

·论著·

重组人类促红细胞生成素对
早产大鼠高氧肺损伤的影响

全裕凤¹,常立文¹,张国凤²,马丽亚¹

(1. 同济医科大学附属同济医院儿科,湖北 武汉 430030 2. 桂林医学院附属医院新生儿科,广西 桂林 541001)

[摘要] 目的 探讨重组人类促红细胞生成素(rhEpo)对早产大鼠高氧肺损伤的影响。方法 生后3 d的早产鼠随机分为 空气对照组, 高氧对照组, 高氧+rhEpo组, 空气+rhEpo组。高氧组持续暴露于≥90%氧(O₂)中,rhEpo组自生后3 d开始皮下注射rhEpo 800 U/kg,隔日1次。分别于暴露3 d,7 d检测各组支气管肺泡灌洗液(BALF)中还原型谷胱甘肽(GSH)、总蛋白、丙二醛(MDA)、非血红素铁含量,并比较肺湿重/干重(W/D)及肺组织病理改变。结果 与空气组相比,高氧组高氧3 d时MDA含量显著增加[(1.39±0.60) nmol/ml vs (0.35±0.22) nmol/ml](*P*<0.01);肺组织呈急性肺损伤病理改变。与空气组比较,高氧组7 d时非血红素铁、MDA、总蛋白含量均显著升高[(109.31±7.86) μg/dl vs (94.95±10.83) μg/dl, (1.53±0.39) nmol/ml vs (0.30±0.13) nmol/ml, (0.47±0.02) g/L vs (0.25±0.04) g/L](*P*<0.01);肺W/D值升高(5.54±0.41 vs 5.00±0.15)(*P*<0.05),肺病理改变加重出现肺纤维化趋势及结构紊乱。高氧+rhEpo组3 d时BALF中MDA为(0.69±0.19) nmol/ml;7 d时非血红素铁、MDA、总蛋白含量、肺W/D值分别为(99.60±8.21) μg/dl, (0.80±0.24) nmol/ml, (0.36±0.02) g/L, 5.08±0.21,较高氧组显著下降(*P*<0.05或0.01);3 d,7 d时GSH含量分别为(130.85±7.62) mg/L和(136.69±5.90) mg/L,较高氧组显著升高(*P*<0.01)。肺病理改变减轻。结论 高氧暴露3 d即可造成早产鼠急性肺损伤,7 d时加重。rhEpo对早产鼠高氧肺损伤有一定的保护作用。

[关键词] 高氧;早产;肺;重组人类促红细胞生成素

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2001)05-0525-04

Effect of Recombinant Human Erythropoietin on
Hyperoxia-Induced Lung Injury in Premature Rats

QUAN Yir Feng, CHANG Li Wen, ZHANG Guo Feng, et al.

Department of Pediatrics, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin, Guangxi, 541001, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of recombinant human erythropoietin (rhEpo) on hyperoxia-induced lung injury in premature rats. **Methods** Three-day-old premature rats were randomly assigned to four groups: the room air group, the hyperoxia group, the hyperoxia + rhEpo group, the room air + rhEpo group. Group and rats were exposed to 90% O₂. Group and rats received rhEpo (800 U/kg) subcutaneously every other day. After 3 days or 7 days of exposure, the contents of glutathione (GSH), total protein, malondialdehyde (MDA) and nonheme iron in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and the ratio of lung wet weight/dry weight (W/D), and lung morphometry were examined in all groups. **Results** After 3 days, Group rats showed an increase of MDA content compared with Group rats [(1.39±0.60) nmol/ml vs (0.35±0.22) nmol/ml, *P*<0.01], and presence of hyperaemia, red cell extravasation and inflammatory infiltration. After 7 days of exposure, the contents of nonheme iron, total protein and MDA increased in Group rats compared with Group rats [(109.31±7.86) μg/dl vs (94.95±10.83) μg/dl, (1.53±0.39) nmol/ml vs (0.30±0.13) nmol/ml, (0.47±0.02) g/L vs (0.25±0.04) g/L, respectively], *P*<0.01. And the ration of lung W/D also increased [(5.54±0.41) vs (5.00±0.15)], *P*<0.05, and

[收稿日期] 2000-10-16; [修回日期] 2001-02-23
[作者简介] 全裕凤(1966-),硕士,主治医师。

pathologic changes were more severe than those after 3 days of exposure. After 3 days of exposure, compared with Group rats, MDA content $[(0.69 \pm 0.19) \text{ nmol/ml}]$ in Group rats decreased significantly ($P < 0.01$), and the changes of acute lung injury were also alleviated. After 7 days of exposure, the contents of MDA $[(0.80 \pm 0.24) \text{ nmol/ml}]$, total protein $[(0.36 \pm 0.02) \text{ g/L}]$, nonheme iron $[(99.60 \pm 8.21) \mu\text{g/dl}]$ and lung W/D (5.08 ± 0.21) also decreased in Group rats compared with Group rats ($P < 0.01$ or 0.05). GSH contents increased in Group rats both after 3 days and 7 days of exposure $[(130.85 \pm 7.62) \text{ mg/L}$ and $(136.69 \pm 5.90) \text{ mg/L}]$ compared with those in Group rats $[(106.86 \pm 9.87) \text{ mg/L}$, $(122.19 \pm 10.41) \text{ mg/L}]$ (both $P < 0.01$), and pathologic changes in Group rats were alleviated more than those in Group rats. **Conclusions** Exposure to 90% O_2 for 3 days and 7 days result in acute lung injury in premature rats. Treatment with rhEpo alleviates hyperoxic lung injury in premature rats.

Key words: Hyperoxia; Premature; Lung; Recombinant human erythropoietin; Rat

文献报道高氧时体内存在铁代谢异常且铁螯合剂能减轻实验动物高氧肺损伤^[1,2]。重组人类促红细胞生成素 (recombinant human Erythropoietin, rhEpo) 是一种红细胞集落刺激因子,在刺激集落红细胞增殖分化、红细胞生成过程中同时转移体内非血红素铁进入骨髓,减少铁参与氧自由基损伤的机会。本实验建立早产鼠高氧肺损伤模型,同时用 rhEpo 干预,以探讨 rhEpo 对损伤的作用,为临床防治高氧肺损伤提供理论依据。

1 对象和方法

1.1 对象

孕 21 d(预产期为 22 d)剖腹产出生并转移给代母鼠的 Sprague Dawley 新生大鼠作为早产鼠^[1], 生后 3 d 随机分为: 空气对照组, 高氧对照组,

高氧 + rhEpo 组, 空气 + rhEpo 组。高氧组氧浓度维持在 $\geq 90\%$, 空气组置于常压空气中。rhEpo 组自生后 3 d 开始皮下注射 rhEpo 800 U/kg(日本麒麟啤酒株式会社产品), 隔日 1 次。对照组接受等量生理盐水。分别暴露 3 d, 7 d。

1.2 方法

1.2.1 计数血网织红细胞数 尾尖采血, 计数 1 000 个红细胞中网织红细胞数, 以总红细胞的百分数表示。

1.2.2 支气管肺泡灌洗 分别于大鼠暴露 3 d, 7 d 麻醉后以每次 0.5 ml, 1.0 ml 冷生理盐水支气管肺泡灌洗, 重复 3 次, 汇集灌洗液 (brochoalveolar lavage fluid, BALF), 4 000 rpm/min 离心 10 min, 取上清液测还原型谷胱甘肽 (GSH)、总蛋白、丙二醛 (MDA)、非血红素铁含量。总蛋白、MDA, GSH 检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供, 非血红素铁用 α, α -双吡啶法测定, 均用比色法测定。

1.2.3 肺病理学检查与肺湿重/干重 (W/D) 测定 结扎右支气管, 取右肺, 即刻称重为肺湿重, 60 ° 烤

至恒重为肺干重, 肺 W/D 值反映肺水肿情况。10 % 中性福尔马林内固定左肺 15 min 后将其浸泡于福尔马林液中。石蜡包埋、切片、HE 染色、光镜下检查肺组织病理改变。

1.3 统计方法

资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 SAS 软件包进行方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 BALF 中总蛋白、MDA、GSH、非血红素铁含量及肺 W/D 的变化

暴露 3 d 时, 与空气组相比高氧组 GSH, MDA 均明显增加 (P 均 < 0.01); 7 d 时, 高氧组 GSH、总蛋白、MDA、非血红素铁、肺 W/D 均明显高于空气组 (P 分别 < 0.01 或 0.05)。提示高氧暴露 3 d 可导致急性肺损伤, 7 d 时加重。与高氧组相比, 3 d 时高氧 + rhEpo 组 MDA 明显降低 ($P < 0.01$), GSH 明显增加 ($P < 0.01$); 7 d 时, 总蛋白、MDA、非血红素铁、肺 W/D 均明显降低 (P 分别 < 0.01 或 0.05), GSH 明显增加 ($P < 0.01$)。提示 rhEpo 对高氧肺损伤提供了保护作用。见表 1。

2.2 网织红细胞记数

rhEpo 治疗 3 d, 7 d 时, 与相应的高氧对照组和空气对照组相比, 血中网织红细胞记数均显著增加 (P 均 < 0.01)。

2.3 肺组织病理学检查

暴露 3 d 时高氧组小血管扩张、充血, 肺泡腔内出现大量红细胞及以中性粒细胞为主的炎症细胞, 间质内细胞增多; 高氧 + rhEpo 组上述病理改变减轻。高氧暴露 7 d 肺间隔轻/中度增宽, 间质细胞增多及胶原样物质增生, 并存在肺组织结构紊乱; 高氧 + rhEpo 组肺间隔灶性轻度增宽, 未见胶原样物质增生及肺组织结构紊乱。

表 1 早产鼠 BAL F 中 GSH,MDA ,总蛋白、非血红素铁含量及血网织红细胞及肺湿/ 干重比较

Table 1 Contents of GSH, total protein, MDA, non heme iron in BAL F, the haema tocrit counts and the ration of lung wet/ dry weight in 4 groups (n = 6, $\bar{x} \pm s$)

组名	GSH(mg/L)		总蛋白(g/L)		MDA(nmol/ ml)		非血红素铁(μg/ dl)		网织红细胞(%)		W/D	
	3 d	7 d	3 d	7 d	3 d	7 d	3 d	7 d	3 d	7 d	3 d	7 d
	60.62 ±8.23	54.04 ±7.44	0.26 ±0.04	0.25 ±0.04	0.35 ±0.22	0.30 ±0.13	94.24 ±3.11	94.95 ±10.83	3.6 ±0.8	3.4 ±0.9	4.97 ±0.24	5.00 ±0.15
	106.86 ±9.87 ^a	122.19 ±10.41 ^a	0.30 ±0.08	0.47 ±0.02 ^a	1.39 ±0.60 ^a	1.53 ±0.39 ^a	92.34 ±5.00	109.31 ±7.86 ^a	3.7 ±0.6	3.8 ±0.5	5.01 ±0.43	5.54 ±0.41 ^b
	130.85 ±7.62 ^c	136.69 ±5.90 ^c	0.31 ±0.03	0.36 ±0.02 ^c	0.69 ±0.19 ^c	0.80 ±0.24 ^c	96.45 ±2.89	99.60 ±8.21 ^c	5.0 ±0.8 ^{a,c}	6.3 ±0.7 ^{a,c}	4.86 ±0.20	5.08 ±0.21 ^d
	131.38 ±8.59 ^a	137.50 ±4.39 ^a	0.32 ±0.04	0.34 ±0.02 ^a	0.39 ±0.12	0.40 ±0.10	98.25 ±6.07	97.00 ±4.06	5.9 ±1.0 ^a	7.7 ±0.9 ^a	4.84 ±0.35	4.99 ±0.43

注: a 与 组比较 P <0.01; b 与 组比较 P <0.05; c 与 组比较 P <0.01;d 与 组比较 P <0.05

3 讨论

高氧肺损伤的自由基理论已被广泛接受。在生物体内非正常性氧自由基的产生过程中,铁被认为是主要的参与者。自由铁通过 Fenton 反应增加活性氧自由基的生成,引起氧化应激损伤。据报道高氧时体内铁代谢发生异常。高氧暴露时肺毛细血管受损,通透性增加,大量红细胞渗漏入肺泡腔并裂解,血红素释放。氧和血红素在转录水平诱导肺内皮细胞血红素加氧酶(Heme Oxygenase, HO)-1^[2]及新生大鼠肺 HO 的表达^[3],促进血红素的降解和铁的释放。释放出的铁使受诱导的 HO-1 表达显著增强^[4],形成正反馈,铁的产生进一步增加;高氧对新生狒狒肺上皮细胞转铁蛋白表达的抑制^[5]、活性氧自由基直接导致铁蛋白中的铁释放及受高氧诱导表达的肺铁蛋白铁含量低下^[6],使自由铁增加。本实验结果表明高氧暴露 7 d 时,早产鼠 BAL F 中非血红素铁含量显著增加,进一步证实了高氧时存在铁代谢异常,同时伴随的 MDA 和总蛋白含量显著升高,肺 W/D 值显著增加,肺组织损伤加重,提示铁代谢异常在高氧肺损伤中发挥了重要作用。

相反,减少参与 Fenton 反应的铁,如增加对铁的定域化则能减轻高氧肺损伤^[7]。本实验给高氧暴露的早产鼠隔日 1 次皮下注射 800 U/kg rhEpo,治疗 3 d 时早产鼠 BAL F 中 MDA 含量显著降低,7 d 时总蛋白含量减少,肺 W/D 值下降,肺组织病理改变减轻,提示 rhEpo 对高氧肺损伤具有保护作用,与 Bany 报道的结果相同,而同时伴随的 BAL F 中非血红素铁含量减少,则提示 rhEpo 的保护作用与非血红素铁的减少密切相关。EPO 是红细胞集落刺激因子,在红细胞的增殖分化中起决定性作用。本实验中 rhEpo 显著增加了空气和高氧暴露早产鼠外周血网织红细胞计数也证实这一作用。红细胞生成过程中对铁的需求增加。铁蛋白是反映体内储

存铁水平的可靠的量化指标,Barry 等在研究 rhEpo 对健康受试者铁代谢的影响时发现:治疗 2 周铁蛋白由平均 43 μg/L 降至略高于被认为无储存铁的铁 13 μg/L,说明红细胞生成过程中需要的铁有赖于储存铁的释放,其中首先被释放的是易于参与活性氧自由基生成的不稳定铁池中的铁,因此有理由推测 rhEpo 的应用可以减轻高氧应激下肺的非血红素铁负荷。同时,rhEpo 增加幼红细胞转铁蛋白受体的表达^[8]及其在幼红细胞膜表面的分布,增加与转铁蛋白的结合及对铁的摄取,促进幼红细胞铁蛋白合成^[8],显著降低血清铁和转铁蛋白饱和度,增加转铁蛋白浓度,因此增加对铁的定域化,发挥了抗高氧肺损伤保护作用。本实验显示 rhEpo 显著增加早产鼠 BAL F 中重要的小分子抗氧化物质 GSH 含量,提高抗氧化能力,这也是 rhEpo 发挥抗氧化损伤作用的一个方面。本实验提示给予接受高氧治疗的早产儿补充 rhEpo 可能成为一种有希望的防治肺损伤措施。

[参 考 文 献]

[1] Tanswell AK, Wong L, Possmayer F, et al. The preterm rat : A model of acute and chronic neonatal lung disease [J]. *Pediatr Res*, 1989, 25(5) : 525 - 529.

[2] Fogg S, Agarwal A, Nick HS, et al. Iron regulates hyperoxia-dependent human heme oxygenase 1 gene expression in pulmonary endothelial cell [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1999, 20(4) : 797 - 804.

[3] Dennerly PA, PA Rodgers, MA Lum, et al. Hyperoxic regulation of lung heme oxygenase in neonate rats [J]. *Pediatr Res*, 1996, 40(6) : 815 - 821.

[4] Phyllis A, Denner Y, Douglas R, et al. Oxygen toxicity and iron accumulation in the lungs of mice lacking heme oxygenase-2 [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(5) : 1001 - 1011.

[5] Yang F, Friedrichs WE, Coalson JJ, et al. Regulation of transferrin gene expression during lung development and injury [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(2 pt 1) : L417 - 426.

[6] Ryan TP, Kizesicki RF, Blakeman DP, et al. Pulmonary fer-

ritin: differential effects of hyperoxic lung injury of subunit mR-NA level [J]. Free Radic Biol Med, 1997, 22(5): 901 - 908.

[7] Fukuda Y, Herman RH, Ferrans VJ, et al. Effect of ICRF-187 on the pulmonary damage induced by hyperoxia in the rat [J]. Toxicology, 1992, 74(2-3): 185 - 202.

[8] Samantha J, Peta A, Bernard A, et al. Complex regulation of transferrin receptors during erythropoietin - induced differentiation of J2E erythroid cells: Elevated transcription and mRNA stabilization produce only a modest rise in protein content [J]. Eur J Biochem, 1997, 249(1): 77 - 84.

(本文编辑:俞燕)

病例报告 ·

病毒相关性噬血细胞综合征 1 例报告

王秀霞¹, 吕彦双²

(1. 河北医科大学第二医院儿科, 河北 石家庄 050000; 2. 无极县医院儿科, 河北 无极 052400)

[中图分类号] R559 [文献标识码] E

患儿,男,14岁,因发热10 d,浅表淋巴结肿大3 d入院。10 d前无明显诱因出现发热,呈稽留高热,最高达40℃,无寒颤、头痛、抽搐、皮疹等症状。当时查血常规 WBC $2.9 \times 10^9/L$, N 0.23, L 0.60, M 0.17, PLT $161 \times 10^9/L$, 门诊给予病毒唑静脉点滴,疗效欠佳,3 d前发现浅表淋巴结肿大。入院查体: T 38.5℃, 急性病容, 全身皮肤未见黄染及皮疹, 腋窝及腹股沟均可触及数个肿大淋巴结, 压痛明显, 活动度可, 咽部充血, 扁桃体Ⅱ度肿大, 心肺检查未见异常, 腹平软, 肝肋下未触及, 脾肋下约1 cm, 质中, 无压痛, 神经系统检查未见异常。实验室检查: WBC $1.8 \times 10^9/L$, N 0.54, L 0.45, RBC $4.59 \times 10^{12}/L$, Hb 127 g/L, PLT $161 \times 10^9/L$, 腺病毒 IgM 抗体阳性, AST 34 U/L, ALT 62 U/L, ALP 181 U/L, 淋巴结活检示: 淋巴窦内可见多量噬中性粒细胞, 窦上皮增生, 滤泡生发中心扩大, 可见多量巨噬细胞, 髓索内有脓肿形成。骨穿结果: 骨髓有核细胞增生明显活跃, 粒系以中晚期粒细胞为主, 可见巨晚粒、巨杆状核粒细胞, 红系稍少, 偶见双核幼红细胞, 成熟红细胞大小、形态无明显变化。噬血细胞易见, 占3%, 巨核细胞104个, 血小板成堆可见。初步诊

断为噬血细胞综合征, 给予甲基强的松龙及抗病毒治疗, 3 d后体温降至正常, 继续抗病毒治疗半个月, 复查血常规示 WBC $5.5 \times 10^9/L$, N 0.60, L 0.40, RBC $4.51 \times 10^{12}/L$, Hb 117 g/L, PLT $130 \times 10^9/L$, 骨髓报告未见噬血细胞, 患儿痊愈出院。

噬血细胞综合征又称噬血细胞性淋巴组织细胞增生症或噬血细胞性网状细胞增生症。其特征为发热、肝脾淋巴结肿大、全血细胞减少。部分患儿可有转氨酶、碱性磷酸酶、胆红素增高。骨髓和淋巴结活检可见组织细胞吞噬红细胞、血小板或有核细胞现象。临床据病因及预后等分为原发性和继发性。前者与常染色体隐性遗传有关, 多见于小年龄儿童; 后者可继发于细菌、病毒、肿瘤等。由病毒感染引起者即称为病毒相关性噬血细胞综合征。应用肾上腺皮质激素及/或足叶乙甙治疗可取得较好疗效。根据该患儿发热、脾及淋巴结肿大、白细胞减少、转氨酶及碱性磷酸酶明显增高、骨髓噬血细胞增多, 腺病毒抗体阳性, 腺病毒相关性噬血细胞综合征诊断成立, 经甲基强的松龙、丙种球蛋白及无环鸟苷等治疗半个月后痊愈出院。

(本文编辑:吉耕中)

[收稿日期] 2001 - 01 - 14; [修回日期] 2001 - 04 - 15
[作者简介] 王秀霞(1967 -), 女, 硕士, 主治医师。