

西沙必利联合腹膜氧合对油酸致急性肺损伤兔肺组织 CC16 mRNA 表达的影响

朱云生 罗佛全 赵为禄 胡庆宏

【摘要】 目的 评价西沙必利联合腹膜氧合对油酸致急性肺损伤兔肺组织 CC16 mRNA 表达的影响。方法 家兔 24 只,雌雄不拘,体重 2.0~2.5 kg,用油酸诱导急性肺损伤模型成功后,随机分为 4 组($n=6$):急性肺损伤组(A组)、西沙必利组(B组)、腹膜氧合组(C组)和西沙必利联合腹膜氧合组(D组)。急性肺损伤模型制备成功后 4 h 取右下肺叶组织,采用半定量 RT-PCR 法测定 CC16 mRNA 的表达。结果 与 A 组和 B 组比较,C 组和 D 组 CC16 mRNA 表达增加($P<0.01$)。与 C 组比较,D 组 CC16 mRNA 表达增加($P<0.05$)。病理结果显示 D 组肺组织损伤程度最轻。结论 西沙必利联合腹膜氧合可上调油酸致急性肺损伤兔肺组织 CC16 mRNA 的表达,有利于急性肺损伤的治疗。

【关键词】 西沙必利; 体外膜氧合作用; 呼吸窘迫综合征,成人; 蛋白质类; RNA,信使

Effects of cisapride combined with transperitoneal oxygenation of Clara cell protein mRNA expression in the lung in a rabbit model of oleic-induced acute lung injury ZHU Yun-sheng, LUO Fo-quan, ZHAO Wei-lu, et al. Department of Anesthesia, First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of cisapride combined with transperitoneal oxygenation on the Clara cell protein (CC16) mRNA in the lung in a rabbit model of oleic acid induced acute lung injury (ALI). **Methods** Twenty-four adult rabbits of both sexes weighing 2.0-2.5 kg were used in this study. The animals were tracheotomized, intubated and mechanically ventilated with high frequency jet ventilation under ketamine-diazepam anesthesia. After 30 min of stabilization ALI was induced with oleic acid 0.08 ml/kg injected i.v. over 2 min. ALI was considered successfully induced when PaO₂ was reduced to less than 60 mmHg. The animals were randomly divided into 4 groups ($n=6$ each): group A ALI; group B ALI + cisapride; group C ALI + transperitoneal oxygenation and group D ALI + cisapride + transperitoneal oxygenation. In group B and D cisapride 1mg in 1 ml was given via gastric tube at 0 and 60 min after ALI was successfully induced. In group C and D transperitoneal oxygenation was performed with carbonic amide hydrogen peroxide 100 ml. The first 30 ml was infused transperitoneally at 180 ml/h and the rest 70 ml at 84 ml/h. The animals were killed at 4 h after ALI was induced. The lungs were immediately removed for determination of CC16 mRNA expression (by RT-PCR). **Results** CC16 mRNA expression in the lung was significantly higher in group C and D than in group A and B ($P<0.05$). CC16 mRNA expression in group D was significantly higher than that in group C ($P<0.05$). Microscopic examination showed that the lung injury was slightest in group D. **Conclusion** Transperitoneal oxygenation combined with cisapride can increase the CC16 mRNA expression in the lung acutely injured in rabbits and is beneficial for the treatment of ALI.

【Key words】 Cisapride; Extracorporeal membrane oxygenation; Respiratory distress syndrome, adult; Proteins; RNA, messenger

腹膜氧合是治疗急性肺损伤的方法之一。研究表明,用纯氧或氟碳、腺苷酸等携氧介质进行腹膜氧合可以提高(ALI)兔或大鼠的 PaO₂^[1-3]。西沙必利是一种新型胃肠动力药,通过作用于 5-羟色胺受体而

促进全胃肠道的运动^[4],从理论上分析,西沙必利可提高腹膜氧合的氧合效果。但即使两者联合应用可以提高腹膜的氧合效果,其对 ALI 的疗效仍有待进一步研究。Clara 细胞蛋白(CC16)与肺内感染炎症反应有关^[5]。本研究拟评价西沙必利联合腹膜氧合对油酸致 ALI 兔肺组织 CC16 mRNA 表达的影响。

材料与方 法

动物选择和准备 家兔 24 只,雌雄不拘,体重 2.0~2.5 kg,由江西医学院实验动物科部提供。将家兔固定后,建立耳缘静脉通道,静脉输注生理盐水 15 ml/h。耳缘静脉输注氯胺酮 10 mg/kg 与地西洋 5 mg/kg 的混合液麻醉后,将一细鼻胃管(内径约 0.5 cm)自家兔口腔插入胃内,回抽干净胃内容物。在家兔颈前正中作一纵切口,分离出气管行气管切开,以 3.5# 气管导管插入气管内并妥善固定,连接 KR-III 型高频喷射呼吸机行高频喷射通气(HFJV),通气参数设置:呼吸频率 60 次/min,吸呼比 1:2,驱动压 0.03 kPa(1 kPa = 7.5 mm Hg),以压缩空气为气源。将一内径约 0.5 cm 的硅胶腹透管在金属针引导下,自左下腹壁插入低位腹腔作为过氧化氢碳酸酰胺溶液或生理盐水的入口,连接微量输液泵。另一内径约 1 cm 多侧孔硅胶管自右腹壁切口插入高位腹腔,作为多余气体及液体的出口。缝合切口以免漏气、漏液。

模型制备及分组 动物准备完毕后稳定 30 min,参照文献[6]的方法,自耳缘静脉缓慢注入油酸(上海清明化工厂)0.08 ml/kg,2 min 注完,通气条件不变。注入油酸后约 1 h,PaO₂ 下降至 60 mm Hg 左右为兔 ALI 模型制备成功的标准。将气源改为纯氧进行 HFJV,其余条件不变。将 ALI 模型制备成功的家兔随机分为 4 组($n=6$):ALI 组(A 组)、西沙必利组(B 组)、腹膜氧合组(C 组)和西沙必利联合腹膜氧合组(D 组)。各组参照文献[7]的方法进行腹膜腔灌注方法,先以 180 ml/h 的速率灌注 30 ml,继以 84 ml/h 的速率灌注 70 ml;西沙必利的灌注方法和剂量参照文献[3]的方法。A 组腹腔灌注生理盐水 100 ml,鼻胃管分别于 ALI 模型出现后即刻、60 min 时各灌注生理盐水 1 ml。B 组腹腔灌注生理盐水 100 ml,鼻胃管分别于 ALI 模型出现后即刻、60 min 时各灌注 1 mg/ml 西沙必利混悬液(100 ml:100 mg,西安杨森制药有限公司)1 ml。C 组腹腔灌注 0.5% 过氧化氢碳酸酰胺(经检测效价:每克过氧化氢碳酸酰胺含过氧化氢 0.3 g,江西中医药研究所)溶液 100 ml(以生理盐水溶解),鼻胃管灌注同 A 组。D 组腹腔灌注同 C 组,鼻胃管灌注同 B 组。

肺组织标本的采集 于 ALI 模型制备成功后 4 h 无菌开胸,观察肺脏的大体形态,然后用高压蒸汽消毒灭菌,并用 RNA 酶处理过的镊子和剪刀小心剪取右下肺组织,用于病理及 CC16 mRNA 表达水平

的检测。

肺组织总 RNA 的提取 称取肺组织约 100 mg,严格按照总 RNA 提取试剂盒(洛阳华美生物工程公司)说明书提取总 RNA,将提取的总 RNA 充分干燥后每管加入 20 μ l DEPC 水溶解,储存于 -35℃ 冰箱内备用。

肺组织中 CC16 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) 提取总 RNA 4 μ l,严格按照 RT-PCR 试剂盒(Promega 公司,美国)说明书加样操作,CC16 引物(上海捷倍思基因技术有限公司):上游 5'-CTTCCATTCTGCCACCA-3',下游 5'-TGGAAATCTTCG GCTTCTC-3',扩增产物为 340 bp。内参照引物 β -actin:上游 5'-CCATCCTGCGTCTGGACCTG-3',下游 5'-CTCATCGTACTCCTGCTTGC-3',扩增产物为 572 bp,反应总体积为 50 μ l,反应条件:37℃ 60 min 逆转录,94℃ 2 min 变性,按下列条件进行循环:94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 90 s,共 30 个循环。取 10 μ l PCR 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,0.1% 溴化乙锭染色,用凝胶成像系统分析,CC16 积分光密度值与内参照积分光密度值的比值反映 CC16 mRNA 表达水平。

病理学观察 将肺组织固定于 10% 甲醛溶液中行 HE 染色后,光镜下观察病理学。

统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

CC16 mRNA 的表达 A 组为 1.078 ± 0.023 ,B 组为 1.192 ± 0.015 ,C 组为 1.742 ± 0.015 ,D 组为 1.788 ± 0.029 。与 A 组比较,B 组 CC16 mRNA 表达差异无统计学意义($P > 0.05$);与 A 组和 B 组比较,C 组和 D 组 CC16 mRNA 表达增加($P < 0.01$);与 C 组比较,D 组 CC16 mRNA 表达增加($P < 0.05$)。

病理学结果 光镜下 A 组、B 组可见肺泡出血、水肿显著,部分肺泡隔断裂及灶性坏死,有含铁血黄素沉着,肺泡腔内见大量淡伊红染水肿液,间质内有大量中性粒细胞,淋巴细胞、浆细胞浸润;C 组可见肺泡有轻度或中度水肿,偶见部分肺泡隔断裂,可见小血管扩张充血,间质内可见少量出血,伴少量或中等的炎性细胞浸润;D 组可见肺泡仅有轻度水肿,伴少量炎性细胞浸润。

讨 论

在肺外途径治疗急性肺损伤的研究中,腹膜氧

合是研究热点之一。其理论基础是因为人体腹膜的表面积相当大(1~2 m²),几乎与整个机体的皮肤面积相等,同时它具有很高的通透性,血液供应充分等特性^[8]。研究表明,过氧化氢碳酸酰胺经腹膜氧合能有效提高急性肺损伤家兔模型的 PaO₂^[9]。本实验在此基础上,引进一种能促进腹膜血液灌注和加速腹膜血液流动速率的药物-西沙必利。因为西沙必利的药理作用是促进胃肠排空,经胃肠道灌注后可以促进腹膜的血液循环^[3],而循环功能的好坏是输送氧的关键,从而西沙必利可提高腹膜氧合的氧合效果。

刘书盈等^[6]的研究表明,油酸致急性肺损伤兔模型制备成功后 1 h 各项指标基本稳定。Barr 等^[3]的研究表明,于给药后 1 h 左右观察西沙必利的疗效最佳。故本研究选择 ALI 模型制备成功后 4 h 无菌开胸,观察肺脏的大体形态。

Clara 细胞是一种无纤毛上皮细胞,主要分布于终末细支气管和呼吸性细支气管上皮。CC16 是由 Clara 细胞合成分泌的,具有抗炎、抗纤维化的生物学特性,参与肺部炎症反应的一系列生理及病理过程^[10]。在经气管注射脂多糖制备急性肺部感染模型中,发现肺内炎性细胞,血浆蛋白渗出增多,肺支气管肺泡灌洗液与肺匀浆中 CC16 含量下降,提示 CC16 与肺炎发病初期有关^[11]。Kevin 等^[12]通过小鼠病毒感染模型研究表明,CC16 使源于肺巨噬细胞的促炎因子基因表达减少,这些细胞因子主要有 IL-1 β 、TNF- α 、IFN- γ 及巨噬细胞炎性蛋白,说明 CC16 在转录水平抑制炎症反应。而肺部炎症反应是导致 ALI 的关键因素^[13]。

本研究结果表明,C 组和 D 组 CC16 mRNA 的表达明显高于 A 组和 B 组,这提示腹膜氧合通过促进急性肺损伤兔肺组织中 CC16 mRNA 表达,提高抗炎因子 CC16 水平,从而使抗炎/促炎平衡,这可能是其改善急性肺损伤的重要机制之一。由于 D 组中 CC16 mRNA 表达高于 C 组,病理结果表明 D 组急性肺损伤程度较其它各组有显著改善,可提示西沙必

利联合腹膜氧合对急性肺损伤有更好的治疗作用。

综上所述,西沙必利联合腹膜氧合可上调油酸致急性肺损伤兔肺组织 CC16 mRNA 的表达,有利于急性肺损伤的治疗。

参 考 文 献

- 1 Klein J, Faithful NS, Salt PJ, et al. Transperitoneal oxygenation with fluorocarbons. *Anesth Analg*, 1986,65:734-738.
- 2 Wu X, Kentner R, Stezoski J, et al. Intraperitoneal, but not enteric, adenosine administration improves survival after volume-controlled hemorrhagic shock in rats. *Crit Care Med*, 2001,29:1767-1773.
- 3 Barr J, Lushkov G, Gurevitch S, et al. Peritoneal ventilation in rabbits: augmentation of gas exchange with cisapride. *Thorax*, 1996,51: 82-86.
- 4 常玲,赵新平,张瑜. 西沙必利的药理及临床应用. *临沂医学专学报*, 1995,17:247-248.
- 5 Hayashida S, Harrod KS, Whitsett JA. Regulation and function of CCSP during pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2000,279:L452-L459.
- 6 刘书盈,刘又宁,张健鹏. 家兔急性肺损伤油酸模型的制备. *前卫医药杂志*, 2000,17:339-340.
- 7 Dierynck I, Bernard A, Roels H, et al. Potent inhibition of both human interferon-gamma production and biologic activity by the clara cell protein CC16. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1995,12:205-210.
- 8 Barr J, Livne A, Lushkov G, et al. Peritoneal ventilation; an animal model of extrapulmonary ventilation in experimental adult respiratory distress syndrome. *Pediatr Res*, 1994,35:682-684.
- 9 刘芬,赵为禄,钱克俭,等. 过氧化氢碳酸酰胺腹腔氧合对急性肺损伤的治疗作用. *江西医药*, 2002,37:414-416.
- 10 章晓红. Clara 细胞蛋白与肺部疾病. *国外医学呼吸系统分册*, 2002,22:49-51.
- 11 Arsalane K, Broeckart F, Knoops B, et al. Clara cell specific protein (CC16) expression after acute lung inflammation induced by intratracheal lipopolysaccharide administration. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000,161:1624-30.
- 12 Kevin A, Harrod KS, Mounday AD, et al. Clara cell secretory protein decrease lung inflammation after acute virus infection. *Am J Physiol*, 1998,275: L924-L930.
- 13 姚媛媛,王焱林,王成天. 异丙酚对内毒素诱导大鼠急性肺损伤的保护作用. *中华麻醉学杂志*, 2004,24:373-376.

(收稿日期:2006-08-14)

(本文编辑:王娟)