

羊膜腔内注射肺表面活性物质对宫内感染致肺损伤胎兔肺表面活性相关蛋白 A 表达的影响

吴 静^{1,3}, 刘冬云², 刘 敬³, 封志纯³ (1. 南方医科大学附属何贤纪念医院新生儿科, 广州 511400; 2. 青岛大学医学院附属医院新生儿科, 山东青岛 266003; 3. 北京军区总医院附属八一儿童医院新生儿中心 100700)

【摘要】 目的 探讨羊膜腔内注射肺表面活性物质(PS)对宫内感染致肺损伤胎兔肺组织肺表面活性相关蛋白 A(SP-A)表达的影响。**方法** 选取健康成年育龄日本大耳白兔 19 只, 成功受孕后随机分为对照组、细菌组、细菌 + PS 组。建立宫内感染模型。对照组和细菌组按胎龄又分为 21、22、23、24、26 d 5 个亚组, 细菌 + PS 组分为 24 d、26 d 2 个亚组。细菌组宫内注射大肠埃希杆菌(*E. coli*)菌株, 细菌 + PS 组宫内注射 *E. coli* 菌株, 同时胎兔羊膜腔内注射 PS 200 mg/kg, 对照组宫内注射生理盐水。模型建成后分别在各时间点对孕兔行剖宫产, 杀取胎兔后取肺组织, 以 TGF- β 1 兔多克隆抗体为一抗, 用免疫组织化学方法检测其肺组织内 SP-A 表达; 用 RT-PCR 检测其 SP-A mRNA 表达; 用 Western blotting 方法检测其 SP-A 蛋白表达; 应用 SPSS13.0 软件进行统计学处理。**结果** 免疫组化结果显示不同组间 SP-A 表达差异有统计学意义($F=237.865, P=0.000$), 细菌组 SP-A 表达明显低于对照组及细菌 + PS 组。SP-A mRNA、蛋白表达则在细菌感染后明显下降, 差异具有统计学意义($F=1101.741, P=0.000$)。注射 PS 后 SP-A 表达增强, 高于细菌组($P=0.000$), 与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 羊膜腔内感染可导致 SP-A 异常低表达, 与新生儿呼吸窘迫综合征(RDS)发生密切相关; 羊膜腔内注射 PS 后 SP-A 表达上调, 表明羊膜腔内注射 PS 可做为一种安全、有效的预防治疗手段, 对降低新生儿发生呼吸窘迫综合征等肺疾病具有重要意义。

【关键词】 肺表面活性物质; 宫内感染; 肺损伤; 肺表面活性相关蛋白 A

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2012.13.014 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)13-1565-03

Effect of intra-amniotic administration of pulmonary surfactant on expression of SP-A in fetus lung injury in rabbit model with intrauterine infection WU Jing^{1,3}, LIU Dong-yun², LIU Jing³, FENG Zhi-chun³ (1. Department of Neonatology, He Xian Memorial Hospital Affiliated to Southern Medical University, Guangzhou, 511400, China; 2. Department of Neonatology, the Affiliated Hospital of Medical College, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266003, China; 3. Bayi Children's Hospital, General Hospital of Beijing Military District, Beijing 100700, China)

【Abstract】 Objective To investigate effect of intra-amniotic administration of pulmonary surfactant on expression of SP-A in fetus lung injury in rabbit model with intrauterine infection. **Methods** Nineteen Japanese albino pregnant rabbits were divided into 3 groups: bacteria group, bacteria + PS group and control group. The rabbit models of fetus lung injury with intrauterine infection were established. In the bacteria group, the rabbits were injected with intrauterine intestine crassum bacterium, and then were subdivided into 21 d, 22 d, 23 d, 24 d, 26 d fetation group respectively; in the bacteria + PS group, the rabbits were injected with intrauterine bacterium coli commune and amniotic intracavitary administration extrinsic source PS 200 mg/kg, and then were subdivided into 24 d and 26 d fetation group respectively. In the control group, the rabbits were injected with 0.9% sodium chloride, and then were subdivided with the same criteria as that in the bacteria group. All the rabbits were delivered by cesarean section and the fetus were taken. Lung tissues of fetus rabbits from each rabbit were excised respectively. Immunohistochemistry method was used to detect SP-A expressions in lung tissues. The expression of SP-A mRNA in lung tissues were detected by Reverse transcription-Polymerase chain reaction and SP-A protein by Western blot. Data were analyzed by SPSS 13.0 software. **Results** Compared with the control group, the expression of SP-A in bacteria group was significantly decreased, with significant differences ($F=237.865, P=0.000$). The expression of SP-A mRNA and protein in bacteria group was significantly lower than those of the control group ($F=1101.741, P=0.000$), which in PS group was higher than bacteria groups ($P>0.05$). **Conclusion** The expression of SP-A decreased after infection, and intracavitary administration PS can lead to the increase of SP-A, which indicate that replacement therapy of PS can increase the expression of SP-A, and this is a useful method to prevention NRDS for postnatal.

【Key words】 pulmonary surfactant; intrauterine infection; lung injury; SP-A

肺表面活性物质(PS)是由肺泡Ⅱ型上皮细胞(AECⅡ)合成的一种含丰富磷脂蛋白的复合体, PS发生变化是新生儿呼

吸窘迫综合征(NRDS)、肺损伤等肺疾病发病的重要机制之一。肺表面活性相关蛋白 A(SP-A)具有参与 PS 的分泌、代

谢、再利用和使肺表面磷脂层扩散的作用,同时在肺组织中还起着非常重要的天然免疫防御作用。已有研究表明 SP-A 与上述疾病密切,并且与疾病严重程度呈正相关。本研究利用羊膜腔内感染动物模型,探讨感染环境暴露下及补充外源性 PS 后对 SP-A 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 菌液准备 取大肠埃希杆菌(E. coli)标准菌株(ATCC 25922 菌株,中国药品生物制品检定所)接种于血平板,37℃培养 16~18 h,得到纯化的 E. coli,用生理盐水稀释,通过麦氏比浊法将菌液进一步稀释至 10⁴/mL。

1.2 动物及主要试剂 健康成年育龄的雌性日本大耳白兔 19 只[北京百尔康纳特实验兔繁育生物技术开发有限公司,动物许可证号 SCXK(京)2005-0011],体质量 2 500~4 000 g。一抗:兔多克隆抗体 SP-A、即用型 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司)。引物序列:Primer5.0 软件设计(恒博和泰,北京)。BCA 蛋白定量试剂盒(Pierce,美国)。猪肺磷脂注射液(固尔苏,PS,意大利凯西制药有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 动物模型建立 19 只雌性大耳白兔于发情期与雄兔合笼交配 1 次,以交配后 1 d 定为妊娠第 1 天。妊娠期间自由进食和饮水。细菌组(*n*=10):宫内注射稀释后的 E. coli 0.1 mL,分 21、22、23、24、26 d 5 个亚组,每组 2 只孕兔。细菌+PS 组(*n*=4):宫内注射稀释后的 E. coli,同时胎兔羊膜囊内注射 PS 200 mg/kg,分 24、26 d 2 个亚组。对照组(*n*=5):宫内注射生理盐水,组别设置同细菌组。

1.3.2 标本采集及处理 按以上实验分组,分别在各个时间点严格无菌操作下行剖宫术,胎兔剖宫取出后,断头法放血处死,无菌操作下开胸,迅速取右上肺放入 RNA 保存液中,4℃冰箱过夜后吸出 RNA 保存液,置-80℃冰箱内保存,以备提取总 RNA,右肺下叶用 PBS 冲洗干净后放入干燥 EP 管中,置-80℃冰箱内保存,以备提取总蛋白;左下肺放入放入 4%的多聚甲醛溶液中,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,切片后行免疫组织化学染色。

1.3.3 免疫组织化学染色 常规脱蜡,抗原修复,3%过氧化氢溶液室温处理后滴加 5%BSA 封闭液,兔多克隆抗体一抗 4℃过夜,冲洗后滴加单克隆小鼠抗兔 IgG,37℃ 20 min 后滴加 SABC,DAB 试剂盒显色,苏木素轻度复染,脱水,透明,封

片。利用高分辨率成像系统对免疫组化切片在 400 倍视野下拍照,每张切片随机选择 5 个区域,以胞浆有棕黄色或黄色颗粒沉着为阳性细胞。应用美国 Image Pro Plus 5.0 图像分析系统,测定去除背景光密度值后所有阳性细胞 IOD 值。

1.3.4 肺组织 SP-A mRNA 的表达 采用 RT-PCR 技术,以 Tizol 试剂盒提取总 RNA,逆转录合成 cDNA 后进行 PCR 扩增,电泳与半定量分析,紫外灯下观察结果并拍照。

1.3.5 肺组织 SP-A 蛋白的表达 待测肺标本加入组织蛋白裂解液,用组织匀浆器在 4 度冰上操作充分粉碎,12 000 g 离心 15 min 后留取上清,BCA 蛋白质浓度测定试剂盒进行蛋白质定量。等量的总蛋白(10 μg/泳道)上样进行电泳(12% SDS-PAGE),采用 ECL 试剂盒进行显色反应,紫外灯下观察结果。采用凝胶图像分析系统对电泳条带扫描后行灰度分析。

1.4 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS13.0 软件完成,采用析因设计资料的方差分析和单因素方差分析,组间多重比较用 SNK 法,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化结果 胎肺组织 SP-A 表达于呼吸道无纤毛柱状上皮细胞、终末细支气管的立方状上皮细胞,定位于胞浆;至囊泡期后可见 SP-A 同时在 AECⅡ细胞胞浆中表达,阳性细胞数量增多,反应程度无明显变化,支气管上皮的无纤毛柱状上皮表达强于 AECⅡ,可见多个阳性细胞成簇分散于支气管上皮。经析因方差分析,结果显示不同组间差异有统计学意义(*F*=237.865,*P*=0.000),细菌组 SP-A 表达低于对照组及细菌+PS 组。不同胎龄之间差异无统计学意义(*F*=0.314,*P*=0.867),胎龄与组别之间不具交互作用(*F*=0.765,*P*=0.580),表 1。

2.2 胎肺组织 SP-A mRNA 表达 羊膜腔内细菌感染后,SP-A 表达明显下降。经析因方差分析,结果显示不同组间差异有统计学意义(*F*=1101.741,*P*=0.000),细菌组 SP-A mRNA 表达明显低于对照组及细菌+PS 组。不同胎龄之间差异具有统计学意义(*F*=62.410,*P*=0.000),胎龄与组别之间有交互作用(*F*=46.369,*P*=0.000)。进一步分析单独效应,结果显示在固定组别因素各水平条件下,不同胎龄之间比较可见细菌组、对照组差异具有统计学意义(*P*<0.05),而细菌+PS 组差异无统计学意义(*P*>0.05)。在固定胎龄因素各水平条件下,不同组别间差异均有统计学意义(*P*<0.01)。见表 2。

表 1 各组不同胎龄胎肺组织内 SP-A 的 IOD 比较($\bar{x} \pm s, n=5$)

分组	胎龄					合计	<i>F</i>	<i>P</i>
	21 d	22 d	23 d	24 d	26 d			
细菌组	1 262±288	1 200±184	1 531±253	1 371±318	1 324±208	1 338±260	1.216	0.335
细菌+PS 组	—	—	—	3 326±259	3 203±664	3 265±480	0.148	0.711
对照组	3 429±156	3 405±190	3 382±277	3 261±390	3 648±659	3 450±357	0.527	0.717
合计	2 369±1 185	2 302±1 176	2 457±1 007	2 679±1 001	2 725±1 162	2 539±1 080	0.314 ^a	0.867 ^a
<i>F</i>	261.605	346.472	121.470	64.451	24.815	237.865 ^a	0.765 ^b	0.580 ^b
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000 ^a	—	—

注:^a 为主效应;^b 为交互效应,—表示无数据。

2.3 胎肺组织 SP-A 蛋白表达 经析因方差分析,结果显示不同组间差异有统计学意义(*F*=60.206,*P*=0.000),细菌组 SP-A 蛋白表达明显低于 PS 组和对照组。不同胎龄之间差异

无统计学意义(*F*=0.391,*P*=0.815),胎龄与组别之间有交互作用(*F*=4.442,*P*=0.001)。进一步分析单独效应,结果显示在固定组别条件下,不同胎龄之间比较可见细菌组、对照组差

异无统计学意义($P>0.05$),而细菌+PS 组差异具有统计学意义($P=0.000$)。在固定胎龄条件下,不同组别间差异均有统计学意义($P>0.012$)。在细菌组内 SP-A 表达除 26 d 略高

于 21 d 外,其他各时间点相比差异无统计学意义($P>0.05$)。PS 注射后 SP-A 表达增强,与对照组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 2 各组不同胎龄肺组织中 SP-A mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s,n=10$)

胎龄	组别			合计	F	P
	细菌组	细菌+PS 组	对照组			
21 d	1.412±0.035	—	2.221±0.093	1.817±0.421	663.162	0.000
22 d	1.407±0.044	—	2.232±0.076	1.820±0.427	877.143	0.000
23 d	1.414±0.057	—	2.951±0.163	2.183±0.797	791.501	0.000
24 d	1.505±0.157	2.741±0.228	2.939±0.242	2.395±0.677	134.358	0.000
26 d	1.422±0.040	2.737±0.025	3.347±0.249	2.502±0.829	456.341	0.000
合计	1.432±0.085	2.739±0.158	2.738±0.479	2.194±0.721	1 101.741 ^a	0.000 ^a
F	2.601	0.003	75.962	62.410 ^a	46.369 ^b	0.000 ^b
P	0.048	0.954	0.000	0.000 ^a	—	—

注:^a 为主效应;^b 为交互效应,—表示无数据。

表 3 各组不同胎龄肺组织中 SP-A 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s,n=10$)

胎龄	组别			合计	F	P
	细菌组	细菌+PS 组	对照组			
21 d	0.863±0.126	—	1.161±0.083	1.012±0.185	39.166	0.000
22 d	0.798±0.051	—	1.164±0.068	0.981±0.197	185.019	0.000
23 d	0.695±0.147	—	1.195±0.013	0.945±0.276	114.965	0.000
24 d	0.772±0.212	1.103±0.477	1.239±0.097	1.005±0.366	5.243	0.012
26 d	0.478±0.218	1.235±0.406	1.275±0.233	0.996±0.471	22.651	0.000
合计	0.721±0.206	1.120±0.462	1.207±0.126	0.990±0.333	60.206 ^a	0.000 ^a
F	8.342	1.253	1.609	0.391 ^a	4.442 ^b	0.001 ^b
P	0.000	0.278	0.189	0.815 ^a	—	—

注:^a 为主效应;^b 为交互效应,—表示无数据。

3 讨 论

PS 是由 AECⅡ合成和分泌的磷脂蛋白复合物,成分包括 40%的磷脂、50%的胆固醇和 10%蛋白质。PS 中可与磷脂结合的蛋白质称为 SP,在 PS 的合成、储存、分泌及功能等方面起着重要作用。其中 SP-A 除参与构成 PS 并增加其表面活性作用、维持磷脂单分子层的稳定之外,还参与宿主局部防御和免疫功能,阻止血浆蛋白进入肺泡腔,调节局部免疫和炎症反应,在肺脏抗感染中起到重要作用。宫内感染环境刺激机体产生大量炎性因子,炎性因子水平升高并从多个方面调控胎肺发育,阻碍肺泡化进程和肺微血管发育,影响 SP-A 的表达,如上皮生长因子(EGF)、 γ -干扰素(IFN- γ)可增加其表达,而肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素-8(IL-8)、IL-2 等可抑制其表达^[1-2]。SP-A 随胎龄增加而逐渐增多,故早产儿常因肺发育不成熟、PS 产生不足、肺组织免疫功能下降,而易患 NRDS、慢性肺疾病(CLD)等肺疾病^[3-7]。

猪肺磷脂注射液是一种改良的天然 PS 制剂,其主要成分为:每毫升含 80 mg 磷脂(包括 54 mg 磷脂酰胆碱,其中含 30.5 mg DPPC)和 1 mg 蛋白(包括 0.3 mg SP-B)。作为一种外源性 PS,临床主要针对病因进行 PS 替代疗法,弥补内源性 PS 不足,改善由于内源性 PS 不足引起的氧合水平下降,减轻肺损伤动物肺内毛细血管的渗出,减少多核淋巴细胞的浸润及 IL-6

及 TNF- α 等炎性因子的渗出^[8]。目前 RDS 的预防及治疗主要是通过产前给予类固醇激素或者生后气管内给予 PS 治疗。有学者提出将 PS 注入羊膜腔内,以期达到预防 RDS 的目的。Illia 等^[9]报道于豚鼠羊膜腔内注射鎢标记外源性 PS,1 h 后剖宫取出胎鼠,放射性分析显示胎鼠双侧肺内均可检测到 PS;而 Lisawa 等^[10]则对羊膜内注射 PS 防止 RDS 的有效性和安全性进行了研究:15 名孕 24~32 周的孕妇在超声引导下予羊膜腔内注射 PS,注射部位尽量选择胎儿口鼻周围,结果 15 例新生儿放射诊断 RDS,7 例需要机械通气,13 例成活,无 1 例产后需要 PS 治疗,证实了羊膜内注射 PS 可安全、有效防止 RDS。

本次研究中,检测了不同胎龄时期 SP-A mRNA 的表达,发现随着胎龄增加,SP-A 表达逐渐增高,在小管期 21 d SP-A mRNA 表达为(2.221±0.093),当处于囊泡期即胎龄 27 d 时 SP-A 表达为(3.347±0.249),提示随着肺泡结构和功能的逐渐完善,肺泡细胞开始分化,AECⅡ分泌的蛋白也随之增多。细菌感染后 24 h 内胎兔肺组织 SP-A 表达下降,考虑为炎症介质产生增多,炎性细胞因子网络失衡,IL-8 等炎症因子表达增强,抑制 SP-A 的表达。同时由于感染之后 AECⅡ的正常结构、形态遭到破坏,细胞凋亡、裂解、坏死,而 AECⅡ又不能及时增生,因此也可导致 SP-A 表达下降。 (下转第 1569 页)

续表 3 HCMV-DNA 阳性患者临床诊断分布构成比(%)

临床诊断	阳性例数	构成比
营养不良	1	2.56
脾肿大,出血	1	2.56
婴儿肝损综合征	1	2.56
重度营养不良	1	2.56
泌尿系感染	1	2.56
脑发育不良	1	2.56
先天性心脏病	1	2.56
支气管肺炎	1	2.56
喘息性支气管炎	1	2.56
合计	39	100.00

3 讨 论

HCMV 是先天性和围生期感染最为常见和重要的病原体,几乎可以侵犯机体的所有器官,危害很大。HCMV 先天性感染的发生率约为 0.5%~2.5%。绝大多数在新生儿期没有表现出症状,仅 5%~10%具有轻重不一的症状,从宫内生长迟缓、黄疸、肝脾肿大、瘀斑以及中枢神经系统异常的严重疾病,到较为局限的感染^[5]。因此,采用荧光定量 PCR 技术对 HCMV 感染早期、快速诊断、及时给予抗病毒治疗以减轻症状、减低病死率具有重要意义。

本研究结果显示,本院儿科住院患者 HCMV 阳性率达 16.05%,男性和女性患儿阳性率分别为 17.83%和 12.79%,

男女之间相比差异无统计学意义。患儿不同年龄段 HCMV 感染率不同,以婴儿期最高为 17.41%。同时本研究显示, HCMV 感染临床诊断主要以巨细胞病毒感染(25.64%)、肝损害(17.95%)、腹泻(10.26%)、黄疸(10.26%)为主,临床症状轻重不一,给临床诊断和治疗带来一定困难。所以,对 HCMV 感染患者,应早期明确诊断,积极防治,减少危害。

参考文献

[1] 杨方华,张德纯. 荧光定量 PCR 检测人巨细胞病毒的方法学建立[J]. 中国微生态学杂志,2009,21(3):275-277.

[2] 高培杰,赖惠英,傅清流. 荧光定量 PCR 检测巨细胞病毒感染的标本选择[J]. 中华医院感染学杂志,2011,21(10):2149-2151.

[3] Chou S. Cytomegalovirus UL97 mutations in the era of ganciclovir and maribavir [J]. Rev Med Virol, 2008, 18(4):233-246.

[4] 王岩,郭晓英,李佳丹,等. 荧光定量 PCR 法在检测 246 例小儿巨细胞病毒感染中的应用[J]. 黑龙江医药科学, 2010,33(6):16-17.

[5] 黄绮梨,朱锋,方仲文. 孕妇血清巨细胞病毒负荷量与胎儿宫内感染研究[J]. 检验医学与临床,2008,5(16):986-989.

(收稿日期:2011-12-30)

(上接第 1567 页)

在本研究中,作者发现给予羊膜腔内注射 PS 后,肺组织内 SP-A mRNA 及蛋白表达均较细菌组有所增高,其机制可能为注射 PS 后使肺泡表面张力降低,肺泡萎陷减少,肺顺应性提高,肺水肿减轻,从而使 AEC II 细胞损害减轻,板层小体破坏减少,减轻了炎症反应所致的 SP-A 下降。通过以上研究,表明在感染环境中进行羊膜腔内注射 PS 对减轻肺损伤、促进肺发育具有积极作用,对预防早产儿发生 NRDS 等肺疾病具有重要意义。

参考文献

[1] Inoue A, Xin H, Suzuki T, et al. Suppression of surfactant protein A by an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor exacerbates lung inflammation[J]. Cancer Sci, 2008, 99(8):1679-1684.

[2] Wissel H, Schulz C, Rudiger M, et al. Chlamydia pneumoniae affect surfactant trafficking and secretion due to changes of type II cell cytoskeleton[J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003, 29(3 Pt 1):303-313.

[3] Heinrich S, Hartl D, Griesse M. Surfactant protein A from genes to human lung diseases[J]. Curr Med Chem, 2006, 13(27):3239-3252.

[4] Gil HW, Oh MH, Woo KM, et al. Relationship between pulmonary surfactant protein and lipid peroxidation in lung injury due to paraquat intoxication in rats[J]. Korean J Intern Med, 2007, 22(2):67-72.

[5] Kishore U, Bernal AL, Kamran MF, et al. Surfactant pro-

teins SP-A and SP-D in human health and disease[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005, 53(5):399-417.

[6] Jung A, Allen L, Nyengaard JR, et al. Design-based stereological analysis of the lung parenchymal architecture and alveolar type II cells in surfactant protein A and D double deficient mice[J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2005, 286(2):885-890.

[7] Maeda H, Fujita MQ, Zhu BL, et al. Pulmonary surfactant-associated protein A as a marker of respiratory distress in forensic pathology: assessment of the immunohistochemical and biochemical findings[J]. Leg Med (Tokyo), 2003, 5(Suppl 1):S318-321.

[8] Krause MF, Wiemann T, Reisner A, et al. Surfactant reduces extravascular lung water and invasion of polymorphonuclear leukocytes into the lung in a piglet model of airway lavage[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2005, 18(2):129-139.

[9] Illia R, Solana C, Oliveri P, et al. Evidence of fetal pulmonary aspiration of intra-amniotic administered surfactant in animal experiment[J]. J Perinat Med, 2004, 32(4):354-358.

[10] Lisawa J, Pietrasik D, Zwolinski J, et al. Intraamniotic surfactant supply as RDS prevention [J]. Med Wieku Rozwoj, 2003, 7(3 Suppl 1):255-260.

(收稿日期:2012-03-22)