

• 研究报告 •

肺脏局部内皮素水平变化在急性肺损伤发病中的意义

罗佛全 赵为禄 吴菊梅

【摘要】 目的 探讨肺脏局部内皮素(ET)在内毒素性急性肺损伤(ALI)发病中的作用。**方法** 根据注射内毒素与否及注射内毒素后的观察时间不同将 56 只雄性 SD 大鼠随机均分为 0(对照组,不注射内毒素)、0.5、1、2、4、6、24 h 7 个组;采用体视学方法测定大鼠肺泡隔面积密度(PASAD)和中性粒细胞(PMN)计数。ET 水平测定用放射免疫分析法。**结果** ALI 组大鼠随致伤时间延长 PASAD 和肺泡隔 PMN 计数进行性增加,两者均于 6 h 达峰值,24 h 基本恢复至正常水平;致伤后 0.5 h 大鼠肺组织匀浆液中 ET 含量开始升高,4 h 达峰值,6 h 后逐渐降低,24 h 恢复至正常水平。**结论** 肺脏局部 ET 水平变化在内毒素性 ALI 的发病中有重要作用。

【关键词】 肺损伤,急性; 内皮素; 内毒素血症; 肺

急性肺损伤(ALI)是全身炎症反应综合征(SIRS)在肺部的典型表现,是由中性粒细胞等多种炎性细胞介导的肺脏局部炎症反应和炎症反应失控所致的肺泡毛细血管膜损伤^[1],最终可发展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)、多器官功能障碍综合征(MODS)甚至多器官功能衰竭(MOF)^[2]。肺脏在全身炎症反应中不仅是受害的靶器官,还可能是全身炎症反应的加速器,肺源性炎症介质内皮素(ET)在内毒素血症致 ALI 中的作用尚不清楚。为此,本研究中制备 ALI 大鼠模型,以观察肺脏局部 ET 水平在其中的变化。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理:56 只雄性 SD 大鼠,5~7 周龄,体重 180~250 g,由江西医学院(现为南昌大学医学院)动物科学部提供。根据注射内毒素与否及注射内毒素后的观察时间不同,将大鼠按随机数字表法均分为 0(即对照组,不注射内毒素)、0.5、1、2、4、6、24 h 共 7 组,每组 8 只。经股静脉注入 5 mg/kg 内毒素(溶于生理盐水中,终浓度为 2 g/L,1 min 内注完)制备内毒素血症大鼠模型;对照组大鼠经股静脉注入等量生理盐水,其余处理两组相同。

1.2 检测指标及方法:于各时间点处死

表 1 各组大鼠肺泡隔 PMN 计数、PASAD 及肺匀浆液中 ET 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	PMN 计数(个/测量框)	PASAD(μm^{-1})	ET(pg/g)
对照组	8	3.50 $\pm$ 1.93	17.268 $\pm$ 4.652	82.664 $\pm$ 0.521
0.5 h 组	8	12.17 $\pm$ 5.78 ^b	23.612 $\pm$ 2.245 ^a	84.829 $\pm$ 1.305 ^{ad}
1 h 组	8	17.50 $\pm$ 6.57 ^b	24.542 $\pm$ 3.372 ^a	84.955 $\pm$ 2.469 ^{ad}
2 h 组	8	19.50 $\pm$ 5.47 ^b	29.849 $\pm$ 4.534 ^b	85.377 $\pm$ 2.299 ^{ac}
4 h 组	8	27.17 $\pm$ 8.84 ^b	31.620 $\pm$ 4.721 ^b	87.726 $\pm$ 3.497 ^b
6 h 组	8	34.83 $\pm$ 9.39 ^b	31.930 $\pm$ 4.501 ^b	86.206 $\pm$ 2.021 ^b
24 h 组	8	4.50 $\pm$ 1.38	0.177 $\pm$ 2.960	84.307 $\pm$ 1.027 ^d

注:与对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与 4 h 组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

大鼠,无菌开胸,取左下肺叶固定于甲醛水溶液中,用于制备石蜡切片;取右肺中叶,用于提取肺组织匀浆液,液氮中保存备检。

1.2.1 肺泡隔中性粒细胞(PMN)计数及肺泡隔面积密度(PASAD)测定:取甲醛水溶液固定的肺组织,石蜡包埋,切成 4 μm 厚切片,常规行苏木素-伊红(HE)染色,封片,用体视学方法^[3]测定肺泡隔 PMN 计数及 PASAD^[4]。

1.2.2 肺匀浆液制备及总蛋白含量测定:取新鲜肺组织 0.2 g,加 0.2 mol/L 的 HAC 缓冲液(按 0.1 g 组织加 1 ml 的比例)进行匀浆,然后放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中煮 10 min,冷却后加乙二胺四酸二钠(EDTA-2Na)、抑肽酶,充分匀浆,离心 15 min,取上清液,于 -35 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于 ET 测定。肺组织匀浆液中总蛋白含量的测定用考马斯亮蓝法。

1.2.3 肺组织匀浆液中 ET 含量测定:采用放射免疫分析法测定,具体操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3 统计学处理:应用 SPSS 10.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析及 q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠 PASAD 和肺泡隔 PMN 计数比较(表 1):注射内毒素后 0.5 h 肺泡隔 PMN 计数进行性增多,于 6 h 达峰值,之后逐渐恢复,于 24 h 恢复至正常水平。PASAD 的变化趋势与 PMN 计数的变化相似。

2.2 肺组织匀浆液中 ET 含量比较(表 1):注射内毒素后 0.5 h 大鼠肺组织匀浆液中 ET 含量开始明显升高,4 h 达峰值,并一直保持在高水平状态,6 h 后开始恢复,24 h 恢复到正常水平。

3 讨论

本实验结果显示,静脉注射内毒素后 0.5 h 肺泡隔内 PMN 计数进行性增多,于 6 h 达峰值。与此同时,反映肺萎陷的 PASAD 亦于注射内毒素后 0.5 h 开始明显增大,并至 6 h 达峰值,两者均于 24 h 基本恢复至正常水平。表明静脉注射内毒素可引起 PMN 在肺泡隔内浸润,引起 ALI,从而导致肺泡萎陷。分析肺泡隔 PMN 计数、PASAD 与肺脏局部 ET 水平的关系发现,前两者于静脉注射内毒素后 0.5 h 随肺脏局部 ET 水平的升高而增大,并随 ET 水平上升到峰值时而达到峰值,于 6 h 后随着 ET 水

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2009.07.018

基金项目:江西省医药卫生科技计划项目(0301048)

作者单位:330006 江苏,南昌大学第一附属医院麻醉科(罗佛全、赵为禄);江苏,南昌大学第一附属医院 ICU(吴菊梅)

Email:lfqjxmc@126.com

平的恢复而逐渐恢复,并于注射内毒素后 24 h 随着 ET 水平的恢复而恢复到大致正常水平。提示内毒素血症致 ALI 可能与其引起肺脏局部 ET 水平的升高有关,肺脏局部 ET 水平的变化在内毒素血症引起的 ALI 发病中有重要作用。

ET 是一种内源性缩血管肽,具有强烈而持久的缩血管效应,在调节局部血流中起重要作用,而且还能引起气管和支气管平滑肌的收缩和痉挛,同时对其他细胞因子的释放具有调节作用。ET 可能通过以下机制导致或加重 ALI: ①促进支气管平滑肌收缩,增加气道阻力,降低肺顺应性。②大量 ET 释放,可提高肺毛细血管压力,造成肺水肿。③ET 可激活 PMN,促进 PMN 在肺内聚集、扣押^[5]。ET 刺激 PMN 表面黏附分子表达及细胞内游离钙动员,使 PMN 与内皮的黏附增加有关。本实验结果显示,随着肺脏局部 ET 水平的升高,肺泡隔 PMN 浸润逐渐加重,其浸润程度随肺脏局部 ET 水平峰值的出现而达最重,6 h 后随 ET 水平的恢复而逐渐减轻,这表明肺脏局部 ET 可促进 PMN 在肺内的浸润,从而导致 ALI。④ET 还可刺激 PMN^[6]和巨噬细胞产生花生四烯

酸、氧自由基等炎症介质,上调肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)等炎症介质的合成和释放^[7]。TNF- α 、IL-6 是核转录因子- κ B(NF- κ B)的重要激活因子,可有效激活 NF- κ B,导致 NF- κ B 过度表达与活化,NF- κ B 激活后可启动更多炎症介质的表达,从而导致肺脏局部炎症反应失控,损伤血管内皮细胞及肺泡上皮细胞,引起肺泡-毛细血管膜受损、通透性增加,引起渗透性肺水肿,最终使肺弥散功能障碍^[8],从而导致 ALI 的发生。

综合本研究结果提示,内毒素血症可引起 ALI,其机制可能与内毒素血症可引起肺脏局部 ET 水平升高有关。

参考文献

- [1] Kutlu CA, Williams EA, Evans TW, et al. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection. *Ann Thorac Surg*, 2000, 69(2): 376-380.
- [2] 中华医学会重症医学分会. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南(2006). *中国危重病急救医学*, 2006, 18(12): 706-710.
- [3] 申洪,沈忠英. 实用生物体视学技术. 广州:中山大学出版社,1991:23-140.
- [4] 罗佛全,傅华群. 生长激素对急性肺损伤的影响. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(9): 523-526.
- [5] Gómez-Garre D, Guerra M, González E, et al. Aggregation of human polymorphonuclear leukocytes by endothelin: role of platelet-activating factor. *Eur J Pharmacol*, 1992, 224(2-3): 167-172.
- [6] Ishida K, Takeshige K, Minakami S. Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990, 173(2): 496-500.
- [7] Battistini B, Forget MA, Laight D. Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relationship to cytokines. *Shock*, 1996, 5(3): 167-183.
- [8] Kunkel EJ, Jung U, Bullard DC, et al. Absence of trauma-induced leukocyte rolling in mice deficient in both P-selectin and intercellular adhesion molecule 1. *J Exp Med*, 1996, 183(1): 57-65.

(收稿日期:2008-07-17)

修回日期:2008-12-20)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

脓毒症时心血管调控与一氧化氮生成抑制对脑组织功能变化有影响

以往的研究发现,脓毒症晚期由诱导型一氧化氮合酶(iNOS)合成过量的一氧化氮(NO)能抑制下丘脑活动,减少抗利尿激素分泌引起的低血压、不可逆性休克甚至死亡。但脓毒症时心血管功能改变能否引起脑组织中相似的神经激素变化还有待研究。巴西的研究人员通过预先向雌性 Wistar 大鼠腹腔注入 iNOS 抑制剂氨基胍或生理盐水,30 min 后进行盲肠结扎穿孔术(CLP)或假手术,持续补液 6 h 或 24 h,然后取脑组织进行 Fos 免疫组化检查。结果表明,CLP 组 6 h 后在下丘脑最后区(AP)、孤束核(NTS)、腹外侧核中部(VLM)、蓝斑(LC)和臂旁核(PB)均可观察到 c-fos 表达增强(P 均 <0.01),但 24 h 后除 VLM 外,其余部位 c-fos 表达明显减弱(P 均 <0.05)。氨基胍组 CLP 后 6 h AP 和 NTS 的 c-fos 表达均减弱,但 24 h 后 AP、NTS、VLM 区表达均增强。因此认为,在脓毒症早期由 iNOS 合成的 NO 与心血管调控的脑组织活动有部分关系,但脓毒症晚期这种联系即明显减弱或消失。

杨明星,编译自《Neurosci Lett》,2009,453(3):141-146;胡森,审核

内毒素血症小鼠组织因子微粒活性水平与凝血活性有关

组织因子(TF)微粒(MPs)在包括脓毒症在内的许多疾病的血栓形成过程中起着重要作用。美国研究者采用梯度离心法自血浆中提取 MPs,用双相显色法检测 MPs 的前凝血活性(PCA)以及凝血酶/抗凝血酶水平和 MPs 数量。结果显示,脂多糖(LPS)能提高野生小鼠 MPs 的 PCA,而且 PCA 能被鼠 TF 抗体(1H1)明显抑制,人 TF 抗体(HTF-1)却无此作用。相反,在仅表达人 TF 的小鼠中,MPs 的 PCA 能被 HTF-1 抑制,1H1 却无作用。使用鼠 FVIIa 与使用人 FVIIa 的野生小鼠比较,前者 MPs 是后者的 6 倍,这也与报道过的 FVIIa 在特殊异种间的差异结果一致。少量表达人 TF 与大量表达人 TF 的小鼠相比,MPs 的 TF 活性和凝血酶/抗凝血酶比值明显降低,但磷脂酰丝氨酸(PS)阳性 MPs 水平却相同。值得注意的是,内毒素血症野生小鼠中 MPs 的 TF 水平与凝血酶/抗凝血酶比值有关,而与 PS 阳性 MPs 无关,因此,研究者认为,在内毒素血症小鼠中 TF 阳性 MPs 激活了凝血系统。

杨明星,编译自《J Thromb Haemost》,2009-04-24(电子版);胡森,审核