维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2004)02-0131-03

急性肺损伤大鼠肺表面活性物质及肺表面活性物质蛋白的研究

许 峰,何 勇,匡凤梧,卢仲毅,王兴勇

(重庆医科大学儿科学院 PICU,重庆 400014)

【摘 要】目的:探讨肺表面活性物质(PS)及肺表面活性物质蛋白(SP)在内毒素(LPS)性急性肺损伤(ALI)中的变化趋势。方法:成年 Wistar 大鼠随机分为对照组(NS 组)和肺损伤组(ALI 组),ALI 组采用 LPS 诱导建立 ALI 模型。用定磷法和高效液相色谱法动态监测了 NS 组和 ALI 组第 1、3、5、7h 大鼠支气管肺泡灌洗液(BALF)中的总磷脂(TPL)和磷脂各组分,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)的方法检测肺组织 SP-A、SP-BmRNA 的表达情况,此外对肺损伤的病理学改变也进行了对比分析。结果:与 NS 组比较,ALI 组有明显水肿、出血和炎症。BALF 中 TPL 在 1、3、5、7h 明显低于 NS 组($P<0.05$),卵磷酯胆碱(PC)在 3、5、7h 明显低于 NS 组($P<0.05$);而溶血卵磷脂(LPC)在 1、3、5、7h 明显高 NS 组($P<0.05$)。肺组织 SP-A、SP-BmRNA 表达在 3、5、7h 明显低于 NS 组($P<0.05$)。结论:ALI 存在 PS 的代谢改变,以及 SP-A、SP-BmRNA 的表达降低,PS 含量的降低和组分的改变是导致难以纠正的低氧血症重要原因之一。

【关键词】急性肺损伤;肺表面活性物质;大鼠

【中国图书分类法分类号】R563.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2003-09-26

Study of pulmonary surfactant and surfactant protein in rats with LPS-induced acute lung injury

XU Feng, et al

(*Department of PICU, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the alteration trend of pulmonary surfactant(PS) and surfactant-associated protein(SP) in rats with LPS-induced acute lung injury(ALI). *Methods*: Fifty-six adult Wistar rats were randomly divided into normal saline(NS) group and ALI group. The levels of mRNA of the SP-A, SP-B were measured by reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR) during iv LPS at 1,3,5,7h. The content and component of PS in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured by high performance liquid chromatography (HPLC). In addition, studies on lung dry/wet weight ratio, the protein content of BALF, alveolar oxygen partial pressure (PaO_2) and histological changes were performed. *Results*: Compared with the NS group, ALI group developed severe lung damage. Edema, hemorrharge and inflammatory changes were found. Total phospholipids (TPL) of BALF at 1,3,5,7h were lower than those in the NS group($P<0.05$); phosphatidylcholine(PC) at 3,5,7h were lower than those in the NS group ($P<0.05$); while lysophosphatidylcholine (LPC) at 1,3,5,7h were higher than those in the NS group($P<0.05$). The expression of SP-A, SP-B mRNA at 3,5,7h were less than those in the NS group($P<0.05$). *Conclusion*: The changed metabolism of PS exists in the pathogenesis of ALI, which is mainly demonstrated as that the decrease in TPL, PC, will decrease expression of SP-A, SP-B mRNA. Decrease in content and change in components of PS may play an important role in severe hypoxemia in ALI.

【Key words】Acute lung injury; Pulmonary surfactant; Rat

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合症(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是临床上最棘手的危重症,病死率高达 40%~60%。已知原发性肺表面活性物质(pulmonary surfactant PS)缺乏是引起新生儿呼吸窘迫综合症的关键性因素,但对于 ALI 和 ARDS 发病机理中 PS 的动态变化尚缺乏研究。新近研究表明 ALI 是 ARDS 发病过程中的早期阶段[1,2],PS 代谢异常可能与 ALI 和 ARDS 发病机制有关[3,4]。本文采用大剂量内毒素(LPS)静脉注射的方法复制大鼠 ALI 模型,动态检测总磷脂(Total phospholipids, TPL)、磷

作者介绍:许 峰(1963-),男,主任医师,博士,主要研究方向:急性肺损伤的发病机制

基金项目:重庆市卫生局回国人员科研基金资助项目(基金号:006002)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

脂各组分以及肺表面活性物质蛋白(surfactant - associated protein,SP)表达的变化趋势,旨在进一步了解 PS 的改变在 ALI 和 ARDS 的发病机制中的作用。

1 材料与方法

1.1 ALI 动物模型的建立

Wistar 大鼠 56 只随机分为生理盐水对照组(NS 组,24 只)和急性肺损伤组(ALI 组,32 只),ALI 组经舌下静脉注射 PLS 15mg/kg(011lB4 sigma 公司)复制 ALI 模型。NS 组舌下静脉注射相同剂量的生理盐水。两组于注射后第 1、3、5、7h 分别做颈动脉分离插管术采 1ml 动脉血做氧分压(PaO_2)后放血处死,迅速打开胸腔,结扎左侧主支气管,取左肺上部检测肺系数(肺干/湿重比);左肺中部冲净血后置 - 70℃ 液氮中保存待测 SP mRNA;左肺下部作病理检查。右侧肺作支气管肺泡灌洗液(BALF):4℃ 生理盐水 5ml,反复灌洗 3 次后回收,回收率超过 90%。BALF 4℃ 离心 5min,取上清液 - 20℃ 保存。

1.2 BALF 中 TPL 和磷脂组分分析

BALF 中 TPL 采用定磷法测定[5],磷脂各组分分析采用高效液相色谱法测定[6],标准品磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰肌酰(PI)、磷脂酰乙醇胺(PE)、溶血卵磷脂(LPC)购置美国 sigma 公司;采用日本 Shimadzu 公司高效液相色谱仪检测。

1.3 肺表面活性物质蛋白(SP - A,SP - B)mRNA 检测

RNA 提取用异硫氰胍一步法快速提取总 RNA,经紫外光检测 OD_{260} 和 OD_{280},OD_{260}/OD_{280} 在 1.6 ~ 2.2 之间,用 OD_{260} 计算总 RNA 的浓度。RT—PCR 反应引物按参考文献[7]并由上海生工生物工程公司合成,引物序列如下:SP - A(747bp)上游引物 5' - atgtcactgtgtcttggcettc - 3' 下游引物 5' - tcaaaattcacaaacagccagcc - 3',SP - B(410bp)上游引物 5' - aagacgctttccaggacacg - 3',下游引物 5' - cacggccagcacaccccttg - 3' β - actin 作内对照。PCR 反应条件:94℃ 变性 30s,60℃ 退火 30s,70℃ 延伸 45s,共 30 个循环。模板量及循环数经预检测均在线性范围内。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳后,以 UVP 计算机图像扫描分析系统测定电泳条带密度值,以 β - actin 为内参照,计算 SP - A、SP - BmRNA 的相对含量。

1.4 肺系数和 BALF 总蛋白检测

肺系数由肺干湿重比反映,取左侧上肺后,立即称湿重,再置于 80℃ 烤箱中 24h 至重量恒定即干重,计算干/湿重比。BALF 总蛋白考马氏亮兰法检测。病理切片作 HE 染色后用普通显微镜观察。

1.5 统计学方法

实验数据结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,均采用 SPSS11.0 版统计学软件处理。$P<0.05$ 表示差异有显著性。

2 结 果

2.1 肺损伤指标

ALI 组大鼠经静脉注入 LPS 后,30min 即出现烦躁不安、呼吸急促,而后又出现精神萎糜、嗜睡,从鼻腔流出泡沫状血性物,部分大鼠出现腹泻。所有 ALI 组均可见整个肺组织充血,在 3、5、7h 可见点状及斑片状出血坏死灶。光镜可见 ALI 组肺间质弥漫性充血,大量炎性淋巴细胞浸润,肺泡内大量红细胞渗出,对照组无明显充血及坏死改变,ALI 组各时段肺系数、血 PaO_2 和 BALF 总蛋白变化见表 1。

表 1 动脉血 P_aO_2(kPa)、肺系数及 BALF 蛋白(g/l)变化($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	P_aO_2	肺系数	BALF 蛋白
NS_1	6	13.0 ± 0.63	0.28 ± 0.74	0.29 ± 0.03
ALI_1	8	12.79 ± 0.89	0.2 ± 0.03*	0.85 ± 0.11*
NS_3	6	13.02 ± 0.29	0.29 ± 0.07	0.30 ± 0.05
ALI_3	8	11.64 ± 0.40*	0.14 ± 0.04*	1.25 ± 0.16*
NS_5	6	12.78 ± 0.50	0.29 ± 0.18	0.31 ± 0.08
ALI_5	8	8.09 ± 0.38*	0.13 ± 0.03*	1.33 ± 0.24*
NS_7	6	12.95 ± 0.71	0.29 ± 0.09	0.27 ± 0.06
ALI_7	8	7.27 ± 0.42*	0.11 ± 0.03*	1.52 ± 0.19*

注:* 指 ALI 组与相应 NS 组比较 $P<0.05$。

表 2 BALF 中 TPL 及磷脂组份变化($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TPL(μg)	PI(μg)	PE(μg)	PC(μg)	LPC(μg)
NS_1	6	831.1 ± 99.8	45.5 ± 14.4	44.4 ± 1.11	234.8 ± 49.9	0
ALI_1	8	685 ± 104.3*	38.5 ± 11.8*	40.9 ± 7.7	191.9 ± 36.77	1.2 ± 0.68*
NS_3	6	808.5 ± 69.1	40.9 ± 7.2	50.3 ± 11.9	247.6 ± 69.4	0
ALI_3	8	643.1 ± 55.6*	31.2 ± 9.3	32.7 ± 5.2*	173.4 ± 40.6*	1.6 ± 0.67*
NS_5	6	776.4 ± 87.1	46.8 ± 8.7	42.8 ± 9.6	262.1 ± 74.1	0
ALI_5	8	393.4 ± 76.4*	30.1 ± 6.8*	33.3 ± 8.2	118.6 ± 25.2*	5.5 ± 1.05*
NS_7	6	827.9 ± 65.3	44.9 ± 10.5	44.0 ± 8.0	225.5 ± 49.5	0
ALI_7	8	312.7 ± 52.2*	31.0 ± 5.7*	30.2 ± 9.2*	59.1 ± 15.0*	16.7 ± 3.2*

注:* 指 ALI 组与相应 NS 组比较 $P<0.05$。

TPL:总磷脂,PI:磷脂酰肌醇,PE:磷脂酰乙醇胺,PC:卵磷脂胆碱,LPC:溶血卵磷脂

维普资讯 http://www.cqvip.com

2.2 肺表面活性物质变化

BALF 中 TPL 及磷脂组份变化见表 2，肺组织 SP mRNA 变化见表 3，可见 BALF 中 TPL 在 1、3、5、7h 明显低于 NS 组($P<0.05$)，PC 在 3、5、7h 明显低于 NS 组($P<0.05$)；LPC 在 1、3、5、7h 明显高于 NS 组($P<0.05$)。肺组织 SP－A、SP－B mRNA 表达在 3、5、7h 明显低于 NS 组($P<0.05$)。

表 3 肺组织 SP mRNA 变化($\bar{x}\pm s$)

组别	例数	SP－A	SP－B
NS_1	4	0.76±0.07	0.69±0.15
ALI_1	4	0.71±0.09	0.56±0.05*
NS_3	4	0.74±0.13	0.59±0.09
ALI_3	4	0.67±0.08*	0.41±0.09*
NS_5	4	0.73±0.11	0.64±0.07
ALI_5	4	0.42±0.06*	0.25±0.07*
NS_7	4	0.73±0.09	0.69±0.15
ALI_7	4	0.18±0.05*	0.19±0.05*

注：* 指 ALI 组与相应 NS 组比较 $P<0.05$

3 讨 论

本文显示注射 LPS 后 ALI 组动脉血 PaO_2 呈进行性下降趋势，同时肺系数下降和 BALF 总蛋白增加，肺组织病理切片中可见肺间质水肿，弥漫性出血，肺泡腔内大量红细胞渗出和淋巴细胞浸润，肺泡塌陷、萎陷，这些变化均非常相似与人类 ALI 的病理生理特征。

PS 由磷脂和蛋白两种成份构成，其中磷脂占 90%以上，蛋白仅占不到 10%，磷脂中包括卵磷脂胆碱(PC)、磷脂酰甘油(PG)、神经鞘磷脂(SPH)、磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰乙醇胺(PE)等，其中主要成分是 PC，蛋白包括 SP－A、SP－B、SP－C、SP－D。本文显示在 LPS 注射后第 1 至 7h，TPL 呈进行性下降。磷脂组分变化最大的是 PC 和 LPC，PC 在 ALI 组进行性下降，到第 7h 已降至对照组的 1/4，而 LPC 在 ALI 组进行性升高达十几倍。目前推测导致 PS 变化的机制，一是 LPS 损伤了肺泡血管导致血浆蛋白漏出，血浆蛋白对 PS 有很强的抑制作用，导致内源性 PS 灭活[8]，二是 LPC 的显著上升与磷脂酶 A_2(PLA_2)的大量分泌有关，LPS 激活巨噬细胞和 PMN，释发 PLA_2，PS 的主要成分 PC 是 PLA_2 的最适底物，PC 被分解后生成极性更强、破坏性更大的 LPC，使得肺泡－毛细血管进一步损伤，从而构成恶性循环[9,10]。

虽然磷脂对 PS 功能致关重要，但只有在 SP 同时存在时，才能有效发挥其降低表面张力的生理功能[11]，本文发现 SP－A、SP－B mRNA 表达呈明显的下降趋势。提示 PS 功能受到严重的破坏或抑制，这可能与 LPS 对Ⅱ型肺泡上皮细胞的直接损伤有关。

内毒素诱导 ALI 模型中，存在 PS 含量的降低和组分改变，此虽与新生儿呼吸窘迫综合症因肺发育不成熟所致的原发性 PS 缺乏不同，但 PS 质和量的异常促进了肺损伤的发生和发展，而肺损伤加重又可进一步导致 PS 功能障碍，导致肺顺应性下降、肺萎缩塌陷，造成肺弥散功能障碍(弥散膜面积减少及弥散膜厚度增加)及通气与血流比例失调，引起难以纠正的低氧血症，恢复 PS 功能，阻断这一恶性循环是 PS 替代疗法治疗 ALI 的理论基础[12]。

参 考 文 献

[1] Goss CH, Brower RG, Hudson LD, et al. Incidence of acute lung injury in the United States[J]. Crit Care Meal, 2003; 31 (6): 1607－1611.

[2] Hudson LD, Uilerg JA, Anardi D, et al. Clinical risks for development of the adult respiratory distress syndrome[J]. Am Rev Respir Dis, 1995; 151: 293－301.

[3] Gunther A, Siebert C, Schmidt R, et al. Surfactant alterations in severe pneumonia acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996; 153: 176－184.

[4] Raymondos K, Leuwer M, Haslam PL, et al. Compostional, structural, and functional alterations in pulmonary surfactant in surgical patients after the early onset of systemic inflammatory response syndrome or sepsis [J]. Crit Care Med, 1999; 27: 82－89.

[5] 王 抒. 中华医学检验全书[M]. 第 1 版，北京：人民卫生出版社，1996; 737－739.

[6] 欧阳瑶，耿秋明，赵鸣武，等. 大鼠支气管肺灌洗液磷脂组分的高效液相色谱测定[J]. 贵阳医学院学报，1997; (21): 203－204.

[7] Zhong Yuan Li, Kazunori Hirayoshi, Yasuhiro Suzuki. Expression of N－deacetylase/sulfotransferase and 3－O－sulfotransferase in rat alveolar type Ⅱ cells[J]. Lung cellular and molecular physiology, 2000; 279(2): 292－301.

[8] Arbibe L, Koumanov K, Daniel Vier, et al. Generation of Lyso－Phospholipids from Surfactant in Acute Lung Injury Is Mediated by Type－H phospholipase A2 and (下转第 152 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

bcl-2 mRNA 和蛋白表达率显著下降。本实验对 bcl-2 蛋白定量测定发现，孕激素能明显降低卵巢癌细胞 H0-8910 的 bcl-2 蛋白表达。bcl-2 蛋白的下降可能是孕激素诱发 H0-8910 细胞凋亡的机理之一，孕激素能够解除 bcl-2 基因对抗细胞凋亡的作用。

参 考 文 献

[1] Boente MP. Early ovarian cancer: a review of its genetic and biologic factors, detection and treatment [J]. Curr Probl Obstet Gynecol Fertil, 1997; 20: 37-66.

[2] Henderson BE, Ross R, Bernstein L. Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation Award Lecture[J]. Cancer Res, 1988; 48: 246-253.

[3] 鄂 征. 组织培养和分子细胞学技术[M]. 第 1 版. 北京：北京出版社，1994；78-85.

[4] Blaakaer J. The pituitary-gonadal function in postmenopausal women with epithelial ovarian tumors[J]. APMIS, 1997; 105: 5-27.

[5] Waksmanski B, Dudkiewicz J, Kowalski T. Changes in insulin-like growth factor 1, 17-b-estradiol, and progesterone in postmenopausal women with benign and malignant ovarian tumours[J]. Med Sei Monit, 2001; 7: 919-923.

[6] Langdon SP, Ritchie A, Yong K, et al. Constrasting effects of 17β-estradiol on the growth of human ovarian carcinoma cells in vitro and in vivo[J]. Int J Cancer, 1993; 55: 459-464.

[7] 牟瀚舟，许沈华，张弈荫，等. 人卵巢癌细胞系 H0-8910 的建立及其生物学特性[J]. 中华妇产科杂志，1994；29：162-164.

[8] Lindgren P, Backstrom T, Mahlck CG, et al. Steriod receptors and hormones in relation to cell proliferation and apoptosis in poorly differentiated epithelial ovarian tumors[J]. Int J Oncol, 2001; 19: 31-38.

[9] Choi KC, Kang SK, Tai CJ, et al. Follicle-stimulating hormone activates mitogen-activated protein kinase in preneoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002; 87: 2245-2253.

[10] Langdon SP, Gabra H, Bartlett JM, et al. Functionality of the progesterone reecptor in ovarian cancer and its regulation by estrogen[J]. Clin Cancer Res, 1998; 4: 2245-2251.

[11] Yu S, Lee M, Shin S, et al. Apoptosis induced by progesterone in human ovarian cancer cell line SNU-840[J]. J Cell Biochem, 2001; 82: 445-451.

[12] Rodriguez GC, Nagarsheth NP, Lee KL, et al. Progestin induced apoptosis in the Macaque ovarian epithelium: differential regulation of transforming growth factor-beta[J]. J Natl Cancer Inst, 2002; 94: 50-60.

[13] Formby B, Wilcy TS. Bcl-2, survivin and variant CD44 v7-v10 are downregulated and p53 is upregulated in breast cancer cells by progesterone: inhibition of cell growth and induction of apoptosis[J]. Mol Cell Biochem, 1999; 202: 53-61.

(上接第 133 页)Inhibited by a Direct surfactant protein A-Phospholipase A2 protein interaction[J]. J Clin Invest, 1998; 102(6): 1152-1160.

[9] Hidi R, Vial D, Havet N, et al. Inhibition by pulmonary surfactant Curosurf of secretory phospholipase A_2 express ion in guinea-pig alveolar macrophage [J]. Biochim pharmacol, 1997; 54 (9): 1055-1058.

[10] Wu Y, Singer M, Thouron F, et al. Effect of surfactant on pulmonary expression of typeIIA PLA(2) in an animal model of acute lung injury[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002; 282(4): L743-750.

[11] Cheng IW, Ware LB, Greene KE, et al. Prognostic value of surfactant proteins A and D in patients with acute lung injury [J]. Crit Care Med, 2003; 31(1): 311-313.

[12] Lewis JF, Brackenbury A. Role of exogenous surfactant in acute lung injury[J]. Crit Care Med, 2003; 31(4s): S324-328.