

• 论著 •

内毒素预处理对大鼠急性肺损伤的影响

薛昀 吴新民 张生锁 张熙哲 付占利 张春丽

【摘要】 目的 探讨肺泡巨噬细胞核因子- κ B(NF- κ B)活性变化在内毒素所致大鼠急性肺损伤中的作用。**方法** Wistar 大鼠 36 只,12 只腹腔连续 3 d 注射脂多糖(LPS)0.5、0.5 和 1.0 mg/kg,第 4 d 腹腔注射脂多糖(LPS)6 mg/kg(LPS 预处理组);12 只腹腔注射内毒素 6 mg/kg(肺损伤组);12 只为正常对照组,腹腔注射生理盐水。注射完毕后 4 h 处死大鼠,取肺测定肺组织湿/干质量比(W/D);以 ^{99}Tc 标记的血清白蛋白测定肺通透指数;从肺灌洗液中提取肺泡巨噬细胞核蛋白,用凝胶电泳迁移率(EMSA)方法检测 NF- κ B 活性。各组肺进行病理组织学观察。**结果** LPS 预处理组肺 W/D 及通透性显著低于肺损伤组,而 PaO_2 和碱剩余高于肺损伤组;且肺损伤组及 LPS 预处理组的 NF- κ B 活性皆显著升高(P 均 <0.05),LPS 预处理组高于肺损伤组。**结论** 内毒素预处理可减轻内毒素造成的肺损伤,此现象可能与肺泡巨噬细胞 NF- κ B 活性变化有关。

【关键词】 肺损伤,急性; 内毒素; 核因子- κ B

中图分类号:R563;R363.27 文献标识码:A 文章编号:1003-0603(2004)06-0361-03

Influence of lipopolysaccharide pretreatment on acute lung injury induced by lipopolysaccharide in rats

XUE Yun*, WU Xin-min, ZHANG Sheng-suo, ZHANG Xi-zhe, FU Zhan-li, ZHANG Chun-li.

*Department of Anesthesia, First Hospital, Peking University, Beijing 100034, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of lipopolysaccharide pretreatment on blocking the development of lipopolysaccharide (E. Coli O₅₅:B₅) induced acute lung injury. The activity of nuclear factor- κ B(NF- κ B) in alveolar macrophages was assessed to elucidate its mechanism. **Methods** Thirty-six Wistar rats were divided into three groups: normal saline (A), lipopolysaccharide (B), lipopolysaccharide preconditioning (C). Rat model of acute lung injury was reproduced by administering intraperitoneally lipopolysaccharide in a dose of 6 mg/kg. Group A and B served as control. In the test group (group C) lipopolysaccharide was given intraperitoneally 0.5 mg/kg, 0.5 mg/kg and 1.0 mg/kg consecutively for 3 days before lipopolysaccharide challenge. Four hours after lipopolysaccharide/normal saline administration, the animals were killed. Blood gas was measured. And total protein of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was calculated by measuring the radioactivity of ^{99}Tc labeled serum albumin. Wet/dry ratios of the lungs of each group were determined. The nuclear protein of the alveolar macrophages was extracted from BALF, and the activity of NF- κ B was assayed with electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Microscopic examination of the lung was done. **Results** In group C, partial pressure of oxygen in artery (PaO_2) was significantly higher than that in group B, and total protein content of BALF was significantly lower in group A and C than that in group B. Activity of NF- κ B in group C was higher than group A and B. **Conclusion** Lipopolysaccharide pretreatment can reduce the severity of acute lung injury induced by lipopolysaccharide challenge. This phenomenon may be related with change in the activity of NF- κ B of the alveolar macrophages.

【Key words】 acute lung injury; lipopolysaccharide; nuclear factor- κ B

CLC number:R563;R363.27 Document code:A Article ID:1003-0603(2004)06-0361-03

在创伤或感染引起的多器官衰竭中,肺通常是最易被累及的器官,早期表现为急性肺损伤(ALI),后期可发展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS),在此过程中,核因子- κ B(NF- κ B)是调节免疫细胞表达各种炎症介质的主要核转录调节因子。本研究拟采用腹腔注射内毒素的方法复制大鼠 ALI 模型^[1],探讨内毒素预处理对内毒素致大鼠 ALI 的影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料:内毒素(E. Coli O₅₅:B₅)为 Sigma 公司产品; γ - ^{32}P -ATP、 ^{99}Tc -血清白蛋白为亚辉公司合成;含有通用 κ B 系列的双链寡核苷酸探针(5'-AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3')为北京赛百盛公司合成;垂直电泳槽、电泳仪、凝胶干燥仪为北京六一仪器厂产品。

1.2 实验方法:

1.2.1 动物模型制备:雄性 Wistar 大鼠 36 只,体重 250~300 g,随机分为 3 组,每组各 12 只大鼠。内毒素预处理组在实验前 3 d 分别经尾静脉注射

作者单位:100034 北京大学第一医院麻醉科

作者简介:薛昀(1974-),男(汉族),江苏省无锡市人,博士研究生,主治医师。

0.5、0.5 和 1.0 mg/kg 脂多糖(LPS, $O_{55}B_5$);在实验当日, LPS 预处理组及肺损伤组按 6 mg/kg 腹腔注射 LPS, 另设正常对照组, 腹腔注射等量生理盐水。注射完毕 4 h 后, 每组各 6 只取主动脉血测血气; 然后处死大鼠, 取右肺用体积分数为 10% 的甲醛固定, 苏木素-伊红(HE)染色, 镜检确定动物是否发生 ALI; 左肺取下后剔除结缔组织, 80 °C 烤箱中烘烤 48 h, 测定湿/干质量比值(W/D)。

1.2.2 肺泡上皮-血管内皮间隔对蛋白质通透性的测定:用肺血管外示踪蛋白含量来表示肺通透指数。每组中另外 6 只大鼠在 LPS 注射前 10 min 经尾静脉注射 10.2 GBq (275 mCi) ^{99}Tc 标记的血清白蛋白, 注射后 4 h 以 20 ml 磷酸盐缓冲液(PBS)行肺灌洗, 以 1 ml 支气管肺泡灌洗液(BALF)与同体积血清中放射性比值作为肺通透性指数。

1.2.3 肺泡巨噬细胞核蛋白提取物中 NF- κ B 活性的测定:参照文献[2]方法制备各组动物肺泡巨噬细胞核提取物, 用 Bradford 法测蛋白浓度, 用凝胶电泳迁移率法(EMSA)测定 NF- κ B 活性。

1.2.4 NF- κ B 与 DNA 结合的特异性测定:在核蛋白与标记探针结合反应体系中, 分别同时加入 4 倍和 100 倍无同位素标记的 NF- κ B 寡核苷酸探针, 进行凝胶电泳迁移率分析。

1.3 统计学处理:结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 所有统计学处理用 SPSS10.0 软件完成, 多组间比较采用方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理检查结果:

2.1.1 正常对照组:肺泡腔完整, 肺泡间隔均匀一致, 壁光滑, 可见少量白细胞, 肺泡腔中无渗出液或渗出的白细胞。

2.1.2 肺损伤组:肺组织毛细血管明显扩张、充血, 白细胞附壁, 肺泡隔明显增厚, 大量白细胞渗出、聚集, 肺泡腔中可见渗出液, 部分肺泡腔萎陷不张。

2.1.3 LPS 预处理组:肺泡毛细血管有轻度充血, 肺泡结构尚可, 肺泡水肿液及肺间质中性粒细胞浸

润较 ALI 组明显为少。

2.2 血气分析:肺损伤组动脉氧分压(PaO_2)及碱剩余(BE)均较正常对照组及 LPS 预处理组显著降低($P<0.05$ 及 $P<0.05$), 但 BE 较正常对照组显著降低。

2.3 肺 W/D:肺损伤组 W/D 较正常对照组及 LPS 预处理组显著增加(P 均 <0.05), LPS 预处理组 W/D 与正常对照组比较无显著差异($P>0.05$)。

2.4 肺通透性指数:肺损伤组肺通透性指数较正常对照组及 LPS 预处理组显著增加(P 均 <0.05), LPS 预处理组肺通透性指数较正常对照组显著增加($P<0.05$)。

2.5 肺泡巨噬细胞 NF- κ B 活性的变化:LPS 预处理组 NF- κ B 活性较正常对照组及肺损伤组显著增强(P 均 <0.05), 肺损伤组 NF- κ B 活性较正常对照组显著增强($P<0.05$)。加入过量未标记 NF- κ B 探针后, 核提取物放射自显影条带较未加时明显减弱。见表 1。

3 讨论

ALI 常与外伤、烧伤及败血症合并, 其最终形式即为 ARDS, 目前仍缺乏有效的治疗手段。脓毒症及感染性休克时肺损伤最早出现, 也常常是导致患者死亡的主要原因。败血症后的 ALI, 中性粒细胞在启动急性炎症反应和导致肺损伤中都起到中心作用^[3], 它释放大量的细胞因子、氧自由基及蛋白分解物, 造成组织损伤; 同时肺泡 2 型细胞分泌表面活性物质减少, 导致部分肺泡萎陷, 通气/血流比例失调。在 ALI 时, 由于肺泡-毛细血管内皮间隔及毛细血管通透性增高, 血中蛋白质及水分进入血管外间隙。本实验中, 注射 LPS 后 4 h 肺组织病理形态学较正常对照即有明显改变, 表现为间质肿胀、毛细血管扩张、炎性细胞渗出、肺泡腔缩小; 肺损伤组血气分析结果出现 PaO_2 下降, BE 变为负值, 说明乳酸代谢增强; 而 LPS 预处理组上述改变轻微。肺损伤组大鼠肺 W/D 与正常对照组比较差异明显, 提示该组肺血管通透性大大增加。而 LPS 预处理组无论是 PaO_2 、BE、肺 W/D, 还是肺蛋白通透性等指标均显

表 1 各实验组肺损伤指标及肺泡巨噬细胞 NF- κ B 活性的变化($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Changes of lung injury indexes and NF- κ B activity of alveolar macrophage($\bar{x}\pm s$)

组别	PaO_2 (mm Hg)	BE(mmol/L)	W/D	肺通透性指数	NF- κ B 灰度值
正常对照组	109.3 $\pm$ 12.4	4.43 $\pm$ 1.55	4.13 $\pm$ 0.36	0.011 0 $\pm$ 0.001 9	14.57 $\pm$ 4.78
肺损伤组	93.9 $\pm$ 4.9*	-(5.80 $\pm$ 2.04)*	5.13 $\pm$ 0.62*	0.084 4 $\pm$ 0.025 1*	19.66 $\pm$ 5.43*
LPS 预处理组	100.9 $\pm$ 3.5	1.25 $\pm$ 1.54*	4.32 $\pm$ 0.21 [#]	0.019 7 $\pm$ 0.003 6* [#]	23.62 $\pm$ 5.49* [#]

注:与正常对照组比较: * $P<0.05$; 与肺损伤组比较: [#] $P<0.05$; 1 mm Hg=0.133 kPa

著好于肺损伤组,提示 LPS 预处理对于继之而来的大剂量 LPS 对肺的损伤有明显的保护作用。LPS 预处理可使机体对随后的内毒素血症表现为低反应性,即耐受^[4]。其机制一直未被阐明,有人认为可能与多个因素有关,但令人瞩目的是内毒素耐受与 NF- κ B 之间的关系。

目前 NF- κ B 被认为是几乎所有细胞在外界或病理刺激下表达与炎症有关基因的主要调节者。在非激活状态细胞、胞浆及适当刺激(如细胞因子、内毒素、氧自由基)情况下, NF- κ B 即被释放进入细胞核内并与特异基因启动子序列上的 κ B 位点相结合,诱导转录及蛋白合成的增加。被 NF- κ B 激活的细胞因子包括白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-6、IL-8、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、环氧化酶-2(Cox-2)、生长因子及黏附分子,都在 ARDS 中起作用。有人称 NF- κ B 为 ALI 过程中的轴心转录因子^[5]。尽管如此,以皮质激素为代表的 NF- κ B 抑制剂的使用对于 ALI 或 ARDS 患者预后并无明显帮助^[6]。本实验中,肺损伤组大鼠肺泡巨噬细胞核内 NF- κ B 活性明显增强,与 LPS 导致的炎症反应有关^[7]。引人注目的是, LPS 预处理组大鼠肺泡巨噬细胞核内 NF- κ B 活性则较肺损伤组及正常对照组都高。

在 ALI 的过程中,肺泡上皮 II 型(AT II)细胞的凋亡与过度的炎症反应对肺组织的破坏同样重要。AT II 细胞既可以自身增殖也可以分化为肺泡上皮 I 型细胞,因而被认为是肺泡上皮的祖细胞。ALI 时, AT II 细胞凋亡明显上升,肺泡上皮完整性无法保持,表面活性物质分泌下降^[8]。目前认为肺泡巨噬细胞通过合成 iNOS,抑制 NO 合成,对 AT II 细胞提供保护^[9]。本实验中 LPS 预处理后肺泡巨噬细胞 NF- κ B 活性增加,其 iNOS 表达很可能也增加,抑制了 AT II 细胞的凋亡。与此相对的是, NF- κ B 活性增强的同时也增加 IL-1 β 与 TNF- α 的表达。但 Tang 等^[10]发现,除去 84% 的大鼠肺泡巨噬细胞,可降低内毒素致 TNF 释放达 86%;将 TNF- α 抗体与 IL-1 β 受体拮抗剂共同吹入肺中,可彻底抑制内毒素所致肺部炎症均无影响。实际上, NF- κ B 除了调控炎性介质的产生,其活性也与对抗凋亡有关,当其活化被阻滞时,正常细胞的凋亡将上升^[11]。

迄今为止,人们对于 NF- κ B 与内毒素预处理关系的研究主要是针对血中白细胞。有报道,以内毒

素体外刺激败血症患者的周围血单核细胞并未导致进一步的 NF- κ B 核转位;与之相反,这些患者外周器官中的巨噬细胞表达大量细胞因子^[12]。这与本实验中 LPS 预处理组肺组织切片中性粒细胞浸润明显减少,而肺泡巨噬细胞核内 NF- κ B 活性明显上升的结果是一致的。综上,内毒素预处理后大剂量内毒素导致的肺损伤明显减轻,这可能与肺泡巨噬细胞 NF- κ B 活性上升,减少了正常组织的凋亡有关。

目前,很多研究致力于通过抑制 NF- κ B 活性来改善败血症或多器官衰竭。但从我们的研究结果来看, NF- κ B 活性的完全丧失可能打破了机体防御系统的调节功能。进一步深入研究内毒素耐受的机制,或许可以帮助我们找到防治 ALI 的道路。

参考文献:

- 1 Koh Y, Lim C H, Kim M J, *et al.* Heat shock response decreases endotoxin-induced acute lung injury in rats[J]. *Respirology*, 1999, 4(4): 325-330.
- 2 Hall B M, Fortney J E, Gibson L F. Alteration of nuclear factor κ B (NF- κ B) expression in bone marrow stromal cells treated with etoposide[J]. *Biochem Pharm*, 2001, 61: 1243-1252.
- 3 Abraham E, Carmody A, Sherkar R, *et al.* Neutrophil as early immunologic effectors in hemorrhage or endotoxemia-induced acute lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000, 279: 1137-1145.
- 4 Flohe S, Domingues F E, Ackermann M, *et al.* Endotoxin tolerance in rats: expression of TNF- α , IL-6, IL-10, VCAM-1 and HSP70 in lung and liver during endotoxin shock[J]. *Cytokine*, 1999, 11(10): 796-804.
- 5 Baeuerle P A, Henkel T. Function and activation of NF- κ B in the immune system[J]. *Annu Rev Immunol*, 1994, 12: 141-179.
- 6 Groeneveld A B. Vascular pharmacology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome[J]. *Vascul Pharmacol*, 2002, 39(4-5): 247-256.
- 7 黄杨, 尹文, 宋祖军, 等. 一氧化氮对内毒素刺激肺泡巨噬细胞核因子 κ B 的影响[J]. *中国危重病急救医学*, 2002, 14(9): 537-539.
- 8 Albertin K H, Soulier M F, Wang Z, *et al.* Fas and Fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory disease syndrome[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(5): 1783-1796.
- 9 Sutherland L M, Edwards Y S, Murray A W. Alveolar type I cell apoptosis[J]. *Comp Biochem Physiol*, 2001, 129: 267-285.
- 10 Tang G, White J E, Lumb P D, *et al.* Role of endogenous cytokines in endotoxin and interleukine-1 induced pulmonary inflammatory response and oxygen tolerance[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995, 12(3): 339-344.
- 11 Yang R C, Chen H W, Lu T S, *et al.* Potential protective effect of NF- κ B activity on the polymicrobial sepsis of rats preconditioning heat shock treatment[J]. *Clin Chimica Acta*, 2000, 302: 11-22.
- 12 Adib-Conquy M, Adrie C, Moine P, *et al.* NF- κ B expression in mononuclear cells of patients with sepsis resembles that observed in lipopolysaccharide tolerance[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000, 162: 1877-1883.

(收稿日期: 2003-11-06 修回日期: 2004-05-24)

(本文编辑: 李银平)