DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.040
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
340 2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)03-0340-03

体外循环血清对肺表面活性物质相关蛋白A的影响及己酮可可碱的作用

郝 嘉[1],肖颖彬[1],郭 红[2],钟前进[1],王学峰[1],陈 林[1] (第三军医大学附属新桥医院:[1]心血管外科;[2]消化内科;重庆 400037)

提 要:目的 研究体外循环血清对肺表面活性物质相关蛋白A(SP-A)的影响和己酮可可碱(PTX)对其作用。方法 实验分为3组。将培养的肺泡Ⅱ型上皮细胞(AT-Ⅱ)分别与CPB术前(对照组)、术后(损伤组)血清共同孵育,PTX组除AT-Ⅱ与CPB术后血清外,再加入100 mmol/L的PTX。检测AT-Ⅱ形态改变和SP-A、SP-A mRNA表达的变化。结果 损伤组细胞形态改变,SP-A、SP-A mRNA较对照组明显降低,PTX有明显的保护作用。结论 CPB术后血清能影响AT-Ⅱ中SP-A翻译和转录,这可能是术后肺表面活性物质(PS)质和/或量异常的重要原因。PTX能减轻CPB后血清对SP-A的抑制作用。

关键词:体外循环;肺泡上皮细胞;肺表面活性物质相关蛋白A;己酮可可碱
中图法分类号:R349.3;R654.1 文献标识码:A

Effect of cardiopulmonary bypass serum on pulmonary surfacant-associated protein A and the preventive effect of pentoxifylline

HAO Jia, XIAO Ying-bin, GUO Hong, ZONG Qian-jin, WANG Xue-feng, CHEN Lin (Department of Cardiovascular Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To explore the injurious effect of the serum drawn from patient under cardiopulmonary bypass (CPB) on pulmonary surfacant-associated protein A(SP-A) and the preventive effect of pentoxifylline (PTX) on the protein. **Methods** The cultured rat alveolar epithelial cell type Ⅱ(AT-Ⅱ) were incubated with CPB serum to observe the change of the cell morphology, and the expressions of SP-A and SP-A mRNA. **Results** Traumatic changes and the decrease of SP-A and SP-A mRNA expressions were found in AT-Ⅱ cells cultured with CBP serum. PTX exerted protective effect on the cells. **Conclusion** The serum after CPB can directly injure rat AT-Ⅱ cells *in vitro*, and inhibit the SP-A expression at transcription and translation levels, which probably is an important reason for the quantitative and qualitative abnormality of pulmonary surfactant after operation. PTX may alleviate the inhibitory effect of CPB serum on SP-A.

Key words: cardiopulmonary bypass; alveolar epithelial; pulmonary surfacant-associated protein A; pentoxifylline

体外循环(Cardiopulmonary bypass, CPB)后呼吸功能不全的发生率较高,尤以婴幼儿为甚。近年研究认为肺泡Ⅱ型上皮细胞(Alveolar type Ⅱ cell, AT-Ⅱ)受损,其合成的肺泡表面活性物质(Pulmonary surfactant, PS)减少很可能是重要原因,其中肺表面活性物质相关蛋白A(Pulmonary surfacant-associated protein A, SP-A)的下降可能是最重要的原因。为了更好地从细胞和分子水平研究CPB后肺损伤机制,本研究拟探讨CPB血清在体外对SP-A的影响和己酮可可碱(Pentoxifylline, PTX)对SP-A的保护作用。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

SP-A单抗、质粒pGEM4Z/SP-A(美国Sheldon I. Feinsein教授惠赠),JM109大肠杆菌,地高辛随机引物标记试剂盒(罗氏公司),BCIP/NBT显色试剂盒、己酮可可碱(徐剑铖博士惠赠),S-P免疫组化试剂盒(中山公司)。

1.2 细胞培养

采用IgG免疫粘附原代培养大鼠AT-Ⅱ。采用鞣酸多彩染色和碱性磷酸酶(AKP)染色鉴定。方法参照文献[1]。

作者简介:郝 嘉(1973-),男,四川省荣县人,硕士,医师,主要从事体外循环肺损伤方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68755114-74580

收稿日期:2000-05-26;修回日期:2000-11-15

1.3 CPB血清的采取和制备

选取8例婴幼儿法乐氏四联征患者,男女各4例,年龄(1.9±0.8)岁,体重(10.3±3.1)kg。在浅低温CPB下行不停跳心内直视手术,于麻醉诱导成功后5min(术前)和转流停止时(术后)无菌采血,灭活补体活性,将其按10%的比例与DMEM培养液配制后-70 ℃保存。

1.4 实验分组[2]

按文献[1]的方法培养鉴定AT-Ⅱ细胞,培养的AT-Ⅱ细胞分别加入CPB术前血清(对照组)、术后血清(损伤组)共同孵育,PTX组除加入CPB术后血清外,还加入含100 mmol/L PTX的DMEM培养液(浓度根据预实验结果和文献[3]),其余处理同文献[4]。

1.5 AT-Ⅱ形态学变化观察

加入干预因素4 h后用0.25%胰酶洗脱AT-Ⅱ,离心后3%戊二醛固定,行透射电镜检查。

1.6 CPB血清对AT-Ⅱ的SP-A蛋白转录和翻译水平的影响及PTX的作用

1.6.1 SP-A免疫组化测定 采用S-P法,SP-A单抗浓度为1∶800。对照组用PBS代替一抗。

1.6.2 SP-A mRNA原位杂交 将质粒PGEM4Z转入JM109大肠杆菌后大量扩增、提取、纯化、酶切、回收cDNA片段,用地高辛随机引物法制备cDNA探针,行原位杂交。阴性对照不加探针或经RNase处理后再行原位杂交。

1.7 图像分析

采用TigerIM细胞图像分析仪行半定量分析,每一玻片任

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

选 5 个视野, 在 200 倍或 400 光镜下检测阳性细胞积分光密度(IOD)、平均光密度(AOD)值。

1.8　统计学分析

结果用 $\bar{x}\pm s$ 表示。采用 GWBASIC 数理统计包单因素方差分析法和 t 检验分析。

2　结果

2.1　CPB 血清对 AT-Ⅱ形态的影响及 PTX 的作用

透射电镜观察可见对照组 AT-II形态完整, 其间可见特征性的板层小体。损伤组 AT-II线粒体嵴溶解、模糊, 内质网扩张, 胞质内板层小体减少及部分呈空圈样变。PTX 组损伤较轻。

2.2　CPB 血清对 AT-Ⅱ的 SP-A 蛋白转录和翻译水平的影响及 PTX 的作用

质粒 *EcoR* Ⅰ 单酶切后电泳可见切下约 900 bp 小段的为 SP-A cDNA。地高辛随机引物法标记探针标记量为 50 ng/ml。图像分析见损伤组 SP-A 蛋白 SP-A mRNA 的 IOD 和 AOD 值与对照组差异显著, 见图 1、2。PTX 组 IOD 和 AOD 值较损伤组也有差异, 见表 1、2。

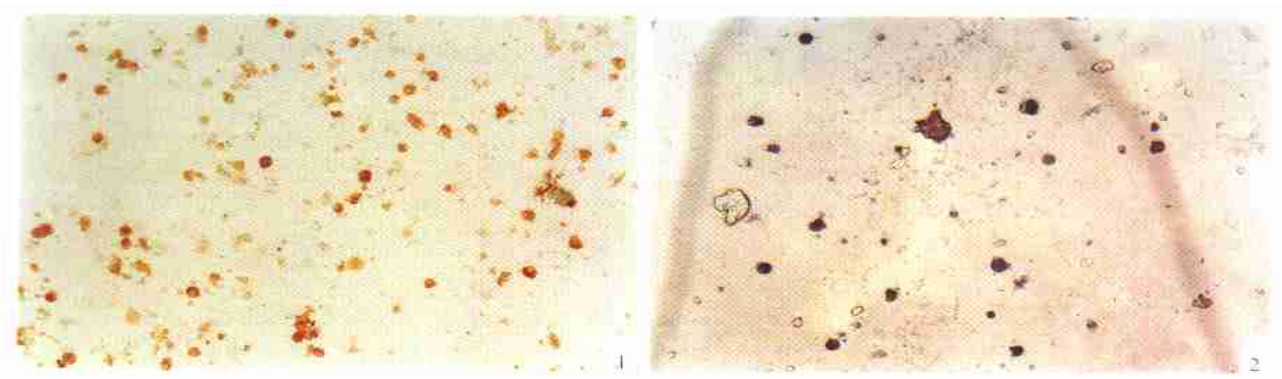


图 1　对照组 **SP-A** 免疫组化检测见胞浆中棕黄色或黄色 **SP-A** 表达　(S-P×200)

Fig 1　Brown or yellow SP-A in cytoplasm of AT-Ⅱ cell in the control group　(S-P×200)

图 2　对照组 **SP-A mRNA** 原位杂交见胞浆中蓝紫色 **SP-A mRNA** 表达　(ISH×200)

Fig 2　Purple SP-A mRNA in cytoplasm of AT-Ⅱ cell in the control group　(ISH×200)

表 1　**AT-Ⅱ SP-A** 免疫组化图像分析结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Image analysis of SP-A immunohistology($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Number of cells	IOD	AOD
Control	8	87	20.875±10.952	0.588±0.151
Injury	8	94	18.557±11.220 **	0.499±0.157 **
PTX	8	89	21.957±12.049 #	0.549±0.147 #

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* injury group

表 2　**AT-Ⅱ SP-A** 原位杂交图像分析结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Image analysis of SP-A *in situ* hybridization($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Number of cells	IOD	AOD
Control	8	16	178.80±91.628	1.5180±0.0996
Injury	8	20	128.61±35.453 *	1.1975±0.0475 **
PTX	8	22	134.02±52.35 #	1.4578±0.0885 #

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* injury group

3　讨论

实验表明 CPB 血清可促进培养 AT-Ⅱ形态呈损伤性改变, 细胞凋亡增加, 这些改变可能是 SP-A mRNA 下降的形态学基础。

SP-A 含量减少可作为急性肺损伤的敏感标志物和预后指标, 而 CPB 术后肺病理生理变化与 ARDS 十分相似, 因此可推测 CPB 术后呼吸功能不全与 SP 密切相关。通过研究 BALF 发现 SP-A 随 CPB 手术进程而逐渐下降, 而最近 Griese[5] 的研究发现 SP-A 在 CPB 术后第 1、2 天后才开始下降。

尽管免疫组化测定 SP-A 蛋白的表达可能受分泌的影响, 但结合肺组织研究结果及板层小体图像分析可表明其蛋白水平下降。实验表明 CPB 术后血清能直接损伤 AT-II并降低 SP-A mRNA 水平, 这可能是引起 SP-A 蛋白翻译水平下降导致术后 PS 质和/或量异常, 从而发生呼吸功能不全的重要机制。其下降的可能机制为: ①氧自由基的损伤作用; ②肿瘤坏死因子-α (TNF-α)的损伤作用: CPB 术中 TNF-α 明显升高, 且 AT-II 中有中等量 TNF-α, 它可直接影响磷脂的分泌和再摄取, 或通过肾上腺素能受体间接改变 AT-II的功能, 致使 PS 的生成、代谢和生理活性功能降低, 并可减少 AT-II 内 SP-A 的含量[6]; ③CPB 血清中炎性介质造成的细胞形态破坏、凋亡是合成 SP-A 减少的另一原因。

本研究表明 PTX 能防止 CPB 术后血清对 AT-Ⅱ形态的损伤、减轻 CPB 血清对 SP-A 转录和翻译的抑制作用, 其机制可能是: ①抑制细胞磷酸二脂酶, 增加细胞 cAMP。动物实验发现 cAMP 是 SP-A 基因的强大激活剂, 凡增加内源性 cAMP 的物质均可促进 SP-A 转录和表达[7]。②增加 AT-Ⅱ细胞膜 ATP 量和细胞内谷胱甘肽的量, 恢复细胞功能。③抑制炎性因子的生成: PTX 抑制 AT-Ⅱ细胞 TNF-α 转录而减少其生成, 从而可

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

减轻内源性TNF-α造成的损伤及对SP-A的抑制作用。Pryhuber等[8]发现PTX能部分逆转TNF-α对SP-A mRNA的抑制,且不是通过改变NF-κB的结合力实现的。④稳定AT-Ⅱ细胞结构[3]。⑤降低细胞粘附力。

本实验认为SP-A mRNA下降是CPB术后PS质和/或量异常的重要原因。同时在应用外源性PS治疗CPB术后呼吸功能不全时应注意SP-A的补充。PTX不失为CPB围术期肺保护的一种良药。

参考文献:

[1] 郝 嘉,李永旺,肖颖彬.大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞的培养和鉴定[J].第三军医大学学报,2000,22(5):500-501.
[2] 迟路湘,杨宗城,王 旭,等.缺氧、烧伤血清对培养心肌细胞膜生物物理特性影响的实验研究[J].第三军医大学学报,1999,21(2):75-77.
[3] Okumura M, Tsuruoka M, Isohama Y, *et al*. Effects of xanthine derivatives on phosphatidylcholine secretion in primary culture of rat type Ⅱ pneumocytes[J]. Jpn J Pharmacol, 1995, 67(2): 165-168.
[4] 郝 嘉,郭 红,肖颖彬,等.体外循环血清对培养大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞损伤的研究[J].第三军医大学学报,2000,22(11):1 080-1 083.
[5] Griese M, Wilnhammer C, Jansen S, *et al*. Cardiopulmonary bypass reduces pulmonary surfactant activity in infants[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999, 118(2): 237-244.
[6] Hertzog J H, Godinez M H, Godinez R I. Tumor necrosis factor-α alter phospholipid content in the bronchoalveolar lavage accessible space of isolated perfuse rat lungs[J]. Crit Care Med, 1994, 22(12): 1 969-1 975.
[7] Breed D R, Margraf L R, Alcorn J L, *et al*. Transcription factor C/EBPdelta in fetal lung: developmental regulation and effects of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate and glucocorticoids[J]. Endocrinology, 1997, 138(12): 5 527-5 534.
[8] Pryhuber G S, Khalak R, Zhao Q. Regulation of surfactant proteins A and B by TNF-alpha and phorbol ester independent of NF-κB[J]. Am J Physiol, 1998, 274(2 Suppl 1): L289-295.

(编辑 谢义霞)

经验与短篇

文章编号:1000-5404(2001)03-0342-01

纤维支气管镜在支气管异物诊断及治疗中的应用

Application of fibroptic bronchoscopy in diagnosis and treatment of broncheal foreign body

沈渝菊,杨和平,刘 平,周沪明 (第三军医大学附属西南医院呼吸内科,重庆 400038)

支气管异物患者11例,男性7例,女性4例,其中儿童6例,成人5例;年龄1岁9个月至57岁。临床表现有不同程度的咳嗽(多为刺激性)、气喘,有些有咳痰、胸闷、发热、胸痛等。病程最短的仅1 h,最长为1年。胸片:阻塞性肺不张3例,阻塞性肺炎3例,3例发现气管内有金属异物,2例未摄片。

除1例年龄小(1岁9个月),无法配合,应用全麻外,余10例均同普通纤维支气管镜(Fiberobronchoscopy, FB)检查相同,术前肌注0.5 mg阿托品,0.5%的卡因局部喷雾麻醉。患者取仰卧位,自宽大鼻腔或置牙垫后从口腔插入FB,发现异物后,视情况直接钳夹或滴入1∶10 000肾上腺素收缩后再钳夹住异物随FB一同取出。

结果:11例异物分别为圆珠笔帽、花生米、义齿各2例,7 cm长铁钉、金属拉丝扣、花生壳、辣椒籽、药丸各1例;位于右主支气管6例,左主支气管2例,右中间支气管2例,右下叶基底干开口1例。FB下见异物周围气管粘膜充血、肿胀;2例见气管粘膜糜烂;4例因误吸时间较长有肉芽组织增生包绕异物导致管腔狭窄,4例有脓性分泌物。11例支气管异物均顺利取出。

讨论

由于FB纤细、视野大、操作方便、痛苦小且并发症少而广泛应用于肺科领域[1]。FB对支气管异物和被漏诊的支气管异物患者均具有重要的诊治价值[2]。通过FB将各种异物取出,可使患者避免开胸或气管切开取异物之痛苦,也为患者节约大量经费。本组11例中有明确误吸史的5例,另6例无明确误吸史,因阻塞性肺炎、肺不张等来院行FB检查,意外发现气管内异物。FB检查不仅明确了病因,且对肉芽肿、脓性分泌物进行了清除,减轻了气道狭窄。同时在局部注射了抗生素等,促进了炎症的吸收,改善了患者的病情,取得了立竿见影的效果。因此,对无明确误吸史的患者,临床表现为刺激性干咳、肺部感染等一系列症状者,在经过一个阶段的治疗后仍无明显好转时,应及时行FB检查,以明确病因[3]。

本结果表明成功摘除异物的关键是:①术前麻醉充分,对于儿童应尽量做好思想工作,不能配合者应行全麻。②对于吸入时间较长的异物,可视情况先将异物松动,然后再行钳取。③对于硬质异物应找准合适部位再行钳取,异物钳应尽量夹紧,防止脱落。④对于软质异物应小心钳夹,以免将异物夹碎,造成不必要的麻烦。⑤应根据异物大小及性质选择不同的钳子。⑥钳子钳住异物后操作者应注意不要移开视线,并随FB一同退出。

关键词:异物;纤维支气管镜
中图法分类号:R768.4 文献标识码:B

作者简介:沈渝菊(1964-),女,上海市人,主管技师,主要从事纤维支气管镜的应用方面的研究,发表论文9篇。电话:(023)68754000-73054

收稿日期:2000-07-10;修回日期:2000-11-20

参考文献:

[1] Liebler J M, Markin C J. Fiberoptic bronchoscopy for diagnosis and treatment[J]. Crit Care Clin, 2000, 16(1): 83-100.
[2] 陈文彬,程得云,戟朝明.纤维支气管镜对支气管异物漏诊者的诊治价值[J].华西医科大学学报,1999,30(3):327-328.
[3] Chen C H, Lai C L, Tsai T T, *et al*. Perng-RP Foreign body aspiration into the lower airway in Chinese adults[J]. Chest, 1997, 112(1): 129-133.

(编辑 郭建秀)

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