DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.033
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
824 2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0824-03

二次打击肺损伤大鼠肺组织中LBP的表达及山莨菪碱的保护作用

侯一峰,毛宝龄,钱桂生,徐剑铖 (第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探讨机体遭受一次打击后,脂多糖结合蛋白(LBP)对二次打击的增敏效应及山莨菪碱的保护机制。方法 用油酸(OA,0.2 ml/kg)和脂多糖(LPS,2 mg/kg)两次致伤,复制大鼠急性肺损伤模型。用RT-PCR检测肺组织中LBP、TNFα、IL-10 mRNA的表达,并行病理组织学观察和动脉血气分析。结果 一次打击可使肺组织中LBP的表达明显增强,在此基础上行二次打击后,肺组织中TNFα和IL-10的表达增高;山莨菪碱干预可抑制LBP的上调,减少TNFα和IL-10的表达,病理改变也有所减轻。结论 第一次打击后LBP的反应性上调是使机体对第二次打击敏感性增加的重要机制,山莨菪碱可能通过抑制LBP的过度表达,阻断LBP对LPS的增敏作用,从而发挥其对肺损伤的防治作用。

关键词:脂多糖结合蛋白;急性肺损伤;山莨菪碱
中图法分类号:R284.1;R341;R563 文献标识码:A

Expression of lipopolysaccharide binding protein mRNA in pulmonary tissues of rat with 'two-hit' acute lung injury and the protective effects of anisodamine in this event

HOU Yi-feng, MAO Bao-ling, QIAN Gui-sheng, XU Jian-cheng (Institute of Respiratory Diseases of PLA, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the potential role of lipopolysaccharide binding protein (LBP) in rat acute lung injury following 'two hit' and the protective effects of anisodamine. **Methods** The animal model of acute lung injury was established with the oleic acid (OA, 0.2 ml/kg) and lipopolysaccharide (LPS, 2 mg/kg) in Wistar rats. LBP, TNFα and IL-10 mRNA expressions in pulmonary tissues were determined with RT-PCR. The pathological changes of pulmonary tissues and arterial blood gas were observed. **Results** LBP mRNA expression was up-regulated after injection of OA alone. The expressions of TNFα and IL-10 mRNA in rat treated with OA and LPS were higher than those in OA-treated rats. Anisodamine inhibited the expressions of LBP, TNFα and IL-10 mRNA, and alleviated the pulmonary tissue damage. **Conclusion** The up-regulation of LBP after the first hit with OA is an important mechanism of increasing sensitivity to second hit with LPS, and anisodamine has a protective effect on acute lung injury through down-regulation of the LBP expression in pulmonary tissues.

Key words: lipopolysaccharide binding protein; acute lung injury; anisodamine

机体遭受创伤后,可导致全身炎症反应综合征(SIRS)。SIRS可以一开始就是全身性炎症反应,也可以由局部炎症发展为全身性炎症。后者表现为初始打击虽未导致难以控制的全身炎症反应,但由于大量炎性因子的释放和机体免疫功能降低,使机体敏感性增高。如并发外源性感染或细菌移位等,则可诱发SIRS,甚至多脏器功能障碍综合征(MODS)和死亡,这就是Bone[1]提出的"二次打击"学说。LPS是引起SIRS的重要原因,LBP是一种能增敏LPS效应的急性反应期蛋白[2],但有关LBP在"二次打击"中的作用目前尚不清楚。本研究用油酸(Oleic acid,OA)和LPS复制大鼠"二次打击"肺损伤模型,并在山莨菪碱干预后观察肺组织中LBP、TNFα、IL-10 mRNA的表达及病理组织学改变,旨在探讨机体遭受第一次打击后,对第二次打击的高敏感性与LBP的关系及山莨菪碱的保护机制。

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39730210)

作者简介:侯一峰(1963-),男,山西省太原市人,博士研究生,主治医师,主要从事全身炎症反应综合征和急性肺损伤方面的研究,发表论文6篇。电话:(032)68755320

收稿日期:2001-03-15;修回日期:2001-05-20

1 材料与方法

1.1 实验材料

大肠杆菌(O111:B4)为Sigma产品。M-MLV逆转录酶为Promega产品,Taq DNA聚合酶为上海生工产品,其它试剂为国产分析纯。PCR引物由新桥医院张青博士惠增。

1.2 动物模型及分组

盐酸氯胺酮(80 mg/kg)腹腔麻醉,Wistar大鼠66只分为:①一次打击组(n=24,每时相点n=6):尾静脉注入OA 0.2 ml/kg后1、3、6和12 h活杀取肺,检测肺组织中LBP mRNA的表达,在6 h点检测TNFα和IL-10 mRNA的表达。②一次打击+山莨菪碱组(n=24,每时相点n=6):尾静脉注入OA 0.2 ml/kg,同时注入山莨菪碱(10 mg/kg)后1、3、6和12 h活杀取肺,检测肺组织中LBP mRNA的表达,在6 h点检测TNFα和IL-10 mRNA的表达。③二次打击组(n=6):注入OA 0.2 ml/kg 4 h后,尾静脉注入LPS(2 mg/kg),观察2 h活杀取肺,检测肺组织中LBP和TNFα、IL-10 mRNA的表达。④二次打击+山莨菪碱组(n=6):尾静脉注入OA 0.2 ml/kg,同时注入山莨菪碱(10 mg/kg),4 h后尾静脉注入LPS(2 mg/kg),观察2 h活杀取肺,检测肺组织中LBP和TNFα、IL-10 mRNA的表达。⑤正常对照组(n=6):未予处理。所有动物活杀前均采动脉血行血气分析,并留右肺行病理组织学检查。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.3　肺组织中 LBP 和 TNFα、IL-10 mRNA 的表达

1.3.1　肺组织总 RNA 提取　　称取肺组织 100 mg, 按 Tripure 核酸提取试剂说明书中的方法提取组织总 RNA。

1.3.2　逆转录-PCR　　根据分子克隆技术中逆转录 PCR 技术对大鼠 LBP、TNFα、IL-10 和β-actin 的 mRNA 进行扩增。将扩增产物行琼脂糖(2%)凝胶电泳, 用 SxImag 软件将扩增片段的积分光密度与β-actin 的积分光密度相比, 数据以标准化积分密度(Normalized integrated intensity, NII)表示。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 并用 SPSS10.0 for windows 进行方差分析和 t 检验。

2　结果

2.1　动脉氧分压的变化

单 OA 和 OA+LPS 致伤后, PaO_2[(8.13±0.59), (6.27±0.58)kPa] 均较正常对照组[(11.61±0.82)kPa] 下降($P<0.01$), 并且二次打击组 PaO_2 明显低于一次打击组($P<0.01$)。二次打击+山莨菪碱组的 PaO_2[(8.32±0.54)kPa] 高于二次打击组($P<0.01$)。

2.2　病理观察

单纯 OA 致伤后, 大鼠肺表面呈暗红色, 胞膜下充血水肿。二次打击大鼠肺胞膜下可见大片出血, 光镜下见肺泡腔内大量水肿液, 并有肺泡萎陷和大量白细胞浸润。山莨菪碱治疗组肺组织病理改变有所减轻, 见图 1~3。

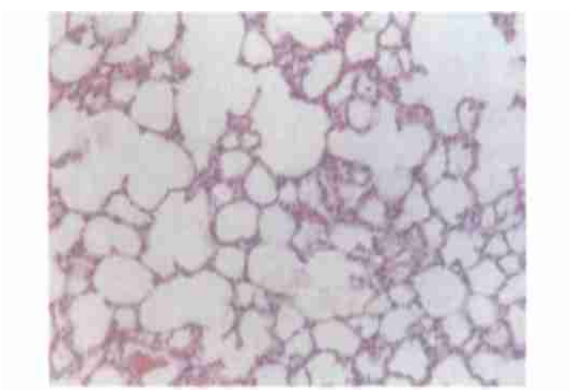


图 1　一次打击后大鼠肺组织病理切片　(HE×200)

Fig 1　Pathological changes of rat lung tissue after the first hit with OA alone　(HE×200)

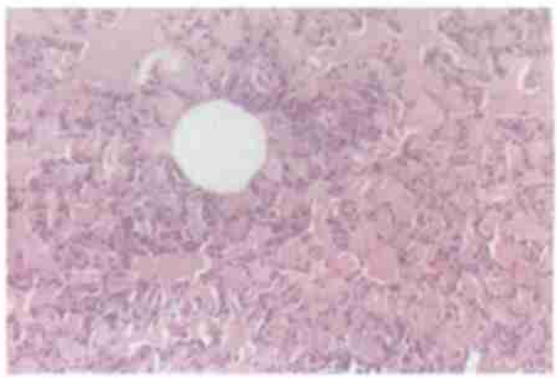


图 2　二次打击后大鼠肺组织病理切片　(HE×200)

Fig 2　Pathological changes of rat lung tissue after two hit with OA and LPS　(HE×200)

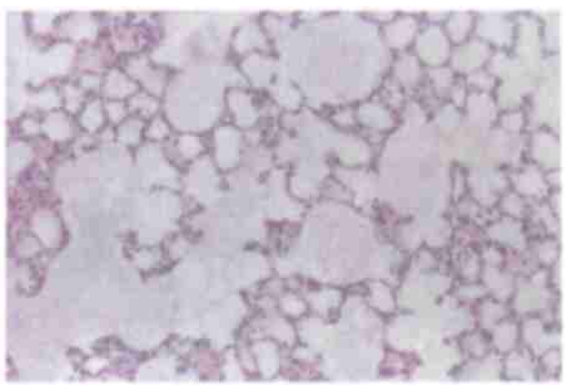


图 3　二次打击后山莨菪碱干预大鼠肺组织病理切片　(HE×200)

Fig 3　Pathological changes of rat lung tissue after two hit with OA and LPS following the administration of anisodamine　(HE×200)

2.3　一次打击后肺组织中 LBP 表达的动态变化及山莨菪碱的影响

用 OA 对大鼠实施一次打击后, 肺组织中 LBP mRNA 的表达在 2 h 开始升高, 6 h 最高, 12 h LBP 的表达仍明显高于注射 OA 前。在注入 OA 的同时注入山莨菪碱, 可明显降低肺组织中 LBP 的表达。在各时相点, 一次打击+山莨菪碱组 LBP 的表达均低于一次打击组, 见表 1。

表 1　一次打击后肺组织中 LBP 的表达及山莨菪碱的影响(NII, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of LBP mRNA expression after oleic acid hit in lung(NII, $\bar{x}\pm s$)

Group	Pretreatment (n=6)	1 h (n=6)	3 h (n=6)	6 h (n=6)	12 h (n=6)
OA	0.25±0.03	0.39±0.04	0.76±0.04	0.83±0.05	0.73±0.04
OA+anisodamine	0.25±0.03	0.35±0.05	0.58±0.06 **	0.68±0.04 **	0.52±0.03 **

**: $P<0.01$ *vs* OA

2.4　两种打击后肺组织中 LBP 和 TNFα、IL-10 的表达及山莨菪碱的影响

分别用 OA 和 OA+LPS 对大鼠实施一次打击和二次打击后, 肺组织中 LBP 和致炎因子 TNFα、抗炎因子 IL-10 的表达均明显增高($P<0.01$)。二次打击组 LBP、TNFα、IL-10 的表达明显高于一次打击组($P<0.01$), 而二次打击+山莨菪碱组 LBP、TNFα、

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

IL-10的表达明显低于二次打击组($P<0.01$)，见表2。

表2 两种打击后肺组织 LBP、TNFα 和 IL-10 的表达及山莨菪碱的影响($NII, \bar{x}\pm s$)

Tab 2 LBP, TNFα and IL-10 mRNA expressions in different groups($NII, \bar{x}\pm s$)

Group	n	LBP	TNFα	IL-10
Control	6	0.25±0.03	0.25±0.04	0.25±0.03
OA	6	0.83±0.06 **++	0.72±0.07 **++	0.81±0.08 **++
OA+LPS	6	1.02±0.09 **	1.08±0.12 **	0.98±0.11 **
OA+LPS+anisodamine	6	0.76±0.07 **++	0.73±0.07 **++	0.77±0.07 **++

**: $P<0.01$ *vs* control; ++: $P<0.01$ *vs* OA+LPS

3 讨论

MODS 是 SIRS 进行性加重的最终后果，SIRS 的失控与否以及能否进一步发展为 MODS 或 ALI，主要取决于机体的反应性[3]。最近一项临床研究显示[4]：在严重脓毒症和脓毒性休克患者血浆中，内毒素的平均浓度仅为 0.3 ng/ml，说明 LBP 在体内对 LPS 发挥了强大的增敏作用。LBP 除主要在肝脏合成外，也可在肺、肾、肠等肝外组织合成，在 ARDS 患者的支气管肺泡灌洗液中，LBP 浓度是正常人的 64 倍[5]。

油酸+LPS 的二次打击肺损伤模型已在本研究所建立和应用，并在研究中发现：单独使用 0.2 ml/kg 油酸和 2 mg/kg 的 LPS，对大鼠的致伤作用较轻，而用同等剂量油酸致伤 4～6 h 左右，再加 LPS，可明显加重损伤程度[6]。我们认为：这并不是两次损伤效应的简单叠加，而是与SIRS 和MODS 的一系列病理生理机制有关。本实验在既往研究的基础上，对体内 LBP 增敏 LPS 的效应进行了探讨，结果显示：单纯 OA 致伤可明显上调肺组织中 LBP 的表达，并且在 6 h 达峰值，这与我们既往观察到二次打击动物在 4～6 h 处于敏感期的结果一致。提示：第一次打击后 LBP 的反应性上调是使机体对第二次打击敏感性增加的重要机制。第一次打击后，肺组织中 LBP 的增高可增敏少量 LPS 的损伤作用，使肺内巨噬细胞释放炎症因子。这些炎症因子不仅可继续上调 LBP 的表达，而且也可导致内皮屏障功能障碍。随着肺内渗出液的增多，血浆中的 LBP 也参与了肺部的炎症反应。这样，肺组织中 LBP 的增高与 LPS 对肺组织的损伤之间形成了正反馈，使得肺部的局部炎症最终发展为 ALI 和 ARDS。尽管 ARDS 是一复杂的综合征，任何单一的机制都难以充分阐明其病理生理的全貌。但对内毒素血症时的分子增敏机制进行深入研究，将有助于进一步了解失控性炎症反应和 ARDS 的关系。

SIRS 向MODS 发展的过程中，SIRS 只是其病理生理反应的一方面，另一方面是代偿性抗炎反应综合征（Compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS）。无论是 SIRS 还是 CARS，过度的反应都会导致病情的恶化。本研究中也观察到：对大鼠实施一次打击和二次打击后，致炎因子 TNFα 和抗炎因子 IL-10 均较对照组明显增高。在炎症反应中，体内出现作用广泛而复杂的细胞因子，从而形成了彼此交错的细胞因子网络。这就使得其病理生理机制决不是某一种或几种细胞因子的增高或降低所能解释的，也不会由于某个炎症介质的阻断或补充而完全得以纠正。因此，在治疗上应使治疗措施能够多途径、多环节、多靶点地发挥作用。

山莨菪碱具有解痉、改善微循环、抑制钙超载和生物膜的脂质过氧化，对组织细胞起保护作用。同时，山莨菪碱可抑制炎症介质如：前列腺素、白三烯等产生。本所既往研究显示：山莨菪碱还可抑制肺组织中 TNFα 和 IL-8 mRNA 的表达。因而山莨菪碱被广泛用于 ALI 和 MODS 的防治并取得良好疗效[7]。本研究用山莨菪碱干预一次打击和二次打击肺损伤大鼠后，观察了肺组织中 LBP、TNFα 和 IL-10 的表达。结果显示：山莨菪碱可明显抑制 LBP 的上调，减少 TNFα 和 IL-10 的表达，并且病理改变也有所减轻。提示：早期使用山莨菪碱不仅可抑制 LBP 的过度表达，阻断 LBP 对 LPS 的增敏效应，而且也有助于机体内环境的稳定和 SIRS/CARS 间的平衡，从而达到对肺损伤的防治作用。当然，单用中药治疗危重而复杂的 MODS 或 ARDS 是不够的，而应充分发挥现代医学的研究成果，将中西医治疗相结合，形成优势互补，才能获得理想的效果。

参考文献：

[1] Bone R C. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome)[J]. JAMA, 1992, 268(24): 3 452—3 455.

[2] Fenton M J, Golenbock D T. LPS-binding proteins and receptors[J]. J Leukoc Biol, 1998, 64(1): 25—32.

[3] Bone R C. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation[J]. Crit Care Med, 1996, 24(1): 163—172.

[4] Opal S M, Scannon P J, Vincent J L, *et al*. Relationship between plasma levels of lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein in patients with severe sepsis and septic shock[J]. J Infect Dis, 1999, 180(5): 1 584—1 589.

[5] Martin T R, Rubenfeld G D, Ruzinski J T. Relationship between soluble CD14, lipopolysaccharide binding protein, and the alveolar inflammatory response in patients with acute respiratory distress syndrome[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155(3): 937—944.

[6] 张 青，毛宝龄，钱桂生，等. 油酸和内毒素两次打击大鼠急性肺损伤模型研究[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(6): 603—605.

[7] 郭振辉，洪 新，毛宝龄，等. 山莨菪碱对 LPS 诱导的急性肺损伤大鼠肺组织 TNFα、IL-8 表达的影响[J]. 第三军医大学学报，2000, 22(5): 410—413.

（编辑 薛国文）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net