

依达拉奉对脓毒症大鼠的保护作用研究

施梦 曹同瓦 沈蕾 孙正达 祝辰辰

【摘要】 目的 探讨依达拉奉及地塞米松对脓毒症大鼠的保护作用。方法 将 50 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、地塞米松治疗组、依达拉奉治疗组、地塞米松与依达拉奉联合治疗组,每组 10 只。用盲肠结扎穿孔术(CLP)建立脓毒症大鼠模型。各治疗组于术后即刻经阴茎背静脉分别注射地塞米松和(或)依达拉奉各 5 mg/kg,假手术组及模型组给予等量生理盐水。于术后 12 h 采集腹主动脉血,用化学反应法检测血清丙二醛(MDA)含量和总抗氧化能力(T-AOC);取肺组织,采用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测肺组织细胞凋亡情况,并进行病理评分。结果 与假手术组比较,模型组 MDA 及细胞凋亡指数(AI)升高,而 T-AOC 水平下降;与模型组比较,各治疗组 MDA 及 AI 降低,T-AOC 升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且联合治疗组疗效优于地塞米松组和依达拉奉组。模型组大鼠肺组织中肺泡破坏、间质水肿、炎性细胞浸润明显,用药物干预后损害程度降低。结论 依达拉奉可通过减少氧自由基产物,抑制组织中脂质过氧化,从而减轻脓毒症。依达拉奉和地塞米松联合应用对脓毒症有更好的治疗效果。

【关键词】 脓毒症; 盲肠结扎穿孔术; 依达拉奉; 地塞米松; 肺; 氧化应激; 凋亡

严重感染引发的脓毒症可使炎症反应失控,最终导致多器官功能障碍综合征(MODS)。目前 MODS 的发病机制尚未明确,氧化应激可能是其中一个致病因素,但对其研究较少。依达拉奉(3-甲基-1-苯基-2-吡啶啉-5-酮)是一种自由基清除剂,通过清除自由基,抑制脂质过氧化,可对缺血/再灌注损伤的多种脏器及组织起保护作用^[1]。本研究中通过观察脓毒症大鼠的氧化还原状态,初步探讨依达拉奉防治脓毒症的作用。

1 材料与方

1.1 动物分组、模型制备及给药:雄性 SD 大鼠 50 只(由中国医学科学院上海实验动物部提供),体重 250~300 g。按随机数字表法将大鼠分为假手术组、模型组、地塞米松治疗组、依达拉奉治疗组和依达拉奉与地塞米松联合治疗组,每组 10 只。采用盲肠结扎穿孔术(CLP)制作脓毒症大鼠模型,模拟临床腹腔感染脓毒症患者。各治疗组分别于制模后即刻经阴茎背静脉注射依达拉奉和(或)地塞米松,用量均为 5 mg/kg,假手术组及模型组注射等量生理盐水。依达拉奉注射液购自南京先声东元制药有限公司;地塞米松注射液购自天津药业焦作有限公司。

表 1 各组大鼠肺组织病理评分比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	病理评分(分)			
		水肿	炎性细胞浸润	出血	总分
假手术组	10	1.00±0.00	1.30±0.48	1.30±0.48	3.60±0.70
模型组	10	2.50±0.53 ^a	3.20±0.79 ^a	2.40±0.52 ^a	8.10±1.10 ^a
地塞米松组	10	1.70±0.48 ^a	2.00±0.47 ^b	1.60±0.52	5.30±0.95 ^{ab}
依达拉奉组	10	1.50±0.53 ^b	2.30±0.48 ^a	1.50±0.53 ^b	5.30±0.82 ^{ab}
联合治疗组	10	1.50±0.53 ^b	1.80±0.42 ^b	1.10±0.32 ^b	4.40±0.84 ^b

注:与假手术组比较,^a $P < 0.005$;与模型组比较,^b $P < 0.005$

1.2 检测指标及方法:于制模后 12 h 取 3 ml 腹主动脉血,用于检测氧化应激指标;放血处死大鼠,取右肺制作病理标本,进行免疫组化实验。

1.2.1 氧化应激指标检测:血清丙二醛(MDA)含量和总抗氧化能力(T-AOC)用化学反应法测定,按试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书操作。

1.2.2 肺组织病理观察:取肺组织,用甲醛水溶液固定,常规脱水、石蜡包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理改变。按病变范围占总视野的百分比进行病理评分,无损伤为 1 分,损伤 < 25% 为 2 分,25%~50% 为 3 分,50%~75% 为 4 分,75%~100% 弥漫性损伤为 5 分。每个标本有 3 个切片,取其均值。

1.2.3 肺组织细胞凋亡指数(AI):取右肺中叶小块肺组织用甲醛水溶液固定,常规石蜡包埋,采用原位末端缺刻标记法(TUNEL)定量检测凋亡细胞,按照试剂盒(北京罗氏公司)说明书操作。阳性细胞为凋亡细胞核呈棕黄色着色,部分胞质可呈阳性着色。凋亡细胞包括肺泡

上皮细胞、支气管上皮细胞、血管内皮细胞以及淋巴细胞等。每张切片在光镜(×400)下随机选择 10 个视野,分别计数凋亡细胞和总细胞数,计算细胞 AI。

1.3 统计学处理:应用 SPSS 11.5 统计软件,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。组织学半定量评分统计采用 χ^2 检验,为避免 I 类错误,5 组间比较时 $P < 0.005$ 为差异有统计学意义。AI 与各参数间的相关关系采用 Pearson 法分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理观察(表 1;彩色插图 1):模型组肺损伤病理评分总分明显高于假手术组($P < 0.005$)。与模型组比较,各治疗组肺损伤病理评分总分均明显降低(P 均 < 0.005)。地塞米松可减少炎性细胞浸润;依达拉奉可改善肺组织水肿及出血情况;地塞米松联合依达拉奉可明显减轻肺水肿,减少炎性细胞浸润及出血。光镜下观察,假手术组大鼠肺泡无萎陷,肺泡和肺间质无炎性细胞浸润,

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.12.016

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院心胸外科(施梦),ICU(曹同瓦、沈蕾、孙正达、祝辰辰)

通信作者:祝辰辰,Email:zhu_hechen@yahoo.com

肺泡壁无增厚,无毛细血管扩张、充血及白细胞附壁现象。模型组大鼠肺实质内可见大量炎性细胞浸润,肺泡间隔增宽,肺间质渗液明显,局限性的肺泡塌陷和肺不张,偶见肺泡水肿及出血现象,符合急性肺损伤改变。各治疗组肺泡萎陷明显减轻,肺泡间隔变窄,毛细血管增生及白细胞附壁现象明显减少。

2.2 血清 MDA 和 T-AOC(表 2);模型组大鼠血清 MDA 浓度较假手术组显著升高, T-AOC 明显降低($P < 0.05$)。与模型组比较,各治疗组血清 MDA 浓度明显降低, T-AOC 明显增高($P < 0.05$),其中以联合治疗组作用明显,但 3 个治疗组间比较差异无统计学意义。

2.3 肺组织细胞 AI(彩色插图图 2;表 2);假手术组可见胞质有阳性着色,胞核着色较少。模型组胞核阳性着色明显,胞质亦见阳性着色;AI 明显高于假手术组($P < 0.01$)。各治疗组胞核着色较模型组不明显, AI 明显减小($P < 0.05$),以联合治疗组变化明显。

3 讨论

脓毒症可引起患者多器官功能障碍,肺脏是最常见的首发衰竭器官^[2]。肺泡巨噬细胞是位于肺泡表面的游离细胞,也是肺泡腔内的常驻吞噬细胞,是肺组织天然免疫系统的第一道防线,在肺部炎症反应中发挥重要作用^[3]。所以本实验中取肺组织标本进行观察,以显示感染对脓毒症大鼠的损伤程度。

脓毒症时机体炎症介质失衡,同时产生大量的氧自由基,引起脂质过氧化,直接导致组织损伤;这些分子,特别是羟自由基高度不稳定,通常和细胞膜脂质成分发生反应。脂质过氧化导致的细胞损害表现为增加细胞通透性和细胞溶解等^[4]。MDA 是氧自由基致脂质过氧化的中间代谢产物,表示器官内脂质过氧化损伤的程度。研究发现,注射内毒素小鼠血浆中 MDA 含量明显增高,提示 MDA 与炎症相关^[5];而 T-AOC 代表了机体总的抗氧化能力。本研究中通过检测血清中 MDA 及 T-AOC 水平探讨氧化应激对脓毒症机体的损伤,研究发现,应用依达拉奉能明显减轻氧化应激诱导的脂质过氧化反应,其抗脂质过氧化能力明显比地塞米松好;地塞米松也表现出一定的抗氧化能力,但其抗氧化能力可能是由于它的抗炎效果而不是因为它的直接抗氧化所产生的。抗氧化治疗能抑制

表 2 各组大鼠血清氧化应激指标及肺组织细胞 AI 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	MDA($\mu\text{mol/L}$)	T-AOC(U/mg)	AI
假手术组	10	2.949 \pm 0.397	13.062 \pm 1.694	2.17 \pm 1.17
模型组	10	5.434 \pm 0.360 ^a	6.920 \pm 0.618 ^a	25.90 \pm 3.61 ^b
地塞米松组	10	4.507 \pm 0.428 ^{ac}	8.754 \pm 0.706 ^{ac}	12.97 \pm 2.29 ^c
依达拉奉组	10	4.015 \pm 0.679 ^{ac}	9.530 \pm 1.421 ^{ac}	12.30 \pm 2.90 ^c
联合治疗组	10	3.711 \pm 0.133 ^{ac}	10.177 \pm 1.433 ^{ac}	8.04 \pm 2.34 ^c

注:与假手术组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$

氧化应激和随后炎症反应中炎症细胞因子的释放。

肺组织中中性粒细胞清除方式有坏死和凋亡两种。林丽娜等^[6]在实验中也发现,再灌注后肺组织细胞凋亡明显增加。在创伤领域里能导致细胞凋亡的因素有细菌感染、细胞因子、氧化应激和缺血/再灌注。在氧化应激反应及热休克时内皮细胞发生凋亡^[7]。Hussain 等^[8]研究发现,中性粒细胞凋亡与肺损伤密切相关,表现为在肺损伤转归后期,中性粒细胞凋亡开始增加,与炎症反应的消退相一致。尚东等^[9]研究发现,全身炎症反应综合征患者存在中性粒细胞的凋亡异常。本研究中发现,脓毒症肺损伤大鼠的肺组织中出现大量的凋亡细胞,用依达拉奉干预后凋亡细胞明显减少。

依达拉奉是一种自由基清除剂,具有自由基清除和抑制脂质过氧化的作用,对缺血/再灌注损伤多种脏器及组织有保护作用。依达拉奉被用于急性脑梗死患者的治疗,已发现其可抑制脑细胞的过氧化损伤,延迟神经细胞死亡,减轻脑缺血以及脑缺血引起的脑水肿和组织损伤^[10]。本研究中证实,依达拉奉能抑制氧化应激引起的脂质过氧化反应,增强机体的抗氧化能力;依达拉奉可通过抑制氧化应激反应,减轻脓毒症大鼠的炎症反应及感染引起的器官损伤,并能减少组织细胞的凋亡;而地塞米松作为外源性糖皮质激素,能在一定程度上缓解脓毒症机体损伤,并通过抑制炎症反应而使氧化应激损伤明显减轻。但糖皮质激素在脓毒症中的使用,临床上一直存在不同看法,主要是考虑到糖皮质激素的作用广泛,有可能造成免疫抑制及二重感染等严重副作用。而依达拉奉却没有这些副作用,但其确切的应用价值还要进一步探讨。

参考文献

[1] Tanaka M. Pharmacological and clinical profile of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotective agent.

Nippon Yakurigaku Zasshi, 2002, 119 (5):301-308.
 [2] Davis KA, Santaniello JM, He LK, et al. Burn injury and pulmonary sepsis; development of a clinically relevant model. J Trauma, 2004, 56 (2):272-278.
 [3] Delclaux C, Azoulay E. Inflammatory response to infectious pulmonary injury. Eur Respir J Suppl, 2003, 42: 10s-14s.
 [4] Jurmann MJ, Dammenhayn L, Schaefer HJ, et al. Pulmonary reperfusion injury: evidence for oxygen-derived free radical mediated damage and effects of different free radical scavengers. Eur J Cardiothorac Surg, 1990, 4(12):665-670.
 [5] 张英谦,刘建华,胡皓夫. 大黄对内毒素血症小鼠一氧化氮和丙二醛的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(2): 123-125.
 [6] 林丽娜,张圣恭,王万铁,等. 生脉注射液对兔肺缺血/再灌注损伤时细胞凋亡的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14(6):361-363.
 [7] Dayan CM, Elsegood KA, Maile R. FasL expression on epithelial cells; the Bottazzo-Feldman hypothesis revisited. Immunol Today, 1997, 18(5):203.
 [8] Hussain N, Wu E, Zhu L, et al. Neutrophil apoptosis during the development and resolution of oleic acid-induced acute lung injury in the rat. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998, 19(6): 867-874.
 [9] 尚东,齐清会,王宝枝,等. 中性粒细胞凋亡调控基因表达异常在全身炎症反应综合征中的作用. 中国危重病急救医学, 2007, 19(1):11-13.
 [10] Nakamura T, Kuroda Y, Yamashita S, et al. Edaravone attenuates brain edema and neurologic deficits in a rat model of acute intracerebral hemorrhage. Stroke, 2008, 39(2):463-469.

(收稿日期:2009-04-24)
(本文编辑:李银平)

甲型 H1N1 流感并发双侧气胸 1 例

(正文见737页)

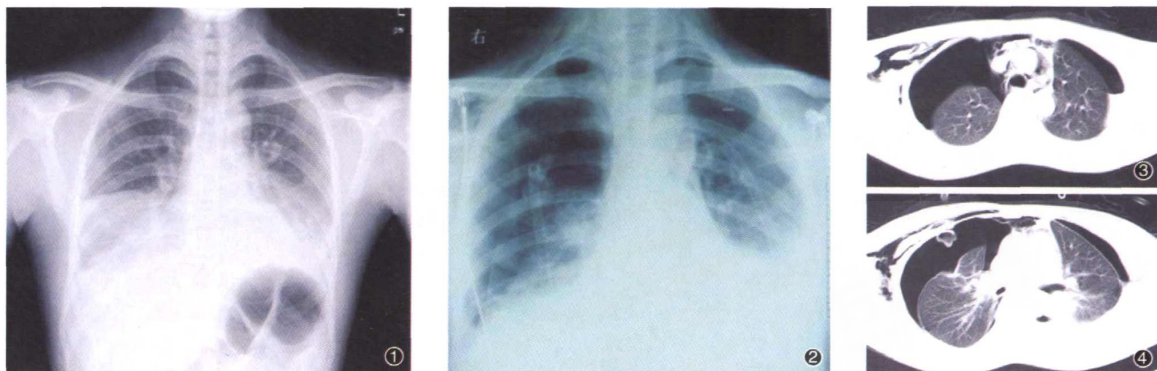


图1 2009年11月18日X线胸片示患者双肺可见模糊片状影, 双侧少量胸腔积液 图2 2009年11月26日X线胸片示患者双侧气胸 图3~4 2009年11月28日CT示患者双侧液气胸, 部分邻近肺组织不张, 纵隔积气, 双侧颈根部积气, 右侧胸壁软组织积气, 右肺中下叶及左肺见高密度影, 图3可见左侧堵塞的导管头, 图4右侧引流通畅, 仍有气胸

依达拉奉对脓毒症大鼠的保护作用研究

(正文见747页)

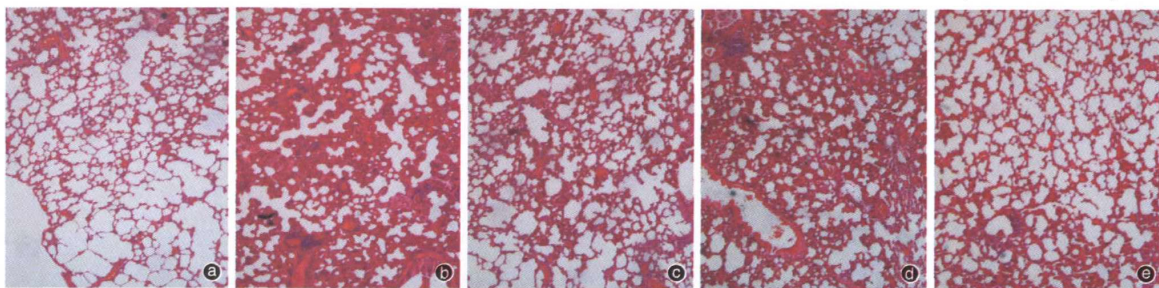


图1 光镜下观察各组大鼠肺组织病理改变 假手术组(a)肺间质及肺泡内无水肿、炎症, 肺泡干燥; 模型组(b)肺组织中可见明显的肺泡水肿, 大量炎性细胞浸润, 肺泡不张、出血, 肺泡间隔增宽; 地塞米松组(c)、依达拉奉组(d)和地塞米松联合依达拉奉组(e)肺组织中肺泡水肿, 中性粒细胞浸润, 肺泡不张、出血和肺泡间隔增宽均较模型组明显减轻 HE $\times 30$

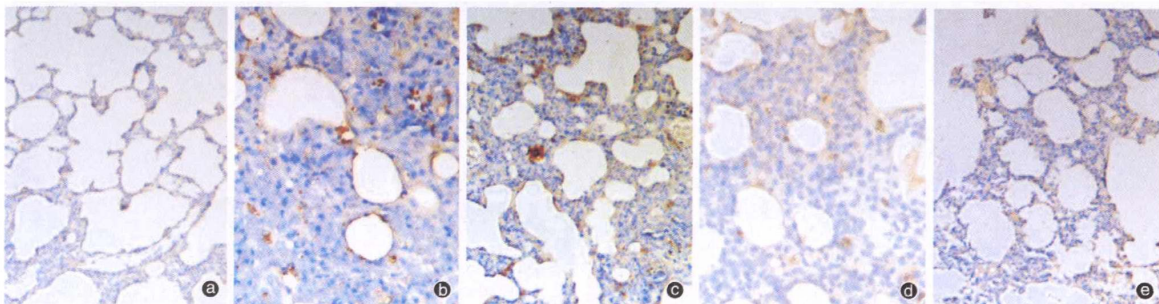


图2 光镜下观察各组大鼠肺组织细胞凋亡情况 假手术组(a)可见胞质阳性着色较少; 模型组(b)胞核有明显着色, 胞质亦见阳性着色; 地塞米松组(c)与依达拉奉组(d)胞核着色较模型组明显减少; 地塞米松联合依达拉奉组(e)凋亡细胞数量更少 TUNEL $\times 200$

甲型 H1N1 流感危重症 1 例成功救治体会

(正文见754页)

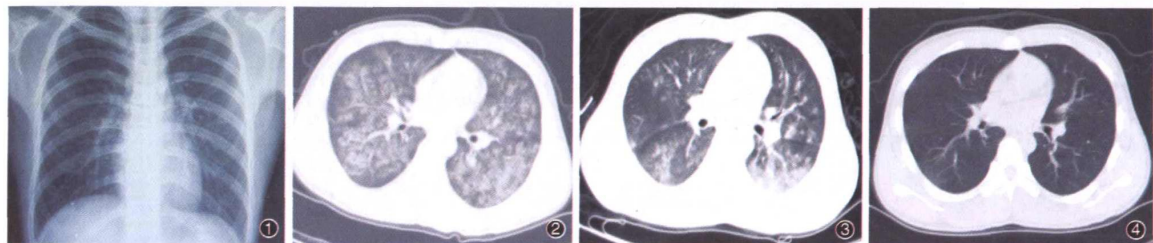


图1 2009年11月22日X线胸片示患者双肺清晰, 无明显异常 图2 2009年11月23日CT示患者双肺弥漫“毛玻璃”样改变 图3 2009年11月24日CT示患者肺部病灶较前有明显吸收 图4 2009年11月28日CT示患者肺部病灶完全吸收