

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.07.004
文章编号: 1005-8982 (2018) 07-0019-04

$\alpha 7nAChR$ 激动剂对大鼠移植肺缺血再灌注损伤的保护作用*

赵正维, 王海强, 尹逊亮, 张志培, 李小飞, 周勇安
(第四军医大学唐都医院 胸外科, 陕西 西安 710038)

摘要: 目的 探讨 $\alpha 7nAChR$ 激动剂对同种异体大鼠左肺移植后缺血再灌注损伤 (I/R) 的保护作用及其机制。**方法** 采用改良三袖套法技术复制同种异体大鼠左肺移植模型, 将雄性 SD 大鼠随机分为 3 组: 假手术组 (A 组)、生理盐水处理的 I/R 组 (B 组) 和 $\alpha 7nAChR$ 激动剂处理组 (C 组)。受体移植肺再灌注 4 h 后阻断右肺门 5 min, 测量动脉血氧分压 (PaO₂) 及动脉血二氧化碳分压 (PaCO₂); 测量移植肺肺组织湿/干重量比率 (W/D); 采用 ELISA 法测移植肺中肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 6 (IL-6) 含量。**结果** 与 A 组比较, B 组 PaO₂ 下降、PaCO₂ 升高, 肺组织 W/D 值升高, TNF- α 及 IL-6 含量升高 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义。与 B 组比较, C 组 PaO₂ 上升、肺组织 W/D 下降, TNF- α 及 IL-6 含量降低 ($P < 0.05$), 差异有统计学意义; PaCO₂ 测定结果两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** $\alpha 7nAChR$ 激动剂对大鼠肺移植缺血再灌注损伤具有保护作用, 能够改善移植肺的功能, 其作用机制可能与抗炎作用有关。

关键词: PNU 282987; 肺移植; 缺血再灌注; 大鼠

中图分类号: R-332

文献标识码: A

Protective effect of $\alpha 7nAChR$ against lung ischemia-reperfusion injury after transplantation in rats*

Zheng-wei Zhao, Hai-qiang Wang, Xun-liang Yin, Zhi-pei Zhang, Xiao-fei Li, Yong-an Zhou
(Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Medical University of the Air Force,
Xi'an, Shaanxi 710038, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and possible mechanism of $\alpha 7nAChR$ agonist (PNU 282987) on lung ischemia-reperfusion injury (IRI) by establishing rat allogeneic orthotopic left lung transplantation model. **Methods** The modified three-cuff anastomotic technique was used to establish the model of rat allogeneic orthotopic left lung transplantation. Healthy Sprague-Dawley male rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group (group A), normal saline-treated IRI group (group B) and $\alpha 7nAChR$ -treated group (group C). After the reperfusion for 4 h, the right pulmonary hilum was blocked for 5 min. The functions of the graft were checked by PaO₂ and PaCO₂. Then the transplanted lung tissues were collected to measure the wet/dry ratio and the content of TNF- α and IL-6 by ELISA. **Results** Compared with the group A, PaO₂ decreased, while PaCO₂, the wet/dry ratio and the content of TNF- α and IL-6 increased in the group B ($P < 0.05$). Compared with the group B, PaO₂ increased, simultaneously, the wet/dry ratio and the content of TNF- α and IL-6 decreased in the group C ($P < 0.05$); however, there was no statistical difference in PaCO₂ between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusions** $\alpha 7nAChR$ agonist has protective effect on lung IRI after transplantation in rats and can improve lung functions by inhibiting inflammation.

Keywords: PNU 282987; lung transplantation; ischemia and reperfusion; rat

收稿日期: 2017-04-11

* 基金项目: 青年科学基金项目 (No: 81402411)

[通信作者] 周勇安, E-mail: zhou.yongan@163.com; Tel: 13700287519

随着器官移植领域的研究进展和技术进步,肺移植术后患者存活率及生活质量得到巨大的改善,肺移植被认为是治疗终末期肺疾病的重要手段^[1]。但是目前,肺移植术后仍会有诸多并发症,其早期最为严重的并发症便是移植肺的缺血再灌注损伤(ischemia and reperfusion, I/R),它是引起移植肺功能丧失和患者死亡的首要原因^[2-3]。怎样预防和减轻移植肺的 I/R 一直以来都是肺移植领域的研究热点。已有文献报道, I/R 过程中的炎症反应可以有效地被 $\alpha 7nAChR$ 激动剂(PNU 282987)抑制^[4]。本实验通过复制同种异体大鼠左肺移植动物模型,探讨 $\alpha 7nAChR$ 激动剂对大鼠肺移植中 I/R 的保护作用及其机制。

1 材料与方 法

1.1 材 料

雄性近交系成年 SD 大鼠 40 只,体重 200 ~ 250 g,由第四军医大学实验动物中心提供。其中 32 只作为供受体,供、受体之间体重差不超过 20 g。PNU 282987 购自(美国)Tocris 公司,肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和白细胞介素 6 (IL-6) 试剂盒购自武汉博士得生物工程有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 动物分组 将雄性 SD 大鼠随机分为 3 组,所有大鼠术前禁食 12 h,不禁水。A 组为假手术组(8 只):该组大鼠仅行机械通气和开胸手术,不行缺血和再灌注处理;B 组为生理盐水处理的 I/R 组(16 只):该组行左肺原位移植,移植成功后受体腹腔注射等量生理盐水替代 PNU 282987。C 组为 PNU 282987 处理组(16 只):该组大鼠同样行左肺原位移植,移植成功后受体腹腔注射 PNU 282987 2.4 mg/kg^[5]。

1.2.2 移植模型 复制同种异体大鼠左肺原位移植模型,采用改良的三袖套法吻合技术建立同种异体大鼠左肺原位移植模型^[6]。

1.2.3 血气分析 移植成功后开放血流再灌注 4 h,阻断右肺门 5 min,抽颈动脉血做血气分析。

1.2.4 移植肺 W/D 测定 取上 1/3 肺组织称重,分析天平称取湿重(W);随后置入 60℃ 烤箱中,72 h 后重量不再变化时称取干重(D),计算 W/D。

1.2.5 移植肺组织 TNF- α 及 IL-6 含量测定 移植肺在冷生理盐水中漂洗、滤纸吸干黏液,以冷生理盐水作为匀浆介质,冰浴下以玻璃匀浆器匀浆,4℃,

3 500 r/min 转低温离心 15 min 取上清。采用 ELISA 检测试剂盒测定各组 TNF- α 及 IL-6 的表达量。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行数据分析。计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多个样本均数的比较采用完全随机设计资料的单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 移植肺 PaO₂、PaCO₂ 及 W/D 比较

与 A 组比较, B 组 PaO₂ 下降、PaCO₂ 升高,肺组织 W/D 值升高;与 B 组比较, C 组的 PaO₂ 升高、肺组织 W/D 值下降,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 移植肺组织 TNF- α 及 IL-6 含量比较

与 A 组比较, B 组移植肺 TNF- α 及 IL-6 含量升高;与 B 组比较, C 组移植肺 TNF- α 及 IL-6 含量下降,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 各组大鼠肺组织的病理学变化

A 组肺泡结构清晰,肺泡腔内无明显渗出。B 组可见肺泡壁结构破坏明显,有明显的炎细胞浸润。C 组可见炎细胞浸润明显,但与 B 组比较,肺泡结构依旧比较完整。见附图。

表 1 移植肺 PaO₂、PaCO₂ 及 W/D 比较 ($\bar{x} \pm s$)

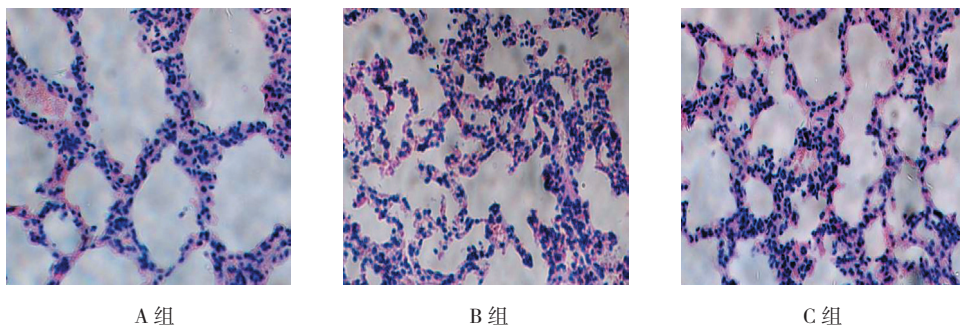
组别	PaO ₂ /mmHg	PaCO ₂ /mmHg	W/D
A 组	105.75 \pm 12.09	15.75 \pm 4.62	4.08 \pm 1.06
B 组	74.25 \pm 11.84 ¹⁾	27.00 \pm 4.04 ¹⁾	6.98 \pm 1.26 ¹⁾
C 组	91.38 \pm 10.50 ²⁾	22.75 \pm 2.67 ²⁾	5.14 \pm 1.30 ²⁾
F 值	15.050	17.290	11.742
P 值	0.000	0.000	0.000

注: 1) 与 A 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 B 组比较, $P < 0.05$

表 2 移植肺 TNF- α 及 IL-6 含量比较 ($\mu\text{g/L}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α	IL-6
A 组	98.38 \pm 13.04	60.38 \pm 14.54
B 组	150.25 \pm 24.42 ¹⁾	98.63 \pm 15.03 ¹⁾
C 组	126.75 \pm 14.77 ²⁾	77.75 \pm 17.52 ²⁾
F 值	16.445	11.828
P 值	0.000	0.000

注: 1) 与 A 组比较, $P < 0.05$; 2) 与 B 组比较, $P < 0.05$



附图 各组大鼠肺组织的病理学变化 (HE $\times 200$)

3 讨论

作为治疗终末期肺疾病的重要手段, 虽然现在供肺的保存与转运手段取得了巨大进步, 同时, 肺移植的手术技巧和术后管理水平也得到了不断提高, 但是 I/R 损伤仍然是肺移植术后难以完美解决的难题, I/R 损伤可导致原发性移植肺的功能障碍, 同时会带来诸多并发症, 严重者可导致移植肺丧失功能及患者死亡^[9]。因此, 预防和减轻 I/R 损伤是肺移植领域十分重要的研究内容。研究显示, 肺移植术后的 I/R 损伤是众多细胞因子参与的炎症损伤过程。I/R 过程激活移植肺组织内的单核巨噬细胞和内皮细胞, 释放一系列细胞因子, 其中 TNF- α 及 IL-6 水平增高, 其促进白细胞的趋化、浸润、聚集、活化和炎症链式反应的发生, 参与了受体内中性粒细胞、淋巴细胞等白细胞的游走和活化, 攻击损伤血管内皮, 引起器官组织再灌注损伤的病理生理改变。

另外有研究表明, 在人体内存在一条抗炎通路即胆碱能抗炎通路 (cholinergic anti-inflammatory pathway, CAP), 它是通过迷走神经及其递质乙酰胆碱与免疫系统之间的相互作用来参与抗炎作用, 是一条神经-免疫调节通路^[7]。

$\alpha 7nAChR$ 就在该通路中起重要作用, 它属于烟碱型乙酰胆碱受体, 是由 5 个 $\alpha 7$ 单体组成的配体门控离子通道, 广泛分布于神经、呼吸、循环、免疫、生殖系统中, 对钙离子有良好的通透性, 其参与的病理生理过程都涉及钙离子的内流。已有研究发现, 激活 $\alpha 7nAChR$ 后可以发挥抗炎、抗凋亡、抗氧化、促血管生成等 4 大作用^[8-10]。因此 $\alpha 7nAChR$ 是胆碱能性抗炎通路与炎症反应之间的关键。迷走神经受到刺激后终末传出支释放乙酰胆碱, 特异性结合于组织巨噬细胞表面的 $\alpha 7nAChR$, 抑制炎症细胞因子释放, 从而发挥控制炎症反应的作用^[11-12]。因此, 猜测激活 $\alpha 7nAChR$ 可以间接降低肺移植后 I/R 中 TNF- α 及

IL-6 的含量, 进而发挥其快速的抗炎作用。

本实验通过复制同种异体大鼠左肺移植 I/R 损伤的动物模型, 探讨 $\alpha 7nAChR$ 激动剂对大鼠移植肺 I/R 损伤是否具有保护作用及可能机制。通过合理的空白对照研究发现 $\alpha 7nAChR$ 激动剂处理组中的 PaO₂ 升高、肺组织 W/D 值下降同时 TNF- α 及 IL-6 的含量降低, 其可能的作用机制为 $\alpha 7nAChR$ 激动剂可以通过 CAP 途径降低肺移植后体内 TNF- α 及 IL-6 的含量, 从而抑制 I/R 过程中炎症介质的释放, 炎症介质的减少能够减轻术后大鼠的肺水肿, 降低 W/D 值, 进而改善移植肺的肺功能。这一结果提示 $\alpha 7nAChR$ 激动剂在预防肺移植术后的 I/R 损伤中具有一定的使用价值。

参考文献

- [1] 许志扬, 许建新, 康明强. NF- κ B 抑制剂对大鼠移植肺缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. 中国现代医学杂志, 2014, 25: 11-15.
- [2] 姜达志, 赵金龙, 钱永跃. 肺缺血再灌注损伤机制研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2013, 33(12): 941-944.
- [3] ALTUN G T, ARSLANTAS M K. CINEL I. Primary graft dysfunction after lung transplantation [J]. Turk J Anaesthesiol Reanim, 2015, 43(6): 418-423.
- [4] 朱国松, 罗刚健, 叶志强, 等. $\alpha 7nAChR$ 激动剂和乌司他丁对大鼠肠缺血再灌注后肺组织 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 作用的比较 [J]. 实用医学杂志, 2013, 29(8): 1231-1233.
- [5] 熊军, 薛富善, 袁玉静, 等. $\alpha 7nAChR$ 激动剂-缺血后处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2010, 30(9): 1118-1121.
- [6] 林江波, 陈道中, 康明强, 等. 袖套法建立大鼠肺移植模型的手术技巧 [J]. 中国组织工程研究与临床康复 [J]. 2010, 14(44): 8186-8190.
- [7] 项辉, 胡波, 李建国. 对胆碱能抗炎通路研究的新认识 [J]. 中国危重病急救医学, 2012, 24(3): 185-188.
- [8] LI D J, HUANG F, NI M, et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor relieves angiotensin ii-induced senescence in vascular smooth muscle cells by raising nicotinamide adenine dinucleotide-dependent SIRT1 activity [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2016

- 36(8): 1566.
- [9] TILLMAN T S, ALVAREZ F J, REINERT N J, et al. Functional human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) generated from *E. coli*[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(35): 18276.
- [10] ZANETTI S R, ZIBLAT A, TORRES N I, et al. Expression and functional role of alpha7 nicotinic receptor in human cytokine-stimulated NK cells[J]. *J Biol Chem*, 2016 291(35): 16542-16552.
- [11] INOUE T, ABE C, SUNG S S, et al. Vagus nerve stimulation mediates protection from kidney ischemia-reperfusion injury through a7nAChR+ splenocytes[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(5): 1939-1952.
- [12] GONG Y, JIANG J H, LI S T. Functional expression of human alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in human embryonic kidney 293 cells[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): DOI: 10.3892/mmr.2016.5493.

(张西倩 编辑)

欢迎订阅《中国现代医学杂志》

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年，是一本医学综合性学术期刊。由中华人民共和国教育部主管，中南大学、中南大学湘雅医院主办。创刊以来始终坚持以服务广大医药卫生科技人员、促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨，密切关注世界医学发展的新趋势，积极推广国内医药卫生领域的新技术、新成果，及时交流广大医药卫生人员的医学科学理论和业务技术水平，成为国内外医学学术交流的重要园地，已进入国内外多个重要检索系统和大型数据库。如：中文核心期刊（中文核心期刊要目总览 2008、2011 和 2014 版）、中国科技论文与引文数据库即中国科技论文统计源期刊（CSTPCD）、俄罗斯文摘（AJ）、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网全文数据库（CNKI）、中文科技期刊数据库、中文生物医学期刊文献数据库（CMCC）、超星“域出版”及中国生物医学期刊光盘版等。

《中国现代医学杂志》辟有基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。主要刊登国内外临床医学、基础医学、预防医学以及医学相关学科的新理论、新技术、新成果，以及医院医疗、教学、科研、管理最新信息、动态等内容。读者为广大医药卫生科技人员。

《中国现代医学杂志》为旬刊，国际标准开本（A4），全刊为彩色印刷，无线胶装。内芯采用 90 g 芬欧汇川雅光纸（880×1 230 mm），封面采用 200 g 紫鑫特规双面铜版纸（635×965 mm）印刷，每个月 10、20、30 日出版。定价 25 元/册，全年 900 元。公开发行，国内统一刊号：CN 43-1225/R；国际标准刊号：ISSN 1005-8982；国内邮发代号：42-143。欢迎新老用户向当地邮局（所）订阅，漏订或需增订者也可直接与本刊发行部联系订阅。

联系地址：湖南省长沙市湘雅路 87 号《中国现代医学杂志》发行部，邮编：410008

电话：0731-84327938；传真：0731-89753837；E-mail：journal@zgxdyx.com

唯一官网网址：www.zgxdyx.com

《中国现代医学杂志》编辑部