

• 论著 •

正常淋巴液对内毒素休克大鼠肺组织髓过氧化物酶活性及膜泵的作用研究

樊贵 赵自刚 牛春雨 杨亦青 张静

【摘要】 目的 观察外源性正常淋巴液对脂多糖(LPS)所致内毒素休克大鼠肺组织匀浆髓过氧化物酶(MPO)活性及肺组织细胞膜泵功能的作用,探讨其干预机制。**方法** 雄性 Wistar 大鼠 40 只,按随机数字表法均分为内毒素组、淋巴液组、血浆组 and 对照组。除对照组外,其他各组应用 LPS 5 mg/kg 复制内毒素休克模型,对照组以等量生理盐水代替 LPS;15 min 后,淋巴液组自颈静脉输入仅占全血量 1/15 的无细胞淋巴液;血浆组以血浆代替淋巴液;内毒素组和对照组以生理盐水代替淋巴液。给予 LPS(或相应液体)后 4 h,制备体积分数为 10% 的肺组织匀浆,检测肺组织匀浆 MPO 及膜 ATP 酶的活性。**结果** 与对照组相比,内毒素组和血浆组大鼠肺组织匀浆 MPO 活性显著增高,4 种膜 ATP 酶活性均显著下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。淋巴液组肺组织匀浆 MPO 活性显著高于对照组, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性显著低于对照组,两组比较差异均有显著性(P 均 < 0.05);而 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶、 $\text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性与对照组比较差异均无显著性(P 均 > 0.05);淋巴液组肺组织匀浆 MPO 活性显著低于内毒素组及血浆组(P 均 < 0.01),4 种膜 ATP 酶活性显著高于内毒素组及血浆组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** 外源性正常淋巴液对内毒素休克所致的肺损伤具有干预作用,其机制可能与减少中性粒细胞激活、提升膜 ATP 酶活性有关。

【关键词】 内毒素; 肺损伤; 淋巴液; 髓过氧化物酶; 膜泵

Effects of normal lymph on myeloperoxidase activity and adenosine triphosphatase in rats with endotoxic shock FAN Gui, ZHAO Zi-gang, NIU Chun-yu, YANG Yi-qing, ZHANG Jing. Department of Pathophysiology, Hebei North College, Zhangjiakou 075029, Hebei, China

【Abstract】 Objective To observe the effects of exogenous normal lymph on myeloperoxidase (MPO) and adenosine triphosphatase (ATPase) activities of lung homogenate in rats with endotoxic shock caused by lipopolysaccharide (LPS), and to preliminarily discuss its mechanisms. **Methods** Forty male Wistar rats were randomly divided into four groups: endotoxin group, lymph group, plasma group and control group. The rats in the preceding three groups were injected intravenously with LPS (5 mg/kg. bw, iv) to replicate endotoxic shock model. LPS was replaced by equal volume of normal saline in the control group. Fifteen minutes later, lymph without cell components was infused in lymph group. The amount of lymph was 1/15 of blood volume. In plasma group, lymph was replaced by plasma, and in normal and endotoxin groups, lymph were replaced by normal saline. Four hours after the infusion of LPS, lung homogenate in a concentration of 10% was prepared. The activities of MPO and ATPase were determined in lung homogenate. **Results** Compared with control group, the activities of MPO in lung homogenate of endotoxin group and plasma group were significantly increased while the activities of ATPase were significantly lower ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The activity of MPO in lung homogenate of lymph group was significantly higher, while $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity was significantly lower than those of control group (both $P < 0.05$). The activities of $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$, $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ in lymph group showed no statistically significant differences compared with those of control group (all $P > 0.05$), but when compared with the endotoxin group and plasma group, the activity of MPO in lung homogenate was significantly lower (both $P < 0.01$) and the activities of 4 kinds of ATPase were significantly higher ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The results demonstrate that exogenous normal lymph could ameliorate the lung injury as a result of endotoxic shock, and its mechanism might relate to reduction of activity of the polymorphonuclear leucocyte (PMN) and enhancement of the activity of ATPase.

【Key words】 endotoxin; lung injury; lymph; myeloperoxidase; adenosine triphosphatase

基金项目:河北省科技厅资助项目(012761160)

作者单位:075029 张家口,河北北方学院病理生理教研室

作者简介:樊贵(1953-),男(汉族),河北张家口人,医学硕士,教授,张家口市拔尖人才,主要从事危重病的病理生理学研究,获河北省科技进步一等奖 1 项、三等奖 2 项及省教科技进步二等奖 1 项,发表学术论文 60 余篇。

内毒素休克是临床常见的急危重症,在其发展进程中,由内毒素诱导的急性肺损伤(ALI)是患者死亡的重要原因^[1]。研究表明,小量外源性正常淋巴液对重症失血性休克有良好的逆转作用,提示正常淋巴液可能存在机体潜在的内源性抗休克因子^[2];正常淋巴液对内毒素休克大鼠同样也具有良好的干

预作用,其机制与减少一氧化氮(NO)释放及自由基损伤有关^[3]。为进一步探讨正常淋巴液对内毒素休克大鼠肺损伤的影响及其机制,本研究拟观察正常淋巴液对内毒素休克大鼠肺组织匀浆髓过氧化物酶(MPO)以及肺组织细胞膜泵功能的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组:雄性 Wistar 大鼠 40 只,体重 270~340 g,由河北医科大学动物中心提供。按随机数字表法均分为内毒素组、淋巴液组、血浆组和对照组。

1.2 正常淋巴液和血浆制备:健康犬在质量分数为 2.5%的戊巴比妥钠(25 mg/kg)静脉麻醉下,腹部正中线偏右作纵切口,仔细分离肠淋巴管,用自制的金属淋巴插管行肠淋巴管插管术^[2,3],质量分数为 1%的肝素(350 U/kg)全身抗凝后,引流肠淋巴液,1 500 r/min(离心半径为 8 cm)离心 10 min,除去细胞成分,取上清液冷冻备用。再从门静脉留取适量血样,制备血浆,冷冻备用。

1.3 内毒素休克模型的复制及其干预:大鼠肌肉注射戊巴比妥钠(50 mg/kg)麻醉,舌静脉注入 0.5%肝素(700 U/kg)全身抗凝;分离右颈总动脉并插管,经 XWTC-264 型自动平衡记录仪连续记录血压,剥离左颈静脉并插管;待血压稳定 30 min 后,内毒素组、淋巴液组、血浆组自颈静脉注入脂多糖(LPS,O111:B4,5 mg/kg, Sigma),15 s 注完,然后立即推注 0.3 ml 生理盐水,保证 LPS 全部进入血循环,复制内毒素休克模型。对照组以等量生理盐水代替 LPS;15 min 后,淋巴液组自颈静脉输入无细胞的淋巴液(仅占全血量的 1/15,全血量以体重的 1/13 计算),并以等量生理盐水稀释,输注速度为 0.5 ml/min。血浆组以血浆代替淋巴液;内毒素组和对照组以生理盐水代替淋巴液。注入 LPS(或相应液体)后 4 h 迅速处死动物,选择固定位置留取肺组织,加 9 倍 4℃ 无菌生理盐水,制备体积分数为 10%的组织匀浆,2 500 r/min(离心半径为 8 cm)离心 10 min,取上清液置冰箱内-26℃ 冷冻备测。

1.4 肺组织匀浆 MPO 以及膜 ATP 酶活性的测

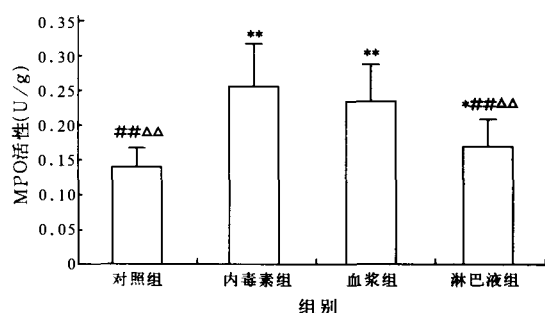
定:采用过氧化氢(H₂O₂)法检测肺组织匀浆 MPO 活性(每克组织蛋白在 37℃ 反应体系中 H₂O₂ 被分解 1 μmol 为 1 个酶活性单位, U/g);采用定磷法检测肺组织匀浆 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性(每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量为一个 ATP 酶活性单位,用 μmol·mg⁻¹·h⁻¹表示。MPO 及 ATP 酶试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,按试剂盒说明书操作。肺组织匀浆蛋白定量采用考马斯亮蓝法。

1.5 统计学处理:实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用 SPSS 11.0 统计分析软件包进行处理,采用单因素方差分析及 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肺组织匀浆膜 ATP 酶活性变化(表 1):内毒素组肺组织匀浆 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Mg²⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性均显著低于对照组(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),与血浆组比较差异均无显著性;淋巴液组上述 4 种膜 ATP 酶活性均显著高于内毒素组和血浆组(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

2.2 各组肺组织匀浆 MPO 活性变化(图 1):内毒素组肺组织匀浆 MPO 活性(0.255±0.062)U/g 显



注:与对照组比较: **P* < 0.05, ***P* < 0.01;与内毒素组比较: ***P* < 0.01;与血浆组比较: Δ*P* < 0.01

图 1 各组大鼠肺组织匀浆 MPO 活性的变化

Figure 1 Changes of MPO activity of lung homogenate in each group

表 1 各组大鼠肺组织匀浆膜 ATP 酶活性的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Changes of ATPase activity of lung homogenate in each group($\bar{x} \pm s$) μmol·mg⁻¹·h⁻¹

组别	动物数(只)	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶	Ca ²⁺ -ATP 酶	Mg ²⁺ -ATP 酶	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP 酶
对照组	10	2.049±0.541	1.974±0.656	2.032±0.621	1.812±0.369
内毒素组	10	1.305±0.552**	1.092±0.432**	1.309±0.528*	1.117±0.425**
血浆组	10	1.401±0.329**	1.114±0.378**	1.391±0.605*	1.254±0.377*
淋巴液组	10	1.868±0.637*#Δ	1.726±0.571*##ΔΔ	1.897±0.634*#Δ	1.672±0.412*##Δ

注:与对照组比较: **P* < 0.05, ***P* < 0.01;与内毒素组比较: #*P* < 0.05, ##*P* < 0.01;与血浆组比较: Δ*P* < 0.05, ΔΔ*P* < 0.01

著高于对照组 (0.139 ± 0.028) U/g ($P < 0.01$), 与血浆组 (0.234 ± 0.054) U/g 比较差异无显著性。淋巴液组肺组织匀浆 MPO 活性 (0.168 ± 0.041) U/g 显著低于内毒素组和血浆组 (P 均 < 0.01), 但显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

内毒素是革兰阴性菌的最外层结构, 其主要化学成分是 LPS, 现普遍认为, LPS 是介导内毒素休克的重要启动因子。当 LPS 入血后, 可与肝脏产生的脂多糖结合蛋白 (LBP) 相结合, 形成 LPS-LBP 复合物, 其进一步启动细胞信号转导系统, 激活核转录因子- κ B (NF- κ B) 及细胞间负责信息调控的激酶, 引起炎症介质的释放, 这些炎症介质的相互作用, 调控着内毒素休克的发生、发展及转归^[4,5]。

大量中性粒细胞黏附于肺血管内皮细胞、在肺内扣押并释放毒性介质等是 ALI 发生的主要机制之一^[6]。而 MPO 存在于中性粒细胞中, 具有还原 H_2O_2 的能力, 因此测定肺组织匀浆 MPO 活性可反映中性粒细胞在肺内的扣押情况。本实验结果显示, 注射 LPS 后, 内毒素组大鼠肺组织匀浆 MPO 活性显著高于对照组, 其机制可能是 LPS 刺激肺泡巨噬细胞、血管内皮细胞等释放粒细胞趋化素等物质, 使中性粒细胞从体循环向肺组织转移, 积聚在肺组织的中性粒细胞被激活, 产生呼吸爆发, 进一步导致肺微血管内皮细胞损伤、加速肺微血管的低反应性, 而 NO 等炎症介质大量释放又可引起持续的血管平滑肌扩张, 从而导致内毒素休克的低血压和血管低反应性^[7], 促使 ALI 的发生。同时, 本研究也发现淋巴液组大鼠肺组织匀浆 MPO 活性显著低于内毒素组和血浆组, 提示正常淋巴液对内毒素休克大鼠肺损伤具有干预作用, 其机制为, 正常淋巴液可改善内毒素休克大鼠的微循环障碍, 从而减少中性粒细胞在肺内的扣押, 降低炎症介质释放, 从而减轻肺微血管内皮细胞损伤, 增加肺微血管的反应性。

ATP 酶为依赖 ATP 的膜结合蛋白酶, 存在于组织细胞及细胞器的膜上, 它们对建立跨膜的离子梯度、维持细胞膜电位、容量、体温、代谢以及营养转运等生理活动具有重要作用, 细胞的损伤程度与膜 ATP 酶活性高低极其相关。本实验结果显示, 内毒素组大鼠肺组织匀浆 Na^+-K^+ -ATP 酶活性显著低于对照组, 其机制可能与 LPS 导致的肺微血管内皮细胞损伤、肺微血管低反应性、微循环障碍引起的缺血、缺氧以及酸中毒等因素有关。而缺血组织细胞出现的一系列对氧的利用及代谢异常^[8], 又加重了

膜泵功能的损伤。结果提示 ATP 酶活性下降是 LPS 导致肺损伤的重要机制之一。而淋巴液组经输注小量正常淋巴液治疗后, 其肺组织匀浆 ATP 酶活性显著高于内毒素组及血浆组, 说明正常淋巴液干预内毒素休克大鼠肺损伤与提升膜泵活性有关。其干预机制可能为, 正常淋巴液在改善内毒素休克大鼠微循环障碍的基础上, 缓解肺组织缺血、缺氧, 维持正常酸碱环境, 从而进一步改善肺组织细胞的膜泵功能、降低中性粒细胞积聚, 提示正常淋巴液存在某些尚未被人们认识的机体内源性抗休克因子。由于起干预作用的淋巴液量很小, 仅相当于全血量的 1/15, 而且内毒素组输入与淋巴液组等量的生理盐水、血浆组输入与淋巴液组等量的血浆 (血浆蛋白含量为 62.54 g/L, 较淋巴液蛋白含量 39.68 g/L 高), 对内毒素休克的干预作用远不如小量正常淋巴液, 提示用恢复血容量及补充胶体渗透压均难以解释淋巴液的抗休克作用。但小量正常淋巴液抗休克的共性, 是通过改善微循环障碍, 还是通过抑制某些细胞信号转导通路降低炎症介质的释放, 或是直接保护血管内皮细胞的功能, 这些都有待进一步研究。

综上所述, 正常淋巴液可减轻内毒素休克大鼠肺损伤, 其机制可能与减轻肺组织细胞膜泵功能损伤、提升血管反应性、改善微循环障碍、降低中性粒细胞在肺内的扣押等因素有关。因此, 以正常淋巴液为靶向, 可能为临床干预内毒素休克开辟新途径。

参考文献:

- 1 陈永华, 蒋建新, 谢国旗, 等. 内毒素血症时小鼠肺局部致炎及炎症因子与急性肺损伤的关系[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12: 331-333.
- 2 牛春雨, 张静, 姚彤, 等. 淋巴液的抗休克作用[J]. 中国应用生理学杂志, 1999, 15: 72-75.
- 3 杨亦青, 樊贵, 韩敏, 等. 淋巴液对内毒素休克大鼠的干预作用及其机制[J]. 中国急救医学, 2004, 24: 661-664.
- 4 Alexander C, Rietschel E T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity[J]. J Endotoxin Res, 2001, 7: 167-202.
- 5 Llewelyn M, Cohen J. New insights into the pathogenesis and therapy of sepsis and septic shock[J]. Curr Clin Top Infect Dis, 2001, 21: 148-171.
- 6 刘韧, 肖南, 田昆仑, 等. 中性粒细胞凋亡延迟在脂多糖所致大鼠急性肺损伤发病机制中的作用[J]. 中华医学杂志, 2001, 81: 617-621.
- 7 Walther A, Barth C, Gebhard M M, et al. Role of nitric oxide in leukocyte-independent endothelial damage during experimental endotoxemia[J]. Shock, 2003, 20: 286-291.
- 8 Wort S J, Evans T W. The role of the endothelium in modulating vascular control in sepsis and related conditions[J]. Br Med Bull, 1999, 55: 30-48.

(收稿日期: 2006-01-03 修回日期: 2006-11-18)

(本文编辑: 李银平)