短篇论著

文章编号:1000-5404(2010)06-0614-03

地塞米松降低胸部开放伤合并海水灌注致急性肺损伤犬模型前B细胞集落促进因子水平

胡晓红[1,2],韩志海[3],李 毅[3],解立新[4],徐世侠[1],段蕴铀[3] (100048 北京,海军总医院儿科[1];100850 北京,军事医学科学院研究生队[2];100048 北京,海军总医院呼吸科[3];100853 北京,解放军总医院呼吸科[4])

[摘要] **目的** 观察早期小剂量地塞米松治疗对胸部开放伤合并海水灌注致急性肺损伤(acute lung injury, ALI)犬模型前B细胞集落促进因子(pre-B-cell colony-enhancing factor, PBEF)水平的影响。**方法** 16只实验犬平均分成海水组和地塞米松治疗组。海水灌注前(0 h)、海水灌注后2、4、6、8 h留取静脉血和动脉血,海水灌注后8 h留取支气管肺泡灌洗液和肺组织;ELISA法测血浆中PBEF水平及血浆中炎症因子IL-1β和IL-8水平。免疫组织化学法测肺组织PBEF阳性分布;RT-PCR法测肺组织PBEF mRNA表达。**结果** 地塞米松治疗后胸部开放伤合并海水灌注致ALI犬模型血浆中PBEF水平及血浆炎症因子IL-1β和IL-8水平较海水组明显降低[PBEF:(2 222.19±459.59) pg/ml *vs* (3 014.16±883.47) pg/ml;IL-1β:(72.84±38.42) pg/ml *vs* (131.90±35.39) pg/ml;IL-8:(45.21±16.39) pg/ml *vs* (88.26±6.66) pg/ml,$P<0.05$],肺组织PBEF mRNA表达减少[地塞米松组(1.03±0.16) *vs* 海水组为(5.27±0.05),$P<0.05$],肺泡通透指数降低[(0.039±0.006) *vs* (0.055±0.002),$P<0.05$]。**结论** PBEF可能作为胸部开放伤合并海水灌注致ALI的一个生物学标记;早期小剂量地塞米松治疗可以降低胸部开放伤合并海水灌注致ALI早期增加的PBEF水平,并减轻炎症反应,改善肺泡通透性。

[关键词] 前B细胞集落促进因子;急性肺损伤;地塞米松;海水;灌注;胸部开放伤

[中图法分类号] R835.355;R392.11;R977.1 **[文献标志码]** A

前B细胞集落促进因子(pre-B-cell colony-enhancing factor, PBEF)作为一种新发现的炎症介质,在感染、缺血再灌注以及机械通气相关等因素所致的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)中表达明显升高,参与炎症反应,是一个非常可靠的反映ALI的生物学标志[1]。胸部开放伤合并胸腔海水灌注,很快出现严重的创伤性ALI,病死率极高[2],其本质是全身炎症反应在肺部的表现[3]。地塞米松很早用于治疗ALI,但仍有争议,是ALI研究热点。地塞米松治疗可以减轻ALI炎症反应,理论上应该降低PBEF的表达水平,本研究就此进行实验报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物模型和实验分组

实验用犬(已取得本院伦理委员会同意):健康成年杂交犬16只,购自北京科宇动物养殖中心(合格证号:SCXF-京-2002),体质量15~20 kg,雌雄不限。平均分成胸部开放伤海水灌注组(海水组)和地塞米松早期治疗组(治疗组),每组各8只。模型及人工海水制备参照文献[4],所有动物致胸部开放伤并灌注海水(35 ml/kg)后,10 min内缝合封闭伤口,治疗组在海水灌注30 min后经颈静脉注射地塞米松(1 mg/kg,天津药业焦作有限公司,生产批号:08110712)。动态观察血气,以氧合指数(PaO_2/FiO_2)<300 mmHg为ALI模型成功的指标。实验动物很快出现呼吸急促、心率增快、血压降低等,伤后6 h内氧合指数(PaO_2/FiO_2)<300 mmHg,符合创伤性ALI典型临床表现,确认胸部开放伤合并胸腔海水灌注致ALI模型成功。

分别于海水灌注前(0 h)、海水灌注后2、4、6、8 h留取静脉血和动脉血,8 h用生理盐水15 ml进行肺中叶支气管肺泡灌洗,留取支气管肺泡灌洗液(broncho-alveolar lavage Fluid, BALF);用15%的KCL注射液10 ml心内注射使模型安乐死,立即取右肺下叶同一部位肺组织标本置于液氮中保存。静脉血和BALF用离心机,3 000 r/min离心10 min,分离血浆和BALF上清液,-20 ℃保存。

1.2 检测指标和方法

1.2.1 血浆渗透压检测和肺泡通透指数(pulmonary penetration index, PPI)的计算 常规生化方法检测血浆和BALF蛋白含量及血浆渗透压。PPI = BALF中蛋白含量/血浆蛋白含量。

1.2.2 ELISA法测PBEF和炎症因子水平 按照ELISA试剂盒(尚柏生物制剂公司提供)说明,测血浆各时间点PBEF水平,IL-1β和IL-8水平。

1.2.3 免疫组织化学法测肺组织PBEF表达 取右肺下叶同一部位肺组织用4%多聚甲醛固定,按照试剂盒说明(试剂盒购自北京尚柏生物制剂公司),逐级酒精脱水、透明、石蜡包埋、切片、脱蜡、修复抗原,分别序贯加入Ⅰ抗(1∶25,兔抗犬PBEF

[基金项目] 海军后勤科研计划课题(04-3304)

[通信作者] 段蕴铀,电话:(010)66958088,E-mail:forever.lemon@163.com

表1 各组血浆中PBEF和炎症因子水平（pg/ml，$n=8$，$\bar{x}\pm s$）

组别	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h
PBEF					
海水组	746.69±88.96	1 735.16±187.39	3 204.56±604.21	2 924.75±718.09	3 014.16±883.47
地塞米松治疗组	715.72±64.45	2 082.48±426.28	2 213.67±569.93[a]	2 242.28±563.12[a]	2 222.19±459.59[a]
IL-1β					
海水组	32.66±4.63	123.82±46.39	144.11±29.72	106.71±37.18	131.90±35.39
地塞米松治疗组	30.24±7.71	79.11±16.84[a]	90.97±41.99[a]	92.35±55.38[a]	72.84±38.42[a]
IL-8					
海水组	32.61±2.30	68.62±18.57	79.91±8.24	77.79±11.01	88.26±6.66
地塞米松治疗组	32.88±4.59	82.49±17.57	68.92±22.87[a]	60.58±18.35[a]	45.21±16.39[a]

a：$P<0.05$，与海水组比较

多抗，ab 58640，Abcam公司）、生物素化Ⅱ抗、辣根酶标记链霉卵白素工作液孵育，DAB显色、苏木精复染，脱水，透明，封片。显微镜下观察并摄片，棕黄色部位为PBEF阳性表达部位，以阳性部位面积表示阳性表达率。

1.2.4 肺组织中编码PBEF mRNA含量测定 在NCBI（National Center for Biotechnology Information）网站检索到编码PBEF蛋白的mRNA序列；采用Primer premier 5及oligo 6等生物软件设计引物。引物及其序列号如下：内参GAPDH（NM_001003142.1，34 bp）上游：5′-AACATCATCCCTGCTTC-CAC-3′，下游：5′-GACCACCTGGTCCTCAGTGT-3′；FBEF（XM_540386）：上游：5′-GAGTGTTTGGTCCCTGGTC-3′；下游：5′-CACGGCATTCAAAGTAGGA-3′。采用北京博迈德RNA提取试剂盒（离心柱型），按使用手册提取肺组织RNA，经反转录过程和RT-PCR反应过程，检测PCR扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化，通过Ct值和标准曲线的分析对起始模板进行定量分析，目的基因电泳条带密度值以灰度×面积/参照物的比值表示。

1.3 统计学处理

以SPSS 13.0统计软件包处理数据。所有数据均以$\bar{x}\pm s$表示。每个指标的重复测量数据用方差分析法，计量数据间显著性采用t检验，用Pearson correlation行相关性分析。

2 结果

2.1 地塞米松治疗改善肺泡通透性

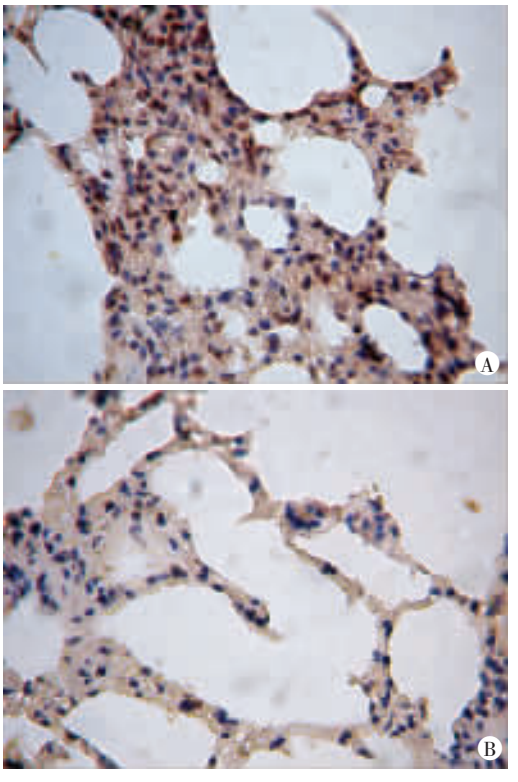
地塞米松治疗组肺泡通透指数显著低于海水组[（0.039±0.006）*vs*（0.055±0.002），$P<0.05$]。血浆渗透压变化无统计学差异[（327.07±6.21）mmol/L *vs*（330.73±6.35）mmol/L，$P>0.05$]。

2.2 地塞米松治疗减少血浆炎症因子和PBEF表达

海水灌注后随着病程发展，血浆PBEF水平进行性升高，在6~8 h达到峰值；地塞米松治疗组PBEF于海水灌注后4 h开始较海水组出现明显降低，于8 h达到最大差异值（$P<0.05$）。血浆IL-1β和IL-8水平也出现进行性升高，IL-1β在4 h、IL-8在8 h达到峰值；地塞米松治疗组IL-1β分别于海水灌注后2、4 h开始较海水组出现明显降低（$P<0.05$），均于8 h达到最低值。见表1。

2.3 免疫组织化学法检测肺组织PBEF分布

从图1可见地塞米松治疗组的PBEF蛋白阳性率明显低于海水组；根据相关软件得到的数据分析量化结果分别为：地塞米松治疗组为（24 467.74±12 007.19），海水组为（32 987.77±11 136.20），地塞米松治疗组肺组织中PBEF的明显少于海水组，二者比较统计学差异显著（$P<0.05$）。



A：海水组；B：地塞米松治疗组

图1 海水灌注后8 h两组实验犬肺组织PBEF分布（SABC ×400）

2.4 肺组织编码PBEF mRNA表达

实时荧光定量PCR技术检测模型肺组织中编码PBEF的mRNA，溶解曲线显示了唯一的一个峰值，说明实验设计的引物具有较强的特异性；扩增曲线显示了实验中检测到编码目的蛋白的mRNA。与海水组相比，治疗组PBEF mRNA表达水平明显降低，根据相关软件得到的量化结果分别为：地塞米松治疗组为（1.03±0.16），海水组为（5.27±0.05），二者比较差异显著（$P<0.05$）。

2.5 相关分析

血浆 PBEF 水平与 IL-1β($r=0.549$),IL-8($r=0.496$)呈正相关($P<0.01$)。

3 讨论

创伤性 ALI 的发病机制错综复杂,其本质是全身炎症反应综合征在肺部的表现,主要病理特征为肺血管通透性增高[3],本实验结果显示小剂量地塞米松对胸部开放伤合并胸腔海水灌注致 ALI 有减轻炎症反应和改善通透性的治疗作用。最近的荟萃分析结果也显示:小剂量类固醇应用与改善死亡率和发病率有关,没有增加副作用[5]。

PBEF 具有细胞因子和趋化因子特性[6],广泛存在于所有生物的大部分组织中,未损伤肺脏适度表达,ALI 时表达增高 5 倍以上[6,7]。PBEF 在进化上高度保守,从原核生物、原始的多细胞动物到人类,具有高度序列同源性,提示此蛋白具有重要的生理作用[7,8]。近年研究也证实这一点:认为 PBEF 是炎症促进后 IL-1β 诱导的、在中性粒细胞内高表达的新的中性粒细胞凋亡抑制剂,参与炎症应答,通过抑制半胱氨酸蛋白酶 caspase-8 和 caspase-3 的活性,抑制中性粒细胞凋亡[9]。用反义寡核苷酸的方法阻止 PBEF 的翻译会完全消除 LPS、IL-1、GM-CSF 和 IL-8 等多种炎症介质抑制中性粒细胞凋亡的作用[10]。同时,过量表达的 PBEF 对炎症引起的肺泡毛细血管屏障功能紊乱有促进作用[1,10]。

我们前期研究结果提示 PBEF 在胸部开放伤合并胸腔海水灌注致 ALI 犬模型中明显升高,并与炎症反应明显相关。本实验显示地塞米松降低胸部开放伤合并胸腔海水灌注致 ALI 犬模型中明显升高的 PBEF 水平,炎症因子降低同时,改善肺泡通透性,更进一步证实 PBEF 参与炎症反应,与 ALI 病变程度一致,可能作为检测病情的指标之一。

糖皮质激素通过抑制基因转录在多种类型的细胞发挥抗炎作用[11],但地塞米松用于治疗 ALI 的剂量一直是令人困惑的难题。有研究表明[12],在 ARDS 早期及预防性使用大剂量[>10 ~ 20 mg/(kg · d)],短程治疗并不能降低患者的病死率,甚至会增加病死率,可能与大剂量过度抑制免疫系统有关。目前多主张中小剂量[≤5 mg/(kg · d),能够抑制患者炎症介质并且能改善 ALI 模型的病情以降低病死率,并且不会引起副作用[5],因此本研究采用小剂量。

与人类和哺乳动物体液相比,海水具有高渗、低温和富含盐类的特点。海水灌注导致模型血浆渗透压升高是胸部开放伤合并海水灌注致 ALI 不同于其他因素引起的 ALI 的突出特点。但本实验并未发现早期小剂量地塞米松治疗改善模型的高渗环境,考虑与地塞米松剂量及应用时间有关,有待进一步探讨。

总之,我们的实验初步显示早期小剂量地塞米松降低胸部开放伤合并海水灌注致 ALI 犬模型血浆和肺组织中的 PBEF 蛋白水平和蛋白合成,与减轻炎症反应和改善病情一致,提示早期 PBEF 水平变化可能是炎症和病情变化的一个生物学指标。

参考文献:

[1] Ye S Q, Simon B A, Maloney J P, *et al*. Pre-B-cell colony-enhancing factor as a potential novel biomarker in acute lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(4): 361 - 370.

[2] 薛志强, 段蕴铀, 孟激光, 等. 肺保护性通气治疗胸腔海水致急性肺损伤的实验研究[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(12): 1358 - 1360.

[3] 钱桂生. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征研究现状与展望[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(2): 97 - 101.

[4] 胡晓红, 段蕴铀, 李毅, 等. 胸部开放伤后海水和淡水浸泡对肺损伤的作用比较[J]. 第三军医大学学报, 2009, 31(21): 2090 - 2093.

[5] Tang B M, Craig J C, Eslick G D, *et al*. Use of corticosteroids in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. Crit Care Med, 2009, 37(5): 1594 - 1603.

[6] Kitani T, Okuno S, Fujisawa H. Growth phase-dependent changes in the subcellular localization of pre-B-cell colony-enhancing factor[J]. FEBS Lett, 2003, 544(1 - 3): 74 - 78.

[7] McGlothlin J R, Gao L, Lavoie T, *et al*. Molecular cloning and characterization of canine pre-B-cell colony-enhancing factor[J]. Biochem Genet, 2005, 43(3 - 4): 127 - 141.

[8] Ognjanovic S, Bryant-Greenwood G D. Pre-B-cell colony-enhancing factor, a novel cytokine of human fetal membranes[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002, 187(4): 1051 - 1058.

[9] Jia S H, Li Y, Parodo J, *et al*. Pre-B cell colony-enhancing factor inhibits neutrophil apoptosis in experimental inflammation and clinical sepsis[J]. J Clin Invest, 2004, 113(9): 1318 - 1327.

[10] Gardai S, Whitlock B B, Helgason C, *et al*. Activation of SHIP by NADPH oxidase-stimulated Lyn leads to enhanced apoptosis in neutrophils[J]. J Biol Chem, 2002, 277(7): 5236 - 5246.

[11] De-Bosscher K, Haegeman G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids[J]. Mol Endocrinol, 2009, 23(3): 281 - 291.

[12] Thompson B T. Glucocorticoids and acute lung injury[J]. Crit Care Med, 2003, 31(4 Suppl): S253 - S257.

(**收稿**:2009-08-04;**修回**:2009-09-21)

(编辑 吴培红)