

• 基础研究 •

脓毒症大鼠肺损伤时肺组织巨噬细胞移动抑制因子变化及丙酮酸乙酯的干预作用

马艳梅 梅冰 詹剑勇 沈美华 何建 霍正禄

【摘要】 目的 观察脓毒症大鼠肺损伤时肺组织巨噬细胞移动抑制因子(MIF)mRNA的变化及丙酮酸乙酯(EP)的干预作用。方法 雄性 Wistar 大鼠,以盲肠结扎穿孔法建立脓毒症大鼠模型。80只大鼠随机分为假手术组、脓毒症组、EP早期治疗组(建模后6h给药)和EP晚期治疗组(建模后12h给药)。各组分别于模型建立后24h和48h检测肺组织 MIF mRNA、髓过氧化物酶(MPO)的活性、肺湿重/干重(W/D)比以及肺组织的病理变化。结果 24h、48h 脓毒症组、EP6h组和EP12h组 MIF mRNA、MPO活性、肺 W/D比值以及肺组织的病理学评分均较假手术组显著升高;EP6h组和EP12h组肺组织 MIF mRNA水平、MPO活性、肺 W/D比值以及肺组织的病理学评分均较同时相点脓毒症组显著降低;脓毒症组24h肺组织 MIF mRNA的水平与 MPO、W/D比值以及肺组织病理学评分的变化之间呈显著正相关。结论 脓毒症大鼠肺损伤时肺组织 MIF mRNA的表达显著升高,EP对脓毒症肺损伤有保护作用,其机制可能与其抑制 MIF的表达有关。

【关键词】 大鼠;丙酮酸乙酯;脓毒症;急性肺损伤;巨噬细胞游走抑制因子

Change of macrophage migration inhibitory factor mRNA expression and effects of ethyl pyruvate on the lung injury of rats induced by sepsis

Ma Yanmei, Mei Bing, Zhan Jianyong, et al

Emergency Department of Changhai Hospital, Shanghai 200433, China

【Abstract】 Objective To observe the expression of macrophage migration inhibitory factor (MIF) mRNA and the effects of ethyl pyruvate(EP) on the lung injury in sepsis rat. Methods In a sepsis model by cecal ligation and puncture, eighty Wistar male rats were randomly divided into sham operation group, sepsis group, EP 6h treatment group(received EP intraperitoneally 6h after CLP) and EP 12h treatment group(received EP intraperitoneally 12h after CLP). Animals were sacrificed at 24 and 48 h after operation. The lung tissue samples were collected to determine the expression of MIF mRNA (by real-time PCR), pulmonary myeloperoxidase (MPO) activity and wet/dry lung weight ration. The pathological changes in lung tissues were observed with light microscopy after HE staining. Results Compared with sham operation group, the expression of MIF mRNA, the activity of MPO, the ratio of wet/dry lung weight and the pathological scores of lung injury were markedly elevated in sepsis group and EP treatment group at 24h and 48h after operation. The previous results compared with sepsis group, the expression of MIF mRNA, the activity of MPO, the ratio of wet/dry lung weight and the pathological scores of lung injury were markedly decreased in EP treatment group. The expression of MIF mRNA was correlated with the changes in the activity of MPO, the ratio of wet/dry lung weight and the pathological scores of lung injury in the sepsis group at 24h after operation. There were no statistic difference between early EP treatment group and late EP treatment group. Conclusion The expression of MIF mRNA obviously increases on the lung injury induced by sepsis. EP could inhibit the expression of MIF mRNA to exert the protective effects on the lungs against acute injury induced by sepsis.

【Key words】 rats; ethyl pyruvate; sepsis; acute lung injury; macrophage migration-inhibitory factor

收稿日期:2009-02-03

作者单位:200433 上海市,第二军医大学长海医院急诊科

作者简介:马艳梅,女,1972年11月生,吉林省敦化市人,在读博士研究生,主治医师,讲师。E-mail:yanmei.ma@gmail.com

通讯作者:梅冰, E-mail:meibing@public4.sta.net.cn

近年来研究发现,巨噬细胞移动抑制因子(macrophage migration inhibitory factor, MIF)在脓毒症和炎症反应中扮演中心地位的角色^[1,2]。脓毒症患者中可以检测到高水平的MIF^[2];将MIF和细菌或细菌毒素一起注入小鼠体内,可致包括急性肺损伤(acute lung injury, ALI)在内的多器官功能不全综合征发生,使小鼠的死亡率明显增加^[3]。笔者认为,MIF过度表达可能是导致脓毒症患者ALI乃至多器官功能不全综合征发生、促进其死亡的一个危险因素。丙酮酸乙酯(ethyl pyruvate, EP)是一种稳定的丙酮酸衍生物,近期研究表明它具有抗炎和免疫调节效应^[4]。本研究采用大鼠盲肠结扎穿孔致脓毒症肺损伤模型,观察脓毒症ALI时肺组织MIF mRNA的变化,并探索EP对肺组织MIF表达水平的影响,探讨EP对脓毒症肺损伤的保护作用及其机制,为临床治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备 健康雄性清洁级Wistar大鼠(第二军医大学实验动物中心提供),体重200~250g。大鼠禁食12h。脓毒症模型采用盲肠结扎穿孔方法,腹腔注射2%戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉后固定,沿腹正中线做1.5cm的切口,然后在盲肠根部结扎盲肠,用18号针穿通2次,形成盲肠漏,再将盲肠还纳腹腔,逐层缝合腹壁切口。

1.2 实验分组及方法 大鼠随机分为4组:假手术组($n=20$):除不作盲肠结扎穿孔术外,其余操作同脓毒症组;脓毒症损伤组($n=20$):行盲肠结扎穿孔术,术后即刻及术后6,12,18,24,36h腹腔内注射乳酸林格液3 ml/kg;EP早期治疗组($n=20$):盲肠结扎穿孔术后6,12,18,24,36h腹腔内注射EP为40 mg/kg(3 ml/kg);EP晚期治疗组($n=20$):于盲肠结扎穿孔术后12,18,24,36h腹腔内注射EP 40 mg/kg(3 ml/kg)。各组分别于模型建立后24h和48h留取肺组织。

1.3 肺组织MIF mRNA的测定 采用实时RT-PCR方法检测肺组织MIF mRNA。根据GenBank公布的基因序列,合成MIF引物片段,引物序列为:上游引物5'-CTATGCCTATGTTTCATCGTG 3';下游引物5'-CAGCAGCTTGCTGTAGTTGC 3';产物长241bp。 β -肌动蛋白作内参,其引物序列为上游引物5'-AGCCATGTAAGCCATCC 3';下游引物5'-CTCTCAGTGGTGGTGAA 3'。所有操作步骤严格按照SYBR PrimeScript RT-PCR试剂盒的要求

进行。取约50mg肺组织,按Trizol一步法提取RNA,按试剂盒的操作要求逆转录cDNA。定量PCR反应及数据处理均在Rotor gene 6000 PCR仪及其相联的计算机上进行。

1.4 肺组织髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)及肺湿/干重比值(W/D)测定 采用分光光度法测定MPO活性;采用真空加热干燥法测定肺W/D比值。

1.5 肺组织病理形态观察 取各试验组24h右肺中叶部分肺组织,10%甲醛固定,常规石蜡包埋,切片,HE染色后行组织学检查。肺组织评分参照文献^[5]。

1.6 统计学处理 数据统计采用SPSS12.0统计软件,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析和 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织MIF mRNA的变化及丙酮酸乙酯的干预作用 如表1所示,24h、48h脓毒症组、EP6h组和EP12h组MIF mRNA均较假手术组显著升高;EP6h组和EP12h组MIF mRNA均较同时相点脓毒症组显著降低;各时相点EP6h组和EP12h组之间MIF mRNA无显著性差异($P > 0.05$)。

表1 肺组织MIF mRNA的变化及丙酮酸乙酯的干预作用($n=20$)

组别	24h	48h
假手术组	1.3 $\pm$ 0.23	1.5 $\pm$ 0.27
脓毒症组	11.4 $\pm$ 2.38*	10.1 $\pm$ 2.03*
EP6h组	7.3 $\pm$ 1.57**	6.9 $\pm$ 1.41**
EP12h组	8.1 $\pm$ 1.64**	7.5 $\pm$ 1.55**

注:vs 假手术组,* $P < 0.01$; vs 脓毒症组,** $P < 0.01$

2.2 大鼠肺组织MPO活性、肺W/D比值的变化及丙酮酸乙酯的干预作用 24h、48h脓毒症组、EP6h组和EP12h组肺组织MPO活性、肺W/D比值均较假手术组显著增高,EP6h组和EP12h组肺组织MPO活性、肺W/D比值均较同时相点脓毒症组显著降低;但EP6h组和EP12h组之间无统计学差异($P > 0.05$;表2)。

2.3 肺组织病理学变化 光镜下,假手术组肺组织结构完整,肺泡间隔无水肿,肺泡腔清晰;脓毒症组肺泡间隔增宽,部分肺泡内渗出、水肿、出血,肺间质见大量炎症细胞浸润;EP治疗组较脓毒症肺损伤组明显减轻(图1~4)。与假手术组相比,脓毒症组、EP治疗组的病理学评分增加;EP治疗组与脓毒症损伤组相比病理学评分降低(表2)。

表 2 肺组织 MPO、W/D 比值、病理学评分的变化及丙酮酸乙酯的干预作用(n=20)

组别	MPO		W/D		病理学评分	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
假手术组	3.12±0.56	3.14±0.57	3.51±0.71	3.55±0.72	0.19±0.11	0.21±0.12
脓毒症组	6.76±1.35*	7.01±1.43*	7.28±1.71*	7.53±1.79*	2.58±0.72*	3.03±0.86*
EP6h 组	4.65±0.97*#	4.42±0.89*#	5.05±1.16*#	5.14±1.19*#	1.71±0.44*#	2.09±0.54*#
EP12h 组	4.99±1.04*#	4.64±0.98*#	5.19±1.24*#	5.42±1.31*#	1.83±0.49*#	2.22±0.60*#

注：与假手术组比较，*P<0.01；与脓毒症组比较，#P<0.01

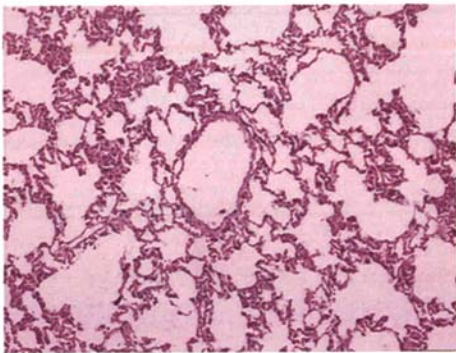


图 1 假手术组 24h 肺组织(HE,×200)

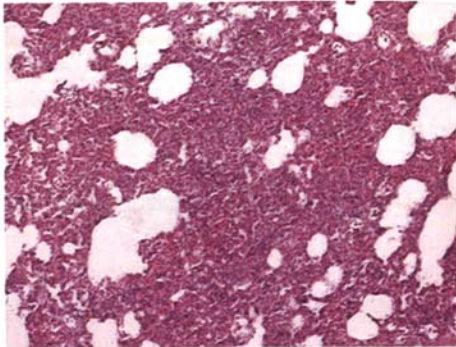


图 2 脓毒症组 24h 肺组织(HE,×200)

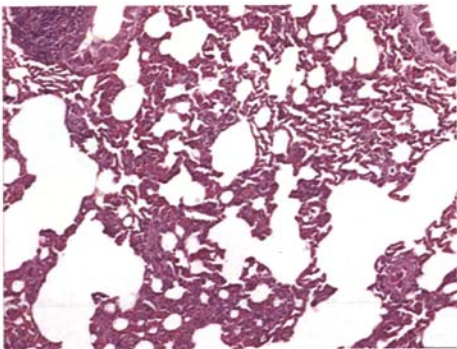


图 3 EP6h 组 24h 肺组织(HE,×200)

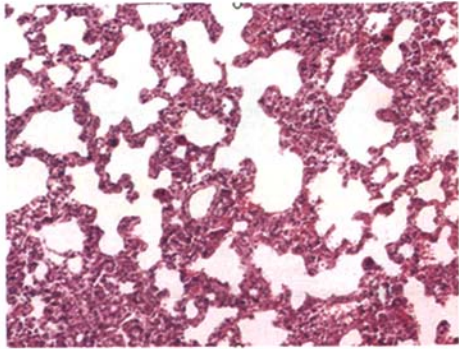


图 4 EP12h 组 24h 肺组织(HE,×200)

2.4 肺组织 MIF mRNA 与 MPO、W/D 比值以及肺组织病理学评分相关性分析 对脓毒症组 24h 肺组织 MIF mRNA 与 MPO、W/D 比值及肺组织病理学评分相关性进行分析发现,肺组织 MIF mRNA 与 MPO、W/D 比值以及肺组织病理学评分之间存在显著相关性,直线相关与回归方程分别为: $Y=2.18+1.66X,r=0.816,P<0.01$; $Y=0.41+1.47X,r=0.824,P<0.01$; $Y=-0.95+2.23X,r=0.831,P<0.01$ 。48h 肺组织 MIF mRNA 与 MPO、W/D 比值以及肺组织病理学评分的直线相关与回归方程分别为: $Y=3.07+1.64X,r=0.799,P<0.01$; $Y=1.70+1.45X,r=0.794,P<0.01$; $Y=-0.44+1.91X,r=0.764,P<0.01$ 。

3 讨论

脓毒症是危重患者常见并发症,在临床危重病患者的死亡原因中占有重要地位。在脓毒症并发的多器官损伤中,肺脏是最易受损伤的靶器官,ALI 出现最早,发生率也最高。MIF 来源于机体内许多种类的细胞,包括 B 淋巴细胞、巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞、成纤维细胞、树突状细胞以及垂体细胞等^[6~8]。近年来研究发现,MIF 不仅可促进炎症细胞因子的表达^[9],并可抵抗糖皮质激素的抗炎作用^[10],在各种炎症性疾病尤其是脓毒症中起重要作用。MIF 可以促使细胞膜表面钟样受体 4(Toll-like receptor-4, TLR4)表达上调,从而促进机体对内毒素的免疫反应^[11]。在小鼠盲肠结扎穿孔模型

中,采用抗 MIF 抗体中和 MIF 可大大降低包括 ALI 在内的多器官功能不全综合征的发生,降低小鼠的死亡率,并在对敲除 TNF- α 基因的小鼠研究中也得到同样结果,提示 MIF 对脓毒症的预后起着重要的作用^[3]。在临床研究中,由脓毒症导致的 ALI 患者中,MIF 在基因表达和蛋白含量检测方面均明显高于正常对照组^[12]。由此可见,MIF 在脓毒症肺损伤的发生、发展中可能起着重要作用。

本研究显示,脓毒症大鼠肺损伤时肺组织 MIF mRNA 均较同时相点假手术组显著升高,通过分析发现,肺组织 MIF mRNA 与 MPO、W/D 比值以及肺组织病理学评分的变化之间存在显著的正相关,上述结果提示 MIF 参与了脓毒症肺损伤的发生、发展过程,并且与动物的病情轻重相关。

EP 是一种稳定的亲脂性的丙酮酸衍生物,是有效的氧自由基清除剂,在医学领域的应用很广泛。近期研究提示,EP 是一种有效的抗炎药物,可以抑制多种炎症因子的表达^[13~16]。以往的研究发现,EP 通过抑制肺组织 TNF- α 等的表达,对脓毒症肺损伤产生一定的保护作用^[17]。但 EP 对脓毒症肺组织 MIF 的影响尚未见相关报道。

本研究显示,EP6h 组和 EP12h 组 MIF mRNA 均较同时相点脓毒症组显著降低,同时,EP6h 组和 EP12h 组肺组织 MPO 活性、肺 W/D 比值以及肺组织的病理学评分均较同时相点脓毒症组显著降低,且肺组织 MIF mRNA 与肺组织 MPO、W/D 比值以及肺组织病理学评分的变化之间存在显著的正相关,本实验结果提示,EP 对脓毒症大鼠的肺损伤具有保护作用,其作用机制可能是通过抑制 MIF 的表达来实现的。本实验还发现,EP6h 组和 EP12h 组 MIF mRNA、MPO、W/D 比值以及肺组织病理学评分的变化之间无统计学差异,EP6h 组和 EP12h 组肺组织病理切片显示无明显差异。提示 EP 在脓毒症发病后有较长的“治疗窗”,显示其具有良好的应用前景。

本研究结果显示,EP 对脓毒症肺损伤具有一定的保护作用,其机制可能与其抑制 MIF mRNA 的表达有关,且 EP 在脓毒症发病后有较长“治疗窗”,这为将来 ALI 的治疗带来一个新的思路。但是,鉴于目前所有的治疗经验都来自动物实验,故对 EP 的临床抗炎作用机制和安全性等问题尚需进一步研究。

参考文献

[1] Berhagen J, Calandra T, Mitchell RA. MIF is a pitu-

itary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxemia. *Nature*, 1993, 365:756-759.

- [2] Froidevaux C, Roger T, Martin C, et al. Macrophage migration inhibitory factor and innate immune responses to bacterial infections. *Crit Care Med*, 2001, 29: S1-S13.
- [3] Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, et al. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med*, 2000, 6: 164-170.
- [4] Fink MP. Ethyl pyruvate. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2008, 21: 160-167.
- [5] Hofbaue RB, Saluja AK, Bhatia M, et al. Effect of recombinant platelet-activating factor acetylhydrolase on two models of experiment acute pancreatitis. *Gastroenterology*, 1998, 115: 1238-1247.
- [6] Maaser C, Eckmann L, Paesold G, et al. Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium. *Gastroenterology*, 2002, 122:667-680.
- [7] Sakamoto W, Fujie K, Isomura S, et al. Secretion of macrophage migration inhibitory factor differs from interleukin-6 in hydrogen peroxide- and LPS-stimulated human fibroblasts. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2: 1123-1131.
- [8] Murakami H, Akbar SM, Matsui H, et al. Macrophage migration inhibitory factor activates antigen-presenting dendritic cells and induces inflammatory cytokines in ulcerative colitis. *Clin Exp Immunol*, 2002, 128:504-510.
- [9] Bozza M, Satoskar AR, Lin G, et al. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med*, 1999, 189: 341-346.
- [10] Daun JM, Cannon JG. Macrophage migration inhibitory factor antagonizes hydrocortisone-induced increases in cytosolic I κ B α . *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000, 279: R1043- R1049.
- [11] Roger T, David J, Glauser MP, et al. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature*, 2001, 414: 920-924.
- [12] Cao L, Flores C, Fan-ma S. Macrophage migration inhibitory factor in acute lung injury: expression biomarker and association. *Transl Res*, 2007, 150: 18-29.
- [13] Venkataraman R, Kellum JA, Song M, et al. Resuscitation with Ringer's ethyl pyruvate solution prolongs survival and modulates plasma cytokine and nitrite/nitrate concentrations in a rat model of lipopolysac-

- charide-induced shock. Shock, 2002, 18;507-512.
- [14] Ullo L, Ochain M, Yang H, et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99;12351-12356.
- [15] Van Zoelen MA, Bakhtiari K, Dessing MC, et al. Ethyl pyruvate exerts combined anti-inflammatory and anticoagulant effects on human monocytic cells. Thromb Haemost, 2006, 96;789-793.
- [16] Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, et al. Anti-high-mobility group box chromosomal protein 1 antibodies improve survival of rats with sepsis. World J Surg, 2006, 30;1755-1762.
- [17] Van Zoelen MA, De Vos AF, Larosa GJ, et al. Intrapulmonary delivery of ethyl pyruvate attenuates lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced lung inflammation *in vivo*. Shock, 2007, 28;570-575.

(上接第157页)

隔缺损封堵术、微创经胸房间隔缺损封堵术、体外循环下房间隔缺损修补术,三种术式各有优缺点,适用于不同的适应症^[4~7]。对于中央型房间隔缺损,直径 $<3.6\text{cm}$,且无其他心脏合并畸形患者,首选介入伞堵或者经胸微创伞堵,创伤小,恢复快。对于介入封堵和微创经胸封堵两种术式的优缺点,目前尚缺乏大组病例对照比较。笔者体会,介入伞堵无需全麻气管插管,创伤更小,恢复更快。对于孔径较小、边缘明确的中央型房间隔缺损,适于选择介入伞堵。而房间隔缺损直径 $>3.0\text{cm}$ 以上,或者边缘较软或短小的患者,介入伞堵成功率相对较小,建议经胸微创伞堵,一旦封堵失败,可以延长切口,建立体外循环,行房间隔缺损修补术。对于合并其他心脏病变,需要同期手术治疗患者,或者房间隔缺损孔径过大,边缘短小,以及上腔静脉型、下腔静脉型,不适于伞堵患者,则需要行体外循环下,修补房间隔缺损,同期矫治心脏合并病变。

老年房间隔缺损手术后往往合并各种房性心律失常,体外手术患者心律失常发生率更高,需要常规缝置心外膜临时起搏导线备用。术后根据具体情况应用抗心律失常药物。老年患者存在合并冠心病的可能,术前需要常规行冠状动脉造影检查,主要冠状动脉Ⅲ级以上狭窄(管径狭窄 $>50\%$ 或管腔面积狭窄 $>75\%$)的患者,需要同时行经皮冠状动脉介入治疗或冠状动脉搭桥手术,避免围术期心肌梗死。老年房间隔缺损患者多合并不同程度的肺动脉高压。从本组临床数据可以看出,除个别患者出现艾森曼格综合征失去手术时机外,多数患者可以通过手术明显降低肺动脉压,改善症状。经严格选择手术适应证和手术方式,围术期合理应用血管活性药物,体外循环下修补房间隔缺损术后可适当延长术后呼吸机辅助时间,严格掌握拔除气管插管指征,尽量保证一次成功拔除气管插管,避免二次插管,可以有效避

免术后肺动脉高压危象,减少术后肺部并发症,降低手术死亡率。

4 结 论

老年房间隔缺损如无其他禁忌证,均应手术治疗,高龄本身并非手术禁忌。合理选择手术方式、适当的围术期处理、避免各种手术并发症是手术成功的关键。

参 考 文 献

- [1] Webb G, Gatzoulis MA. Atrial septal defects in the adult: recent progress and overview. Circulation, 2006, 114;1645-1653.
- [2] Schon E, Tracz W, Podolec P, et al. Atrial septal defect in adults: the influence of age and haemodynamic parameters on the results of surgical repair. Kardiologia Pol, 2006, 64; 470-478.
- [3] Slavin L, Tobis JM, Rangarajan K, et al. Five year experience with percutaneous closure of patent foramen ovale. Am J Cardiol, 2007, 99;1316-1320.
- [4] Swan L, Varma C, Yip J, et al. Transcatheter device closure of atrial septal defects in the elderly: technical considerations and short-term outcomes. Int J Cardiol, 2006, 107;207-210.
- [5] 李寰,张玉顺,吴栋梁,等. Amplatzer 房间隔封堵器治疗 200 例的并发症. 心脏杂志, 2003, 15;549-551.
- [6] 康云帆,俞世强,蔡振杰,等. 微创非体外循环房间隔缺损封堵术的临床应用. 第四军医大学学报, 2003, 24; 封 2.
- [7] Hoerer J, Miller S, Schreiber C, et al. Surgical closure of atrial septal defect in patients older than 30 years; risk factors for late death from arrhythmia or heart failure. Thorac Cardiovasc Surg, 2007, 55; 79-83.