

静脉注射全氟化碳预处理与后处理对急性肺损伤大鼠的影响

尹晓峰¹, 钱国强^{1△}, 樊毫军², 宋建奇²

(1. 黄淮学院护理学院, 河南驻马店 463000; 2. 武警医学院附属医院医教部, 天津 300162)

[摘要] **目的** 探讨静脉注射全氟化碳(PFC)预处理与后处理对脂多糖(LPS)致急性肺损伤大鼠的保护作用及相关作用机制。**方法** 选取 24 只雄性 Wistar 大鼠分为对照组(NS 组)、LPS 组、PFC 预处理组(Pre 组)和 PFC 后处理组(Post 组)。NS 组均以等量生理盐水作对照, LPS 组经气管内滴注 LPS; Pre 组于气管内滴注 LPS 前经股静脉注射 PFC; Post 组于气管内滴注 LPS 后经股静脉注射 PFC。NS 组于气管内滴注生理盐水后 6 h, LPS 组、Pre 组与 Post 组分别于滴注 LPS 后 6 h 处死动物。比较各组大鼠肺病理学变化, PaO₂, 肺湿干比(W/D), 肺髓过氧化物酶(MPO)及细胞黏附分子-1(ICAM-1)表达情况。**结果** 应用 PFC 明显升高 PaO₂, 降低肺 W/D 比值、MPO 活性及 ICAM-1 表达水平($P < 0.05$), 而且 Pre 组较 Post 组作用更显著。**结论** 静脉注射 PFC 对 ALI 具有保护作用, 以 PFC 预处理效果更为显著, 其机制可能与下调 ICAM-1 表达有关。

[关键词] 呼吸窘迫综合征, 成人; 脂多糖; 全氟化碳; 细胞黏附分子-1; 中性粒细胞

[中图分类号] R361.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2017)08-1020-03

Effect of intravenous infusion with perfluorocarbons pretreatment and posttreatment on acute lung injury in rats

Yin Xiaofeng¹, Qian Guoqiang^{1△}, Fan Haojun², Song Jianqi²

(1. Department of Nursing, Huanghuai College, Zhumadian, Henan 463000, China; 2. Department of Medical Education, the Affiliated Hospital of Medical College of Armed Police Forces, Tianjin 300162, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect and the possible mechanism of intravenous infusion with perfluorocarbon pretreatment and posttreatment on acute lung injury in rats on LPS-induced acute lung injury in rats. **Methods** A total of 24 Wistar rats were randomly divided into 4 groups: control group(NS group), LPS group, Pre group and Post group. Normal saline was given to NS group as a control. Rats were treated with LPS by intratracheal instillation in LPS group, rats received PFC through femoral vein prior to LPS instillation in Pre group and rats received PFC through femoral vein after LPS instillation in Post group. NS group were sacrificed at 6 h after being injected with NS, LPS group, Pre group and Post group were sacrificed at 6h after being given LPS. Pathological changes of lung, PaO₂, lung wet to dry weight ratio(W/D), expression of myeloperoxidase (MPO) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) of lung were assessed. **Results** Intravenous infusion with perfluorocarbons increased PaO₂, decreased W/D, MPO and ICAM-1 significantly ($P < 0.05$), and this effect is more remarkable in Pre group. **Conclusion** Intravenous infusion of PFC significantly protects lung from acute lung injury, especially by pretreatment forms, probably by down-regulate the expression of ICAM-1.

[Key words] respiratory distress syndrome, adult; lipopolysaccharide; perfluorocarbon; intercellular adhesion molecule-1; polymorphonuclear neutrophil

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是由严重感染、创伤、休克、中毒及吸入有害气体等各种致病因素导致的急性呼吸功能不全或衰竭, 临床以呼吸窘迫、顽固性低氧血症和非心源性肺水肿为特征, 是临床常见的急危重症, 病死率极高。其发病机制迄今尚未完全阐明, 目前普遍认为肺内过度失控性炎症反应, 炎性介质和抗炎介质二者失衡, 最终引起不可逆性病变是导致 ALI/ARDS 发生的根本原因^[1-2]。因此, 积极寻找抑制炎症反应, 减轻病理损伤的方法是治疗 ALI/ARDS 的关键所在。研究表明, 全氟化碳(perfluorocarbon, PFC)具有的理化特性能够提高肺顺应性, 改善 ALI 动物模型的氧合功能和呼吸力学指标^[3]。但是目前关于 PFC 在 ALI 的应用研究主要是通过采用部分液体通气技术, 需要建立人工气道, 不便对早期尚未插管的患者进行干预。鉴于此, 本研究考虑对 ALI 大鼠损伤前后进行静脉滴注 PFC 途径给药, 观察其对 PMN 浸润

及病理损伤的影响, 并对作用机制进行初步探讨。

1 材料与方

1.1 材料 健康雄性 Wistar 大鼠 24 只, 由军事医学科学院实验动物中心提供, 体质量 180~220 g。实验试剂: PFC(北京天水生物科技公司); 脂多糖(LPS, 美国 Sigma 公司); 髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(南京建成生物工程研究所); 小鼠抗大鼠细胞黏附分子-1(ICAM-1)单克隆抗体(美国 Abcam 公司); 免疫组织化学染色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

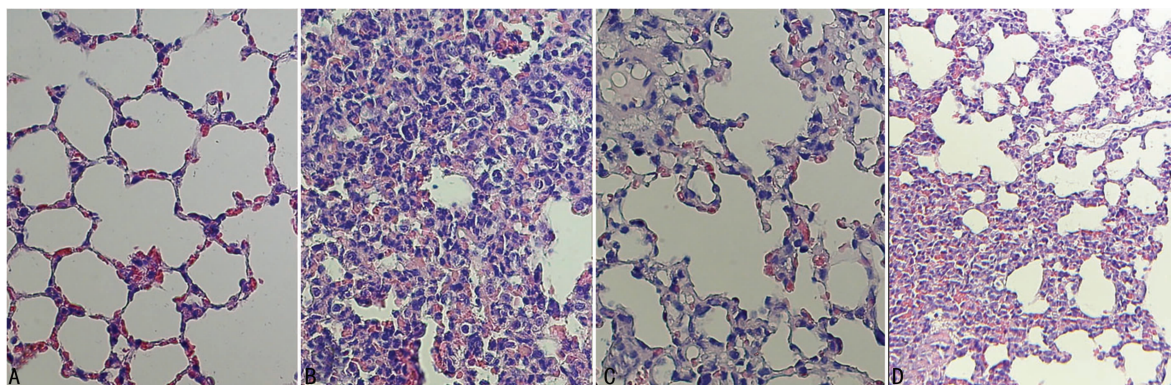
1.2 方法

1.2.1 动物模型的制备及实验分组 24 只健康雄性 Wistar 大鼠分为 4 组: (1)对照组(NS 组), 给予等体积生理盐水作对照。(2)脂多糖组(LPS 组), 大鼠以 2% 戊巴比妥钠腹腔注射进行麻醉, 将动物取仰卧位固定于实验台上, 逐层暴露气管, 以 0.5 mL/kg LPS 溶液进行气管内滴注, 药物注入完毕将大鼠取直立位并旋转, 便于药液均匀分布。(3)PFC 预处理组(Pre

表 1 各组 PaO₂、W/D、MPO、ICAM-1 比较(̄x±s)

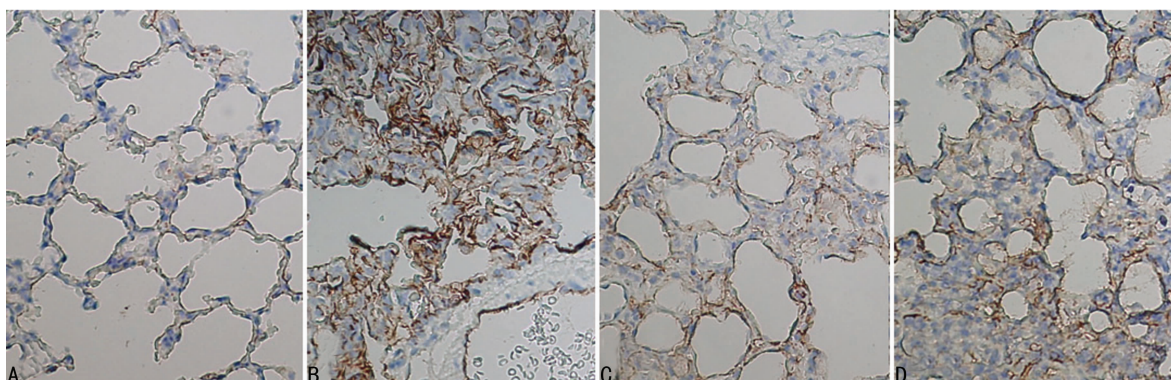
组别	n	PaO ₂ (mm Hg)	W/D	MPO	ICAM-1
NS 组	6	98.88±2.59	4.42±0.18	0.41±0.04	0.041±0.008
LPS 组	6	65.43±3.85*	6.06±0.21*	2.06±0.11*	0.075±0.001*
Pre 组	6	77.45±3.49*#	5.23±0.11*#	1.26±0.07*#	0.063±0.009*#
Post 组	6	71.44±3.56*#▲	5.80±0.23*#▲	1.61±0.10*#▲	0.069±0.006*#▲

*: P<0.05, 与 NS 组比较; #: P<0.05, 与 LPS 组比较; ▲: P<0.05, 与 Pre 比较。



A: NS 组; B: LPS 组; C: Pre 组; D: Post 组。

图 1 各组肺组织病理学变化(×400)



A: NS 组; B: LPS 组; C: Pre 组; D: Post 组。

图 3 各组肺组织 ICAM-1 的表达(×400)

组),于气道滴注 LPS 前 30 min 经股静脉注射 PFC(6 mL/kg)。(4)PFC 后处理组(Post 组),于气道滴注 LPS 后 30 min 经股静脉注射 PFC(6 mL/kg)。

1.2.2 标本采集与检测 滴注 LPS 或 NS 后 6 h 取腹主动脉血行血气分析并放血处死动物,开胸取全部左肺,滤纸吸干表明水分和血液,称取湿质量(W),置 80 °C 干燥箱烘烤 48 h,称取干质量(D),计算肺湿干比(W/D);取右肺上叶和中叶用 10%乙醇溶液固定,常规石蜡包埋切片,用于 HE 染色及免疫组织化学分析肺组织 ICAM-1 的表达情况;取右肺下叶置于离心管,并放于低温冰箱中保存,采用比色法测定肺组织 MPO 活性,具体操作步骤严格按照说明书步骤进行。

1.2.3 肺组织 ICAM-1 表达的判定标准 采用 Image-pro-plus 医学图像分析系统处理,以光密度平均值代表 ICAM-1 的表达强度。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,数据进行正态性检验,计量资料以 ̄x±s 表示,多组均数之间显著性检验采用方差分析,均数两两比较采用 LSD 检验。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动脉血氧分压(PaO₂)比较 与 NS 组比较,LPS 组 PaO₂ 显著降低(P<0.05),PFC 可显著提高 ALI 大鼠 PaO₂,但仍低于 NS 组(P<0.05),并且 Pre 组较 Post 组对 PaO₂ 提升作用更明显(P<0.05),见表 1。

2.2 肺 W/D 变化 LPS 组较 NS 组大鼠肺 W/D 明显增加(P<0.05),PFC 可明显降低 ALI 大鼠肺 W/D,并且 Pre 组比 Post 组大鼠肺 W/D 更低(P<0.05),见表 1。

2.3 肺组织病理学观察 与 NS 组大鼠肺组织比较,LPS 组光镜下可见肺组织结构破坏明显,肺泡毛细血管扩张充血,肺泡壁破裂,间隔增宽,大量 PMN 等炎症细胞浸润,伴出血及肺间质水肿;应用 PFC 减轻 ALI 大鼠肺组织病理损伤程度,光镜下可见肺间隔轻度增宽、无明显出血,少量炎性细胞浸润,见图 1。

2.4 肺组织 MPO 活性的比较 与 NS 组比较,LPS 组大鼠肺组织 MPO 活性显著升高(P<0.05);与 LPS 组比较,Pre 组和 Post 组 MPO 活性明显降低(P<0.05),并且 Pre 组比 Post 组大鼠肺 MPO 活性更低(P<0.05)。见表 1。

2.5 肺组织 ICAM-1 的表达 NS 组 ICAM-1 未见明显表达; LPS 组则表达明显增多,可见血管内皮细胞、支气管上皮细胞及肺泡上皮细胞有棕黄色或深棕色颗粒,染色较深;Pre 组和 Post 组表达相对减少,染色较浅(图 2)。图像分析结果表明,与 NS 组比较,LPS 组 ICAM-1 光密度平均值明显增高($P < 0.05$)。Pre 组和 Post 组与 LPS 组比较 ICAM-1 光密度平均值显著降低($P < 0.05$),但高于对照组($P < 0.05$),并且 Pre 组比 Post 组大鼠肺 ICAM-1 光密度平均值更低($P < 0.05$)。

3 讨 论

近年来,大量研究表明以 PFC 作为通气媒介的部分液体通气技术在治疗 ALI/ARDS 上取得了理想的效果,可显著改善 ALI 动物的氧合功能和肺顺应性,稳定血流动力学状态,减轻肺损伤,降低实验动物的病死率,并且无明显不良影响^[4-7]。然而,这些措施需要建立人工气道以便于 PFC 进入肺部发挥作用,因而并不适用于早期尚未插管患者的治疗。因此,在本实验选择了静脉注射方式给予 PFC 乳液,观察和评价其对 ALI 大鼠的影响,并在大鼠造模前后分别给予同等剂量的 PFC,观察比较二者对 ALI 大鼠相应指标的影响,旨在评价不同时点静脉注射 PFC 对 ALI 大鼠的效果。

本实验表明,对 LPS 诱导的 ALI 大鼠采取静脉注射给予 PFC 能够明显改善 ALI 大鼠的肺功能,提高 PaO₂,降低肺 W/D,减轻肺水肿,减轻肺组织病理损伤,其可能和 PFC 抑制 ICAM-1 表达,减少 PMN 肺组织浸润有关。这些结果提示 PFC 对于 ALI 患者,尤其是早期患者可能具有一定的临床应用价值。

ALI/ARDS 是一种由多种致病因素引发的全身炎症反应和自身代偿抗炎反应失调,从而损伤器官,肺脏往往成为所累及的首位靶器官^[8]。目前,ALI/ARDS 的发病机制尚未完全阐明,有待进一步深入研究。其中,PMN 在肺内聚集、激活,并释放蛋白酶、氧自由基和炎性介质等,以及其他炎症细胞的参与在 ALI/ARDS 的发病起着重要的作用^[5]。正常情况下 ICAM-1 表达有着严格的调控机制,在 LPS 等刺激因素的作用下,毛细血管内皮细胞上 ICAM-1 表达上调,PMN 与毛细血管内皮细胞之间的黏附作用增强,进而大量聚集,游出肺血管床,进入肺泡腔,促进炎症的发生、发展,造成肺组织损伤^[9]。

目前,关于 PFC 在 ALI 的应用研究主要是通过采用部分液体通气技术及汽化吸入,而对静脉注射给药途径研究较少。大量研究表明,应用 PFC 对于 ALI/ARDS 具有保护意义,但保护作用机制尚有待研究。PFC 是一类碳氢化合物中的氢原子被氟原子取代后形成的化合物,它可以在呼吸道内发挥良好的气体转运功能。大量研究表明,PFC 具有广泛的非特异性抗炎效应,能够明显减少炎症细胞的趋化、聚集和浸润,并能抑制炎性介质的释放,对 ALI 具有重要的保护作用,PFC 的非特异性抗炎效应可能是其对于 ALI 重要的保护机制之一。Rüdiger 等^[10]研究发现,PFC 能够促进肺泡表面活性物质的分泌,降低肺泡表面张力,减少肺不张,有利于肺通气。Nakata 等^[11]研究发现,循环系统内的 PFC 乳剂能够通过弥散作用到达肺血管内皮细胞、肺泡上皮细胞等,作为一个物理屏障阻挡炎症细胞、炎性介质等对肺组织的侵袭,进而发挥其保护作用。本实验研究结果表明,PFC 明显提高 PaO₂,降低肺组织 W/D 活力,减轻 PMN 的肺内浸润程度,减轻 LPS 致 ALI 大鼠肺损伤程度。在 LPS 刺激下,肺组织 ICAM-1 表达明显增高,PMN

与血管内皮细胞黏附、游走与渗出,向炎症部位积聚,加强炎症反应,造成肺组织损伤持续加重。本研究结果提示,PFC 可明显下调 LPS 致 ALI 时 ICAM-1 在肺组织的表达,减轻肺组织炎症反应,提示 PFC 可能通过下调 ICAM-1,减少 PMN 浸润,减轻炎症反应对 ALI 大鼠发挥保护作用。

本研究通过对 ALI 大鼠造模前后进行静脉注射 PFC 并进行比较发现 LPS 行气道滴注前应用 PFC 相较 LPS 行气道滴注后应用 PFC 能够更有效的提高 PaO₂,减少肺组织 ICAM-1 表达,降低 PMN 肺组织浸润,减轻肺组织病理损伤,对于 ALI 大鼠具有更强的保护作用,该结果出现的原因可能与应用 PFC 进行预处理时能够使其在 LPS 进入肺内之前覆盖于肺泡表面,更好地发挥其屏障保护作用,从而显著降低了 LPS 对肺组织的损伤作用;而 PFC 后处理组则由于应用 LPS 在前,使得肺组织损伤提早形成,再应用 PFC 仅能起到一定的治疗效果。

综上所述,静脉注射 PFC 对 ALI 具有保护作用,该给药途径不需要建立人工气道,更适用于早期 ALI,并且 PFC 预处理和后处理两种给药时点比较,预处理对于 ALI 肺功能改善,肺组织病理损伤减轻效果更显著,而且通过本研究表明 PFC 的保护作用机制可能与 PFC 下调 ICAM-1 表达,进而减少 PMN 肺组织浸润有关,这也为临床静脉注射 PFC 防治 ALI/ARDS 提供了理论基础。

参考文献

- [1] 唐瑾,郭忠良.全氟化碳在治疗 ALI/ARDS 时对促炎因子影响的研究进展[J]. 同济大学学报(医学版),2014,35(4):129-132.
- [2] 连祥基,喻文强,余革,等.低剂量全氟化碳不同时点干预急性肺损伤实验兔对肺组织病理学的影响[J]. 广东医学,2015,36(17):2669-2672.
- [3] Guo ZL, Lu GP, Ren T, et al. Partial liquid ventilation confers protection against acute lung injury induced by endotoxin in juvenile piglets[J]. *Respir Physiol Neurobiol*,2009,167(3):221-226.
- [4] Rimensberger PC. Partial liquid ventilation: is it really time to give it a go? [J]. *Pediatr Crit Care Med*,2008,9(6):664-666.
- [5] 余革,刘瑾,温晓晖,等.全氟化碳汽化吸入预处理对急性肺损伤实验兔早期炎症因子的影响[J]. 新医学,2011,42(8):513-517.
- [6] Wang X, Zhang J, Li X, et al. Sustained improvement of gas exchange and lung mechanics by vaporized perfluorocarbon inhalation in Piglet acute lung injury model[J]. *Clin Respir J*,2014,8(2):160-166.
- [7] Shashikant BN, Miller TL, Jeng MJ, et al. Differential impact of perfluorochemical physical properties on the physiologic, histologic, and inflammatory profile in acute lung injury[J]. *Crit Care Med*,2005,33(5):1096-1103.
- [8] Everhart MB, Han W, Sherrill TP, et al. Duration and intensity of NF-kappaB activity determine the severity of endotoxin-induced acute lung injury[J]. *J Immunol*,2006,176(8):995-1005.
- [9] 芮萌,段蕴植.中性粒细胞凋亡与急性肺肺损伤[J]. 中国临床医学,2008,38(12):1129-1132. (下转第 1026 页)

物质的游离氨基与还原糖的醛基经过缩合、重排、裂解、氧化修饰后产生一组稳定的终末产物^[15-16]。组织中 AGEs 水平在一定程度上能反映 DM 肾病的严重程度,同时 AGEs 可与成骨细胞表面的受体 RAGE 结合,抑制成骨细胞分化,使成骨细胞成骨能力下降^[17]。本实验中,高通 AGEs 的表达量在普通兔子使用普通时种植体随时间递增较快,而使用改性种植体递增较慢,但二者间差异无统计学意义($P>0.05$),说明在普通兔上,AGEs 表达改变不明显,而在 DM 兔上,使用改性种植体后,AGEs 递减迅速,普通种植体不变。这说明复合涂层种植体在可抑制 AGEs 的表达,从而促进 DM 动物的成骨,可能原因是与 AGEs 与 TGF- β 1 呈负相关,而复合涂层种植体通过 TGF- β 1 的过表达来抑制 AGEs 从而在 DM 中起到骨保护作用。

本实验使用的复合涂层改性种植体,在 DM 动物体内对于成骨具有明显的促进作用,该材料有望进一步研究以期以后的临床运用。

参考文献

- [1] 苟诗然,张帆,李萌婷,等. 钛表面羟磷灰石/壳聚糖-转化生长因子- β 1 缓释微球复合涂层的制备及其对成骨细胞黏附与增殖的影响[J]. 华西口腔医学杂志,2016,34(3): 229-233.
- [2] Aloufi F, Bissada N, Ficara A, et al. Clinical assessment of peri-implant tissues in patients with varying severity of chronic periodontitis[J]. Clin Implant Dent Relat Res, 2009,11(1):37-40.
- [3] Abreu MH, Bianchini MA, Magini RS, et al. Clinical and radiographic evaluation of periodontal and peri-implant conditions in patients with implant-supported prosthesis[J]. Acta Odontol Latinoam,2007,20(2):87-95.
- [4] Crespi R, Capparè P, Gherlone E. A 4-year evaluation of the peri-implant parameters of immediately loaded implants placed in fresh extraction sockets[J]. J Periodontol,2010,81(11):1629-1634.
- [5] Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, et al. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI dental implant system[J]. Clin Oral Implants Res,2003,14(3):329-339.
- [6] Yamalik N, Günday S, Kilinc K, et al. Analysis of cathepsin-K levels in biologic fluids from healthy or diseased natural teeth and dental implants[J]. Int J Oral Maxillofac Implants,2011,26(5):991-997.
- [7] Tang Z, Sha Y, Lin Y, et al. Peri-implant mucosal inflam-

mation and bone loss: clinical and radiographic evaluation of 108 dental implants after 1-year loading[J]. Chin J Dent Res,2000,3(2):15-20.

- [8] Mendonca G, Mendonca DB, Aragao FJ, et al. Advancing dental implant surface technology-from micron-to nanotopography[J]. Biomaterials,2008,29(28):3822-3835.
- [9] Dohan ED, Coelho PG, Kang BS, et al. Classification of osseointegrated implant surfaces: materials, chemistry and topography[J]. Trends Biotechnol,2010,28(4): 198-206.
- [10] Sarkar PD, Choudhury AB. Relationships between serum osteocalcin levels versus blood glucose, insulin resistance and markers of systemic inflammation in central Indian type 2 diabetic patients[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013,17(12):1631-1635.
- [11] Liu T, Gao Y, Sakamoto K, et al. BMP-2 promotes differentiation of osteoblasts and chondroblasts in Runx-2 deficient cell lines[J]. J Cell Physiol,2007,211(3):728-735.
- [12] Sun X, Cao Z, Zhang Q, et al. Aluminum trichloride inhibits osteoblast mineralization via TGF- β 1/Smad signaling pathway[J]. Chem Biol Interact,2016(244),449-2415.
- [13] Yamagishi SI. Role of advanced glycation end products (AGEs) in osteoporosis in diabetes[J]. Curr Drug Targets,2011,12(14):2096-2102.
- [14] Kolluru GK, Bir SC, Kevil CG. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing[J]. Int J Vasc Med,2012(2012): 918267.
- [15] Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, et al. AGE and their interaction with AGE receptor in vascular disease and diabetes I. The AGE concept[J]. Cardiovasc Res,1998,37(3):586-600.
- [16] Mai CY, Wang B, Wen JY, et al. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and AGEs are associated with cardiovascular risk factors in women with history of gestational diabetes mellitus[J]. Gynecol Endocrinol,2014,30(3): 241-244.
- [17] Santana RB, Xu L, Chase HB, et al. A role for advanced glycation end products in diminished bone healing in type 1 diabetes[J]. Diabetes,2003,52(6):1502-1510.

(收稿日期:2016-07-22 修回日期:2016-09-20)

(上接第 1022 页)

- [10] Rüdiger M, Wissel H, Ochs M, et al. Perfluorocarbons are taken up by isolated type II pneumocytes and influence its lipid synthesis and secretion[J]. Crit Care Med,2003, 31(4):1190-1196.
- [11] Nakata S, Yasui K, Nakamura T, et al. Perfluorocarbon

suppresses lipopolysaccharide and alpha-toxin-induced interleukin-8 release from alveolar epithelial cells[J]. Neonatology,2007,91(2):127-133.

(收稿日期:2016-09-21 修回日期:2016-11-16)