

· 实验研究 ·

对 LPS 诱导的急性肺损伤幼鼠肺组织 SP-A 变化的研究

舒林华, 魏克伦, 刘春峰, 韩晓华, 尚云晓, 蔡栩栩, 李玖军, 王丽杰

(中国医科大学盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

【摘要】 目的 SP-A 在维持肺表面活性物质(PS)功能和肺局部免疫功能方面起着重要作用。该文旨在探讨急性肺损伤(ALI)时肺组织 SP-A 随时间的变化规律。**方法** 无病原体的 21 日龄 Sprague-Dawley 幼鼠 110 只被随机分为正常对照组和 ALI 组(每组又分为 6 个亚组)。腹腔注射脂多糖(LPS, 4 mg/kg)建立 ALI 模型, 正常对照组注射等量生理盐水。LPS 注射后 6, 12, 24, 36, 48 和 72 h 每亚组各处死 8 只大鼠。用 Western blot 方法测定肺组织 SP-A 的相对含量。**结果** 与正常对照组相比, ALI 时肺组织 SP-A 的变化在 12 h 内无明显变化($P > 0.05$); 在 24 h 至 48 h 处于上升阶段($P < 0.01$), 于 36 h 达最高点(6.94 ± 0.80); 到 72 h 时 SP-A 下降($P < 0.01$)。**结论** 肺组织 SP-A 在 LPS 诱导的 ALI 中的变化为时间依赖性。肺组织 SP-A 一过性升高, 表现出 SP-A 在某种程度上的代偿能力较强。
[中国当代儿科杂志, 2008, 10(2): 203-206]

【关键词】 急性肺损伤; 内毒素; 肺表面活性蛋白 A; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1008-8830(2008)02-0203-04

Changes of pulmonary surfactant protein A in young rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide

SHU Lin-Hua, WEI Ke-Lun, LIU Chun-Feng, HAN Xiao-Hua, SHANG Yun-Xiao, CAI Xu-Xu, LI Jiu-Jun, WANG Li-Jie.
Department of Pediatrics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: shulinhua@126.com)

Abstract: Objective Pulmonary surfactant protein A (SP-A) plays an important role in the maintenance of pulmonary surfactant function and innate immune defence. This study aimed to explore the changes of SP-A concentration in the lungs of young rats with acute lung injury. **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly assigned to control and lung injury groups. Acute lung injury was induced by intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS) (4 mg/kg) in the lung injury group. The same amount of normal saline was given for the control group. The two groups were subdivided into 6 groups sacrificed at 6, 12, 24, 36, 48 and 72 hrs of injection ($n=8$ each). Western blot was employed to detect SP-A concentration in the lung tissues. **Results** SP-A concentration in the lung injury group was not different from the control group within 12 hrs after LPS injection. SP-A concentration in the lung injury group was elevated significantly during 24-48 hrs after LPS injection, peaking at 36 hrs (6.94 ± 0.80 vs 5.01 ± 0.36 ; $P < 0.01$), compared with the controls. However, SP-A concentration in the lung injury group was significantly reduced 72 hrs after LPS injection compared with the controls ($P < 0.01$). **Conclusions** The changes of lung SP-A concentration in rats following acute lung injury were time-dependent. The transient elevation of SP-A concentration in the lungs indicated a strong compensation ability of SP-A in the host defence against acute lung injury.
[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10(2): 203-206]

Key words: Acute lung injury; Lipopolysaccharide; Pulmonary surfactant protein A; Rats

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是儿科常见和潜在危害极大的疾病之一。ALI 是 ARDS 的早期阶段, 重度的 ALI 即发展为 ARDS。国内最新调查显示, ARDS 患儿的死亡率达到 60% 以上^[1]。只有在疾病早期有效地控制 ALI 的发展进程, 才能遏制 ARDS 的产生和发展, 提高

ARDS 的存活率。小儿 ALI/ARDS 正成为临床危重医学的研究重点^[2]。

SP-A 是由肺泡 II 型上皮细胞(alveolar type II cell, AEC-II)和气道 Clara 细胞合成和分泌到肺泡腔中的一种胶原糖蛋白, 是具有降低肺表面张力的肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)的重要组成部分, 具有先天的局部免疫功能。探究肺组织

[收稿日期] 2007-09-27; [修回日期] 2007-10-24
[作者简介] 舒林华, 男, 博士, 讲师。主攻方向: 急性肺损伤。

SP-A在ALI时随时间的变化规律是研究ALI发病机制和探索治疗新途径的基础和前提。目前国内尚未见对ALI时肺组织SP-A进行动态观察的报道。本实验旨在探讨肺组织SP-A与ALI随时间的变化关系。

1 材料与方法

1.1 材料

SP-A山羊多克隆抗体(一抗),驴抗羊多克隆抗体IgG(二抗),Santa Cruz, Biotechnology, Inc.。硝酸纤维素膜, Millipore Corporation。3 MM滤纸, Whatman, Clifton, NJ, USA。

1.2 动物、ALI模型制备

由中国医科大学动物部提供的无病原体的21日龄Sprague-Dawley幼鼠110只(确保死亡后每组至少8只,有动物使用合格证明),不分雌雄,体重44~61 g,随机分为对照组和ALI组,各组再按给药后6,12,24,36,48,72 h分为6个亚组。ALI组腹腔注射LPS 4 mg/kg^[3~6]以造成ALI模型,对照组注射等量生理盐水。与对照组相比,ALI 6 h组幼鼠不活跃;12 h组幼鼠出现腹泻和呼吸急促;24 h组出现呼吸困难、少动、口鼻周围发绀,2只死亡;48 h组发绀、周身青紫,不动,体重下降,4只死亡;72 h体重略上升,但低于对照组,发绀消失,1只死亡。

1.3 取材

用10%水合氯醛(4 mL/kg^[3,4])麻醉SD幼鼠,分别于给LPS后6,12,24,36,48,72 h无菌条件下横断腹主动脉处死。取左下肺部分组织置于洁净的Eppendorf管中,经液态氮转至-80℃冰箱保存待检。

1.4 左肺组织匀浆

将左肺组织放在匀浆缓冲液中(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 包括1 mM EDTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride和2.5 mM N-ethylmaleimide), 1 g肺组织:9 mL缓冲液。使用Polytron (Brinkman Instruments, Westbury, NY)匀浆匀浆,在冰上超声波降解肺组织,20 s×5次,300 r/min, 5 min,除去组织残块。

1.5 总蛋白分析

电泳前Lowry法测量肺组织匀浆的蛋白质浓度,调整样本的浓度均匀一致。

1.6 Western blot分析

从各组中取20 μL样品用8%的SDS用Western blot方法半定量测定SD幼鼠ALI时肺组织

SP-A。从各组中取20 μL样品用8% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,120 V 1.5 h。在含有192 mM glycine, 20% methanol, 25 mM Tris-HCl(pH 8.0)的电转移装置,将胶转印到两张3 MM滤纸(Whatman, Clifton, NJ)硝酸纤维素膜(Millipore公司提供)上,常压50 V 2 h,搅拌温度4℃,3 h。转印成功由着色胶和硝酸纤维素膜证实。硝酸纤维素膜在5%的低脂奶粉的磷酸盐缓冲液中封闭2 h,接着在PBS-T中冲洗3次10 min。硝酸纤维素膜在含有山羊抗大鼠SP-A抗体(1:500)的1% PBS-T中孵浴1 h,分别在1% PBS-T中冲洗3次共10 min。再在含驴抗山羊血清(1:2 000, Santa Cruz公司)的1% PBS-T中1 h探测膜上抗体。将膜在PBS-T中冲洗3次,再在碱性磷酸酶缓冲液中孵育3次,每次10 min。用β-Naphthyl acid phosphate、o-Dianisidine和Tetrazotized给膜染色,扫描照相。SP-A的图像用FlourChem数字影像系统V 2.0 (Alpha Innotech公司)进行t数字量化。统计数据来源于经SPSS 12.0软件处理的整合光密度(IDVs)值,并用百万分之一表示。

1.7 统计学处理

用SPSS12.0统计软件包进行,所有资料均采用mean±SD表示,组间比较采用方差分析和LSD法(方差齐)及矫正t检验(方差不齐),P<0.05为差异有显著意义。

2 实验结果

采用Western blot法测定ALI幼鼠肺组织SP-A^[7]。在LPS诱导的ALI过程中,在最初的6,12 h,SP-A与对照组无显著差异(P>0.05)。在24,36,48 h等时间点,SP-A明显上升(P<0.01),并且在36 h处达到最高点(6.94±0.80);但在72 h处,SP-A明显下降(P<0.01),低于正常对照组,二者差异有显著性(图1)。从SP-A在不同时间段对LPS的反应看,在ALI的初期6 h至12 h,SP-A处于相对稳定期;在24 h至48 h,SP-A处于明显上升阶段,此为机体代偿的结果,即SP-A处于代偿阶段;而在72 h,SP-A明显下降,SP-A处于失代偿阶段(表1)。

3 讨论

SP-A是由AEC-II合成和分泌的、含量最多的一种多功能糖蛋白,广泛分布于板层小体(lamellar body, LB)、管髓体(Tubular myelin, TM)、内质网

表 1 对照组、ALI 组和治疗组 SD 幼鼠肺组织 SP-A 含量的比较 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

组别	6 h	12 h	24 h	36 h	48 h	72 h	F	P
对照组	5.10 ± 0.37	5.13 ± 0.39	5.02 ± 0.35	5.01 ± 0.36	5.01 ± 0.36	5.22 ± 0.36	0.413	>0.05
ALI 组	4.90 ± 0.51	5.06 ± 0.83	6.52 ± 0.62	6.94 ± 0.80	6.65 ± 0.62	3.87 ± 0.50	27.530	<0.01
t	0.760	0.541	5.278	5.503	5.323	5.712		
P	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01		

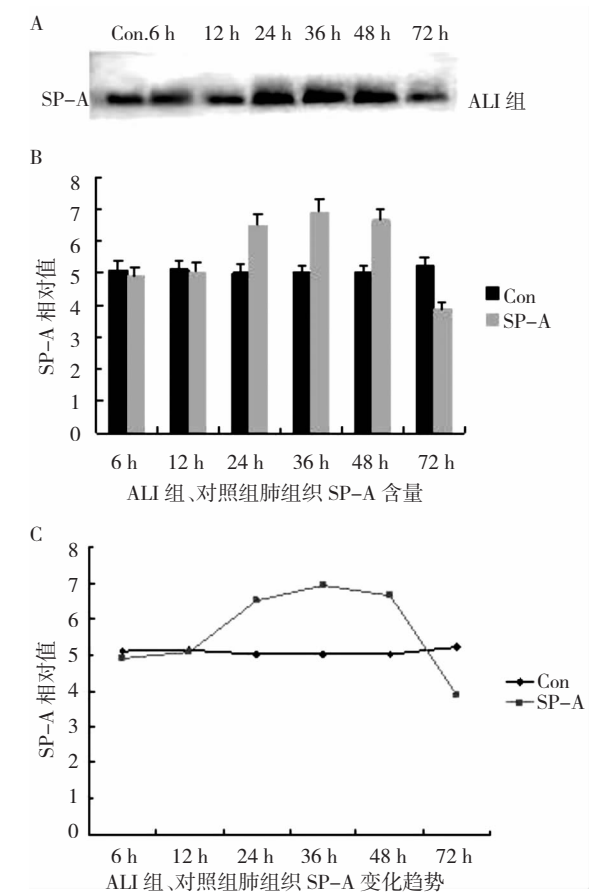


图 1 对照组、ALI 组肺组织 SP-A 含量及变化趋势

(endoplasmic reticulum, ER) 和高尔基体 (Golgi complex, GC) 中, 对管髓体和板层小体 (lamellar body, LB) 的形成具有重要意义。SP-A 可以与许多呼吸道病原体相互作用, 调节白细胞对病原微生物的反应, 参与肺部免疫和炎症调节^[7]。

本研究采用 SD 幼鼠腹腔注射 LPS 的方法制备 ALI 动物模型, 随 LPS 作用时程的延长, 肺组织 SP-A 的含量发生明显变化。在 LPS 所致的 ALI 初期 12 h 内肺组织 SP-A 无明显变化。说明 LPS 在短时间内对肺组织 SP-A mRNA 和 SP-A 的作用不能立刻导致 SP-A 下降。肺组织 SP-A 在 24 ~ 48 h 处于高水平状态。由 LPS 和 LPS 引发的炎症介质/抗炎介质失衡所产生的 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 等大量炎症介质在 24 h 时刺激肺 II 型上皮细胞 (AEC-II),

致使 AEC-II 分裂增殖, 细胞周转率加快, LB 数目增加, 细胞代谢旺盛, SP-A 合成增多, 故肺组织 SP-A 含量增加, 表达水平升高。AEC-II 对 SP-A 的再摄取和利用导致 SP-A 循环再利用增加^[8]。SP-A 的表达增强部分是由于 ALI 模型中细胞因子水平变化诱导的炎症反应^[8]。SP-A 的合成速率大于 SP-A 的消耗速率, 故肺组织 SP-A 的含量维持在较高水平, 此为机体代偿功能所致。此阶段肺组织 SP-A 的高水平状态与 Griese 等^[9]的报道相类似。

随着 LPS 作用的进一步加强, 肺组织 SP-A 水平呈下降趋势。肺组织 SP-A 含量减少的可能潜在的机制: 随着 SP-A mRNA 下调效应的积累、叠加与放大, AEC-II 内 SP-A 的生成减少, 肺组织 SP-A 含量逐渐下降^[8]。肺组织 SP-A 可直接与 LPS 结合, 导致 SP-A 严重减少^[3, 7]。LPS 是 SP-A 的主要配体, SP-A 的糖识别域 (carbohydrate-recognition domain, CRD) 与 LPS 结合^[7, 10, 11], 使肺组织 SP-A 大量消耗。感染性 ALI 中肺泡毛细血管通透性增加, 血管内的炎性细胞和多形核白细胞大量聚集、迁移并释放大 量弹性蛋白酶^[7]、炎性细胞代谢产物以及大量漏出的血浆蛋白, 均可降解 SP-A, 其降解强度依次为纤维蛋白降解产物、纤维蛋白原、球蛋白和白蛋白。SP-A 对免疫细胞尤其是单核-巨噬细胞及中性粒细胞具有趋化作用。SP-A 可与病毒、细菌、真菌、原虫、支原体等大部分病原体^[12]等各种病原微生物的表面结合。SP-A 作为调理素可以促进肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophage, AM) 的吞噬作用^[7], 其机制可能是 SP-A 作为调理素与 AM 膜上的受体结合, 使 AM 接近病原体便于吞噬, 结合病原体后的 SP-A 能增强受体的活性, 刺激 AM 的吞噬能力^[13, 14]。SP-A 促使 AM 内超氧自由基和/或 NO 大量生成, 促进 AM 的杀菌作用^[15], 同时也促进 SP-A 的进一步消耗。SP-A 以剂量依赖方式下调促炎细胞因子如 TNF- α 、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 β 、巨噬细胞炎症蛋白 (macrophage inflammatory protein, MIP)-1 α 、单核细胞趋化蛋白 (monocyte chemoattractant protein, MCP)-1 等的产生, 通过抑制某些细胞因子和炎症介质的合成与释放抑制炎症反应^[16], 也加剧 SP-A 的损耗。SP-A 直接作用于 B 淋巴细胞或间接

通过刺激免疫细胞因子作用于 B 淋巴细胞,激活该细胞产生免疫球蛋白 IgG, IgA, IgM^[17], 同时使得 SP-A 更加减少。此外,由于 AEC-Ⅱ超微结构的变化, LB 破溃与裂解, 细胞骨架的破坏, AEC-Ⅱ调亡、变性和坏死均是导致 SP-A 含量下降的原因之一^[18]。本实验中 ALI 失代偿期肺组织 SP-A 的减少可能是 BALF 中 SF-A 含量下降的主要原因之一^[19,20]。由于 SP-A 减少导致肺局部免疫功能降低可能是产生 ALI 的主要机制之一。

[参 考 文 献]

[1] 喻文亮,陆铸今,王莹,施丽萍,匡凤梧,张剑晖,等. 小儿急性呼吸窘迫综合征前瞻性多中心临床流行病学研究[J]. 中华急诊医学杂志,2005,14(6):448-453.

[2] Lu YM, Song ZF, Zhou X, Huang SG, Zhu DM, Yang XY, et al. A 12-month clinical survey of incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in Shanghai intensive care units[J]. Intens Care Med, 2004, 30(13):2197-2203.

[3] 舒林华,吴秀清,魏克伦,舒林宏,薛辛东,吴红敏,等. 脂多糖诱导的急性肺损伤幼鼠肺表面活性蛋白 D 的时序变化[J]. 中国当代儿科杂志,2005,7(6):483-488.

[4] 舒林华,薛辛东,舒林宏,刘春峰,韩晓华,吴红敏,等. 地塞米松对脂多糖诱导的急性肺损伤幼鼠肺表面活性蛋白 D 的影响[J]. 中国当代儿科杂志,2007,9(2):155-158.

[5] Fehrenbach H, Brasch F, Uhlig S, Weisser M, Stamme C, Wendel A, et al. Early alterations in intracellular and alveolar surfactant of the rat lung in response to endotoxin[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1998, 157(5):1630-1639.

[6] Wang D, Wei J, Hsu K, Jau J, Lieu MW, Chao TJ, et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats[J]. J Biomed Sci, 1999, 6(1):28-35.

[7] Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense[J]. Annu Rev Physiol, 2001, 63: 521-554.

[8] McIntosh JC, Swyers AH, Fisher JH, Wright JR. Surfactant proteins A and D increase in response to intratracheal lipopolysaccha-

ride[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996, 15(4): 509-519.

[9] Griese M, Neumann M, von Bredow T, Schmidt R, Ratjen F. Surfactant in children with malignancies, immunosuppression, fever and pulmonary infiltrates[J]. Eur Respir J, 2002, 20(5): 1284-1291.

[10] van Iwaarden JF, Pikaar JC, Storm J, Brouwer E, Verhoef J, Oosting RS, et al. Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides[J]. Biochem J, 1994, 303(Pt 2):407-418.

[11] Kalina M, Blau H, Riklis S, Kravtsov V. Interaction of surfactant protein A with bacterial lipopolysaccharide may affect some biological functions[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 1995, 268(1 Pt 1):L144-L151.

[12] Lawson PR, Reid KB. The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity[J]. Immunol Rev, 2000, 173: 66-78.

[13] LeVine AM, Whitsett JA. Pulmonary collectins and innate host defense of the lung[J]. Microbes Infect, 2001, 3(2): 161-166.

[14] Fehrenbach H. Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited[J]. Respir Res, 2001, 2(1):33-46.

[15] Hickman-Davis JM, Fang FC, Nathan C, Shepherd VL, Voelker DR, Wright JR. Lung surfactant and reactive oxygen-nitrogen species: antimicrobial activity and host-pathogen interactions[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 281(3): L517-L523.

[16] McCormack FX, Whitsett JA. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung[J]. J Clin Invest, 2002, 109(6):707-712.

[17] Schahat TL, Tino MJ, Wright JR. Regulation of protein phosphorylation and pathogen phagocytosis by surfactant protein A[J]. Infect Immun, 1999, 67(9): 4693-4699.

[18] 舒林华,薛辛东,舒林宏,刘春峰,吴红敏,韩晓华,等. 脂多糖诱导的急性肺损伤幼鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构研究(英文)[J]. 国际儿科学杂志, 2007, 34(3):166-168.

[19] Günther A, Siebert C, Schmidt R, Ziegler S, Grimminger F, Yabut M, et al. Surfactant alterations in severe pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and cardiogenic lung edema[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 153(1): 176-184.

[20] Lewis JF, Veldhuizen R, Possmayer F, Sibbald W, Whitsett J, Qanbar R, et al. Altered alveolar surfactant is an early marker of acute lung injury in septic adult sheep[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994, 150(1): 123-130.

(本文编辑:吉耕中)