

## · 论著 ·

## 生长激素对急性肺损伤大鼠 Clara 细胞的影响

罗佛全 傅华群

**【摘要】** 目的 探讨应激反应期生长激素(Gh)对急性肺损伤(ALI)大鼠 Clara 细胞的影响。方法 将 112 只雄性 SD 大鼠随机均分为 ALI 组和重组人生长激素(rhGh)组,两组大鼠根据致伤与否及致伤后的观察时间不同又随机均分为 0、0.5、1、2、4、6 和 24 h 共 7 个亚组。通过免疫组织化学染色、透射电镜分析,观察 ALI 大鼠 Clara 细胞数量和形态学方面的变化。结果 静脉注射内毒素脂多糖(LPS)后 0.5 h ALI 组大鼠开始出现 ALI 病理改变,随着时间的延长,肺损伤程度逐渐加重,于 6 h 达最重,6 h 后逐渐恢复。rhGh 组大鼠静脉注射 LPS 后肺部病理变化趋势与 ALI 组大鼠相似,但各时间点肺损伤程度进一步加重。LPS 致伤后 1 h ALI 组大鼠 Clara 细胞数量开始明显减少,6 h 达最少,24 h 逐渐恢复,差异有统计学意义( $P$  均 $<0.01$ )。与 ALI 组同期比较,LPS 致伤后 rhGh 组大鼠 Clara 细胞数均有不同程度减少,以 24 h 减少更明显。LPS 致伤后 24 h,ALI 组大鼠 Clara 细胞的超微结构明显受损,rhGh 组大鼠 Clara 细胞超微结构损害较 ALI 组更为严重。结论 应激反应期应用 rhGh 可加重内毒素血症所致 ALI 大鼠 Clara 细胞受损。

**【关键词】** 内毒素血症; 肺损伤,急性; Clara 细胞; 生长激素

The effect of growth hormone on Clara cell in acute lung injury of rats LUO Fo-quan\*, FU Hua-qun.

\*Department of Anesthesiology, The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi, China

**【Abstract】** Objective To study the effect of growth hormone (Gh) on Clara cell in acute lung injury (ALI) rats during stress responsive stage. Methods One hundred and twelve male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into ALI group and recombinant human Gh (rhGh) group. The rats in two groups were subdivided into seven subgroups of different time intervals after lipopolysaccharide (LPS) injection: 0 (pre-injection of LPS, acted as control group), 0.5, 1, 2, 4, 6 and 24 hours subgroups respectively. Immunohistochemistry and electron microscope were used to investigate the number and morphological changes in Clara cells in ALI rats. Results Half of an hour after LPS injection, ALI was induced. The extent of lung injury increased with the time increased after LPS injection, peaked at 6 hours, then the extent of lung injury began to recess. The dynamic changes in lung injury of rats in rhGh group were similar to those in ALI group, but the extent of injury was more severe than that in ALI group at different time intervals. The Clara cell counts decreased significantly 1 hour after LPS injection, reaching the lowest at 6 hours, then began to recover 24 hours after LPS injection with statistically significant difference (all  $P < 0.01$ ). The counts of Clara cells in rhGh group decreased more significantly than that in ALI group at different time intervals after LPS injection, especially at 24 hours. The ultrastructure of Clara cell showed significant damage 24 hours after LPS injection. Compared with ALI group, the ultrastructure of Clara cell in rhGh group were more damaged 24 hours after LPS injection. Conclusion rhGh could deteriorate the damage of Clara cell in acute lung injury rats induced by endotoxemia during stress response stage.

**【Key words】** endotoxemia; acute lung injury; Clara cell; growth hormone

Clara 细胞在呼吸道免疫和维持呼吸系统正常生理功能中具有重要作用。我们的前期研究表明,内毒素血症可引起 Clara 细胞受损。因生长激素(Gh)可以促进蛋白合成、组织修复而广泛用于临床,本研究拟探讨应激反应期 Gh 对内毒素血症所致急性肺损伤(ALI)大鼠 Clara 细胞形态学方面的影响。

基金项目:江西省医药卫生科技计划资助项目(0301048)

作者单位:330006 江西南昌,南昌大学第一附属医院麻醉科(罗佛全);330006 江西南昌,南昌大学第二附属医院普通外科(傅华群)

作者简介:罗佛全(1973-),男(汉族),江西省人,博士,副教授,副主任医师,主要从事多器官功能障碍综合征的研究,Email:lfqjxmc@126.com.

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料:**112 只雄性 SD 大鼠,5~7 周龄,体重 180~250 g,由江西医学院动物科学部提供。羊抗鼠 CC16 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)、生物素化兔抗羊 IgG(N1030)和辣根过氧化物酶标记链亲合素均购自北京中山生物技术有限公司;内毒素脂多糖(LPS,O55:B5,批号:072K4095,美国 Sigma 公司),重组人生长激素(rhGh,思真,每支 10 U,瑞士雪兰诺公司)。

**1.2 动物分组及处理:**将 112 只大鼠按随机数字表法均分为 ALI 组和 rhGh 组,两组动物根据注射 LPS 与否及 LPS 致伤后观察时间不同,又随机分为

0(即对照,不注射 LPS)、0.5、1、2、4、6 和 24 h 7 个亚组。ALI 模型建立见文献[1]方法。rhGh 组动物分别于静脉注射 LPS 前 24 h 和注射后即刻皮下注射 rhGh(用无菌生理盐水稀释成终浓度 1 kU/L),每次 0.5 U/kg;ALI 组动物用等量生理盐水代替 rhGh,其余处理同 rhGh 组。

### 1.3 观察指标及方法

**1.3.1 肺组织病理学观察:**取左肺下叶,用体积分数为 10%的甲醛固定,石蜡包埋,切成 4  $\mu\text{m}$  薄片,行常规苏木素-伊红(HE)染色,封片,然后在双目显微镜下观察。

**1.3.2 免疫组化染色及结果判断:**取右肺下叶,冰冻切片(5  $\mu\text{m}$ ),按文献[2]方法进行免疫组化染色,封片,按文献[3]报道方法,在高倍镜( $\times 400$ )下计数 Clara 细胞,并计算 Clara 细胞占细支气管上皮细胞的百分率。

**1.3.3 电镜标本制备:**取左肺上叶,立即固定于体积分数为 2.5%的戊二醛溶液中,按电镜常规行标本制备,定位终末细支气管或呼吸性细支气管后做超薄切片,电子染色,透射电镜下观察 Clara 细胞的超微结构。

**1.4 统计学处理:**所有数据用 SPSS 10.0 统计软件分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较用方差分析和  $q$  检验。 $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 病理学观察:**对照组肺组织结构清楚,肺泡壁薄,肺泡腔内无渗液,无白细胞和红细胞漏出。静脉注射 LPS 后 0.5 h 肺脏出现 ALI 病理改变,光镜下见肺小动脉充血,肺泡隔水肿、增宽,出现以中性粒细胞(PMN)为主的炎性细胞浸润。静脉注射 LPS 后 1、2 和 4 h 肺小动脉充血、肺泡隔水肿、炎性细胞浸润程度随时间延长进一步加重,并逐渐出现肺泡隔断裂、肺泡腔萎陷、肺不张。致伤后 6 h 肺组织病理损害最严重,肺组织毛细血管明显扩张、充血,白细胞附壁,肺泡隔明显增宽,大量白细胞渗出、聚集,肺泡腔中可见渗出液和漏出聚集的红细胞,肺萎陷

明显,有些区域呈实体团状。6 h 后肺损伤逐渐恢复,24 h 大鼠肺水肿明显消退,肺组织结构基本清楚,肺泡隔炎性细胞浸润明显减轻,部分肺泡隔可见程度较轻的水肿,肺小动脉轻度扩张充血。rhGh 组大鼠肺组织病理改变规律与 LPS 组相似,但 rhGh 组各时间点肺损伤程度较 LPS 组同期重,以 PMN 为主的炎性细胞浸润更为明显。注射 LPS 后 24 h,两组肺损伤差异尤为明显,rhGh 组肺小动脉充血、肺泡隔水肿程度明显较 LPS 组重,部分肺泡腔和气管腔内仍可见红细胞漏出。

**2.2 rhGh 对 ALI 大鼠细支气管 Clara 细胞数的影响(表 1):**注射 LPS 后 1 h,ALI 组和 rhGh 组细支气管 Clara 细胞数开始明显减少( $P$  均 $<0.01$ ),管腔内可见脱落的 Clara 细胞、胞质明显减少。6 h 达低谷,致伤后 24 h 开始回升,但仍较 0 h 低( $P$  均 $<0.01$ )。rhGh 处理对正常大鼠 Clara 细胞数无明显影响。LPS 致伤后,rhGh 组大鼠 Clara 细胞数的动态变化规律与 LPS 组相似。但 LPS 致伤后 rhGh 组大鼠各时间点 Clara 细胞数较 ALI 组同期有不同程度减少,以 LPS 致伤后 24 h 最为明显( $P<0.05$ )。

**2.3 rhGh 对 ALI 大鼠 Clara 细胞超微结构的影响:**正常大鼠 Clara 细胞呈椭圆形突入细支气管腔,表面有短小微绒毛,胞质内见大量、有膜包绕的颗粒,呈圆形或椭圆形,电子密度均匀,部分电子密度较低的颗粒周边有空晕或致密核心,偶见分泌颗粒边移,与细胞顶部的胞膜相贴(彩色插页图 1)。LPS 致伤后 24 h,Clara 细胞数较正常大鼠少,胞质内的分泌颗粒减少,线粒体肿胀变性(彩色插页图 2)。与 ALI 组比较,伤后 24 h rhGh 组大鼠 Clara 细胞数减少更明显,胞质内的分泌颗粒进一步减少,线粒体肿胀变性更明显(彩色插页图 3)。

## 3 讨论

Clara 细胞是存在于呼吸道上皮内的一种非纤毛细胞,主要分布在终末细支气管和呼吸性细支气管。Clara 细胞存在分泌颗粒,分泌是 Clara 细胞的基本特性。Clara 细胞可分泌 Clara 细胞相对分子质量为 16 000 蛋白(CC16)、白细胞蛋白酶抑制剂、肺

表 1 ALI 组和 rhGh 组大鼠注射 LPS 后不同时间点细支气管 Clara 细胞数比较( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

组别	0 h(对照,%)	注射 LPS 后不同时间点 Clara 细胞数(%)					
		0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
ALI 组	64.74 $\pm$ 6.72	62.27 $\pm$ 4.07	54.63 $\pm$ 7.24 <sup>a</sup>	52.39 $\pm$ 5.10 <sup>a</sup>	50.18 $\pm$ 5.00 <sup>a</sup>	46.32 $\pm$ 5.81 <sup>abcd</sup>	54.70 $\pm$ 2.62 <sup>ac</sup>
rhGh 组	63.11 $\pm$ 6.82	60.84 $\pm$ 6.20	53.78 $\pm$ 5.96 <sup>a</sup>	50.76 $\pm$ 6.72 <sup>a</sup>	47.64 $\pm$ 6.40 <sup>a</sup>	45.87 $\pm$ 6.70 <sup>abc</sup>	48.30 $\pm$ 6.23 <sup>af</sup>

注:与本组对照比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与本组 0.5 h 比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与本组 1 h 比较,<sup>c</sup> $P<0.01$ ;与本组 2 h 比较,<sup>d</sup> $P<0.05$ ;与本组 6 h 比较,<sup>e</sup> $P<0.01$ ;与 ALI 组同期比较,<sup>f</sup> $P<0.05$

表面活性物质相关蛋白(SP)A、B、D 和小部分肺表面活性物质,其中 CC16 是肺局部重要的抗炎因子及免疫调节因子<sup>[4]</sup>。Clara 细胞含有高水平的细胞色素 P450 单氨氧化酶和其他与生物转化有关的酶,具有活跃的生物转化功能。Clara 细胞靠近气道的管腔侧有 Na<sup>+</sup>和 Cl<sup>-</sup>通道,能从管腔侧向基底侧主动转运 Na<sup>+</sup>,并可向管腔侧主动分泌 Cl<sup>-</sup>,在维持远端气道液体平衡中发挥重要作用。因此,Clara 细胞在呼吸道免疫和维持呼吸系统正常生理功能中具有重要作用。另外,Clara 细胞还具有活跃的增殖分化特性,可增殖分化为纤毛上皮细胞,在气道上皮更新和损伤修复、维持远端气道上皮的完整性中有重要作用。

本实验结果显示,LPS 致伤后 1 h,ALI 大鼠细支气管腔中可见 Clara 细胞脱落,细支气管中 Clara 细胞数明显下降,于 6 h 降至低谷。24 h 大鼠 Clara 细胞数已开始回升,但细支气管 Clara 细胞百分率仍低于正常大鼠。超微结构观察显示,正常 SD 大鼠 Clara 细胞呈椭圆形突入细支气管腔,表面有短小微绒毛,胞质内见大量有膜包绕的分泌颗粒,呈圆形或椭圆形,电子密度均匀,部分电子密度较低的颗粒周边有空晕或致密核心,偶见分泌颗粒边移,与细胞顶部的胞膜相贴,Clara 细胞内有大量滑面内质网及线粒体,与文献[5]报道相似。本研究发现,ALI 大鼠 Clara 细胞数较正常大鼠降低,Clara 细胞超微结构

亦发生明显变化,表现为伤后 24 h 大鼠 Clara 细胞胞质内的颗粒明显减少,线粒体肿胀变性。提示内毒素血症所致 ALI 大鼠 Clara 细胞受损,Clara 细胞可能是内毒素致肺损伤的重要靶细胞。rhGh 组大鼠伤后 24 h Clara 细胞超微结构较 ALI 组同期损害更明显,表现为胞质内的颗粒进一步减少,线粒体肿胀变性更为明显。提示应激反应期应用 rhGh 可加重内毒素血症所致 ALI 大鼠 Clara 细胞损害。

总之,应激反应期应用 rhGh 可加重内毒素血症所致 ALI 大鼠 Clara 细胞损害,这个结论的临床意义值得进一步研究。

**参考文献**

- [1] Davidson K G, Bersten A D, Barr H A, et al. Endotoxin induces respiratory failure and increases surfactant turnover and respiration independent of alveolecapillary injury in rats [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(11): 1516-1525.
- [2] 罗佛全,傅华群. 生长激素对急性肺损伤的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(9): 523-526.
- [3] Riess A, Wiggs B, Verburgr L, et al. Morphologic determinants of airway responsiveness in chronic smokers [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154(5): 1444-1449.
- [4] Singh G, Katyal S L. Clara cells and Clara cell 10 kD protein (CC10) [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(2): 141-143.
- [5] Chandra S, Davis J M, Drexler S, et al. Safety and efficacy of intratracheal recombinant human clara cell protein in a newborn piglet model of acute lung injury [J]. Pediatr Res. 2003, 54(4): 509-515.

(收稿日期:2007-10-04 修回日期:2007-12-06)  
(本文编辑:李银平)

**• 科研新闻速递 •**

**TLR2、TLR4、CD14 和 Fcγ受体 II A 因子多态性与临床肺炎链球菌感染的相关性**

肺炎链球菌是导致获得性肺炎最普遍的原因,也是引起患者死亡的一个主要原因。为了解肺炎链球菌和感染肺炎链球菌患者基因的相关性,澳大利亚学者研究了 85 例肺炎链球菌脓毒症患者和 409 例健康人的 Toll 样受体 2 基因 Arg 或 Gln 753 (TLR2-Arg/Gln753)、TLR4-Asp/Gly299、TLR4-Thr/Ile399、CD14-159C/T 和 Fcγ受体 II A-R/H131 等基因多态性变化。结果显示,脓毒症患者 TLR4-299/399 基因多态性发生率明显低于对照组,CD14-159CC 和 Fcγ受体 II A-R/R131 基因多态性表达率明显高于对照组,即只有 35% 的肺炎链球菌脓毒症患者携带低风险或保护性基因,而健康人携带低风险或保护性基因达 61%。因而他们认为,TLR4、CD14 和 Fcγ受体 II A 基因的变异增加了肺炎链球菌感染的风险。

黄彬,编译自《Immunol Cell Biol》,2008-01-08(电子版);胡森,审校

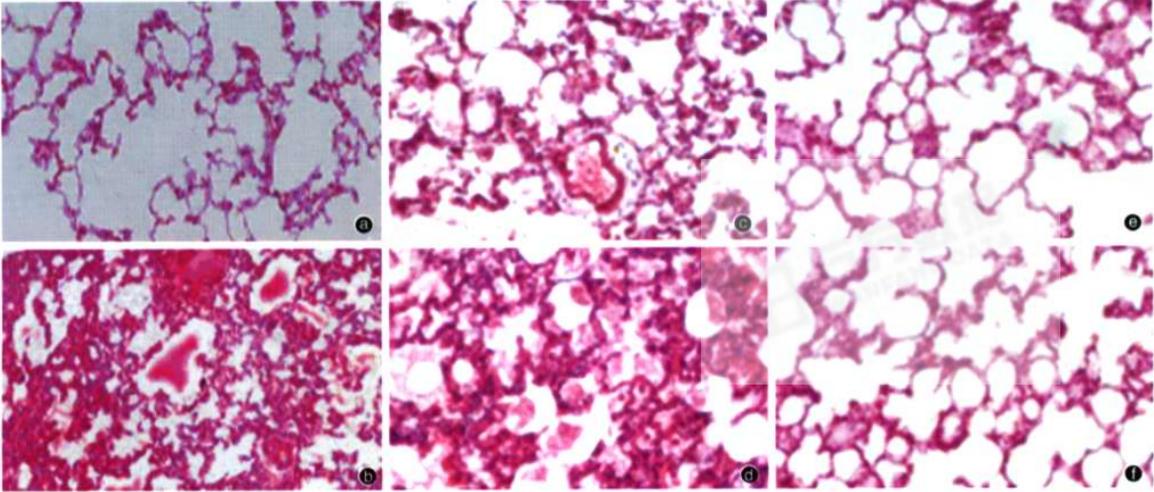
**内源性白细胞介素-10 缺乏加重多器官功能障碍综合征小鼠器官功能障碍和死亡率**

以往的实验证据表明,白细胞介素-10(IL-10)在全身感染发生机制中起重要作用。日本学者最近研究了酵母多糖诱导的多器官功能障碍综合征(MODS)小鼠模型急性期 IL-10 缺乏对机体的影响。研究者采用含有 IL-10 基因的正常小鼠和 IL-10 基因剔除的小鼠制备 MODS 模型。研究结果显示,IL-10 基因剔除组动物腹腔渗出和中性粒细胞数增多,小鼠回肠和肺组织中髓过氧化物酶活性和脂质过氧化产物增加,血浆肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IL-1β、一氧化氮(NO)均高于 IL-10 非缺乏组。另外,IL-10 基因剔除组小鼠出现了肾脏、肝脏和胰腺的功能障碍,并且 12 d 全身炎症反应和死亡率也明显高于 IL-10 非缺乏组。以上结果显示,内源性 IL-10 缺乏能加重由酵母多糖诱发的 MODS。

黄彬,编译自《Cytokine》,2007-12-19(电子版);胡森,审校

# 不同时间给予猪肺表面活性物质对大鼠油酸型急性肺损伤疗效的影响

(正文见88页)



Ⓐ:假手术组; Ⓒ:PPS 100 mg/kg 0.5 h组; Ⓓ:PPS 150 mg/kg 0.5 h组;  
 Ⓑ:模型组; Ⓔ:PPS 100 mg/kg 2 h组; Ⓕ:PPS 150 mg/kg 2 h组  
 图5 油酸注入不同时间给予PPS对ALI大鼠肺组织病理学的影响(HE, × 200)

# 生长激素对急性肺损伤大鼠Clara细胞的影响

(正文见92页)

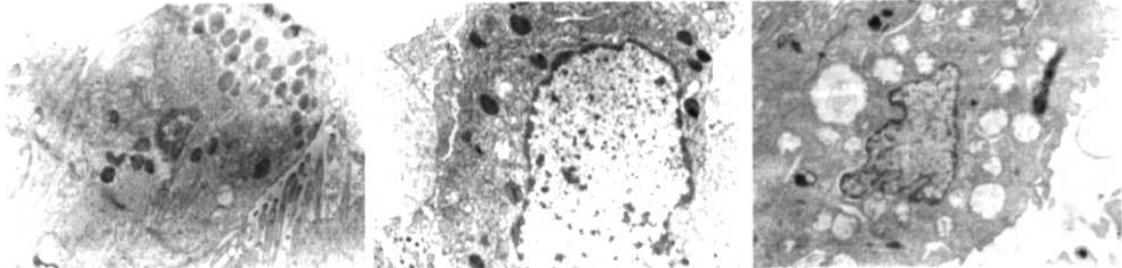
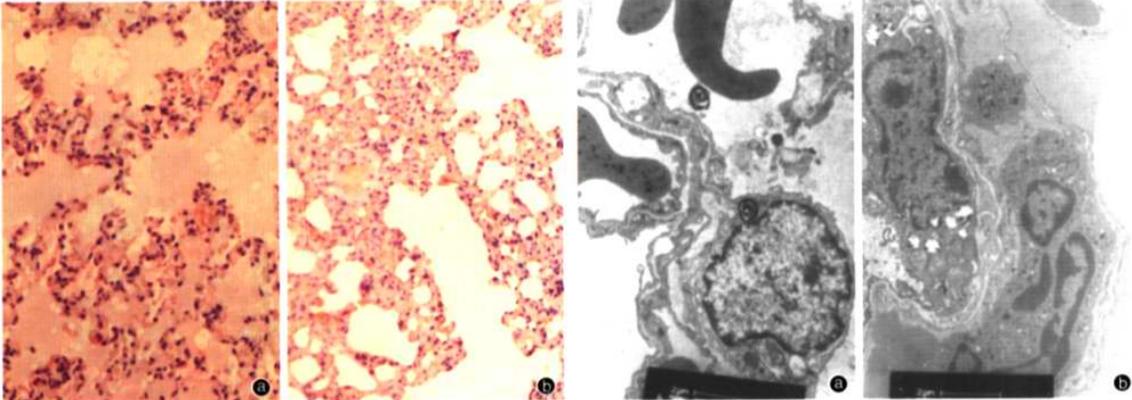


图1 生理盐水对照大鼠Clara细胞超微结构(× 8 000)      图2 ALI组注射LPS后24 h大鼠Clara细胞超微结构(× 8 000)      图3 rhGh组注射LPS后24 h大鼠Clara细胞超微结构(× 8 000)

# 山萘苕碱雾化吸入对油酸诱导大鼠急性肺损伤的保护作用及其机制

(正文见117页)



Ⓐ:模型组; Ⓑ:治疗组      Ⓐ:模型组; Ⓑ:治疗组  
 图1 光镜下观察两组大鼠肺组织病理学改变(HE, × 40)      图2 电镜下观察两组大鼠超微结构改变(× 5 000)