

吗啡胸段硬膜外给药对急性心肌缺血诱发大鼠肺组织肿瘤坏死因子- α 表达的影响

周日华 郭政

【摘要】 目的 观察急性心肌缺血大鼠肺组织中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的表达变化以及吗啡硬膜外给药的干预效应。**方法** 将健康成年雄性 SD 大鼠 18 只随机分为假手术组(S 组)、结扎冠状动脉(冠脉)缺血组(CAO 组)和吗啡预处理组(M 组),每组 6 只。S 组动物仅开胸,不结扎左冠脉前降支;CAO 组动物开胸后结扎左冠脉前降支;M 组动物在结扎左冠脉前降支前 15 min 经硬膜外注射吗啡 60 μ g/kg。各组在开胸或扎闭左冠脉前降支后 3 h 开胸取右肺下叶,采用免疫组化、酶联免疫吸附法(ELISA)检测肺组织中 TNF- α 表达变化。**结果** 免疫组化结果显示,与 S 组比较($8.68 \pm 0.29, 1.609 \pm 0.050$),CAO 组($24.55 \pm 6.25, 1.844 \pm 0.027$)和 M 组($11.60 \pm 1.21, 1.733 \pm 0.027$)气管 TNF- α 阳性单位及平均吸光度(A)值均明显升高,而 M 组较 CAO 组明显降低,差异均有统计学意义(P 均 < 0.01)。ELISA 结果显示;CAO 组(221.58 ± 5.23 ng/L)和 M 组(103.45 ± 4.56 ng/L)肺组织 TNF- α 阳性免疫反应物质的表达水平均高于 S 组(47.14 ± 1.36 ng/L),且 M 组显著低于 CAO 组(P 均 < 0.01)。**结论** 急性心肌缺血能通过神经机制介导肺脏 TNF- α 表达上调;阿片类物质及其受体机制参与了机体内心脏伤害性神经信号转导的调节。

【关键词】 吗啡; 肿瘤坏死因子- α ; 心肌缺血,急性; 肺

Effects of epidurally administration of morphine at thoracic level on expression of tumor necrosis factor- α in the lungs in acute myocardial ischemia in rats ZHOU Ri-hua, GUO Zheng. Department of Anesthesiology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China
Corresponding author: GUO Zheng (Email: guozheng713@yahoo.com)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in lungs following coronary artery occlusion (CAO) and the effect of morphine pretreatment via epidural administration on its expression in the rats. **Methods** Eighteen adult healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham operation group (S group), CAO group and morphine pretreatment group (M group), with 6 in each group. In S group the left anterior descending branch of coronary artery was not occluded. In CAO group the left anterior descending branch of coronary artery was occluded. In M group the rats were pre-treated with morphine 60 μ g/kg by epidural injection 15 minutes before CAO. The right lung was harvested 3 hours after CAO. The expression of TNF- α in lungs was assessed with immunohistochemistry and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The immunohistochemistry results showed, compared with S group ($8.68 \pm 0.29, 1.609 \pm 0.050$), the positive unit and average light density of TNF- α in CAO group ($24.55 \pm 6.25, 1.844 \pm 0.027$) and M group ($11.60 \pm 1.21, 1.733 \pm 0.027$) were higher significantly, while they were lower significantly in M group compared with CAO group (all $P < 0.01$). ELISA results showed the level of TNF- α in the lung was significantly higher in CAO group (221.58 ± 5.23 ng/L) and M group (103.45 ± 4.56 ng/L) than that in S group (47.14 ± 1.36 ng/L), while it was significantly lower in M group compared with CAO group (all $P < 0.01$). **Conclusion** Acute myocardial ischemia could cause up-regulation of TNF- α in lungs, which is likely to be mediated by neural mechanisms. Opioid and its receptors in spinal cord might be involved in modulation of inflammatory reaction in the lung after acute coronary ischemia.

【Key words】 morphine; tumor necrosis factor- α ; acute myocardial ischemia; lung

急性心肌缺血是致残率和病死率较高的心脏

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30471656)

作者单位:030001 山西太原,山西医科大学第二医院麻醉科,山西医科大学麻醉学系

通信作者:郭政,医学博士,教授,主要从事伤害性刺激信号传导与器官损伤的研究,Email:guozheng713@yahoo.com

作者简介:周日华(1979-),女(汉族),山西省人,医学硕士,医师,现在北京航天总医院麻醉科工作,Email:rihuazhou7879@yahoo.com.cn.

病,缺血伤害性刺激通过心肌局部感受器传入中枢神经系统,同时可能通过复杂的周围和中枢神经机制,引起远隔器官如肺脏的异常神经活动,甚至诱发组织损伤。肿瘤坏死因子- α (TNF- α)作为一种作用广泛的促炎症细胞因子,其生物活性广泛,与炎症关系密切^[1],也可诱导动物出现急性肺损伤(ALI)^[2]。Groban 等^[3]研究发现,鞘内小剂量应用吗啡可以削弱交感传入和传出神经活性,减轻心肌缺血时的应

激反应损伤。心和肺在胸 1~5 段(T1~5)具有相同的交感神经传导通路,那么吗啡硬膜外干预是否可以减轻心肌缺血时的肺损伤目前尚不清楚。本研究中采用急性心肌缺血动物模型,观察吗啡硬膜外给药对急性心肌缺血诱发大鼠肺脏 TNF- α 表达的干预效应,探讨神经机制在器官损伤及保护中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂: TNF- α 一抗(Neuromics, 美国), 链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶(SABC)免疫组化染色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒(北京中山生物技术公司), TNF- α 酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(R&D Systems, Inc, 美国)。

1.2 动物分组及心肌缺血模型制备: 健康成年雄性 SD 大鼠 18 只(由山西医科大学动物中心提供), 体重(250 $\pm$ 20)g。按随机数字表法分为假手术组(S 组)、结扎冠状动脉(冠脉)缺血组(CAO 组)和硬膜外吗啡预处理组(M 组), 每组 6 只。腹腔注射乌拉坦麻醉大鼠, 气管切开插管行人工机械通气(呼吸频率 70 次/min, 潮气量 8 ml/kg)。开胸暴露心脏, 切开心包, 以左冠状静脉主干为标志, 在左心耳下方 2 mm 处进针, 用 6-0 手术线穿过心肌表层肌肉, 在肺动脉圆锥旁出针, 结扎左冠脉前降支后计时 3 h(S 组仅开胸不结扎冠脉; M 组在结扎左冠脉前降支前 15 min 经硬膜外注射吗啡 60 μ g/kg)。结扎后心肌变为暗红色, 心电图出现 ST-T 改变, 证明结扎成功, 逐层关胸, 负压吸引, 大鼠脱离呼吸机后即刻恢复自主呼吸。

1.3 硬膜外置管: 异戊巴比妥(40 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠, 分离寰枕关节前膜, 暴露硬膜外腔, 将前端直径 0.61 mm 的 PE-10 管送入硬膜外腔约 3 cm 至 T2~3 椎间隙水平并固定。硬膜外置管成功的标志: ①动物苏醒后肢体运动正常, 表明在置管过程中没有明显的脊髓或神经损伤; ②硬膜外注入利多卡因后大鼠前肢肌力减退, 胸段痛觉减退或者消失; 后肢无明显异常。

1.4 TNF- α 的检测: 结扎后 3 h 给动物注射超量麻醉药, 再次开胸, 取动物右肺下叶制备免疫组化和 ELISA 标本。

1.4.1 免疫组化实验: 将部分肺组织置多聚甲醛水溶液中固定 3 h, 然后移入蔗糖溶液中脱水 72 h, 包埋、连续冠状冰冻切片, 片厚 8 μ m, 采用 SABC 进行免疫组化染色, DAB 显色。显微镜下随机观察气管、肺泡 10 个高倍视野($\times 40$), 用显微图像分析系统进

行 TNF- α 平均吸光度(A)和阳性单位半定量分析。

1.4.2 ELISA 实验: 取各组右肺下叶 50 mg, 分别置于 1.5 ml 微量离心管(EP 管)中, 加入裂解液[0.5 mol/L NaCl、50 mmol/L 4-羟乙基哌嗪乙磺酸(HEPES)、1%细胞裂解液(NP40)、1 g/L 亮抑肽酶(Leupeptin)] 500 μ l, 用超声波细胞粉碎机匀浆, 4 $^{\circ}$ C 下 10 000 $\times$ g, 离心 20 min, 取上清液, 采用双抗体夹心 ELISA 测定 TNF- α 浓度。

1.5 统计学处理: 应用 SPSS 13.0 软件, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 组间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 免疫组化结果(彩色插页图 1; 表 1): 在 CAO 组气管的内膜、肺泡 I 型细胞及血管内皮细胞中 TNF- α 呈棕黄色阳性表达。与 S 组比较, CAO 组、M 组气管 TNF- α 阳性单位和 A 值均升高(P 均 <0.01); 与 CAO 组比较, M 组气管 TNF- α 阳性单位和 A 值均显著降低(P 均 <0.01)。

表 1 各组大鼠气管中 TNF- α 表达的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	TNF- α 阳性单位	TNF- α A 值
S 组	6	8.68 $\pm$ 0.29	1.609 $\pm$ 0.050
CAO 组	6	24.55 $\pm$ 6.25 ^a	1.844 $\pm$ 0.027 ^a
M 组	6	11.60 $\pm$ 1.21 ^{ab}	1.733 $\pm$ 0.027 ^{ab}

注: 与 S 组比较, ^a $P<0.01$; 与 CAO 组比较, ^b $P<0.01$

2.2 ELISA 检测结果: 各组 TNF- α 阳性免疫反应物质的表达变化趋势同免疫组化结果, 其中 CAO 组、M 组均显著高于 S 组[(221.58 $\pm$ 5.23)ng/L、(103.45 $\pm$ 4.56)ng/L 比 (47.14 $\pm$ 1.36)ng/L, P 均 <0.01], M 组显著低于 CAO 组($P<0.01$)。

3 讨论

TNF- α 主要由激活的单核/巨噬细胞产生, 是一种具有多种生物活性的多肽促炎症细胞因子。研究显示: TNF- α 在急性心肌梗死、慢性心力衰竭、心脏移植排斥反应及体外循环手术中是心肌损伤的重要介质^[4]。本课题组前期的研究结果表明, 急性心肌缺血可诱发大鼠心肌 TNF- α 表达增多^[5]。TNF- α 是肺组织产生炎症反应的重要细胞因子, 主要以旁分泌(细胞-细胞)和自分泌的方式释放, 在局部组织、器官内产生生物作用, 既是炎症反应的原因, 又是炎症反应的结果^[6]。TNF- α 的大量释放与 ALI/急性呼吸窘迫综合征(ARDS)发病密切相关^[7]。TNF- α 在神经系统活动中也发挥重要的作用, 是神经内分泌系统和免疫系统共同的化学语言, 是传递信息、调

节机体反应的重要信使。

心肌缺血时,心脏组织的伤害性信息沿交感神经和迷走神经中感觉传入纤维传入脊髓背角和延髓,在此交换神经元后上传,并且诱发神经系统反应,如交感神经系统活动增强^[8]。心肌缺血、缺氧后心脏痛信号的传递可能主要通过交感传入神经的心中和心下神经投射到脊髓 T1~5 节段后根外侧部,而肺脏在脊髓 T1~5 节段与心脏具有相同的传导通路,这就为心脏的伤害性刺激向肺脏传导奠定了神经源性解剖学基础。结扎大鼠左冠脉前降支可致大鼠急性心肌缺血,由于缺血区心肌血流中断,因缺血产生的有害化学介质很少进入血流到肺脏,因此本研究中,急性心肌缺血可能通过复杂的神经活动即神经源性机制引起肺内感觉神经释放 TNF- α 增多;同时也可能存在通过神经调节下的组织反应,引起肺组织内 TNF- α 的分泌。

吗啡作为中枢性镇痛药,不仅可以作用于中枢神经系统的阿片受体产生镇痛作用,在外周对机体的心血管、呼吸、免疫、部分神经内分泌功能等都具有明显的调节作用^[9]。外源性吗啡可抑制心肌缺血诱发的 Pf 神经元 μ -1 受体 mRNA 表达上调,提示外源性吗啡可能通过作用于丘脑以下中枢神经系统特异性受体,阻遏心肌缺血伤害性刺激信息的上传^[10]。实验证明采用离子导入吗啡于脊髓胶质区,可抑制伤害性刺激引起的背角神经元放电。Suzuki 等^[11]采用电生理学方法证实,鞘内应用吗啡能剂量依赖性地使神经痛大鼠脊髓背角神经元的反应性减弱,故认为鞘内应用吗啡是治疗疼痛的有效途径。

本研究中发现,预先经大鼠胸段硬膜外间隙使用吗啡,使之与阿片受体结合,阻断心肺共同传导通路 T1~5 节段躯体神经和交感神经传入和传出纤维的兴奋传导,从而减轻急性心肌缺血诱发的肺脏 TNF- α 表达上调。该结果提示,结扎冠脉诱发的肺脏 TNF- α 表达上调是由神经机制所介导的;并且阿

片类物质及其受体机制参与了机体内脏伤害性神经信号对肺组织 TNF- α 表达上调的调节作用。该研究结果可能对探讨器官损伤及保护和多器官损伤及保护机制具有意义,并且对临床治疗提供参考信息。

参考文献

[1] 孙耕耘,毛宝龄,吕宝璋. 白细胞介素-1、肿瘤坏死因子与炎症[J]. 生理科学进展,1993,24(1):23-26.
[2] Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, et al. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema, comparison to septic acute lung injury[J]. Am Rev Respir Dis, 1988,137(6):1364-1370.
[3] Groban L, Vernon JC, Butterworth J. Intrathecal morphine reduces infarct size in a rat model of ischemia-reperfusion injury[J]. Anesth Analg, 2004,98(4):903-909.
[4] Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Cain BS, et al. Increased myocardial tumor necrosis factor-alpha in a crystalloid-perfused model of cardiac ischemia-reperfusion injury[J]. Ann Thorac Surg, 1998,65(2):439-443.
[5] 朱燕兰,郭政. 结扎大鼠冠状动脉对心肌和背根神经节内肿瘤坏死因子- α 表达的影响[J]. 中国危重病急救医学,2007,19(11):657-661.
[6] O'Grady NP, Preas HL, Pugin J, et al. Local inflammatory responses following bronchial endotoxin instillation in humans[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(7): 1591-1598.
[7] 朱桂军,刘俊峰,于占彪,等. 二烯丙基三硫对急性肺损伤小鼠肿瘤坏死因子- α 表达及核转录因子- κ B 活性的影响[J]. 中国危重病急救医学,2007,19(4):205-208.
[8] Armour JA, Huang MH, Pelleg A, et al. Responsiveness of in situ canine nodose ganglion afferent neurones to epicardial mechanical or chemical stimuli[J]. Cardiovasc Res, 1994, 28(8):1218-1225.
[9] 张林忠,郭政. 吗啡预先给药对急性心肌缺血大鼠心肌 NF- κ B 水平的影响[J]. 中华麻醉学杂志,2005,25(9):695-696.
[10] 温建忠,郭政. 吗啡预先给药对急性心肌缺血大鼠丘脑旁核神经元 μ -1 受体 mRNA 表达的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2005,25(11):862-863.
[11] Suzuki R, Chapman V, Dickenson AH. The effectiveness of spinal and systemic morphine on rat dorsal horn neuronal responses in the spinal nerve ligation model of neuropathic pain[J]. Pain, 1999,80(1-2):215-228.

(收稿日期:2008-02-21 修回日期:2008-08-10)

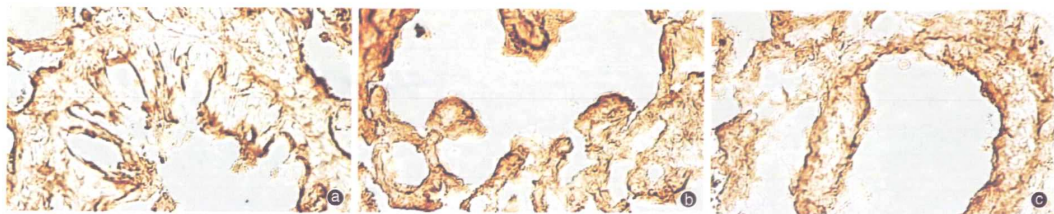
(本文编辑:李银平)

中国科技信息研究所 2008 年版《中国科技期刊引证报告》(核心版)
——基础医学、医学综合类和中医学与中药学类影响因子前 10 位排序表

基础医学、医学综合类			中医学与中药学类		
期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	影响因子	排位
中华医院管理杂志	1.342	1	中国中西医结合杂志	0.817	1
中国危重病急救医学	1.208	2	中国中西医结合急救杂志	0.797	2
医学研究生学报	0.858	3	中国中药杂志	0.693	3
ASIAN JOURNAL OF ANDROLOGY	0.847	4	中西医结合学报	0.674	4
中华医学杂志	0.820	5	中草药	0.531	5
细胞与分子免疫学杂志	0.773	6	北京中医药大学学报	0.491	6
中华病理学杂志	0.756	7	中药新药与临床药理	0.440	7
生理学报	0.744	8	上海中医药大学学报	0.433	8
CHINESE MEDICAL JOURNAL	0.734	9	中华中医药杂志	0.414	9
医疗卫生装备	0.683	10	世界科学技术-中医药现代化	0.397	10

吗啡胸段硬膜外给药对急性心肌缺血诱发大鼠肺组织
肿瘤坏死因子- α 表达的影响

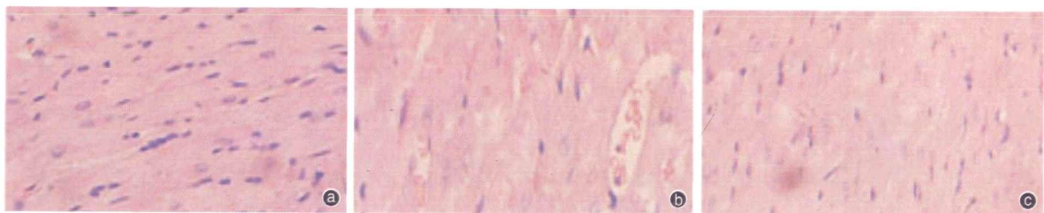
(正文见707页)



①:气管; ②:肺泡; ③:血管
图1 光镜下观察CAO组大鼠肺组织中TNF- α 的表达(DAB, $\times 40$)

胰岛素强化治疗对烫伤大鼠心肌细胞作用的初步研究

(正文见724页)



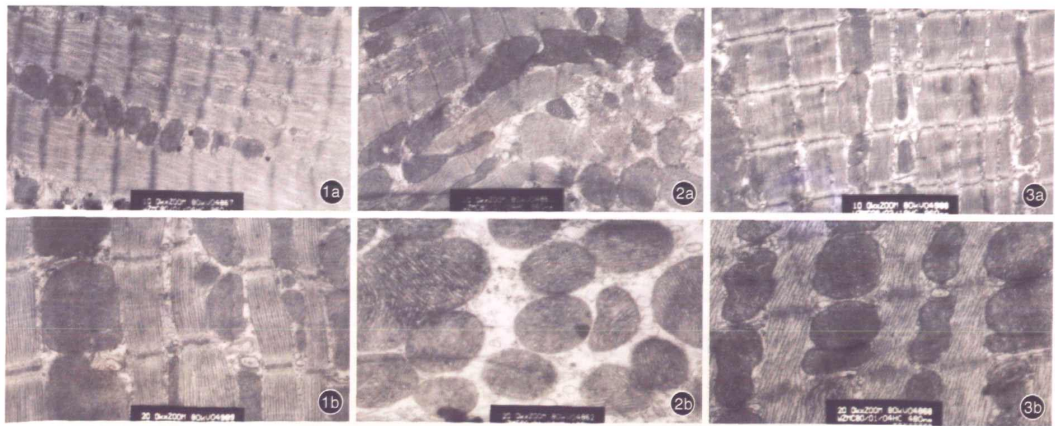
①:假伤组; ②:烫伤组; ③:强化组
图1 光镜下观察各组大鼠左室组织常规病理学改变(HE, $\times 200$)



①:假伤组; ②:烫伤组; ③:强化组
图2 光镜下观察各组大鼠左室组织超微病理学改变($\times 20\ 000$)

乌司他丁对大鼠心肺复苏后心肌损伤的保护作用

(正文见730页)



1:对照组; 2:复苏组; 3:药物组; ①: $\times 10\ 000$; ②: $\times 20\ 000$
图1 透射电镜下观察各组大鼠CPR后心肌组织病理学改变