论著

文章编号:1000-5404(2009)21-2116-04

吡咯烷二硫代氨基甲酸盐对脓毒症大鼠急性肺损伤的保护作用及机制

熊 燚,王兴勇,周海银,何 蓉,丁 淼,邱春兰,周 景,贺 引 (重庆医科大学附属儿童医院重症监护病房,重庆 400014)

摘 要:目的 研究脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)所致急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的病理过程,探讨吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamates,PDTC)对LPS所致ALI的保护作用及机制。**方法** 96只SD雄性大鼠分为对照组、模型组,PDTC预防组。静脉注射LPS(6 mg/kg)复制ALI动物模型,分别于注射后2、4、8、12 h活杀。PDTC预防组在注射LPS前30 min予以PDTC(120 mg/kg)腹腔注射。测定肺湿/干质量比(W/D),石蜡包埋切片经HE染色行肺组织病理评分,TUNEL法测肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages,AM)凋亡率,免疫组化法检测核因子-κBp65(nuclear factor-κBp65,NF-κBp65)表达,RT-PCR法检测AM的$sPLA_2$ Ⅱ A、Bcl-2、Bax基因的表达。**结果** 与对照组比较,模型组肺W/D、肺组织病理评分、AM的NF-κBp65表达及凋亡、AM的$sPLA_2$ Ⅱ A基因表达增加($P<0.05$),AM Bcl-2、Bax基因的表达下降($P<0.05$)。与模型组比较,PDTC预防组上述改变得以逆转,肺损伤程度明显减轻($P<0.05$)。**结论** 预防性予以PDTC可抑制AM NF-κB活化,抑制$sPLA_2$ Ⅱ A基因表达,促进Bcl-2基因表达,抑制AM凋亡,对LPS所致的ALI有一定的保护作用。

关键词: 肺损伤;吡咯烷二硫代氨基甲酸盐;磷脂酶A

中图法分类号: R563; R631.2; R914.4 **文献标识码:** A

Protective effects and mechanism of pyrrolidine dithiocarbamates on acute lung injury of LPS-induced septic rats

XIONG Yi, WANG Xing-yong, ZHOU Hai-yin, HE Rong, DING Miao, QIU Chun-lan, ZHOU Jing, HE Yin (Intensive Care Unit, Children's Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

Abstract: Objective To investigate the pathological process of lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury (ALI) in rats, and to explore the protective effects and mechanisms of pyrrolidine dithiocarbamates (PDTC) on it. **Methods** Ninety-six SD male rats were randomly assigned into 3 groups: control group, model group, PDTC prevention group. ALI was induced by intravenous injection of LPS (6 mg/kg), and then these animal were respectively killed in 2, 4, 8 and 12 h after LPS injection. The rats from PDTC prevention group were given PDTC (120 mg/kg) by intraperitoneal injection in 30 min before the LPS injection. The lung wet/dry weight ratio was calcuated, lung pathology was observed with hematoxylin and eosin (HE) staining, alveolar macrophages (AM) apoptosis ratio with TUNEL method, nuclear factor-κBp65 (NF-κBp65) expression with immunohistochemical staining, and mRNA expressions of secretory phospholipase A2 type Ⅱ A ($sPLA_2$ Ⅱ A), Bcl-2 and Bax with RT-PCR. **Results** Compared with control group, the lung wet/dry weight ratio, lung pathologic tissue score, AM apoptosis ratio, AM NF-κBp65 expression, and $sPLA_2$ Ⅱ A expression were increased, and AM Bcl-2 expression was decreased in model group ($P<0.05$). These changes were inverted in rats of PDTC prevention group, and the degree of lung injury was markedly attenuated ($P<0.05$). **Conclusion** The prophylactic PDTC administration potentially exerts protective function in LPS-induced ALI rats, probably through inhibiting the activation of NF-κB, decreasing the expression of $sPLA_2$ Ⅱ A while increasing Bcl-2 expression in AM, and thus suppressing AM apoptosis.

Key words: lung injury; pyrrolidine dithiocarbamates; phospholipase A

基金项目: 重庆市卫生局基金(2007-2-147)

Supported by the Foundation of Chongqing Municipal Health Bureau (2007-2-147)

作者简介: 熊 燚,男,重庆市人,硕士研究生,主治医师,主要从事危重病医学方面的研究。E-mail:docxiongyi@126.com

通信作者: 王兴勇,E-mail:wxy9918@vip.sina.com

收稿日期: 2009-03-07;**修回日期:** 2009-04-07

脓毒症及脓毒败血症导致的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)或急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS)是危重症患者致死或致残的重要原因之一。吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamates,PDTC)是 NF-κB 特异性抑制剂,具有抗氧化作用,国内外的一些动物实验已发现,早期予以 PDTC 可明显减轻各种原因所致的肺水肿,降低病死率[1,2]。本研究采用脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)致 ALI 动物模型,通过预防性给予 PDTC 观察各项指标变化,以探讨 LPS 致大鼠肺损伤的机制及 PDTC 保护性作用的机制。

1　材料与方法

1.1　主要仪器及试剂

LPS、PDTC(美国 Sigma 公司),TUNEL 原位凋亡检测试剂盒(美国 Roche 公司),RNA 提取及 PCR 试剂盒(美国 Fermentas 公司),CO_2 培养箱、紫外可见分光光度计(岛津制作所),AG22331 型 PCR 仪(德国 eppendorf 公司),美国 Bio-Rad 凝胶成像系统等。

1.2　实验动物分组及处理

96 只 40 ~ 50 d 龄 SD 雄性大鼠[购于重庆医科大学实验动物中心,体质量(250 ± 20) g]分为对照组、模型组、PDTC 预防组,每组 32 只。每组再分注射后 2、4、8、12 h 4 个亚组(n = 8)。采用尾静脉注射 LPS 6 mg/kg 复制肺损伤模型[3];对照组予尾静脉注射生理盐水;PDTC 干预组在尾静脉注射 LPS 前 30 min 腹腔注射 PDTC 120 mg/kg。每组注射总液量 2 ml/kg。分别在各个时间点麻醉后活杀。

1.3　样本制备

麻醉固定后气管插管,开胸取右上叶肺固定切片后,HE 染色。37 ℃生理盐水 5 ml × 5 次,灌洗左肺,回收灌洗液,回收率 >90%,灌洗液 1 000 r/min 离心 10 min,去上清,重悬细胞,接种于 6 孔板,孵育 2 h,去上清,收集贴壁细胞。鉴定细胞及存活率后,重悬细胞制备细胞爬片。另取一定量肺泡巨噬细胞(alveolar macrophages,AM)加入 1 ml tripure 液裂解后,备行基因检测。

1.4　观察指标及方法

1.4.1　肺湿/干质量比　　取右中叶肺吸干表面液体称湿质量,放入 80 ℃烤箱 72 h,称取干质量,计算 W/D 值。

1.4.2　肺损伤肺组织病理评分　　参照 Hofbauer 等[4]的方法,肺组织病理评分与肺损伤程度呈正相关。

1.4.3　AM 凋亡检测　　将细胞爬片按细胞凋亡检测试剂盒操作步骤进行。每张爬片随机取 5 个高倍视野(× 400)照相,用 Image-Pro Plus6.0 软件计算凋亡率。凋亡率(%) = 凋亡细胞总数/细胞总数 × 100%。

1.4.4　AM NF-κBp65 的表达　　将细胞爬片按免疫组化试剂盒操作步骤进行。每张爬片随机取 5 个高倍视野(× 400)照相,用 Image-Pro Plus6.0 软件计算平均光密度值 D(255)。

1.4.5　AM $sPLA_2$ Ⅱ A 及 Bcl-2、Bax 基因的表达　　AM 裂解液采用 RT-PCR 技术对 $sPLA_2$ Ⅱ A 及 Bcl-2、Bax mRNA 进行逆转录扩增。所有引物均由上海英骏生物技术公司合成。β-actin 引物(825 bp)序列,正义链:5′-GTCAGAAGGACTCCTACGTG-3′,反义链:5′-TAGGAGCCAGGGCAGTAATC-3′;Bcl-2 引物(731 bp)序列,正义链:5′-CCCCTTCATCCAAGAATGCAAAGCACATC-3′,反义链:5′-ACAAAGGCATCCCAGCCTCCGTTATCC-3′;Bax 引物(502 bp)序列,正义链:5′-GGCGGGCCCACCAGCTCTG AA-3′,反义链:5′-CCACAAAGATGGTCACTGTCTG CCATGTG-3′;$sPLA_2$ Ⅱ A 引物(569 bp)序列,正义链:5′-GCTAGC AGTTGTGATCATGGCC-3′,反义链:5′-AGGCTTCA GCGGCTCCTTCTGGGT-3′。

1.5　统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SAS 9.13 软件包行三因素(LPS、PDTC、时间)方差分析;时间与 LPS、PDTC 有交互作用,采用线性对比法进行多重比较及两两比较。各组指标间关系做 Pearson 相关性分析,并做相关系数假设检验。

2　结果

2.1　肺湿/干质量比

模型组肺 W/D 值随造模时间延长逐渐增大,各个时间点与对照组有显著性差异(F = 640.52,P < 0.05),PDTC 预防组各个时间点与模型组比较肺 W/D 值明显减小(F = 369.53,P < 0.05),但较对照组肺 W/D 值增大(除注射后 2 h 外),有显著性差异(P < 0.05),见表 1。

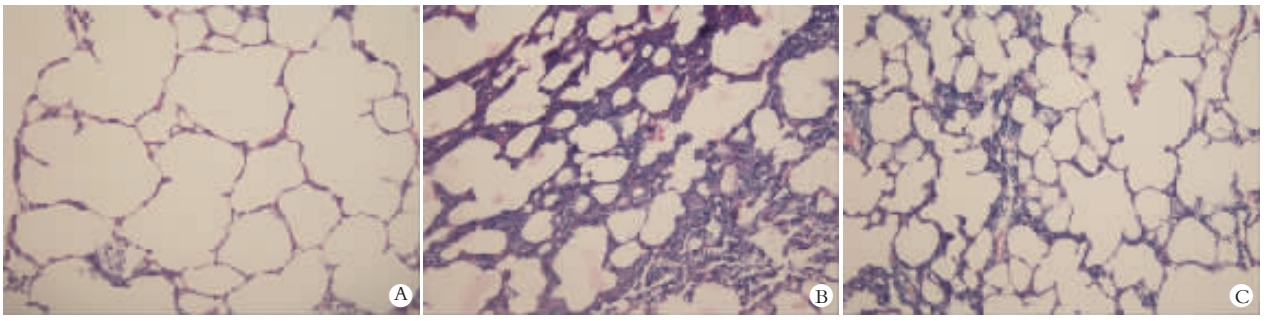
表 1　各组右肺中叶 W/D、肺组织病理评分及 AM 凋亡率、NF-κBp65 的表达(n = 8,$\bar{x} \pm s$)

组别	右肺中叶 W/D	肺组织病理评分	AM 凋亡率(%)	NF-κBp65 表达
对照组				
2 h	4.108 ± 0.090	0.883 ± 0.285	7.308 ± 0.796	0.147 ± 0.030
4 h	4.143 ± 0.072	0.902 ± 0.282	7.676 ± 0.927	0.146 ± 0.041
8 h	4.114 ± 0.093	0.919 ± 0.301	7.124 ± 0.551	0.143 ± 0.018
12 h	4.150 ± 0.106	0.953 ± 0.368	7.458 ± 0.929	0.133 ± 0.001
模型组				
2 h	4.535 ± 0.080[a]	1.905 ± 0.151[a]	17.361 ± 4.504[a]	0.228 ± 0.003[a]
4 h	4.846 ± 0.102[a]	2.010 ± 0.278[a]	22.035 ± 3.224[a]	0.268 ± 0.002[a]
8 h	5.144 ± 0.242[a]	2.200 ± 0.158[a]	23.189 ± 4.569[a]	0.274 ± 0.003[a]
12 h	5.505 ± 0.237[a]	2.579 ± 0.146[a]	41.618 ± 5.361[a]	0.278 ± 0.004[a]
PDTC 预防组				
2 h	4.198 ± 0.097[b]	1.405 ± 0.285[ab]	10.606 ± 1.684[ab]	0.194 ± 0.006[ab]
4 h	4.303 ± 0.056[ab]	1.661 ± 0.270[ab]	14.562 ± 1.231[ab]	0.208 ± 0.001[ab]
8 h	4.366 ± 0.127[ab]	1.786 ± 0.253[ab]	17.260 ± 2.007[ab]	0.223 ± 0.001[ab]
12 h	4.494 ± 0.159[ab]	1.837 ± 0.238[ab]	16.314 ± 1.413[ab]	0.226 ± 0.006[ab]

a: P < 0.05,与对照组比较;b: P < 0.05,与模型组比较

2.2　肺损伤肺组织病理评分

光镜下观察:对照组肺组织结构基本正常。模型组随造模时间延长损伤进行性加重(F = 5.71,P < 0.05),可见肺组织水肿,粒细胞扣押(图 1B),支气管内出血,肺泡腔大量渗出,局灶性肺不张和肺气肿,部分肺泡破裂及透明膜形成(图 1B)。PDTC 预防组与模型组相比,在各个时间点肺水肿、肺内粒细胞浸润均明显减轻(F = 82.89,P < 0.05),未见肺内透明膜。见表 1、图 1。



A:对照组注射后 12 h;B:模型组注射后 12 h;C:PDTC 预防组注射后 12 h

图 1 各组注射后 12 h 肺组织病理改变 (HE ×200)

2.3 AM 凋亡和 NF-κBp65 的表达检测及其与肺组织病理评分的相关性

模型组各时间点较对照组 AM 凋亡明显增加,随建模时间延长,凋亡率逐渐增加,有显著性差异($P<0.05$),同时NF-κB P65 的表达明显增加,有显著性差异($F=1\,033.31$, $P<0.05$),且随建模时间延长,表达逐渐增加($F=13.52$, $P<0.05$);PDTC 预防组各时间点较模型组凋亡明显降低,NF-κBp65 的表达明显降低,但较对照组仍升高,差异有显著性($P<0.05$)。经正态性检验,各组数据均为正态性分布。分别对肺组织病理评分与 AM 凋亡率、NF-κBp65 的表达进行相关性分析及相关系数的假设检验,结果肺组织病理评分与 AM 凋亡率相关系数为:$r=0.610\,7$,$P<0.01$,说明肺组织损伤程度与 AM 凋亡率呈正相关;肺组织病理评分与 AM NF-κBp65 表达的相关系数为:$r=0.832\,5$, $P<0.01$,说明肺组织损伤程度与 AM NF-κBp65 的表达呈正相关。见表 1。

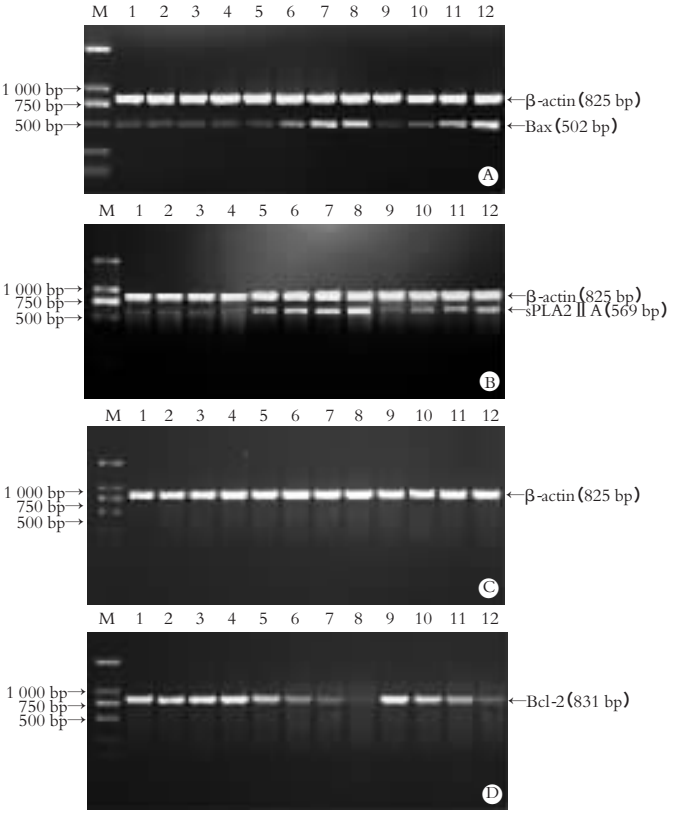
2.4 AM $sPLA_2$ Ⅱ A 及 Bcl-2、Bax mRNA 的表达

模型组各时间点较对照组 $sPLA_2$ Ⅱ A、Bax mRNA 转录明显增加,有显著性差异($F=7\,123.75$, $P<0.05$),且随建模时间延长,表达逐渐增加($F=892.04$,$F=150.36$, $P<0.05$),Bcl-2 mRNA 转录明显降低($F=2\,827.8$),Bcl-2/Bax 比值亦明显降低($F=491.7$),有显著性差异($P<0.05$);PDTC 预防组各时间点较模型组 $sPLA_2$Ⅱ A、Bax mRNA 转录明显降低($F=777.31$,$F=224.44$),Bcl-2 mRNA 转录明显增强($F=39.68$),Bcl-2/Bax 比值明显增大($F=137.33$),差异有显著性($P<0.05$)。见表 2、图 2。

表 2 AM $sPLA_2$ Ⅱ A、Bcl-2、Bax mRNA 的表达[$D(255)$,$n=8$,$\bar{x}\pm s$]

组别	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax	$sPLA_2$ Ⅱ A
对照组				
2 h	0.651 ±0.036	0.126 ±0.007	5.179 ±0.200	0.039 ±0.004
4 h	0.654 ±0.038	0.127 ±0.007	5.150 ±0.224	0.039 ±0.004
8 h	0.642 ±0.026	0.123 ±0.004	5.157 ±0.205	0.040 ±0.003
12 h	0.644 ±0.029	0.125 ±0.005	5.168 ±0.215	0.039 ±0.004
模型组				
2 h	0.604 ±0.024[a]	0.169 ±0.010[a]	3.592 ±0.237[a]	0.098 ±0.009[a]
4 h	0.354 ±0.035[a]	0.209 ±0.012[a]	1.700 ±0.179[a]	0.225 ±0.006[a]
8 h	0.185 ±0.009[a]	0.306 ±0.015[a]	0.606 ±0.029[a]	0.370 ±0.009[a]
12 h	0.061 ±0.005[a]	0.400 ±0.029[a]	0.153 ±0.016[a]	0.540 ±0.014[a]
PDTC 预防组				
2 h	0.649 ±0.026[ab]	0.067 ±0.016[ab]	10.159 ±2.223[ab]	0.052 ±0.009[ab]
4 h	0.421 ±0.015[ab]	0.166 ±0.011[ab]	2.549 ±0.209[ab]	0.138 ±0.019[ab]
8 h	0.221 ±0.020[ab]	0.260 ±0.023[ab]	0.858 ±0.110[ab]	0.271 ±0.011[ab]
12 h	0.079 ±0.007[ab]	0.338 ±0.032[ab]	0.235 ±0.029[ab]	0.417 ±0.031[ab]

a: $P<0.05$,与对照组比较; b: $P<0.05$,与模型组比较



M:标准;1 ~4:对照组 2、4、8、12 h;5 ~8:模型组 2、4、8、12 h;9 ~12:PDTC 预防组 2、4、8、12 h

A:Bax mRNA 的表达;B:$sPLA_2$ Ⅱ A mRNA 的表达;C:β-actin mRNA 的表达;D:Bcl-2 mRNA 的表达

图 2 各组各时间点 Bax、$sPLA_2$ Ⅱ A 、Bcl-2 mRNA 的表达

2.5 AM $sPLA_2$ Ⅱ A 表达与 AM NF-κBp65 的表达的相关性

经正态性检验,AM $sPLA_2$ Ⅱ A 表达为正态性分布。对 AM $sPLA_2$ Ⅱ A 表达与 AM NF-κBp65 的表达进行相关性分析及相关系数的假设检验,结果相关系数 $r=0.829\,4$,$P<0.01$, 说明 AM $sPLA_2$ Ⅱ A 表达与 AM NF-κBp65 的表达呈正相关。

3 讨论

NF-κB 是一种多效核转录因子,其过度活化在脓毒症所引起的 ALI 的过程中起重要作用。使用药物抑制 NF-κB 活化是目前脓毒症治疗的新方向。NF-

κBp65 的表达量直接反应 NF-κB 活化情况。本实验使用静脉一次性注射 LPS 建立 ALI 模型,我们观察到模型组较对照组肺 W/D 值明显上升,肺组织病理评分较高,AM NF-κBp65 的表达增加,肺组织病理评分与 AM 凋亡率及 NF-κBp65 的表达呈正相关,说明脓毒症所致的 ALI,其肺损伤程度与 AM 的过度凋亡及 NF-κB 过度活化有关。且发现 AM 表达 $sPLA_2$ ⅡA 增加,促凋亡基因 Bax 表达增加,抗凋亡基因 Bcl-2 表达降低,AM $sPLA_2$ ⅡA 表达与 AM NF-κBp65 的表达呈正相关;PDTC 预处理组上述改变明显逆转,说明 PDTC 在活体内对 LPS 致肺损伤有明确的保护作用。它可改善肺泡毛细血管通透性,减少肺泡蛋白渗出,减轻肺内中性粒细胞浸润和扣押,抑制过氧化物反应,抑制多种促炎因子和黏附因子表达[1,2,5,6]。PDTC 是 NF-κB 的特异性抑制剂,同时它又是一种较强的抗氧化剂,能对抗体内脂质过氧化物反应,清除氧自由基[7]。本研究中发现 PDTC 预处理后,$sPLA_2$ ⅡA 表达明显下降,提示 NF-κB 信号途径参与调控 $sPLA_2$ ⅡA 基因表达,其活化可促进 $sPLA_2$ ⅡA 表达,这与一些国外的体内外研究结果相似[8]。同时本研究发现,PDTC 预处理后较模型组,Bcl-2 基因的表达上调,Bcl-2/Bax 比值增高,AM 凋亡率下降,提示 LPS 诱导的肺损伤中,NF-κB 活化对 AM 起促凋亡作用。另有研究发现 LPS 诱导的肺损伤,NF-κB 活化,中性粒细胞肺内浸润和扣押,中性粒细胞凋亡延迟[9]。提示不同的组织细胞,NF-κB 活化后起促凋亡还是抗凋亡作用不同,这可能是由于信号转导途径不同所致。结合本实验的研究结果,我们可以推断,PDTC 可有效抑制 LPS 诱导的 AM 中 NF-κB 的活化,从而下调 $sPLA_2$ⅡA 基因表达,使 $sPLA_2$ⅡA 合成降低,减轻 AM 膜的损害,改善 AM 吞噬功能,同时 PDTC 减轻 LPS 诱导的 AM 抗凋亡基因 Bcl-2 下调,使 AM 凋亡减少,肺廓清能力加强;另 PDTC 通过抑制 NF-κB 活化,减少了促炎因子的合成,促进抗炎因子合成,调节 LPS 所致的抗炎/促炎免疫失衡。

参考文献:

[1] Kabay B, Teke Z, Aytekin F O, *et al*. Pyrrolidine dithiocarbamate reduces lung injury caused by mesenteric ischemia/reperfusion in a rat model[J]. World J Surg, 2007, 31(8): 1707 – 1715.

[2] Zhao J, Shao Z, Zhang X, *et al*. Suppression of perfluoroisobutylene induced acute lung injury by pretreatment with pyrrolidine dithiocarbamate[J]. J Occup Health, 2007, 49(2):95 – 103.

[3] 李　琦,钱桂生,张　青. 不同剂量脂多糖对大鼠急性肺损伤效应的观察[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(10): 871 – 873.

[4] Hofbauer B, Saluja A K, Bhatia M, *et al*. Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experimental acute pancreatitis [J]. Gastroenterology, 1998, 115(5): 1238 – 1247.

[5] 廖克龙,朱佩芳,王正国,等. PDTC 对创伤性肺损伤大鼠肺组织 TNFα、IL-8 含量及其 mRNA 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(8): 957 – 959.

[6] Cuzzocrea S, Chatterjee P K, Mazzon E, *et al*. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of acute and chronic inflammation [J]. Br J Pharmacol, 2002, 135(2): 496 – 510.

[7] Nathens A B, Bitar R, Davreux C, *et al*. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates endotoxin-induced acute lung injury[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(5): 608 – 616.

[8] Alaoui-El-Azher M, Wu Y, Havet N, *et al*. Arachidonic acid differentially affects basal and lipopolysaccharide-induced sPLA(2)-IIA expression in alveolar macrophages through NF-kappaB and PPAR-gamma-dependent pathways[J]. Mol Pharmacol, 2002, 61(4): 786 – 794.

[9] Reutershan J, Basit A, Galkina E V, *et al*. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(5): L807 – L815.

(编辑　栾　嘉)

(上接 2111 页)

3　讨论

人体即使在静止状态下每分钟也可向环境(空气)中散发 500 ~ 1 500 个细菌,活动时散发的细菌就更多[2]。人员越密集、流动性越大,空气中细菌含量越多。有些地方人员数量一致但空气中细菌含量却不相同(流动性不一致),有些地方人员数量少但空气质量反而不如人多的地方(所处空间面积不一样)。空气微生物除了可以直接引起医院感染外,还可通过附着形式污染其他物品,包括各种诊疗器械,进而引起医院感染的发生。因此,消除和控制空气中的病原微生物,对控制医院感染有着十分重要的意义。在工作中应注意以下几个方面:①提高门诊空气质量,切实保障医患身心健康,必须保持空气流通,特别是冬春、秋冬季节是呼吸道疾病高发期,更应加强空气质量的监控。多开窗通风,尤其是上午诊疗高峰时段。使用空调时要增加新风的循环次数,中央空调定时维护。②进行必要的空气消毒。特殊季节无人时用化学消毒剂喷雾进行空气消毒处理。③加强导医管理,提供合理的流通渠道,减少患者往返频率,缩短就医时间。门诊量大的科室尽量设置在低楼层,防止通过垂直交通时的患者拥挤。使得就诊程序优化、科学、方便患者及时就医、及时诊疗。④地面进行湿式清扫,且应避开就诊时间。在检查和治疗时严格控制室内人员数量。

关键词: 门诊;空气;细菌培养;医院感染
中图法分类号: R181.34　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 王枢群, 张邦燮. 医院感染学[M]. 重庆:科学技术文献出版社重庆分社, 1990: 308 – 312.

[2] 钱培芬,倪语星. 医院感染监控与管理[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2008: 237.

(编辑　龙　亮)