

李佳岑,罗瑶,曾思. 亚甲蓝与七氟醚在肺缺血再灌注(IR)损伤大鼠模型中对血清及肺组织氧化应激指标及炎症因子的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(4): 88 - 92,97.

Li JC, Luo Y, Zeng S. Effects of methylene blue and sevoflurane on oxidative stress indexes and inflammatory factors in serum and lung tissue in rats with lung ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(4): 88 - 92,97.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.04.015

# 亚甲蓝与七氟醚在肺缺血再灌注(IR)损伤大鼠模型中对血清及肺组织氧化应激指标及炎症因子的影响

李佳岑,罗瑶\*,曾思

(四川省医学科学院,四川省人民医院麻醉科,成都 610041)

**【摘要】** 目的 研究亚甲蓝与七氟醚在肺缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)损伤大鼠模型中对血清及肺组织氧化应激指标及炎症因子影响。方法 60只雄性SD大鼠根据随机数字表法分成四组,假手术组(空白对照组)、肺缺血再灌注组(IR对照组)、亚甲蓝预处理组(MB组)、七氟醚预处理组(S组),每组15只。建立离肺缺血再灌注损伤模型后,比较SD大鼠采用不同方式处理后,对血清及肺组织中白介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )等炎症指标和超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)以及三磷酸腺苷(ATP)等氧化应激指标,血液流变学以及肺湿重和干重的影响。结果 MB组、S组的肺组织湿/干质量比显著高于假手术组,且显著低于IR组,具有统计学差异( $P < 0.05$ )。MB组、S组的湿/干质量比组间相比无统计学差异( $P > 0.05$ )。MB组、S组的SOD、ATP水平显著低于假手术组,显著高于IR组,同时MDA和ROS显著高于假手术组,显著低于IR组,具有统计学差异( $P < 0.05$ ),而MB组、S组各氧化应激指标组间比较无统计学差异( $P > 0.05$ )。MB组、S组肺组织和血清各炎症指标水平显著高于假手术组,显著低于IR组,具有统计学差异( $P < 0.05$ ),MB组、S组各炎症指标组间比较无统计学差异( $P > 0.05$ )。MB组、S组T1、T2期的红细胞变形指数、红细胞聚集指数和血浆黏度均低于T0期,MB组T1、T2期各指数均低于S组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 亚甲蓝与七氟醚均可改善肺缺血再灌注损伤大鼠中肺组织氧化应激指标,降低血清及肺组织炎症因子水平,改善水肿状态,但亚甲蓝改善血液黏度效果更显著,可有效降低血栓形成风险。

**【关键词】** 缺血再灌注;氧化应激;炎症因子;亚甲蓝;七氟醚

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019)04-0088-05

## Effects of methylene blue and sevoflurane on oxidative stress indexes and inflammatory factors in serum and lung tissue in rats with lung ischemia-reperfusion injury

LI Jiacen, LUO Yao\*, ZENG Si

(Sichuan Academy of Medical Sciences, Department of Anesthesiology of Sichuan People's Hospital, Chengdu 610041, China)

**【基金项目】** 四川省卫生和计划生育科研课题项目(150234)。

**【作者简介】** 李佳岑(1986—),女,湖南人,博士研究生,专业:泌尿外科麻醉。E-mail: llj999@qq.com

**【通信作者】** 罗瑶(1969—),女,本科,副主任医师,专业:泌尿外科麻醉。E-mail: 16230058@qq.com

**【Abstract】 Objective** To study the effects of methylene blue and sevoflurane on oxidative stress indexes and inflammatory factors in serum and lung tissue in rats with lung ischemia-reperfusion injury. **Methods** Sixty male Sprague-Dawley rats were divided into four groups according to random number table, sham operation group (blank control group), lung ischemia-reperfusion group (IR control group), methylene blue pretreatment group (MB group), sevoflurane pretreatment group (S group), 15 in each group. After establishing a model of lung ischemia-reperfusion injury, the rats were treated respectively, and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin-6 (IL-6) were detected in serum and lung tissues. Inflammatory markers such as tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and oxidative stress indicators such as superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), reactive oxygen species (ROS), and adenosine triphosphate (ATP), hemorheology and the effects of lung wet weight and dry weight were assessed. **Results** The lung wet/dry mass ratios in the MB and S groups were significantly higher than that in the sham operation group and significantly lower than that in the IR group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in wet/dry weight ratios between the MB group and the S group ( $P > 0.05$ ). The levels of SOD and ATP in the MB and S groups were significantly lower than those in the sham operation group and significantly higher than those in the IR group, while MDA and ROS were significantly higher than those in the sham operation group and significantly lower than those in the IR group, all showed statistical significance ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the indexes of oxidative stress in the MB and S groups ( $P > 0.05$ ). The inflammatory index levels of lung tissue and serum in the MB and S groups were significantly higher than those in the sham operation group and significantly lower than those in the IR group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in inflammatory index levels between the MB and S groups ( $P > 0.05$ ). The erythrocyte deformation index, erythrocyte aggregation index, and plasma viscosity in the MB group and S group at the T1 and T2 phases were lower than those in the T0 phase, and those in the MB group at the T1 and T2 phases were lower than those in the S group ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Methylene blue and sevoflurane can improve the index of oxidative stress in the lung tissue, reduce the level of inflammatory factors in the serum and lung tissue, and improve the edematous state in IR injury rats. However, methylene blue can decrease the blood viscosity more significantly, which can effectively reduce the risk of thrombosis.

**【Keywords】** ischemia reperfusion; oxidative stress; inflammatory factor; methylene blue; sevoflurane

缺血再灌注是机体器官暂时性血流供应不足后再次恢复血流灌注时产生的病理过程,如氧化应激、异常炎症、凋亡坏死等,尽管缺血后恢复血流供应,但是组织器官损伤并未减轻,如肺缺血再灌注,可导致肺毛细血管内皮细胞以及肺泡上皮细胞受损,从而引起呼吸障碍<sup>[1-2]</sup>。缺血再灌注多发生于外科手术中,常见的处理方式有缺血预处理、远距调节方式等<sup>[2-3]</sup>,其中缺血预处理主要有吸入七氟醚,作为全身麻醉中常用吸入型药物,可减轻气道阻力和炎症,从而改善通气功能和减轻组织缺血再灌注损伤,可控性和操作性较强,但是诱导期和恢复期容易产生不适,从而导致躁动,影响手术过程,同时在受到手术刺激时,会导致血液黏度升高,增加血栓形成的可能,影响手术治疗以及预后效果<sup>[4-5]</sup>。亚甲蓝是吩噻嗪类化合物,易透过血脑屏障,可有效穿过线粒体膜,减轻缺血再灌注引起的线粒体损伤,氧化型和还原型的特点保证了较强的抗氧化及增强代谢的能力<sup>[6]</sup>,但是,目前关于其能在缺血再灌注中的应用并不多见,其是否能够达到与七氟醚相同的疗效,同时改善血液黏度,以及在缺血再灌注损伤中对机体血清及肺组织氧化应激

指标及炎症因子影响的有待进一步考察,本文以大鼠为模型动物探讨两者差异,为实际应用提供指导。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

60 只二级清洁雄性 SD 大鼠,体重 180~220 g,由四川省人民医院实验室动物中心提供 [SCXK(川)2018-15], [SYXK(川)2018-110]。本研究使用大鼠的实验过程均经过我院伦理委员会的批准。将 60 只大鼠根据随机数字表法随机分成 4 组,每组 15 只。

### 1.2 主要试剂与仪器

七氟醚购自于恒瑞医药有限公司;亚甲蓝购自于济川药业集团有限公司;二甲基亚砷、PBS、甲醇、戊巴比妥钠等均购自于 Sigma 公司;ELISA 试剂盒购自于武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.3 实验方法

SD 大鼠根据随机数字表法分成四组,术前 12 h 禁食,自由饮水。称重后于腹腔注射 2% 戊巴比妥钠 (0.5 mL/100 g),动物麻醉后取仰卧位固定于手术台上并消毒。于尾静脉注射肝素 100 U/kg,气管

切开后插管并行正压通气,保持大鼠呼吸频率为每分钟 70 次,潮气量稳定在 8.0~9.0 mL/kg 范围内。于左侧胸骨第 5 肋间开胸,随后于左心室近心尖处注射肝素 500 U/kg,便于分离左侧肺动脉。用无损伤血管钳夹阻断近心端左肺动脉,吸气末则用血管钳阻断左主支气管,造成左肺缺血。假手术组(空白对照组)只需分离大鼠左侧肺门和肺动静脉,无需进行阻断。肺缺血再灌注组(IR 对照组)在肺缺血 1 h 后放开,随后再灌注 2 h 即可。MB 组和 S 组建模方法同 IR 组,其中假手术组和 IR 组灌注前 5 min 于腹腔注射生理盐水即可,而 MB 组灌注前 5 min 于腹腔注射 5 mg/kg 亚甲蓝,而 S 组需在灌注前 5 min 于呼吸管上添加七氟醚,并保持肺中检测到的七氟醚浓度稳定在 2.1% 即可。

### 1.3.1 检测指标

血液流变学指标的检测:分别于麻醉前(T0)、麻醉诱导后 30 min(T1)、灌注 2 h(T2),检查患者红细胞变形指数、红细胞聚集指数、血浆黏度。并于灌注 2 h 后,经麻醉处死前先空腹采外周静脉血 5 mL,3000 r/min 离心 20 min,于 -20℃ 暂存。经麻醉后处死,取左肺组织,将其分成 2 等份。一份用于检测肺组织湿/干质量比,即生理盐水冲洗并去除多余水分称肺湿重,于 80℃ 烘烤 24 h 后称干质量,计算湿/干质量比。另一半肺组织制成 10% 匀浆

液,4℃ 3000 r/min 离心 10 min,采用 BCA 法测蛋白浓度检测超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)以及三磷酸腺苷(ATP)含量。按相应酶联免疫试剂盒说明操作测定血清和肺组织匀浆液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 IL-6 含量。

### 1.4 统计学方法

本研究所有数据均采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,其中计量资料以平均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 四组大鼠肺组织湿/干质量比

MB 组、S 组的肺组织湿/干质量比显著高于假手术组,且显著低于 IR 组,MB 组、S 组的肺湿重显著低于 IR 组,其中 MB 组的肺湿重显著高于假手术组,具有统计学差异( $P < 0.05$ )。MB 组、S 组的肺湿重和湿/干质量比无统计学差异( $P > 0.05$ ),见表 1。

### 2.2 四组大鼠肺组织氧化应激指标

MB 组、S 组的 SOD、ATP 水平显著低于对照组,显著高于 IR 组,同时 MDA 和 ROS 显著高于对照组,显著低于 IR 组,具有统计学差异( $P < 0.05$ ),而 MB 组、S 组各氧化应激指标组间比较无统计学差异( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 1 四组大鼠肺组织湿/干质量比( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )  
Table 1 The lung wet/dry mass ratio in four groups of rats

组别 Groups	肺湿重(g) Lung wet weight	肺干重(g) Lung dry weight	湿/干质量比 Wet/dry mass ratio
假手术组 Sham group	0.68 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	0.14 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	4.85 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
IR 组 IR group	1.39 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.19 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup>	7.32 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>
MB 组 MB group	0.84 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>	0.16 $\pm$ 0.06	5.25 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>
S 组 S group	0.80 $\pm$ 0.19 <sup>b</sup>	0.15 $\pm$ 0.05	5.33 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>

注:与假手术组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 IR 组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with sham group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with IR group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

表 2 四组大鼠的肺组织氧化应激指标( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 15$ )  
Table 2 Oxidative stress indexes of lung tissue in four groups of rats

组别 Groups	SOD(U/mg)	MDA(nmol/mg)	ROS(a.u. $\times$ 108)	ATP(nmol/mg)
假手术组 Sham group	326.08 $\pm$ 54.11 <sup>b</sup>	1.18 $\pm$ 0.13 <sup>b</sup>	1.28 $\pm$ 0.18 <sup>b</sup>	336.65 $\pm$ 44.53 <sup>b</sup>
IR 组 IR group	158.63 $\pm$ 49.12 <sup>a</sup>	2.42 $\pm$ 0.20 <sup>a</sup>	3.69 $\pm$ 0.43 <sup>a</sup>	123.46 $\pm$ 28.86 <sup>a</sup>
MB 组 MB group	296.65 $\pm$ 57.19 <sup>ab</sup>	1.32 $\pm$ 0.15 <sup>ab</sup>	2.24 $\pm$ 0.21 <sup>ab</sup>	269.74 $\pm$ 35.86 <sup>ab</sup>
S 组 S group	288.72 $\pm$ 55.50 <sup>ab</sup>	1.29 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>	2.42 $\pm$ 0.19 <sup>ab</sup>	247.74 $\pm$ 30.87 <sup>ab</sup>

注:与假手术组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 IR 组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Sham group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with IR group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

### 2.3 四组大鼠肺组织炎性指标

MB 组、S 组肺组织各炎性指标水平显著高于对照组,显著低于 IR 组,具有统计学差异( $P < 0.05$ ),而 MB 组各炎性指标略高于 S 组,但组间比较无统计学差异( $P > 0.05$ ),见表 3。

### 2.4 四组大鼠血清炎性指标

MB 组、S 组血清各炎性指标水平显著高于对照组,显著低于 IR 组,具有统计学差异( $P < 0.05$ ),而 MB 组、S 组各炎性指标组间比较无统计学差异( $P > 0.05$ ),见表 4。

### 2.5 两组各时间段血液流变学变化

MB 组、S 组 T1、T2 期的红细胞变形指数、红细胞聚集指数和血浆黏度均低于 T0 期,而 IR 组 T1、

T2 期各指数均高于 T0 期,MB 组 T1、T2 期各指数均低于 S 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 5。

## 3 讨论

肺缺血再灌注损伤是机体组织器官因血流供应不足或受阻而迅速引起的肺组织损伤,如肺毛细血管内皮细胞以及肺泡上皮细胞受损等,与 ROS 大量产生而引起的氧化应激,组织炎症细胞聚集,或者炎性因子的大量产生密切相关<sup>[6]</sup>。缺血再灌注损伤常见的处理方式有缺血预处理、远距调节方式等,常用的模型为结扎法制作的肺缺血再灌注损伤。其中,缺血预处理主要有吸入七氟醚,但关于腹腔注射亚甲蓝的应用效果并未得到广泛认可,因

表 3 四组大鼠肺组织炎性指标( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )  
Table 3 Inflammatory markers tissue of serum in four groups of rats

组别 Groups	IL-1 $\beta$ (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)
假手术组 Sham group	101.18 $\pm$ 12.35 <sup>b</sup>	131.19 $\pm$ 15.38 <sup>b</sup>	51.28 $\pm$ 10.33 <sup>b</sup>
IR 组 IR group	192.42 $\pm$ 18.22 <sup>a</sup>	252.62 $\pm$ 24.52 <sup>a</sup>	213.69 $\pm$ 21.46 <sup>a</sup>
MB 组 MB group	136.32 $\pm$ 14.35 <sup>ab</sup>	186.79 $\pm$ 17.92 <sup>ab</sup>	142.24 $\pm$ 18.24 <sup>ab</sup>
S 组 S group	131.25 $\pm$ 12.88 <sup>ab</sup>	176.25 $\pm$ 16.73 <sup>ab</sup>	122.42 $\pm$ 15.29 <sup>ab</sup>

注:与假手术组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 IR 组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with sham group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with IR group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

表 4 四组大鼠血清炎性指标( $\bar{x} \pm s, n = 15$ )  
Table 4 Serum inflammatory markers in four groups of rats

组别 Groups	IL-10 (ng/L)	IL-6 (ng/L)	TNF- $\alpha$ (ng/L)
假手术组 Sham group	93.19 $\pm$ 6.69 <sup>b</sup>	123.19 $\pm$ 19.69 <sup>b</sup>	217.19 $\pm$ 26.69 <sup>b</sup>
IR 组 IR group	273.88 $\pm$ 21.07 <sup>a</sup>	350.88 $\pm$ 28.07 <sup>a</sup>	493.88 $\pm$ 38.07 <sup>a</sup>
MB 组 MB group	163.73 $\pm$ 16.48 <sup>ab</sup>	229.66 $\pm$ 23.44 <sup>ab</sup>	313.19 $\pm$ 31.60 <sup>ab</sup>
S 组 S group	173.84 $\pm$ 15.63 <sup>ab</sup>	235.72 $\pm$ 25.47 <sup>ab</sup>	302.77 $\pm$ 29.78 <sup>ab</sup>

注:与假手术组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 IR 组相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with sham group, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with IR group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ .

表 5 两组各时间段血液流变学的变化( $\bar{x} \pm s, \text{mPa} \cdot \text{s}, n = 15$ )  
Table 5 Changes of hemorheology in two groups

组别 Groups	时间 Time	红细胞变形指数 Erythrocyte deformation index	红细胞聚集指数 Erythrocyte aggregation index	血浆黏度 Plasma viscosity
假手术组 Sham group	T0	0.75 $\pm$ 0.13	8.71 $\pm$ 0.22	1.75 $\pm$ 0.14
	T1	0.73 $\pm$ 0.12 <sup>bc</sup>	8.82 $\pm$ 0.26 <sup>bc</sup>	1.78 $\pm$ 0.15 <sup>bc</sup>
	T2	0.71 $\pm$ 0.10 <sup>bc</sup>	8.95 $\pm$ 0.24 <sup>bc</sup>	1.80 $\pm$ 0.13 <sup>bc</sup>
IR 组 IR group	T0	0.74 $\pm$ 0.12	8.64 $\pm$ 0.23	1.72 $\pm$ 0.15
	T1	0.81 $\pm$ 0.13 <sup>ac</sup>	8.89 $\pm$ 0.25 <sup>ac</sup>	1.87 $\pm$ 0.16 <sup>ac</sup>
	T2	0.87 $\pm$ 0.14 <sup>ac</sup>	9.17 $\pm$ 0.26 <sup>ac</sup>	1.95 $\pm$ 0.17 <sup>ac</sup>
MB 组 MB group	T0	0.76 $\pm$ 0.13	8.70 $\pm$ 0.20	1.68 $\pm$ 0.13
	T1	0.66 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>	7.61 $\pm$ 0.18 <sup>ab</sup>	1.53 $\pm$ 0.11 <sup>ab</sup>
	T2	0.61 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>	7.54 $\pm$ 0.17 <sup>ab</sup>	1.54 $\pm$ 0.12 <sup>ab</sup>
S 组 S group	T0	0.77 $\pm$ 0.11	8.67 $\pm$ 0.23	1.70 $\pm$ 0.15
	T1	0.71 $\pm$ 0.09 <sup>abc</sup>	8.34 $\pm$ 0.21 <sup>abc</sup>	1.63 $\pm$ 0.10 <sup>abc</sup>
	T2	0.65 $\pm$ 0.10 <sup>abc</sup>	8.01 $\pm$ 0.19 <sup>abc</sup>	1.62 $\pm$ 0.11 <sup>abc</sup>

注:与 T0 期相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 IR 组同时间点相比,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 MB 组同时间点相比,<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the T0 phase, <sup>a</sup> $P < 0.05$ . Compared with the same time point of the IR group, <sup>b</sup> $P < 0.05$ . Compared with the same time point of the MB group, <sup>c</sup> $P < 0.05$ .

此本文以 SD 大鼠肺缺血再灌注损伤为模型探讨七氟醚、亚甲蓝在调控氧化应激、炎症反应、血液流变学方面的区别,旨在为亚甲蓝的应用提供依据。研究显示,MB 组、S 组的肺组织湿/干质量比显著高于假手术组,且显著低于 IR 组,表明大鼠肺 IR 后存在明显的水肿,而经过七氟醚或者亚甲蓝预处理后,均可有效减轻水肿,但不能完全避免水肿的发生,而 MB 组、S 组的肺湿重和湿/干质量比无统计学差异,表明两组对于水肿的改善效果相近。研究发现 MB 组、S 组的 SOD、ATP 水平显著低于对照组,显著高于 IR 组,同时 MDA 和 ROS 显著高于对照组,显著低于 IR 组,与孙雷等报道相符<sup>[1,7]</sup>。进一步表明大鼠肺 IR 损伤后存在明显氧化应激反应,而经过七氟醚或者亚甲蓝预处理后,均可一定程度减轻氧化应激反应,而 MB 组、S 组各氧化应激指标组间比较无统计学差异,说明腹腔注射亚甲蓝在改善氧化应激方面能够达到与七氟醚相同的疗效。分析认为,大鼠肺 IR 后肺细胞上线粒体电子传递链的电子渗漏到氧上以及细胞中酶的催化反应导致 ROS 增多,ROS 不可逆地破坏细胞内蛋白质、脂质等结构,引发脂质过氧化,从而产生 MDA,破坏细胞膜,还导致细胞酶系统遭受破坏,使得 SOD 水平降低,同时 SOD 的降低又导致不能正常清除 ROS 活性,使得细胞内氧化还原失去平衡,阻断能量代谢导致 ATP 水平降低,引起氧化应激反应,导致细胞结构被破坏和细胞死亡<sup>[7-8]</sup>。MB 组大鼠接受亚甲蓝预处理后,可通过增强 Cyt C 氧化酶的活性而促进 ATP 的生成,通过激活 Nrf2/ARE 通路而增强组织抗氧化作用,从而降低 ROS 水平,故而也降低 MDA 水平和增加 SOD 水平,减轻了氧化应激对肺组织的损伤<sup>[9-10]</sup>。而 S 组接受七氟醚预处理,通过优化大鼠有氧代谢率和扩张支气管及肺血管,从而增加肺组织供氧和改善肺顺应性,同时在体内代谢过程中可产生过氧化物,提前激活抗氧化机制以及清除氧自由基,改善氧化应激水平<sup>[11]</sup>。尽管,两者作用机制不同,但均可改善大鼠肺缺血再灌注损伤状态,从而保护对肺损伤,为亚甲蓝在肺缺血再灌注损伤中的应用提供依据。

当机体发生缺血再灌注损伤时,机体病灶部位可产生大量 ROS,同时趋化和激活大量中性粒细胞、巨噬细胞,从而刺激免疫细胞产生大量炎症因子并释放入血,如 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ <sup>[5,12]</sup>。炎症细胞因子是引起肺泡损伤的重要原因,单核细胞生成的 TNF- $\alpha$  可增强中性粒细胞的吞噬作用,促进 IL-1 $\beta$ 、IL-6 的分泌,进而启动炎症级联放大反应,促进血管内皮细胞与中性粒细胞的粘附,从而增加肺血

管通透性,使得肺组织炎症因子水平进一步增加,加剧局部炎症反应,引起肺细胞损伤。本次研究结果显示,MB 组、S 组肺组织和血清各炎症指标水平显著高于对照组,显著低于 IR 组,表明大鼠肺 IR 损伤后存在明显的炎症反应,而经过七氟醚或者亚甲蓝预处理后,均可一定程度减轻炎症反应,而 MB 组、S 组各炎症因子水平组间比较无统计学差异,说明腹腔注射亚甲蓝在改善炎症方面能够达到与七氟醚相同的疗效。七氟醚在清除 ROS 的同时,可抑制内皮和中性粒细胞间的粘附,减轻肺组织损伤,减少损伤刺激,同时下调肺组织细胞中基质金属蛋白酶的表达,从而维持细胞膜和基质稳定性,使得细胞正常运转,从而降低了炎症刺激<sup>[7,13]</sup>,故而表现为 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平的降低。MB 组大鼠接受亚甲蓝预处理后,由于其良好的膜通透性使之容易进入线粒体中,其的高度自动氧化特性使之可以在氧化态和还原态之间自由切换,从而维持线粒体电子传递链的运转,稳定线粒体功能<sup>[14-15]</sup>,降低 ROS 水平,避免细胞氧化应激引起的细胞损伤和凋亡,从而降低炎症刺激和炎症因子水平。氧化应激反应和炎症反应关系密切,氧化应激反应引起的细胞损伤和凋亡可诱导炎症反应,本次研究中发现使用七氟醚或亚甲蓝预处理后,均可改善大鼠氧化应激状态和降低炎症因子水平,可相互佐证,同时通过肺组织水肿状态可以直观反应。但进一步研究血液流变学指标发现,IR 组 T1、T2 期红细胞变形指数、红细胞聚集指数和血浆黏度均高于 T0 期,MB 组 T1、T2 期各指数均低于 S 组,表明亚甲蓝、七氟醚均可改善血液黏度,但亚甲蓝效果更优,推测是亚甲蓝能够通过改善炎症反应和氧化应激反应,以及减少血管阻力,从而使血液黏度降低,稳定血流动力学状态,降低血栓形成风险。

综上所述,亚甲蓝与七氟醚均可改善肺缺血再灌注损伤大鼠中肺组织氧化应激指标,降低血清及肺组织炎症因子水平,改善水肿状态,但亚甲蓝改善血液黏度效果更显著,可有效降低血栓形成风险。

#### 参考文献:

- [1] 孙雷,李文雅,刘文科,等.缺血后处理对肺缺血再灌注损伤模型大鼠的保护作用[J].中国组织工程研究,2015,19(27):4271-4276.
- [2] Qi QY, Chen W, Li XL, et al. H<sub>2</sub>S protecting against lung injury following limb ischemia-reperfusion by alleviating inflammation and water transport abnormality in rats[J]. Biomed Environ Sci,2014,27(6):410-418.

示,本品在日最大给药量(MFD)32 g/kg 时小鼠未见任何不良反应,相当于小鼠药效学等效剂量的 46 倍左右,临床人用剂量的 427 倍左右。

重复给药毒性试验研究(repeated dose toxicity)是药物临床前安全性评价最主要内容,通过将药物按照临床用药途径大剂量重复多次给予动物,密切检测动物产生的毒性反应和中毒靶组织器官,能够获得毒性产生的量效和时效关系,预测药物在临床上可能出现的毒性反应性质及发生率,对药物的临床应用具有重要的参考意义<sup>[4,7]</sup>。本文 SD 大鼠重复给药毒性试验结果表明,肠胃宁胶囊 9、3、1 g/kg 三个剂量下对大鼠体重、摄食量、血液学、血液生化学及脏器相对重量均无明显影响。病理学检查结果亦显示,以上剂量下未见明显的毒性靶器官。从试验结果可得大鼠重复给药 13 周最大无毒反应剂量(NOEL)大于 9 g/kg,此剂量相当于大鼠药效学等效剂量的 18 倍,临床人用剂量的 120 倍。

综上所述,通过本研究结果可得肠胃宁胶囊小鼠单次给药最大给药量(MFD)为 32 g/kg;大鼠重复给

药 13 周最大无毒反应剂量(NOEL)大于 9 g/kg。提示本品临床应用安全范围较大,安全窗较宽。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 苗明三,刘同祥,孙艳红,等.肠胃宁片对大、小鼠结肠炎模型的影响[J].中约药理与临床,2003,19(5):41-42.
- [ 2 ] 牛洪辉,杨亚蕾,苗明三,等.肠胃宁片镇痛作用和对肠蠕动的影响[J].时珍国医国药,2009,20(10):2499-2500.
- [ 3 ] 曹明成,黄泰康.我国有毒中药的研究进展综述[J].中国药业,2016,25(2):9-13.
- [ 4 ] 药物非临床安全性研究技术指导原则[S].国家食品药品监督管理局药品审评中心,2014:21-33.
- [ 5 ] 张颖,马玉奎,戴晓莉,等.多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液大鼠重复给药毒性的比较[J].中国比较医学杂志,2016,26(6):23-27.
- [ 6 ] 李波,袁伯俊,廖明阳.药物毒理学[M].北京:人民卫生出版社.2015:523-525.
- [ 7 ] 戴晓莉,戴学栋,郭峰,等.注射用右旋雷贝拉唑钠大鼠 13 周重复给药毒性研究[J].中国药物警戒,2016,13(7):389-393.

[收稿日期]2018-11-20

#### (上接第 92 页)

- [ 3 ] Li C, Xu M, Wu Y, et al. Limb remote ischemic preconditioning attenuates lung injury after pulmonary resection under propofol-remifentanyl anesthesia: a randomized controlled study [J]. Anesthesiology.2014,121(2):249-259.
- [ 4 ] 韩冲芳,贺建东,王晓鹏,等.七氟醚预处理联合后处理对大鼠心肌缺血-再灌注损伤的影响[J].临床麻醉学杂志,2015,31(06):592-596.
- [ 5 ] 陈红生,曹苏.七氟醚后处理对大鼠脑缺血-再灌注后炎症因子水平的影响[J].江苏医药,2016,42(15):1641-1643.
- [ 6 ] 陈海娥,马迎春,何金波,等.缺血后处理对肺缺血/再灌注损伤的保护作用及其机制[J].中国应用生理学杂志,2014,30(3):251-256.
- [ 7 ] 卢孙山,顾健腾,鲁开智,等.七氟醚预处理在单肺通气肺缺血再灌注损伤中的保护作用[J].第三军医大学学报,2018,40(02):155-159.
- [ 8 ] Luo C, Yuan D, Zhao W, et al. Sevoflurane ameliorates intestinal ischemia-reperfusion-induced lung injury by inhibiting the synergistic action between mast cell activation and oxidative stress[J]. Mol Med Rep, 2015, 12(1):1082-1090.
- [ 9 ] 孙鸿然,苟杨,刘丹彦.亚甲蓝预处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响[J].重庆医科大学学报,2018,43(03):426-431.
- [ 10 ] Ding Y, Chen M, Wang M, et al. Posttreatment with 11-keto-β-

boswellic acid ameliorates cerebral ischemia-reperfusion injury: Nrf2/HO-1 pathway as a potential mechanism [J]. Mol Neurobiol,2015,52(3):1430-1439.

- [ 11 ] 庞勇.七氟醚预处理对缺血再灌注损伤大鼠的神经保护作用及机制研究[J].现代预防医学,2015,42(21):3959-3961.
- [ 12 ] 杨黄恬,王志华,刘金龙,等.线粒体在心肌缺血再灌注损伤与保护中的重要作用[J].中国病理生理杂志,2015,31(10):1822.
- [ 13 ] Breuer T, Maes K, Rossaint R, et al. Sevoflurane exposure prevents diaphragmatic oxidative stress during mechanical ventilation but reduces force and affects protein metabolism even during spontaneous breathing in a rat model[J]. Anesth Analg, 2015, 121(1):73-80.
- [ 14 ] 盛琼,翁平,张晓彤,等.亚甲蓝减轻大鼠离体心脏缺血/再灌注引起的线粒体损伤[J].中国病理生理杂志,2017,33(04):711-716.
- [ 15 ] Tucker D, Lu Y, Zhang Q. From mitochondrial function to neuroprotection—an emerging role for methylene blue[J]. Mol Neurobiol, 2017, 55(6):5137-5153.
- [ 16 ] 黄剑峰,洗海燕,侯小琼.七氟醚对新生大鼠神经干细胞的增殖作用[J].中国比较医学杂志,2018,28(07):24-27,42.

[收稿日期]2018-09-18