

# 雾化吸入和腹腔注射依达拉奉对烟雾吸入性损伤肺模型大鼠保护作用比较研究<sup>Δ</sup>

肖长栓<sup>1\*</sup>, 刘娅平<sup>2</sup>, 杨景哲<sup>1#</sup>(1.承德医学院附属医院烧伤整形科, 河北承德 067000; 2.承德医学院附属医院妇二科, 河北承德 067000)

中图分类号 R285;R644 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)01-0070-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.01.13

**摘要** 目的:比较雾化吸入和腹腔注射依达拉奉对烟雾吸入性肺损伤模型大鼠急性肺损伤的保护作用。方法:将30只雄性SD大鼠按照随机数字表法分为正常对照组(A组)、致伤空白组(B组)、致伤腹腔注射治疗组(C组)和致伤低、高剂量雾化吸入治疗组(D、E组),每组6只。B~E组大鼠均被置于含松木屑的烟雾发生器中复制烟雾吸入性肺损伤模型;A组大鼠除不放松木屑外,其余操作同上。造模后30 min, C组大鼠腹腔注射依达拉奉18 mg/kg(每间隔70 min重复1次,共4次);D、E组大鼠雾化吸入依达拉奉9、18 mg/kg(雾化吸入10 min,每间隔60 min重复1次,共4次);A、B组大鼠不作任何处理。末次给药后6 h,进行大鼠动脉血气分析,并计算大鼠肺湿干比(W/D)和肺组织含水率;采用双抗体夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测其血清中肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素6(IL-6)、IL-10含量;采用ELISA等方法检测其肺组织中丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、胱天蛋白酶3(Caspase-3)含量;采用苏木精-伊红染色法观察其肺组织病理改变;采用TUNEL法检测其肺组织细胞凋亡率。结果:A组大鼠肺组织未见异常;B组大鼠肺组织中可见出血及水肿,肺泡结构难以辨认,并可见炎症细胞和红细胞浸润;C~E组大鼠肺组织上述症状均有不同程度改善。与A组比较,其余组大鼠动脉氧分后和吸入氧浓度比值(PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>)以及肺组织SOD含量均显著降低( $P < 0.05$ );肺含水率、W/D,血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10含量以及肺组织MDA、MPO、Caspase-3含量和细胞凋亡率均显著升高( $P < 0.05$ )。与B组比较,各给药组大鼠动脉PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>以及血清IL-10含量均显著升高( $P < 0.05$ );肺含水率、W/D,血清TNF- $\alpha$ 、IL-6含量以及肺组织MDA、MPO、Caspase-3含量和细胞凋亡率均显著降低,且呈剂量依赖性( $P < 0.05$ )。结论:依达拉奉对烟雾吸入性肺损伤模型大鼠具有一定的保护作用,可剂量依赖性地减少炎症介质和(或)细胞因子的产生及释放、减轻过氧化损伤并抑制细胞凋亡,且雾化吸入较腹腔注射的效果更明显。

**关键词** 雾化吸入;腹腔注射;依达拉奉;吸入性肺损伤;量效关系;大鼠;保护作用;炎症因子

- orders, 2018, 233(6):79-85.
- [19] ISHIKAWA C, SHIGA T. The postnatal 5-HT1A receptor regulates adult anxiety and depression differently via multiple molecules[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2017, 78(1):66-74.
- [20] OLIVIER JDA, HART MGVD, SWELM RPL, et al. A study in male and female 5-HT transporter knockout rats: an animal model for anxiety and depression disorders[J]. Neuroscience, 2008, 152(3):573-584.
- [21] LI Y, LIU J, LIU X, et al. Antidepressant-like action of single facial injection of botulinum neurotoxin A is associated with augmented 5-HT levels and BDNF/ERK/CREB pathways in mouse brain[J]. Neurosci Bull, 2019, 35(4):661-672.
- [22] LI ZC, HE Y, TANG JS, et al. Molecular imaging of striatal dopamine transporters in major depression: a meta-analysis[J]. J Affect Disord, 2015, 174(15):137-143.
- [23] CLAUSIUS N, BORN C, GRUNZE H. The relevance of dopamine agonists in the treatment of depression[J]. Neuropsychiatr, 2009, 23(1):15-25.
- [24] DANDEKAR MP, LUSE D, HOFFMANN C, et al. Increased dopamine receptor expression and anti-depressant response following deep brain stimulation of the medial forebrain bundle[J]. J Affect Disord, 2017, 217(8):80-88.
- [25] DUVAL F, MOKRANI M C, ERB A, et al. Thyroid axis activity and dopamine function in major depression[J]. Psychoneuroendocrinology, 2017, 83(11):42-45.
- [26] YAN TX, XU MJ, WU B, et al. The effect of Schisandra chinensis extracts on depression by noradrenergic, dopaminergic, GABAergic and glutamatergic systems in the forced swim test in mice[J]. Food Funct, 2016, 7(6):2811-2819.
- [27] LEI L, WATARU I, ALEXEI M. Overexpression of channelrhodopsin-2 interferes with the GABA<sub>B</sub> receptor-mediated depression of GABA release from the somatostatin-containing interneurons of the prefrontal cortex[J]. Neurophotonics, 2018. DOI:10.1117/1.NPh.5.2.025003.

(收稿日期:2020-08-31 修回日期:2020-12-14)

(编辑:林静)

<sup>Δ</sup> 基金项目:承德市基础研究项目(No.201904A107)

\* 主治医师, 硕士。研究方向:吸入性损伤、重症烧伤、烧伤后整形。电话:0314-2279277。E-mail: xiaochangshuanl@163.com

# 通信作者:副主任医师, 硕士。研究方向:烧伤外科。电话:0314-2279277。E-mail: 13653247707@163.com

## Comparative Study of Protective Effects of Atomization Inhalation and Intraperitoneal Injection of Edaravone on Smoke Inhalation Lung Injury Model Rats

XIAO Changshuan<sup>1</sup>, LIU Yaping<sup>2</sup>, YANG Jingzhe<sup>1</sup> (1. Dept. of Burn and Plastic Surgery, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Hebei Chengde 067000, China; 2. Dept. Two of Gynaecology, the Affiliated Hospital of Chengde Medical University, Hebei Chengde 067000, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To compare the protective effect of atomization inhalation and intraperitoneal injection of edaravone on acute lung injury in smoke inhalation lung injury model rats. **METHODS:** Thirty male SD rats were divided into normal control group (group A), injury group (group B), intraperitoneal injection group (group C), low-dose aerosol inhalation group (group D), high-dose aerosol inhalation group (group E) according to random number table, with 6 rats in each group. Group B-E were placed in smoke generator containing pine sawdust to induce smoke inhalation lung injury model. In group A, the operation was the same as above except that the pine sawdust was not placed. Thirty minutes after modeling, group C were injected intraperitoneally with edaravone 18 mg/kg (every 70 min, 4 times in total). Group D and E inhaled edaravone 9, 1.8 mg/kg (every 60 min, lasting for 10 min each time, 4 times in total). The rats were treated by no means in group A and group B. Six hours after last medication, arterial blood gas analysis was performed, and the lung wet to dry ratio (*W/D*) and water content of lung tissue were calculated. The levels of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 in serum were detected by double antibody ELISA. The contents of MDA, MPO, SOD and Caspase-3 in lung tissue were determined by ELISA and other methods. HE staining was used to observe the pathological changes of lung tissue. The apoptotic rate of cells in lung tissue were determined by TUNEL assay. **RESULTS:** No abnormality was found in lung tissue of group A; in group B, hemorrhage and edema were found in lung tissue, alveolar structure was difficult to identify, and inflammatory cells and red blood cell infiltration were seen. Above symptoms of rats in group C-E were improved to different extent. Compared with group A, PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> and SOD content of lung tissue were decreased significantly in other groups ( $P < 0.05$ ); water content of lung tissue, *W/D*, serum contents of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10, the contents of MDA, MPO and Caspase-3 in lung tissue, apoptotic rate were increased significantly ( $P < 0.05$ ). Compared with group B, PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> and serum contents of IL-10 were increased significantly in administration groups ( $P < 0.05$ ); water content of lung tissue, *W/D*, serum contents of TNF- $\alpha$  and IL-6, the contents of MDA, MPO and Caspase-3 in lung tissue, apoptotic rate were significantly decreased, in dose-dependent manner ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Edaravone has a certain protective effect on smoke inhalation lung injury model rat. It can reduce the production and release of inflammatory mediators and/or cytokines, reduce the peroxide damage and inhibit cell apoptosis in a dose-dependent manner. The effect of atomization inhalation is more obvious than that of intraperitoneal injection.

**KEYWORDS** Atomization inhalation; Intraperitoneal injection; Edaravone; Smoke inhalation lung injury; Dose-effect relationship; Rats; Protective effect; Inflammation factor

近年来有数据显示,各种火灾事故所致死的人员中,有75%被证实合并不同程度的吸入性损伤<sup>[1]</sup>。吸入性损伤是发生在呼吸道及肺实质、因热力和(或)烟雾造成的一种烧伤严重合并症,具有病情危重、发病隐匿等特点<sup>[1]</sup>。研究表明,吸入性肺损伤发病机制较复杂,可能与热力/烟雾等致伤因素激活肺部炎症细胞后分泌某些炎症介质及细胞因子,导致失控性炎症反应发生,产生大量氧自由基,继而启动系统性炎症反应综合征(SIRS)有关,严重时可引发呼吸窘迫综合征(ARDS)以及多器官功能障碍综合征(MODF),严重危害人体健康<sup>[2]</sup>。对于吸入性肺损伤,临床现多采用气管切开及灌洗、机械通气等介入综合治疗措施,但多因治疗费用昂贵、收效甚微而被人们诟病;此外,国内外学者还进行了相关药物的体内研究,但其安全性及有效性欠佳<sup>[3]</sup>。因此,寻找可靠的干预手段以有效减轻吸入性肺损伤的原发性炎

症反应及继发性损害成为当前研究的热点之一。目前,多种抗炎及抗氧化剂被广泛应用于动物研究和临床治疗中,其中依达拉奉是近年来较为常见的一种新型氧自由基清除剂。研究表明,该药可通过抑制脂质过氧化及调节炎症因子分泌、抑制细胞凋亡等途径来发挥神经系统保护作用<sup>[4]</sup>。多项研究表明,依达拉奉在多种原因导致的急性肺损伤中均显示出积极的作用<sup>[5-6]</sup>,但将该药用于改善烟雾吸入性肺损伤,目前国内外报道较少。此外,依达拉奉具有较好的亲脂性,且分子量小,故能较容易地透过细胞膜渗入局部组织器官及动静脉并获得良好的组织及血管内药物浓度<sup>[7]</sup>,加之雾化吸入方式可使药物直达靶器官,因此笔者推测给药方式的改变可能更有利于肺保护。基于此,本研究拟通过早期雾化吸入不同剂量及腹腔注射高剂量依达拉奉对烟雾吸入性肺损伤模型大鼠进行干预,比较两种给药方式对烟雾吸入性

肺损伤的保护作用并探讨其可能机制,以期为临床治疗提供实验依据和新思路。

## 1 材料

### 1.1 仪器

MHY-27127型烟雾发生器(北京美华仪科技有限公司);ABL-800型血气分析仪(丹麦Radiometer公司);PARI Turbo BOY N型系列雾化机(德国PARI GmbH公司);ELX800UV型酶标检测仪(美国BioTek公司);Centrifuge5702型离心机(德国Eppendorf公司);CK40型光学显微镜(日本Olympus公司);KD-BM型生物组织包埋机(浙江金迪科迪仪器设备有限公司);RM2235型石蜡切片机(德国Leica公司)。

### 1.2 药品与试剂

依达拉奉原料药[双鹤药业(商丘)有限责任公司,批号:19042011,纯度:99.7%];苏木精-伊红(HE)染色液(安徽雷根生物技术有限公司,批号:20191010);免疫染色强力通透液、脱氧核糖核苷酸末端转移酶反应液(北京百奥莱博科技有限公司,批号分别为20191008、20191011);大鼠白细胞介素6(IL-6)、IL-10、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、胱天蛋白酶3(Caspase-3)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(美国R&D公司,批号分别为20180505、20180308、20180401、20180305);大鼠丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)、考马斯亮蓝蛋白检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为20171213、20171214、20171212、20171224);TUNEL检测阳性对照制备试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司科技发展公司,批号:20171020);其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

### 1.3 动物

清洁级雄性SD大鼠,60日龄,体质量约200 g,由中国食品药品检定研究院提供,动物生产许可证号:SCXK(京)2017-0005。所有大鼠均饲养于室温22~25℃的环境下,并自由饮食、饮水。适应性喂养1周后,进行后续实验,并于实验前12 h禁食、自由饮水。

## 2 方法

### 2.1 分组、造模与给药

取大鼠30只,采用随机数字表法随机分为5组,即正常对照组(A组)、致伤空白组(B组)、致伤腹腔注射治疗组(C组)和致伤低、高剂量雾化吸入治疗组(D、E组),每组6只。按如下步骤制作烟雾吸入性肺损伤模型:提前在烟雾发生器内放入松木屑,打开电源,发烟15 min,打开致伤室进气口阀门和风扇,当报警器报警后关闭阀门;B、C、D、E组大鼠腹腔注射盐酸氯胺酮(100 mg/kg)进行麻醉后,放入致伤室下层,打开致伤室中间开槽式

拉板,使大鼠吸入烟雾致伤5 min;关闭开槽式拉板,取出大鼠置于空气流通处5 min,当其呼吸和心率接近致伤前水平后再次同法致伤,共重复操作3次,整个致伤过程约持续30 min。A组大鼠除不放松木屑外,其余步骤操作与上述致伤组别相同。

参考相关文献<sup>[8-10]</sup>,将D、E组大鼠的给药剂量分别设定为9、18 mg/kg;参考相关文献<sup>[9-10]</sup>,腹腔注射依达拉奉9 mg/kg效果明显且具有剂量依赖性,故C组选择高剂量18 mg/kg。造模后30 min,C组大鼠腹腔注射依达拉奉18 mg/kg,每间隔70 min重复1次,共4次;D、E组大鼠于自制密闭玻璃箱中分别用雾化机以0.1 mL/min雾化吸入依达拉奉9、18 mg/kg(即将依达拉奉1.8、3.6 mg分别溶于生理盐水1 mL中制成吸入用药液)10 min,每间隔60 min重复1次,共4次;A、B组大鼠不作任何处理。模型制作及给药过程中无大鼠死亡等意外情况发生。

### 2.2 标本采集

各组大鼠末次给药后6 h,用血气针抽取颈动脉血1 mL,用于血气分析;于大鼠正中线剖开胸腹部,取腹主动脉血约5 mL,以3 000 r/min离心15 min后,分离血清,于-20℃冷冻保存,用于TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10含量的检测;取血后,处死大鼠,迅速取出肺脏,选取左肺组织,于-70℃冷冻保存,用于MDA、MPO、SOD、Caspase-3含量的检测;选取右肺后叶组织,置于4%甲醛溶液中固定24 h,用于病理检查和凋亡率检测;选取右肺前叶及中叶组织适量,用于肺湿干比(W/D)及肺组织含水率的检测。

### 2.3 指标检测

2.3.1 血气分析和W/D、肺组织含水率检测 取颈动脉血样本,于取样后30 min内使用血气分析仪进行血气分析,并计算动脉氧合指数[即动脉氧分压和吸入氧浓度比值(PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>)]。取右肺前叶及中叶组织适量,用滤纸拭干表面血渍和污物,称定湿质量,随后于80℃烘烤48 h,再称定干质量,计算W/D和肺组织含水率:W/D=肺湿质量/肺干质量,肺组织含水率=(肺湿质量-肺干质量)/肺湿质量×100%。

2.3.2 血清中IL-6、IL-10、TNF- $\alpha$ 含量检测 取血清标本,采用双抗体夹心ELISA法以酶标仪于450 nm波长处检测各组大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10含量,严格按照各试剂盒说明书操作。

2.3.3 肺组织中MDA、MPO、SOD、Caspase-3含量检测 取左肺组织适量,用滤纸拭干表面血渍和污物,剪碎并充分研磨,按质量体积比1:9的比例加入4℃生理盐水,制备组织匀浆。取匀浆液适量,以考马斯亮蓝蛋

白测定法检测肺组织匀浆液中蛋白的浓度后,分别采用邻联茴香胺供氢法、硫代巴比妥酸法、黄嘌呤氧化酶法、ELISA法以酶标仪于460、532、550、450 nm处检测各组大鼠肺组织中MPO、MDA、SOD、Caspase-3含量,严格按照各试剂盒说明书操作。

2.3.4 肺组织形态学观察 取固定于4%甲醛溶液中的右肺后叶组织适量,依次经脱水、石蜡包埋后切片(厚度约5 μm),再经HE染色后置于显微镜下观察各组大鼠肺组织的病理改变情况。

2.3.5 肺组织细胞凋亡率检测 采用TUNEL法检测。取固定于4%甲醛溶液中的右肺后叶组织适量,依次经脱水、石蜡包埋后切片(厚度约5 μm);进行TUNEL染色,再经免疫染色强力通透液浸泡、冰上促渗2 min后,用磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)冲洗3次;加入脱氧核糖核苷酸末端转移酶反应液适量,于37 °C反应60 min,用PBS冲洗3次。每只大鼠随机选取5个非重叠的高倍镜视野(×400倍)观察,记录凋亡细胞数(凋亡细胞染色后荧光增强)和细胞总数,计算肺组织细胞凋亡率:肺组织细胞凋亡率=肺组织凋亡细胞数/肺组织细胞总数×100%。

## 2.4 统计学方法

采用SPSS 20.0软件对数据进行统计分析。计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,并进行方差齐性(Hartley法)及正态分布(Shapiro-Wilk法)检验。符合正态分布且方差齐时采用方差分析,不符合正态分布且方差不齐时采用非参数检验;组间两两比较采用SNK法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 各组大鼠动脉 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>、W/D 和肺组织含水率比较

与A组比较,B、C、D、E组大鼠动脉 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>均显著降低,W/D和肺组织含水率均显著升高( $P < 0.05$ )。与B组比较,C、D、E组大鼠动脉 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>均显著升高,且D、E组显著高于C组,E组显著高于D组( $P < 0.05$ );肺组织含水率、W/D均显著降低,且D、E组显著低于C组,E组显著低于D组( $P < 0.05$ ),详见表1(表中,1 mmHg=0.133 kPa)。

### 3.2 各组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-10 含量比较

与A组比较,B、C、D、E组大鼠血清中TNF-α、IL-6、IL-10含量均显著升高( $P < 0.05$ )。与B组比较,C、D、E组大鼠血清中IL-10含量均显著升高,且D、E组显著高于C组,E组显著高于D组( $P < 0.05$ );TNF-α、IL-6含量均显著降低,且D、E组显著低于C组,E组显著低于D组( $P < 0.05$ ),详见表2。

表1 各组大鼠动脉 PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>、W/D 和肺组织含水率比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 1 Comparison of arterial PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>, W/D and water content of lung tissue in rats of each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	PaO <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> ,mmHg	W/D,g/g	肺组织含水率,%
A组	419.33±10.19	4.27±0.14	76.52±0.08
B组	289.17±6.49*	8.76±0.15*	88.55±0.02*
C组	301.57±7.59**	7.02±0.14**	85.64±0.05**
D组	316.51±5.99** <sup>Δ</sup>	6.22±0.13** <sup>Δ</sup>	83.92±0.03** <sup>Δ</sup>
E组	354.83±6.62** <sup>Δ</sup> □	5.38±0.11** <sup>Δ</sup> □	81.40±0.35** <sup>Δ</sup> □

注:与A组比较,\* $P < 0.05$ ;与B组比较,\*\* $P < 0.05$ ;与C组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ;与D组比较,□ $P < 0.05$

Note: vs. group A, \* $P < 0.05$ ; vs. group B, \*\* $P < 0.05$ ; vs. group C, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ; vs. group D, □ $P < 0.05$

表2 各组大鼠血清中 TNF-α、IL-6、IL-10 含量比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 2 Comparison of serum contents of TNF-α, IL-6 and IL-10 in rats of each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	TNF-α,pg/mL	IL-6,pg/mL	IL-10,pg/mL
A组	107.79±5.95	139.36±6.03	117.96±4.50
B组	388.74±11.77*	369.14±6.23*	232.28±6.84*
C组	331.58±8.56**	284.25±7.08**	250.68±8.41**
D组	299.65±9.30** <sup>Δ</sup>	214.98±4.14** <sup>Δ</sup>	276.29±8.01** <sup>Δ</sup>
E组	226.75±7.91** <sup>Δ</sup> □	172.12±3.75** <sup>Δ</sup> □	355.51±7.82** <sup>Δ</sup> □

注:与A组比较,\* $P < 0.05$ ;与B组比较,\*\* $P < 0.05$ ;与C组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ;与D组比较,□ $P < 0.05$

Note: vs. group A, \* $P < 0.05$ ; vs. group B, \*\* $P < 0.05$ ; vs. group C, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ; vs. group D, □ $P < 0.05$

### 3.3 各组大鼠肺组织中 MDA、MPO、SOD 含量的比较

与A组比较,B、C、D、E组大鼠肺组织中MDA、MPO含量均显著升高,SOD含量显著降低( $P < 0.05$ )。与B组比较,C、D、E组肺组织中MDA、MPO含量均显著降低,且D、E组显著低于C组,E组显著低于D组( $P < 0.05$ );SOD含量均显著升高,且D、E组显著高于C组,E组显著高于D组( $P < 0.05$ ),详见表3。

表3 各组大鼠肺组织中 MDA、MPO、SOD 含量比较( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 3 Comparison of MDA, MPO and SOD in lung tissue of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	MDA,nmol/mg	MPO,U/g	SOD,U/mg
A组	2.32±0.33	13.19±0.11	360.63±6.13
B组	6.24±0.06*	72.92±0.76*	101.99±2.05*
C组	5.03±0.03**	60.58±0.46**	129.64±3.25**
D组	4.11±0.05** <sup>Δ</sup>	45.99±0.32** <sup>Δ</sup>	149.71±3.09** <sup>Δ</sup>
E组	3.18±0.04** <sup>Δ</sup> □	25.39±1.13** <sup>Δ</sup> □	212.05±3.45** <sup>Δ</sup> □

注:与A组比较,\* $P < 0.05$ ;与B组比较,\*\* $P < 0.05$ ;与C组比较,<sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ;与D组比较,□ $P < 0.05$

Note: vs. group A, \* $P < 0.05$ ; vs. group B, \*\* $P < 0.05$ ; vs. group C, <sup>Δ</sup> $P < 0.05$ ; vs. group D, □ $P < 0.05$

### 3.4 肺组织病理切片观察结果

A组大鼠肺组织未见水肿及出血,肺泡腔结构完整、清晰,壁均匀且光滑,肺泡腔内无炎症细胞浸润;B组大鼠肺组织可见出血及水肿,肺泡结构难以分辨且壁厚,伴有程度不一的萎缩及扩张,腔内可见较多炎症细胞及红细胞浸润;C组大鼠肺泡结构仍不清晰,形状尚不规则、大小不一致,仍有一定程度的萎缩及扩张,肺泡腔内尚有一定数量的炎症细胞及红细胞浸润;D组大鼠肺组织出血、水肿及炎症细胞浸润程度均较C组轻,肺组织轻度水肿、少量出血,肺泡结构清楚、大小较一致、形状较规则;E组大鼠肺组织未见出血,水肿程度较D组进一步减轻,肺泡大小一致、形态较规则,腔内红细胞、炎症细胞浸润程度最轻,详见图1。

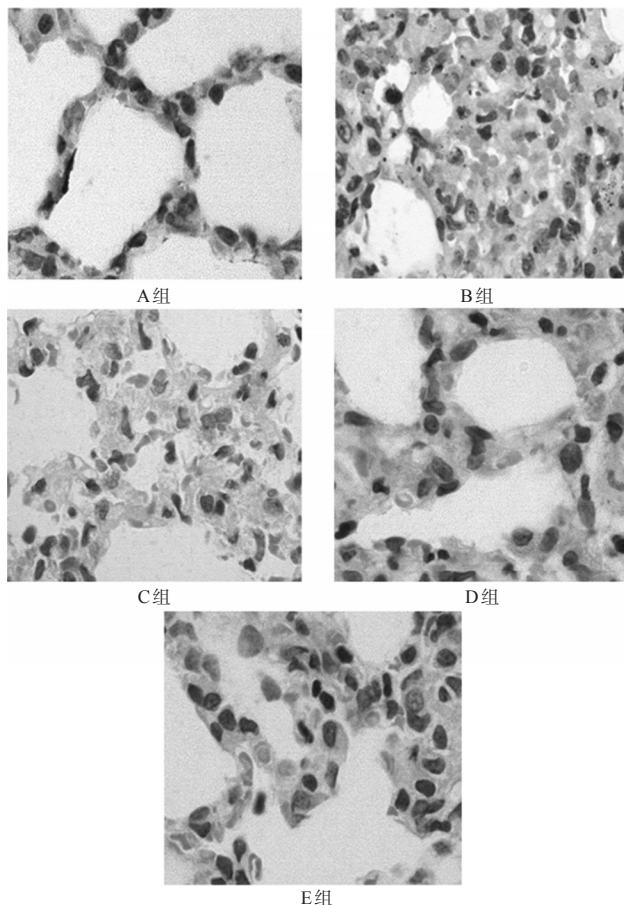


图1 各组小鼠肺组织切片的显微图(HE,×400)

Fig 1 Micrograph of pulmonary tissue slices of mice in each group (HE,×400)

### 3.5 肺组织细胞凋亡率和Caspase-3含量比较

与A组比较,B、C、D、E组大鼠肺组织细胞凋亡率和Caspase-3含量均显著升高( $P<0.05$ );与B组比较,C、D、E组大鼠肺组织细胞凋亡率和Caspase-3含量均显著降低,且D、E组显著低于C组,E组显著低于D组( $P<0.05$ ),详见表4。

表4 各组肺组织细胞凋亡率和Caspase-3含量比较( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Tab 4 Comparison of apoptosis rate and Caspase-3 content in lung tissue of rats in each group( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	肺组织细胞凋亡率,%	Caspase-3, $\mu\text{mol/mL}$
A组	0.49±0.03	5.49±1.04
B组	21.36±0.74*	32.58±1.11*
C组	20.02±0.58**	25.47±1.27**
D组	18.07±0.44** <sup>△</sup>	19.53±1.15** <sup>△</sup>
E组	14.96±0.53** <sup>△□</sup>	13.88±0.88** <sup>△□</sup>

注:与A组比较,\* $P<0.05$ ;与B组比较,\*\* $P<0.05$ ;与C组比较,<sup>△</sup> $P<0.05$ ;与D组比较,<sup>□</sup> $P<0.05$

Note: vs. group A, \* $P<0.05$ ; vs. group B, \*\* $P<0.05$ ; vs. group C, <sup>△</sup> $P<0.05$ ; vs. group D, <sup>□</sup> $P<0.05$

### 4 讨论

严重烧伤发生后,由于患者早期无特异性症状,医护人员往往更加关注其大面积体表烧伤而忽视其呼吸道损伤,一旦错过最佳治疗时机,将极易造成患者肺通气及换气功能共同受损,从而诱发和加重全身多脏器功能障碍,危及其生命<sup>[3]</sup>。尽管目前医疗水平有了较大提高,但对吸入性肺损伤仍缺乏有效的治疗手段<sup>[3]</sup>。如果能及时有效地对吸入性肺损伤进行早期干预、保护脏器组织细胞及功能,无疑对后续治疗具有重要意义。依达拉奉是一种最初应用于神经系统疾病的氧自由基清除剂,有资料显示,该药可通过减少细胞色素聚集、抑制神经细胞凋亡通路的方式来改善缺血性脑损伤导致的神经功能症状<sup>[4,11]</sup>;此外,依达拉奉还可通过减少炎症介质、细胞因子的产生及释放对小肠缺血再灌注及海水淹溺所致肺损伤发挥积极的保护作用<sup>[12-13]</sup>。吸入性肺损伤可诱导并放大炎症反应,启动细胞凋亡程序,造成肺组织细胞凋亡及肺功能障碍,其中所产生的氮、氧自由基(ONOO<sup>-</sup>、·OH等)可使肺组织中脂质及蛋白发生氧化、硝化/亚硝化反应,破坏组织完整性<sup>[1,7,14]</sup>;而依达拉奉可通过把单电子转移给自由基转化为依达拉奉基团的方式来阻断上述过氧化过程<sup>[15]</sup>。此外,依达拉奉亲脂性较好,容易透过细胞膜<sup>[7]</sup>;加之雾化吸入可使药物直达靶器官,故笔者推测该给药方式可能优于临床现有的静脉、肌肉注射。同时,鉴于已有文献<sup>[8-10]</sup>,腹腔注射依达拉奉9 mg/kg即对吸入性肺损伤模型大鼠有肯定的改善作用,且这种作用呈剂量依赖性,因此笔者暂未将腹腔注射依达拉奉9 mg/kg设为阳性对照,而是选择效果更明显的腹腔注射剂量18 mg/kg与雾化吸入(9、18 mg/kg)进行比较,同时通过检测炎症、过氧化、细胞凋亡等相关指标来探索其治疗大鼠吸入性肺损伤的机制。

本研究病理切片结果显示,致伤后,大鼠肺组织水

肿明显,腔内可见炎症细胞浸润、转移,表示烟雾吸入性肺损伤模型建立成功。经药物干预后,各药物组大鼠肺损伤均有不同程度的改善,肺组织充血水肿减轻,毛细血管通透性降低,炎症细胞数量减少,且有剂量依赖趋势。这表明,与依达拉奉腹腔注射比较,雾化吸入方式给药可更有效地减轻模型大鼠肺水肿及炎症反应,且高剂量效果更好。

烟雾、热力等致伤因素损伤呼吸道后可致肺部单核巨噬细胞过度活化,产生及释放大量炎症介质及促炎因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6等),启动炎症反应,导致肺组织水肿,造成肺血流比例失常,使组织缺少充分的灌注及氧合,从而加重肺水肿与气道梗阻,形成恶性循环<sup>[14,16]</sup>。其中,TNF- $\alpha$ 是重要的促炎因子,不仅可增加外周血中多形核白细胞(PMN)的趋化能力,还可促使骨髓白细胞被释放至循环系统,活化血管内皮细胞,从而启动、延续、放大局部及全身炎症反应;TNF- $\alpha$ 激活内皮细胞后,后者进一步诱导多种炎症细胞分泌IL-6等细胞因子,加重肺水肿及炎症反应程度<sup>[17]</sup>。IL-6是炎症细胞调控因子,当急性肺损伤发生后,其外周血含量非常高,并可大量活化炎症细胞、上调黏附分子及其他细胞因子水平,产生级联“瀑布”效应,进一步加强炎症反应。TNF- $\alpha$ 、IL-6能较好地体现肺组织的损伤程度,是炎症性疾病中多脏器功能衰竭及死亡的重要标志,故可将其作为评价肺损伤治疗效果的可靠指标<sup>[18]</sup>。IL-10是一种可拮抗多种炎症介质和细胞因子对组织破坏作用的重要抗炎因子。炎症反应发生后,体内多种免疫细胞被激活,合成并分泌IL-10,其可抑制单核巨噬细胞和PMN分泌并释放TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-2,对炎症反应中的器官组织有积极的保护作用<sup>[19]</sup>。有研究表明,依达拉奉可以明显减轻重度烫伤大鼠肺部炎症反应,显著改善肺水肿及氧合情况<sup>[20]</sup>。另有报道称,吸入性肺损伤大鼠腹腔注射依达拉奉,可减少炎症介质的产生及释放,减轻肺水肿程度,提高动脉氧分压<sup>[10]</sup>。基于此,本研究通过检测动脉PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>、W/D、肺组织含水率来评估大鼠肺组织炎症反应后其肺水肿及肺微血管损伤的情况,通过检测TNF- $\alpha$ 、IL-6含量来反映其肺组织炎症反应的严重程度,通过测定血清中IL-10的含量来间接反映其机体抗炎能力。结果显示,B、C、D、E组大鼠动脉PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>均较A组显著降低,W/D、肺组织含水率以及血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10含量均较A组显著升高(其中B组IL-10含量也升高的原因可能与吸入性肺损伤发生早期致伤因素可活化多种免疫细胞,使机体自身抗炎能力得到一定程度的改善有关<sup>[19]</sup>);经药物干预后,C、D、E组大鼠动脉PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub>、血清中IL-10含量均较B组显著升高,W/D、肺组织含水率

以及血清中IL-6、TNF- $\alpha$ 含量均较B组显著降低,且呈剂量依赖性。这提示在烟雾吸入致肺损伤中,雾化吸入较腹腔注射依达拉奉能更有效地减轻模型大鼠肺水肿、改善氧合、降低炎症及细胞因子水平,且在一定范围内用药剂量越高效果越好。

在正常生理状态下,SOD广泛分布在机体各个组织器官内,其作用为抑制化学性趋化因子活化、阻断炎症通路,是反映机体清除氧自由基能力的可靠指标;MDA是脂质过氧化反应的重要产物之一,其水平高低反映了氧自由基攻击组织细胞的严重程度及体内氧自由基的水平;MPO可反映组织细胞内中性粒细胞浸润的严重程度<sup>[21-22]</sup>。林思宁等<sup>[15]</sup>报道,依达拉奉可有效提高颅脑创伤后脑组织中SOD的含量,降低MDA、MPO的含量。本研究结果显示,与A组比较,B、C、D、E大鼠肺组织中MPO、MDA含量均显著升高,SOD含量均显著降低,提示模型大鼠氧化/抗氧化系统失衡;经药物干预后,C、D、E组大鼠肺组织中MPO、MDA含量均显著降低,SOD含量均显著升高,且呈剂量依赖性。这提示给药后模型大鼠抗氧化能力增强,且对于烟雾吸入性肺损伤,雾化吸入较腹腔注射依达拉奉的抗氧化作用更明显,且存在一定的量效关系。

烟雾吸入性损伤发生后,局部炎症细胞释放TNF- $\alpha$ 、IL-6和大量自由基,导致胞膜钙失衡,细胞色素C等凋亡启动因子自细胞线粒体中释放,诱发Caspases的级联反应,最终使下游凋亡执行因子Caspase-3激活,从而诱发广泛的细胞凋亡,使肺损伤进一步加重<sup>[23-24]</sup>。Caspase-3标志着细胞凋亡进入不可逆的阶段,故检测肺组织细胞凋亡率及其中Caspase-3的含量可反映吸入性损伤肺组织的细胞凋亡情况<sup>[25]</sup>。有研究表明,对于脂多糖导致的肺损伤,依达拉奉可通过下调Caspase-3的表达来有效抑制大鼠肺组织细胞凋亡<sup>[26]</sup>。本研究结果表明,与A组比较,B、C、D、E组大鼠肺组织细胞凋亡率和Caspase-3含量均显著升高;经药物干预后,C、D、E组大鼠肺组织上述指标均较A组显著降低,且上述变化E组>D组>C组。这提示对于吸入性肺损伤,依达拉奉具有明显的抗凋亡作用,且高剂量雾化吸入效果较好。

综上所述,依达拉奉对烟雾吸入性肺损伤模型大鼠具有一定的保护作用,可剂量依赖性地减少炎症介质和(或)细胞因子的产生及释放、减轻过氧化损伤并抑制细胞凋亡,且雾化吸入较腹腔注射给药的效果更明显。但因条件所限,有关依达拉奉对于吸入性肺损伤在抗炎、抗氧化、抗凋亡等方面的具体作用机制及相互关联尚未完全阐明;另外,临床治疗所需具体剂量、浓度及给药方式的优劣等还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] TAN A, SMAILES S, FRIEBEL T, et al. Smoke inhalation increases intensive care requirements and morbidity in paediatric burns[J]. *Burns*, 2016, 42(5):1111-1115.
- [2] YANG T, ZHANG J, SUN L, et al. Combined effects of a neutrophil elastase inhibitor (sivelestat sodium) and a free radical scavenger (edaravone) on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats[J]. *Inflamm Res*, 2012, 61(6):563-569.
- [3] 冯胜娟, 贾赤字, 刘真, 等. 重度烟雾吸入性损伤发病机制及治疗研究进展[J]. *中华烧伤杂志*, 2016, 32(2):122-125.
- [4] LIN H, MA X, WANG BC, et al. Edaravone ameliorates compression-induced damage in rat nucleus pulposus cells[J]. *Life Sci*, 2017. DOI:10.1016/j.lfs.2017.09.024.
- [5] ZHANG Z, LUO Z, BI A, et al. Compound edaravone alleviates lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2017. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.05.047.
- [6] UCHIYAMA M, TOJO K, YAZAWA T, et al. Edaravone prevents lung injury induced by hepatic ischemia-reperfusion[J]. *J Surg Res*, 2015, 194(2):551-557.
- [7] ZHENG J, CHEN X. Edaravone offers neuroprotection for acute diabetic stroke patients[J]. *Ir J Med Sci*, 2016, 185(4):819-824.
- [8] 肖长栓, 刘群, 张建明, 等. 依达拉奉对吸入性肺损伤大鼠肺保护作用的实验研究[J]. *天津医科大学学报*, 2013, 19(2):101-103.
- [9] KOIZUMI T, TANAKA H, SAKAKI S, et al. The therapeutic efficacy of edaravone in extensively burned rats[J]. *Arch Surg*, 2006, 141(10):992-995.
- [10] 王正冠, 李芮冰, 徐舒敏, 等. 葛根素联合依达拉奉对烟雾所致吸入性肺损伤大鼠的治疗作用[J]. *解放军医学杂志*, 2015, 40(1):66-70.
- [11] 曹籍文, 黄云丽, 陈君. 依达拉奉腹腔注射对大鼠缺血性脑损伤的治疗作用及其机制探讨[J]. *山东医药*, 2019, 59(30):8-12.
- [12] 陈卓, 山洪, 李宏. 依达拉奉对海水淹溺性大鼠急性肺损伤治疗作用的影响[J]. *中国医药导报*, 2019, 16(23):16-20.
- [13] 邹锋, 郭乃良, 马国平, 等. 依达拉奉对大鼠小肠缺血-再灌注所致肺损伤的保护作用[J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(4):374-376.
- [14] SUN GZ, GAO FF, ZHAO ZM, et al. Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis in the penumbra aggravates secondary damage in rats with traumatic brain injury[J]. *Neural Regen Res*, 2016, 11(8):1260-1266.
- [15] 林思宁, 李建民, 刘俊杰, 等. 依达拉奉对大鼠颅脑创伤后神经元凋亡的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2018, 53(5):676-679.
- [16] 付忠华, 江政英, 孙威, 等. 雾化吸入重组人角质细胞生长因子2对重度烟雾吸入性损伤兔肺组织的作用[J]. *中华烧伤杂志*, 2018, 34(7):466-475.
- [17] STROMPS JP, FUEHS P, DEMIR E, et al. Intraalveolar TNF- $\alpha$  in combined burn and inhalation injury compared with intra alveolar interleukin-6[J]. *J Burn Care Res*, 2015, 36(2):e55-e61.
- [18] 王大为, 刘琪, 陈兴, 等. 富氢生理盐水对烟雾吸入所致大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. *山东医药*, 2014, 54(2):20-22.
- [19] SAWADA H. Clinical efficacy of edaravone for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2017, 18(7):735-738.
- [20] FANG Y, FU XJ, GU C, et al. Hydrogen-rich saline protects against acute lung injury induced by extensive burn in rat model[J]. *J Burn Care Res*, 2017, 32(3):82-89.
- [21] QIN T, LEI LY, LI N, et al. Edaravone improves survival and neurological outcomes after CPR in a ventricular fibrillation model of rats [J]. *Am J Emerg Med*, 2016, 34(10):1944-1949.
- [22] 李开智, 杨森林, 姜晖, 等. 依达拉奉对心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的抑制作用及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(1):13-20.
- [23] GUO Y, YOU Y, LV D, et al. Inducible nitric oxide synthase contributes to insulin resistance and cardiac dysfunction after burn injury in mice[J]. *Life Sci*, 2019. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.116912.
- [24] 曹丽萍, 温彦芳, 曹昌魁, 等. 血必净对百草枯中毒大鼠肺组织 Caspase-3 表达及血浆炎症因子的影响[J]. *中华急诊医学杂志*, 2018, 27(10):1121-1125.
- [25] JEDDI S, ZAMAN J, ZADEH-VAKILI A, et al. Involvement of inducible nitric oxide synthase in the loss of cardioprotection by ischemic postconditioning in hypothyroid rats[J]. *Gene*, 2016, 580(2):169-176.
- [26] 刘月英, 郭究民, 李波, 等. 依达拉奉对急性肺损伤大鼠肺组织凋亡的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2017, 34(37):4482-4484.

(收稿日期:2020-07-16 修回日期:2020-11-03)

(编辑:张元媛)