

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180873

15-脱氧- $\Delta^{12,14}$ -前列腺素 J_2 对大鼠酸性胃内容物吸入性肺损伤的保护作用

施劲东¹, 隆 玄², 符翠萍², 李建楠¹, 谢 娟¹, 施天昀¹, 梅周芳¹, 揭志军¹, 李善群^{2*}

1. 复旦大学附属上海市第五人民医院呼吸科, 上海 200240

2. 复旦大学附属中山医院呼吸与危重症医学科, 上海 200032

[摘要] **目的:** 探讨 15-脱氧- $\Delta^{12,14}$ -前列腺素 J_2 (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 , 15d-PG J_2) 在大鼠酸性胃内容物 (combined acid and gastric particles, CAGP) 吸入性肺损伤中的保护作用。**方法:** 制备大鼠 CAGP 模型, 将 20 只大鼠模型随机分为对照组与治疗组, 每组 10 只。对照组: 气管内滴注 CAGP, 腹腔内注射 PBS; 治疗组: 气管内滴注 CAGP, 腹腔内注射 15d-PG J_2 。肺损伤后 4 h 和 12 h, 两组各取 5 只大鼠采集标本, 测定动脉血氧分压 (PaO $_2$)、肺组织湿重/干重比值 (W/D)、支气管肺泡灌洗液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) 总蛋白浓度、BALF 白细胞计数和分类计数、BALF 和血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 浓度、肺组织苏木精-伊红 (H-E) 染色炎症评分等指标。**结果:** 与对照组比较, 损伤后 4 h 和 12 h, 治疗组大鼠肺组织 H-E 染色炎症程度减轻, 肺组织炎症评分下降, 动脉血氧分压 (PaO $_2$) 升高, 肺组织 W/D、BALF 总蛋白浓度、白细胞总数和中性粒细胞数均下降, BALF 和血清 TNF- α 浓度下降 ($P < 0.05$)。**结论:** 15d-PG J_2 能减轻大鼠 CAGP 吸入性肺损伤和肺部炎症水平, 改善动脉血氧分压。

[关键词] 15-脱氧- $\Delta^{12,14}$ -前列腺素 J_2 ; 酸性胃内容物; 吸入性肺损伤**[中图分类号]** R 563.1; R-332**[文献标志码]** A

Protective effect of 15 deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 on a rat model of combined acid and gastric particles-induced aspiration lung injury

SHI Jin-dong¹, LONG Xuan², FU Cui-ping², LI Jian-nan¹, XIE Juan¹, SHI Tian-yun¹, MEI Zhou-fang¹, JIE Zhi-jun¹, LI Shan-qun^{2*}

1. Department of Respiratory, The Fifth People's Hospital of Shanghai, Fudan University, Shanghai 200240, China

2. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of 15d-PG J_2 treatment on a rat model of combined acid and gastric particles (CAGP)-induced aspiration lung injury. **Methods:** The model of CAGP-induced aspiration lung injury model was established in SD rats. Twenty SD rats were randomly divided into control group and experimental group, with 10 rats in each group. Control group: rats were treated with CAGP intratracheal instillation and PBS intraperitoneal injection; experimental group: rats were treated with CAGP intratracheal instillation and 15d-PG J_2 intraperitoneal injection. At 4 h and 12 h after CAGP instillation, the arterial partial pressure of oxygen (PaO $_2$), wet-to-dry weight ratio (W/D) of lung tissue, total protein concentration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), white blood cell count and differential count in BALF, tumor necrosis factor- α (TNF- α) concentration in BALF and serum, and lung inflammation score by H&E staining were analyzed in samples of 5 rats from each group. **Results:** Compared with control group, inflammatory scores based on histology were alleviated, and PaO $_2$ was improved at 4 h and 12 h after CAGP injury in 15d-PG J_2 treatment group. Compared with control group, W/D of lung tissue, total protein concentration in BALF, white blood cell count and differential count in BALF, TNF- α concentration in BALF and serum were decreased at both timepoints in 15d-PG J_2 treatment group ($P < 0.05$). **Conclusions:** 15d-PG J_2 could alleviate the levels of lung injury and inflammation, and improve the PaO $_2$ in rat CAGP-induced

[收稿日期] 2018-08-10**[接受日期]** 2018-11-27

[基金项目] 上海市卫计委科研项目 (201640237), 上海市科委科研项目 (18411970400), 复旦大学附属上海市第五人民医院卓越人才培养计划 (2017WYRCZY01). Supported by the Science Foundation of Shanghai Health and Family Planning Commission (201640237), the Shanghai Committee of Science and Technology Program (18411970400), and Talent Development Plan of the Fifth People's Hospital of Shanghai (2017WYRCZY01).

[作者简介] 施劲东, 硕士, 副主任医师. E-mail: shijd8@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-64041990-2508; E-mail: li.shanqun@zs-hospital.sh.cn

aspiration lung injury models.

[Key Words] 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 ; acid and gastric particles; aspiration lung injury

吸入性肺损伤是危重病患者的常见并发症之一,可迅速进展为急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)。临床上常见的吸入性肺损伤主要由胃酸、食物颗粒等胃内容物反流误吸所致,目前尚缺少有效的治疗方法,导致其发病率和死亡率居高不下。胃酸及胃内颗粒是胃内容物的主要成分,吸入后导致双相肺损伤,早期主要为由酸介导的化学损伤,后期主要为由炎症细胞、炎症因子介导的炎症级联反应^[1-2]。因此,降低或阻断酸性胃内容物吸入性肺损伤时的炎症级联反应可能是提高该病抢救成功率的关键。

研究^[3]表明,前列腺素类化合物 15-脱氧- $\Delta^{12,14}$ -前列腺素 J_2 (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J_2 , 15d-PG J_2)能抑制机体的炎症及氧化应激损伤。在内毒素和博来霉素诱导的 ARDS 和感染性休克动物模型中,15d-PG J_2 能够通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ , PPAR- γ)或抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)、转录因子-1(AP-1)等途径,发挥肺保护作用^[4-7]。本研究通过建立酸性胃内容物所致大鼠肺损伤模型,进一步探讨 15d-PG J_2 能否减轻肺损伤程度。

1 材料与方法

1.1 实验动物 雄性 SPF 级 Sprague-Dawley (SD)大鼠 25 只,体质量 200~250 g,购自复旦大学上海医学院动物房。动物由复旦大学附属中山医院实验动物中心于 SPF 级条件下饲养,自由饮水、饮食。

1.2 酸性胃内容物悬液制备 酸性胃内容物颗粒悬液(combined acid and gastric particles, CAGP)的制备方法参照文献^[8]:将用于提取胃内容物的 5 只 SPF 级雄性 SD 大鼠经腹腔注射 20%乌拉坦麻醉(7.5 mL/kg),待大鼠安静后将其仰卧置于手术台板上,固定头部与四肢;腹部备皮消毒,切开腹部皮肤,暴露大鼠胃并用手术剪切开,收集胃内容物;用 0.9%氯化钠液冲洗胃内容物 3 次,然后外科纱布过滤,以去除胃内大分子颗粒、胆盐等;过滤液在高压蒸汽下消毒灭菌 25 min,以 800×g 在室温下离心 2 min;弃去上清液,进一步去除胃内胆

盐等物质,收集离心所得沉淀物,称重,用 pH 为 1.25 的盐酸溶液(经 0.2 μ m 无菌一次性针头滤器过滤)重悬,制成浓度为 20 mg/mL 的酸性胃内容物悬液。

1.3 吸入性肺损伤模型的建立及干预治疗 将 20 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为对照组和治疗组,每组 10 只。所有大鼠经腹腔注射 10%水合氯醛按 4 mL/kg 进行麻醉,待大鼠安静后将其仰卧置于无菌手术台板上,固定头部与四肢,使台板倾斜 30°。颈部备皮消毒,于中线做约 8 mm 小切口,分开筋膜后,游离甲状腺并用血管钳分开颈前肌,暴露气管。将 14G 静脉套管针插入气管至隆突上 0.5~1 cm,拔出针心,套管针连接于 1 mL 注射器,向气管内缓慢滴注制备好的 CAGP (1.5 mL/kg)。滴注后取下套管针,保持台板倾斜的同时轻轻转动大鼠,使注射的酸性胃内容物悬液均匀分布至大鼠双侧肺。滴注 CAGP 后即刻,治疗组腹腔注射 15d-PG J_2 (1 mg/kg),对照组腹腔注射相同体积的 PBS。用缝线分别缝合气管与颈部切口,使大鼠正常呼吸,并在室温下自行苏醒。分别于滴注 CAGP 后 4 h 和 12 h,每组各取 5 只大鼠终止实验,并采集标本。

1.4 标本采集和检测方法

1.4.1 血气分析 损伤后 4 h 和 12 h,经腹腔注射 20%乌拉坦麻醉大鼠。消毒后打开腹腔,将腹腔内肠管翻至一侧,暴露出腹主动脉。用事先肝素化的 1 mL 注射器抽取腹主动脉血 0.5 mL 后,立即用止血钳夹闭腹主动脉,以避免动脉血喷射。抽出的动脉血即刻用血气分析仪进行动脉血氧分压(arterial partial pressure of oxygen, PaO $_2$)检测。

1.4.2 血清采集和肺湿重/干重比值(wet-to-dry weight ratios, W/D)测定 大鼠行血气分析后,剪开腹主动脉放血处死,采集腹腔内积血,分离血清冻存待检。放血后迅速打开胸腔,结扎右侧主支气管,取出右肺上叶,用吸水纸吸干其表面液体后,于电子天平秤上称其质量,记录为湿重。将称量好的右肺上叶置于 60℃鼓风干燥箱内 72 h 以上,至其质量不再发生变化后,再次称重,记录为干重。计算前后两次的比,即 W/D。

1.4.3 支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)的收集、蛋白测定、细胞计数 对大鼠

左肺进行支气管肺泡灌洗。用16G插管针气管插管,用注射器取1.5 mL 无菌冷 PBS 行支气管肺泡灌洗术3次。收集的BALF于4℃离心机250×g离心10 min,留取上清液于-20℃冻存。用BCA法(试剂盒购自碧云天公司)测定大鼠BALF上清液中总蛋白浓度,以观察大鼠肺泡内蛋白渗出情况。操作方法严格按照说明书进行。

细胞沉淀用0.5 mL PBS重悬,吸取20 μL用细胞计数板计数细胞总数。余悬液在TXT3细胞涂片上于离心机中250×g离心10 min,使细胞均匀平铺于载玻片上,晾干后,用瑞-姬氏染液进行快速染色,在高倍镜下计数200个细胞,进行中性粒细胞计数。

1.4.4 肺组织病理学检测 将大鼠左肺用4%多聚甲醛充盈,结扎左侧主支气管后放入4℃的4%多聚甲醛中固定,3 d后进行包埋、切片和苏木精-伊红(H-E)染色,在200倍视野下观察、拍照。由未参与实验的病理科医师分别在低倍和高倍视野下进行观察和炎症程度评分,参考文献^[9-10]。

1.4.5 BALF和血清肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)浓度测定 采用ELISA法检测BALF上清液和血清中的TNF-α浓度,试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司。

1.5 统计学处理 采用SPSS 19 统计软件分析数据,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验或Wilcoxon秩和检验进行组间比较,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 肺部H-E染色和PaO₂ 结果(图1、表1)表明:与对照组相比,损伤后4 h和12 h,治疗组炎症程度明显下降,PaO₂明显改善,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

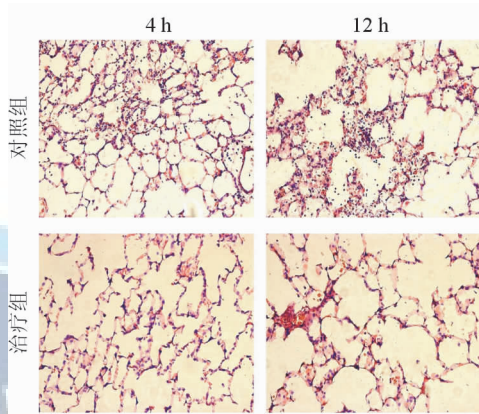


图1 两组大鼠肺组织H-E染色结果比较
Original magnification: ×200

表1 两组大鼠炎症和肺功能相关指标比较

观察指标	对照组		治疗组	
	4 h	12 h	4 h	12 h
炎症评分/分	3.25 ± 0.79	3.66 ± 0.44	2.82 ± 1.26*	2.74 ± 0.51*
PaO ₂ P/mmHg	69 ± 1	57 ± 5	76 ± 11*	77 ± 13*
W/D	4.39 ± 0.19	4.23 ± 0.20	3.35 ± 0.32*	3.14 ± 0.51*
BALF				
总蛋白 ρ _B /(mg · mL ⁻¹)	10.4 ± 3.5	11.7 ± 3.1	6.9 ± 2.7*	8.9 ± 1.6*
白细胞数/(×10 ⁵ /mL)	65.4 ± 12.3	69.9 ± 9.9	56.7 ± 17.6*	58.3 ± 18.0*
中性粒细胞数/(×10 ⁵ /mL)	58.8 ± 11.2	64.3 ± 13.7	48.2 ± 19.5*	51.9 ± 15.9*
TNF-α ρ _B /(pg · mL ⁻¹)	2 712 ± 314	3 310 ± 242	2 318 ± 854*	2 941 ± 1 110*
血清 TNF-α ρ _B /(pg · mL ⁻¹)	2 441 ± 667	3 375 ± 1 204	2 283 ± 757	2 298 ± 801*

PaO₂:动脉血氧分压;W/D:肺组织湿重/干重比值;BALF:支气管肺泡灌洗液;TNF-α:肿瘤坏死因子-α. * $P < 0.05$ 与对照组同时点相比

2.2 肺损伤程度 结果(表1)表明:损伤后4 h、12 h,治疗组肺部渗出(W/D)与蛋白渗漏(总蛋白)均较对照组减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 BALF中白细胞总数和中性粒细胞数 结果(表1)表明:损伤后4 h、12 h,治疗组BALF中白细胞总数和中性粒细胞数均较对照组减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 BALF和血清中TNF-α浓度 结果(表1)表明:损伤后4 h、12 h,治疗组BALF和血清中TNF-α浓度均较对照组下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

胃内容物误吸是ARDS的主要病因之一。在

年老体弱、酗酒、颅脑创伤、神经系统疾病、肿瘤等危重患者中,吸入性肺损伤发生率更高^[11-12]。与其他因素所致的 ARDS 不同,酸性胃内容物吸入性肺损伤是一个双相过程:早期主要为酸液介导的化学性损伤,一般发生于损伤后 3 h 之内;后期为吸入的胃内容物引发由炎症细胞和炎症因子介导的炎症级联反应,此阶段的损伤程度更为剧烈,损伤后 4~6 h 达高峰,15 h 后逐渐出现修复反应^[13]。目前,临床对于酸性胃内容物吸入性肺损伤的治疗仅限于对症及支持治疗,如气管插管或气管镜下清除吸入物质、机械通气、抗生素治疗、糖皮质激素抗炎治疗等。然而,这些治疗方法均未能取得令人满意的效果。因此,寻找有效控制吸入性肺损伤的治疗方法成为了该领域的研究热点之一。

近年研究^[14]表明,15d-PGJ₂ 是组织炎症及氧化应激损伤时释放的内源性物质,对机体的炎症及氧化应激损伤起着重要的抑制作用。15d-PGJ₂ 由前列腺素 D₂ (prostaglandin D₂, PGD₂) 自发脱水形成,是 PPAR- γ 的天然配体及强激动剂之一。Genovese 等^[6]在博来霉素诱导肺损伤小鼠模型中发现,给予 PPAR- γ 的两个激动剂,即罗格列酮和 15d-PGJ₂,能够减轻肺水肿,减轻炎症细胞浸润和肺部炎症程度,降低小鼠死亡率。Wang 等^[7]研究表明,在内毒素诱导的急性肺损伤小鼠模型中,PPAR- γ 激活后能通过抑制高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1)-晚期糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation endproducts, RAGE) 水平发挥肺保护作用。因此,本研究在大鼠发生酸性胃内容物吸入性肺损伤后,给予外源性 15d-PGJ₂,观察其能否发挥抗炎、免疫调节及抗氧化应激的作用,从而产生肺保护作用。

本研究结果显示,大鼠发生吸入性肺损伤后,与对照组比较,治疗组损伤后 4 h 和 12 h 肺组织炎症评分、BALF 中的白细胞总数和中性粒细胞数均下降 ($P<0.05$),提示 15d-PGJ₂ 能减轻吸入性肺损伤大鼠肺部炎症;治疗组 BALF 中总蛋白减少、W/D 比值下降 ($P<0.05$),提示给予 15d-PGJ₂ 治疗能减少急性肺损伤过程中肺泡内富含蛋白液体的渗出,进而保护肺功能。Lu 等^[5]的研究也发现,在内毒素诱发的急性肺损伤大鼠模型中,通过静脉注射 15d-PGJ₂ 能减轻肺部炎症和蛋白渗漏。Zingarelli 等^[15]发现,15d-PGJ₂ 能改善脓毒症大鼠的血流动力学,降低其血浆 TNF- α 等细胞因子的

浓度,减轻肺组织中中性粒细胞浸润,并抑制肺组织中 NF- κ B 和 AP-1 的活性。此外,本研究还发现,15d-PGJ₂ 能降低 BALF 和血清中 TNF- α 的浓度,且能改善 PaO₂ ($P<0.05$),纠正急性肺损伤所诱发的低氧血症。

综上所述,在酸性胃内容物吸入性肺损伤大鼠模型中,腹腔注射 15d-PGJ₂ 能减轻其肺部损伤和肺部炎症水平,改善 PaO₂。本研究的局限性在于:(1)未设置吸入 0.9%氯化钠液的正常对照组,因此不利于评估 15d-PGJ₂ 是否对其他吸入性肺损伤发挥作用;(2)观察时间较短,难以明确 15d-PGJ₂ 治疗对大鼠预后的影响;(3)没有阐明 15d-PGJ₂ 通过 PPAR- γ 调控肺脏炎症的具体分子机制。今后将补充上述实验,进一步验证 15d-PGJ₂ 对肺损伤的保护作用。随着对急性肺损伤发病机制研究的不断深入,15d-PGJ₂ 有望取代糖皮质激素成为吸入性肺损伤的有效治疗药物。

参考文献

- [1] RICHTER T, BERGMANN R, MUSCH G, et al. Reduced pulmonary blood flow in regions of injury 2 hours after acid aspiration in rats[J]. BMC Anesthesiol, 2015, 15:36.
- [2] GRAMATTÉ J, PIETZSCH J, BERGMANN R, et al. Causative treatment of acid aspiration induced acute lung injury-Recent trends from animal experiments and critical perspective[J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2018, 69(1-2): 187-195.
- [3] ISHII T. Close teamwork between Nrf2 and peroxiredoxins 1 and 6 for the regulation of prostaglandin D₂ and E₂ production in macrophages in acute inflammation[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 88(Pt B):189-198.
- [4] KAPLAN J M, COOK J A, HAKE P W, et al. 15-Deoxy-delta (12, 14)-prostaglandin J (2) (15D-PGJ (2)), a peroxisome proliferator activated receptor gamma ligand, reduces tissue leukosequestration and mortality in endotoxic shock[J]. Shock, 2005, 24(1):59-65.
- [5] LU J, GUO S, XUE X, et al. Identification of a novel series of anti-inflammatory and anti-oxidative phospholipid oxidation products containing the cyclopentenone moiety in vitro and in vivo: Implication in atherosclerosis[J]. J Biol Chem, 2017, 292(13):5378-5391.
- [6] GENOVESE T, CUZZOCREA S, DI PAOLA R, et al. Effect of rosiglitazone and 15-deoxy-Delta 12, 14-prostaglandin J₂ on bleomycin-induced lung injury[J]. Eur Respir J, 2005, 25(2):225-234.
- [7] WANG G, LIU L, ZHANG Y, et al. Activation of PPAR γ attenuates LPS-induced acute lung injury by inhibition of HMGB1-RAGE levels[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 726:

- 〔本文编辑〕 姬静芳

我院心内科主任葛均波院士当选为世界心脏联盟常务理事



2018年12月7日,在阿拉伯联合酋长国-迪拜举行的世界心脏病学大会上,中华医学会心血管病学分会主任委员、中国科学院院士、复旦大学附属中山医院心内科主任葛均波教授当选为世界心脏联盟(World Heart Feredation, WHF)常务理事。

WHF 是总部设在日内瓦的非政府组织,由来自 97 个国家和 168 个心脏病协会和心脏基金会组成,致力于控制全球(特别是中低收入国家)心脏病和脑卒中的发生,延长人类寿命,改善生活质量。世界心脏病日即由 WHF 于 1999 年发起。葛均波院士一直致力于心血管科普知识的传播,尤其在世界心脏病日来临之际,组织多方力量,拍摄公益宣传片、开展健康科普教育主题会、在线科普问诊、进行义诊或患者教育。

· 消 息 ·