文章编号:1000-5404(2013)11-1119-05

论著

尾加压素Ⅱ与中介素在牛磺酸减轻油酸所致大鼠肺损伤中的作用

宋 斌[1,2],于忠和[3],郑 涛[2] (400038 重庆,第三军医大学研究生管理大队[1];100700 北京 北京军区总医院:重症监护科[2],全军肿瘤内科诊治中心[3])

[摘要] **目的** 研究牛磺酸对油酸所致急性肺损伤大鼠的干预作用及其通过影响尾加压素Ⅱ(UⅡ)及中介素(intermedin,IMD)合成与分泌发挥肺保护作用的机制。**方法** 采用油酸性急性肺损伤大鼠模型。动物分为3组,对照组(C组)、油酸损伤组(A组)、牛磺酸治疗组(T组),分别于0、6、12、24 h 4个时间抽动脉血2 mL并取肺泡灌洗液(BALF),测动脉血氧分压[$p(O_2)$],血浆及BALF中UⅡ、IMD浓度,测定肺湿干质量比(W/D)并进行统计学分析;HE染色、免疫组化检查肺组织中UⅡ与IMD表达水平;电镜观察肺组织超微结构。**结果** T组$p(O_2)$在6、12、24 h时高于A组($P<0.05$);A组肺组织W/D在0 h和6 h高于T组($P<0.05$);A组血浆UⅡ在24 h高于T组($P<0.05$);A、T组BALF UⅡ在0、6 h差异显著($P<0.05$),0 h时T组高于A组($P<0.05$),6 h时A组高于T组($P<0.05$);A组血浆IMD在0 h时高于T组($P<0.05$)。光镜观察:T组肺组织损伤减轻。免疫组化染色结果显示各组大鼠支气管黏膜上皮细胞、平滑肌细胞,肺内血管内皮细胞、平滑肌细胞细胞膜及细胞质均有UⅡ与IMD阳性表达,A组与T组间表达无明显差异。电镜观察:T组较A组损伤减轻,基底膜完整,未见明显胶原增生。**结论** 牛磺酸可减轻油酸致大鼠急性肺损伤,其机制可能与抑制UⅡ表达,减轻毛细血管基底膜损伤后肺泡渗出有关。

[关键词] 油酸;急性肺损伤;尾加压素Ⅱ;中介素;牛磺酸
[中图法分类号] R563; R341; R977.4 [文献标志码] A

Role of urotensin Ⅱ and intermedin in taurine alleviating oleic acid-induced acute lung injury in rats

Song Bin[1,2], Yu Zhonghe[3], Zheng Tao[2] ([1]Administration Office of Graduate Students, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Center of Cancer Diagnosis and Treatment, [3]Center of Diagnosis and Treatment for Oncology, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing, 100700, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the intervention effect of taurine on oleic acid-induced acute lung injury (ALI) in rats and investigate its possible mechanisms, especially the role of synthesis and secretion of urotensin Ⅱ (UⅡ) and intermedin (IMD). **Methods** A total of 54 SD rats, at an age of 9 weeks, weighting 280 to 310 g, were randomly divided into 3 groups, control ($n=6$), the ALI group ($n=24$) and the taurine treatment group ($n=24$). Rat models of ALI were established by tail vein injection of 0.15 mL/kg oleic acid. Taurine solution was given intraperitoneally at a dose of 20 mg/mL, 0.1 mL/kg for 3 consecutive days before oleic acid injection. Blood sample of 2 mL were drawn from the arteries at 0, 6, 12, and 24 h after oleic acid injection, while bronchioalveolar lavage fluid (BALF) was taken at the same time points to measure arterial partial pressure oxygen [$p(O_2)$]. The plasma and BALF contents of UⅡ and IMD, and lung wet-to-dry ratio (W/D) were measured and counted. Immunohistochemical assay was used to detect the expression of UⅡ and IMD in lung tissues. Electron microscopy was used to observe the ultrastructure of lung tissues. **Results** $p(O_2)$ was significantly higher in the treatment group than in the model group at 6, 12 and 24 h ($P<0.05$). The W/D ratio was obviously higher in the model group than in the treatment group at 0 and 6 h ($P<0.05$). Plasma content of UⅡ was obviously higher in the model group than in the treatment group at 24 h ($P<0.05$). There were significant differences in BALF content of UⅡ between model group and treatment group at 0 and 6 h ($P<0.05$). It was remarkably higher in the treatment group than in the model

[通信作者] 于忠和,E-mail: zhonghe88@263.net
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130327.1445.007.html(2013-03-27)

group at 0 h ($P<0.05$), while higher in the model group than in the treatment group at 6 h ($P<0.05$). But for plasma content of IMD, it was obviously higher in the treatment group than in the model group at 0 h ($P<0.05$). Electron microscopy displayed that the injury of lung tissue was milder in the treatment group than the other groups. Immunohistochemical assay showed there were positive expression of UⅡ and IMD in the bronchial epithelial cells, smooth muscle cells, and pulmonary vascular endothelial cells in the 3 groups, and no significant difference was seen between the model group and treatment group. Electron microscopy indicated the injury was significantly milder in the treatment group than in the model group, with intact basement membrane and without obvious collagen hyperplasia. **Conclusion** Taurine alleviates the lung injury induced by oleic acid, which might be due to its inhibiting the expression of UⅡ and protecting the capillary basement membrane to reduce plasma protein exudation.

[**Key words**] oleic acid; acute lung injury; urotensin Ⅱ; intermedin; taurine

Corresponding author: Yu Zhonghe, E-mail: zhonghe88@263.net

急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是由创伤、感染、中毒、失血等多种原因引起的,以肺部微血管通透性增加所致以肺水肿为主要病理特征的急性肺组织肺泡细胞及间质的播散性损伤,是急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome,ARDS)的基础病变[1]。ALI及其更严重形式ARDS仍旧是危重患者的重要死因[2]。目前,ALI的发病机制仍不十分清楚,尾加压素Ⅱ(urotensinⅡ,UⅡ)是新近发现在自然界存在的一种新型血管活性肽,其缩血管作用比内皮素还要强16倍[3-4];中介素(intermedin,IMD)是一种肽类激素,也是最近发现的血管活性物质,属降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)超家族成员,其结构、功能与同家族的肾上腺髓质素(adrenomedullin,ADM)有许多相似性,故又称为ADM2[5-6]。国内外研究表明,血浆UⅡ与IMD可在肺损伤的病理生理中起重要作用[7-8]。牛磺酸是一种有抑制性作用的氨基酸,具有广泛的细胞保护作用[9],可参与细胞膜主要成分磷脂代谢,保护膜磷脂免受降解,具有直接膜稳定作用,并调节膜对离子的通透性[10]。国外实验证实牛磺酸具有抗炎及抗氧化性质,对肺损伤具有保护作用[11-12]。目前关于牛磺酸对ALI后UⅡ及IMD表达影响尚不清楚,本研究初步探讨牛磺酸对油酸致大鼠ALI的干预作用以及对UⅡ、IMD表达影响,从而为临床治疗ALI提供新思路。

1 材料与方法

1 材料

1.1 主要试剂与仪器

牛磺酸(上海信宜药厂有限公司,国药准字H19999371),大鼠UⅡ、IMD ELISA试剂盒及抗体(北京博奥森生物科技有限公司),血气分析仪(GEM Premier 3 000),透射电镜(HITACHI H-7650)。

1.2 实验动物

健康清洁级雄性SD大鼠54只(北京维通利华实验动物技术有限公司提供),鼠龄9周,体质量280~310 g,常规条件下饲养,自由进食和饮水,室内温度22~24 ℃,湿度为40%~60%。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及造模方法 实验前禁食12 h。分为对照组(C组)6只,实验前连续3 d腹腔注射生理盐水(1 mL/100 g),实验中尾静脉注射生理盐水(0.15 mL/1 kg)后取材;油酸损伤组(A组)24只,实验前连续3 d腹腔注射生理盐水(1 mL/100 g),实验中尾静脉注射油酸(0.15 mL/1 kg)造成ALI;牛磺酸治疗组(T组)24只,实验前连续3 d腹腔注射牛磺酸生理盐水溶液(1 mL/100 g,20 mg/mL),实验中尾静脉注射油酸(0.15 mL/1 kg)造成ALI,A组与T组各下设4个时相点,每个时相点6只大鼠,自油酸注射后开始计时,分别于0、6、12、24 h取材。

1.3.2 标本采集和结果检测

1.3.2.1 血样采集 1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉后,将大鼠四肢固定在实验台上,颈前正中切口行气管切开,自主呼吸。左颈动脉插管,用50 kU/L肝素钠润滑过的1 mL注射器抽取动脉血0.5 mL血气分析仪测动脉血氧分压。继续取血2 mL,注入含10% EDTA 30 μL和抑肽酶30 μL的试管中,4 ℃下离心(3 000 r/min)15 min,血浆置于1.5 mL离心管,-80 ℃冻存待测。

1.3.2.2 支气管肺泡灌洗液(BALF)采集 放血处死大鼠,结扎右侧支气管,左肺用生理盐水2 mL行BALF 2次,取回收的BALF 2 mL注入含以上抗凝剂的试管,BALF处理同血液标本。

1.3.2.3 组织标本的制备 ①电镜标本:以最快速度取4~5块小米粒大小的右侧肺组织,置于专用固定液及缓冲液中,4 ℃冰箱保存,以备制作电镜片。②肺湿干质量比(W/D):分离右侧肺组织,取上叶,用吸水纸吸干表面水分后称肺湿质量,置于70 ℃烤箱烤至肺质量不再减少,称肺干质量,计算W/D。③右肺下叶浸泡于10%中性甲醛溶液中,24 h后脱水、石蜡包埋,光镜病理检查及免疫组化观察肺组织中UⅡ与IMD的分布和变化。

1.3.3 结果检测 血浆及BALF中UⅡ与IMD浓度采用酶联免疫分析法检测,在北京华英生物技术公司实验室完成。肺组织病理片由北京军区总医院病理科协助完成。肺组织免疫

组化检测及电镜分析由北京军区总医院附属八一脑科医院研究所协助完成。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较行方差分析,先行方差齐性检验,方差齐,两两比较行 q 检验。

2 结果

2.1 ALI 模型的建立

各组大鼠注射油酸或油酸加牛磺酸后数分钟,逐渐出现发绀,呼吸加深、加促,活动明显减少,1 ~ 2 h 最明显,持续至 10 余小时后逐渐缓解,但至 24 h 活动仍较正常大鼠少,少数大鼠出现肉眼血尿;活杀后肺组织大体观察,肺明显充血肿胀、淤斑,表面有较多渗出液,符合 ALI 模型,其中 T 组活动能力较 A 组早恢复 2 ~ 3 h,其肺组织肿胀不明显,表面充血减少。

2.2 各组大鼠血 $p(O_2)$,肺组织 W/D,血浆及 BALF 中 UⅡ、IMD 浓度

图 1A 示 A、T 组大鼠 $p(O_2)$ 损伤后 6、12、24 h 有统计学差异($P<0.05$),图 1B 示 A、T 组肺组织 W/D 在 0 h 及 6 h 有统计学差异($P<0.05$),图 1C 示 A、T 组血浆 UⅡ在 24 h 时有统计学差异($P<0.05$),图 1D 示 BALF UⅡ在 0 h 及 6 h 有统计学差异($P<0.05$),图 1E、F 示 A、T 组血浆及 BALF IMD 在 0 h 时有统计学差异($P<0.05$)。

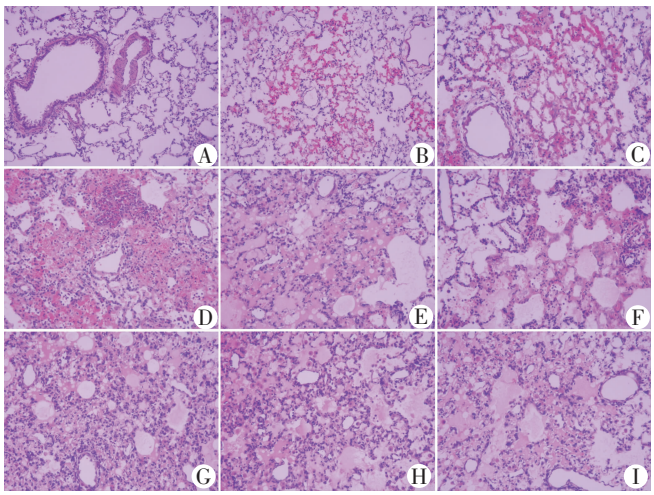
2.3 油酸致肺损伤及牛磺酸治疗对大鼠肺组织病理学的影响

2.3.1 大体标本观察　　油酸致伤鼠肺肉眼见肺脏轻度肿胀,可见斑片状出血坏死,整体肺组织充血,牛磺酸治疗后肺表面充血较 A 组减轻,斑片状出血减少。

2.3.2 光镜观察　　A 组肺泡萎陷,肺间质水肿,弥漫性出血,肺泡腔内可见大量红细胞渗出和中性粒细胞浸润,血浆蛋白渗出增多,形成透明膜,肺泡隔增厚。C 组肺组织正常。T 组肺组织渗出减轻,中性粒细胞及红细胞渗出减少。A 组中 0、6 h 损伤程度无明显变化,12 h 渗出开始减少,24 h 渗出明显减少,肺泡腔变小,T 组 0、6 h 与 A 组比较无明显差异,12 h 及 24 h 肺泡损伤均较 A 组减轻(图 2)。

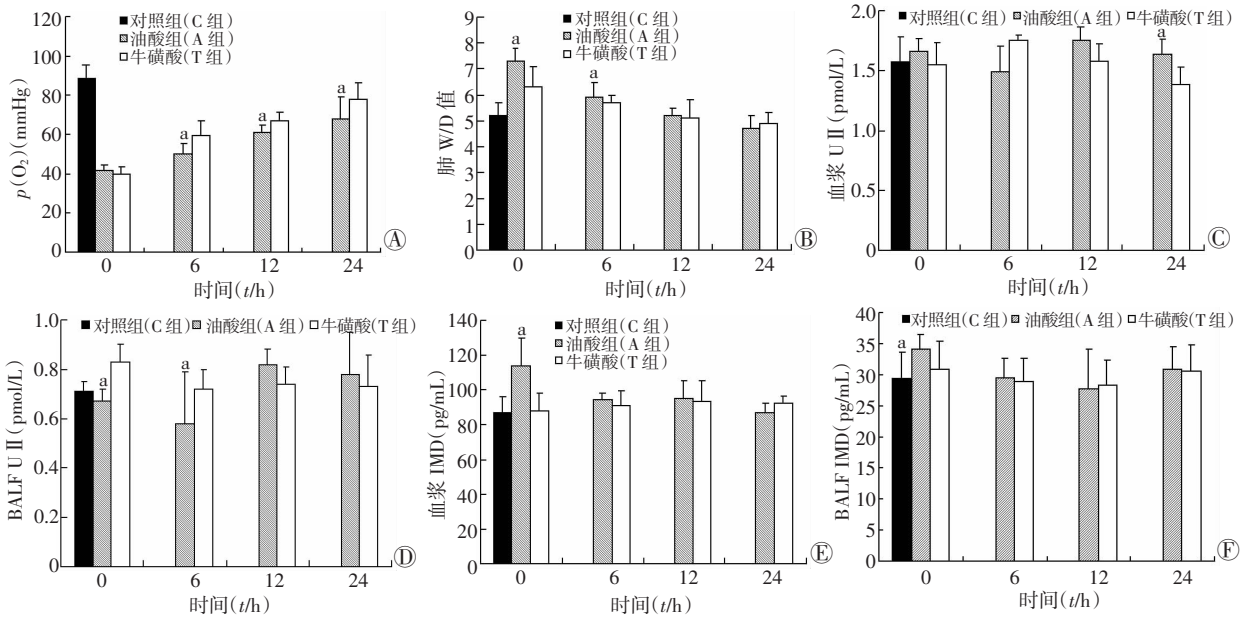
2.3.3 电镜观察　　C 组肺泡结构基本正常,内皮细胞及基底膜结构完整。A 组 0、6 h 毛细血管内皮细胞损伤,基底膜变薄,细胞间紧密连接基本正常;12、24 h 基底膜结构模糊,屏障破坏,肺泡间质中胶原增多。T 组 0、6 h 基底膜结构基本完整;12、24 h 基底膜结构基本完整,胶原增生不明显(图 3)。

2.3.4 免疫组化染色观察　　3 组大鼠支气管黏膜上皮细胞、平滑肌细胞,肺内血管内皮细胞、平滑肌细胞细胞膜及细胞质均有 UⅡ与 IMD 阳性表达,部分巨噬细胞胞核表达阳性,A 组与 T 组间表达无明显差异(图 4)。



A:对照组;B ~ E:分别为油酸损伤组(0、6、12、24 h);F ~ I:分别为牛磺酸治疗组(0、6、12 24 h)

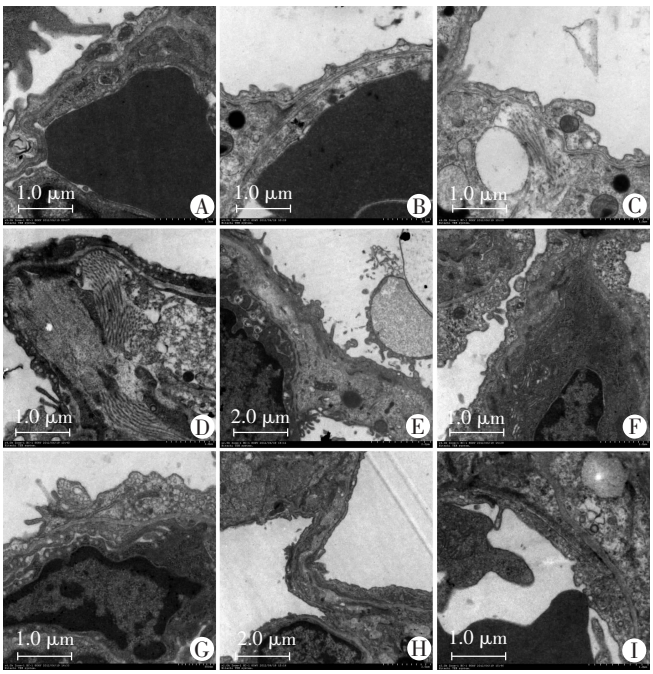
图 2　各组大鼠肺组织形态改变　(HE ×100)



a:$P<0.05$,与 T 组比较

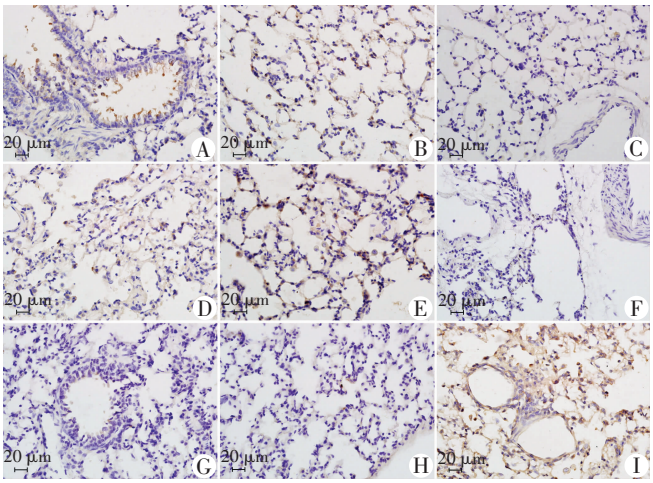
A:$p(O_2)$;B:肺组织 W/D;C:血浆 UⅡ;D:BALF UⅡ;E:血浆 IMD;F:BALF IMD

图 1　各组大鼠血 $p(O_2)$、肺组织 W/D、血浆及 BALF 中 UⅡ、IMD 浓度的变化



A:对照组;B~E:分别为油酸损伤组(0、6、12、24 h);F~I:分别为牛磺酸治疗组(0、6、12、24 h)

图3 各组大鼠肺泡毛细血管基底膜电镜观察 (TEM)

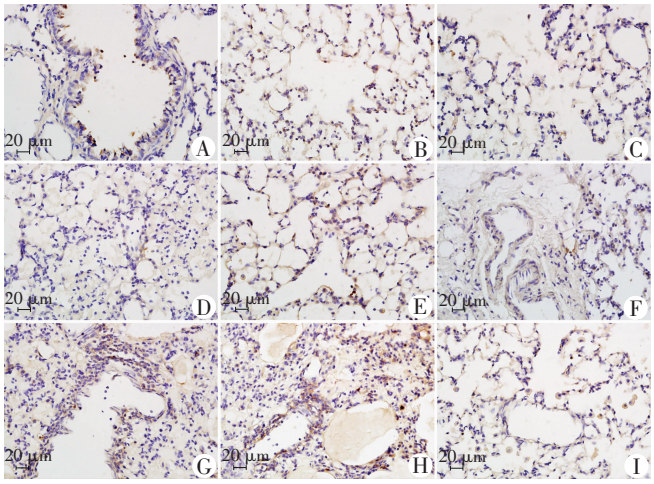


A:对照组;B~E:分别为油酸损伤组(0、6、12、24 h);F~I:分别为牛磺酸治疗组(0、6、12、24 h)

图4 各组大鼠肺组织UⅡ免疫组化染色结果 (SABC)

3 讨论

油酸型肺损伤模型由于其实验的可靠性已在肺损伤相关研究中得到广泛应用[13]。研究显示血管活性肽对ALI的发生、发展有明显影响。UⅡ是一种生长抑素样环肽,研究提示其对肺小动脉及全身阻力动脉具有强力扩张作用[14],可增加血管通透性[7],通过激活UT受体呈剂量依赖性刺激血浆渗出[15],同时可刺



A:对照组;B~E:分别为油酸损伤组(0、6、12、24 h);F~I:分别为牛磺酸治疗组(0、6、12、24 h)

图5 各组大鼠肺组织IMD免疫组化染色结果 (SABC)

激白介素-6的释放[7],在心肺疾病中发挥重要的调节作用。UⅡ在肺组织中可增强气道收缩,扩张血管,增加血管通透性造成血浆渗出增加,刺激炎症因子的释放,这些均是引发ALI重要环节。国内有研究报道ALI大鼠血浆中UⅡ浓度随病程进行性升高[16]。IMD通过CGRP家族共同的受体系统——降钙素受体样受体/受体活性修饰蛋白复合物发挥效应。Pfeil等[17]在实验中发现,IMD能阻止压力诱导人肺微血管单层内皮细胞模型的内皮渗透性增高;而且,IMD通过受体介导的方式和激活单层内皮细胞内的蛋白激酶(PKA),降低了基础渗透性和凝血酶诱导的细胞高渗透性。近日Aslam等[18]发现IMD通过CRLR/PAMP2受体复合物稳定了人脐静脉内皮细胞的屏障功能,证实了IMD是内皮屏障稳定因子,并指出IMD是在炎症状态下减轻血管渗出的潜在作用因子。

本研究结果显示:静脉注射油酸后大鼠肺损伤严重,迅速出现$p(O_2)$明显降低,肺W/D升高,而损伤前腹腔注射牛磺酸可减轻肺损伤,促进$p(O_2)$恢复接近正常水平,降低肺W/D减轻肺水肿,与国外实验结果一致[11];组织病理学检查及电镜结果提示T组损伤后12 h及24 h较A组明显减轻,肺泡渗出减少,毛细血管基底膜结构完整,胶原纤维增生不明显,本实验结果说明牛磺酸可减轻油酸所致肺损伤。

早期关于牛磺酸的肺损伤保护作用的报道多集中在抗炎、抗氧化作用[11-12]。目前血管活性肽在肺损伤的发病中越来越受到重视,牛磺酸对血管活性肽是否

有影响引起了我们的注意。实验中T组血浆中UⅡ在6 h时即达到最高,此后逐渐降低,达峰时间比A组提前,在24 h较A组显著降低,同时组织病理学及电镜结果提示损伤早期(0、6 h)两组肺泡损伤及渗出无明显差异,12 h及24 h T组损伤有所减轻,提示牛磺酸可能通过降低血浆中UⅡ浓度减轻肺损伤。与国内研究结果[16]不同,T组BALF中的UⅡ浓度损伤早期(0、6 h)即达到最高,后期降低并与对照组无差异,推测肺泡上皮细胞损伤早期参与UⅡ的合成或分泌,ALI发生后多种炎性细胞激活,炎症反应明显,即刻刺激分泌增强,故牛磺酸在肺损伤早期并不能抑制UⅡ分泌,随着病程进展,牛磺酸通过抑制血浆中UⅡ升高发挥肺保护作用。

A组血浆及BALF中IMD浓度在0 h时高于T组,其余时间点差异不显著。机体在损伤刺激后IMD反应性升高,由于牛磺酸具有抗炎及抗氧化性质,可发挥肺保护作用,牛磺酸治疗后,机体受损伤刺激作用减少,故在T组中IMD浓度反而下降,推测牛磺酸并不能通过刺激IMD分泌发挥肺保护作用。

综上所述,牛磺酸对油酸致ALI有保护作用,其机制可能是通过抑制UⅡ表达,减轻毛细血管基底膜损伤后肺泡渗出发挥保护作用,尚不能证明通过刺激IMD分泌发挥肺保护作用。本研究为临床研究治疗ALI提供了新思路,但由于ALI发病机制复杂,UⅡ与IMD体内分布广泛,受影响因素多,故仍需进一步探讨其可能的发病机制。

参考文献:

[1] Headley A S, Trolley E, Meduri G U. Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome[J]. Chest, 1997, 111(5): 1306-1321.

[2] Phua J, Badia J R, Adhikari N K, *et al*. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(3): 220-227.

[3] Cohn J N. Myocardial structural effects of aldosterone receptor antagonism in Heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2007, 50(7): 597-599.

[4] Miller A B. Aldosterone antagonism in heart failure[J]. Vasc Health Risk Manag, 2007, 3(5): 605-609.

[5] Roh J, Chang C L, Bhalla A, *et al*. Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes[J]. J Biol Chem, 2004, 279(8): 7264-7274.

[6] Takei Y, Inoue K, Ogoshi M, *et al*. Identification of novel adrenomedullin in mammals: a potent cardiovascular and renal regulator[J]. FEBS Lett, 2004, 556(1/3): 53-58.

[7] Johns D G, Ao Z, Naselsky D, *et al*. Urotensin-Ⅱ-mediated cardiomyocyte hypertrophy: effect of receptor antagonism and role of inflammatory mediators[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004, 370(4): 238-250.

[8] 于晓敏, 刘新民, 齐永芬, 等. 中介素1-53对油酸致大鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(12): 808-811.

[9] Pan C, Giraldo G S, Prentice H, *et al*. Taurine protection of PC12 cells against endoplasmic reticulum stress induced by oxidative stress[J]. J Biomed Sci, 2010, 17 Suppl 1: S17.

[10] 秦建伟, 别平, 朱瑾. 环孢素A对大鼠肝脏缺血再灌注后线粒体细胞色素C释放及肝细胞凋亡的影响[J]. 消化外科, 2005, 4(6): 416-420.

[11] Bhavsar T M, Cantor J O, Patel S N, *et al*. Attenuating effect of taurine on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in hamsters[J]. Pharmacol Res, 2009, 60(5): 418 428.

[12] Yucel O, Kunak Z I, Macit E, *et al*. Protective efficiacy of taurine against pulmonary edema progression: experimental study[J]. J Cardiothorac Surg, 2008, 3: 57.

[13] Furue S, Kuwabara K, Mikawa K, *et al*. Crucial role of group ⅡA phospholipase A(2) in oleic acid-induced acute lung injury in rabbits[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999, 160(4): 1292-1302.

[14] Stirrat A, Gallagher M, Douglas S A, *et al*. Potent vasodilator responses to human urotensin-Ⅱ in human pulmonary and abdominal resistance arteries[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 280(2): H925-H928.

[15] Vergura R, Camarda V, Rizzi A, *et al*. Urotensin Ⅱ stimulates plasma extravasation in mice *via* UT receptor activation[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004, 370(5): 347-352.

[16] 赖荣德, 梁子敬. 急性肺损伤大鼠血浆及支气管肺泡灌洗液中尾加压素Ⅱ的变化及意义[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(8): 501-502.

[17] Pfeil U, Aslam M, Paddenberg R, *et al*. Intermedin/adrenomedullin-2 is a hypoxia-induced endothelial peptide that stabilizes pulmonary microvascular permeability[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2009, 297(5): L837-L845.

[18] Aslam M, Pfeil U, Gunduz D, *et al*. Intermedin(adrenomedullin2) stabilizes endothelial barrier and antagonizes thrombin-induced barrier failure in endothelial cell monolayers[J]. Br J Pharmacol, 2012, 165(1): 208-222.

(**收稿**:2013-02-25;**修回**:2013-03-21)

(编辑 邓强庭)