

• 论著 •

不同时间给予猪肺表面活性物质对大鼠油酸型急性肺损伤疗效的影响

孙瑜 王轶群 钟纪根 卢建

【摘要】 目的 探讨不同时间给予猪肺表面活性物质(PPS)混悬液对油酸致大鼠急性肺损伤(ALI)的治疗作用。方法 将 48 只 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组、0.5 h PPS 治疗组和 2 h PPS 治疗组。假手术组仅行气管和颈动脉插管手术操作,其余各组大鼠静脉注入油酸诱发 ALI;0.5 h PPS 治疗组和 2 h PPS 治疗组分别于油酸注入后 0.5 h 和 2 h 经气道均滴入 100 mg/kg 和 150 mg/kg 两个剂量的 PPS。实验过程中计数大鼠呼吸频率,测定动脉血气指标,于实验 4 h 计算大鼠存活率后处死动物,观察肺组织病理学改变,并检测肺系数及支气管肺泡灌洗液(BALF)中总蛋白(TP)含量和血浆中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)浓度。结果 与模型组比较,0.5 h 给予 PPS 100 mg/kg 和 150 mg/kg 以及 2 h 给予 PPS 150 mg/kg 治疗都能显著降低大鼠的呼吸频率,提高动脉血氧分压(PaO₂)及大鼠存活率,降低肺毛细血管通透性及肺出血、肺水肿发生率,降低血浆中 TNF- α 和 BALF 中 TP 含量(P 均 < 0.05)。而 2 h 给予 100 mg/kg PPS 的治疗作用不明显。结论 早期气道内滴入 ≥ 100 mg/kg 的 PPS,能明显改善油酸型 ALI 大鼠的呼吸功能、减轻肺损伤;晚期较大剂量的 PPS (150 mg/kg)才有治疗作用。

【关键词】 油酸; 肺损伤,急性; 肺表面活性物质

Influence of porcine pulmonary surfactant administered at different time on therapeutic effects in rats with oleic acid induced acute lung injury SUN Yu, WANG Yi-qun, ZHONG Ji-gen, LU Jian. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, The Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

【Abstract】 Objective To investigate the therapeutic effects of endotracheal instilling porcine pulmonary surfactant (PPS) given at different time on acute lung injury (ALI) induced by oleic acid (OA). **Methods** Arterial blood gases and respiratory rate during the experiments, survival rate, lung index, total protein (TP) contents in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), tumor necrosis factor- α (TNF- α) level in plasma, light microscopy of the lung at 4 hours after the experiments were examined in different groups of Sprague-Dawley (SD) rats: Group 1, sham group; Group 2, injected intravenously with OA 0.2 ml/kg; Group 3, injected intravenously with OA 0.2 ml/kg+PPS 100 mg/kg 0.5 hour after OA; Group 4, injected intravenously with OA 0.2 ml/kg+PPS 150 mg/kg 0.5 hour after OA; Group 5, injected intravenously with OA 0.2 ml/kg+PPS 100 mg/kg 2 hours after OA; Group 6, injected intravenously with OA 0.2 ml/kg+PPS 150 mg/kg 2 hours after OA. **Results** Giving PPS not only improved the rats' (Group 3, Group 4 and Group 6) arterial blood gases and reduced respiratory rate, but also significantly raised their 4 hours-survival rate and decreased lung index, protein contents in BALF and TNF- α level in plasma, ameliorated pathohistological changes compared with Group 2 and Group 5 (all $P < 0.05$). **Conclusion** PPS (100 mg/kg) administered at the early stage (0.5 hour after OA) provides obvious effects on respiratory efficiency and alleviates lung injury in rats with OA induced ALI, PPS (150 mg/kg) at the late stage (2 hours after OA) has the same effects mentioned above, however PPS (100 mg/kg) given 2 hours after ALI has no therapeutic effects.

【Key words】 oleic acid; acute lung injury; pulmonary surfactant

肺表面活性物质(PS)合成减少、破坏增多或失活导致的肺泡萎陷和肺水肿是急性肺损伤(ALI)发生发展的重要机制之一^[1-3],可用外源性 PS 替代治疗 ALI^[4],但用药剂量和时间对疗效有明显的影响。虽然国内外已有不少用外源性 PS 替代治疗 ALI 的

实验和临床报道^[5-9],但由于各家所用 PS 的来源、用药剂量等不同,导致疗效的差异较大,目前尚无成熟的外源性 PS 防治 ALI 的临床用药方案。本研究拟观察了气道内滴入不同剂量猪肺表面活性物质(PPS)对大鼠 ALI 的疗效,探讨不同时间给予 PPS 对治疗效果的影响,以期为该药用于防治 ALI 及临床用药方案的制定提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料:油酸购自宜兴市第二化学试剂厂;PPS

基金项目:上海市科委重点基础项目(03JC14002);军队十一五科技攻关项目(06G063)

作者单位:200433 上海,第二军医大学基础部病理生理学教研室

作者简介:孙瑜(1979-),女(汉族),江苏省人,博士研究生。

混悬液由本校病理生理教研室制备,主要成分是磷脂,已获得了国家药品监督管理局的临床研究批文(批号:2003L01685)。大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)检测试剂盒购自美国 Biosource 公司。

1.2 油酸型 ALI 大鼠模型复制及分组:清洁级 SD 大鼠 48 只,体重 200~250 g,雌雄不拘(由中科院斯莱克动物中心提供),按随机数字表法分为假手术组、模型组、0.5 h PPS(100 mg/kg 或 150 mg/kg)治疗组、2 h PPS(100 mg/kg 或 150 mg/kg)治疗组,每组 8 只。大鼠麻醉后行气管和颈动脉插管,保留自主呼吸。假手术组仅行上述操作。将油酸用体积分数为 0.1%的牛血清白蛋白(BSA)稀释 5 倍,按 0.2 ml/kg(稀释后 1 ml/kg)缓慢注入其余各组大鼠的右侧舌静脉,治疗组分别于油酸注入 0.5 h 和 2 h 经气道滴入 100 mg/kg 和 150 mg/kg 的 PPS,观察 4 h 后处死各组大鼠。

1.3 疗效观察及检测指标:在规定时间内记录各组动物呼吸频率(RR)、动脉血氧分压(PaO₂)、动脉血二氧化碳分压(PaCO₂);计算存活率后处死大鼠,取大鼠肺脏称肺湿重并计算肺系数(LI, LI=肺湿重(g)/体重(kg))。经右支气管插管,将 4℃生理盐水 3 ml 缓慢注入右肺中,在肺内停留 30 s 后吸出,反复灌洗 3 次,回收支气管肺泡灌洗液(BALF),离心取上清液,用 Lowry 法检测总蛋白(TP)含量。将左下肺叶用甲醛固定,苏木素-伊红(HE)染色,行组织病理学检查。用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血浆中 TNF- α 的含量(按照试剂盒说明书操作)。

1.4 统计学方法:数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS 10.0 统计软件处理。存活率比较用 χ^2 检验;其余各数据间比较,方差齐性时用 SNK 法,方差不齐时用 Dunnett' C 法作多重比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同时间给予不同剂量 PPS 对 ALI 大鼠的存活率及血浆 TNF- α 浓度的影响(表 1):与模型组比较,注入油酸后 0.5 h,两个剂量 PPS 给药组均能显著提高 ALI 大鼠的存活率,降低血浆 TNF- α 含量(P 均 <0.05);2 h 给药组中仅 150 mg/kg PPS 有上述作用(P 均 <0.05),表明早期给药优于晚期。

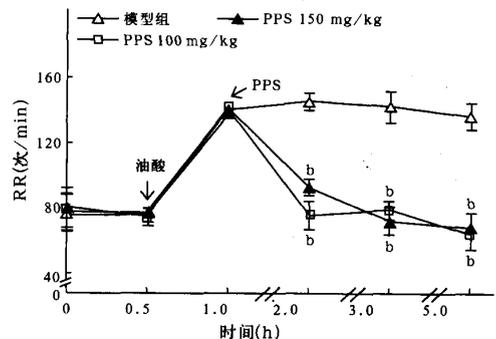
2.2 不同时间给予不同剂量 PPS 对 ALI 大鼠 RR 的影响(图 1,图 2):注入油酸后使大鼠的 RR 明显加快,达到 140~150 次/min,0.5 h 后气道分别滴入 PPS 100 mg/kg 和 150 mg/kg 均能显著降低 RR,与模型组同期比较差异有统计学意义(P 均 $<$

0.05),但两个剂量间比较差异无统计学意义。注入油酸后 2 h 给予 PPS,只有 150 mg/kg 的 PPS 能明显降低 RR($P<0.05$),100 mg/kg 的 PPS 作用不明显。表明 ALI 早期给予 PPS ≥ 100 mg/kg 能有效降低大鼠的 RR,改善呼吸窘迫症状,晚期只有较大剂量的 PPS 才能发挥此作用。

表 1 不同时间给予不同剂量 PPS 对 ALI 大鼠存活率及血浆 TNF- α 含量的影响

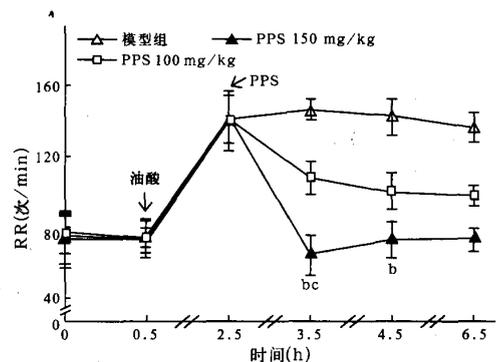
组别	动物数	大鼠存活率 (%)(只)	血浆 TNF- α 含量 ($\bar{x}\pm s$,ng/L)
假手术组	8	100.0(8)	40.14±20.95
模型组	8	75.0(7) ^a	1171.31±244.69 ^a
PPS 100 mg/kg 0.5 h 组	8	100.0(8) ^b	372.89±29.90 ^{ab}
PPS 150 mg/kg 0.5 h 组	8	100.0(8) ^b	345.45±104.09 ^{ab}
PPS 100 mg/kg 2 h 组	8	62.5(6) ^a	1202.32±47.18 ^a
PPS 150 mg/kg 2 h 组	8	100.0(8) ^{bc}	469.57±26.53 ^{abc}

注:与假手术组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与 PPS 100 mg/kg 2 h 组比较,^c $P<0.05$



注:与模型组同期比较,^b $P<0.05$

图 1 PPS 对油酸注入后 0.5 h ALI 大鼠 RR 的影响

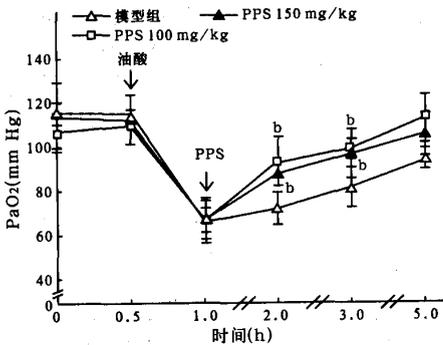


注:与模型组同期比较,^b $P<0.05$;
与 PPS 100 mg/kg 组同期比较,^c $P<0.05$

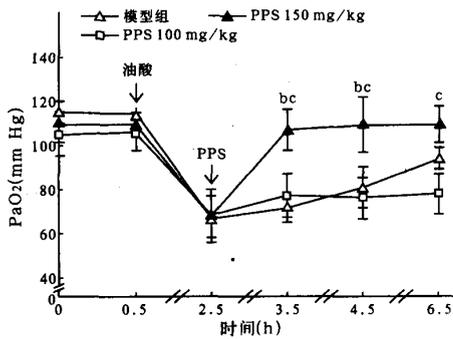
图 2 PPS 对油酸注入后 2 h ALI 大鼠 RR 的影响

2.3 不同时间给予不同剂量 PPS 对 ALI 大鼠血气的影响(图 3,图 4):注入油酸后大鼠的 PaO₂ 显著下

降, 0.5 h 后两个剂量 PPS 给药组均能明显提高大鼠的 PaO₂; 与模型组同期比较差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。注入油酸后 2 h 给予 100 mg/kg PPS 几乎没有作用, 只有 150 mg/kg PPS 能显著提高 PaO₂ (P < 0.05), 表明 ALI 晚期治疗时, 改善呼吸功能的有效 PPS 剂量增大。



注: 与模型组同期比较, ^bP < 0.05; 1 mm Hg = 0.133 kPa
图 3 PPS 对油酸注入后 0.5 h ALI 大鼠 PaO₂ 的影响



注: 与模型组同期比较, ^bP < 0.05;
与 PPS 100 mg/kg 组同期比较, ^cP < 0.05
图 4 PPS 对油酸注入后 2 h ALI 大鼠 PaO₂ 的影响

2.4 不同时间给予不同剂量 PPS 对 ALI 大鼠 LI、BALF 中 TP 含量的影响(表 2): 注入油酸后 0.5 h, 两个剂量 PPS 给药组均能明显降低肺毛细血管通透性, 减轻肺水肿和肺部炎症反应, 表现为降低 LI 以及 BALF 中的 TP 含量 (P 均 < 0.05); 2 h 给药组中仅 150 mg/kg PPS 有上述作用 (P 均 < 0.05), 表明早期用药效果优于晚期用药。

2.5 不同时间给予不同剂量 PPS 对 ALI 大鼠肺大体及肺病理的影响(彩色插页图 5): 模型组肺泡萎陷, 且有水肿液和大量渗出的红细胞; 0.5 h 给药组肺出血、水肿和肺泡萎陷显著减轻; 2 h 给药组中, 给予 PPS 150 mg/kg 能显著减轻肺组织损伤, PPS 100 mg/kg 与模型组比较改善不明显。

表 2 不同时间给予不同剂量 PPS 对 ALI 大鼠 LI 及 BALF 中 TP 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	LI	TP 含量 (g/L)
假手术组	8	5.47 ± 0.35	0.63 ± 0.31
模型组	7	11.73 ± 1.49 ^a	9.28 ± 1.81 ^a
PPS 100 mg/kg 0.5 h 组	8	7.14 ± 1.85 ^b	3.34 ± 2.81 ^{ab}
PPS 150 mg/kg 0.5 h 组	8	6.88 ± 0.39 ^b	2.37 ± 2.11 ^{ab}
PPS 100 mg/kg 2 h 组	6	12.32 ± 2.06 ^a	10.42 ± 0.25 ^a
PPS 150 mg/kg 2 h 组	8	8.85 ± 2.70 ^{abc}	3.46 ± 0.26 ^{abc}

注: 与假手术组比较, ^aP < 0.05; 与模型组比较, ^bP < 0.05; 与 PPS 100 mg/kg 2 h 组比较, ^cP < 0.05

3 讨论

我们前期工作证实, 对气道内滴入内毒素和海水淹溺引发 ALI 早期(模型复制后 30 min) 给予大鼠本实验室自制的 PPS (≥ 100 mg/kg), 能明显改善 ALI 大鼠的呼吸功能, 减轻肺出血、水肿和肺内炎症反应。在此基础上, 本实验进一步观察了 ALI 晚期给药的疗效。结果表明, 注入油酸后 2 h, 只有给予较大剂量 (150 mg/kg) PPS 才能明显降低 RR, 提高 PaO₂ 和大鼠的存活率, 减少 LI 及 BALF 中 TP 含量, 减轻肺内炎症反应和改善肺病理变化, 但在改善呼吸功能和减轻肺损伤方面均不如早期给药的效果好, 而 2 h 给予 100 mg/kg PPS 除了能轻微降低 RR 以外, 其余各项指标与模型组比较改变均不明显, 表明早期用药的重要性。早期用药不仅效果好, 而且用药量少, 这可以减少患者的经济负担, 因为上市的 PS 价格很高; 而晚期用药的效果差。用量大的原因可能是由于炎症反应进一步加重, 肺泡上皮细胞破坏和从肺毛细血管漏出的蛋白进一步增多, 加上全身炎症级联反应已经启动, 使较小剂量的 PS 不足以对抗 ALI 晚期多种因素对它的破坏和灭活, 所以不能发挥作用。加大 PS 剂量虽然能增强药物的效果, 但是 PS 量也不可无限制加大, 除了经济方面的原因外, PS 用量过多易导致细支气管的阻塞, 加重患者的缺氧^[10], 与我们的研究结果相类似。临床上报道急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 发病 2 d 以后再给药, 有些病例已发生不可逆损害。为尽可能减少 ALI 的发生, 是否需要轻度肺损伤或具有发生 ARDS 危险因素的患者预防性给予外源性 PS 治疗, 也值得探讨。目前正在正在进行临床试验的是在肺移植前给供体肺应用外源性 PS, 延长保存时间, 减轻移植后受体发生肺缺血/再灌注损伤。

总之, 在外源性 PS 替代治疗 ALI 时, 其疗效除了与肺损伤的性质和严重程度、给药剂量和给药时机有关外, 还与 PS 的制剂类型、给药途径以及是否

联合用药等多种因素密切相关^[11-14], 仍需进一步对这些因素进行研究, 以制定更合理的用药方案。

参考文献

- [1] Zhou Z, Kozłowski J, Schuster D P. Physiological, biochemical, imaging characterization of acute lung injury in mice[J]. Am J Respiratory Crit Care Med, 2005, 172(3): 344-351.
- [2] 朱光发, 钮善福, 蔡映云, 等. 肺表面活性物质在急性油酸性肺损伤时的变化[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(9): 525-528.
- [3] 黎檀实, 尹明, 冯丽洁, 等. 急性肺损伤中肺泡 I 型细胞凋亡机制的研究现状[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(3): 185-187.
- [4] 纪树萍, 张秀玲, 马文旭, 等. 肺表面活性物质替代治疗早产儿肺透明膜病的研究[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(4): 248.
- [5] Günther A, Ruppert C, Schmidt R, et al. Surfactant alteration and replacement in acute respiratory distress syndrome [J]. Respir Res, 2001, 2(6): 353-364.
- [6] Matthay M A, Zimmerman G A. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33(4): 319-327.
- [7] Ingenito E P, Mora R, Cullivan M, et al. Decreased surfactant protein-B expression and surfactant dysfunction in a murine model of acute lung injury [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2001, 25(1): 35-44.
- [8] Walmrath D, Grimminger F, Pappert D, et al. Bronchoscopic administration of bovine natural surfactant in ARDS and septic

shock; impact on gas exchange and haemodynamics [J]. Eur Respir J, 2002, 19(5): 805-810.

- [9] Lu K W, Robertson B, Tausch H W. Dextran or polyethylene glycol added to curosurf for treatment of meconium lung injury in rats [J]. Biol Neonate, 2005, 88(1): 46-53.
- [10] Haitsma J J, Papadakos P J, Lachmann B. Surfactant therapy for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. Curr Opin Crit Care, 2004, 10(1): 18-22.
- [11] McGuigan R M, Mullenix P, Norlund L L, et al. Acute lung injury using oleic acid in the laboratory rat; establishment of a working model and evidence against free radicals in the acute phase [J]. Curr Surg, 2003, 60(4): 412-417.
- [12] Haitsma J J, Papadakos P J, Lachmann B. Surfactant therapy for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome [J]. Curr Opin Crit Care, 2004, 10(1): 18-22.
- [13] Möller J C, Schaible T, Roll C, et al. Treatment with bovine surfactant in severe acute respiratory distress syndrome in children; a randomized multicenter study [J]. Intensive Care Med, 2003, 29(3): 437-446.
- [14] Safdar Z, Yiming M, Grunig G, et al. Inhibition of acid-induced lung injury by hyperosmolar sucrose in rats [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(8): 1002-1007.

(收稿日期: 2007-12-17 修回日期: 2008-01-18)

(本文编辑: 李银平)

• 科研新闻速递 •

大鼠额叶撞击伤增加回肠上皮的通透性

创伤性脑损伤后常发生胃肠道功能障碍。最近爱尔兰学者研究了大鼠额叶撞击伤与肠道通透性增加之间的关系。他们测定了大鼠额叶撞击伤后回肠和结肠上皮电阻、甘露醇磁导率系数, 并进行了肠黏膜形态学检查。研究结果显示, 额叶撞击伤组回肠和结肠黏膜上皮电阻的变化与对照组比较差异无统计学意义, 而额叶撞击伤组空肠甘露醇磁导率系数明显高于对照组。肠黏膜组织学检查显示, 50% 的回肠有病理学改变, 而结肠变化不明显。上述结果表明, 脑外伤能明显降低回肠屏障功能, 其机制可能与肠上皮紧密连接开放有关。提示急性脑损伤患者实施肠内营养时, 肠腔内毒素可能经肠屏障移位诱发脓毒症和多器官功能衰竭。

黄彬, 编译自《J Trauma》, 2008, 64(1): 131-138; 胡森, 审校

分泌型磷脂酶 A₂ 在脂多糖引起的胃肠道损伤中的作用

磷酸卵磷脂疏水层覆盖并保护着肠道表面, 形成完整的屏障。脓症患者因磷酸卵磷脂被分解, 肠道屏障功能被破坏。美国学者研究了分泌型磷脂酶 A₂ (sPLA₂) 与内毒素脂多糖 (LPS) 诱导的大鼠胃肠道通透性的关系。他们检测 LPS 诱导胃肠道损伤后大鼠胃肠腔内 sPLA₂ 活性和溶解的磷酸卵磷脂含量。结果显示, LPS 诱导的大鼠胃肠道 sPLA₂ 活性明显增加, 具有毒性的溶解性磷酸卵磷脂含量明显增加。sPLA₂ 可能通过分解胃肠黏膜细胞的磷脂保护层, 与溶解性磷酸卵磷脂共同损伤胃肠黏膜屏障, 导致胃肠道通透性增加。胃肠道通透性能被口服具有活性的 sPLA₂ 抑制剂阻断, 此项研究结果可能为减轻 LPS 引起的胃肠道损伤、保护胃肠黏膜屏障功能提供了新的治疗途径。

黄彬, 编译自《Shock》, 2007-12-20(电子版); 胡森, 审校

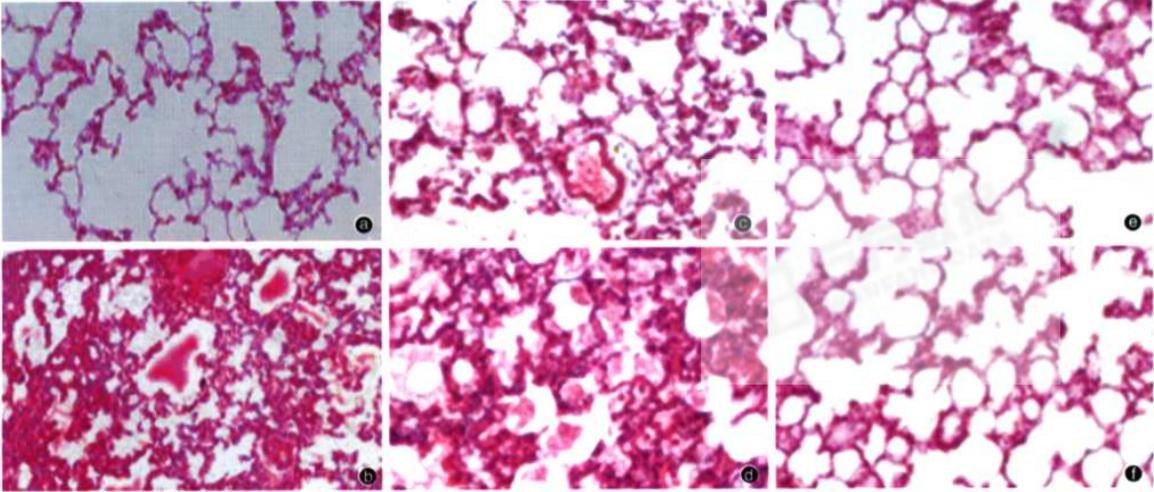
葡聚糖分离法不适用于脓症患者外周血中单核细胞的分离

为了测定用葡聚糖分离法 (Ficoll) 对脓症患者外周血单核细胞和粒细胞分离情况, 荷兰学者研究了脓症患者和健康对照组外周血单核细胞和粒细胞的细胞数量和纯度。细胞数量和纯度使用细胞离心涂片器和流体细胞计数免疫荧光法测定。研究结果显示, 在脓症患者的血清悬浮细胞层中单核细胞只占 11%~52%, 粒细胞占 48%~89%; 健康人组单核细胞所占比例高达 88%~100%。脓症组和健康组血离心后管底沉淀细胞层中的细胞相似, 92% 为多形核粒细胞。因此他们认为, 从脓症患者中分离的粒细胞不适合用于研究单核细胞, 但可以用于研究高纯度的粒细胞。

黄彬, 编译自《Intensive Care Med》, 2008-01-08(电子版); 胡森, 审校

不同时间给予猪肺表面活性物质对大鼠油酸型急性肺损伤疗效的影响

(正文见88页)



①:假手术组; ②:PPS 100 mg/kg 0.5 h组; ③:PPS 150 mg/kg 0.5 h组;
④:模型组; ⑤:PPS 100 mg/kg 2 h组; ⑥:PPS 150 mg/kg 2 h组
图5 油酸注入不同时间给予PPS对ALI大鼠肺组织病理学的影响(HE, × 200)

生长激素对急性肺损伤大鼠Clara细胞的影响

(正文见92页)

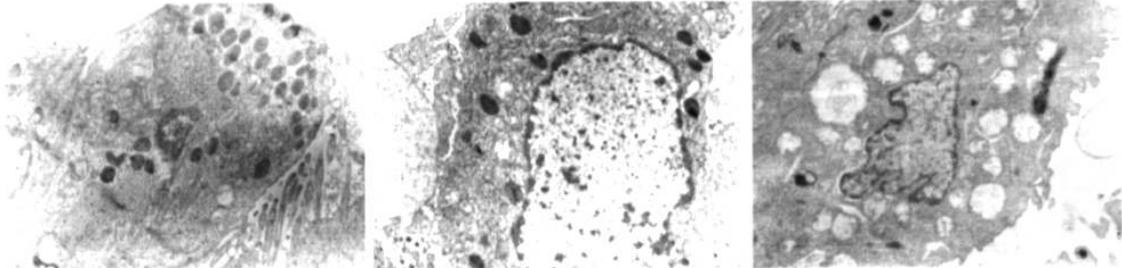


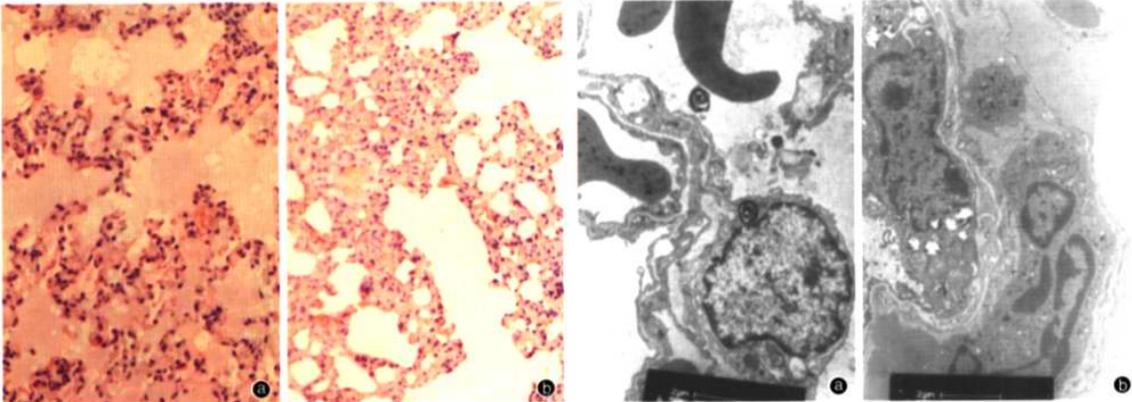
图1 生理盐水对照大鼠Clara细胞超微结构(× 8 000)

图2 ALI组注射LPS后24 h大鼠Clara细胞超微结构(× 8 000)

图3 rhGh组注射LPS后24 h大鼠Clara细胞超微结构(× 8 000)

山莨菪碱雾化吸入对油酸诱导大鼠急性肺损伤的保护作用及其机制

(正文见117页)



①:模型组; ②:治疗组

图1 光镜下观察两组大鼠肺组织病理学改变(HE, × 40)

①:模型组; ②:治疗组

图2 电镜下观察两组大鼠超微结构改变(× 5 000)