DOI: 10.16016/j.1000-5404.1999.03.012

高原 RDS表面活性物质相关蛋白 A B C mRNA表达的变化*

崔社怀** (第三军医大学附属西南医院呼吸内科) 重庆, 400038
郭先健 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆, 400037

提 要 目的: 观察高原 RDS时 SP-A SP-B和 SP-C mRNA表达与影响因素, 了解其变化情况, 并探讨其在急性肺损伤中的作用机制及意义。方法: 采用高原 RDS动物模型, 利用分子生物学技术观察肺组织肺泡II 型上皮细胞表面活性蛋白及其基因的表达。结果: SP-A SP-B和 SP-C斑点杂交结果表明, 油酸组 SP-A, SP-B和 SP-C mRNA表达的相对含量均显著低于对照组。油酸可抑制 SP-A, SP-B和 SP-C mRNA在高原 RDS中的表达。结论: 高原 RDS后 SP-A SP-B和 SP-C mRNA表达明显减低, 油酸可抑制 SP-A, SP-B和 SP-C mRNA在高原 RDS中的表达。与油酸的直接毒性作用和油酸引起的肺水肿, 肺泡腔渗出大量的水肿液及血浆蛋白有关。

关键词 低氧; 肺表面活性物质相关蛋白; 基因表达; 呼吸窘迫综合征
中图法分类号 R563.02

表面活性物质相关蛋白 (SP) A B和 C(SP-A SP-B SP-C)在急性肺损伤或 ARDS中的作用、调控和意义等方面的研究, 国内外报道不多。故我们对高原 RDS时 SP-A SP-B和 SP-C mRNA表达与影响因素进行探讨。

1 材料与方法

1.1 动物模型

实验动物随机分为对照组和油酸组。每次 3~4只 Wistar大鼠放入小动物低压舱内, 自由饮水, 匀速减压模拟海拔 6000 m高度(约 30 min)至, 减压 12 h。从低压舱取出小动物, 用 3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉 (0.3 ml/100 g), 然后行气管、颈总动脉和颈外静脉插管。手术完毕后先给大鼠吸入 9.78% O_2混合气体, 使其低氧状态与减压仓内相同, 30 min后开始实验。抽对照血气后, 立即从上腔静脉注入油酸, 剂量为 10~15 μl/100 g体重, 15 min注完。对照组注入同等剂量生理盐水。肺组织总 RNA提取, 按文献 [1]进行。紫外分光光度计定量 RNA及判定其纯度。肺组织 SP-A SP-B和 SP-C mRNA斑点杂交基本按文献 [2]进行。探针标记按 Prome-a-Gene Labeling System试剂盒说明书进行, 并加到自制的 Sephadex G50柱上进行纯化。放射自显影: 用滤纸吸去 NC膜上大部分水分, 封于塑料袋, 放入暗盒中, -70℃放射自显影 72 h。定量分析: 放射自显影结果(胶片)置薄层扫描仪上 (日本道津 GS9000), 根据自显影的面积和密度以及标准 Marker的含量, 计算出各样品所含 mRNA的总量。统计分析: 采用方差分析对数据进行统计分析。

1.2 SP-A SP-B SP-C cDNA探针的制备

基本按分子克隆有关章节[3]。

1.3 PGEM 4Z质粒的转化

基本参照 Dower的方法[4]。

1.4 试剂

质粒 PGEM 4Z质粒三种, 由美国 Fisher教授惠赠。λDNAa/HindIII marker华美生物工程公司。异硫氰酸胍, 焦碳二 (DEPC), 十二烷基肌氨酸钠 (Sarcosyl)美国 Sigma公司产品。电泳级琼脂糖, 北京中山公司产品。十二烷基硫酸钠 (SDS)美国 Sigma公司产品。鲑精 DNA华美生物工程公司产品。Ficoll 400美国 Sigma公司产品。同位素随机引物标记试剂盒美国 Promega公司产品。其它试剂, 精解蛋白胨, 酵母浸出粉、酚、氯仿、异戊醇、无水乙醇等均为国产分析纯。

1.5 主要仪器

754型紫外分光光度计 上海分析仪器厂, 低温高速离心机 湖南湘仪。基因枪 (Pulse Generator)美国 Bio-Rad公司制造。

2 结果

经细菌转化、扩增、提取的 PGEM 4Z质粒, 用 Eco RI酶切同时用λDNA/HindIII Marker标定。异硫氰酸胍-酚-氯仿-异戊醇一步法提取肺组织总 RNA, 经 754型分光光度计测定 D_{260}值并判定纯度。其纯度为 $D_{260/280}$ > 1.8 油酸组 SP-A mRNA表达的相对含量显著低于对照组。油酸组 SP-B mRNA相对含量与对照组比显著降低 ($P < 0.05$)。与 SP-A和 SP-B mRNA表达的情形相同, SP-C mRNA的表达在对照组显著高于油酸组 ($P < 0.05$)。余各组间比较差异均不显著 ($P > 0.05$), 见表 1。

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39670336
** 崔社怀, 男, 43岁, 副教授, 副主任医师, 博士

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

表 1 高原 RDS肺组织 SP-A SP-B and SP-C mRNA 相对含量的比较 (ρ_B /pg·μl^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The results for expression of SP-A SP-B and SP-C mRNA in the lung of RDS in plateau (ρ_B/pg·μl^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	SP-A	SP-B	SP-C
Control	12	181.90± 32.06	757.98± 96.21	2252.01± 153.77
Oleic acid	8	100.44± 23.12*	367.71± 91.61*	852.72± 131.34*

*: $P<0.05$ *vs* control

3 讨论

目前发现的 SP共有 4种,根据其结构不同分为 SP-A SP-B SP-C和 SP-D. 根据功能分为亲水性的 SP-A和 SP-D,疏水性的 SP-B和 SP-C[5,6]。由于 SP-B和 SP-C主要影响肺表面活性物质 (Pulmonary surfactant, PS)的生物物理特性,与临床关系密切,所以其研究也较深入。但该类研究主要集中于因 PS生成不足所致的新生儿呼吸窘迫综合征 (NRDS)[7]。在高原 RDS时该三种蛋白的变化国内外尚无文献。本研究的斑点杂交结果均发现油酸组 SP-A SP-B和 SP-C mRNA表达均显著低于对照组, Huang等[8]采用高浓度氧致肺损伤,观察 SP-A mRNA表达的变化时发现, SP-A mRNA在该类肺损伤时表达明显降低。而且在 NRDS患儿的 RALF中, SP-A SP-B和 SP-C的含量极低,甚至不能测出[9]。在 ARDS和多发性创伤患者的 BALF中 SP-A的含量也呈类似变化[10]。ARDS和 NRDS时 SP-B mRNA的表达同样受到抑制。无论是 SP基因的抑制还是 BALF中含量降低,均严重影响了 PS的功能,导致肺表面张力的增加和微肺不张。

严重的低氧血症,肺组织细胞损伤及胞内酶活性降低,功能异常,可能是高原 RDS SP-A SP-B和 SP-C mRNA表达降低的原因之一。油酸是否对三种表面活性物质相关蛋白即 SP-A SP-B和 SP-C mRNA的表达产生影响,尚无直接证据。但大量的资料表明,油酸对肺毛细血管内皮细胞、肺泡II 型上皮细胞等有直接毒性作用[11]。我们既往研究资料证明[12],油酸急性肺损伤模型中可见肺泡II 型上皮细胞空泡变,内质网扩张,核周间隙加大,板层体排空,线粒体肿胀等改变。这些改变可能是导致 SP-A SP-B和 SP-C mRNA表达降低的形态学基础。由于产生 SP的主要细胞肺泡II 型上皮细胞的变性,故不可避免地影响了 SP的表达,可能是 SP-A SP-B和 SP-C mRNA表达降低的又一原因。SP-A SP-B和 SP-C mRNA表达降低还可能与油酸引起的肺水肿、肺泡腔渗出大量的水肿液及血浆蛋白有关。我们另一组研究结果提示,油酸注入后,部分试验动物可见经口鼻涌出大量粉红色水肿液,病理检查见肺泡腔同样存在大量水肿液[13]。据认为,血浆蛋白是最早发现对 PS活性有抑制作用,其抑制原理是与气/液面的 PS竞争并干扰 S单分子层的形成[14]。血浆蛋白渗出到肺泡腔不仅增加了肺泡表面张力,而且其中的纤维素单体 (纤维蛋白降解产物)对 PS具有强烈的抑制作用。

参考文献

1 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analytical Biochem, 1987, 162(1): 156

2 蔡文琴,王伯 主编.实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术.成都:四川科学技术出版社, 1994. 492~ 503

3 金冬雁,黎孟枫译.分子克隆实验指南.第二版.北京:科学出版社, 1992. 26~ 29

4 Dower W J, Miller J F. High efficiency transformation of E coli by high voltage electroporation. Nucle Acid Res, 1988, 16(6): 6127

5 Sarin V K, Gupta S, Leung T K, *et al*. Biophysical and biochemical activity of a synthetic 8.7 kDa hydrophobic pulmonary surfactant protein SP-B. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87(7): 2633

6 Yamada T, Kegami N, Tabor B L, *et al*. Effects of surfactant protein A on surfactant function in preterm ventilated rabbit. Am Rev Respir Dis, 1990, 142(4): 754

7 Cleary J P, Berstein G, Mannino F, *et al*. Improved oxygenation during synchronized intermittent mandatory ventilation in neonates with respiratory distress syndrome: a randomized, crossover study. J Pediate, 1995, 126(3): 407

8 Huang Y C T, Caminiti S P, Fawcett T A, *et al*. Natural surfactant and hyperoxic lung injury in primates. I Physiology and biochemistry. J Appl Physiol, 1994, 76(3): 991

9 Moya F R, Montes H F, Thomas V L, *et al*. Surfactant protein A and saturated Phosphatidylcholine in respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 150(5): 1672

10 Pison U, Obertacke U, Seeger W, *et al*. Surfactant protein A(SP-A) is decreased in acute parenchymal lung injury associated with polytrauma. Eur J Clin Invest, 1992, 22(4): 712

11 Olanoff L S, Reines D, Spicer K M, *et al*. Effects of oleic acid on pulmonary capillary leak and thromboxanes. J Surgic Res, 1984, 36(6): 597

12 崔社怀,毛宝龄,郭先健,等.油酸致犬肺损伤的血栓素和前

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

列环素的研究.中华结核和呼吸杂志,1989,12(1):24
13 崔社怀,郭先健.急性低氧复合油酸大鼠肺损伤模型的复制及 PTX的治疗作用.中国病理生理杂志,1999,15(2):150
14 Holm B A, Matalon S. Role of pulmonary surfactant in the development and treatment of aduot respiratory distress synrome. Anesth Analg, 1989, 69(6): 805

(收稿: 1998-05-09;修回: 1999-01-15)
(编辑　冯崇英)

Expression of pulmonary surfactant associated protein A, B and C mRNA in plateau ARDS*

Cui Shehuai, Guo Xianjian, Qian Guisheng (Department of Respiratory Disease of Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objection: To study the expression and regulation of pulmonary surfactant associated protein A, B and C mRNA on oleic acid-induced model of RDS of rats under acute hypoxia. Meanwhile, the mechanism of the changes was investigated. Methods: Rats were placed in hypobaric chamber for 12 h and then oleic acid was injected into the superior vena cava to induce RDS. The expression of pulmonary surfactant associated protein A, B and C mRNA was observed with the method of dot blot hybridization. Results: Oleic acid could inhibit the expression of surfactant associated proteins since SP-A, SP-B and SP-C mRNA were expressed significantly lower in the group receiving loeic acid injection. Conclusion: Oleic acid can inhibit the expression of SP-A, SP-B and SP-C mRNA in hypoxic rats with pulmonary injury.

Key words hypoxia; surfactant associated proteins; gene expression; respiratory distress syndrome

* This project was supported by the National Natural Science Foundation of China, No. 39670336

(上接 180页)

后,麻醉平面消退至 T_{12}时,心电图监测由正常又转为 CLBBB.整个手术过程血压稳定于 16/8 kPa,呼吸平稳,面罩吸 O_2, SPO_2 100%。

例 2,患者,女,54岁,因慢性结石性胆囊炎行胆囊切除术,术前 BP19/10 kPa, ECG示完全性右束支传导阻滞(CRBBB),无自觉症状,未行治疗,术前半小时常规肌注鲁米那钠,阿托品。入室后 ECG I 导联示 P-R增宽,S波型明显增宽粗钝,结合术前 ECG检查,诊断为 CRBBB.手术采用硬膜外麻醉(穿刺间隙 $T_{8,9}$↑,2%利多卡因+ 1∶20万 AD),穿刺成功后注药 5 ml, 5 min后追加 7 ml, 15 min后手术开始,此时 BP17/8 kPa,测平面 T_{4-10}.手术开始时 ECG由 CRBBB转变为正常波形,手术历时 75 min.手术结束后,当麻醉平面消退至 T_9时,ECG监测又复现 CRBBB,整个手术过程 BP波动于 17~19/8~10 kPa,呼吸平稳,采用面罩吸 O_2, SPO_2 100%。

2 讨论

在 CBBB的病人中,特别是 CLBBB的病人,在麻醉手术时,由于有可能影响到明显的血液动力学变化,而致严重后果,危及病人安全。因此,对于束支传导阻滞(BBB)的病人,如何避免麻醉手术对病人的影响,对于提高手术的安全性有重要意义。腰麻时,CLBBB暂时性恢复的病例已见报道,但硬膜外麻醉下致 CLBBB.CRBBB恢复的病例进行观察的极少。出现 BBB时,应考虑心肌存在病变,特别是 CLBBB.本两例病人,均为中老年病人,处于冠心病的高发期,冠心病在发病早期具有隐匿性,即病人无自觉症状,临床各种检查无明显心肌缺血征象,但心肌损害已经出现,当心肌供血供氧与耗氧矛盾改善时,心肌损害减轻或逆转;反之,则加重。利多卡因药理作用属于局麻药和 Ib类抗心律失常药物。作为后者,可改善希-浦系统传导并消除单向传导阻滞,抑制心肌收缩,提高致颤阈;作为前者,可以阻断神经传导,利多卡因在麻醉时,较低浓度即可阻断交感神经传导,所以交感神经阻断平面通常较临床测定镇痛平面广,进而扩张胸腹腔脏器血管,降低外周阻力。利多卡因在局部吸收入血后,作用于心肌,抑制心肌收缩。二者相互作用减少心肌耗氧,缓解供氧耗氧矛盾。另一方面,由于利多卡因所特有的 Ib类抗心律失常作用,改善希-浦传导系统功能,消除单向传导阻滞。当麻醉平面消退时,其药理作用亦消退,病人的 BBB的病因又再次出现。

关键词　硬膜外麻醉;束支传导阻滞
中图法分类号　R614.4

参考文献

1 沈建藩,徐淑梅.完全性左束传导阻滞腰麻后暂时性恢复一例报告.临床麻醉学,1997,13(1):27
2 刘俊杰,赵　俊.现代麻醉学.北京:人民卫生出版社,1996.642~643
3 陈灏珠.实用内科学.北京:人民卫生出版社,1997.1161~1164
4 黄振文,崔天祥.实用临床心脏病学.北京:中国医药科技出版社,1997.574~575

(收稿: 1998-09-05;修回: 1998-12-13)
(编辑　仇玉福)

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