

氯化钡预处理对急性呼吸窘迫综合征小鼠的肺保护作用

王艳雪¹ 杨洪娜^{1,2} 李文玉¹ 于孝义¹ 王春亭¹ 方巍¹

¹ 山东第一医科大学附属省立医院重症医学科, 济南 250101; ² 山东大学, 济南 250101

通信作者: 方巍, Email: doctorfang@163.com

【摘要】目的 探讨氯化钡(BaCl₂)预处理是否对脂多糖(LPS)诱导的急性呼吸窘迫综合征(ARDS)小鼠具有保护作用及其可能的作用机制。**方法** 将60只8~12周龄健康C57BL/6雄性小鼠随机分为假手术组、ARDS模型组和BaCl₂预处理组,每组20只。BaCl₂预处理组提前3d连续经尾静脉注射BaCl₂4mg/kg,其余两组不进行预处理。采用气管内滴注LPS3mg/kg的方法制备小鼠ARDS模型;假手术组则给予等体积0.9%生理盐水。制模成功后24h,将部分小鼠处死取肺组织,分离右肺下叶于光镜下观察各组小鼠肺组织病理改变,取小鼠剩余肺组织称重,观察各组小鼠肺组织湿/干质量(W/D)比值;部分小鼠经尾静脉注射伊文思蓝(EB),2h后处死取肺组织,观察肺微血管通透性变化;剩余小鼠行肺泡灌洗,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平变化。**结果** 与假手术组比较,ARDS模型组小鼠表现出典型的ARDS病理变化,该组小鼠肺W/D比值明显升高(4.951±0.161比3.449±0.299, $P<0.01$),每克肺组织中EB含量明显增加($\mu\text{g/g}$:0.130±0.027比0.085±0.011, $P<0.01$),光镜下显示肺泡壁结构被明显破坏、肺淤血及肺泡内渗出液明显增多、炎症细胞大量浸润,肺损伤病理评分明显升高(分:10.33±1.15比1.67±0.58, $P<0.01$),BALF中TNF- α 水平明显升高(ng/L:900.85±247.80比68.21±5.79, $P<0.01$)。与ARDS模型组比较, BaCl₂预处理组小鼠肺W/D比值明显降低(4.620±0.125比4.951±0.161, $P<0.01$),每克肺组织中EB含量明显减少($\mu\text{g/g}$:0.108±0.011比0.130±0.027, $P<0.01$),光镜下显示肺组织损伤程度较ARDS模型组减轻,肺损伤病理评分明显降低(分:5.00±1.00比10.33±1.15, $P<0.01$),BALF中TNF- α 水平明显降低(ng/L:169.16±73.33比900.85±247.80, $P<0.01$)。**结论** BaCl₂预处理可通过减轻肺毛细血管通透性和局部炎症反应改善LPS诱导的ARDS模型小鼠的肺组织病理学改变,对ARDS小鼠具有保护作用。

【关键词】 急性呼吸窘迫综合征; 急性肺损伤; 脂多糖; 氯化钡

基金项目: 国家自然科学基金(81701057)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20221020-00932

Protective effect of barium chloride pretreatment on lung in mice with acute respiratory distress syndrome

Wang Yanxue¹, Yang Hongna^{1,2}, Li Wenyu¹, Yu Xiaoyi¹, Wang Chunting¹, Fang Wei¹

¹Department of Critical Care Medicine, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong First Medical University, Jinan 250101, Shandong, China; ²Shandong University, Jinan 250101, Shandong, China

Corresponding author: Fang Wei, Email: doctorfang@163.com

【Abstract】 Objective To explore whether barium chloride (BaCl₂) preconditioning has the protective effect on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) model in mice and the possible mechanism. **Methods** Sixty 8–12 week old healthy C57BL/6 male mice were randomly divided into control group, ARDS model group and BaCl₂ pretreatment group, with 20 mice in each group. The BaCl₂ pretreatment group was continuously injected with BaCl₂ (4 mg/kg through the tail vein) for 3 days before ARDS model establishment. ARDS model was established by intratracheally injecting (3 mg/kg) LPS. The control group was intratracheally given the same volume of 0.9% normal saline. On 24th hour after ARDS model establishment, some mice were sacrificed for obtaining fresh lung tissue. And the right lower lobe of the lung was separated for observing the pathological changes of lung tissue while the left lung tissue was used to measure the wet/dry weight ratio (W/D) of the lung. Some mice were sacrificed for observing pulmonary microvascular permeability at 2nd hours after injecting Evans blue (EB) through tail vein. The left mice were killed for alveolar lavage to measure the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) via enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Comparing with the control group, ARDS model group showed typical ARDS pathological changes, which included the increased W/D ratio (4.951±0.161 vs. 3.449±0.299, $P<0.01$) and the content of EB in the lung tissue ($\mu\text{g/g}$: 0.130±0.027 vs. 0.085±0.011, $P<0.01$), the damaged alveolar wall structure, lung congestion and exudates in the alveoli, as well as amounts of inflammatory cells. The pathological score of lung injury (10.33±1.15 vs. 1.67±0.58) and the level of TNF- α in BALF (ng/L: 900.85±247.80 vs. 68.21±5.79) were significantly increased in the ARDS model group (both $P<0.01$). Comparing with the ARDS model group, the lung W/D ratio (4.620±0.125 vs. 4.951±0.161) and the EB content in the lung tissue ($\mu\text{g/g}$: 0.108±0.011 vs. 0.130±0.027)

of BaCl₂ pretreatment group were significantly reduced (both $P < 0.01$). And the damaged pulmonary structural BaCl₂ pretreatment group were significantly alleviated. In addition, the pulmonary pathological score (5.00 ± 1.00 vs. 10.33 ± 1.15) and the level of TNF- α in BALF (ng/L: 169.16 ± 73.33 vs. 900.85 ± 247.80) were significantly decreased (both $P < 0.01$). **Conclusion** Barium chloride pretreatment can improve the lung histopathological changes of ARDS model mice induced by LPS by reducing the permeability of pulmonary capillaries and local inflammatory reaction. Barium chloride has the protective effect against LPS attack in mice model of ARDS.

【Key words】 Acute respiratory distress syndrome; Acute lung injury; Lipopolysaccharide; Barium chloride

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81701057)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20221020-00932

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是指由不同原因引起的以顽固性低氧血症 [氧合指数 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) < 300 mmHg; $1 \text{ mmHg} \approx 0.133 \text{ kPa}$] 为显著特征的临床综合征。在全球范围内, ARDS 占重症监护病房 (intensive care unit, ICU) 入院患者的 10%, 其病死率可高达 40% 左右^[1-2]。目前对 ARDS 的治疗尚无特效方法, 主要以对症支持治疗为主, 因此仍需我们继续探索相关治疗措施。有研究表明, 内向整流钾离子通道 2.1 (inward rectifier K⁺ channel, Kir2.1) 是由 KCNJ 基因转录翻译的阳离子通道家族成员之一, 广泛表达于内皮细胞^[3]。当膜电位介于钾离子 (K⁺) 平衡电位与静息膜电位之间时, Kir2.1 不允许正常 K⁺ 内流, 只允许少量 K⁺ 外流, 从而使内皮细胞膜超极化, 激活内皮细胞上的非电压依赖性钙通道, 增加血管通透性^[4]。既往研究证实, 脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 在体外可以使小鼠肺微血管内皮细胞 Kir2.1 通道高表达, 而氯化钡 (BaCl₂) 可阻断 Kir2.1 通道高表达; ARDS 主要病理生理特征是由肺部弥漫性炎症病变导致的急性肺损伤及肺上皮细胞和内皮细胞通透性增加引起的肺泡毛细血管屏障破坏, 从而导致肺水肿^[5]。因此, 推测 BaCl₂ 可能通过阻断 Kir2.1 通道从而减轻肺泡内皮细胞通透性, 改善病情。本研究经气管内滴注 LPS 建立小鼠 ARDS 模型^[6], 术前连续 3 d 经尾静脉注射 BaCl₂ 溶液, 以验证 BaCl₂ 能否改善 ARDS 所致肺损伤, 现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及准备: 选用健康 C57BL/6 雄性小鼠, 8~12 周龄, 体质量 (22 ± 3) g, 均购自济南朋悦实验动物繁育有限公司 [许可证号: SCXK (鲁) 20190003, 动物合格证号: 370726211100344978]。实验用小鼠均饲养于山东第一医科大学附属省立医院实验动物中心普通清洁环境 (每笼 5 只), 室内温度维持在 (22 ± 2) °C, 湿度维持在 (40 ± 5) %, 人工 12 h 昼夜循环, 术前适应性喂养 1 周, 自由获取食物

(相同的标准饲料) 和水。

1.2 实验动物分组及处置: 采用随机数字表法将 60 只小鼠分为假手术组、ARDS 模型组和 BaCl₂ 预处理组, 每组 20 只。BaCl₂ 预处理组提前 3 d 连续经尾静脉注射 BaCl₂ 4 mg/kg; 其余两组不进行预处理。采用气管内滴注 LPS 3 mg/kg 的方法制备小鼠 ARDS 模型^[6]; 假手术组则气管内滴注等体积 0.9% 生理盐水。经观察小鼠出现活动能力减弱、眼周分泌物增多、毛发稀疏、呼吸急促等改变判定为模型制备成功。制模成功后 24 h, 部分小鼠处死取肺组织, 部分小鼠在处死前 2 h 经尾静脉注射伊文思蓝 (Evans blue, EB), 部分小鼠在处死前行肺泡灌洗收集支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF)。

所有动物的实验操作均严格遵守实验动物管理条例, 并征得山东第一医科大学附属省立医院动物实验伦理委员会许可 (审批号: 2021-600)。

1.3 样本采集及观察指标

1.3.1 肺湿/干质量比值 (wet/dry weight ratio, W/D): 取小鼠肺组织冲洗、吸干水分, 称湿重, 之后置于 80 °C 烤箱 48 h, 连续称重 3 次, 直至肺重量不再变化, 视为干重, 计算肺 W/D 比值。

1.3.2 肺损伤病理评分: 取小鼠肺组织置于 4% 多聚甲醛固定液中, 4 °C 避光保存 2~3 d, 经脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色等步骤, 光镜下观察小鼠肺组织病理损伤变化并进行肺损伤病理评分^[7], 从肺泡间隔增厚、中性粒细胞浸润、肺泡水肿、肺泡淤血 4 个方面进行半定量评分, 其中无病变或病变轻微为 0 分、轻度病变为 1 分、中度病变为 2 分、重度病变为 3 分, 总赋值 12 分, 分值越高表示肺损伤越严重。

1.3.3 肺微血管通透性: 向小鼠尾静脉注射 0.5% EB 12 mL/kg, 1 h 后麻醉小鼠进行肺循环灌流, 直至左心耳流出液体由蓝黑色变透明, 称取 100 mg 小鼠肺组织, 用 2 mL 50% 三氯乙酸 (trichloroacetic acid,

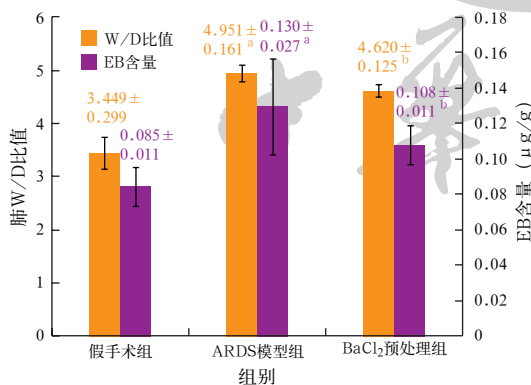
TCA)充分匀浆、离心,取1 mL上清与3 mL无水乙醇混合,分别在波长620 nm和680 nm处用酶标仪测量吸光度(absorbance, A)值,用零校标准品配制梯度浓度(50~1 000 μg/L)的EB溶液,并测量其A值以绘制标准曲线(线性关系),参照标准曲线计算每克肺组织的EB含量,用于表示肺微血管通透性^[8]。

1.3.4 BALF中肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)含量:收集小鼠BALF置于1.5 mL小离心管中,以3 000 r/min(离心半径10.1 cm)离心5 min取上清,采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunoadsorbent assay, ELISA)试剂盒检测BALF中TNF-α含量。

1.4 统计学处理:使用Graphpad Prism 9.0.0软件分析并作图。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,将数据进行正态性检验和方差齐性分析,方差齐时,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),然后进行Newman-Keuls检验,采用Tukey法进行组间多重比较;方差不齐时则采用Brown-Forsythe进行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BaCl₂对小鼠肺W/D比值的影响(图1):与假手术组比较,ARDS模型组小鼠肺W/D比值明显升高($P < 0.01$);与ARDS模型组比较,BaCl₂预处理组小鼠肺W/D比值明显降低($P < 0.01$),提示BaCl₂可以减轻ARDS小鼠肺组织水肿。



注:ARDS为急性呼吸窘迫综合征,BaCl₂为氯化钡,EB为伊文思蓝;与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与ARDS模型组比较,^b $P < 0.01$

图1 各组小鼠肺组织湿/干质量(W/D)比值及肺微血管通透性比较

2.2 BaCl₂对小鼠肺微血管通透性的影响(图1):与假手术组比较,ARDS模型组小鼠每克肺组织中EB含量明显增加($P < 0.01$),表明小鼠肺微血管通

透性增加;与ARDS模型组比较,BaCl₂预处理组小鼠每克肺组织中EB含量明显减少($P < 0.01$),提示BaCl₂可以改善ARDS小鼠肺微血管通透性。

2.3 BaCl₂对小鼠肺组织病理损伤的影响(图2~3):光镜下显示,假手术组小鼠肺组织结构正常;ARDS模型组小鼠肺组织可见明显损伤,肺损伤病理评分较假手术组明显升高($P < 0.01$);BaCl₂预处理组小鼠肺组织损伤程度较ARDS模型组减轻,肺损伤病理评分明显降低($P < 0.01$),提示BaCl₂预处理对ARDS小鼠肺组织具有一定保护作用。

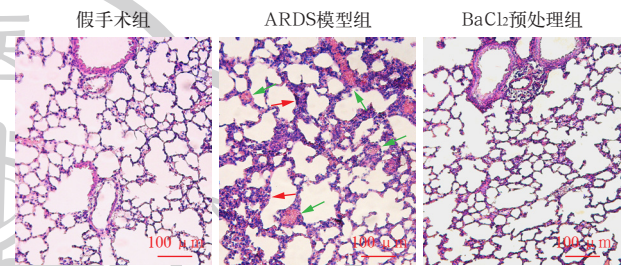
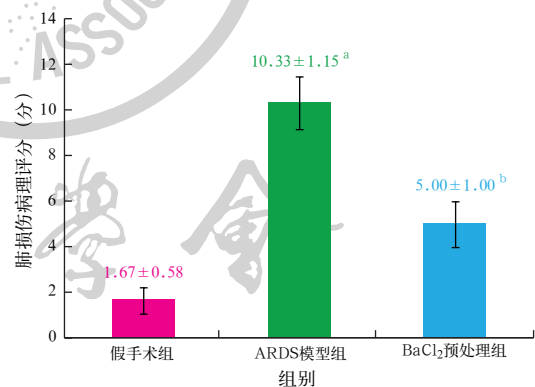


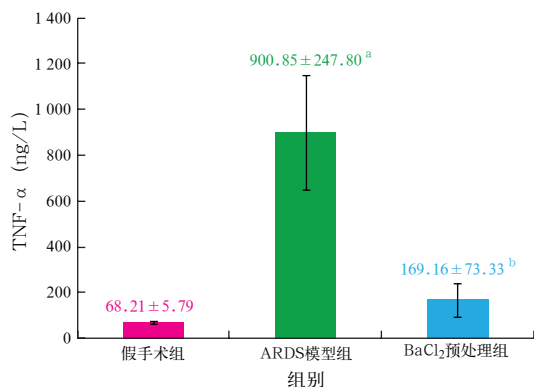
图2 光镜下观察各组小鼠肺组织病理改变 假手术组小鼠肺组织结构正常,肺泡间隔无增厚、水肿及肺泡淤血,未见炎症细胞浸润;急性呼吸窘迫综合征(ARDS)模型组小鼠肺组织可见明显肺泡破坏及肺泡间隔增厚(红色箭头所示),伴有明显水肿及肺泡淤血(绿色箭头所示),肺间质伴有大量炎症细胞浸润;氯化钡(BaCl₂)预处理组小鼠肺泡内淤血及渗出减少,肺泡间隔变薄,肺间质炎症细胞渗出减少 苏木素-伊红(HE)染色 中倍放大



注:ARDS为急性呼吸窘迫综合征,BaCl₂为氯化钡;与假手术组比较,^a $P < 0.01$;与ARDS模型组比较,^b $P < 0.01$

图3 各组小鼠肺损伤病理评分比较

2.4 BaCl₂对小鼠BALF中炎症因子TNF-α含量的影响(图4):与假手术组比较,ARDS模型组小鼠BALF中TNF-α含量明显升高($P < 0.01$);与ARDS模型组比较,BaCl₂预处理组小鼠BALF中TNF-α含量明显降低($P < 0.01$),提示BaCl₂可以改善LPS诱导的ARDS小鼠的炎症因子表达。



注: BALF 为支气管肺泡灌洗液, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ; ARDS 为急性呼吸窘迫综合征, BaCl₂ 为氯化钡; 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$; 与 ARDS 模型组比较, ^b $P < 0.01$

图4 各组小鼠BALF中TNF- α 含量比较

3 讨论

ARDS 是一种肺部弥漫性炎症损伤,可引起肺微血管通透性增加,导致弥漫性肺水肿及肺组织顽固性缺氧。LPS 诱导的 ARDS 动物模型是研究疾病分子机制和探索新治疗方法最常见及最重要的动物模型^[9]。本实验通过气管内滴注 LPS 的方法成功制备小鼠 ARDS 模型。

本研究显示,给予 BaCl₂ 预处理可以明显改善 LPS 诱导的 ARDS 模型小鼠肺 W/D 比值和肺组织病理损伤。有研究已证实,肺泡上皮损伤和血管通透性增加对肺水肿的形成至关重要,并且被认为是 ARDS 发生的标志^[10-11]。当膜电位介于 K⁺ 平衡电位与静息膜电位之间时, Kir2.1 不允许正常 K⁺ 内流,只允许少量 K⁺ 外流,从而使细胞膜超极化,激活内皮细胞上的电压依赖性钙通道,促进钙离子 (Ca²⁺) 内流,增加血管通透性^[4]。Lin 等^[12] 通过延长激动剂诱导啮齿类动物血管内皮细胞超极化,可使 Ca²⁺ 进入细胞内的驱动力增强,从而增加微血管通透性。Kir2.1 通道也被发现在肺血管内皮细胞上表达,在调节肺血管张力、改变肺血管通透性方面起重要作用^[13],而 Kir2.1 通道的这种作用可以被 BaCl₂ 抑制^[14]。因此,本研究借助 EB 渗透实验观察小鼠肺毛细血管通透性的变化,结果表明,ARDS 模型组小鼠 EB 渗出增多,通透性明显增加;而经 BaCl₂ 处理后,EB 通透性显著下降,提示 BaCl₂ 通过改变肺毛细血管通透性发挥其保护作用。

有研究表明, TNF- α 作为一种早期炎症反应因子,可以引发进一步炎症反应^[15], LPS 可以直接或通过 TNF- α 等介导,上调内皮表面黏附分子的表达,增加原位趋化因子的产生,从而促进肺脏的

炎症反应^[16]。因此, TNF- α 是 ARDS 患者肺组织中具有生物活性的细胞因子,能够增加肺上皮通透性^[17]。本研究采用 ELISA 试剂盒检测各组小鼠 BALF 中 TNF- α 水平,结果显示, ARDS 模型组小鼠 BALF 中 TNF- α 水平较假手术组小鼠明显升高,而 BaCl₂ 预处理则可以明显降低 ARDS 模型小鼠的 TNF- α 水平。

综上,本研究结果表明, BaCl₂ 预处理通过降低肺毛细血管通透性和 BALF 中 TNF- α 水平,可以明显缓解 LPS 导致的肺组织损伤,上述结果为未来寻找 ARDS 的治疗方法提供了新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Fan E, Brodie D, Slutsky AS. Acute respiratory distress syndrome: advances in diagnosis and treatment [J]. JAMA, 2018, 319 (7): 698-710. DOI: 10.1001/jama.2017.21907.
- [2] 赵峰, 沈子渊, 杨翠, 等. LPS 评分联合 APACHE II 评分和氧合指数预测 ARDS 发生模型的建立和验证 [J]. 中华危重病急救医学, 2022, 34 (10): 1048-1054. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220930-00883.
- [3] Nehring RB, Wischmeyer E, Döring F, et al. Neuronal inwardly rectifying K⁺ channels differentially couple to PDZ proteins of the PSD-95/SAP90 family [J]. J Neurosci, 2000, 20 (1): 156-162. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-01-00156.2000.
- [4] He P, Curry FE. Endothelial cell hyperpolarization increases [Ca²⁺]_i and venular microvessel permeability [J]. J Appl Physiol (1985), 1994, 76 (6): 2288-2297. DOI: 10.1152/jappl.1994.76.6.2288.
- [5] Huppert LA, Matthay MA, Ware LB. Pathogenesis of acute respiratory distress syndrome [J]. Semin Respir Crit Care Med, 2019, 40 (1): 31-39. DOI: 10.1055/s-0039-1683996.
- [6] D'Alessio FR. Mouse models of acute lung injury and ARDS [J]. Methods Mol Biol, 2018, 1809: 341-350. DOI: 10.1007/978-1-4939-8570-8_22.
- [7] Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 44 (5): 725-738. DOI: 10.1165/ajrmb.2009-0210ST.
- [8] Uyama O, Okamura N, Yanase M, et al. Quantitative evaluation of vascular permeability in the gerbil brain after transient ischemia using Evans blue fluorescence [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1988, 8 (2): 282-284. DOI: 10.1038/jcbfm.1988.59.
- [9] Chen H, Bai CX, Wang XD. The value of the lipopolysaccharide-induced acute lung injury model in respiratory medicine [J]. Expert Rev Respir Med, 2010, 4 (6): 773-783. DOI: 10.1586/ers.10.71.
- [10] Fein A, Grossman RF, Jones JC, et al. The value of edema fluid protein measurement in patients with pulmonary edema [J]. Am J Med, 1979, 67 (1): 32-38. DOI: 10.1016/0002-9343(79)90066-4.
- [11] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome [J]. N Engl J Med, 2000, 342 (18): 1334-1349. DOI: 10.1056/NEJM200005043421806.
- [12] Lin MT, Jian MY, Taylor MS, et al. Functional coupling of TRPV4, IK, and SK channels contributes to Ca²⁺-dependent endothelial injury in rodent lung [J]. Pulm Circ, 2015, 5 (2): 279-290. DOI: 10.1086/680166.
- [13] Hogg DS, McMurray G, Kozlowski RZ. Endothelial cells freshly isolated from small pulmonary arteries of the rat possess multiple distinct K⁺ current profiles [J]. Lung, 2002, 180 (4): 203-214. DOI: 10.1007/s004080000094.
- [14] Fang W, Xia L, Sun XX, et al. Lipopolysaccharides increase Kir2.1 expression in lung endothelial cells [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2018, 11 (6): 2959-2967.
- [15] 龚裕强, 陈毅军, 施小燕, 等. 不同途径茶多酚对兔急性呼吸窘迫综合征肺保护的研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2007, 14 (3): 154-158, 封3. DOI: 10.3321/j.issn:1008-9691.2007.03.008.
- [16] Souza-Fernandes AB, Pelosi P, Rocco PR. Bench-to-bedside review: the role of glycosaminoglycans in respiratory disease [J]. Crit Care, 2006, 10 (6): 237. DOI: 10.1186/cc5069.
- [17] Herrero R, Sanchez G, Lorente JA. New insights into the mechanisms of pulmonary edema in acute lung injury [J]. Ann Transl Med, 2018, 6 (2): 32. DOI: 10.21037/atm.2017.12.18.

(收稿日期: 2022-10-20)