

• 论著 •

甲基泼尼松龙干预对急性肺损伤大鼠Ⅲ型前胶原的影响

贾静 刘晓民 张健鹏

【摘要】 目的 探讨甲基泼尼松龙对急性肺损伤(ALI)大鼠Ⅲ型前胶原(PCⅢ)的影响。**方法** 将 45 只大鼠按随机数字表法分为内毒素损伤组(损伤组)、甲基泼尼松龙干预组(干预组)和对照组,每组 15 只。通过静脉注射内毒素(6 mg/kg)制备大鼠 ALI 模型,于制模后 1、3 和 14 d 各处死 5 只,观察各组支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞总数、中性粒细胞(PMN)分类、巨噬细胞分类及血清和 BALF 中 PCⅢ水平变化。**结果** 损伤组 1 d BALF 细胞总数、PMN 分类及血清和 BALF 中 PCⅢ水平即明显升高,与对照组比较差异均有显著性(P 均 <0.01),干预组上述指标均明显低于损伤组,差异有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 甲基泼尼松龙抑制内毒素所致 ALI 大鼠血清和 BALF 中 PCⅢ水平升高,对 ALI 早期肺纤维化有抑制作用。

【关键词】 肺损伤,急性; Ⅲ型前胶原; 甲基泼尼松龙

Effect of methylprednisolone on procollagen type Ⅲ of rats with acute lung injury JIA Jing*, LIU Xiao-min, ZHANG Jian-peng. * Department of Respiratory Disease, General Hospital of the Chinese People's Armed Police Force, Beijing 100039, China

【Abstract】 Objective To observe the effect of methylprednisolone on procollagen type Ⅲ of rats with acute lung injury (ALI) induced by endotoxin. **Methods** Forty-five rats were randomly divided into three groups: endotoxin group, endotoxin plus methylprednisolone group, and control group, with 15 rats in each group. The model of ALI in rat was reproduced by intravenous injection of endotoxin in the dose of 6 mg/kg. On 1, 3, 14 days after the onset of ALI in rats, total cell number, classification of polymorphonuclear neutrophil (PMN), macrophages and procollagen type Ⅲ in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined by radioimmunoassay. **Results** Total cell number, classification of PMN and macrophages in BALF as well as procollagen type Ⅲ level in serum and BALF were obviously increased in endotoxin group on the first day, then decreased gradually (all $P<0.01$). Methylprednisolone inhibited the increase of the above-mentioned parameters ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Methylprednisolone can inhibit the increase of the procollagen type Ⅲ levels in serum and BALF in rats with acute lung injury induced by endotoxin.

【Key words】 acute lung injury; procollagen type Ⅲ; methylprednisolone

急性肺损伤(ALI)是急性呼吸窘迫综合征(ARDS)进程中的重要环节。ALI 早期即出现肺纤维化改变,这种纤维化可能对患者预后产生影响。而 ALI 早期干预治疗是否会对早期肺纤维化起作用,尚有待研究。本研究中以血清及支气管肺泡灌洗液(BALF)Ⅲ型前胶原(PCⅢ)作为肺纤维化的标志,探讨甲基泼尼松龙对 ALI 早期肺纤维化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料:健康雄性 SD 大鼠,体重 260~280 g,由解放军总医院动物中心提供。冻干精制大肠杆菌内毒素(LPS,O55:B5)购自 Sigma 公司。PCⅢ放射免疫试剂盒购自上海海研医学生物技术中心。乌拉坦购自北京化学试剂公司。

1.2 实验动物与分组:45 只 SD 大鼠按随机数字表

法分为 3 组:甲基泼尼松龙干预组(干预组)、LPS 损伤组(损伤组)和对照组,每组 15 只。各组处理方法如下:①干预组:经尾静脉按 6 mg/kg 注射 LPS,溶于 0.2 ml 生理盐水;随后每日腹腔注射甲基泼尼松龙 2 mg/kg,溶于 0.1 ml 生理盐水。②损伤组:经尾静脉按 6 mg/kg 注射 LPS,随后每日腹腔注射 0.1 ml 生理盐水。③对照组:经尾静脉注射 0.2 ml 生理盐水,随后每日腹腔注射 0.1 ml 生理盐水。每组于静脉给药后 1、3 和 14 d 各处死 5 只。

1.3 血液标本的采集和处理:大鼠于相应时间点腹腔注射质量分数为 20%的乌拉坦 1 mg/kg 麻醉,颈静脉取血后,放血处死,全血抗凝,4 000 r/min (离心半径 5~7 cm)离心 10 min,收集血清,置于 -20℃冰箱保存待用。

1.4 支气管肺泡灌洗及 BALF 中细胞计数:气管插入灌洗管,用 4℃生理盐水 3 ml 分两次行肺灌洗,每次 1.5 ml,反复抽吸 3 次,记回收量;取摇匀的灌洗液 1 滴,在细胞计数板上于 400 倍高倍镜下

基金项目:国家“十五”科技攻关计划项目(2003BA712A07-01)

作者单位:100039 北京,武警总医院呼吸科(贾静,张健鹏);
150001 哈尔滨医科大学附属第一医院呼吸科(刘晓民)

作者简介:贾静(1970-),女(汉族),北京人,医学硕士,主治医师。

计数细胞总数(除外红细胞)。灌洗液以 1 500 r/min (离心半径 5~7 cm)离心 5 min,细胞沉渣涂片行 Wright - Giemsa 染色,400 倍高倍镜下分类,计数巨噬细胞、中性粒细胞(PMN)及淋巴细胞百分比(计数 100 个细胞),上清液置-20℃冰箱保存待用。

1.5 血清及 BALF 中 PCⅢ测定:按试剂盒说明书要求操作。

1.6 统计学分析:数据用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用均数 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BALF 细胞总数、PMN 分类和巨噬细胞分类(表 1):损伤组 BALF 细胞总数 1 d 较对照组明显升高,3 d 仍高于对照组(P 均 <0.01);干预组 BALF 细胞总数 1 d 和 3 d 均低于损伤组(P 均 <0.05)。损伤组 BALF 中 PMN 分类 1 d 较对照组明显升高,3 d 达高峰,然后呈逐渐下降趋势,14 d 仍高于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);干预组 3 d 明显低于损伤组($P<0.05$)。巨噬细胞分类干预组与损伤组比较差异均无显著性。

2.2 血清及 BALF 中 PCⅢ水平测定(表 2):损伤组 1 d 时血清中 PCⅢ较对照组明显升高,此后逐渐下降,3 d 和 14 d 仍均高于对照组(P 均 <0.01);1、3 和 14 d 干预组血清中 PCⅢ均明显低于损伤组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。损伤组 1 d 时 BALF 中 PCⅢ较对照组明显升高($P<0.01$),3 d 达高峰,后逐渐下降,14 d 仍高于对照组(P 均 <0.01);干预组 BALF 中 PCⅢ水平 3 d 和 14 d 均明显低于损伤组($P<0.01$ 和 $P<0.05$)。

3 讨论

ALI/ARDS 是以进行性呼吸困难以及难治性低氧血症为主要表现的综合征,影响其预后的因素较多^[1]。ARDS 临床病死率为 30%~50%^[2],存活 ARDS 患者大部分出现不同程度的进行性肺纤维化^[3,4],当临床发现肺功能出现改变时,多难于逆转。目前关于 ARDS 并发肺纤维化的发病机制并不清楚,亦缺乏有效的治疗措施。以往认为肺纤维化为 ARDS 晚期表现。近年研究表明,ARDS 早期即已出现肺纤维化,早期肺纤维化的严重程度直接影响 ARDS 的预后^[5]。因此,早期逆转肺纤维化或控制肺纤维化进程对改善 ARDS 患者预后意义重大。

胶原是细胞外基质的主要成分,胶原积聚是肺间质纤维化的一个重要特征。早期肺纤维化首先表现为肺内成纤维细胞增生,合成并分泌大量胶原、透明质酸,导致细胞外基质过度沉积。I 型和Ⅲ型胶原是肺内细胞外基质中胶原的主要成分,其中Ⅲ型胶原在肺纤维化早期即明显增加,首先由肺成纤维细胞等间质细胞以 PCⅢ形式合成并分泌到细胞外,前胶原分解后形成胶原分子、氨基端前胶原肽(PNP)和羧基端前胶原肽(PCP)。在肺纤维化的研究中,PCⅢ是反映肺内成纤维细胞的活化状态,以及胶原代谢活动性的主要指标之一^[6]。本实验中观察到:LPS 损伤后 1 d BALF 细胞总数即明显升高,此后逐渐下降;BALF 中 PMN 分类 1 d 也明显升高,3 d 达高峰,此后逐渐下降;与对照组比较差异均有显著性。损伤组大鼠血清 PCⅢ于 1 d 即明显升高,随后逐渐下降;BALF 中 PCⅢ亦于 1 d 明显升高,3 d 达高峰。提示 ALI 早期肺纤维化与炎症反应同时出

表 1 各组大鼠 BALF 中细胞总数、PMN 分类、巨噬细胞分类比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 1 Total cell number, classification of PMN and macrophages in the rats' BALF of every group($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	BALF 细胞总数($\times 10^6/L$)			PMN 分类(%)			巨噬细胞分类(%)		
	1 d	3 d	14 d	1 d	3 d	14 d	1 d	3 d	14 d
对照组	2.98±0.59	2.60±0.68	2.89±0.71	3.80±0.77	4.72±0.89	3.48±0.94	94.14±1.81	92.34±1.14	92.92±1.93
损伤组	11.10±2.38**	6.24±1.63**	3.26±1.49	24.42±5.96**	30.18±1.76**	7.45±2.58*	71.38±6.61**	64.66±8.30**	85.10±5.10*
干预组	7.46±1.64**#	4.18±1.48**	3.15±1.32	22.97±5.22**	22.32±5.85**#	6.04±1.75	70.10±5.85**	71.70±7.47**	90.02±2.97

注:与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与损伤组比较: # $P<0.05$

表 2 各组大鼠血清和 BALF 中 PCⅢ水平比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Comparison of PCⅢ in the rats' serum and BALF of every group($\bar{x}\pm s, n=5$)

μg/L

组别	血清中 PCⅢ			BALF 中 PCⅢ		
	1 d	3 d	14 d	1 d	3 d	14 d
对照组	8.36±5.72	7.39±3.58	7.01±3.02	0.65±0.23	0.59±0.26	0.53±0.21
损伤组	92.06±4.07**	35.26±5.00**	29.30±8.06**	18.20±3.03**	28.60±7.58**	10.16±4.33**
干预组	69.23±7.14**#	24.09±4.73**#	20.07±7.52**#	17.80±5.61**	7.89±1.63**#	5.36±1.72**#

注:与对照组比较: ** $P<0.01$;与损伤组比较: # $P<0.05$, ** $P<0.01$

现,肺纤维化主要表现为胶原合成增多。

激素对 ARDS 的治疗一直存在争议。由于激素可作用于 ARDS 的多个发病环节,同时可通过抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)、进而抑制多种细胞因子转录。因此,20 世纪 90 年代以前曾广泛用于 ARDS 的治疗。但激素对 ARDS 的疗效却存在较大争论。有研究表明,短期大剂量应用激素既不能预防、也不能治疗 ARDS,同时可增加感染的发生率^[7]。而另有研究显示,采用持续、低剂量激素治疗不仅可抑制过度炎症反应,而且可降低病死率,并未发现增加感染率^[8,9]。大量研究表明,影响 ARDS 预后的主要因素是机体过度而持续的防御反应,并非原发病^[9]。糖皮质激素可抑制机体防御反应(HDR)的多个环节,主要包括抑制细胞激活和细胞因子生成,抑制多种细胞产生生长因子,抑制成纤维细胞增生和胶原沉积^[9-11]。激素的持续、非特异性抑制作用一方面减轻机体过度防御反应,另一方面可直接抑制纤维化的进程。因此,ARDS 时早期使用激素有利于抑制纤维化进程。

本实验中采用早期持续、低剂量(2 mg/kg)甲基泼尼松龙治疗,观察到干预组 BALF 细胞总数(主要为 PMN)于 LPS 损伤后 1 d 和 3 d 明显低于损伤组,提示甲基泼尼松龙可以降低 PMN 数、减轻肺泡炎性渗出。另外,干预组于损伤后 1、3 和 14 d 血清中 PCⅢ明显低于损伤组,损伤后 3 d 和 14 d BALF 中 PCⅢ明显低于损伤组,可见甲基泼尼松龙可降低血清及 BALF 中 PCⅢ水平。

综上所述,ALI 时血清及 BALF 中 PCⅢ水平升高,甲基泼尼松龙可降低 PCⅢ水平,推测甲基泼尼松龙可减少 ALI 时胶原合成,抑制 ALI 早期肺纤维化形成。ALI 早期肺纤维化直接影响预后^[5,12]。因此,对 ALI 早期肺纤维化进行干预可能对探索 ALI/ARDS 的治疗提供有益参考。

参考文献:

- 1 张齐.急性呼吸窘迫综合征预后相关指标分析[J].中国危重病急救医学,2004,16:308.
- 2 Ware L B, Matthay M A. The acute respiratory distress syndrome[J]. N Engl J Med, 2000, 342: 1334-1349.
- 3 黎毅敏. 38 例重症 SARS 患者临床救治回顾分析[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 343-345.
- 4 马成. 118 例 SARS 患者胸部 X 线表现分析[J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 338-342.
- 5 Marshall R P, Bellin G, Webb S, et al. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162: 1783-1788.
- 6 Bergeron A, Soler P, Kambouchner M, et al. Cytokine profiles in idiopathic pulmonary fibrosis suggest an important role for TGF- β and IL-10[J]. Eur Respir J, 2003, 22: 69-76.
- 7 London L, Majeski E I, Altman H S, et al. Respiratory reovirus 1/L induction of diffuse alveolar damage: pulmonary fibrosis is not modulated by corticosteroids in acute respiratory distress syndrome in mice[J]. Clin Immunol, 2002, 103: 284-295.
- 8 Meduri G U, Tolley E A, Chinn A, et al. Procollagen types I and III aminoterminal propeptide levels during acute respiratory distress syndrome and in response to methylprednisolone treatment[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 158: 1432-1441.
- 9 Meduri G U. The role of the host defence response in the progression and outcome of ARDS: pathophysiological correlations and response to glucocorticoid treatment[J]. Eur Respir J, 1996, 9: 2650-2670.
- 10 Rocco P R, Souza A B, Faffe D S, et al. Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 168: 677-684.
- 11 Meduri G U, Tolley E A, Chrousos G P, et al. Prolonged methylprednisolone treatment suppresses systemic inflammation in patients with unresolving acute respiratory distress syndrome evidence for inadequate endogenous glucocorticoid secretion and inflammation-induced immune cell resistance to glucocorticoids[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165: 983-991.
- 12 Clark J G, Milberg J A, Steinberg K P, et al. Type III procollagen peptide in the adult respiratory distress syndrome: association of increased peptide levels in bronchoalveolar lavage fluid with increased risk for death[J]. Ann Intern Med, 1995, 122: 17-23.

(收稿日期:2005-10-26 修回日期:2006-05-25)

(本文编辑:李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

《中国危重病急救医学》杂志稿约说明

《中国危重病急救医学》杂志稿约刊登在每年的第 1 期上,欢迎广大作者踊跃投稿,投稿请严格按照稿约的要求。同时交付文稿 1 份、单位介绍信或文稿加盖公章、软盘(word 排版)、审稿费每篇 40 元、课题批件复印件,以利于稿件审稿过程,提高稿件刊出速度。

本刊对所有来稿均采用同行审稿的方式进行公平、公正地审定。

(本刊编辑部)