

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.03.007

体质指数与大鼠急性肺损伤模型的肺损伤程度相关性研究

冷文颖, 刘 畅, 刘永生, 周发春

(重庆医科大学附属第一医院急诊科/中心 ICU, 重庆 400016)

【摘 要】目的:急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)发病机制复杂,死亡率高。本研究从大鼠体质指数(Body mass index, BMI)及血脂水平角度出发探讨脂质代谢是否在 ALI 发病机制中起着调控作用及其可能途径。方法:36 只雄性 SD(Sprague-dawley, SD)大鼠随机平均分为对照组(C 组)、模型组(OA 组)、高脂肥胖组(C-H 组)、高脂肥胖模型组(O-H 组),造模后预定时间点处死大鼠并取肺组织作湿重/干重比值(W/D)、肺组织病理学观察、肺组织核因子- κ B(Nuclear factor -kappa B, NF- κ B)表达水平,及测定炎症因子白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (Tumor necrosis factor α , TNF- α)等。结果:O-H 组在肺损伤病理学评分以及 IL-1 β 、TNF- α 3 项指标均较 OA 组程度升高($P < 0.05$),前者肺组织 NF- κ B mRNA 表达水平较后者明显上调,C-H 组较 C 组相比也存在上述指标的显著差异。结论:在相同单位剂量油酸的诱导下,从 mRNA 及炎症因子水平提示了 BMI 水平与肺损伤程度呈正相关,是影响肺损伤程度的独立因子,为临床防治提供一定的参考价值。

【关键词】体质指数;急性肺损伤;损伤程度

【中国图书分类法分类号】R563.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-09-13

Correlation of body mass index and lung injury in rat models of acute lung injury

LENG Wenying, LIU Chang, LIU Yongsheng, ZHOU Fachun

(Department of Emergency, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the correlation between BMI and lung injury degree in acute lung injury of rats. Methods: A total of 60 male sprague-dawley (SD) rats were randomly divided into control group (C), Oleic acid-treated group (OA), control-hyperlipidemia (C-H) group, and Oleic acid-hyperlipidemia (O-A) group. Acute lung injury was induced by injection of OA, O-A (dose, 0.15 ml/kg) via intravenous vein. Rats were killed at scheduled time-points and the Lung tissues were removed for lung pathology and determination of wet/dry weight ratio (W/D), nuclear factor- κ B (NF- κ B) expression, inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β), and tumor necrosis factor α (TNF- α). Results: In O-H group, the pathology of lung injury score, IL-1 β and TNF- α were significantly increased, as compared with the OA group ($P < 0.05$). The above lung tissue expression of NF- κ B mRNA in O-H group were also significantly increased than OA group. Conclusion: Under the same dose of oleic acid induction, the mRNA and the level of inflammatory cytokines suggest that BMI levels and lung injury were positively correlated with each other.

【Key words】body mass index; acute lung injury; injury degree

急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)/急性呼吸窘迫综合征(Acute respiratory distress syndrome, ARDS)目前认为其本质是全身炎症反应综合征在肺部的表现^[1]。尽管针对性的呼吸支持技术和药物治疗取得很大进展,但 2009 年 1 项 Meta 回归分析发现 ARDS 发病率从 1994 年来无明显改善^[2]。一些国外临床研究已经证实 ICU 内高体质指数(Body mass index, BMI)患者比正常体重患者发生肺损伤的几率高且程度重^[3-6],而与肥胖紧密相关的脂质代谢是否在其发病机制中起着关键作用目前尚无报道。为此,我们采用高脂饮食诱导肥胖大

鼠后复制肺损伤模型,从 BMI 及血脂水平角度研究脂质代谢与肺损伤病程中炎症因子的关系,可能成为降低肺损伤发生率与死亡率的潜在手段。

1 方法和材料

1.1 主要仪器和试剂

PTC-200 PCR 扩增仪(GENE 公司,美国),Alpha hmotech 凝胶成像分析系统(Alpha hmotech,美国),一抗核因子- κ B(Nuclear factor -kappa B, NF- κ B)p65 兔抗鼠多克隆抗体(Cell signaling technology,美国),羊抗兔绿色荧光二抗(武汉博士德生物技术有限公司,中国),RT-PCR 试剂盒(RNA-PCR

作者介绍:冷文颖(1985-),女,硕士,

研究方向:急、重症医学。

通信作者:周发春,男,主任医师,Email:zfc88@126.com。

kit Ver.3.0, TaKaRa, 日本), RNA 提取试剂(北京百泰克生物技术有限公司, 中国), 大鼠白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor α , TNF- α) ELISA 检测试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司, 中国)。

1.2 动物模型制备

健康雄性 SD 大鼠 36 只, 体质量(168 ± 31) g, 由重庆医科大学动物实验中心提供, 按完全随机原则分为 4 组($n=9$), C 组、OA 组采用普通饲料喂养, C-H 组、O-H 组采用高脂饲料(20%猪油, 10%奶粉, 10%鸡蛋, 60%普通饲料)诱导肥胖模型。8 周后测量 BMI(kg/m^2)及血脂水平(mmol/L)。C 组、C-H 组采用尾静脉注射生理盐水作对照组, OA、O-H 2 组采用尾静脉注射油酸复制肺损伤模型, 各组剂量均为 0.1 ml/kg, 造模后 4 h 通过观察造模后大鼠的呼吸频率、皮肤黏膜颜色、活动行为, 初步判断造模成功与否, 采用 3.5%水合氯醛充分麻醉大鼠(10 ml/kg), 颈静脉取血分离血浆备用; 取左肺固定部分作湿重/干重比值(W/D)、肺组织冰冻切片及病理学观察, 取右肺组织分装冻存于-80℃冰箱备用。

1.3 肺组织炎症因子含量 TNF- α 、IL-1 β 及血脂检测

采用 ELISA 检测, 按试剂盒要求操作, 绘制标准曲线, 根据样品的 A 值在标准曲线上查出浓度, 计量单位 ng/L; 取血液标本送重庆医科大学附属第一医院检验科检测血脂。

1.4 免疫荧光检测 NF- κ B p65 核转位比率

丙酮固定肺组织 20 min, PBS 溶液清洗 5 min 共 3 次, 用 Triton X-100 透膜 15 min, PBS 溶液清洗 5 min 共 3 次, 10%胎牛血清封闭 20 min, 加入 NF- κ B p65 兔抗鼠多克隆抗体(PBS 1:50 稀释), 4℃孵育过夜; 37℃复温 1 h, PBS 冲洗 5 min 共 3 次, 避光孵育荧光二抗 3 h, PBS 清洗 5 min 共 3 次, 50%甘油 PBS 封片, 荧光倒置显微镜观察并照相留底, 阴性对照用 PBS 代替一抗, 其余步骤同上。

1.5 RT-PCR 法检测肺组织 NF- κ B mRNA 表达水平

按试剂盒说明书提取肺组织总 RNA, 测定并计算 RNA 浓度及纯度; 逆转录: 按试剂盒说明配置反应体系 20 μL , 经 37℃ 15 min、85℃ 5 s 进行逆转录; 引物由上海生工合成, 引物序列为: NF- κ B: 正义链: 5'-GCACTGTGAGGACGGCATA-3', 反义链: 5'-TCCAGTCTCCGAGTGAAGC-3', 退火温度 59℃, 产物 348 bp; β -actin: 正义链: 5'-AGATGACCCAGATCAT-GTTTGA-3', 反义链: 5'-TTGGCATAGAGTCTTTA-3', 退火温度 59℃, 产物 535 bp; 采用内参和目的基因分别扩增: 94℃变性 3 min, 58℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 共 35 次循环, 72℃额外延伸 5 min, 最后 4℃保存 10 min。取 PCR 产物于 1.5%琼脂糖凝胶中电泳。经凝胶成像系统分析成像, 以目的 PPAR- γ 片段和 NF- κ B 片段与 β -actin 片段的平均光密度(Optical density, OD) 比值作 PPAR- γ mRNA 和 NF- κ B mRNA 的半定量分析, 并分别进行比较。

1.6 统计学处理

采用 SAS9.1 版统计分析软件, 计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 多样本均数间比较使用单因素 GLM 过程, 先行方差齐性检验, 方差齐, 两两比较采用 SNK- q 检验, 方差不齐, 采用秩和 Kruskal-Wallis H 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 4 组大鼠一般情况

C 组及 C-H 组大鼠一般情况好, 精神状态可, 呼吸平稳, 频率分别为(44 ± 12)、(42 ± 8)次/min, 无紫绀出现, 未见死亡。OA 组大鼠于造模后 1~4 h 呼吸频率显著增加, 达(98 ± 13)次/min, 全身毛发竖立, 紫绀出现, 未见死亡。O-H 组大鼠造模后数分钟呼吸频率显著增加(130 ± 22)次/min, 全身毛发竖立肺部哮鸣音显著, 口唇紫绀较 OA 组更为明显, 4 h 内死亡 1 只。分别测得 4 组大鼠血脂、体重、身长, C 组、OA 组甘油三酯(Triglyceride, TG)、BMI 2 指标差异没有统计学意义, C-H、O-H 组 TG 及 BMI 较前 2 组显著升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)(见表 1)。

表 1 各组大鼠血脂、BMI 比较($\bar{x} \pm s$)

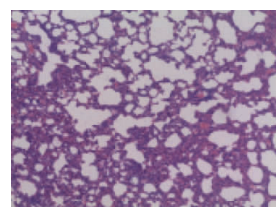
Tab.1 Comparation of lipids and BMI index among groups($\bar{x} \pm s$)

组别	TG (mmol/L)	BMI (kg/m^2)
C	0.47 ± 0.10	4.64 ± 0.28
OA	0.54 ± 0.14	4.70 ± 0.34
C-H	$1.39 \pm 0.29^*$	$6.38 \pm 0.52^*$
O-H	$1.53 \pm 0.21^*$	$6.13 \pm 0.51^*$

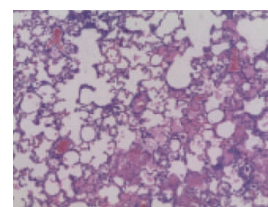
注: 与 C、OA 组相比, *, $P < 0.05$

2.2 肺组织观察

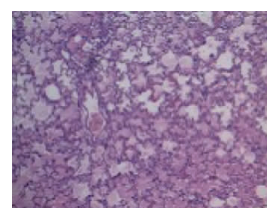
开胸后观察肉眼眼下, C 组肺组织表面光滑, 浅粉红色, 无充血、水肿, C-H 组可见肺组织较正常组增大, 表面可见黄色脂肪组织; OA 模型组肺组织呈暗红色, 可见广泛点状或灶状出血, 病理可见肺水肿、肺出血、炎细胞浸润等肺损伤典型改变; O-H 组肺组织明显增大成暗红色, 部分部位略成黄白色, 大片灶状区域, 病理可见明显水肿, 大量炎细胞浸润。参照文献[7]对 4 组大鼠肺损伤病理学评分结果示, C-H 组、O-H 组及 OA 组均较 C 组升高差异具有统计学意义, 且 O-H 组与 OA 组相比差异同样具有统计学意义, 但从 W/D 数据显示 O-H 与 OA 2 组差异并无统计学意义(见表 2)。



A. C 组肺组织 (HE, 100 $\times$)



B. OA 组肺组织 (HE, 100 $\times$)



C. O-H 组肺组织 (HE, 100 $\times$)

图 1 各组肺组织病理学观察

Fig.1 Pathology of lung tissue

表 2 各组肺组织 W/D、损伤病理学评分 ($\bar{x} \pm s$)

组别	W/D	病理学评分
C	2.82 ± 0.31	0.13 ± 0.08
OA	6.63 ± 0.13*	2.46 ± 0.28*
C-H	3.51 ± 0.43*	0.59 ± 0.17*
O-H	6.73 ± 0.19* ^{△#}	3.88 ± 0.38* ^{△##}

注:与 C 组相比,*, $P < 0.05$;与 C-H 组相比,△, $P < 0.05$;与 OA 组相比,#, $P > 0.05$;与 OA 组相比,##, $P < 0.05$

2.3 各组血浆 TNF- α 、IL-1 β 含量差异

肺组织匀浆上清液 TNF- α 、IL-1 β 的测定可评估肺组织炎症反应程度。在造模后 4 h OA、O-H 2 组 TNF- α 、IL-1 β 较对照组均明显升高,且 O-H 组较 OA 升高更为明显(见表 3)。

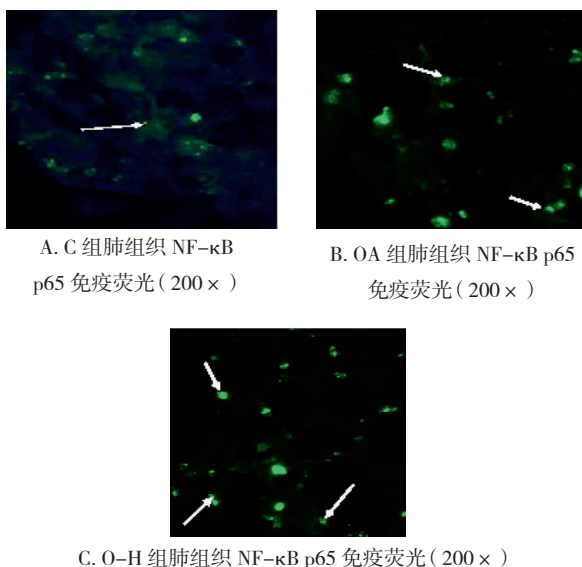
表 3 各组肺组织 NF- α 、IL-1 β 浓度 [$\bar{x} \pm s$, p/($\mu\text{g} \cdot \text{L}$)]

组别	TNF- α	IL-1 β
C	70.69 ± 14.89	70.19 ± 14.32
OA	490.92 ± 15.07*	349.10 ± 18.62*
C-H	194.21 ± 33.63*	162.49 ± 24.95*
O-H	519.88 ± 22.23* ^{△#}	398.75 ± 23.16* ^{△#}

注:与 C 组相比,*, $P < 0.05$;与 C-H 组相比,△, $P < 0.05$;与 OA 组相比,#, $P < 0.05$

2.4 间接免疫荧光检测 NF- κB p65 及 PCR 测定 mRNA 表达

圆形绿色荧光代表 NF- κB p65 蛋白所在的阳性细胞图像,荧光标记主要浓集细胞核区。C 组阳性细胞少,OA 模型组核转位阳性细胞增多,O-H 组较 OA 组升高更为明显(见图 2)。用 ImageJ 软件测定每组图片光密度值,O-H 模型组光密度值高于 OA 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表 4);NF- κB 电泳后显示在 348 bp 处,O-H 组 NF- κB mRNA 表达较 OA 组显著增加($P < 0.05$)(见图 2)。

A. C 组肺组织 NF- κB p65 免疫荧光 (200 ×)B. OA 组肺组织 NF- κB p65 免疫荧光 (200 ×)C. O-H 组肺组织 NF- κB p65 免疫荧光 (200 ×)图 2 各组间接免疫荧光检测 NF- κB p65Fig.2 Immunofluorescence express of NF- κB p65

2.5 BMI 分别与肺组织 W/D、病理评分、血浆炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 相关性分析

BMI 与上述指标均成正相关,与病理评分及 IL-1 β 相关性最高,与 W/D 相关性不明显。见表 5。

表 4 各组大鼠肺组织 NF- κB p65 表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	NF- κB p65 (平均光密度)
C	0.41 ± 0.01
OA	0.12 ± 0.03*
O-H	0.16 ± 0.02* [△]

注:与 C 组相比,*, $P < 0.05$;与 C 组相比,△, $P < 0.05$

表 5 BMI 与肺损伤指标相关性分析

Tab.5 Correlation of BMI index and ALI Index

相关性	W/D	Score	TNF- α	IL-1 β
C and C-H	0.62	0.78	0.83	0.84
OA and O-H	0.29	0.85	0.65	0.79

3 讨论

引发肺损伤的机制复杂,目前尚未完全阐明。有研究^[8]表明在肥胖患者中一些炎症因子升高,而这些炎症因子与肺损伤的病理生理机制密切相关。

本实验旨在研究肺损伤模型中,BMI 是否成为影响病情因素。所测定的肺损伤评价指标较为公认,TNF- α 被认为是引起肺损伤最重要的细胞前炎性因子之一,与 IL-1 β 等共同启动 ARDS 肺泡炎症,并且氧化应激和蛋白酶激活参与了肺损伤的病理损伤过程^[9],NF- κB 可上调 TNF- α 、IL-1 β 、VCAM-1 等多种细胞因子表达,激活 NF- κB 是肺损伤一个关键环节。研究结果显示在相同单位剂量油酸诱导下,O-H 组肺损伤病理学评分、IL-1、TNF- α 水平均较 OA 组升高更为显著,提示高 BMI 大鼠肺组织的损伤程度更深更为广泛,前者肺组织 NF- κB 表达水平较后者明显上调,也提示了肺部的炎症反应程度随着 BMI 的增加而增加,该实验在动物模型上验证了不同 BMI 组别病理生理学差异,行 BMI 与肺损伤的评价指标相关性分析可知,未注射油酸前,C-H 组与 C 组 BMI 与肺损伤病理评分、TNF- α 、IL-1 β 等均呈较高的正相关性,两组建模后,炎症因子的上升程度同样与 BMI 成正相关,但与 W/D 相关性不明显。分析实验结果可得知造模前肥胖大鼠较普通大鼠体内的 NF- κB 、IL-1、TNF- α 等水平已明显上调,笔者推测或许是高 BMI 者本身一些炎症因子就长期存在高表达状态,而在遭受到刺激后也更容易发生炎症瀑布反应,为炎症反应提供了更大的空间,在造模前与造模后炎症因子形成 1 加 1 大于 2 的叠加效应,从而导致更严重的肺损伤,这需要更多的样本来完善结论。本实验不足处于采用油酸这种化学性炎症复制 ARDS 模型,虽然模型复制了肺换气功能、肺机械功能的损伤等肺损伤的基本特征,但对临床上 ARDS 患者的全身炎症反应综合征在肺部的表现这一本质不尽人意,

可能这也是导致造模后 O-H 组与 OA 组在肺湿干重比方面差异不明显的原因。发生肺损伤前及发生肺损伤后, BMI 与体内炎症因子的良好相关性, 是否使其能成为肺损伤程度一个简单易获得的预警指标甚至是一个独立危险因素需要更多的基础及临床研究证实, 同时在 ICU 内对高 BMI 患者采取特异性的干预措施是否可降低肺损伤的发生亟待研究, 为临床防治提供一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Ware L B, Matthay M A. The acute respiratory distress syndrome[J]. N Engl J Med, 2000, 342 (18): 1334-1349.
- [2] Phua J, Badia J R, Adhikari N K, et al. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time? A systematic review[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179 (3): 220-227.
- [3] Morris A E, Stapleton R D, Rubinfeld G D, et al. The association between body mass index and clinical outcomes in acute lung injury [J]. Chest, 2007, 131 (2): 342-348.

- [4] Dossett L A, Heffernan D, Lightfoot M, et al. Obesity and pulmonary complications in critically injured adults[J]. Chest, 2008, 134 (5): 974-980.
- [5] Towfigh S, Peratta M V, Matin M J, et al. Acute respiratory distress syndrome in nontrauma surgical patients: A 6-year study[J]. J Trauma, 2009, 67 (6): 1239-1243.
- [6] Gong M N, Bajwa E K, Thompson B T, et al. Body mass index is associated with the development of acute respiratory distress syndrome[J]. Thorax, 2010, 65 (1): 44-50.
- [7] Murray M J, Matthay M A, Luce J M, et al. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome[J]. Am Rev Respir Dis, 1988, 138 (3): 720-730.
- [8] Fain J N. Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: A Review[J]. Mediators Inflamm, 2010, 2010: 513948-513968.
- [9] John R C, Dorinsky P M. Immunologic therapy for ARDS, septic shock, and multiple-organ failure[J]. Chest, 1993, 103 (3): 932-943.

(责任编辑: 冉明会)

(上接第 197 页)

的稳定性与固定针的数量及固定时间有关, 在外固定架安装时应选用配套钻头, 避免固定针反复穿入, 固定针与膝、踝关节的冠状面应平行, 所有固定针尽量调整在同一个平面上, 避免 S 形扭曲, 消除针-骨界面动态应力是防止固定针松动的有效措施之一^[2], 手术操作应符合现代医学损伤控制 (Damage control, DC) 理论^[3], 即对人体创伤要选用最简单的方法控制出血和污染, 减轻对人体及局部组织的损害。腓肠神经营养血管皮瓣主要血供由皮神经节段动脉供给, 静脉回流主要通过伴行静脉和小隐静脉; 皮瓣蒂部旋转点通常选择在外踝上 5 ~ 6 cm 处, 蒂部应宽而短, 旋转角度尽可能小, 且深筋膜宽度应大于 2 cm, 以免引起张力性水泡; 手术分离皮瓣时要确保腓肠神经及小隐静脉在皮瓣内, 创面彻底止血, 避免血肿形成, 皮瓣缝合时张力不宜过大。近年来腓动脉穿支供血的腓肠神经营养血管皮瓣已经广泛应用于临床, 逐渐成为修复小腿下段及足部组织缺损的主要方法之一^[4]。

选用恰当的多功能组合架联合腓肠神经营养血管皮瓣在治疗复杂小腿下段损伤有独特优势, 符合生物力学要求^[5], 其优越性表现为: (1) 对骨折可实施有效的固定, 固定针的操作远离骨折端, 不加重局部血运的破坏, 术后便于皮瓣的观察和处理; (2) 可进行早期的加压固定与后期的弹性固定, 增加生理应力刺激, 消除应力遮挡, 促进骨折愈合; (3) 皮瓣能为创面提供良好的组织覆盖和感觉功能, 其不牺牲下肢主要血管, 对下肢软组织血供影响小; (4) 便于患肢早期功能锻炼, 无需 2 次手术, 并发症少。本组 16 例患者应用多功能组合架联合腓肠神经皮瓣治疗胫骨下段开放性骨折具有皮瓣设计灵活, 成活率高, 外固定操作简单, 创伤小, 愈合快等优点, 易于基层推广, 是一种有效的治疗方法。

参 考 文 献

- [1] 胥少汀, 葛宝丰, 徐印坎. 实用骨科学[M]. 3 版. 北京: 人民军医出版社, 2005: 330-337.
- Xu S T, Ge B F, Xu Y K. Practical orthopaedics and tranmatology[M]. 3rd ed. Beijing: People's Military Medical Press, 2005: 330-337.
- [2] 于仲嘉, 刘光汉, 张志占, 等. 单侧多功能外固定支架的临床应用[J]. 中华骨科杂志, 1996, 16(4): 211-214.
- Yu Z J, Liu G H, Zhang Z Z, et al. The clinical application of unilateral multifunctional external fixator[J]. The Chinese Journal of Orthopaedics, 1996, 16(4): 211-214.
- [3] Stawicki S P, Brooks T, Bilski T, et al. The concept of damage control: extending the paradigm to emergency general surgery[J]. Injury, 2008, 39(1): 93-101.
- [4] 胡晓骅, 沈余明, 王志永, 等. 腓肠神经营养血管逆行皮瓣修复小腿下段及足部组织缺损[J]. 中华烧伤杂志, 2009, 25(1): 25-27.
- Hu X H, Shen Y M, Wang Z Y, et al. The flap of distally based sural neurocutaneous repaired the defect of tissue for lower leg and foot[J]. The Chinese Journal of burns, 2009, 25(1): 25-27.
- [5] 赵文, 李红芹, 李为. 外固定架治疗复杂开放性骨折的应用技术探讨[J]. 中国矫形外科杂志, 2005, 13(14): 1079-1081.
- Zhao W, Li H Q, Li W. The treatment of open fractures with external fixator[J]. The Chinese Journal of Orthopaedic Surgery, 2005, 13(14): 1079-1081.

(责任编辑: 冉明会)