1.47±0.19	1.70±0.16	1.58±0.13
	2 h	6.93±0.93	9.77±0.85**	8.00±0.68△	1.62±0.13	1.93±0.15	1.72±0.12*△
	4 h	7.0±1.25	9.94±1.19**	8.34±1.03**△	1.77±0.16	1.97±0.16	1.82±0.15

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* OC; △: $P<0.05$ *vs* IR

* 向明章 男,36岁,硕士,副主任医师

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

2.2 IL-6含量变化

结果见表 2,IR组肺组织 IL-6含量于再灌注 4 h后非常显著高于 OC组,NT组肺组织 IL-6含量于再灌注 4 h后下降近 OC组水平($P > 0.05$)。

表 2 肺组织和血浆 IL-6含量变化($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Tab 2 Changes in IL-6 content of lung tissue and plasma ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

	Time	Lung tissue(W_B/ng·mg^{-1})			Plasma(ρ_B/ng·ml^{-1})		
		OC	IR	NT	OC	IR	NT
Post-ischemia		2.16±0.32	2.21±0.40	2.18±0.30	0.42±0.06	0.44±0.04	0.44±0.06
Post-reperfusion	1 h	2.20±0.36	2.22±0.31	2.22±0.33	0.43±0.06	0.45±0.04	0.44±0.05
	2 h	2.23±0.33	2.42±0.30	2.27±0.34	0.43±0.04	0.45±0.07	0.44±0.06
	4 h	2.23±0.37	3.19±0.29**	2.68±0.36	0.44±0.06	0.45±0.05	0.45±0.04

** : $P < 0.01$ *vs* OC

2.3 IL-8含量变化

结果见表 3,IR组肺组织 IL-8含量于再灌注 4 h后显著高于 OC组,NT组肺组织 IL-8再灌注 4 h降低至 OC组水平($P > 0.05$)。

表 3 肺组织和血浆 IL-8含量变化($n = 6, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 Changes in IL-8 content of lung tissue and plasma ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

	Time	Lung tissue(W_B/ng·mg^{-1})			Plasma (ρ_B/ng·ml^{-1})		
		OC	IR	NT	OC	IR	NT
Post-ischemia		2.49±0.38	2.52±0.32	2.47±0.36	0.29±0.06	0.29±0.06	0.28±0.04
Post-reperfusion	1 h	2.49±0.33	2.55±0.38	2.49±0.46	0.29±0.06	0.29±0.06	0.29±0.05
	2 h	2.50±0.40	2.56±0.34	2.52±0.39	0.29±0.07	0.29±0.06	0.29±0.04
	4 h	2.51±0.35	3.20±0.34*	2.72±0.41	0.29±0.06	0.29±0.08	0.29±0.04

* : $P < 0.05$ *vs* OC

2.4 肺组织总钙水平变化

再灌注后各时相 IR组和 NT组肺组织总钙水平均分别较 OC组有非常显著升高($P < 0.01$),NT组升幅非常明显低于 IR组($P < 0.01$),见图 1。

2.5 肺组织 D/W变化

IR组再灌注 1 h,肺组织 D/W已较 OC组显著下降($P < 0.05$),4 h降至最低($P < 0.01$)。NT组再灌注后肺组织 D/W虽较 OC组仍呈下降趋势,但比值明显高于 IR组($P < 0.05$)。

2.6 肺 Cst变化

见表 4,IR组缺血再灌注后 Cst各项指标均较 OC组呈进行性下降,NT组较 IR组明显改善,EI与 OC组比较已无明显差别。

2.7 相关性分析

见表 5,肺组织总钙与肺组织 TNF-α、IL-6和 IL-8均呈显著正相关。肺组织 TNF-α、IL-6和 IL-8与 $C_{2.94}$均呈显著负相关。肺组织 TNF-α与 D/W、EI也均呈显著负相关。

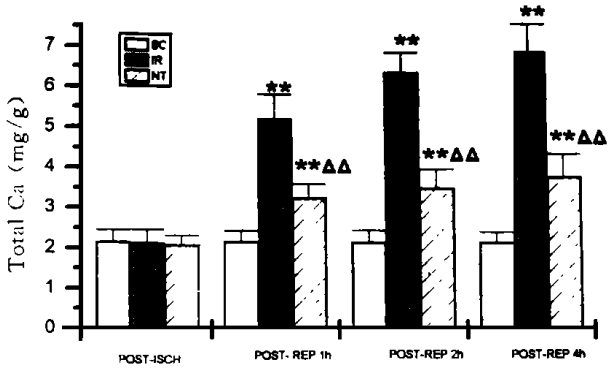


图 1 左肺组织总钙水平变化 (mg/g干肺, $n = 6, \bar{x} \pm s$)

Fig 1 Changes in total calcium level of left lung tissue (mg/g dry lung, $n = 6, \bar{x} \pm s$)

** : $P < 0.01$ *vs* OC; △△: $P < 0.05$ *vs* IR

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

表 4 肺静态顺应性变化($n=6, \bar{x}\pm s$)

Tab 4 Changes in static lung compliance ($n=6, \bar{x}\pm s$)

Groups		$C_{2.94}$ (ml· kpa^{-1}· kg^{-1})	$C_{0.49}$ (ml· kpa^{-1}· kg^{-1})	EI
OC post-ischemia		11.08± 0.98	33.80± 0.86	0.48± 0.02
post-reperfusion	1 h	11.06± 1.02	33.21± 0.90	0.47± 0.03
	2 h	11.03± 1.03	33.28± 0.90	0.48± 0.02
	4 h	11.02± 1.12	34.25± 0.87	0.48± 0.01
IR post-ischemia		10.13± 1.18	31.27± 1.43**	0.46± 0.06
post-reperfnsion	1 h	9.73± 0.65*	29.91± 1.21**	0.46± 0.04
	2 h	8.44± 0.73**	27.07± 1.12**	0.41± 0.03**
	4 h	8.06± 0.84**	26.47± 1.41**	0.39± 0.04**
NT post-ischemia		10.77± 0.78	32.16± 1.09	0.47± 0.04
post-reperfusion	1 h	10.1± 0.75	31.06± 1.48	0.46± 0.04
	2 h	9.29± 0.83*	29.21± 0.60*△△	0.45± 0.03
	4 h	8.99± 0.74**	27.84± 1.10*△	0.44± 0.03△

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* OC △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* IR

表 5 肺组织 TNF-α、IL-6 IL-8与血浆 TNF-α 及其与肺组织总钙、D/W、Cst间相关性

Tab 5 Correlations of TNF-α, IL-6, IL-8 in lung tissue and TNF-α in plasma with total calcicm, D/W, Cst of lung tissue

	D/W	$C_{2.94}$	EI	Total calcium	Plasma TNF-α
Lung TNF-α	- 0.89*	- 0.92**	- 0.85*	+ 0.88*	+ 0.88*
Plasma TNF-α	- 0.40	- 0.81*	- 0.02	+ 0.59	
Lung IL-6	- 0.63	- 0.81*	- 0.86*	+ 0.85*	+ 0.45
Lung IL-8	- 0.35	- 0.81*	- 0.71	+ 0.89*	+ 0.30

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$

3 讨论

Ca^{2+} 的跨膜流动和细胞内 Ca^{2+} 浓度变化对炎性细胞因子的合成和释放是必不可少的[4]。本研究发现,大鼠肺缺血后再灌注,肺组织总钙水平明显升高,间接反映了组织细胞内游离 Ca^{2+} 水平的增高,即胞内 Ca^{2+} 稳态的破坏。与肺组织总钙水平升高同步,肺缺血后再灌注,肺组织 TNF-α、IL-6和 IL-8含量相继升高,其中 TNF-α 首先升高,升幅最大,其次为 IL-6,而 IL-8升高偏晚,升幅也最小。相关分析表明,肺组织总钙水平与肺组织 TNF-α、IL-6和 IL-8含量均呈显著正相关。间接提示肺组织细胞因子的释放增加与细胞内 Ca^{2+} 浓度变化有一定关系。此外,肺内炎性细胞因子含量升高与肺组织损害指标 D/W、Cst变化时间上一致,均呈明显相关关系,从而表明炎性细胞因子在肺缺血再灌注损伤中发挥了重要作用。

本研究还发现,整个实验过程中,血浆 TNF-α 水平有一定程度升高,并与 $C_{2.94}$呈显著负相关,但升幅明显低于肺内 TNF-α 水平,而血浆 IL-6、IL-8变化不明显。这一方面提示肺缺血再灌注损伤时血浆炎性细胞因子水平的变化滞后于肺内炎性细胞因子水平的变化,另一方面也表明肺缺血再灌注损伤时炎性细胞因子可能主要由肺内产生并留存于肺组织,通过自分泌/旁分泌形式发挥生物学效应。

有研究证实,二氢吡啶 CCBs可抑制淋巴细胞、单核/巨噬细胞的激活,减少 TNF-α、IL-1和 IL-6的合成[5,6],肾移植病人给予 CCBs后,血浆 TNF-α、IL-1、IL-2和 IL-6水平降低[7]。本研究发现,NT处理后,肺 D/W升高,Cst改善,再灌注肺组织总钙水平降低,各时相肺组织 TNF-α 含量均不同程度地较 IR组减少,IL-6和 IL-8含量于再灌注 4 h后下降近 OC组水平,说明 NT通过阻滞 Ca^{2+} 通道,减少细胞 Ca^{2+} 内流,对上述细胞因子产生有一定抑制作用。但其确切机制尚需进一步探讨。有学者[8]认为 Ca^{2+} 激活的磷酸化耦联可

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

能与转录因子激活和细胞因子基因表达有关。还有研究报道[5],二氢吡啶 CCBs可阻断 TNF-α 转录。

综上所述,本研究初步显示了 NT可以抑制大鼠肺缺血再灌注损伤早期肺组织 TNF-α、IL-6和 IL-8含量的升高,适当应用 CCBs可避免或减轻肺缺血再灌注损伤。

参考文献

1 Hachida M, Morton D L. The protection of ischemic lung with verapamil and hydralazine. J Thorac Cardiovasc Surg, 1988, 95(2): 178

2 向明章,蒋耀光,王如文,等.尼群地平对缺血再灌注肺脂质过氧化反应的影响.中国胸心血管外科临床杂志, 1998, 5(2): 76

3 Ennema J J, Kobayashi T, Robertson B, *et al*. Inactivation of exogenous surfactant in experimental respiratory failure induced by hyperoxia. Acta Anaesthesiol Scand, 1988, 32(8): 665

4 Hotchkiss R S, Karl I E. Calcium: a regulation of the inflammatory response in endotoxemia and sepsis. New Horiz, 1996, 4(1): 58

5 Lichtman S N, Wang J, Zhang C, *et al*. Endocytosis and Ca^{2+} are required for endotoxin-stimulated TNF-alpha release by rat Kupffer cells. Am J Physiol, 1996, 271(5 Ptl): G920

6 Weir M R, Gomolka D, Pepplar R, *et al*. Mechanisms responsible for inhibition of lymphocyte activation by agents which block membrane calcium or potassium channels. Transplant Proc, 1993, 25(1): 605

7 Carozzi S, Nasini M G, Pietrucci A, *et al*. Immunosuppressive effects of different calcium channel blockers in human kidney allografts. Transplant Proc, 1995, 27(1): 1054

8 Shapira L, Takashiba S, Champagne C, *et al*. Involvement of PKC and protein tyrosine kinase in LPS-induced TNF-α and IL-1 β production by human monocytes. J Immunol, 1994, 153(4): 1818

(收稿: 1998-04-01;修回: 1998-09-28)

(编辑　冯崇英)

Therapeutic effects of nitrendipine on early pulmonary ischemia/reperfusion injury in rats

Xiang Mingzhang, Jiang Yaoguang, Wang Ruwen, Fan Shizhi (Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract **Objective**: To determine the therapeutic effects of nitrendipine on early pulmonary ischemia/reperfusion injury and to explore its possible mechanism. **Methods**: Seventy-two rats were randomized into the opetation control group (OC), pulmonary ischemia/reperfusion injury group (IR) and nitrendipine-treated group (NT). The animals in IR were inflicted on pulmonary ischemia/reperfusion injury through occlusion of left lung hilus for 45 min while those in NT were inflicted on the same injury and treated with nitrendipine. The dynamic changes of tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-8 (IL-8) in both the pulmonary tissue and plasma were observed. The total calcium level of the pulmonary tissue, dry-wet weight ratios of the lung tissue (D/W) and static lung compliance (Cst) were also measured during pulmonary ischemia/reperfusion. **Results**: As compared with OC, the levels of TNF-α, IL-6, IL-8 and total calcium in the pulmonary tissue in IR were significantly increased ($P < 0.05$ and 0.01). These four parameters and D/W and Cst were correlated to one another. In NT, the four parameters were markedly decreased ($P < 0.05$ and 0.01). **Conclusion**: Nitrendipine can reduce Ca^{2+} influx of the cells by blocking dihydropyridine-sensitive calcium channel to inhibit the release of inflammatory cytokines. Therefore, it can alleviate the pulmonary ischemia/reperfusion injury.

Key words pulmonary injury; ischemia-reperfusion injury; cytokine; calcium overload; static lung compliance; nitrendipine

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