

·实验研究报告·

地塞米松对胎粪吸入幼兔肺表面活性物质 相关蛋白 B 的影响及意义

吴红敏¹, 李娟¹, 何安生², 魏克伦¹

(1. 中国医科大学附属第二医院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 鞍钢铁西医院儿科, 辽宁 鞍山 114011)

[摘要] 目的 胎粪吸入综合征合并肺动脉高压发病机制不明, 治疗上缺乏有效的措施。曾有学者试用地塞米松治疗胎粪吸入猪, 能降低肺高压, 减轻肺水肿, 但其机制不十分清楚。为进一步探讨地塞米松的作用机制, 该文利用胎粪吸入模型观察地塞米松对幼兔胎粪吸入后肺表面活性蛋白 B 的影响。方法 通过气管内灌入胎粪 0.6 ml/kg 和 4 ml/kg 建立轻、重幼兔胎粪吸入模型, 根据是否应用地塞米松分为轻度胎粪吸入治疗组、对照组; 重度胎粪吸入预防组、对照组。应用右心室穿刺法测定右心室收缩压。用 RT-PCR 检测技术检测肺组织表面活性蛋白 B (SP-B) mRNA 在转录水平的基因表达。结果 轻度胎粪吸入组肺组织 SP-B mRNA 表达量较未治疗组升高, 24 h 达高峰 (0.89 ± 0.04), 72 h 为 (2.05 ± 0.10) 仍高于对照组 (1.84 ± 0.10), 差异有极显著性意义 ($P < 0.01$)。重度胎粪吸入预防组 (0.38 ± 0.05) 高于对照组 (0.20 ± 0.05) 差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。地塞米松治疗后轻度胎粪吸入组 24, 48 h 及重度胎粪吸入预防组右心室压力明显低于对照组。结论 地塞米松可促进幼兔胎粪吸入肺组织 SP-B 表达增加, 降低右心室收缩压, 显示地塞米松对预防和治疗胎粪吸入综合征及其并发的肺动脉高压具有一定临床价值。

[关键词] 吸入综合征; 胎粪; 表面活性蛋白 B; 反转录聚合酶链反应; 地塞米松; 幼兔

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1008-8830(2003)03-0283-02

胎粪吸入综合征 (meconium aspiration syndrome MAS) 合并肺动脉高压 (persistent pulmonary hypertension of the newborn PPHN) 的发病率和病死率均极高, 其发生机制尚未完全阐明, 是我国现代新生儿急救医学的重要问题之一。已有文献报道^[1] 胎粪吸入幼兔肺损伤后肺表面活性蛋白明显降低, 参与胎粪吸入肺损伤的病理生理过程。糖皮质激素是目前普遍用于预防新生儿呼吸窘迫综合征 (RDS) 的药物, 但对 MAS 伴有肺表面活性物质减少临床至今尚未找到有效的药物, 我们利用胎粪吸入动物模型观察地塞米松对胎粪吸入幼兔肺表面活性蛋白的影响, 进一步为临床治疗提供新的理论依据。

1 材料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 幼兔胎粪吸入模型的建立 在本院动物部选择日本大耳白兔 30 只, 日龄 30 ~ 35 d, 雌雄不限, 体重 400 ~ 500 g。

胎粪制备: 取多个正常新生儿第一次胎便, 用生理盐水稀释成 20% 胎粪混合物。

轻度胎粪吸入模型: 采用 Gerard 等^[2] 建立轻度胎粪吸入模型的方法, 用 20% 乌拉坦 5 ~ 10 ml/kg 腹腔麻醉动物后, 气管内灌入胎粪 0.6 ml/kg, 然后连接呼吸囊以正压通气 5 min 确保胎粪均匀进入支气管及肺泡, 随之拔管。等动物清醒后, 允许正常活动和饮食。

重度胎粪吸入模型: 开始步骤同上, 气管内注入胎粪 4 ml/kg, 并需机械通气 (呼吸机型号为 DH-140B, 浙江医科大学仪器厂生产)。呼吸机参数: 呼吸频率 (RR) 80 次/min、潮气量 (TV) 6 ~ 8 ml、吸呼之比 (I:E) 1:1 ~ 1:1.5。

1.1.2 实验分组 轻度胎粪吸入治疗组: 于建立胎粪吸入模型同时, 静脉给予地塞米松治疗, 首剂 1 mg/kg, 6 h 后 0.5 mg/kg, 以后每 12 h 静脉注射 1 次, 分别到 16, 24, 48, 72 h 处死。每设计时间 5 只幼兔, 共 20 只。

重度胎粪吸入预防组: 5 只幼兔。在建立重度

[收稿日期] 2002-12-02; [修回日期] 2003-04-04

[作者简介] 吴红敏 (1960-), 女, 博士, 副教授。主攻方向: 新生儿急救。

胎粪吸入模型前,每天 1 mg/kg 地塞米松静脉注射连续 3 d 后,制备重度胎粪吸入模型,静脉输液,机械通气维持 6 h 处死。

胎粪吸入对照组:分别建立轻、重度胎粪吸入模型,例数同上,未用任何药物治疗。

1.2 实验方法

1.2.1 肺组织匀浆 取新鲜左肺下叶肺组织 40 mg,加无水乙醇 0.1 ml,再加 1 ml 生理盐水充分研磨制成匀浆,离心取上清液 - 30℃ 保存待检。

1.2.2 右心室压力测定 按设计时间,将动物处死前,胸骨正中切开皮肤长 2.0 cm,以 22 号套管针于右胸骨旁第 3、4 肋间穿刺进针 1.0~1.5 cm,拔出针芯,经压力传感器与日本光电公司 RM-6000 型多道生理记录仪相连,测定右心室收缩压,以此反映肺动脉收缩压改变。

1.2.3 SP-B mRNA 检测 总 RNA 提取:用 TRIZOL 总 RNA 提取试剂(promega 公司)按说明书操作。 反转录:在 20 μl 反转录反应体系中加入:样本 RNA;5 ×Bca Buffer;25 mmol MgSO₄;dNTPs;Rnasin;Oligo(dT);DEPC 水;Bca BEST polymerase;混匀后 65℃ 1 min、30℃ 5 min、其间 15~30 min 匀速升温、65℃ 25 min、98℃ 5 min、5℃ 5 min,产物即为 cDNA。 PCR 扩增:SP-B 引物由大连宝生物(TaKaRa)公司合成,序列如下:上游 5' AAA GCCCT GGGACACTGTCTAC - 3';下游 5' TTAATCTGGCTCTGGAA GTAGG - 3'。其产物为 248 bp。同时合成内参照引物,在 PCR 扩增体系中加入:cDNA;10 ×Bca Buffer;25 mmol MgSO₄;dd-H₂O;上游引物;下游引物;TaqDNA 聚合酶,条件为 94℃ 3 min、94℃ 30 s、58℃ 30 s、72℃ 1 min、30 个循环后 72℃ 7 min。 产物分析:RT-PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶中电泳、溴化乙锭染色,紫外灯下观察结果可见 248 bp 的特异亮带,并照像。

1.3 数据分析

用凝胶成像及分析系统扫描 SP-B 扩增产物,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)吸光度值量化 SP-B 吸光度值,得到 SP-B 相对含量,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 地塞米松对胎粪吸入后肺 SP-B mRNA 的影响

轻度胎粪吸入组,应用地塞米松治疗 16 h SP-B mRNA 表达量略有增加,但与对照组比较无统计学

意义,24 h SP-B mRNA 表达明显增多,一直到 72 h 仍高于对照组,差异有极显著性($P < 0.01$)。见表 1。重度胎粪吸入预防组与对照组比较差异有极显著性,见表 3。

2.2 地塞米松对胎粪吸入后右心室压力的影响

幼兔轻度胎粪吸入后应用地塞米松治疗 16 h 右心室压力无变化,在 24、48 h 时及重度胎粪吸入预防组的右心室压力明显低于对照组,差异有显著性,见表 2、3。

表 1 轻度胎粪吸入治疗组与对照组肺 SP-B mRNA 变化 ($\bar{x} \pm s$)

	16 h	24 h	48 h	72 h
对照组	1.23 ±0.08	0.74 ±0.08	0.75 ±0.05	1.84 ±0.10
治疗组	1.31 ±0.03	0.89 ±0.04	0.83 ±0.03	2.05 ±0.10
t	2.0	3.75	3.63	3.50
P	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01

表 2 轻度胎粪吸入治疗组与对照组右心室压力变化 (kPa, $\bar{x} \pm s$)

	16 h	24 h	48 h	72 h
对照组	2.57 ±0.10	3.57 ±0.14	2.28 ±0.09	1.89 ±0.04
治疗组	2.56 ±0.08	3.03 ±0.13	1.94 ±0.05	1.86 ±0.07
t	0.20	6.75	6.80	0.75
P	>0.05	<0.01	<0.01	>0.05

表 3 重度胎粪吸入预防组与对照组肺 SP-B mRNA 及右心室压力变化 ($\bar{x} \pm s$)

	SP-B mRNA	右心室压力(kPa)
对照组	0.20 ±0.05	4.36 ±0.14
预防组	0.38 ±0.05	3.86 ±0.10
t	6.0	6.25
P	<0.01	<0.01

3 讨论

已有研究表明糖皮质激素有促进胎肺发育的作用,是目前临床普遍用于预防 RDS 的药物。早期研究集中在糖皮质激素对肺表面活性物质中磷脂的影响,由于表面活性物质中仅含磷脂并不能明显降低肺表面张力,只有在表面活性蛋白 B 存在下,肺表面活性物质才能产生有效的降低表面张力的效

(下转第 288 页)

novel point mutations in the survival motor neuron gene SMN, in three patients with SMA [J]. Hum Genet, 2001, 108(4): 356 - 357.

[10] Wirth B. An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA) [J]. Hum Mutat, 2000, 15(3): 228 - 237.

[11] Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, et al. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMA1 from the copy gene SMN2 [J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(7): 1177 - 1183.

[12] Srivastava S, Mukherjee M, Panigrahi I, et al. SMN - deletion in childhood - onset spinl muscular atrophy [J]. Am J Med Genet, 2001, 101(3): 198 - 202.

[13] Jablonka S, Rossoll W, Schrank B, et al. The role of SMN in spinal muscular atrophy [J]. J Neurol, 2000, 247 (Suppl 1): 137 - 42.

[14] Schmalbruch H, Haase G. Spinal muscular atrophy: present state [J]. Brain Pathol, 2001, 11(2): 231 - 247.

[15] Biros I, Susan Forrest. Spinal muscular atrophy:untangling the knot [J]. J Med Genet, 1999, 36(1): 1 - 8.

[16] Guettier - Sigrist S, Coupin G, Braun S, et al. On the possible role of muscle in the pathogenesis of spinal muscular atrophy [J]. Fundam Clin Pharmacol, 2001, 15(1): 31 - 40.

[17] Cifuentes - Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, et al. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy [J]. J Cell Biol, 2001, 152(5): 1107 - 1114.

[18] Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, et al. Htra2 - beta 1 stimulates an esonic splicing enhancer and can restore full - length SMN expression to survival motor neuron 2(SMN2) [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(17): 9618 - 9623.

[19] Young PJ, Didonato CJ, Hu D, et al. SRp30c - dependent stimulation of survival motor neuron(SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2betal [J]. Hum Mol Genet, 2002, 11(5): 577 - 587.

[20] Baron - Delage S, Abadie A, Echaniz - Laguna A, et al. Interferons and IRF - 1 induce expression of the survival motor neuron(SMN) genes [J]. Mol Med, 2000, 6(11): 957 - 968.

(本文编辑:吉耕中)

(上接第 284 页)

果^[3]。因此,近年来又开始研究糖皮质激素对表面活性蛋白的影响。王晓川等^[4]研究表明,地塞米松具有明显促进表面活性蛋白 B 基因表达的作用,随时间延长、地塞米松剂量的增加,效果越显著。

我们以前对胎粪吸入幼兔肺表面活性物质相关蛋白 B 研究表明^[1],MAS 及其并发的 PPHN 伴有明显的表面活性蛋白 B 降低。为此我们利用幼兔胎粪吸入模型在幼兔轻度胎粪吸入同时给予地塞米松治疗,重度胎粪吸入提前 3 d 预防用药。研究结果显示,应用地塞米松治疗轻度胎粪吸入组 16 h SP-B 的 mRNA 表达量有增加,但与对照组比较无统计学意义,24 h 有明显表面活性蛋白 B mRNA 表达增加,直到 72 h 仍明显高于对照组。表明地塞米松可能主要作用于 SP-B 基因转录过程,与 Weaver 等^[5]报道一致。并发现对重度胎粪吸入幼兔预防用药 3 d,也能显著增加 SP-B mRNA 表达,与对照组比较有极显著性意义。

Soukka^[6]报道了在猪胎粪吸入前,用甲基强的松龙预防可降低肺高压,减轻肺水肿并提高氧合。我们研究表明在轻度幼兔胎粪吸入治疗组 16 h 右心室压力无变化,在 24 h 至 48 h 右心室压力明显低于对照组。重度胎粪吸入预防用药组右心室压力明显低于未预防用药的对照组,此时 SP-B mRNA 表达明显增加,提示地塞米松通过促进肺表面活性相关蛋白 B 基因表达增加对 MAS 肺损伤和 MAS 并发的

PPHN 有预防和减轻作用。但对糖皮质激素的使用,临床上一直存在不同的看法,主要是糖皮质激素的作用广泛,有可能造成免疫抑制及二重感染等副作用,从本研究的结果来看,我们认为糖皮质激素在 MAS 治疗中,特别是早期、短期应用可能有积极的治疗作用。

[参 考 文 献]

[1] 吴红敏,李玖军,魏克伦,等. 幼兔胎粪吸入后肺表面活性蛋白 B 动态改变及与右心室压力关系的探讨 [J]. 中华儿科杂志, 2000, 38(11): 699 - 701.

[2] Gerard M, Michael J, Deborah A, et al. Exudative lung injury is associated with decreased levels of surfactant proteins in a rat model of meconium aspiration [J]. Pediatrics, 1997, 100(6): 998 - 1003.

[3] 吴静怡,徐志信,沈慧卿,等. 肺表面活性蛋白质分离和生物活性作用 [J]. 上海医科大学学报,1991, 18(3): 421 - 424.

[4] 王晓川,金勤立,沈惟堂,等. 早产大鼠肺表面活性物质蛋白 B 基因表达的调节 [J]. 中华儿科杂志,1996, 34(6): 380 - 382.

[5] Weaver TE, Whitsetl JA. Function and regulation of expression of pulmonary surfactant associated proteins [J]. Biochem J, 1991, 273(Pt2): 249 - 264.

[6] Soukka H, Halkola L, Aho H, et al. Methylprednisolone attenuates the pulmonary hypertensive response in porcine meconium aspiration [J]. Pediatr Res, 1997, 42(2): 145 - 150.

(本文编辑:吉耕中)