

血必净对脂多糖诱导的急性肺损伤大鼠肺组织细胞间粘附分子-1 表达的影响

张之龄, 沈琪琦, 朱健, 童小文, 徐兵, 周吴刚

(上海交通大学医学院附属第九人民医院急诊科, 上海 200011)

[摘要] **目的** 观察血必净对脂多糖诱导的急性肺损伤(ALI)大鼠细胞间粘附分子-1(ICAM-1)表达的影响。**方法** 将45只Wistar大鼠采用随机数字表分为三组:(1)健康对照(Control)组(15只)、(2)脂多糖(LPS)组(15只)、(3)血必净(XBJ)组(15只)。LPS组和XBJ组采用股静脉注射LPS(5 mg/kg)制备大鼠ALI模型。造模前半小时开始给药,XBJ组给予血必净4 mL/kg;Control组和LPS组则给予等容积0.9%氯化钠注射液。在造模后6 h、12 h、24 h各随机处死大鼠5只,分别作为I、II、III亚组,光镜下观察肺脏组织形态学变化,免疫组织化学法(IHC)检测肺组织中ICAM-1蛋白表达。**结果** 造模后LPS组随着实验时间的延长,肺组织ICAM-1蛋白呈逐渐增加趋势,至24 h达到高峰。与LPS组相比,血必净组各时间点肺组织ICAM-1蛋白表达明显降低($P < 0.05$)。光镜显示LPS组肺组织病理形态学改变明显,而血必净组则明显减轻。**结论** 血必净可通过抑制脂多糖诱导的急性肺损伤大鼠肺组织增强的ICAM-1表达减轻脂多糖诱导的大鼠肺损伤程度。

[关键词] 急性肺损伤;脓毒症;胞间黏附分子1;大鼠,Wistar

中图分类号:R563.8

文献标识码:A

DOI:10.3969/J.issn.1672-6790.2016.04.022

Effect of Xuebijing on expression of ICAM-1 in the lung tissue of rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide Zhang Zhiling, Shen Qiqi, Zhu Jian, Tong Xiaowen, Xu Bing, Zhou Wugang (Department of Emergent Medicine, Affiliated Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200011, China)

Corresponding author: Shen Qiqi, Email: shen_qiqi@21cn.com

[Abstract] **Objective** To observe the effect of Xuebijing on expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the lung tissue of rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide. **Methods** Forty-five Wistar rats were randomly divided into 3 groups by random number table method: (1) control group ($n = 15$), (2) LPS group ($n = 15$), (3) Xuebijing group (XBJ group) ($n = 15$). Injection of LPS (5 mg/kg) into femoral vein to reproduce ALI model in LPS group and XBJ group. Male Wistar rats of XBJ group were given XBJ 4 mL/kg 30 min before the intravenous injection of LPS, whereas control group and LPS group were given equivalent volume normal saline. Five rats in each group were killed at 6 h, 12 h and 24 h, which were divided into subgroup I, II, III. The pathomorphism changes of lung tissue were observed by light microscope, and expression of ICAM-1 in pulmonary was examined by immunohistochemistry. **Results** Expression of ICAM-1 were gradually increased with experimental time prolonged and reached the peak at 24 h in LPS group after establishing model. ICAM-1 were significantly lower in XBJ group than LPS group at each time points ($P < 0.05$). Compared to LPS group, the pathological change was significantly reduce in XBJ group under microscope. **Conclusion** Xuebijing can inhibit the expressions of ICAM-1 and reduce acute lung injury induced by lipopolysaccharide in the lung tissue of rats.

[Key words] Acute Lung injury; Sepsis; Intercellular adhesion molecule-1; Rats, Wistar

脓毒症目前依然是ICU患者最主要的死亡原因,严重时可并发急性肺损伤(ALI)和多器官衰竭(MOF)。最新的流行病学调查结果^[1]显示ALI患者死亡率在34%至58%之间,因此,寻找新的ALI

发病的分子机制及治疗策略刻不容缓。虽然ALI的具体发病机制仍不明确,但研究^[2]发现细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的黏附功能和炎性反应及其相互关系是导致ALI的主要因素,与炎症性疾病有着十分密切的关系,在ALI/ARDS的发生和发展过程中起重要作用。有研究^[3-4]认为针对ICAM-1进行干预将有利于炎症的恢复。本实验通过观察血必净注

作者简介:张之龄,副主任医师,Email: zhangzhiling1970@163.com

通信作者:沈琪琦,副主任医师,Email: shen_qiqi@21cn.com

射液对 ALI 模型大鼠肺组织 ICAM-1 表达的影响, 探讨其可能的保护作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康雄性 Wistar 大鼠 45 只, 2.5 ~ 3.5 月龄, 体质量 250 ~ 280 g/只, 由上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司提供[生产许可证号: SCXK (沪)2008 - 0016]。

1.2 实验药品和试剂 血必净注射液(10 mL/支, 天津红日药业有限公司产); 脂多糖(LPS, Escherichia coli O127:B8, L3129, Sigma, 美国); ICAM-1 羊抗大鼠多克隆抗体(Santa Cruz, 美国)。

1.3 方法

1.3.1 实验动物分组、模型建立及给药方法 腹腔注射 10% 水合氯醛(5 mL/kg) 麻醉后固定, 经大鼠股静脉注射 LPS(5 mg/kg)。45 只 SPF 级雄性成年 Wistar 大鼠采用随机数字表分为三组:(1)健康对照组($n = 15$)、(2)脂多糖组(LPS 组, $n = 15$)、(3)血必净干预组(XBJ 组, $n = 15$)。血必净组在造模前半小时静脉内给予血必净 4 mL/kg, 健康对照组和 LPS 组则给予等容积 0.9% 氯化钠注射液。在造模后 6 h、12 h、24 h 各随机处死大鼠 5 只, 分别作为 I、II、III 亚组, 无菌留取大鼠肺组织。

1.3.2 标本制备 在造模后 6 h、12 h、24 h 各随机处死大鼠 5 只, 分别作为 I、II、III 亚组, 取右肺上、下叶组织置入 4% 多聚甲醛固定, 制作组织病理切片和免疫组织化学染色切片用于病理学检查。

1.3.3 免疫组织化学法(IHC)检测肺组织中 ICAM-1 蛋白表达 采用 SP 法检测肺组织中 ICAM-1 蛋白表达。肺组织经石蜡包埋作 5 μ m 厚度的切片常规脱蜡至水, 0.3% H_2O_2 甲醇溶液消除内源性过氧化物酶, 正常羊血清封闭, 滴加一抗(羊抗大鼠 ICAM-1 多克隆抗体, 浓度 1:50)。PBS 漂洗后滴加辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min, PBS 漂洗后二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木精染色。光镜观察并应用 Image pro Plus5.1 图像处理系统采集图片对结果进行半定量分析, 每张切片随机选 5 个不重复的视野, 放大 400 倍, 计算 ICAM-1 阳性染色的积分吸光度值(IOD), 分别取其平均值进行分析。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件包分析, 多组均数采用单因素方差分析(ONE-WAY ANOVA), 组间两两比较采用 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织的病理形态学变化 健康对照组大鼠肺组织结构完整, 肺泡腔清晰, 肺泡间隔无炎症、无水肿。且各时间点无明显差异; LPS 组大鼠肺组织结构基本毁损, 肺泡间隔增宽, 部分肺泡内见渗出、水肿、出血及纤维蛋白沉积, 肺间质见大量炎症细胞浸润。且随时间点增长而明显。XBJ 组大鼠肺组织肺泡隔略有增宽, 肺泡内渗出、水肿、出血情况有所改善, 肺间质见少量炎症细胞浸润。

2.2 肺组织 ICAM-1 蛋白的表达 正常大鼠肺组织微弱阳性表达 ICAM-1, 仅少量分布于肺泡上皮细胞。LPS 组肺组织 ICAM-1 强阳性表达, 主要分布于肺泡上皮和肺血管内皮细胞。XBJ 组肺组织 ICAM-1 阳性表达减轻。图像分析软件测定的积分吸光度值提示, LPS 各亚组较健康对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$), XBJ 各亚组较 LPS 组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 三组大鼠不同时间点肺组织 ICAM-1 的免疫组织化学表达($\bar{x} \pm s, \times 10^3$)

组别	I 亚组(6 h, $n = 5$)	II 亚组(12 h, $n = 5$)	III 亚组(24 h, $n = 5$)
对照组	3.67 $\pm$ 0.47	3.85 $\pm$ 0.56	3.43 $\pm$ 0.37
LPS 组	14.69 $\pm$ 1.40 ^a	23.07 $\pm$ 2.65 ^a	26.76 $\pm$ 1.92 ^a
XBJ 组	11.35 $\pm$ 1.69 ^{ab}	20.12 $\pm$ 2.10 ^{ab}	23.44 $\pm$ 1.98 ^{ab}

注:表中为 IOD 值;与对照组同时时间点比较, ^a $P < 0.05$;与 LPS 组同时时间点比较, ^b $P < 0.05$

3 讨论

脓毒症常在感染和手术应激情况下发生, 其本质为大量细胞因子和炎性介质释放后引起宿主自身免疫损伤进而导致多器官功能障碍综合征。流行病学调查显示, 脓毒症与诸多免疫信号通路异常激活有密切的关系。有研究证实, 临床上超过 60% 脓毒症患者的致病菌为革兰阴性菌^[5], 而启动免疫反应的 LPS 是革兰阴性菌细胞壁释放的重要成分。LPS 与细胞表面受体结合后, 激活了一系列免疫信号通路, 同时分泌大量炎性因子, 最终导致机体发生失控的炎症反应^[6]。目前, 脓毒症确切的分子发病机制还不清楚。

ALI 是脓毒症最主要的器官并发症^[7]。由于脓毒症引起机体免疫功能受损, 致使大量处于极度活跃状态的炎症细胞诸如巨噬细胞和中性粒细胞释放的炎性介质和细胞因子进一步加重肺组织及肺毛细血管内皮损伤。因此, 深入研究脓毒症诱导肺损伤的发病机制对于临床治疗 ALI 至关重要。

ICAM-1 又名 CD54, 是免疫球蛋白超家族类的成员之一, 是一种重要的细胞表面粘附分子^[8], 其参与介导中性粒细胞与上皮细胞或血管内皮细胞的粘附, 在炎症反应的发生发展过程中具有不可替代的作用。作为粘附分子家族的重要成员之一, ICAM-1 在重症急性胰腺炎早期即显著升高, 并与急性肺损伤的发生有密切的关系, 提示 ICAM-1 可能在危重病时介导了炎症网络的形成。在各种 ALI/ARDS 动物模型中发现, ICAM-1 在肺泡上皮细胞和血管内皮细胞膜表面大量并持久表达, 并且 ICAM-1 的表达量与肺损伤的严重程度呈正相关^[9-10]。有研究表明, 经 ICAM-1 基因敲除处理后的小鼠, 可阻断 PMN 与内皮细胞的粘附, 进而减轻肺组织的损伤; 应用 ICAM-1 单克隆抗体阻断 ICAM-1 形成, 可减轻 LPS 引起的肺、肾、肝等多器官损伤^[11]。全身的炎症反应及致病因子对肺血管内皮细胞的直接损伤是 ALI 的发病机制中最主要的环节。中性粒细胞 (PMN)、巨噬细胞等炎症细胞和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 等炎症介质以及它们与血管内皮细胞的相互作用^[12-13] 贯穿了全身炎症反应的整个过程, 而 ICAM-1 在细胞与细胞粘附的相互作用过程中起重要作用。如能有效地控制 ICAM-1 的过度表达, 对 ALI 的治疗具有重要意义。

血必净是由中药赤芍、川芎、丹参、红花、当归的提取物组成的复方中药静脉制剂, 具有很好活血化瘀、疏通络脉、溃散毒邪的作用。临床上被广泛应用于治疗脓毒症。多项研究证实血必净是一种有效的抗炎药物, 能增强 annexin A1 表达并抑制白介素 (IL)-1, 6, 8, 23 和 TNF- α 等促炎因子的生成^[14-16]。王煜霞等^[17] 发现血必净能显著抑制缺血再灌注家兔肺组织 ICAM-1 释放, 提高家兔的动脉氧分压。顾滔^[18] 在对复苏综合征患者的临床研究发现血必净可有效下调 ICAM-1 等炎症介质的过量表达, 从而抑制机体过度炎症反应, 提高患者的 30 d 存活率。

本实验采取 LPS 静脉内注射的方式造模。本实验病理学观察发现肺泡间隔增宽, 肺泡腔出血, 间质内大量炎细胞浸润, 提示成功建立了 ALI 的动物模型。本实验采用免疫组织化学方法检测的研究结果显示, 同时时间点 LPS 组的肺组织 ICAM-1 蛋白表达量显著高于正常组, 且呈逐渐上升趋势, 结合对脓毒症大鼠的肺组织病理学观察等结果, 发现 ICAM-1 蛋白表达水平与肺组织的病理损害程度基本一致。提示 ICAM-1 可能在脂多糖诱导 ALI 的过程中具有

重要作用, 与 Beck-Schimmer 等^[19] 的结果相吻合。

本实验前期研究^[20-21] 发现, 血必净可以有效减轻 ALI 时肺组织的炎症反应。为了进一步研究血必净对 ALI 大鼠的保护作用机制, 本研究拟从分子机制上探讨其对肺组织局部 ICAM-1 表达的影响。研究结果显示, 血必净可通过抑制 ICAM-1 的表达, 进而减少炎症因子的释放和炎症反应的扩大, 减轻肺组织炎症反应, 从而实现对脓毒症诱导肺损伤的保护作用, 为临床救治急性肺损伤提供了新思路。

参考文献

- [1] MacCallum NS, Evans TW. Epidemiology of acute lung injury[J]. Current Opinion in Critical Care, 2005, 11(1): 43-49.
- [2] Mondrinos MJ, Zhang T, Sun S, et al. Pulmonary endothelial protein kinase C - delta (PKC δ) regulates neutrophil migration in acute lung inflammation[J]. Am J Pathol, 2014, 184(1): 200-213.
- [3] Hou S, Ding H, Lv Q, et al. Therapeutic effect of intravenous infusion of perfluorocarbon emulsion on LPS - induced acute lung injury in rats[J]. PLoS ONE, 2014, 9(1): e87826.
- [4] Theobaldo MC, Llimona F, Petroni RC, et al. Hypertonic saline solution drives neutrophil from bystander organ to infectious site in polymicrobial sepsis: a cecal ligation and puncture model[J]. PLoS ONE, 2013, 8(9): e74369.
- [5] 王强. JAK/STAT 信号通路对脓毒症大鼠肿瘤坏死因子- α 表达的影响及意义[D]. 西安: 第四军医大学, 2001.
- [6] Durosier LD, Herry CL, Cortes M, et al. Does heart rate variability reflect the systemic inflammatory response in a fetal sheep model of lipopolysaccharide-induced sepsis? [J]. Physiol Meas, 2015, 36(10): 2089-2102.
- [7] Filgueiras LR, Martins JO, Serezani CH, et al. Sepsis - induced acute lung injury (ALI) is milder in diabetic rats and correlates with impaired NF κ B activation[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e44987.
- [8] Arnson Y, Shoenfeld Y, Amital H. Effects of tobacco smoke on immunity, inflammation and autoimmunity[J]. J Autoimmun, 2010, 34(3): 258-265.
- [9] Chunsheng L, Peichun G, Xinhue H. Expression of intercellular adhesion molecule in lung tissues of experimental acute lung injury and the affect of Rhubarb on it[J]. Chin Med Sci, 2000, 5(1): 93-97.
- [10] Zhou Q, Bai M. Intercellular adhesion molecule-1 in the pathogenesis of heroin-induced acute lung injury in rats[J]. J Hnzhong Univ Sci Teehnolog Med Sci, 2004, 241(5): 430-432.

- [11] 闫文生, 阚文宏, 黄巧冰, 等. 脂多糖诱导小鼠脏器中细胞间黏附分子1的表达[J]. 生理学报, 2002, 54(1): 71-74.
- [12] 罗昆仑, 何振平. 中性粒细胞介导组织损伤的机制[J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 1999, 19(1): 51-54.
- [13] Siblly Y, Reynolds Y. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury[J]. Am Rev Respir Dis, 1990, 141(2): 471-501.
- [14] He XD, Wang Y, Wu Q, et al. Xuebijing protects rats from sepsis challenged with *Acinetobacter baumannii* by promoting annexin A1 expression and inhibiting proinflammatory cytokines secretion[J]. Evid-based Compl Alt, 2013; 11.
- [15] Jiang M, Zhou M, Han Y, et al. Identification of NF- κ B Inhibitors in Xuebijing injection for sepsis treatment based on bioactivity-integrated UPLC-Q/TOF[J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(2): 426-433.
- [16] Sun J, Xue Q, Guo L, et al. Xuebijing protects against lipopolysaccharide-induced lung injury in rabbits[J]. Exp Lung Res, 2010, 36(4): 211-218.
- [17] 王煜霞, 王雷, 姬明丽. 血必净注射液对家兔左心缺血再灌注损伤肺脏的保护作用[J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2013, 41(6): 127-129.
- [18] 顾滔. 血必净注射液对复苏后综合征血液流变学和凝血功能的影响[J]. 环球中医药, 2013, 6(S1): 97-98.
- [19] Beck-schimmer B, Schimmer RC, Warner RL, et al. Expression of lung vascular and airway ICAM-1 after exposure to bacterial lipopolysaccharide[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(2): 344-352.
- [20] 张之龄, 尹小燕, 童小文, 等. 血必净对脂多糖诱导的急性肺损伤大鼠肺组织高迁移率族蛋白1表达的影响[J]. 中国临床保健杂志, 2011, 14(4): 395-397.
- [21] 张之龄, 童小文, 徐兵, 等. 血必净对脂多糖诱导急性肺损伤大鼠的保护作用[J]. 中国临床保健杂志, 2014, 17(4): 373-375.

(收稿日期: 2016-02-16)

《中国临床保健杂志》第十三届编辑委员会名单

编委会主任: 黄洁夫

编委会副主任: 沈 干 林嘉滨 王伟夫 吴 军 刘殿荣

编 委: (以姓氏笔画为序)

丁西平	丁 琪	于普林	于德志	于密萍	万书臻	马艳春	马礼坤	王伟夫	王子时	王新日
王方正	王 林	王 键	王剑平	王喜瑛	王建国	王丽萍	王卫东	王锦权	王 俊	王邦宁
王巧民	王曼唯	王 雁	王 静	方明金	方煜平	方 向	韦军民	尹秋生	兰 青	卢彦朝
卢德成	白 松	宁 光	叶山东	史虹莉	司全金	许戈良	许树强	许 锋	齐海平	齐 璇
孙福成	孙敬武	孙耕耘	孙思勤	孙梦雯	孙 冰	朱 宏	朱 健	朱德发	朱薇波	刘殿荣
刘同柱	刘福生	刘家全	刘 健	刘德军	刘永泉	刘 影	刘小梅	任 伟	汤其强	汤 如
张子顺	张志勉	张秀萍	张绍廉	张曼萍	张智民	张奇志	张 琦	张艳红	张洪青	汪 耀
李 宁	李泽庚	李 青	李 伟	李春虹	李中南	李苏宜	李金虎	李建丽	陈卫东	陈孝平
陈学奎	陈晓红	陈礼明	陈 炯	陈 尹	沈 干	沈雁英	沈国栋	严 光	严 静	何荆贵
杨小红	杨 洪	邸 星	吴 军	吴大保	吴 蕾	肖 峻	苏克亮	林嘉滨	郑芙林	郑志坚
尚希福	周林玉	孟翔凌	胡世莲	胡 敏	胡何节	胡立群	骆松明	姜 玲	姜 毅	姜 悦
赵 岚	赵淑琴	赵冬梅	俞国华	施 冰	郝希春	徐春军	徐晓玲	徐维平	秦绍森	秦学文
秦明伟	唐海沁	唐世琪	唐丽琴	袁曙平	谈 敏	耿洪森	耿小平	高 坚	高国力	高宗良
凌 斌	柴小青	殷 实	黄洁夫	黄慈波	黄振平	黄先勇	黄 政	黄志刚	黄业华	龚小敏
梅晓冬	康冬梅	曹克将	盛 凯	鲁朝晖	程 刚	程 民	程 翠	彭代银	彭永德	褚 英
蓝 安	蔡其云	蔡亚禄	滕安宝	魏 阳	魏军平	魏 红	蹇在金			

总编辑: 胡世莲

副总编辑: 于普林 唐海沁 叶山东 王卫东 严 光 齐海平 王 俊 汤 如 李 青

编辑部主任: 蓝 安

编辑部副主任: 程 翠 王 静

正加速度暴露对不同程度冠状动脉狭窄小型猪血浆儿茶酚胺和交感神经系统活性的影响

张颖¹, 罗惠兰¹, 刘兴德², 田建伟¹

(空军总医院心内科, 北京 100142; 2. 贵阳医学院附属医院心内科)

[摘要] **目的** 研究正加速度(+Gz)对不同程度冠状动脉狭窄小型猪血浆儿茶酚胺水平和交感神经系统活性的影响。**方法** 以巴马小型猪为研究对象, 采用左前降支丝线环扎法建立冠脉轻度狭窄(<50%)、中度狭窄(50%~69%)、重度狭窄组($\geq 70\%$)动物模型, 分别给予间断高强度+Gz暴露, 观察各组心率变化以及血浆肾上腺素(Ad)、去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)水平变化。**结果** 基础心率重度狭窄组明显高于健康对照组及轻度狭窄组($P < 0.05$), 高强度+Gz暴露后即刻、10 min 各组心率均显著增快($P < 0.01$), 中度狭窄和重度狭窄组心率较健康对照组进一步增快($P < 0.01$), 重度狭窄组心率增快持续超过 30 min, 其余各组心率在+Gz暴露后 30 min 恢复正常; +Gz暴露前, 重度狭窄组血浆 Ad、NE 水平明显高于对照组及轻度狭窄组($P < 0.01$), 暴露后各组血浆 Ad、NE 水平均显著增高($P < 0.01$), 轻度、中度狭窄组至暴露后 30 min 时恢复正常, 重度狭窄组持续超过 30 min($P < 0.01$)。暴露后 10 min 时中度及重度狭窄组血浆 Ad、NE 水平均较对照组及轻度狭窄组显著增高($P < 0.01$); +Gz暴露前各组 DA 水平差异无统计学意义($P > 0.05$), +Gz暴露后即刻各组血浆 DA 水平均显著增高($P < 0.05$), 其中重度狭窄组 DA 水平显著高于其余各组($P < 0.05$), 各组血浆 DA 水平于 10 min 时恢复正常。**结论** +Gz暴露可激活冠脉狭窄小型猪交感神经系统, 增加血浆儿茶酚胺(Ad、NE、DA)水平, 冠脉狭窄 $\geq 50\%$ 情况下交感神经系统激活更为强烈。

[关键词] 冠状动脉狭窄; 儿茶酚胺类; 交感神经系统; 模型, 动物

中图分类号: R543.31

文献标识码: A

DOI: 10.3969/J.issn.1672-6790.2016.04.023

Effects of positive acceleration on sympathetic nervous activity and plasma catecholamine in miniature pig model with different coronary artery stenosis Zhang Ying*, Luo Huilan, Liu Xingde, Tian Jianwei (* Department of Cardiology, Air Force General Hospital of PLA, Beijing 100142, China)

Corresponding author: Luo Huilan, Email: 809817757@qq.com

[Abstract] **Objective** To study the effects of positive acceleration (+Gz) on sympathetic nervous activity and plasma catecholamine in miniature pig model with different coronary artery stenosis. **Methods** Twenty-eight Obama miniature pigs were distributed to mild stenosis (Less than 50%, $n = 7$) group, moderate stenosis (50% ~ 69%, $n = 7$) group, severe stenosis (more than 70%, $n = 7$) group, and sham-operation control group ($n = 7$). The left anterior descending branch wire cerclage method was adopted for establish animal model of coronary artery stenosis. We observed the effects of intermittent high +Gz exposure on heart rate and plasma adrenaline (Ad), norepinephrine (NE) and dopamine (DA) levels of miniature pigs with different coronary artery stenosis. **Results** The basal heart rate of severe stenosis group was significant higher than that in the normal control group and mild stenosis group ($P < 0.05$). The heart rate of each group was significantly increased at immediately and 10 minutes after high +Gz exposure. Compare with control group and mild stenosis group, the heart rate of moderate and severe stenosis group were significantly increased. Furthermore, the duration of heart rate increase fast in severe stenosis group was more than 30 minutes after exposure. The plasma Ad, NE levels of severe stenosis groups were significant higher than the control and mild stenosis group ($P < 0.01$) before exposure. Plasma Ad and NE levels in all groups were significantly increased at immediately and 10min after exposure ($P < 0.01$). The plasma Ad and NE levels return to normal

基金项目: 全军“十二五”重点课题(BWS11J054)

作者简介: 张颖, 硕士在读, Email: 809817757@qq.com

通信作者: 罗惠兰, 主任医师, 硕士生导师, Email: 809817757@qq.com

at 30min after exposure in control and mild stenosis group, and the plasma Ad and NE of severe stenosis group continued more than 30 minutes ($P < 0.01$). Plasma DA of each group was significantly increased at once after +Gz exposure and return to normal at 10min after exposure ($P < 0.05$). There was significantly increased plasma DA levels in severe stenosis group than the other group at 10min after exposure ($P < 0.05$). **Conclusion** +Gz exposure can activate sympathetic nervous system and increase plasma catecholamine (Ad, NE and DA) levels in miniature pig model, and the effects were much stronger in miniature pig with coronary artery stenosis more than 50%.

[**Key words**] Coronary stenosis; Catecholamines; Sympathetic nervous system; Models, animal

冠状动脉粥样硬化以及冠状动脉粥样硬化性心脏病(冠心病)是严重危害人类健康的常见病,也是威胁飞行安全的重要因素。战斗机飞行员驾驶飞机进行空战动作或特技飞行时,加速度的作用会导致血液动力学改变、交感神经激活以及导致应激性反应,其中正加速度(+Gz)对飞行能力的影响尤为常见^[1-2]。随着我国高性能战斗机种的普及,高强度+Gz负荷的飞行特点对飞行员心血管系统调节适应能力提出了更高要求。然而,+Gz对于合并冠状动脉狭窄者的神经体液反应以及血流动力学的影响目前尚不十分清楚,冠脉狭窄严重程度与交感神经活性改变之间的关系亦未见文献报道。本实验旨在通过构建不同程度冠状动脉狭窄的巴马小型猪动物模型,观察+Gz作用下交感神经系统活性以及血浆儿茶酚胺水平的改变,为探讨不同程度冠脉狭窄在模拟飞行条件下的安全性提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性封闭群巴马小型猪28头,购自黑龙江省双鸭山市实创科技小型猪养殖场,饲养于中国医学科学院阜外心血管病医院动物中心饲养室[SYXK(京)2008-0016],体质量(22.6 ± 2.2)kg,月龄(10.6 ± 1.2)个月。根据动物生长情况,每日喂食2次,自由饮水,有专职兽医确保实验动物健康。实验动物在麻醉下采用左前降支丝线环扎法构建冠脉不同程度狭窄的动物模型,经冠状动脉造影分为:假手术正常冠脉对照组(A组)、冠脉轻度狭窄组(B组,冠状动脉血管直径狭窄 $< 50\%$)、冠脉中度狭窄组(C组, $50\% \leq$ 狭窄程度 $< 70\%$)、冠脉重度狭窄组(D组, $70\% \leq$ 狭窄程度 $< 100\%$)。研究方案经阜外医院动物伦理委员会批准,按实验动物使用的3R原则行人道的关怀。

1.2 仪器和设备 OEC 9800 数字减影机(GE公司,美国);NARKOMED 2C 麻醉机(Draeger公司,德国);心电监护仪(HP公司,美国);Savina 重症监护呼吸机(Draeger公司,德国);6F JL4.0 造影导管

(Medtronic公司,美国);Vision Ris 医学影像存档传输系统V 5.0.0(伟业前程科技有限公司,北京);离心机半径为8 m的98型离心机(中国航天员科研训练中心);UC2401-VP 高速离心机(Sigma公司,德国)。

1.3 试剂 多巴胺检测 ELISA 试剂盒、肾上腺素检测 ELISA 试剂盒、去甲肾上腺素检测 ELISA 试剂盒购自美国 R&D 公司。其他化学试剂均为国产分析纯。

1.4 冠脉狭窄动物模型的制备 巴马小型猪禁食水12 h,氯胺酮35mg/kg麻醉,右侧卧位,左侧胸部备皮,经口腔行气管插管并接呼吸机。右侧位固定动物,于左侧腋后线水平第4肋间、胸骨旁第2肋间水平、锁骨中线第4肋间水平分别作胸腔镜头孔、主操作孔(主孔)、辅助操作孔(辅孔)。进入胸腔,暴露心脏,分离血管,于左前降支近端分叉用血管钳夹持1-0丝线按方案要求环绕结扎,环扎前在丝线与血管之间衬用不同型号穿刺用套管针(分别衬用14、16号穿刺用套管针制作轻度狭窄模型,18、20号穿刺用套管针制作中度狭窄模型,22、24号穿刺用套管针制作重度狭窄模型),快速环扎后轻柔撤出套管针。关闭胸腔,肌内注射青霉素,术后4 h始皮下注射低分子肝素钙(1次/12 h),连续注射1周后停药;阿司匹林肠溶片+硫酸氯吡格雷片治疗至实验结束^[3]。

3只猪于术中出现室颤,除颤成功后分别于术后6、48 h死亡。假手术组不进行冠脉结扎,其余处理均与手术组一致。

1.5 冠脉狭窄程度的影像学检测 采用C形臂X线血管造影机,经皮穿刺股动脉后置入6F鞘管,经鞘管送入6F JL4.0 造影导管至左冠状动脉窦,注入碘普罗胺370造影剂进行冠状动脉造影。常规投影角度,采用连续电影法观察左前降支直径狭窄情况,术后结扎股动脉。运用 Vision Ris 医学影像存档传输系统计算机定量分析软件分析冠脉直径狭窄程

度,按照冠脉狭窄程度进行分组:狭窄程度 20% ~ 49% 为轻度狭窄组($n=7$)、狭窄程度 50% ~ 69% 为中度狭窄组($n=7$)、狭窄程度 70% ~ 90% 为重度狭窄组($n=7$)。假手术组($n=7$)冠脉未见狭窄。

1.6 +Gz 暴露 实验猪经氯胺酮肌内注射麻醉后安置于离心机上,尾部朝向离心机外部,所有动物给予 +3 Gz ~ +6 Gz 高正加速度暴露,初始加速度为 +3 Gz,每次暴露 10 s,G 值增长率 1 G/s,间隔时间 5 min,最高加速度为 +6 Gz。在 +3 Gz ~ +6 Gz 的暴露环境下,若心电监护显示出现相关危险心电信号(同一导联出现 3 次以上的室性期前收缩或者心室颤动等)则停止 +Gz 暴露。

1.7 心率测量 分别于各组小型猪 +Gz 暴露前及暴露后通过心电监测计算心率,心率 = 30 s 心跳次数 $\times 2$,心率水平反应实验动物的交感神经活性状况。

1.8 血液采集与检测 各组小型猪分别于麻醉状态下分别于 +Gz 暴露前、暴露后即刻、暴露后 10 min、暴露后 30 min 经前腔静脉抽取静脉血 3 mL,加入装有抗凝剂的干燥试管中 4 ℃ 保存,于 4 h 内离心分离血浆。采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测多巴胺、肾上腺素和去甲肾上腺素水平,操作过程严格按照试剂盒说明书进行。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 19.0 统计软件包进行数值分析。各组小型猪在 +Gz 暴露前、暴露后数

据间的比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 +Gz 暴露对不同程度冠脉狭窄猪心率的影响

各组动物均顺利完成 +Gz 暴露。+Gz 暴露前,冠脉重度狭窄组心率明显高于健康对照组及轻度冠脉狭窄组($P<0.05$)。高强度 +Gz 暴露后及暴露后 10 min 各组心率均较暴露前显著增高($P<0.01$),30 min 后心率恢复正常。与对照组相比较,中度、重度冠脉狭窄组心率明显增快($P<0.01$),重度狭窄组心率增快持续至暴露后 30 min ($P<0.01$)。见表 1。

2.2 +Gz 暴露对不同程度冠脉狭窄猪血浆肾上腺素水平的影响

+Gz 暴露前,与正常冠脉组、冠脉轻度狭窄组、中度狭窄组相比较,重度狭窄组猪基础血浆肾上腺素水平明显增高($P<0.01$)。高强度 +Gz 暴露后即刻各组猪血浆肾上腺素水平均较离心前显著增高($P<0.01$),持续至 10 min 时仍未恢复正常($P<0.01$),重度狭窄组血浆肾上腺素水平升高持续至暴露后 30 min($P<0.01$)。与正常冠脉组、轻度狭窄组、中度狭窄组相比较,重度狭窄组血浆肾上腺素水平在高强度 +Gz 暴露后即刻、暴露后 10 min、30 min 时均显著增高($P<0.01$)。冠脉正常组、轻度狭窄及中度狭窄组之间血浆肾上腺素水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 1 正加速度(+3 ~ +6Gz)暴露对不同程度冠脉狭窄猪心率的影响($\bar{x} \pm s$, 次/min)

组别	猪数(只)	+Gz 暴露前	暴露后即刻	暴露后 10 min	暴露后 30 min
正常冠脉组	7	78 $\pm$ 6	128 $\pm$ 8 ^b	106 $\pm$ 6 ^b	82 $\pm$ 6
冠脉轻度狭窄组	7	76 $\pm$ 4	132 $\pm$ 6 ^b	108 $\pm$ 8 ^b	84 $\pm$ 8
冠脉中度狭窄组	7	82 $\pm$ 8	158 $\pm$ 10 ^{ab}	116 $\pm$ 7 ^b	90 $\pm$ 6
冠脉重度狭窄组	7	88 $\pm$ 6 ^a	172 $\pm$ 8 ^{ab}	128 $\pm$ 10 ^{ab}	96 $\pm$ 10 ^b

注:与正常冠脉组比较,^a $P<0.01$;与 +Gz 暴露前比较,^b $P<0.01$

表 2 正加速度暴露对不同程度冠脉狭窄猪血浆肾上腺素水平的影响($\bar{x} \pm s$, $\mu\text{g/L}$)

组别	猪数(只)	+Gz 暴露前	暴露后即刻	暴露后 10 min	暴露后 30 min
正常冠脉组	7	1404.35 $\pm$ 45.24	2218.87 $\pm$ 71.48 ^d	1685.22 $\pm$ 54.29 ^d	1410.74 $\pm$ 51.47
冠脉轻度狭窄组	7	1431.69 $\pm$ 36.85	2262.07 $\pm$ 58.23 ^d	1718.03 $\pm$ 44.23 ^d	1445.83 $\pm$ 48.63
冠脉中度狭窄组	7	1401.34 $\pm$ 34.60	2214.11 $\pm$ 54.68 ^d	1681.61 $\pm$ 41.53 ^d	1419.53 $\pm$ 50.10
冠脉重度狭窄组	7	1511.47 $\pm$ 65.29 ^{abc}	2539.27 $\pm$ 109.68 ^{abcd}	1934.67 $\pm$ 83.57 ^{abcd}	1762.50 $\pm$ 111.33 ^{abcd}

注:与正常冠脉组比较,^a $P<0.01$;与冠脉轻度狭窄组比较,^b $P<0.01$;与冠脉中度狭窄组比较,^c $P<0.01$;与 +Gz 暴露前比较,^d $P<0.01$

2.3 +Gz 暴露对不同程度冠脉狭窄猪去甲肾上腺素水平的影响 +Gz 暴露前,冠脉重度狭窄组猪基础血浆去甲肾上腺素水平较对照组明显增高($P < 0.01$),冠脉正常组、轻度狭窄组、中度狭窄组血浆基础去甲肾上腺素水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。高强度 +Gz 暴露后即刻,各组猪血浆肾上腺素水平均较暴露前显著增高($P < 0.01$),暴露后 10 min 仍高于基础水平($P < 0.01$),轻度狭窄 30 min 后恢复正常,中度狭窄组及狭窄组升高持续至暴露后 30 min($P < 0.01$)。与正常冠脉组、轻度狭窄组、中度狭窄组相比较,重度狭窄组血去甲肾上腺素水平在高强度 +Gz 暴露后即刻、暴露后 10 min、30 min 时均显著增高($P < 0.01$)。与冠脉正常组相比较,轻度狭窄及中度狭窄组在 +Gz 暴露后血浆去甲肾上腺素水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

2.4 +Gz 暴露对不同程度冠脉狭窄猪血浆多巴胺水平的影响 +Gz 暴露前,各组猪血浆多巴胺水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。高强度 +Gz 暴露后,各组多巴胺水平均较暴露前明显增高($P < 0.05$),其中,冠脉重度狭窄组血浆多巴胺水平显著高于对照组及冠脉轻度狭窄组($P < 0.05$)。暴露后 10 min 以后血浆多巴胺水平恢复正常。见表 4。

3 讨论

机体受到 +Gz 加速度作用时,由于重力作用导致血流向下肢移动、头颈部血压下降及交感神经系

统激活,神经内分泌以及血管活性物质水平增高,以对抗加速度对血流动力学的影响。本研究观察到正常冠脉以及冠脉轻度狭窄小型猪在较大 +Gz 离心力的作用下出现交感神经激活以及血浆儿茶酚胺水平明显增高,以血浆肾上腺素、去甲肾上腺素增高尤为显著,+Gz 暴露后 10 min 仍高于正常,30 min 时恢复正常水平。交感神经激活及血浆儿茶酚胺升高可通过增快心率、增强心脏收缩力以及收缩血管等作用对抗 +Gz 对血流动力学的影响,具有代偿性维持血流动力学稳定的作用。然而交感神经过度激活以及儿茶酚胺异常增高可严重危害机体健康,甚至诱发严重心血管事件的发生。研究发现冠脉中度、重度狭窄(狭窄程度 $\geq 50\%$)小型猪动物模型在 +Gz 作用下出现交感神经过度激活以及血浆儿茶酚胺进一步增高,表现为心率进一步增快以及血浆肾上腺素、去甲肾上腺素、多巴胺浓度显著增高。

高强度 +Gz 暴露引起交感神经系统激活、大量儿茶酚胺合成释放以及心率增快,一方面心率增快所产生的剪切力和冲击力可造成内皮损害,促进粥样硬化性斑块的进展,增加斑块的不稳定性甚至导致斑块破裂、出血并形成血栓,导致心肌缺血或心肌梗死。同时,心率增快导致心肌耗氧量增加,可诱发心绞痛,促发心力衰竭等疾病^[4-7]。另外大量血儿茶酚胺可促进细胞膜离子通道构型的改变,导致细胞内大量钾离子外流,胞内钠、钙离子内流,引起水电解

表 3 正加速度暴露对不同程度冠脉狭窄猪血浆去甲肾上腺素水平的影响($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}$)

组别	猪数(只)	+Gz 暴露前	暴露后即刻	暴露后 10 min	暴露后 30 min
正常冠脉组	7	1363.53 $\pm$ 47.33	1906.09 $\pm$ 120.48 ^d	1563.50 $\pm$ 59.60 ^d	1447.61 $\pm$ 87.62
冠脉轻度狭窄组	7	1407.93 $\pm$ 72.34	2127.97 $\pm$ 120.85 ^d	1615.90 $\pm$ 145.10 ^d	1457.17 $\pm$ 43.68
冠脉中度狭窄组	7	1399.94 $\pm$ 32.24	2113.72 $\pm$ 57.57 ^d	1687.18 $\pm$ 50.95 ^d	1504.76 $\pm$ 59.97 ^d
冠脉重度狭窄组	7	1452.97 $\pm$ 31.35 ^a	2358.04 $\pm$ 164.09 ^{abcd}	1823.85 $\pm$ 121.09 ^{abcd}	1762.50 $\pm$ 111.33 ^{abcd}

注:与正常冠脉组比较,^a $P < 0.01$;与冠脉轻度狭窄组比较,^b $P < 0.01$;与冠脉中度狭窄组比较,^c $P < 0.01$;与 +Gz 暴露前比较,^d $P < 0.01$

表 4 正加速度暴露对不同程度冠脉狭窄猪血浆多巴胺水平的影响($\bar{x} \pm s, \text{pg/mL}$)

组别	猪数(只)	+Gz 暴露前	暴露后即刻	暴露后 10 min	暴露后 30 min
正常冠脉组	7	40.1 $\pm$ 2.3	49.5 $\pm$ 2.6 ^a	40.1 $\pm$ 6.7	38.6 $\pm$ 1.4
冠脉轻度狭窄组	7	40.3 $\pm$ 1.9	50.5 $\pm$ 4.2 ^a	42.8 $\pm$ 4.8	41.7 $\pm$ 4.9
冠脉中度狭窄组	7	40.4 $\pm$ 2.7	53.8 $\pm$ 6.3 ^a	41.7 $\pm$ 2.8	39.0 $\pm$ 2.6
冠脉重度狭窄组	7	37.9 $\pm$ 2.7	56.2 $\pm$ 4.5 ^{abc}	41.4 $\pm$ 6.0	37.8 $\pm$ 4.2

注:与 +Gz 暴露前比较,^a $P < 0.05$;与正常冠脉组比较,^b $P < 0.05$;与冠脉轻度狭窄组比较,^c $P < 0.05$

质失衡,出现各型恶性心律失常,特别是恶性室性心律失常的发生^[8]。

交感神经系统兴奋可引起下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统以及交感-肾上腺髓质激活,并通过增强与儿茶酚胺合成相关的关键酶酪氨酸羟化酶(TH),多巴胺-β-羟化酶(DBH)和苯乙醇胺-N-甲基转移酶(PNMT)的活性,从而增加儿茶酚胺的合成与释放^[9-10]。高强度+Gz加速度暴露引起血流动力学变化以及应激反应,激活交感神经系统,导致血浆肾上腺素、去甲肾上腺素水平显著增高,随后逐渐下降,至10 min时仍高于暴露前水平,30 min后恢复正常水平。血浆多巴胺水平在+Gz暴露后即刻出现轻度增高,10 min时完全恢复正常,与应激状态下血儿茶酚胺改变相符合。这是由于多巴胺作为递质的神经元主要分布于中枢神经系统,且多巴胺不能通过血脑屏障进入血液,因此,血浆中多巴胺的主要来源是新合成的增加,而不是神经囊泡的释放。

冠脉重度狭窄(狭窄程度 $\geq 70\%$)小型猪静息心率、血浆儿茶酚胺水平以及+Gz暴露后心率和血浆儿茶酚胺水平均较正常冠脉和轻度冠脉狭窄(狭窄程度 $< 50\%$)、中度冠脉狭窄(狭窄程度 $50\% \sim 69\%$)小型猪明显增加,心肌耗氧显著加强,血氧供需矛盾更加突出,发生心血管事件风险显著增加,提示冠脉重度狭窄对+Gz耐力具有非常明显的影响。中度冠脉狭窄小型猪静息心率与正常冠脉小型猪相比较虽无明显差别,但是在+Gz暴露后出现心率及儿茶酚胺显著增高,提示+Gz适应不良及耐力下降,具有潜在的相关风险。冠脉轻度狭窄($< 50\%$)小型猪在+Gz暴露后心率以及血儿茶酚胺水平与正常冠脉小型猪无明显差别,提示单纯 $< 50\%$ 冠脉狭窄对+Gz的适应性、耐力及交感神经系统影响相对较小。

总之,+Gz加速度暴露可出现交感神经系统激活及血儿茶酚胺水平增高,有助于机体对抗+Gz对血流动力学的影响,而交感神经系统过度激活及血儿茶酚胺大量释放则导致心肌耗氧增加及诱发心血管事件的发生。冠脉轻度狭窄($< 50\%$)对+Gz激活交感神经系统的影响相对较小,中度($50\% \sim 69\%$)、重度冠脉狭窄(狭窄程度 $\geq 70\%$ 在+Gz暴露

后出现交感神经系统过度激活及血儿茶酚胺大量释放,+Gz适应不良及耐力下降,具有潜在的心血管事件风险。因此,中、重度冠状动脉狭窄($\geq 50\%$)对飞行安全具有明显的影响。

参考文献

- [1] Öztürk C, ilbasmis MS, Akin A. Cardiac responses to long duration and high magnitude +Gz exposure in pilots: an observational study[J]. Anadolu Kardiyol Derg, 2012, 12(8):668-674.
- [2] 刘炳坤,马红磊,姜世忠. 人体对冲击加速度耐受限度研究进展[J]. 生物医学工程学杂志, 2010, 27(2):444-447.
- [3] 张海涛,罗惠兰,朴龙松,等. 经胸腔镜建立巴马小型猪冠状动脉狭窄模型[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(3):21-24.
- [4] Custodis F, Schirmer SH, Baumhäkel M, et al. Vascular pathophysiology in response to increased heart rate[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 56(24):1973-1983.
- [5] Tjugen TB, Flaa A, Kjeldsen SE. The prognostic significance of heart rate for cardiovascular disease and hypertension[J]. Curr Hypertens Rep, 2010, 12(3):162-169.
- [6] Diaz A, Bourassa MG, Guertin MC, et al. Long-term prognostic value of resting heart rate in patients with suspected or proven coronary artery disease[J]. Eur Heart J, 2005, 26(10):967-974.
- [7] Ford I, Robertson M, Komajda M, et al. Top ten risk factors for morbidity and mortality in patients with chronic systolic heart failure and elevated heart rate: The SHIFT Risk Model[J]. Int J Cardiol, 2015, 184C:163-169.
- [8] Vazir A, Claggett B, Jhund P, et al. Prognostic importance of temporal changes in resting heart rate in heart failure patients: an analysis of the CHARM program[J]. Eur Heart J, 2015, 36(11):669-675.
- [9] Sabban EL, Nankova BB, Serova LI, et al. Molecular regulation of gene expression of catecholamine biosynthetic enzymes by stress: sympathetic ganglia versus adrenal medulla[J]. Ann N Y Acad Sci, 2004, 1018:370-377.
- [10] Gavrilovic L, Spasojevic N, Dronjak S. Modulation of catecholamine-synthesizing enzymes in adrenal medulla and stellate ganglia by treadmill exercise of stressed rats[J]. Eur J Appl Physiol, 2012, 112(3):1177-1182.

(收稿日期:2015-08-30)