

A2a 受体激动剂联合 LPD 对大鼠供肺组织病理结构的影响

蒋德英¹, 彭雪梅¹, 易艳萍¹, 卢春英¹, 席露²

(1. 暨南大学第一附属医院麻醉科, 广东 广州 510630;

2. 广州医学院第三附属医院麻醉科, 广东 广州 510140)

【摘要】 目的 观察 A2a 受体激动剂联合低钾右旋糖苷(LPD)对大鼠供肺组织病理学结构的影响, 探讨 A2a 受体激动剂在供肺组织中的保存作用。方法 选择 20 只健康雄性 SD 大鼠, 体重为 350 g 左右, 采用随机数字表法分为两组($n=10$), L 组大鼠供肺组织采用常温 LPD 液进行肺灌注, LC 组则在 L 组的灌注液及保存液中加入 A2a 受体激动剂 CGS21680 液, 灌注肺离体后置于 4℃ 相应组的保存液里保存 6 h 后, 取两组移植肺组织行光镜下病理学观察并进行积分计算和统计学分析。结果 肺组织炎症渗出积分方面 LC 组为 3.5 分, 低于 L 组的 9.5 分, 两组比较差异有统计学意义($P<0.05$); 肺组织病理评分总分方面, L 组为(10.67±1.63)分, LC 组为(7.50±1.22)分, 两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 A2a 受体激动剂可减少供体肺组织炎症细胞浸润程度, 提高 LPD 液对供肺组织保存效果。

【关键词】 A2a 受体激动剂; LPD 液; 病理学结构; 肺组织

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2015)15-2193-03

Effect of A2a receptor agonist combined with low potassium dextran on the pathological structure of donor lung tissues in rats. JIANG De-ying¹, PENG Xue-mei¹, YI Yan-ping¹, LU Chun-ying¹, XI Lu². 1. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Jinan University, Guangzhou 510630 Guangdong, CHINA; 2. Department of Anesthesiology, the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510140, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To observe the effects of A2a receptor agonist combined with low potassium dextran (LPD) on the pathological structure of donor lung tissues in rats, and to investigate the preservation of A2a receptor agonist in donor lungs tissues. **Methods** Twenty healthy male Sprague-Dawley rats, weighing about 350 g, were randomly divided into two groups: L group ($n=10$, the rats' donor lung tissues were primed with LPD solution at room temperature) and LC group ($n=10$, the perfusion and preservation solution were added with A2a receptor CGS21680 based on that of L group). The primed lung was preserved *in vitro* for 6 hours in the solutions of the corresponding group at 4℃. The transplanted lung tissues were collected and observed under microscope for pathological changes. **Results** The integral term of lung tissue inflammation of LC group (3.5 points) was significantly lower than that of L group (9.5 points), and the difference was statistically significant ($P<0.05$). The total pathological score of lung tissue was (10.67±1.63) points in L group and (7.50±1.22) points in LC group, with statistically significant difference ($P<0.05$). **Conclusion** Adenosine A2a receptor can reduce the inflammatory cells' infiltration in lung tissue of donor and improve preservation of the LPD solution for rat lung.

【Key words】 A2a receptor agonist; Low potassium dextran (LPD); Pathological structure; Lung tissue

肺是人体与外界大气相通的器官, 受外界环境污染大, 细菌感染机会多, 一个活肺保鲜期不超过五六个小时, 且活肺来源有限, 于是安全有效的器官保存是肺移植成功的先决条件, 供肺保存液的研究成为肺移植界的一项重要课题。理想的肺灌注保存液是能防止保存期内肺炎症渗出, 抑制肺细胞组织的水肿, 并为肺保存期间提供必要的能量供

给。目前广泛用于临床的供肺保存液是以低钾右旋糖酐溶液(Low potassium dextran, LPD)^[1]为代表的细胞外液型保存液, 但 LPD 液对保存供肺期缺血再灌注损伤的抗炎、抗炎症细胞浸润的能力较差^[2]。近期研究表明腺苷 A2a 受体能抑制中性粒细胞的炎症浸润, 抑制炎症因子分泌而起到抗炎作用^[3]。本研究拟在 LPD 保存液的基础上加入 A2a 受体激动

剂 CGS21680, 从病理组织结构改变方面观察其对供肺的保存作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物 本实验遵守广东省实验动物饲养和使用规定, 实验动物为雄性 SD 大鼠 20 只, 体重(300±25.12) g, 由广州中医药大学动物实验中心提供, 实验场所为暨南大学动物实验中心。

1.2 器官灌注液和保存液 LPD 液购于 Perfadex, Sweden; A2a 受体激动剂 CGS21680 液购于 slkchem 公司(美国)。

1.3 动物模型分组与建立 采用数字随机法将 SD 大鼠分为 L 组和 LC 组, 每组 10 只。L 组的肺灌注液和离体肺保存液均为 LPD 液; LC 组是肺灌注液和保存液为 LPD 液加入 A2a 受体激动剂 CGS21680 液(0.1 mg/kg)的混合液。参照 Fischer 等^[4]方法建立肺灌注模型^[5]。动物先称重量, 于大鼠腹腔内注射 3% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉后, 行气管切开插管, 接 DW2000 型动物呼吸机, 呼吸机参数设置为潮气量为 2.5 ml/100 g, 吸呼比为 1:2, 通气频率为 60 次/min, 术中持续机械通气。正中开胸游离上、下腔静脉, 经下腔静脉注射肝素 80 U/100 g, 24 G 动脉穿刺针以右心室流出道插入肺动脉干, 结扎上下腔静脉, 在肺动脉干顺行灌注灌注液, 速率为 240 ml/h, 并在左心耳置一流出道。灌注过程中持续通气, 当灌注肺成完全苍白时, 在中度膨胀肺(60%~70%)时, 结扎气管并取下心肺置于 4℃ 上述保存液中。

1.4 标本采集及观察指标、病理评分 供肺保存 6 h 后, 各取右下肺同一部位的肺组织行福尔马林固定, 石蜡包埋, 常规切片后行 HE 染色, 由同一位实验者在光镜下观察以下项目: 肺泡壁清晰与完整性、肺间质充血、肺间质水肿、肺泡腔红细胞渗出、炎症细胞

渗出。从以上五个方面进行病理评分: 无病理改变评为 1 分, 病理变化轻微且位置局限为 2 分, 病理变化显著但位置局限或病理变化轻微但病变广泛为 3 分, 广泛显著病理改变为 4 分。病理总分为各观察项目评分的总和。

1.5 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 病理总分进行两独立样本 *t* 检验; 对每个病理评分的组间差别, 进行两独立样本 Wilcoxon 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病理组织评分 光镜下病理 LC 组在肺组织清晰与完整、肺间质水肿、肺间质充血和肺泡腔红细胞渗出四项评分均低于 L 组, 但差异均无统计学意义($P > 0.05$), 两组在炎性细胞渗出方面 LC 组明显低于 L 组, 差异具有显著统计学意义($P < 0.01$)。肺组织的病理评分五项总分方面, L 组为较 LC 组积分高, 两组差异有统计学意义($P = 0.00$); 肺组织病理评分总分方面, L 组为(10.67±1.63)分, LC 组为(7.50±1.22)分, 两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 见表 1。

表 1 两组光镜下各项病理评分指标对比(分)

组别	肺组织	肺间质	肺间质	肺泡腔	炎性细胞
	清晰与完整	水肿	充血	红细胞渗出	渗出
L 组(n=10)	7.50	8.08	8.00	8.00	9.50
LC 组(n=10)	5.50	4.92	5.00	5.00	3.50
Z 值	1.48	1.73	1.68	1.68	3.21
P 值	0.14	0.08	0.09	0.09	0.00

2.2 肺组织病理变化 LC 组肺组织结构清晰较完整, 肺泡隔少量增厚, 少量肺泡壁断裂; L 组肺组织结构较清晰完整, 肺泡壁断裂、肺间质及肺泡见少量红细胞渗出, 肺泡上皮细胞及内皮细胞见空泡化及炎症细胞, 见图 1。

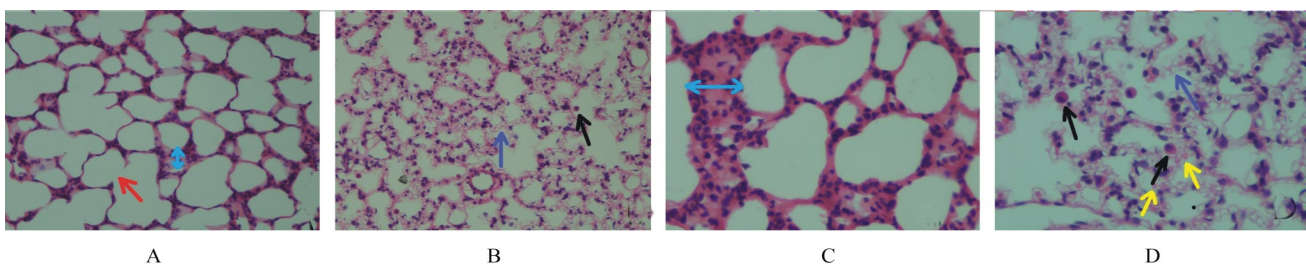


图 1 两组肺组织光镜病理(HE, ×200)

注: A: LC 组肺组织结构较清晰、完整, 肺泡隔少量增厚(绿色箭头), 少量肺泡壁断裂(红色箭头), 无肺间质及肺泡红细胞渗出, 无空泡化; B: L 组肺组织结构较清晰完整, 肺泡上皮细胞及内皮细胞见空泡化(蓝色箭头)及炎症细胞(黑色箭头)。C: LC 组肺组织结构较清晰、完整, 肺泡隔少量增厚(绿色箭头), 无红细胞和炎症细胞渗出, 无细胞空泡化; D: L 组肺组织结构较清晰完整, 肺泡壁断裂、肺间质及肺泡见少量红细胞渗出(黄色箭头), 肺泡上皮细胞及内皮细胞见空泡化(蓝色箭头)及炎症细胞(黑色箭头)。

3 讨论

良好的肺灌注液以及肺灌注保存技术一直是肺移植手术成功的重点,它是减少肺缺血再灌注损伤的关键。缺血再灌注损伤导致供体器官保存过程中器官损伤机理十分复杂,一般认为是缺血再灌注过程中引起肺间质大量炎症细胞浸润、炎症介质释放,导致过度炎症反应。LPD液是属于细胞外型供肺保存液,为肺移植的首选保存液,含有高浓度钠离子、低浓度钾离子和右旋糖酐40,低钾可以保持内皮细胞结构和功能的完整性、减轻肺血管的收缩^[6],右旋糖酐40能改善肺微循环及保护肺泡毛细血管屏障的作用^[7]。但有研究发现LPD液对供肺的抗炎、减少炎症细胞的渗出、浸入方面效果较差^[8],龙小毛将LPD液经肺动静脉灌注后的供肺保存在4℃低温LPD液中,发现80%~90%肺组织肺泡腔内有大量的炎性细胞渗出^[9]。这一点在我们的研究中也得到证实。

腺苷作为一种内源性嘌呤核苷,通过激活并结合与G蛋白偶联的腺苷受体(Adenosine receptors, ARs)介导的。ARs包含A1R、A2AR、A2BR、A3R四种类型,其中A2AR活化后可产生抗炎效应,阻止白细胞黏附以及抑制活性氧的产生,并抑制中性粒细胞、单核细胞等炎性细胞的聚集并减弱其功能,同时减少炎症介质的释放,尤以抑制TNF- α 的作用最为突出,从而发挥抗炎和修复效应。

本研究中采用在LPD保存液中加入CGS21680进行供肺灌注和保存,肺组织病理结构显示在炎症细胞渗出与离体肺组织总体病理积分两方面LC组要明显优于L组,从而在病理方面证实A2a受体激活剂能有效提高供肺抗炎能力,减轻炎症损伤,优于单一低

分子右旋糖苷保存液对供肺的保存作用。

综上所述,A2a受体激动剂可减少供体肺组织炎症细胞浸润程度,能明显改善LPD保存液在动物供肺的保存质量,提高保存效果,对于临床肺保存液提供了一个客观真实的理论依据。

参考文献

- [1] Simões EA1, Cardoso PF, Pêgo-Fernandes PM, et al. An experimental rat model of *ex vivo* lung perfusion for the assessment of lungs regarding histopathological findings and apoptosis: low-potassium dextran vs. histidine-tryptophan-ketoglutarate [J]. J Bras Pneumol, 2012, 38(4): 461-469.
- [2] Okada Y, Kondo T. Preservation solution for lung transplantation [J]. Gen Thorac Cardiovasc Surg, 2009, 57(12): 635-639.
- [3] Kumar V, Sharma A. Adenosine: an endogenous modulator of innate immune system with therapeutic potential [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 616(1-3): 7-15.
- [4] Fischer S, Hopkinson D, Liu M, et al. Raffinose improves 24-hour lung preservation in low potassium dextran glucose solution: a histologic and ultrastructural analysis [J]. Ann-Thorac Surg, 2001, 71(4): 1140-1145.
- [5] 彭雪梅, 席露, 王华东, 等. 乳化氟碳保存液对大鼠供肺的保护作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2013, 33(9): 1082-1084.
- [6] Fischer S, Matte-Marty A, de Perrot M, et al. Low-potassium dextran preservation solution improves lung function after human lung transplantation [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2001, 121(3): 594-596.
- [7] Witwer T, Franke U, Fehrenbach A, et al. Impact of retrograde graft preservation in perfadex-based experimental lung transplantation [J]. J Surg Res, 2004, 117(2): 239-248.
- [8] De Perrot M, Sekine Y, Fischer S, et al. Interleukin-8 release during early reperfusion predicts graft function in human lung transplantation [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(2): 211-215.
- [9] 龙小毛, 林辉, 李香伟, 等. 体外温血持续灌注对猪供肺的保护作用[J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29(12): 2522-2524.

(收稿日期:2015-01-21)