

· 短篇论著 ·

辛伐他汀对脂多糖诱导肺损伤大鼠的肺血管通透性的影响

郑伟浩 赵英萍 莫红缨 肖正伦

【摘要】 目的 探讨辛伐他汀能否降低脂多糖(LPS)诱导急性肺损伤大鼠的肺血管通透性。
方法 30只SD大鼠随机分为对照组、LPS组和辛伐他汀治疗组,治疗组又分1 h、3 d和7 d三组,每组6只;治疗组大鼠在实验前经胃管分别给予辛伐他汀20 mg/kg(4 ml/kg)治疗1 d、3 d和7 d,每天1次;对照组和LPS组则给予蒸馏水(4 ml/kg)管饲7 d。在最后一次给药1 h后,LPS组和治疗组大鼠从尾静脉注射LPS 5 mg/kg(2.5 ml/kg),对照组则予注射无菌生理盐水(2.5 ml/kg)。观察6 h后,处死大鼠,取样。计算肺湿/干重比值、肺水含量,比色法测定肺泡灌洗液(BALF)蛋白含量、肺匀浆伊文思蓝(EB)含量和髓过氧化物酶(MPO)活性,ELISA法测定血清IL-6和TNF- α 水平,以及行肺组织病理学检测。
结果 治疗组的肺湿/干重比值、肺水含量显著降低($P < 0.001$),BALF蛋白、肺匀浆EB亦低于LPS组(1 h组 $P > 0.05$,3 d组 $P < 0.05$,7 d组 $P < 0.001$),具有时间-效应依赖性;治疗组肺匀浆MPO活力和血清IL-6和TNF- α 水平均显著下降($P < 0.001$);肺组织病理学亦显示治疗组的肺损伤程度轻于LPS组。
结论 辛伐他汀可以降低脂多糖诱导肺损伤大鼠的肺血管通透性,减轻内毒素性肺损伤。

【关键词】 肺疾病; 脂多糖类; 斯伐他汀; 毛细血管通透性

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是由各种直接或间接的因素导致肺泡弥散性损伤,破坏肺泡毛细血管的结构和内皮细胞屏障功能,导致血管通透性增加,使肺泡腔内充满富含蛋白质的水肿液,从而形成了ALI/ARDS最具有特征性的病理改变。其中,血管内皮细胞的损伤和血管通透性的增加在炎症的发生、发展过程中起着极其关键的作用^[1]。如何调节或减轻这一炎症的发生发展过程,减轻炎症性肺损伤,已成为治疗ALI/ARDS及改善其预后的重要方面^[1,2]。研究表明他汀类药物对血管内皮细胞屏障功能具有保护作用^[3,4],可以减轻缺血再灌注肺损伤^[5],可以延长脓毒症小鼠的存活时间,降低病死率^[6]。而对于内毒素导致的以肺血管内皮细胞弥漫性损伤为特征的ALI/ARDS,他汀类药物是否具有保护肺血管内皮细胞作用,是否可以减轻肺损伤,这是本实验将探讨的问题。本实验将探讨在脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导急性肺损伤的大鼠模型中,用辛伐他汀对大鼠进行预处理,观察其能否降低肺血管通透性,减轻肺损伤的严重程度。

一、材料与方法

1. 主要试剂:内毒素(美国Sigma公司),辛伐他汀(舒降之,杭州默沙东制药有限公司),IL-6和TNF- α ELISA试剂盒(北京晶美生物试剂有限公司)。

2. 动物和实验分组:成年雄性SD大鼠30只,SPF级,体重(200 \pm 20)g,适应性饲养1周,随机分为对照组(NS组)、LPS组和辛伐他汀治疗组;其中,治疗组分为1 h、3 d和7 d三组,每组6只。治疗组大鼠在实验前经胃管给予辛伐他汀悬液20 mg/kg(4 ml/kg)治疗1 d、3 d和7 d,每天1次;对照组和LPS组则给予蒸馏水(4 ml/kg),每天1次,连续7 d。在最后一次给药1 h后,LPS组和治疗组大鼠从尾静脉注射LPS 5 mg/kg(2.5 ml/kg),对照组则予注射无菌生理盐水(2.5 ml/kg)。观察6 h后,处死大鼠,取样。

3. 标本采集:(1)取血清样本:处死动物时,经腹正中切口打开腹腔,从腹主动脉抽取血3 ml,室温下放置2 h,在4 $^{\circ}$ C低温离心3000 r/min,15 min,取上清液测炎症介质。(2)支气管肺泡灌洗:打开胸腔,分离气管及左右主支气管,用自制气管插管插入左主支气管,两端结扎固定,用冷PBS(10 ml/kg)行左肺灌洗3次,将收集的灌洗液在4 $^{\circ}$ C低温离心,1000 r/min,5 min,取上清液测蛋白含量。(3)肺组织:取右下肺用于测定肺的湿/干重比值(Wet/Dry, W/D),右中叶行病理学检测,剩余右肺制成5%肺匀浆检测髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)的活力。(4)伊文思蓝(Evans blue, EB)测定肺血管通透性:另取一组动物30只,按同样方法分组、建模,在处死前30 min,经尾静脉注射EB 20 mg/kg。处死动物,打开胸,用自制穿刺针,经右心室穿刺进入肺动脉,用止血钳钳夹心脏固定穿刺针,剪去左心耳,用10 ml生理盐水,以约20 cm H₂O压力冲洗肺循环,定位取左肺及右肺中叶各约100 mg,按每100 mg肺组织加1 ml的甲酰胺溶液,加入研磨器,进行手工匀浆,匀浆液放入60 $^{\circ}$ C恒温箱温育18 h,取出后离心5000 r/min,30 min,取上清液测定EB浓度。

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.21.047

作者单位:529030 广东省,江门市中心医院重症医学科(郑伟浩、赵英萍);广州医学院广州呼吸疾病研究所(莫红缨、肖正伦)

通讯作者:郑伟浩,Email:zhengweihao999@yahoo.com.cn

4. 检测指标及方法:(1)肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)蛋白含量的测定:应用BCA法,采用上海申能博彩生物科技有限公司的BCA-100蛋白质定量测定试剂盒K300,严格按说明书步骤进行测定。(2)肺组织W/D及肺水含量的测定:取右下肺叶,用滤纸吸干表面血迹及水分后,立即称湿重(W),然后置于80℃烘箱,烘干48h恒重后称干重(D),计算W/D,肺水含量(%)=(W-D)/W×100%。(3)肺组织EB浓度的测定:采用比色法测定肺组织EB浓度。(4)肺匀浆MPO活力的测定:采用南京建成的髓过氧化物酶试剂盒,严格按说明书步骤进行测定。(5)血清炎症介质测定:采用ELISA测定血清IL-6、TNF-α浓度。(6)病理学检查:取右肺中叶置于10%中性福尔马林中固定,经石蜡包埋、切片、HE染色,行光学显微镜观察。

5. 统计学处理:采用SPSS 12.0进行数据处理,所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析判断组间差异,采用Pearson相关分析判断两变量间的相关性(2-tailed), $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

二、结果

1. 辛伐他汀对W/D、肺水含量和BALF蛋白含量的影响:(1)W/D、肺水含量的结果显示(表1):LPS组W/D、肺水含量均明显高于NS组($P < 0.001$),辛伐他汀显著降低W/D和肺水含量($P < 0.001$),其中3d组和7d组的W/D和肺水含量与NS组无统计学差异($P > 0.05$);采用Pearson相关分析表明两者均与辛伐他汀预处理的时间相关,前者 $r = -0.648$,后者 $r = -0.683$, $P < 0.001$ 。另外,本研究还同时进行了辛伐他汀10mg/kg和40mg/kg两个剂量的实验,结果发现辛伐他汀对W/D和肺水含量的影响与剂量并无明显相关性。

(2)BALF蛋白检测结果显示(表1):各组动物的肺泡灌洗液的回收率均>85%,LPS组BALF蛋白含量是NS组的5倍($P < 0.001$),治疗组均低于LPS组(3d组 $P < 0.05$,7d组 $P < 0.001$),但均显著高于NS组($P < 0.001$);且与时间的相关, $r = -0.562$, $P < 0.001$;与剂量无明显相关性。

2. 辛伐他汀对肺血管通透性的影响:通过测定肺匀浆EB含量来反应肺血管的通透性,结果表明(表1):LPS组的肺匀浆EB含量明显高于NS组($P < 0.001$),辛伐他汀可不同程度减少肺匀浆EB的含量(1h组 $P > 0.05$,3d组 $P = 0.001$,7d组 $P < 0.001$),且与时间相关, $r = -0.655$, $P = 0.004$ 。

3. 辛伐他汀对肺匀浆MPO活力的影响:通过检测肺匀浆MPO活力来反映中性粒细胞的数量,结果表明(表2):LPS组MPO是NS组的2倍($P < 0.001$),治疗组均显著低于LPS组($P < 0.001$),且3d组、7d组与NS组无统计学差异($P > 0.05$),与时间的相关系数 $r = -0.638$, $P < 0.001$;与剂量无明显相关性。

表1 辛伐他汀对肺血管通透性指标的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | W/D | 肺水含量(%) | BALF蛋白含量(μg/ml) | 肺匀浆EB含量(μg/g lung) |
|------|-----|---------------------------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------|
| NS组 | 6 | 4.60 ± 0.29 | 0.782 ± 0.013 | 44.26 ± 12.72 | 10.07 ± 2.28 |
| LPS组 | 6 | 5.89 ± 0.75 ^a | 0.828 ± 0.021 ^a | 229.90 ± 75.62 ^a | 29.59 ± 5.67 ^a |
| 治疗组 | 1 h | 5.02 ± 0.26 ^b | 0.801 ± 0.010 ^b | 210.99 ± 14.07 ^a | 26.57 ± 5.70 |
| | 3 d | 4.80 ± 0.12 ^{bc} | 0.792 ± 0.005 ^{bc} | 181.27 ± 17.94 ^{ad} | 19.48 ± 1.71 ^d |
| | 7 d | 4.84 ± 0.14 ^{bc} | 0.794 ± 0.007 ^{bc} | 160.20 ± 33.65 ^{ab} | 17.66 ± 2.39 ^b |

注:与NS组相比,^a $P < 0.001$,^c $P > 0.05$;与LPS组相比,^b $P < 0.001$,^d $P < 0.05$

表2 辛伐他汀对肺匀浆MPO和血清炎症介质的影响($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 肺匀浆MPO活力(U/g) | 血清IL-6浓度(pg/ml) | 血清TNF-α浓度(pg/ml) |
|------|-----|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| NS组 | 6 | 0.637 ± 0.036 | 171.36 ± 1.05 | 13.23 ± 1.00 |
| LPS组 | 6 | 1.115 ± 0.338 ^a | 5977.37 ± 1087.54 ^a | 58.58 ± 4.13 ^a |
| 治疗组 | 1 h | 0.819 ± 0.106 ^b | 2584.10 ± 81.24 ^d | 25.96 ± 9.44 ^{dc} |
| | 3 d | 0.708 ± 0.097 ^{bc} | 855.62 ± 228.87 ^{dc} | 30.95 ± 6.33 ^d |
| | 7 d | 0.709 ± 0.042 ^{bc} | 997.62 ± 456.25 ^{dc} | 26.69 ± 12.44 ^{dc} |

注:与NS组相比,^a $P < 0.001$,^c $P > 0.05$;与LPS组相比,^b $P < 0.001$,^d $P < 0.01$

4. 辛伐他汀对血清炎症介质的影响:ELISA检测结果表明(表2):LPS组血清IL-6、TNF-α浓度显著高于NS组($P < 0.001$),治疗组均显著低于LPS组($P < 0.01$)而均高于NS组,其中3d组和7d组的血清IL-6浓度以及1h组和7d组的TNF-α浓度与NS组无显著区别($P > 0.05$);辛伐他汀降低血清IL-6、TNF-α的效应与时间和剂量无明显相关。

5. 病理学结果:在光学显微镜下可见(图1):LPS组部分肺泡结构受到破坏,气道上皮细胞排列紊乱,部分变形脱落,肺间质和肺泡腔有大量炎症细胞浸润,间质水肿明显,部分有出血,肺泡腔内出现水肿液,肺透明膜形成,出现典型的ALI/ARDS病理改变。在治疗组中,辛伐他汀均可不同程度的减轻LPS对肺的损伤,肺泡结构破坏减少,大部分气道上皮细胞仍排列整齐,肺间质和肺泡腔炎症细胞的浸润、间质水肿、出血均不同程度的减轻,尤其以3d组和7d组明显。

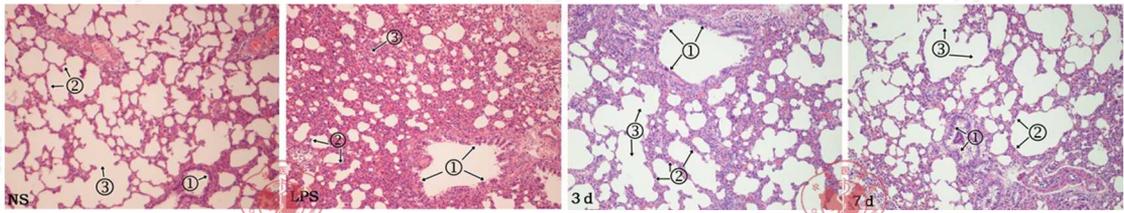


图1 辛伐他汀减轻内毒素性肺损伤。LPS组肺损伤严重,气道上皮细胞排列紊乱,部分脱落,肺间质和肺泡腔有大量炎症细胞浸润,肺间质水肿明显;3 d组和7 d组肺损伤程度均明显轻于LPS组。图中所示:①为气道黏膜上皮;②为肺泡间质;③为肺泡腔(HE ×10)

三、讨论

ALI是临床上一种常见的危重病症,也是全身炎症反应综合征时最易出现的一种器官组织损伤。ALI进一步发展即为ARDS。ALI/ARDS起病急骤,发展迅速,病情凶险顽固,治疗棘手困难,预后差,死亡率高。其发病机制复杂,至今尚未完全阐明,感染是导致ALI/ARDS的重要因素。

正常的肺泡毛细血管屏障是个半透膜,ALI/ARDS时内皮细胞和上皮细胞损伤,肺泡毛细血管屏障的完整性受到破坏,导致大量液体和蛋白质进入肺间质和肺泡腔,形成致命性的肺水肿和呼吸衰竭。本实验中,注射LPS后,肺水含量、W/D及BALF中蛋白含量均明显高于对照组,表明LPS使血管通透性增加,形成富含蛋白质的肺水肿。而辛伐他汀可以不同程度地改善这一病理生理过程,且具有时间依赖效应,而无明显剂量相关性。另外,肺匀浆EB含量结果也表明辛伐他汀可以降低肺血管通透性,减轻炎症性肺水肿,具有保护血管内皮屏障功能的作用。这与在体外细胞研究的结果^[7-8]是相一致的,Siempas等^[9]在离体兔子肺的机械通气相关肺损伤的研究中也证明阿托伐他汀可以减轻机械通气相关肺损伤,降低肺血管通透性。

MPO是反映中性粒细胞数量的一个指标,也是反映炎症反应严重程度的一个指标,其活力的高低反映白细胞数量的多少;而血清TNF- α 、IL-6则是反映全身炎症反应的指标,在炎症反应导致肺损伤的进程中具有极其重要的作用。本研究发现,静脉注射LPS后,血清TNF- α 、IL-6水平和肺匀浆MPO活力均显著高于正常组,而辛伐他汀可逆转其升高,这说明在LPS诱导ALI/ARDS的大鼠模型中,辛伐他汀预先处理可抑制炎症介质的产生,减轻全身炎症反应;同时可抑制白细胞的渗出,减轻肺内炎症反应;表明辛伐他汀具有抗炎的特性。肺组织病理学检查结果更是直接表明了这一点,尤其是治疗时间长(超过3 d)的组别。

我们的实验结果明确提示了辛伐他汀可减轻LPS诱导的炎症反应,降低肺血管通透性,减轻肺损伤,并且,预处理的时间越长,其保护作用越明显,具有明显的时间依赖效应。这一点在临床工作中将有重要意义。尽管在临床患者中是比较难做得预防给药,但是,从感染或误吸等因素诱发ALI需要一个过程,即使是出现ALI,也常需要几天的时间才发展成ARDS^[10]。因此,我们相信,早期诊断,早期使用辛伐他汀治疗可能将对脓毒症性ALI/ARDS的预后产生有益的影响。

参 考 文 献

- [1] Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 2000, 342:1334-1349.
- [2] Brower RG, Ware LB, Berthiaume Y, et al. Treatment of ARDS. *Chest*, 2001, 120:1347-1367.
- [3] Jacobson JR, Garcia JG. Novel therapies for microvascular permeability in sepsis. *Curr Drug Targets*, 2007, 8:509-514.
- [4] Abeles AM, Pillinger MH. Statins as Antiinflammatory and Immunomodulatory Agents. A Future in Rheumatologic Therapy? *Arthritis & Rheumatism*, 2006, 54:393-407.
- [5] Pirat A, Zeyneloglu P, Aldemir D, et al. Pretreatment with Simvastatin Reduces Lung Injury Related to Intestinal Ischemia-Reperfusion in Rats. *Anesth Analg*, 2006, 102:225-232.
- [6] Merx MW, Liehn EA, Janssens U, et al. HMG-CoA Reductase Inhibitor Simvastatin Profoundly Improves Survival in a Murine Model of Sepsis. *Circulation*, 2004, 109:2560-2565.
- [7] Jacobson JR, Dudek SM, Birukov KG, et al. Cytoskeletal activation and altered gene expression in endothelial barrier regulation by simvastatin. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004, 30:662-670.
- [8] Dudek SM, Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol*, 2001, 91:1487-1500.
- [9] Siempas II, Maniatis NA, Kopterides P, et al. Pretreatment with atorvastatin attenuates lung injury caused by high-stretch mechanical ventilation in an isolated rabbit lung model. *Crit Care Med*, 2010, 38:1321-1328.
- [10] Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, et al. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med*, 2004, 30:51-61.

(收稿日期:2011-06-15)

(本文编辑:吴莹)