

围产医学

DOI: 10.11699/cyxb20131010

绒毛膜羊膜炎与产前糖皮质激素双重暴露
对早产大鼠胎肺成熟与发育的影响

李娟, 罗欣, 杨中玫, 丁明霞, 漆洪波

(重庆医科大学附属第一医院妇产科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨不同程度绒毛膜羊膜炎(chorioamnionitis, CA)与产前糖皮质激素双重暴露对早产大鼠胎肺成熟及远期肺发育的影响。**方法:**36 只 SD 孕鼠随机分 6 组:生理盐水+地塞米松(A 组)、脂多糖 0.5 μg +地塞米松(B 组)、脂多糖 4.0 μg +地塞米松(C 组)、生理盐水+生理盐水(D 组)、脂多糖 0.5 μg +生理盐水(E 组)、脂多糖 4.0 μg +生理盐水(F 组)。孕 19 d 时每组每个羊膜腔内分别注射生理盐水、脂多糖 0.5、4.0 μg , 24 h 后分别肌注地塞米松 0.4 mg 和生理盐水。再 24 h 后剖宫取胎, 胎盘、胎膜行病检, 每组随机处死 6 只新生鼠, 胎肺行病检。实时荧光定量 PCR 测肺组织表面活性蛋白(surfactant protein, SP)A、B、C 及炎症细胞因子白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的 mRNA 相对水平。生后第 15 天(P15)肺组织切片做形态学观察。**结果:**(1)C、F 组胎鼠死亡率高于其他组而子鼠生存率低于其他组(P 均 <0.05)。(2)肺炎和 CA 病理评分 C、F 组最高, B、E 组次之, A、D 组最低(P 均 <0.05)。(3)SP-A、SP-C mRNAs 相对表达水平 D、F 组低于其余 4 组而 B 组最高(P 均 <0.05); SP-B mRNA 表达水平 D、E、F 组低于其余 3 组而 B、C 组最高(P 均 <0.05)。(4)IL-1 β mRNA 表达水平在 F 组最高($P<0.05$); TNF- α mRNA 表达水平在 C、F 组最高, A、D 组最低(P 均 <0.05)。(5)P15 时 C 组肺泡发育明显受抑。**结论:**孕鼠羊膜腔内注射不同剂量脂多糖可诱导不同程度的 CA 和肺炎, 组织学炎症程度随脂多糖剂量增高而加重; 轻中度 CA 和产前地塞米松双重暴露不会对围产期母子生存率造成不利影响, 不会抑制胎儿和新生儿生长, 炎症不被抑制反而协同诱导更显著的肺成熟; 重度 CA 和产前地塞米松双重暴露会带来不利影响, 尤其是增加支气管肺发育不良风险。

【关键词】绒毛膜羊膜炎; 脂多糖; 糖皮质激素; 大鼠; 肺成熟; 支气管肺发育不良

【中国图书分类法分类号】R722.1; R722.6; R725.6

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-04-15

Effects of chorioamnionitis and prenatal glucocorticoid on fetal lung maturation and development in preterm rats

LI Juan, LUO Xin, YANG Zhongmei, DING Mingxia, QI Hongbo

(Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To determine the effects of different degrees of chorioamnionitis(CA) and prenatal glucocorticoid on fetal lung maturation and development in preterm rats. **Methods:** Totally 36 pregnant SD rats were randomly assigned to 6 groups. A group: normal saline(NS)+dexamethasone(DEX); B group: lipopolysaccharide(LPS) 0.5 μg +DEX; C group: LPS 4.0 μg +DEX; D group: NS+NS; E group: LPS 0.5 μg +NS; F group: LPS 4.0 μg +NS. All groups underwent intraamniotic injection with NS, LPS(0.5 μg and 4.0 μg respectively) on gestational day 19; 24 h later, rats were intramuscularly injected with DEX 0.4 mg and NS respectively. After another 24 h, pathological inflammation of placenta, chorioamnion and fetal lung were observed. Surfactant protein A, B, C(SP-A, SP-B, SP-C) and interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNAs in lung were determined by quantitative real-time PCR(qRT-PCR). Lung morphologic observation was performed on postnatal day 15(P15). **Results:** ①fetal rat mortality in C, F groups were higher than that in other groups; rat survival rate in C, F groups were lower than that in other groups(P all <0.05). ②Pathological grading of pulmonary inflammation and CA: C and F groups were the highest, followed by B and E groups and A and D groups were the lowest(P all <0.05). ③Relative expression of SP-A, SP-C mRNAs: D and F groups were lower than other groups, B group was the highest(P all <0.05); relative expression of SP-B mRNA: D, E, F groups were lower than other groups, B and C groups were the highest(P all <0.05). ④Relative expression of IL-1 β mRNA: F group was the highest($P<0.05$). Relative expression of TNF- α mRNA: C and F groups were the highest while A and D groups were the lowest($P<0.05$). ⑤On P15, C group alveolarization was significantly inhibited. **Conclusions:** Different doses of intraam-

作者介绍: 李娟, Email: 592213263@qq.com,

研究方向: 母胎医学。

通信作者: 漆洪波, Email: qi_hongbo@yahoo.com.cn。

基金项目: 国家临床重点专科建设项目经费资助项目(编号: 201101ck ZD)。

niotic LPS could induce CA and fetal lung inflammation with different degrees. Histological inflammation aggravates with LPS dose increasing. Mild to moderate CA and antenatal DEX will not adversely affect the survival rate nor inhibit fetus and newborn growth. Inflammation was not suppressed but synergistically induced more significant lung maturation. Severe CA and prenatal DEX might cause adverse effects, particularly, increasing the risk of bronchopulmonary dysplasia.

【Key words】chorioamnionitis; lipopolysaccharide; glucocorticoid; rat; lung maturation; bronchopulmonary dysplasia

绒毛膜羊膜炎(chorioamnionitis, CA)是绒毛膜板、绒毛膜羊膜、脐带和羊水的炎性改变,在 70% 小于 30 周胎龄早产儿中可见,包括临床绒毛膜羊膜炎(clinical chorioamnionitis, CCA)和组织学绒毛膜羊膜炎(histologic chorioamnionitis, HCA)两类。流行病学研究证实暴露于 CA 的早产儿易并发胎儿炎症反应综合征和肺、脑、肠道等损伤^[1]。其中,肺部炎症能使肺对产后损伤因素如机械通气、感染和外源性表面活性物质替代治疗等的易感性增加,启动一种渐进性损伤导致支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)^[2]。然而,胎肺暴露于 CA 也能增加肺表面活性蛋白和脂质的合成,促进肺成熟,有利于减少呼吸窘迫综合征(respiratory distress syndrome, RDS)的发生^[3]。

产前糖皮质激素是临床用于促早产儿胎肺成熟的标准治疗,通过同步诱导和抑制多种基因,最终使肺表面脂质、表面活性蛋白增加,使肺间质变薄以增大潜在肺泡腔^[4-5],从而促进肺成熟。亦有资料显示产前糖皮质激素可抑制肺泡生长^[6],增加平均肺泡容积,减少总肺泡数,从而抑制胎肺发育。

现已证实 CA 和产前糖皮质激素均可以对新生儿呼吸系统产生两方面的影响,一是 RDS;二是 BPD。但他们之间关联是难以界定的,因受到许多因素的混淆,比如胎儿暴露于宫内炎症环境的时间和强度;从早产发动到分娩的间隔时间难于控制,孕母接受糖皮质激素用药的次数及剂量不尽相同等。对大多数孕妇而言,CA 是亚临床的,仅在组织学上发现胎盘和绒毛膜羊膜中存在多形核白细胞浸润。临床上最可能的情况是在孕母慢性亚临床 CA 的基础上叠加糖皮质激素的治疗。目前对二者的累积效应报道甚少,本研究旨在探索不同程度 CA 和产前糖皮质激素双重暴露对胎肺成熟和远期肺发育的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及准备

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(L2880;美国 Sigma),地

塞米松(dexamethasone, DEX H50021463;中国西南药业股份有限公司)。LPS 用 9% 无菌生理盐水(normal saline, NS)溶解,分装(0.5、4.0 $\mu\text{g}/40\ \mu\text{l}$),DEX 用 NS 稀释,分装(0.4 mg/0.1 ml),保存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 。

1.2 实验动物及模型制作

清洁级成年 SD 大鼠雌性 36 只(体质量 270~300 g)、雄性 10 只(体质量 270~310 g),购自重庆医科大学实验动物中心。SPF 级动物房保持温湿度恒定,每天照明 12 h(早 8:00~晚 8:00),大鼠自由摄食饮水。适应环境 3 d 后,每天 17:00 按雄雌 1:3 合笼,次晨阴道涂片找精子,见精子当天记为 E1,足月妊娠平均为 E22.5,出生当天记为 P0。

36 只孕鼠随机分为 6 组($n=6/\text{组}$):NS+DEX(A 组),LPS 0.5 μg +DEX(B 组),LPS 4.0 μg +DEX(C 组),NS+NS(D 组),LPS 0.5 μg +NS(E 组),LPS 4.0 μg +NS(F 组)。在 E19 时,无菌准备后予乙醚吸入麻醉,孕鼠下腹部作一长 3~4 cm 的横切口暴露子宫。用一次性 1 ml 空针于各组孕鼠羊膜腔内分别注射 NS、LPS 0.5 μg 和 LPS 4.0 μg ,均 40 μl 。最靠近左卵巢的羊膜腔最先注射,然后按顺时针方向依次注射其余羊膜腔(内含死胎、畸胎或明显胎儿生长受限的排除),每只孕鼠最多注射 10 个羊膜腔以防止 LPS 的累积毒性致孕鼠死亡。将子宫还纳腹腔,腹壁双层缝合。羊膜腔注射 24 h 后,于各组孕鼠后肢根部给予肌肉注射 DEX 0.4 mg(按体表面积折算相当于临床早产孕妇常用量)或 NS,均 0.1 ml。监测孕鼠活动、摄食、阴道流血和感染等情况。各组孕鼠实验前体质量无统计学差异。

1.3 注射后处理及取材

肌注后 24 h,在乙醚吸入麻醉下对孕鼠实施剖宫产。按注射顺序依次娩出胎鼠(先前未予羊膜腔内注射的舍弃)。所有胎鼠在麻醉开始后 5 min 内娩出,擦净口鼻周围羊水,刺激身体诱导张口呼吸,记录宫内死亡数。新生鼠立即放于保温箱中,不予额外供氧或机械通气。复温 1 h 后,新生鼠交与代养大鼠(每只代养大鼠负责同组新生鼠 8~10 只)。

P0 时每组每窝随机留取 4、5 个完整的胎盘、胎膜分别置于 10% 福尔马林中固定,用于病检。P0、P15 时每组随机处死 6 只新生鼠,取左肺叶同样于 10% 福尔马林中固定;P0 取的右肺叶分装于灭酶 EP 管,置液氮中过夜后冻存于 $-80\ ^\circ\text{C}$ 。

1.4 研究方法

1.4.1 实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测 胎肺组织中表面活性蛋白(surfactant protein, SP)-A、SP-B、SP-C、白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)mRNAs 的表达 100 mg 胎肺组织于液氮中研磨成粉,按 RNAwase Plus(大连宝生物)

表 1 各组孕鼠、胎鼠死亡率和新生鼠总体生存率

Tab.1 Dams mortality, fetal rats mortality and the overall survival rate of newborn rats

指标 (%)	A 组	B 组	C 组	D 组	E 组	F 组	χ^2 值	P 值
孕鼠死亡率	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	33.33 (2/6)	0.00 (0/6)	0.00 (0/6)	16.67 (1/6)	5.250	0.395
胎鼠死亡率	3.33 (2/60)	1.67 (1/60)	32.50 (13/40) ^a	0.00 (0/60)	1.67 (1/60)	28.00 (14/50) ^b	62.655	0.000
子鼠总体生存率	98.97	97.96	75.48 ^c	100.00	98.99	72.92 ^d	57.010	0.000

注: C 组与 A 组、B 组、D 组、E 组比较, a, P 分别为 0.001、0.000、0.000、0.000; F 组与 A 组、B 组、D 组、E 组比较, b, P 分别为 0.002、0.001、0.000、0.001, 即均 <0.003 (调整检验水准); C 组与 A 组、B 组、D 组、E 组比较, c, P 分别为 0.000、0.000、0.000、0.000, 即均 <0.05 ; F 组与 A 组、B 组、D 组、E 组比较, d, P 分别为 0.000、0.000、0.000、0.000, 即均 <0.05

说明书提取组织总 RNA。逆转录反应根据 Primescript[®] RT Reagent Kit with gDNA Eraser (宝生物) 说明书操作。引物由宝生物设计及合成, 序列如下: SP-A 上游为 5'-TACCAG-AGCAGG-AGGCAACAT-3', 下游为 5'-GTAGTTCACAGAA-GCCCCAT-CC-3'; SP-B 上游为 5'-ATGTCTACCTGCCCC-TGGTTATC-3', 下游为 5'-GGCTTCTGCTCTGGCTTACTCT-3'; SP-C 上游为 5'-GTGGTTGTGGTGGTAGTCCTTGT-3', 下游为 5'-GTAGCGATGCTGTCTGTGTGTTT-3'; IL-1 β 上游为 5'-GAAGCTGTGGCAGCTACCTATGTCT-3', 下游为 5'-CTCTGCTTGAGAGGTGCTGATGTAC-3'; TNF- α 上游为 5'-TACTGAACCTTCGGGGTGATCGGTCC-3', 下游为 5'-CAGC-CTTGTCCTTGAAGAGAACC-3'; 内参 GAPDH 上游为 5'-TATGACTCTACCCACGGCAAGT-3', 下游为 5'-ATACTCAG-CACC-AGVATCACC-3'。在 Thermal Cycler Dice[®] Real Time System (美国 Bio-Rad) 上进行 DNA 扩增和分析, 程序如下: (1) 预变性: 95 $^{\circ}\text{C}$, 60 s, 循环 1 次; (2) PCR 反应: 95 $^{\circ}\text{C}$, 10 s; 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s, 循环 40 次。根据融解曲线判断反应特异性, 按 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析基因相对表达量。

1.4.2 组织病理分析 前述留取组织于 10% 福尔马林中固定 24 h 以上, 常规石蜡包埋, 4 μm 连续切片, HE 染色后光镜下观察组织病理学变化。

1.5 统计方法

采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计分析。多个率比较用 $R \times C$ 表卡方检验, 多重比较采用 Bonferroni 法调整检验水准为 0.003。总体生存率用 Kaplan-Meier 法估计, 组间生存率比较用 Log rank 检验; 正态分布计量数据多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较根据方差是否齐性分别采用 LSD- t 检验或 Dunnett's T3 检验; 多组间炎症病理评分比较用 Kruskal-Wallis 检验, 两两比较用 Mann-Whitney 检验。炎症病理评分与 LPS 剂量做 Spearman 相关分析。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组孕鼠、胎鼠和子鼠的存活情况

2.1.1 孕鼠围产期一般情况 36 只孕鼠在孕期均正常摄食和活动, 无死亡。C 组有 2 只、F 组有 1 只孕鼠于给药后 48 h 内死亡, 死前发生严重流产, 其子鼠均未纳入后续研究。

2.1.2 胎鼠死亡率 剖宫时, 各组胎鼠死亡率见表 1。C、F 组

的胎鼠死亡率明显高于其余 4 组 (P 均 <0.003), 而 2 组之间无统计学差别 ($P > 0.05$)。其余 4 组间两两相比, 胎鼠死亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.1.3 新生鼠总体生存率 到 P15 为止, 各组新生鼠的总体生存率见表 1。C、F 组的新生鼠总体生存率明显低于其余 4 组 (P 均 <0.05), 而 2 组本身之间无统计学差别 ($P > 0.05$)。其余 4 组间两两相比, 新生鼠总体生存率差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组胎肺、胎膜、胎盘等组织的炎症病理改变及评分

建立一个评分系统对组织病理炎症程度进行分级 (表 2), 各组随机选取胎肺、胎膜及胎盘切片各 15 张评分 (图 1), A 组和 D 组、B 组和 E 组、C 组和 F 组分别做 2 组间比较均未发现肺炎和 CA 病理评分有差异 ($P > 0.05$); 肺炎和 CA 的病理评分 C 组和 F 组最高, B 组和 E 组次之, A 组和 D 组最低 ($P < 0.05$) (图 2)。炎症病理评分随羊膜腔内注射 LPS 剂量的增加而增加 (肺炎、CA r_s 分别 = 0.810, 0.752, P 均 = 0.000)。

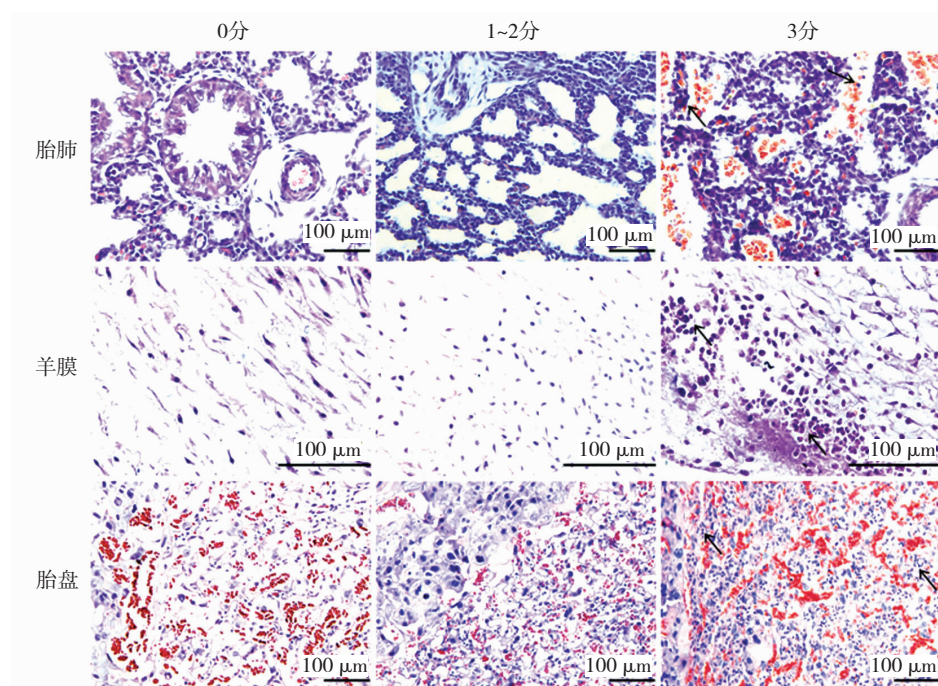
表 2 炎症评分系统

Tab.2 Gading system of histological inflammation

评分	病理改变
胎肺炎症	
0	无病理表现
1	少数单个中性粒细胞 (polymorphonuclear leukocyte, PMN) 散在浸润, 无坏死
2	一些或者小群 PMN 散在浸润, 轻微渗出, 偶有充血或出血
3	大量 PMN 广泛浸润或群集, 肺泡腔中见大量渗出, 出血; PMN 围绕血管壁浸润或血管腔中可见
CA	
0	无病理表现
1	CA-轻度: 单个 PMN 散在浸润羊膜、绒毛膜和 (或) 胎盘实质, 5 个/高倍镜视野 $\leq$ PMN < 10 个/高倍镜视野
2	CA-中度: 多个或小群 PMN 散在浸润羊膜、绒毛膜和 (或)
3	胎盘实质, PMN ≥ 10 个/高倍镜视野
	CA-重度: 大量 PMN 广泛浸润羊膜、绒毛膜和 (或) 胎盘实质, 可见微脓肿

2.3 各组新生鼠肺组织表面活性蛋白基因和炎症细胞因子基因的表达情况

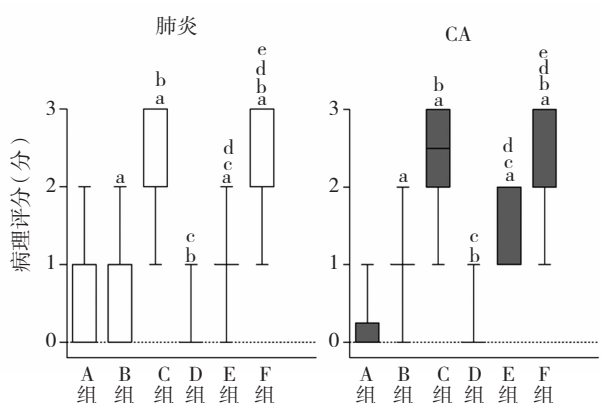
2.3.1 表面活性蛋白基因表达 肺表面活性蛋白主要包括 4 种: SP-A、SP-B、SP-C 和 SP-D, 其中最具有生物物理学活性的成分是 SP-B 和 SP-C, 可将气液交界面的张力降到很低水平, 维持正常呼吸。SP-A mRNA 表达水平: A 组和 D 组之



0分:各组织结构正常,无炎症病理改变;1~2分:各组织中有少量炎细胞散在浸润,组织结构完整;3分:各组织中见大量 PMN 广泛浸润,局部聚集成团;肺间质增宽,肺泡内带状水肿、出血,伴局灶性肺不张;胎盘迷路带中母血间隙和胎儿血管内均见较多炎细胞。箭头为 PMN

图1 P0 时胎肺、羊膜、胎盘组织各级炎症评分的典型切片 (HE) 光镜示意图 (胎肺、胎盘 200×;羊膜 400×)

Fig.1 Tissues of fetal lung, amnion and placenta obtained on P0 and HE representative sample of each inflammation score (fetal lung, amnion, 200×; placenta, 400×)



$n=15/\text{组}$

肺炎:A组与B组、C组、E组、F组比较,a, P 分别为0.039、0.000、0.016、0.000;B组与C组、D组、F组比较,b, P 分别为0.000、0.001、0.000;C组分别与D组、E组比较,c, P 均为0.000;D组分别与E组、F组比较,d, P 均为0.000;E组与F组比较,e, $P=0.000$

CA:A组与B组、C组、E组、F组比较,a, P 分别为0.003、0.000、0.000、0.000;B组与C组、D组、F组比较,b, P 均为0.000;C组分别与D组、E组比较,c, P 分别为0.000、0.001;D组分别与E组、F组比较,d, P 均为0.000;E组与F组比较,e, $P=0.000$

图2 各组肺炎和CA病理评分箱图

Fig.2 Pathology scores of fetal lung inflammation and CA

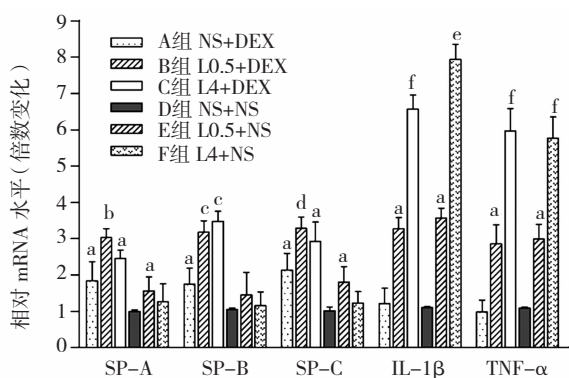
间无明显差异($P>0.05$),但二者均低于其余4组(P 均 <0.05);B组的表达水平最高(P 均 <0.05)。SP-B mRNA 表达水平:D

组、E组和F组之间无明显差异($P>0.05$),但三者均低于其余3组(P 均 <0.05);B组和C组的表达水平最高(P 均 <0.05)。SP-C mRNA 表达水平:组间比较情况类似于 SP-A mRNA。羊膜腔内注射 LPS 0.5 μg 上调 SP-A、SP-C mRNAs 的表达,但并未影响 SP-B mRNA 的表达;羊膜腔内注射 LPS 4.0 μg 有上调 SP-A、SP-B、SP-C mRNAs 表达的趋势,但尚缺乏统计学意义。无论羊膜腔内是否注射 LPS,肌肉注射 DEX 能提高 SP-A、SP-B、SP-C mRNAs 相对表达水平,但若预先羊膜腔内注射 LPS,DEX 肌注会诱导 SP-A、SP-B、SP-C mRNAs 表达更高(图3)。

2.3.2 炎性细胞因子基因表达 IL-1 β mRNA 表达水平:A组和D组、B组和E组之间做2组间比较无统计学差异($P>0.05$),但均低于其余2组(P 均 <0.05),F组的表达水平最高(P 均 <0.05)。TNF- α mRNA 表达水平:C组和F组最高,B组和E组次之,A组和D组最低($P<0.05$)。炎性细胞因子 IL-1 β 、TNF- α mRNAs 的表达水平受羊膜腔内注射 LPS 的诱导,LPS 高剂量较小剂量诱导能力更强。肌注 DEX 并未明显抑制炎性因子 mRNAs 的表达(图3)。

2.4 各组新生鼠肺发育的情况

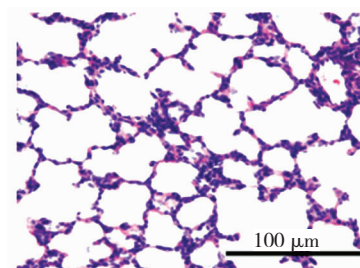
肺形态学观察:各组胎肺组织于 P0 时观察未见明显组织学成熟度差异,而 P15 时可见 C 组肺泡发育明显受抑制,组织学成熟度低于 A 组和 B 组,后二者之间无明显区别(图4)。



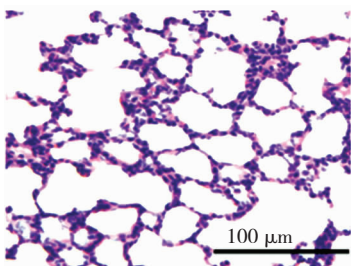
SP-A: 与 D 组、F 组比较, $a, P < 0.05$; 与 A 组、C 组、D 组、E 组、F 组比较, $b, P < 0.05$ 。SP-B: 与 D 组、E 组、F 组比较, $a, P < 0.05$; 与 A 组、D 组、E 组、F 组比较, $c, P < 0.05$ 。SP-C: 与 D 组、F 组比较, $a, P < 0.05$; 与 A 组、C 组、D 组、E 组、F 组比较, $d, P < 0.05$ 。IL-1 β : 与 A 组、D 组比较, $a, P < 0.05$; 与 A 组、B 组、D 组、E 组比较, $f, P < 0.05$; 与 A 组、B 组、C 组、D 组、E 组比较, $e, P < 0.05$ 。TNF- α : 与 A 组、D 组比较, $a, P < 0.05$; 与 A 组、B 组、D 组、E 组比较, $f, P < 0.05$ 。

图 3 各组 P0 时胎肺组织表面活性蛋白基因和炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α 基因的相对表达水平

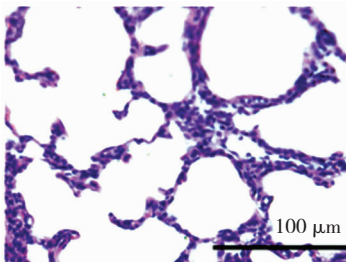
Fig.3 Relative mRNA expression of SPs and IL-1 β , TNF- α in fetal lung tissues on P0



A. A 组



B. B 组



C. C 组

A 组、B 组可见较多次级肺泡隔,成熟度较高;C 组肺泡壁增厚,次级肺泡隔较少,肺泡腔大,肺泡数少,成熟度较低

图 4 肺组织 P15 形态学光镜观察 (HE, 200 $\times$)

Fig.4 Morphology observation on lung tissues on P15 by light microscope (HE, 200 $\times$)

3 讨论

3.1 不同剂量 LPS 单独及叠加 DEX 后对孕鼠、胎鼠和子鼠的生存情况的影响

在本研究中,无论是否叠加 DEX, LPS 大剂量 4.0 μg 组的孕鼠死亡率及胎鼠死亡率均最高,子鼠生存率最低。影响围产期母子生存的关键因素是 LPS 剂量而非 DEX。

3.2 不同剂量 LPS 单独使用对孕鼠 HCA,胎鼠肺炎和肺成熟的诱导

LPS 是革兰氏阴性菌的细胞壁成分,进入体内后通过 LPS/LBP/CD14 复合体与 Toll 样受体 4-髓样分化蛋白 2 (TLR4-MD2) 结合,经 MyD88 依赖途径及非依赖途径激活细胞内信号级联放大^[7],最终引起核因子- κB 从细胞质移位到细胞核内,结合到目标基因的启动子区域,从而诱导促炎症细胞因子如 IL-1、IL-6、TNF- α 等的基因转录。LPS 是 CA、肺炎和肺成熟的有力诱导剂,胎儿通过呼吸道直接接触羊水水中的 LPS 和(或)炎症介质来启动信号通路诱导肺成熟。Kallapur 等^[8]于孕羊分娩(119~125 d 胎龄时)前 5 h~25 d 予以羊膜腔内注射 20 mg LPS。给药后 5 h 羊膜或绒毛膜上出现炎症细胞浸润,持续 25 d;给药后 5~15 h,羊膜或绒毛膜的 IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α mRNAs 升高;给药后 1~2 d,胎肺细胞因子 mRNAs 也增高,并持续升高数周;7 d 后肺容积和肺泡饱和卵磷脂含量增加,提示单剂量 LPS 羊膜腔内注射先诱导绒毛膜、羊膜和胎肺炎症,之后才诱导胎肺成熟。

在孕晚期(E19)的大鼠羊膜腔内单次注射 LPS,发现小剂量 0.5 μg 在组织学上可诱导出轻到中度的肺炎和 CA,炎症细胞因子 IL-1 β 、TNF- α mRNAs 的表达水平升高,而反映肺成熟度的 SP-A、SP-B 和 SP-C mRNAs 相对表达量在所有组中最高。大剂量 4.0 μg 诱导重度肺炎和 CA,IL-1 β 、TNF- α mRNAs 的表达水平最高,SP mRNAs 相对表达水平与 NS 组近似。以上结果表明不同剂量 LPS 羊膜腔内注射可以诱导不同程度的肺炎和 HCA,组织学炎症程度随着 LPS 剂量的增高而加重;炎症程度与诱导肺成熟的强度相关,轻、中度炎症诱导肺成熟较重度炎症更显著。

3.3 不同剂量 LPS 叠加 DEX 对孕鼠 HCA,胎鼠肺炎和肺成熟的诱导

LPS 叠加 DEX 后组织学肺炎和 HCA 的评分无

明显改变,IL-1 β 、TNF- α mRNAs 的表达水平亦未受影响。单独肌肉注射 DEX 就能提高 SP mRNAs 相对表达水平,但若预先羊膜腔内注射 LPS,则会诱导 SP mRNAs 更高水平表达。可见 DEX 不仅没有抑制炎症,反而与 LPS 协同作用诱导更强烈的肺成熟效应,尤其以叠加小剂量 LPS 明显。类似地,对绵羊模型的研究亦证实产前激素与 CA 对肺成熟有协同促进效应^[5,9];Goldenberg 等^[10]对 457 名在 23~32 周之间出生的婴儿进行回顾性研究,证实有宫内感染或炎症证据的母亲,产前糖皮质激素使用有利于降低 RDS 且不会令新生儿结局(新生儿死亡、脑室内出血)恶化。

3.4 不同剂量 LPS 单独及叠加 DEX 后对子鼠肺发育的影响

人类典型肺发育分为 5 期:胚胎期(3.5~7 周)、假腺体期(5~17 周)、小管期(16~26 周)、囊泡期(24~36 周)和肺泡期(36 周~生后 2 年)。鼠科动物和人类肺发育有很大的共同性,上述 5 期分别对应于胚胎 9.5~14.2 d、14.2~16.5 d、16.5~17.5 d、17.5 d~产后 4 d、产后 4~21 d^[11]。现今以炎症等宫内不良环境导致的以肺泡发育受阻和肺微血管发育不良为主的新型 BPD 越来越多。在以往对羊和兔模型的研究中,产前暴露于内毒素和 DEX 都会抑制肺泡分隔,出现类似 BPD 的病理变化^[12-13],但二者的累积效应鲜有报道。本研究发现 LPS 小剂量 0.5 μ g 叠加 DEX 不会导致 P0、P15 肺组织结构异常,未见肺泡化受阻、肺泡内水肿或纤维性变,肺组织学成熟度也与叠加 NS 组无差异。但 LPS 大剂量 4.0 μ g 叠加 DEX 则导致 P0 时大量 PMN 广泛浸润于肺泡和肺间质,并局部聚集成团,肺间质明显增宽,而 P15 见肺泡发育受抑制,肺泡数目降低、体积变大、肺泡膈减少。这提示,在重度 CA 存在时,产前糖皮质激素的使用可能是 BPD 的一个危险因素。

总之,由于受到产前产后诸多因素的干扰,同时受限于缺乏足够的人体肺标本,目前就胎肺成熟和 BPD 的绝大多数研究结果只能来自动物模型。本研究发现大鼠羊膜腔内注射不同剂量 LPS 可诱导程度不同的 HCA 和肺炎,组织学炎症程度随 LPS 剂量增高而加重。轻、中度 HCA 和产前 DEX 双重暴露不会对围产期母子生存率造成不利影响,炎症不被抑制反而协同诱导更显著的肺成熟效应;然而重

度 HCA 和产前 DEX 双重暴露则会带来不利影响,尤其是增加 BPD 风险。

参 考 文 献

- [1] Thomas W, Speer C P. Chorioamnionitis: important risk factor or innocent bystander for neonatal outcome? [J]. Neonatology, 2011, 99(3): 177-187.
- [2] Kallapur S G, Ikegami M. Physiological consequences of intrauterine insults [J]. Paediatr Respir Rev, 2006, 7(2): 110-116.
- [3] Andrews W W, Goldenberg R L, Faye-Petersen O, et al. The Alabama preterm birth study: polymorphonuclear and mononuclear cell placental infiltrations, other markers of inflammation, and outcomes in 23- to 32-week preterm newborn infants [J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 195(3): 803-808.
- [4] Wade K C, Guttentag S H, Gonzales L W, et al. Gene induction during differentiation of human pulmonary type II cells in vitro [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2006, 34(6): 727-737.
- [5] Willet K E, Jobe A H, Ikegami M, et al. Antenatal endotoxin and glucocorticoid effects on lung morphometry in preterm lambs [J]. Pediatr Res, 2000, 48(6): 782-788.
- [6] Jobe A H. Antenatal factors and the development of bronchopulmonary dysplasia [J]. Semin Neonatol, 2003, 8(1): 9-17.
- [7] Harju K, Ojaniemi M, Rounioja S, et al. Expression of toll-like receptor 4 and endotoxin responsiveness in mice during perinatal period [J]. Pediatr Res, 2005, 57(5Pt1): 644-648.
- [8] Kallapur S G, Willet K E, Jobe A H, et al. Intra-amniotic endotoxin: chorioamnionitis precedes lung maturation in preterm lambs [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001, 280(3): L527-536.
- [9] Jobe A H, Newnham J P, Willet K E, et al. Effects of antenatal endotoxin and glucocorticoids on the lungs of preterm lambs [J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 182(2): 401-408.
- [10] Goldenberg R L, Andrews W W, Faye-Petersen O M, et al. The Alabama preterm birth study: corticosteroids and neonatal outcomes in 23- to 32-week newborns with various markers of intrauterine infection [J]. Am J Obstet Gynecol, 2006, 195(4): 1020-1024.
- [11] Ahlfeld S K, Conway S J. Aberrant signaling pathways of the lung mesenchyme and their contributions to the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2012, 94(1): 3-15.
- [12] Jobe A H, Bancalari E. Bronchopulmonary dysplasia [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 163(7): 1723-1729.
- [13] Gras-Le Guen C, Denis C, Franco-Montoya M L, et al. Antenatal infection in the rabbit impairs post-natal growth and lung alveolarisation [J]. Eur Respir J, 2008, 32(6): 1520-1528.

(责任编辑:冉明会)