

• 研究报告 •

血必净注射液对内毒素性肺损伤治疗作用的实验研究

吴允孚, 陈刚, 席与斌

〔苏州市立医院(东区)ICU/急诊科, 江苏 苏州 215001〕

【关键词】 肺损伤, 急性; 生长因子; 肝细胞生长因子; 角细胞生长因子; 血必净注射液

中图分类号: R285.5; R256.1 文献标识码: B 文章编号: 1008-9691(2008)03-0181-03

机体在遭受各种严重损伤后可引起全身炎症反应综合征(SIRS), 导致急性肺损伤(ALI)的发生, 感染是最常见的病因。而肝细胞生长因子(HGF)和角细胞生长因子(KGF)在肺的炎症反应和损伤后修复中有重要作用^[1]。采用内毒素性ALI模型, 观察大鼠血清和支气管肺泡灌洗液(BALF)中HGF、KGF、白细胞和蛋白水平的改变, 探讨血必净注射液对内毒素性ALI的保护作用及机制。

1 材料与方

1.1 动物分组及模型制备: SPF级雄性SD大鼠(由苏州大学实验动物中心提供)54只, 体重(180±20)g。按随机数字表法分为对照组、ALI组、血必净组, 每组18只。从尾静脉注射内毒素脂多糖(LPS)5 mg/kg制备ALI模型; 对照组注射0.2 ml生理盐水。血必净组制模后每日腹腔注射血必净注射液10 g/kg; 模型组和对照组注射5 ml生理盐水。3组在制模后6、24和48 h处死6只大鼠。

1.2 观察指标及方法

1.2.1 血标本的采集和处理: 于相应时间点腹腔注射盐酸氯胺酮(50 mg/kg)麻醉大鼠, 腹主动脉放血, 全血抗凝, 行血气分析; 离心收集血清, 置于-20℃下保存。

1.2.2 BALF中细胞计数: 大鼠麻醉后气管切开插管, 用生理盐水反复灌洗, 收集BALF, 计数细胞总数(除红细胞外)。离心后涂片, 行Wright-Giemsa染色, 计数巨噬细胞、中性粒细胞(PMN)、淋巴细胞及分类, 上清液置-20℃冰箱内保存待用。

1.2.3 HGF、KGF测定: 按试剂盒说明
基金项目: 江苏省苏州市科技发展计划
基金资助项目(SS0526)

作者简介: 吴允孚(1963-), 男(汉族), 江苏省人, 医学硕士, 副教授, 硕士生导师, 江苏省急诊医学分会委员, Email: icuwu@163.com。

表1 各组大鼠BALF和血清中HGF、KGF的变化($\bar{x} \pm s, n=6$) ng/L

组别	时间	BALF中HGF	BALF中KGF	血清中HGF	血清中KGF
对照组	6 h	0.56±0.02	0.15±0.02	1.55±0.15	0.41±0.16
	24 h	0.59±0.03	0.16±0.03	1.55±0.17	0.45±0.17
	48 h	0.57±0.03	0.15±0.01	1.54±0.03	0.50±0.17
ALI组	6 h	1.32±0.02 ^a	0.31±0.03 ^a	3.09±0.18 ^a	1.02±0.15 ^a
	24 h	1.43±0.03 ^a	0.41±0.03 ^a	2.86±0.12 ^a	0.69±0.12 ^a
	48 h	2.28±0.02 ^a	0.32±0.02 ^a	2.83±0.12 ^a	0.63±0.22 ^a
血必净组	6 h	0.85±0.02 ^{ab}	0.19±0.02 ^{ac}	2.75±0.12 ^{ab}	0.82±0.19 ^{ac}
	24 h	0.94±0.04 ^{ab}	0.26±0.02 ^{ac}	1.65±0.13 ^{ab}	0.53±0.18 ^{ac}
	48 h	1.23±0.02 ^{ab}	0.23±0.03 ^{ac}	1.68±0.16 ^{ab}	0.58±0.13 ^{ac}

注: 与对照组同期比较, ^a $P < 0.01$; 与ALI组同期比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$

书要求操作。

1.2.4 肺组织切片制备: 用体积分数为10%的中性甲醛水溶液以20 cm H₂O(1 cm H₂O=0.098 kPa)的压力灌注肺, 持续20 min后摘除鼠肺, 用10%中性甲醛水溶液固定12 h, 常规脱水、石蜡包埋, 制成5 μm厚的组织切片, 苏木素-伊红(HE)染色。

1.3 统计学处理: 使用SPSS 12.0统计分析软件, 数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用单因素方差分析和 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学改变(彩色插图1): 光镜下, 对照组肺组织结构清晰, 肺泡壁完整, 肺间质无渗出。ALI组肺内小血管及肺泡隔毛细血管扩张充血, 肺泡壁破裂, 肺泡隔及肺泡腔内出血, 肺泡塌陷实变, 肺间质水肿、肺泡隔增宽, 小血管周围、肺泡隔及肺泡腔内单核/巨噬细胞增多。血必净组肺组织病理改变明显减轻, 可见轻度水肿, 少见出血, 肺间质充血、水肿明显减轻, 肺泡、肺间质PMN浸润减少。

2.2 BALF和血清中HGF、KGF含量(表1): ALI组各时间点大鼠BALF和血清中HGF、KGF水平均明显高于对照组(P 均 < 0.01); 血必净组BALF和

血清中HGF、KGF水平均明显低于ALI组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 血气分析结果(表2): ALI组各时间点氧合指数(PaO_2/FiO_2)、动脉血氧分压(PaO_2)、pH值明显降低, 动脉血二氧化碳分压($PaCO_2$)则明显升高(P 均 < 0.01); 血必净组24 h和48 h PaO_2/FiO_2 、 PaO_2 、pH值明显升高, $PaCO_2$ 明显降低(P 均 < 0.05)。

2.4 BALF中细胞总数及PMN分类计数(表2): ALI组各时间点BALF中细胞总数明显高于对照组, 血必净组则显著低于ALI组; ALI组与血必净组细胞分类以PMN为主, 明显高于对照组, 但血必净组明显低于ALI组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

3 讨论

ALI是由感染等因素引起、以PMN浸润为主的肺组织炎症反应, 各种损伤因素导致肺不同程度破坏或缺损, 肺修复的主要目的是支气管和肺泡上皮再生, HGF是肺泡上皮细胞分泌的促有丝分裂因子, HGF可明显促进肺气道上皮增殖和DNA合成^[1]。研究表明, HGF在肺组织损伤后的修复过程中起营养因子的作用^[2]。Liu等^[3]发现, HGF可明显降低过氧化氢导致的大鼠ALI后血浆脂质过氧化和凋亡细胞水平, 消除损伤引

表 2 各组大鼠动脉血气分析及 BALF 中细胞总数和 PMN 分类的比较(̄x±s, n=6)

组别	时间	动脉血气分析				BALF	
		PaO ₂ /FiO ₂ (mm Hg)	PaO ₂ (mm Hg)	PaCO ₂ (mm Hg)	pH 值	细胞总数(×10 ⁶ /L)	PMN 分类(%)
对照组	6 h	476.19±5.12	100.34±3.23	51.05±4.62	7.38±0.06	2.32±1.01	4.50±2.23
	24 h	408.29±6.45	85.23±9.56	63.12±5.86	7.31±0.06	3.85±0.89	5.83±3.23
	48 h	486.25±4.65	96.35±3.56	50.45±3.65	7.36±0.02	4.45±2.35	3.85±2.31
ALI 组	6 h	320.35±5.65 ^a	67.20±2.65 ^a	73.54±6.54 ^a	7.22±0.05 ^a	8.50±1.76 ^a	92.20±4.65 ^a
	24 h	250.59±8.21 ^a	52.20±3.46 ^a	82.94±3.62 ^a	7.16±0.04 ^a	15.06±3.89 ^a	95.22±6.85 ^a
	48 h	216.57±6.35 ^a	45.36±4.87 ^a	86.54±5.42 ^a	7.10±0.03 ^a	64.56±10.56 ^a	99.32±5.96 ^a
血必净组	6 h	350.52±3.24 ^a	73.16±5.68 ^a	60.56±5.64 ^a	7.28±0.08 ^{ab}	4.12±1.63 ^{ab}	75.61±7.21 ^{ab}
	24 h	300.58±5.68 ^{ab}	63.21±6.48 ^{ab}	70.58±6.21 ^{ab}	7.25±0.03 ^{ab}	10.85±1.95 ^{ab}	85.51±3.74 ^{ab}
	48 h	286.34±3.65 ^{ab}	60.61±6.23 ^{ab}	80.45±2.36 ^{ab}	7.21±0.04 ^{ab}	21.87±7.84 ^{ac}	80.12±3.64 ^{ac}

注:与对照组同期比较,^aP<0.01;与 ALI 组同期比较,^bP<0.05,^cP<0.01;1 mm Hg=0.133 kPa

起的严重肺不张、肺水肿,提示 HGF 具有毛细血管上皮和肺泡上皮的膜稳定作用,同时还有抗细胞凋亡和肺保护作用。Douglas 等^[4]用博来霉素建立了小鼠肺纤维化模型 4 d 后,肺组织 HGF β 链水平上升,与 I 型肺泡上皮细胞增生水平一致,同时可检测到 I 型肺泡上皮中有 HGF 受体,而在正常肺组织中不表达 HGF,提示 HGF 可能调控 I 型肺泡上皮的增殖和 HGF mRNA 在 I 型肺泡上皮中的表达。

KGF 又称纤维母细胞生长因子-7(FGF-7),近来研究提示其在 ALI 早期可能已开始启动了增生和修复过程^[5]。Panos 等^[6]首次报道气管内给予重组人 KGF(rhKGF)对高氧诱导的 ALI 大鼠有保护作用,提高了动物存活率,减少了气管内出血和肺泡腔内液体的积累,而且其保护效果呈时间和剂量依赖性。Guery 等^[7]发现 KGF 刺激 I 型肺泡上皮细胞增生,同时增强了 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性,促进肺 Na⁺的运输,提高液体清除率,对正常肺和受损肺均有作用。Sugahara 等^[8]发现 KGF 可稳定促进肺表面活性蛋白(Sp2A, Sp2B)mRNA 增加 2~3 倍,同时增加 Sp2A 蛋白。研究表明 KGF 对肺损伤多环节都有保护作用,如直接上皮损伤、内皮损伤, T 细胞介导的损伤,在多水平(从细胞到器官)、多途径(静脉内、气管内)上有保护作用,保护效果主要表现在减少纤维化和胶原沉积、降低血管渗透性、减少肺水肿、提高生存率,在 BALF 中发现 KGF 可能有生物活性^[6]。但是 ALI 患者如何重新获得内源性的 KGF,机制还不十分明确。这些研究证实 KGF 是 ALI 早期 I 型肺泡细胞增生和成熟的介质,可对损

伤的 I 型肺泡细胞进行修复,合成表面活性物质。KGF 可减少在伤口处的成纤维细胞,并促进增生伤口边缘角质细胞的迁移^[5]。

对 ALI 的治疗目前尚缺乏有效药物。具有拮抗内毒素和炎症介质的中药制剂用于 ALI 可显著提高动物的生存率^[9]。研究证明,血必净注射液具有强效的抗内毒素作用及拮抗内毒素诱导单核/巨噬细胞产生内源性炎症介质失控性释放的作用,可增加血小板、纤维蛋白原含量及血小板聚集力,改善弥散性血管内凝血(DIC)的凝血机制异常,提高超氧化物歧化酶活性,同时能调节过高或过低的免疫反应,保护和修复应激状态下受损的脏器^[10]。

本研究显示,血必净注射液的抗应激损伤作用在于可降低血浆中 HGF、KGF 的异常升高,减轻肺脏的炎症反应,发挥对肺组织的保护作用。

参考文献

[1] Yanagita K, Matsumoto K, Sekiguchi K, et al. Hepatocyte growth factor may act as a pulmotrophic factor on lung regeneration after acute lung injury [J]. J Biol Chem, 1993, 268 (28): 21212-21217.

[2] 张旂,许楚宏,林德访,等.血必净注射液对慢性阻塞性肺疾病急性加重期合并全身炎症反应综合征患者病程的影响[J].中国危重病急救医学,2005,17(7):437-438.

[3] Liu X L, Sato S, Dai W, et al. The protective effect of hepatocyte growth promoting factor (pHGF) against hydrogen peroxide-induced acute lung in rats [J]. Med Electron Microsc, 2001, 34(2):92-102.

[4] Douglas D, Chen G, Kjhahia N. Increase in the beta chain of hepatocyte growth factor (HGF beta) precedes c-met expression after bleomycin-induced lung injury in the rat [J]. Exp Lung Respi Crit Care Med, 2000, (6):207.

[5] Marshall R P, Bellingan G, Webb S, et al. Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2000, 162(5):1783-1788.

[6] Panos R J, Bak P M, Simonet W S, et al. Intratracheal instillation of keratinocyte growth factor decreases hyperoxia-induced mortality in rats [J]. J Clin Invest, 1995, 96(4):2026-2033.

[7] Guery B P, Mason C M, Dobard E P, et al. Keratinocyte growth factor increases transalveolar sodium reabsorption in normal and injured rat lungs [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155(5):1777-1784.

[8] Sugahara K, Iyama K, Kuroda M J, et al. Double intratracheal instillation of keratinocyte growth factor prevents bleomycin-induced lung fibrosis in rats [J]. J Pathol, 1998, 186(1):90-98.

[9] 王学谦,胡晓翌,李瑾,等.血浆血小板激活因子与急性肺损伤相关性及其“神农 33”注射液对其影响的观察[J].中国危重病急救医学,1999,11(2):105-108.

[10] 张畔,曹书华,崔克亮,等.血必净对多脏器功能障碍综合征单核细胞 HLA-DR 表达影响的研究[J].中国中西医结合急救杂志,2002,9(1):21-23.

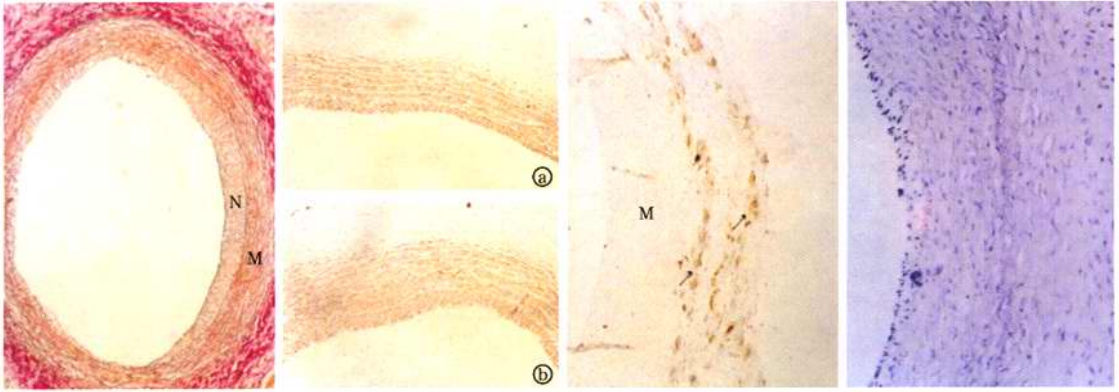
(收稿日期:2007-11-18

修回日期:2008-03-20)

(本文编辑:李银平)

赤芍对球囊损伤术后血管内膜单核细胞趋化蛋白-1基因表达的影响

(正文见138页)



M:中膜; N:增生内膜
图1 模型组内膜增生情况
(弹力及胶原纤维双重染色, ×40)

①:赤芍高剂量组; ②:模型组
图4 球囊损伤术后α-sm-actin
表达(免疫组化, ×200)

M:中膜; 箭头示:巨噬细胞阳性着色
图5 模型组球囊损伤术后RAM-11
表达(免疫组化, ×100)

图6 模型组球囊损伤术后
MCP-1 mRNA表达
(原位杂交, ×200)

银杏叶提取物对血管内皮细胞的保护作用

(正文见152页)

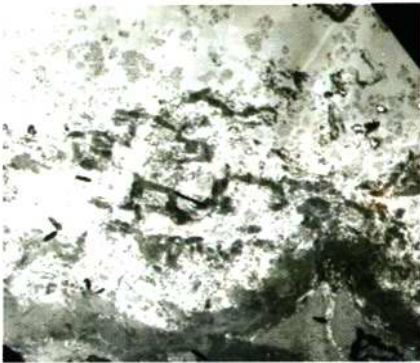


图3 模型组透射电镜下血管内皮改变
(醋酸铀-枸橼酸铅, ×40 000)

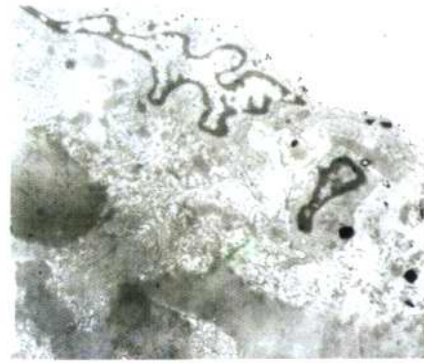
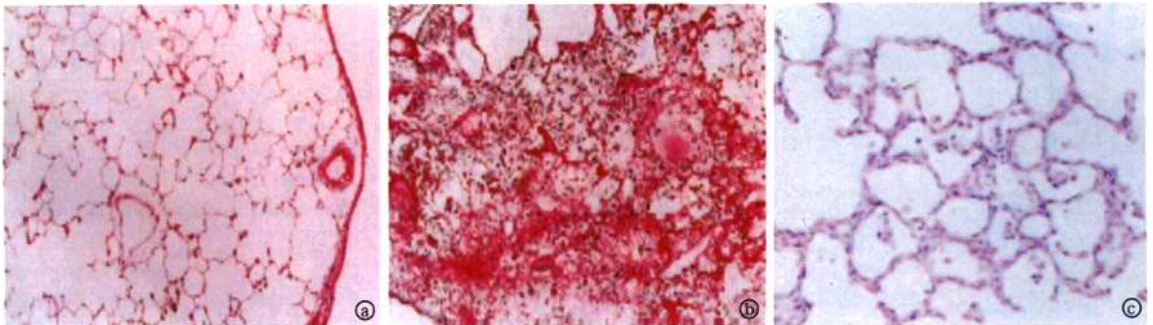


图4 GBE组透射电镜下血管内皮改变
(醋酸铀-枸橼酸铅, ×80 000)

血必净注射液对内毒素性肺损伤治疗作用的实验研究

(正文见181页)



①:对照组; ②:ALI组; ③:血必净组
图1 各组大鼠肺组织病理学观察(HE, ×100)