

盐酸戊乙奎醚对腹腔感染脓毒症小鼠肺损伤的保护作用

雷利荣 王焱林 贾宝辉 詹佳 王成天

【关键词】 盐酸戊乙奎醚； 脓毒症； 超氧化物歧化酶； 丙二醛； 诱生型一氧化氮合酶

脓毒症/感染性休克是造成多器官功能障碍乃至死亡的重要原因。在脓毒症并发的多器官损伤中，肺脏往往是受累最早也是最严重的器官^[1]。抗胆碱药用于治疗微循环障碍性疾病取得了很好的效果，文献^[2]报道山莨菪碱(654-2)能将脓毒症的病死率降至14%，但其具体机制还不十分清楚。盐酸戊乙奎醚(PHC)为新型选择性抗胆碱药，但其用于脓毒症/感染性休克治疗的研究尚未见报道。本研究利用盲肠结扎穿孔术(CLP)复制脓毒症/感染性休克动物模型，观察PHC对肺组织超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量和诱生型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA表达的影响，并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 CLP模型制备:昆明雌性小鼠，体重(22.5±2.5)g，由武汉大学医学院实验动物中心提供。以500 mg/kg的水合氯醛腹腔麻醉小鼠，于腹前正中作1 cm切口，游离肠系膜和盲肠，4-0丝线环形结扎盲肠根部，12号针头于盲端部位贯通穿孔，挤出粪便少许，还纳肠管，逐层缝合关腹。术毕皮下注射生理盐水20 ml/kg以补充丢失的液体，肌肉注射青霉素800 kU/kg以防止切口感染。

1.2 实验分组与方法:将36只小鼠按随机数字表法分为假手术组、CLP组和PHC处理组，每组12只。假手术组动物除不行盲肠结扎和穿孔外，其余步骤与CLP组相同；PHC处理组于制模前1 h腹腔注射PHC 0.45 mg/kg。

1.3 观察指标及样品采集方法

1.3.1 一般情况及大体形态学检查:观察动物有无萎靡、躁动、寒颤、竖毛、腹
基金项目:湖北省卫生厅科研基金资助项目(2005GX2C61)

作者单位:430071 武汉大学中南医院麻醉科

作者简介:雷利荣(1981-),女(汉族),湖北省人,医学硕士,研究方向为麻醉与循环(现于湖北省肿瘤医院麻醉科工作,Email:10e0i@yahoo.com.cn)。

泻、脓性尿及眼角分泌物增加，并观察其呼吸、二便、饮食和活动情况。剖腹观察各器官组织形态学改变。

1.3.2 肺组织病理学观察:CLP后6 h每组各处死6只小鼠，取肺组织。一部分肺组织经体积分数为4%的甲醛固定，石蜡包埋、切片，苏木素-伊红(HE)染色后，用普通光学显微镜观察。另一部分肺组织经体积分数为2.5%的戊二醛固定做电镜切片。

1.3.3 肺组织SOD活性和MDA含量的检测:CLP后12 h每组处死6只小鼠，取肺组织。其中0.5 g肺组织制成体积分数为10%的匀浆，检测SOD活性和MDA含量。SOD活性检测用黄嘌呤氧化酶法，MDA含量检测用硫代巴比妥酸(TBA)法。

1.3.4 肺组织iNOS mRNA表达的检测:取CLP后12 h小鼠的新鲜肺组织，用含有体积分数为10%的焦碳酸二乙酯(DEPC)和4%的多聚甲醛磷酸盐缓冲液(PBS)0.1 mol/L固定，常规脱水、浸蜡、包埋、冰冻切片，操作步骤按试剂盒说明书进行。iNOS阳性染色表现为胞浆呈棕黄色颗粒沉着。参照Birner等^[3]的方法，以综合染色强度和染色细胞占总细胞数的百分比两者积分之和来判断。强度积分:不染为0分，轻度染色为1分，中度染色为2分，强染色为3分；阳性细胞占总细胞数的百分比积分:≤5%为0分，6%~25%为1分，26%~50%为2分，51%~75%为3分，>75%为4分。上述两项评分相加，每个标本观察10个视野，取其平均值。结果的判定由两位不知分组情况的病理医生进行。

1.4 统计学处理:采用SPSS11.5统计软件进行分析，计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用成组设计资料的t检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况及组织大体形态学检查:CLP组动物术后逐渐出现萎靡、躁动、竖毛、寒颤、腹泻、脓性尿及眼角分泌物

增加等表现，术后动物苏醒慢，精神极差，卧不动，呼吸急促、呼吸困难，口唇发绀，部分小鼠鼻腔内流出血性泡沫状分泌物，毛发湿，饮食、水极少，二便量少且大便干燥。濒死前出现寒颤、四肢僵硬、呼吸困难甚至颈项强直。剖腹见腹腔有混浊脓性渗出液，恶臭；盲肠肿胀变黑，发生坏疽和粘连；空肠肠管胀气；肝、肾充血、水肿，尚有淤点及淤斑等。而PHC处理组术后表现较轻。

2.2 肺组织病理学改变:①大体观察:CLP组肺脏体积明显增大，呈暗红色，表面可见不同程度充血、水肿，边缘部分大量肺梗死灶。PHC处理组肺脏呈浅红色，表面轻度充血、水肿，未见明显肺梗死灶。②光镜下观察:CLP组肺泡、肺间质充血、水肿，肺泡腔内见大量弥漫性中性粒细胞浸润，部分有脓肿形成，可见不同程度肺不张、坏死、代偿性肺气肿、血栓及类似透明膜形成(彩色插页图1)。PHC处理组肺泡腔内未见明显的中性粒细胞浸润(彩色插页图2)。③电镜下观察:CLP组板层小体排空现象明显，形成大空泡，多数线粒体膜断裂、解体、嵴粒溶解以及线粒体空泡化(彩色插页图3)。PHC处理组板层小体排空减轻，未见线粒体膜的断裂、解体、嵴粒溶解以及线粒体空泡化(彩色插页图4)。

2.3 肺组织SOD活性和MDA含量(表1):与假手术组比较，CLP组肺组织SOD活性降低，MDA含量升高(P 均 < 0.01)；与CLP组比较，PHC处理组肺组织SOD活性明显升高，MDA含量明显下降(P 均 < 0.05)。

表1 3组小鼠肺组织SOD活性和MDA含量的比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

| 组别 | SOD(U/mg) | MDA(nmol/mg) |
|--------|---------------|--------------|
| 假手术组 | 150.22±9.03 | 1.66±0.05 |
| CLP组 | 120.84±5.62** | 1.93±0.13** |
| PHC处理组 | 139.82±14.07# | 1.74±0.10# |

注:与假手术组比较:** $P < 0.01$;与CLP组比较: # $P < 0.05$

2.4 肺组织iNOS mRNA的表达:原位

杂交显示,假手术组 iNOS 染色结果阴性,其评分值为(1.90±0.99)分;CLP 组有大量单核/巨噬细胞、血管平滑肌细胞和支气管上皮细胞着色,胞质呈深棕色深染,其评分值为(4.90±1.10)分,为 iNOS 强阳性表达(彩色插图图 5),与假手术组比较差异有显著性($P<0.01$);PHC 处理组只有散在的单核/巨噬细胞、血管平滑肌细胞和支气管上皮细胞着色,胞质呈棕色,其评分值为(3.50±1.27)分,为 iNOS 弱阳性表达(彩色插图图 6),与 CLP 组比较差异有显著性($P<0.05$)。

3 讨论

内毒素作用于肺内的巨噬细胞、上皮细胞和肺上皮细胞等,激活 iNOS 和其他炎症介质大量表达,产生过量的 NO,促使大量中性粒细胞在肺组织内聚集和活化,引起“呼吸爆发”,产生大量氧自由基,促进肺组织的炎性渗出及肺泡损伤^[4]。有研究表明,CLP/内毒素所致急性肺损伤时,注入选择性 iNOS 抑制剂可减轻肺损伤和微血管渗漏^[5-6]。其中,MDA 是机体内氧自由基代谢中产生的脂质过氧化产物,它可以反映该体系中脂质过氧化自由基的存在及反应的程度^[7]。SOD 是广泛存在于需氧物体内的一种金属酶,能催化超氧阴离子自由产生歧化反应,是体内最重要的自由基清除剂^[8]。

本研究表明,CLP 小鼠肺组织中 MDA 含量明显升高,SOD 活性明显降低,肺组织 iNOS mRNA 的表达显著增强。肺泡、肺间质充血、水肿,肺泡腔内大量弥漫性中性粒细胞浸润,部分有脓肿形成。电镜显示板层小体排空现象明显,形成大空泡,多数线粒体膜断裂、解体、

嵴粒溶解。iNOS mRNA 过度表达,产生大量 NO,可通过两个方面损伤肺组织:①NO 与细胞质中可溶性鸟苷酸环化酶(GC)活化中心上的 Heme 基因结合,使之活化,造成细胞内环磷酸鸟苷(cGMP)升高而产生血管平滑肌松弛作用^[9-10];②NO 与氧自由基结合生成另一种强氧化自由基——过氧化硝基化合物,产生细胞毒性作用,造成组织损伤、细胞坏死^[11]。

给予 PHC 处理后,小鼠肺组织中 SOD 活性明显升高,MDA 含量显著下降,iNOS mRNA 表达也明显减弱,肺泡腔内无明显的中性粒细胞浸润,板层小体排空减轻,形成空泡数量少、体积小,未见线粒体膜的断裂、解体、嵴粒溶解。PHC 对 CLP 引起肺损伤的保护作用可能通过抑制 iNOS 活性,减少过量 NO 产生来实现,一方面降低血管平滑肌松弛和细胞毒性作用,纠正肺部低氧血症及改善肺脏血流量,而减轻肺损伤;另一方面则通过减少脂类过氧化物的形成,增强机体对自由基损伤的防御能力,从而减轻组织或细胞的过氧化损伤。但其详细机制及其临床效果有待进一步深入研究。

参考文献:

- 1 Fein A M, Calalang-Colucci M G. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock[J]. Crit Care Clin, 2000, 16(2): 289-317.
- 2 祝寿河, 方鹤松. 山萘碱治疗感染性休克[J]. 北京第二医学院学报, 1980, 1(1): 2-9.
- 3 Birner P, Schindl M, Obermair A. Overexpression hypoxia-inducible factor-1 α is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer[J].

Cancer Res, 2000, 60(17): 4693-4696.

- 4 杨毅, 邱海波, 周韶霞, 等. 吸入一氧化氮对急性肺损伤小鼠肺组织炎症反应的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(12): 723-727.
- 5 Okamoto I, Abe M, Shibata K, et al. Evaluating the role of inducible nitric oxide synthase using a novel and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in septic lung injury produced by cecal ligation and puncture[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(2 Pt 1): 716-722.
- 6 刘颖格, 李焕章, 戚好文. 氨基胍对内毒素诱发的急性肺损伤血清丙二醛的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 13(9): 548-549.
- 7 Gawel S, Wardas M, Niedworok E, et al. Malondialdehyde(MDA) as a lipid peroxidation marker[J]. Wiad Lek, 2004, 57(9-10): 453-455.
- 8 McCord J M, Edeas M A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision[J]. Biomed Pharmacother, 2005, 59(4): 139-142.
- 9 Thomas D D, Miranda K M, Colton C A, et al. Heme proteins and nitric oxide(NO): the neglected, eloquent chemistry in NO redox signaling and regulation[J]. Antioxid Redox Signal, 2003, 5(3): 307-317.
- 10 杜捷夫, 沈洪. 一氧化氮在急诊医学的进展及应用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(1): 54-56.
- 11 Royall J A, Kooy N W, Beckman J S. Nitric oxide-related oxidants in acute lung injury[J]. New Horiz, 1995, 3(1): 113-122.

(收稿日期: 2007-04-13)

修回日期: 2007-09-04)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

依那西普降低酵母多糖诱导的多器官功能障碍综合征急性期组织损伤和死亡率

众所周知,肿瘤坏死因子- α (TNF- α)在多器官功能障碍综合征(MODS)的发病过程中起重要作用。近期,意大利研究者用酵母多糖(500 mg/kg,溶于氯化钠溶液,腹腔内注射)复制 MODS 模型,在此模型上应用一种可溶性的 TNF- α 抑制剂依那西普(Etanercept, 10 mg/kg 皮下注射),研究其对 MODS 急性期和后期死亡率的影响。实验采用注射酵母多糖 1 h 后给予依那西普,18 h 后处死动物;另一组只给予依那西普的动物用于监测药物的组织毒性、体重降低和 12 d 死亡率;并设生理盐水组和 TNF 受体 1(TNFR1)缺陷动物组作为对照。结果显示,在依那西普治疗和 TNFR1 基因缺陷的小鼠,由酵母多糖所诱导的腹膜渗出和中性粒细胞迁移均显著减轻;胰腺和回肠组织损伤减轻,回肠和肺组织髓过氧化物酶活性增加;胰腺和回肠组织 TNF- α 、转化生长因子- β 和血管内皮生长因子免疫组化阳性染色深度明显减弱;18 h 器官功能指标和 12 d 存活率均明显改善。研究者由此证明了依那西普能降低非脓毒症 MODS 模型小鼠急性期组织损伤和死亡率。

杜颖,编译自《Shock》,2007-08-23(电子版);胡森,审校

电刺激迷走神经对脓毒症大鼠急性肺损伤的影响

(正文见593页)



A: SHAM组; B: CLP组; C: STM组

图1 各组光镜下肺组织病理学改变 (HE, ×400)

Figure 1 Pathological change of lung tissue in each group under light microscope(HE, ×400)



A: SHAM组; B: CLP组; C: STM组

图2 各组电镜下肺组织病理学改变(醋酸铀-枸橼酸铅双染, ×5 000)

Figure 2 Pathological change of lung tissue in each group under electron microscope(uranylacetate and lead citrate double staining, ×5 000)

盐酸戊乙奎醚对腹腔感染脓毒症小鼠肺损伤的保护作用

(正文见623页)

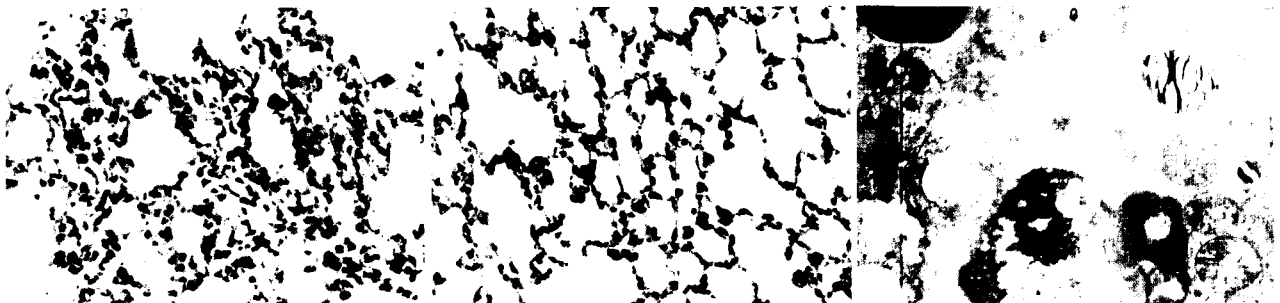


图1 光镜下CLP组肺组织病理学观察 (HE, ×400)

Figure 1 Pathological change of lung tissue in CLP group under light microscope (HE, ×400)

图2 光镜下PHC处理组肺组织病理学观察 (HE, ×400)

Figure 2 Pathological change of lung tissue in PHC group under light microscope (HE, ×400)

图3 电镜下CLP组肺组织病理学观察 (醋酸铀-枸橼酸铅双染, ×10 000)

Figure 3 Pathological change of lung tissue in CLP group under electron microscope (uranylacetate and lead citrate double staining, ×10 000)

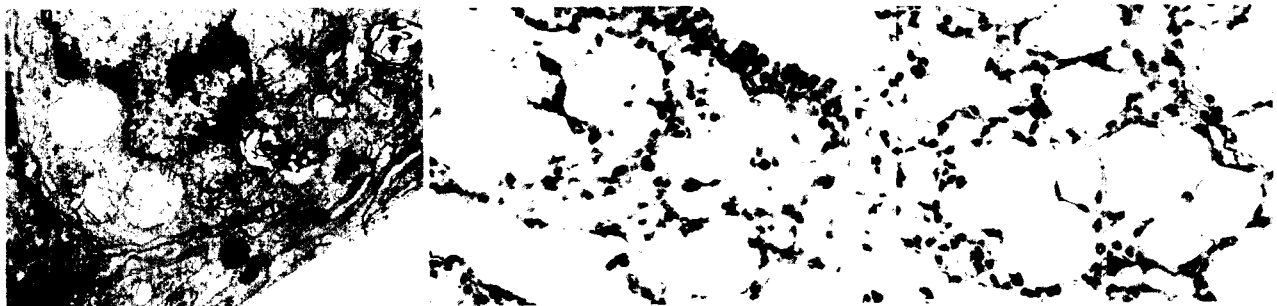


图4 电镜下PHC处理组肺组织病理学观察 (醋酸铀-枸橼酸铅双染, ×10 000)

Figure 4 Pathological change of lung tissue in PHC group under electron microscope (uranylacetate and lead citrate double staining, ×10 000)

图5 CLP组肺组织iNOS mRNA阳性表达 (原位杂交, ×400)

Figure 5 Positive expression of iNOS mRNA of lung tissue in CLP group (in situ hybridization, ×400)

图6 PHC处理组肺组织iNOS mRNA阳性表达(原位杂交, ×400)

Figure 6 Positive expression of iNOS mRNA of lung tissue in PHC group (in situ hybridization, ×400)