

• 研究报告 •

超大剂量与常规剂量地塞米松对急性肺损伤大鼠肺保护作用的对比研究

甄洁 阎锡新 陈炜 赵磊 盛博 陆非平

【摘要】目的 探讨不同剂量地塞米松(DEX)对脂多糖(LPS)诱导急性肺损伤(ALI)大鼠的肺保护作用。**方法** 按照随机数字表法将 36 只健康雄性 SD 大鼠分为对照组、模型组、常规剂量 DEX 干预组和大剂量 DEX 干预组 4 组,每组 9 只。经尾静脉注射 LPS 8 mg/kg 制备 ALI 模型,对照组给予等量生理盐水;常规剂量和大剂量 DEX 干预组于制模后分别腹腔注射 DEX 1 mg/kg 及 8 mg/kg。制模后 4 h,光镜下观察肺组织病理学改变并进行组织学评分,计算肺湿/干质量(W/D)比值,测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中蛋白含量以及肺组织 Na^+-K^+ -ATP 酶活性。**结果** 模型组肺泡内可见纤维蛋白渗出和大量中性粒细胞浸润、肺泡间隔增宽、气道上皮细胞脱落及肺血管充血;给予常规剂量和大剂量 DEX 干预后肺组织病理学改变均较模型组明显改善,且病理评分明显降低(分: 10.15 ± 1.06 、 11.42 ± 1.53 比 12.39 ± 1.47 ,均 $P < 0.05$),但不同剂量 DEX 干预组间无差异。与对照组比较,模型组肺 W/D 比值、BALF 蛋白含量明显增高[肺 W/D 比值: 4.98 ± 0.28 比 4.32 ± 0.54 ,蛋白含量(g/L): 0.61 ± 0.12 比 0.24 ± 0.07 ,均 $P < 0.01$],肺组织 Na^+-K^+ -ATP 酶活性明显降低($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$): 4.24 ± 0.55 比 6.09 ± 0.52 , $P < 0.01$)。与模型组比较,常规剂量及大剂量 DEX 干预组肺 W/D 比值、BALF 蛋白含量均明显下降[肺 W/D 比值: 4.35 ± 0.27 、 4.59 ± 0.39 比 4.98 ± 0.28 ,蛋白含量(g/L): 0.34 ± 0.12 、 0.45 ± 0.11 比 0.61 ± 0.12 ,均 $P < 0.05$],肺组织 Na^+-K^+ -ATP 酶活性明显升高($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$): 5.19 ± 0.54 、 4.87 ± 0.45 比 4.24 ± 0.55 ,均 $P < 0.05$),但常规剂量与大剂量 DEX 干预组之间均无明显差异。**结论** DEX 可以明显改善 LPS 诱导的 ALI 模型大鼠肺损伤程度,但大剂量 DEX 对肺保护作用未显示出优势。

【关键词】 急性肺损伤; Na^+-K^+ -ATP 酶; 地塞米松

严重感染、休克、创伤等因素常可导致急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)。ALI/ARDS 的主要病理特点是肺泡上皮细胞和肺毛细血管内皮细胞损伤所致的弥漫性肺间质及肺泡水肿^[1]。在多种因素综合作用下,由于肺内液体渗出与吸收的动态平衡遭到破坏,形成肺水肿^[2]。目前研究认为,血管外肺水清除的主要机制可能是肺泡上皮细胞基膜侧的 Na^+-K^+ -ATP 酶参与的主动清除。而基础研究已证实,糖皮质激素可能通过调节肺水的生成和清除起到对肺组织的保护作用^[3],但目前对其应用价值、使用时机和疗效报道不一,尤其是针对糖皮质激素剂量选择的问题,学者们的研究结果也不尽相同^[4]。故本研究通过观察不同剂量地塞米松(DEX)对 ALI 大鼠 Na^+-K^+ -ATP 酶活性及肺组织病理学改变的影响,探讨其在 ALI 中对肺的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组及模型制备:健康雄性 SD 大鼠 36 只,体质量 250 ~ 300 g,购自河北医科大学动物中心,动物合格证号 703039。按随机数字表法分为对照组、模型组及常规剂量和大剂量 DEX 干预组 4 组,每组 9 只。采用尾静脉注射

大肠杆菌脂多糖(LPS) 8 mg/kg 制备 ALI 模型;对照组经尾静脉注射等量生理盐水。常规剂量及大剂量 DEX 干预组分别在制模后腹腔注射 DEX 1 mg/kg 及 8 mg/kg。

本实验动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 标本收集:于制模后 4 h 腹腔注射 10% 水合氯醛 4 mL/kg 麻醉大鼠,开胸取右肺组织,用于进行组织病理学观察并测定湿/干质量(W/D)比值及 Na^+-K^+ -ATP 酶活性;分离支气管进行气管插管,用无菌生理盐水灌洗左肺,回收支气管肺泡灌洗液(BALF),离心取上清液,用于测定蛋白含量。

1.2.2 肺 W/D 比值:取部分肺组织称湿质量后,于 80 °C 烤箱放置 48 h,取出称干质量,计算 W/D 比值。

1.2.3 肺组织病理学观察:取部分肺组织,用 10% 甲醛溶液固定 48 h,经过脱水、透明、浸蜡、包埋、切片后行苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理学改变并进行组织学评分。

1.2.4 BALF 蛋白含量测定:采用考马斯亮蓝法,设定空白管、标准管和测定管,按说明书步骤依次加入试剂,混匀后静置 10 min,紫外分光光度计(波长 595 nm,光径 1 cm)内空白管调零后,测定各管吸光度(A)值。按照公式计算 BALF 中蛋白含量。

蛋白含量 = 测定管 A 值 / 标准管 A 值 × 标准管浓度

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.12.015

基金项目:国家自然科学基金青年博士基金(2012-QB14)

作者单位:100038 首都医科大学附属北京世纪坛医院重症医学科(甄洁、陈炜、赵磊、盛博、陆非平);050000 石家庄,河北医科大学第二医院呼吸内科(阎锡新)

通信作者:陈炜, Email: hanwa@aliyun.com

1.2.5 肺组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性测定:按照 Na⁺-K⁺-ATP 酶测试盒(南京建成生物公司提供)说明书步骤操作。取 100 mg 肺组织,加 9 倍生理盐水配制成 10% 匀浆,离心取上清 0.2 mL 加入生理盐水稀释成 2% 的匀浆,用考马斯亮蓝试剂在紫外分光光度计(波长 660 nm,光径 1 cm)上测定肺组织匀浆的蛋白含量。

1.3 统计学分析:应用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),两两比较采用 Newman-Kuel 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺 W/D 比值比较(表 1):模型组肺 W/D 比值明显高于对照组 ($P < 0.01$)。不同剂量 DEX 干预组肺 W/D 比值较模型组明显下降(均 $P < 0.05$);大剂量 DEX 干预组肺 W/D 比值仍显著高于对照组 ($P < 0.05$),但常规剂量 DEX 组与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 不同剂量 DEX 对 ALI 大鼠肺 W/D 比值、BALF 蛋白含量及肺组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺 W/D 比值	蛋白含量 (g/L)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶活性 ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
对照组	9	4.32 ± 0.54	0.24 ± 0.07	6.09 ± 0.52
模型组	9	4.98 ± 0.28 ^a	0.61 ± 0.12 ^a	4.24 ± 0.55 ^a
常规剂量 DEX 组	9	4.35 ± 0.27 ^c	0.34 ± 0.12 ^c	5.19 ± 0.54 ^c
大剂量 DEX 组	9	4.59 ± 0.39 ^{bc}	0.45 ± 0.11 ^{bc}	4.87 ± 0.45 ^{bc}

注:肺 W/D 比值为肺湿/干质量比值, BALF 为支气管肺泡灌洗液, DEX 为地塞米松;与对照组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$;与模型组比较, ^c $P < 0.05$

2.2 肺组织病理学观察:对照组肺组织结构清楚,肺泡间隔均匀,肺泡内未见纤维蛋白渗出和中性粒细胞浸润。模型组肺组织可见大量纤维蛋白渗出、中性粒细胞浸润,肺泡间隔增宽、气道上皮细胞脱落、肺血管内充血。常规剂量和大剂量 DEX 干预组肺组织病理改变有不同程度改善,且病理评分均较模型组明显降低(分:10.15 ± 1.06、11.42 ± 1.53 比 12.39 ± 1.47,均 $P < 0.05$),但两个剂量 DEX 干预组间无明显差异 ($P > 0.05$)。

2.3 BALF 蛋白含量比较(表 1):模型组 BALF 蛋白含量较对照组明显升高 ($P < 0.01$)。不同剂量 DEX 干预组 BALF 蛋白含量均较模型组明显降低(均 $P < 0.05$);常规剂量 DEX 组已降至对照组水平 ($P > 0.05$),而大剂量 DEX 组仍显著高于对照组 ($P < 0.05$),但两个剂量 DEX 干预组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 肺组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶水解活性比较(表 1):模型组 Na⁺-K⁺-ATP 酶水解活性较对照组明显降低 ($P < 0.01$)。不同剂量 DEX 干预组 Na⁺-K⁺-ATP 酶水解活性均较模型组明显升高(均 $P < 0.05$);常规剂量 DEX 组已升至对照组水平 ($P > 0.05$),而大剂量 DEX 组仍显著低于对照组 ($P < 0.05$),但两个剂量干预组之间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

ALI/ARDS 是临床上较为常见的急危重症,是严重感染、创伤、上腹部大手术、急性胰腺炎等诱因引起机体全身免疫炎症反应过程中的不同阶段。虽然目前对其发病机制的认识已较为深入,加之治疗策略有了较大的进展,但其病死率仍居高不下^[5]。

目前研究证实,ALI/ARDS 发病机制错综复杂,主要是内毒素通过活化炎性细胞诱发肺部失控的炎症反应,从而引起肺泡-毛细血管弥漫性损伤^[6],主要病理基础是肺水肿的形成。在肺水生成及清除过程中,位于肺泡上皮细胞膜上的跨膜蛋白 Na⁺-K⁺-ATP 酶参与的主动转运起到了重要作用。而糖皮质激素可以通过多种途径上调 Na⁺-K⁺-ATP 酶功能,增加 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性,促进肺水清除^[7-8]。本研究结果显示,模型组大鼠出现了明显的肺水肿表现,而且肺组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性显著低于对照组。但在 DEX 干预后,肺组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性显著高于模型组,提示糖皮质激素对 ALI 模型大鼠肺组织有着积极的保护作用。

虽然在 ALI/ARDS 诊断和治疗指南中糖皮质激素不作为常规推荐用于治疗 ARDS,但大量动物实验表明,糖皮质激素对肺损伤动物模型的保护作用是确切的,而在 ARDS 临床治疗中,糖皮质激素应用的时机和剂量亦是研究的热点。

糖皮质激素的剂量一直是令人困惑的临床难点,目前多主张的小剂量为氢化可的松 200 ~ 300 mg/d,而大剂量糖皮质激素一直没有明确定量。本研究为了观察不同剂量 DEX 干预 ALI 效果的异同,将常规剂量 DEX (相当于氢化可的松 200 ~ 300 mg/d) 与 8 倍剂量的超大剂量 DEX 进行对比,结果显示,两种剂量 DEX 均能明显降低 ALI 大鼠肺 W/D 比值及 BALF 蛋白含量,增加肺组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性,明显改善肺组织病理损伤程度;但超大剂量 DEX 并未显示出更明显的改善作用,也未发现有明显的剂量依赖效应。

现有的动物实验已证实,常规剂量 DEX 通过抑制多种炎症介质水平,改善肺组织的炎症程度,从而提高生存率^[9]。梁玲^[10]研究表明,小剂量 DEX 可抑制血管内皮细胞凋亡,从而改善肺组织毛细血管通透性,减少血浆漏入组织间隙,达到肺毛细血管内皮细胞的保护作用,从而减轻肺组织水肿和炎症程度;周涛等^[11]实验研究也证明了小剂量激素对大鼠 ALI 的保护作用最佳,并且发现激素剂量无依赖效应,这与本实验得出的结论是一致的。临床研究也已证实,ARDS 患者应用持续、低剂量激素治疗可降低病死率,并不增加感染率^[12]。

多个多中心随机双盲临床研究发现,ALI 时应用大剂量糖皮质激素弊大于利,在 ALI/ARDS 早期,短期应用大剂量糖皮质激素组的并发症发生率显著高于对照组,有些研究甚至发现大剂量糖皮质激素治疗组的病死率高于对照组^[13-15]。在本研究中,与模型组相比,给予 8 mg/kg 超大剂量 DEX 干预后,虽然可以改善肺组织病理损伤程度,减少肺 W/D 比值和 BALF 中蛋白含量,增加肺组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性,但与常规剂量 DEX 干预组相比不仅未表现出进一步的优势,

反而出现 BALF 中蛋白增高、肺组织 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶活性降低,提示糖皮质激素对 ALI 动物模型的保护作用不存在剂量依赖效应。在临床实践中同样发现,大剂量激素在治疗 ALI/ARDS 的过程中并未体现出更好的保护作用,反而增加了病死率^[16],推测因为糖皮质激素只有通过激活激素受体形成受体-激素复合物,才能由细胞质进入到细胞核,发挥转录调控生物学效应。

目前研究已证实糖皮质激素在 ALI 中的抗炎机制有:

① 促进肺泡上皮细胞膜上的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶去磷酸化,激活其转运活性,增加肺泡内液体的吸收^[17-18];② 维持肺泡表面活性物质的活性,减少肺泡萎缩导致的肺内分流^[19];③ 保护肺泡毛细血管膜的完整性,并降低其通透性,从而减少肺泡透明膜和肺间质内水肿的形成^[20];④ 减少各类促炎细胞因子的表达,从而减轻肺组织损伤的程度^[21]。

由于糖皮质激素受体 (GR) 的结合位点数量是有限的,而在 ALI 时 GR 的结合容量和结合活性均下降^[22-23],因此,当糖皮质激素与 GR 全部结合已经发挥最大效应时^[24],即使再增加激素剂量也不会增加效应。杨洁等^[25]的实验表明,糖皮质激素对 GR 呈现双向调节作用,较小剂量时可上调 GR 的表达,大剂量时反而抑制 GR 的表达,增加对 GR 的反向调节和全身免疫抑制等不良反应。Folkesson 等^[26]的实验结果亦表明,在脓毒症期间,GR 表达下调,而由 GR 介导的 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶表达也下调,因此,即使增加激素剂量也不能提高 $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶的活性。另外,一项多个前瞻性随机双盲对照临床研究结果显示,与小剂量组比较,大剂量甲泼尼龙 ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 6 h 1 次) 或等剂量地塞米松冲击治疗非但不能控制 ARDS 的发生发展,而且病死率和感染风险增加,应激性溃疡等副作用发生率也均明显增高^[27-29]。本研究初步证实了常规剂量糖皮质激素对 ALI 大鼠模型肺组织的保护作用明确的,不需要增加更多的剂量,这为临床医生治疗 ARDS 提供了有益的治疗思路和剂量选择,从而避免大剂量糖皮质激素所带来的临床不必要的副作用。

参考文献

[1] 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) [J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18 (12): 706-710.

[2] 陈文彬. ARDS 渗透性肺水肿的形成及肺心功能的改变 [J]. 中国实用内科杂志, 1997, 17 (10): 577-579.

[3] 成勤, 刘苏, 张茂银, 等. 糖皮质激素受体对内毒素性急性肺损伤大鼠的保护作用及机制 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2010, 31 (6): 513-517.

[4] 常立国, 彭守春, 李永春. 糖皮质激素对急性肺损伤的治疗进展 [J]. 中国全科医学, 2006, 9 (8): 684-686.

[5] Rocco PR, Zin WA. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different? [J]. Curr Opin Crit Care, 2005, 11 (1): 10-17.

[6] 徐丽艳, 刘瑶, 韩文文, 等. 生长抑素对内毒素致小鼠急性肺损伤中炎症反应的影响和机制 [J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (5): 315-320.

[7] 丁新民, 段蕴铀, 彭朝胜, 等. 地塞米松对海水淹溺性肺损伤兔肺水肿吸收的影响 [J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15 (9): 801-804.

[8] 李家琼, 邱海波. 肺泡上皮细胞钠泵清除急性肺损伤时肺泡内液体的研究进展 [J]. 国外医学呼吸系统分册, 2005, 25 (7): 496-499.

[9] 高婧, 梁显泉. 地塞米松对黄磷吸入致急性肺损伤大鼠的治疗作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2009, 21 (11): 688-689.

[10] 梁玲. 创建急性肺损伤模型探讨小剂量地塞米松对肺脏的保护作用 [J]. 重庆医科大学学报, 2006, 31 (5): 747-749.

[11] 周涛, 樊寻梅, 王永清, 等. 不同剂量氢化可的松对大肠杆菌致休克早期大鼠肺损伤的影响 [J]. 中华儿科杂志, 2004, 42 (9): 644-648.

[12] 马钧. 急性呼吸窘迫综合征患者糖皮质激素合理使用方案及受体机制 [J]. 中国危重病急救医学, 2003, 15 (11): 680-682.

[13] Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, et al. High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome [J]. N Engl J Med, 1987, 317 (25): 1565-1570.

[14] Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164 (10 Pt 1): 1896-1903.

[15] Peter JV, John P, Graham PL, et al. Corticosteroids in the prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in adults: meta-analysis [J]. BMJ, 2008, 336 (7651): 1006-1009.

[16] Matthay MA, Folkesson HG, Clerici C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema [J]. Physiol Rev, 2002, 82 (3): 569-600.

[17] 何国鑫, 汤旭明, 郑霞, 等. 血必净注射液对急性有机磷农药中毒大鼠膈肌 ATP 酶活性的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (1): 55-57.

[18] Cole TJ, Solomon NM, Van Driel R, et al. Altered epithelial cell proportions in the fetal lung of glucocorticoid receptor null mice [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2004, 30 (5): 613-619.

[19] 李娜, 陆士奇. 糖皮质激素在百草枯致急性肺损伤中应用的研究进展 [J]. 中国急救医学, 2008, 28 (2): 170-172.

[20] 高婧, 杨艳荣, 梁显泉. 人肺泡 II 型上皮细胞表面抗原在急性呼吸窘迫综合征患者中的变化及地塞米松的保护作用 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2012, 19 (2): 83-85.

[21] Kenyon NJ, Albertson T. Steroids and sepsis: time for another reevaluation [J]. J Intensive Care Med, 2002, 17 (2): 68-74.

[22] 张红金, 刘娇, 吴相伟, 等. 大黄对烫伤后脓毒症大鼠糖皮质激素受体表达和外周血淋巴细胞的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2014, 21 (3): 186-189.

[23] 张民, 熊仁平, 陈星云, 等. 小鼠急性肺损伤后糖皮质激素受体的活性改变与热休克蛋白的关系 [J]. 南方医科大学学报, 2008, 28 (5): 725-728.

[24] 宫钦志, 朱诚, 徐仁宝. 大剂量糖皮质激素减轻大鼠创伤性脑水肿的受体机制 [J]. 中国病理生理杂志, 1996, 12 (4): 384-386.

[25] 杨洁, 吴大玮, 唐琳娜, 等. 比较不同剂量地塞米松对小鼠脓毒症致急性肾损伤的保护作用 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (7): 424-428.

[26] Folkesson HG, Norlin A, Wang Y, et al. Dexamethasone and thyroid hormone pretreatment upregulate alveolar epithelial fluid clearance in adult rats [J]. J Appl Physiol (1985), 2000, 88 (2): 416-424.

[27] Meduri GU, Headley AS, Golden E, et al. Effect of prolonged methylprednisolone therapy in unresolving acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial [J]. JAMA, 280 (2): 159-165.

[28] Meduri GU, Golden E, Freire AX, et al. Methylprednisolone infusion in early severe ARDS: results of a randomized controlled trial [J]. Chest, 2007, 131 (4): 954-963.

[29] Bernard GR, Luce JM, Sprung CL, et al. High-dose corticosteroids in patients with the adult respiratory distress syndrome [J]. N Engl J Med, 1987, 317 (25): 1565-1570.

(收稿日期: 2014-06-30)

(本文编辑: 李银平)