

## 地塞米松对高原肺水肿大鼠的影响研究

胡小艳<sup>1</sup>, 汤恩杰<sup>2</sup>

**【摘要】 目的** 探讨地塞米松对高原肺水肿 (HAPE) 大鼠的影响。**方法** 2016 年 5—10 月于第三军医大学高原医学教育部重点实验室和西南医院中心实验室进行实验。选取成年 SD 大鼠 90 只, 采用随机数字表法分为 A 组、B 组和 C 组, 每组 30 只, 剔除实验过程中死亡大鼠后 A 组纳入 22 只, B 组纳入 29 只, C 组纳入 22 只。3 组大鼠均进行力竭运动, 后将 B 组和 C 组大鼠低氧暴露 48 h 以建立 HAPE 模型, 减压低氧暴露 48 h 后 B 组大鼠予以 0.9% 氯化钠溶液 300  $\mu$ l 腹腔注射、1 次/d, C 组大鼠予以地塞米松 300  $\mu$ g 腹腔注射、1 次/d; 连续用药 3 次后处死所有大鼠。观察 3 组大鼠肺脏形态、肺组织学形态、肺组织超微结构及肺组织 Occludin 蛋白的表达, 比较 3 组大鼠肺组织含水量、肺泡灌洗液蛋白质含量、肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白相对表达量、血液和肺泡漏出液炎症因子水平。**结果** (1) 肺脏形态: A 组大鼠肺叶表面光滑, 呈浅粉红色且无泡沫溢出; B 组大鼠肺叶肿大, 肺表面呈暗红色, 肺组织硬度增加, 表面有点状出血和脓肿形成, 切面有较多泡沫溢出; C 组大鼠肺表面光滑, 呈浅粉红色, 切面少有泡沫溢出, 表面无出血和脓肿形成。(2) 肺组织学形态: A 组大鼠肺泡结构正常, 肺泡腔内无红细胞和粉红色蛋白样物质; B 组大鼠肺组织结构较致密, 肺质地实变, 肺血管高度扩张充血, 肺泡壁增厚, 肺泡间隔增宽, 肺泡腔内可见大量红细胞; C 组大鼠仅部分肺泡壁增厚, 部分肺泡间隔增宽, 肺泡腔内未见红细胞和粉红色蛋白样物质。(3) 肺组织超微结构: A 组大鼠肺泡壁血管膜双层结构清晰, 结构正常, 无融合和断裂; B 组大鼠一侧肺泡壁血管膜双层结构的内皮层疏松、完全断裂或融合, 结构模糊不清, 内皮层疏松呈串珠状; C 组大鼠肺泡壁血管膜双层结构清晰, 部分区域血管膜双层结构似有融合。(4) 肺组织含水量及肺泡灌洗液蛋白质含量: A、C 组大鼠肺组织含水量、肺泡灌洗液蛋白质含量低于 B 组 ( $P < 0.05$ ); A 组大鼠肺泡灌洗液蛋白质含量低于 C 组 ( $P < 0.05$ )。 (5) 肺组织及肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白的表达: A 组大鼠肺组织 Occludin 蛋白表达呈强阳性, B、C 组大鼠肺组织 Occludin 蛋白表达呈弱阳性。A 组大鼠肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白相对表达量高于 B、C 组 ( $P < 0.01$ ); B 组大鼠肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白相对表达量低于 C 组 ( $P < 0.05$ )。 (6) 血液和肺泡漏出液炎症因子水平: 3 组大鼠血液白介素 8 (IL-8) 水平比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); A 组大鼠血液肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白介素 6 (IL-6) 水平低于 B 组 ( $P < 0.05$ ); C 组大鼠血液 TNF- $\alpha$  水平高于 A 组, 血液 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平低于 B 组 ( $P < 0.05$ )。A 组大鼠肺泡漏出液 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平低于 B 组 ( $P < 0.05$ ); C 组大鼠肺泡漏出液 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平高于 A 组, 肺泡漏出液 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平低于 B 组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 地塞米松可有效减轻 HAPE 大鼠肺水肿及炎症反应, 改善肺-气血屏障通透性, 有利于减少蛋白质的漏出。

**【关键词】** 肺水肿; 大鼠; 地塞米松; 炎症反应; 水肿

**【中图分类号】** R 541.63 **【文献标识码】** A DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2017.04.013

胡小艳, 汤恩杰. 地塞米松对高原肺水肿大鼠的影响研究 [J]. 实用心脑血管病杂志, 2017, 25 (4): 56-62. [www.syxnf.net]

HU X Y, TANG E J. Impact of dexamethasone on rats with high altitude pulmonary edema [J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2017, 25 (4): 56-62.

### Impact of Dexamethasone on Rats with High Altitude Pulmonary Edema HU Xiao-yan<sup>1</sup>, TANG En-jie<sup>2</sup>

1. Department of Anesthesiology, Southwest Hospital of the Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

2. Air Force Qionglai Terminal Hospital, Qionglai 611530, China

Corresponding author: TANG En-jie, E-mail: enjietang@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the impact of dexamethasone on rats with high altitude pulmonary edema (HAPE). **Methods** From May to October in 2016, the experiment was carried out in the Key Laboratory Ministry of Education

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2009BAI85B03)

1. 400038 重庆市, 第三军医大学西南医院麻醉科

2. 611530 四川省邛崃市, 空军邛崃场站医院

通信作者: 汤恩杰, E-mail: enjietang@163.com

for High Altitude Medicine in the Third Military Medical University and Central Laboratory of Southwest Hospital. A total of 90 adult SD rats were randomly divided into A group, B group and C group according to random number table, each of 30 cases; excluded the dead rats during the experiment, eventually 22 rats involved in A group, 29 rats involved in B group, and rats involved in C group. Rats of the three groups take the exhaustion exercise, then rats of B group and C group received hypoxic exposure to prepare HAPE model; after 48 hours of decompressive hypoxic exposure, rats of B group received intraperitoneal injection of 0.9% sodium chloride injection (300  $\mu$ l), 1 time per day, rats of C group received intraperitoneal injection of dexamethasone (300  $\mu$ g) 1 time per day; both B group and C group continuously injected for 3 times, then rats of the three groups were killed. Lung morphology, lung histological performance, lung ultrastructure and expression of Occludin protein in lung tissue of the three groups were observed, lung water content and bronchoalveolar lavage fluid protein content, relative expression quantity of Occludin protein of vascular endothelial cells of alveolar wall, blood and alveolar transudation inflammatory cytokines levels were compared among the three groups. **Results** (1) Lung morphology: lung lobes of A group were smooth, pale pink, without foam spill; lung lobes of B group were dropsical, with dark red lung surface, increased solidity of lung tissue, punctate bleeding and abscess, and relatively large foam spill; lung surface of C group was smooth, pale pink, with relatively less foam spill, without bleeding or abscess in lung surface. (2) Lung histological performance: alveolus structure of A group was normal, without red blood cells or pink protein-like substance in the alveolus cavity; lung tissue structure of B group was relatively compact, with increased solidity of lung tissue, high ectatic and congestive pulmonary vessels, thickened alveolar wall and widened alveolar septum, large amount of red blood cells can in the alveolus cavity; part of alveolar wall of C group plumped, part of alveolar septum widened, without red blood cells or pink protein-like substance in the alveolus cavity. (3) Lung ultrastructure: vascular membrane double layer structure of alveolar wall of A group was clear and normal, without fusion and fracture; unilateral epithelial layer of vascular membrane double layer structure of alveolar wall of B group was loose, completely fractured or fusional, with blurry structure and bead-like loose entoderm; vascular membrane double layer structure of alveolar wall of C group was clear, with fusion-like partial vascular membrane double layer structure. The alveolus pulmonis wall structure in group C is clear, just some regional membrane double layer structure seems to have fusion. (4) Lung water content and bronchoalveolar lavage fluid protein content: lung water content and bronchoalveolar lavage fluid protein content of A group and C group were statistically significantly lower than those of B group ( $P < 0.05$ ), meanwhile bronchoalveolar lavage fluid protein content of A group was statistically significantly lower than that of C group ( $P < 0.05$ ). (5) Expression of Occludin protein in lung tissue and relative expression quantity of Occludin protein of vascular endothelial cells of alveolar wall: expression of Occludin protein in lung tissue of A group was strongly positive, while expressions of Occludin protein in lung tissue of B group and C group were both weakly positive. Relative expression quantity of Occludin protein of vascular endothelial cells of alveolar wall of A group was statistically significantly higher than that of B group and C group, respectively ( $P < 0.01$ ), while relative expression quantity of Occludin protein of vascular endothelial cells of alveolar wall of B group was statistically significantly lower than that of C group ( $P < 0.05$ ). (6) Blood and alveolar transudation inflammatory cytokines levels: no statistically significant differences of blood IL-8 level was found among the three groups ( $P > 0.05$ ); blood levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 of A group were statistically significantly lower than those of B group ( $P < 0.05$ ); blood TNF- $\alpha$  level of C group was statistically significantly higher than that of A group, while blood levels of IL-1 $\beta$  and IL-6 of C group were statistically significantly lower than those of B group ( $P < 0.05$ ). Alveolar transudation levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 of A group were statistically significantly lower than those of B group ( $P < 0.05$ ); alveolar transudation levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 of C group were statistically significantly higher than those of A group, while alveolar transudation levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-8 of C group were statistically significantly lower than those of B group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Dexamethasone can effectively relieve the pulmonary edema and inflammatory reaction, improve the permeability of lung air-blood barrier of rats with HAPE, is helpful to reduce the leakage of protein.

**【Key words】** Pulmonary edema; Rats; Dexamethasone; Inflammatory response; Edema

高原肺水肿 (HAPE) 是指特发于高原低氧环境中的肺水肿, 多发生于平原地区生活人群初次进入高原地区或高原地区居民进入更高海拔地区时, 发病率为 0.5% ~ 2.0%<sup>[1-2]</sup>。HAPE 具有起病急、病情进展快、危害较重等特点, 治疗不及时可导致昏迷甚至死亡, 严重威胁患者生命安全<sup>[3]</sup>。近半个多世纪以来, 高原地区的医学工作者通过各种努力降低了 HAPE 的发病率和病

死率, 但近年来随着高原地区开发建设和高原旅游业的兴起, 因公务、商务、开发、旅游、宗教活动等进出于高原地区的人数增加, 导致 HAPE 的发病率出现升高趋势<sup>[4]</sup>。HAPE 的具体发病机制尚不完全明确, 多数研究者认为其可能与炎症有关<sup>[5]</sup>。本研究旨在探讨地塞米松对 HAPE 大鼠的影响, 为地塞米松治疗 HAPE 提供实验依据, 现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 成年 SD 大鼠 90 只, 体质量 (200 ± 20) g, 周龄 6 周, 清洁级, 雌雄各半, 均由第三军医大学实验动物所提供 (实验动物编号: SYDD003), 严格按照实验动物管理规定处置大鼠。

1.1.2 实验试剂与仪器 地塞米松购自中国河南润弘制药股份有限公司; 氯化钠注射液购自中国大冢制药有限公司; Occludin 大鼠多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白浓度检测试剂盒购自美国 Synergy (Synergy, HT) 基因公司; 肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白介素 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、白介素 6 (IL-6) 和白介素 8 (IL-8) 试剂盒购自北京北方免疫试剂研究所。Multiskan FC 全自动多功能酶标仪购自美国 Thermo 公司; 全自动放免测定仪由中国科技大学中佳公司生产; 动物实验跑台购自中国安徽淮北正华生物仪器设备公司 (ZH-PT 型) 和东西仪北京科技有限公司 (WI32812 型); 高原环境模拟舱 (DYC-2842T 型低压氧舱) 由贵航集团风雷机械厂建造; 组织学观察采用日本 Nikon 公司 50i 光学显微镜; 超微结构观察采用日本日立公司 JEM-1400 型透射电子显微镜。

1.2 分组与建立模型 2016 年 5—10 月于第三军医大学高原医学教育部重点实验室 (主要提供仪器设备并负责相关指标的检测等) 和西南医院中心实验室 (主要负责动物模型制备、具体实验等) 进行实验。采用随机数字表法将所有大鼠分为 A 组、B 组及 C 组, 每组 30 只, 剔除实验过程中死亡大鼠, 最终 A 组纳入 22 只, B 组纳入 29 只, C 组纳入 22 只。参照文献 [5] 中的方法并加以改良后建立动物模型: 将 3 组大鼠置于跑步机上并以 15 m/min 速度进行力竭运动, 运动时间为 15 min, 休息 20 min 后再次进行力竭运动, 循环运动直至大鼠力竭, 后将 B 组和 C 组大鼠暴露于海拔 6 000 m 高原模拟舱内 (低氧暴露) 48 h 建立 HAPE 模型, 减压低氧暴露 48 h 后 B 组大鼠予以 0.9% 氯化钠溶液 300  $\mu$ l 腹腔注射, 1 次/d; C 组大鼠予以地塞米松 300  $\mu$ g 腹腔注射, 1 次/d。连续用药 3 次后处死所有大鼠。

1.3 观察指标 观察 3 组大鼠肺脏形态、肺组织学形态、肺组织超微结构及肺组织 Occludin 蛋白的表达, 比较 3 组大鼠肺组织含水量、肺泡灌洗液蛋白质含量、肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白相对表达量、血液和肺泡漏出液炎症因子水平。

#### 1.3.1 肺脏形态、肺组织学形态及肺组织超微结构

(1) 减压低氧暴露 5 d 后处死大鼠, 取出肺组织并观察肺脏形态, 后置于 4% 多聚甲醛溶液中固定数天, 经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、连续切片、HE

染色、中性树胶封片后, 于光学显微镜下观察肺组织学形态并采集图像。(2) 将肺组织标本制成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小组织块, 置入含有 4 °C 混合固定液的玻璃小瓶内, 采用后固定法浸泡过夜; 采用 1% 硝酸镧 - 0.1 M 二甲砷酸钠缓冲液漂洗 2 次, 1% 四氧化钨后固定 2 h, 再采用 0.1 mol/L 二甲砷酸钠缓冲液漂洗 2 次, 梯度丙酮脱水, 常规透射电镜切片并制样, 醋酸铀与枸橼酸铅双重电子染色, 采用透射电子显微镜观察肺组织超微结构。

1.3.2 肺组织含水量 减压低氧暴露 5 d 后处死大鼠, 取出右肺并迅速置于精密电子天平上称量湿重, 后置于 60 °C 电热恒温干燥箱中烘烤至恒重 (2 次称量干重误差 < 0.002 g 为达到恒重) 后取出, 记录组织块干重。依据 Elliot 公式计算肺组织含水量, 肺组织含水量 (%) = (湿重 - 干重) / 湿重 × 100%。

1.3.3 肺泡灌洗液蛋白质含量 取标准配制液 0.8 ml 加入标准品 20 mg 中配成 BCA 标准 A 液 (25 mg/ml); 取 25 mg/ml 蛋白标准液 2  $\mu$ l 加入 0.01 M 磷酸盐缓冲液 (PBS) 98  $\mu$ l 制成 BCA 标准 B 液 (0.5 mg/ml); 取 BCA 标准 A 液 8 ml 加入 BCA 标准 B 液 160  $\mu$ l 以 50:1 比例配成 BCA 工作液; 将标准品按 0、1、2、4、8、12、16、20  $\mu$ l 加入 96 孔板标准品孔中, 加标准品稀释液补足至 20  $\mu$ l, 后将待测样本加入 96 孔板, 各孔加入 BCA 工作液 200  $\mu$ l, 于 37 °C 烘箱孵育 30 min, 采用 Lowry 法在波长 562 nm 的多功能酶标仪检测吸光度值, 并根据标准品蛋白吸光度绘制标准曲线, 计算肺泡灌洗液蛋白质含量。

1.3.4 肺组织及肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白的表达 Occludin 为肺气 - 血屏障内皮细胞间紧密连接蛋白, 肺组织 Occludin 蛋白的表达采用半定量分析: 每组随机抽取 10 张切片, 每张切片随机选取 9 个视野, 固定窗口面积, 采用美国 Imaging J 图像处理系统测定其平均累积光密度值 (IOD), 平均 IOD 越高表示阳性反应产物强度越强, 提示 Occludin 蛋白表达量越高。采用两步法测定肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白表达量, 并通过 Quantity One 4.6.2 图像分析软件测定其 IOD, 计算目的蛋白与内参蛋白 IOD 比值, 即 Occludin 蛋白相对表达量。

1.3.5 血液和肺泡漏出液炎症因子水平 减压低氧暴露 5 d 后将各组大鼠麻醉并固定于动物实验台上, 沿腹白线剪开腹壁, 打开腹腔, 暴露腹主动脉并采集腹主动脉血 4 ml, 于低温离心机上离心 10 min, 分离血清, 置于 -20 °C 冰箱中保存待测; 取血完成后沿胸部正中逐层剪开胸壁, 暴露胸腔脏器, 先结扎右侧各肺叶, 后经气管插入塑料导管至左肺, 结扎固定导管后予以 0.9%

氯化钠溶液缓慢匀速注入左肺, 1 ml/次, 存留片刻后抽回, 再予以 0.9% 氯化钠溶液缓慢匀速注入左肺, 如此反复 3 次收集肺泡漏出液 3 ml, 置于离心管内, 混匀后离心, 取上清液并置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存待测。采用放射免疫法检测血液和肺泡漏出液 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 及 IL-8 水平。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行数据处理, 计量资料以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK- $q$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 肺脏形态 A 组大鼠肺叶表面光滑, 呈浅粉红色且无泡沫溢出 (见图 1A); B 组大鼠肺叶肿大, 肺表面呈暗红色, 肺组织硬度增加, 表面有点状出血和脓肿形成, 切面有较多泡沫溢出 (见图 1B); C 组大鼠肺表面光滑, 呈浅粉红色, 表面无出血和脓肿形成, 切面少有泡沫溢出 (见图 1C)。

2.2 肺组织学形态 光镜下可见 A 组大鼠肺泡结构完全正常, 肺泡腔内无红细胞和粉红色蛋白样物质 (见图 2A); B 组大鼠肺组织结构较致密, 肺质地实变, 肺血管高度扩张充血, 肺泡壁增厚, 肺泡间隔增宽, 肺泡腔内可见大量红细胞 (见图 2B); C 组大鼠仅部分肺泡壁增厚, 部分肺泡间隔增宽, 肺泡腔内未见红细胞和粉红色蛋白样物质 (见图 2C)。

2.3 肺组织超微结构 电镜下可见 A 组大鼠肺泡壁血管膜双层结构清晰, 结构正常, 无融合和断裂 (见图 3A); B 组大鼠一侧肺泡壁血管膜双层结构的内皮层疏松、完全断裂或融合, 结构模糊不清, 内皮层疏松呈串珠状 (见图 3B); C 组大鼠肺泡壁血管膜双层结构清晰, 部分区域血管膜双层结构似有融合 (见图 3C)。

2.4 肺组织含水量和肺泡灌洗液蛋白质含量 3 组大鼠肺组织含水量、肺泡灌洗液蛋白质含量比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); A 组、C 组大鼠肺组织含水量、肺泡灌洗液蛋白质含量低于 B 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); A 组大鼠肺泡灌洗液蛋白质含量低于 C 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 见表 1)。

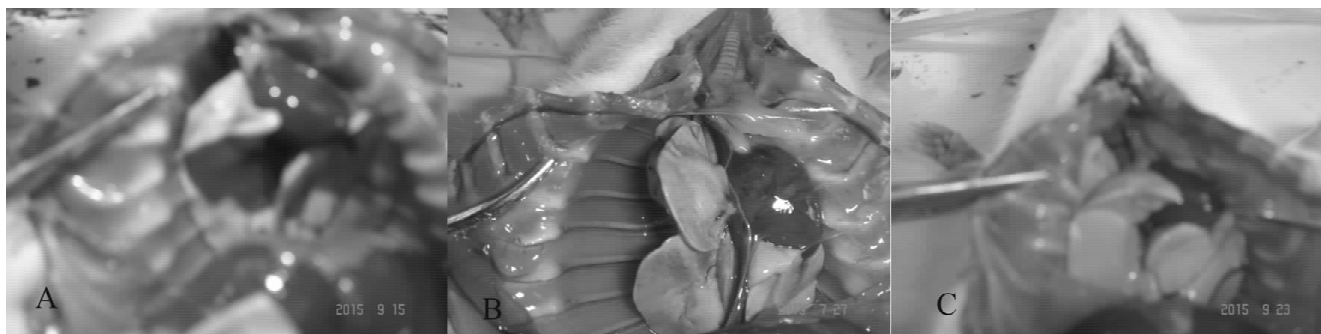
表 1 3 组大鼠肺组织含水量和肺泡灌洗液蛋白质含量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of lung water content and bronchoalveolar lavage fluid protein content among the three groups of rats

组别	只数	肺组织含水量 (%)	肺泡灌洗液蛋白质含量 (mg/ml)
A 组	22	78.49 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	0.285 3 $\pm$ 0.009 2 <sup>a</sup>
B 组	29	80.25 $\pm$ 4.05	0.606 8 $\pm$ 0.127 4
C 组	22	78.16 $\pm$ 2.42 <sup>a</sup>	0.317 8 $\pm$ 0.711 5 <sup>ab</sup>
F 值		5.444	11.928
P 值		<0.05	<0.05

注: 与 B 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 A 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

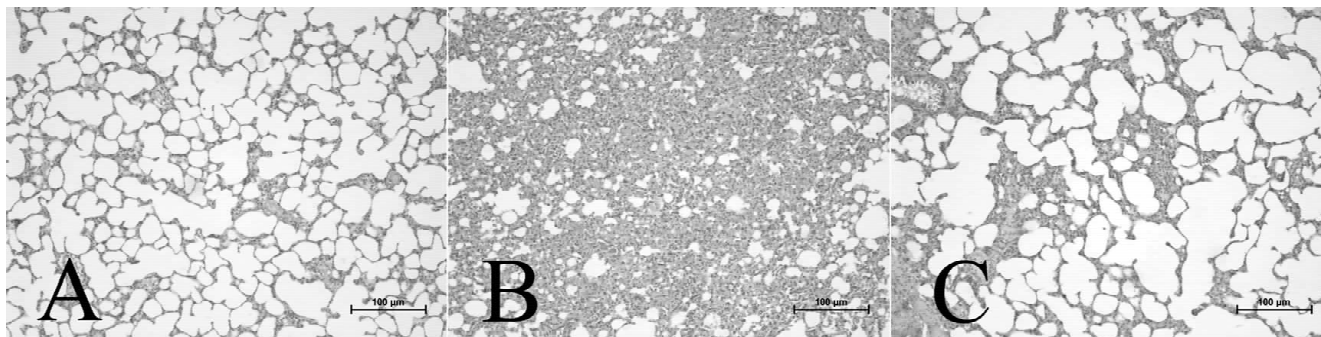
2.5 肺组织及肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白的表达 免疫组化染色结果显示, Occludin 蛋白主要沿肺泡上皮细胞的胞膜顶端及胞质分布, 呈棕褐色线状信号。A 组大鼠肺组织 Occludin 蛋白表达呈强阳性 (见图 4A); B、C 组大鼠肺组织 Occludin 蛋白表达呈弱阳性 (见图 4B、C)。A 组大鼠肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白相对表达量为 (178.372 7  $\pm$  2.099 2), B 组为 (160.925 2  $\pm$  2.710 9), C 组为 (165.031 2  $\pm$  1.333 8), 3 组大鼠肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $F = 18.368$ ,  $P < 0.05$ ); A 组大鼠肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白相对表达量高于 B、C 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); B 组大鼠肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白相对表达量低于 C 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



注: A 图示肺叶表面光滑, 呈浅粉红色且无泡沫溢出; B 图示肺叶肿大, 肺表面呈暗红色, 肺组织硬度增加, 表面有点状出血和脓肿形成, 切面有较多泡沫溢出; C 图示肺表面光滑, 呈浅粉红色, 表面无出血和脓肿形成, 切面少有泡沫溢出

图 1 3 组大鼠肺脏形态

Figure 1 Lung morphology of the three groups of rats



注：A 图示肺泡结构正常；B 图示肺组织结构致密，肺泡腔内充满大量红细胞和粉红色蛋白样物质；C 图示部分肺泡间隔增宽，肺泡腔内未见红细胞和粉红色蛋白样物质

图2 3组大鼠肺组织学形态 (HE 染色, ×100)

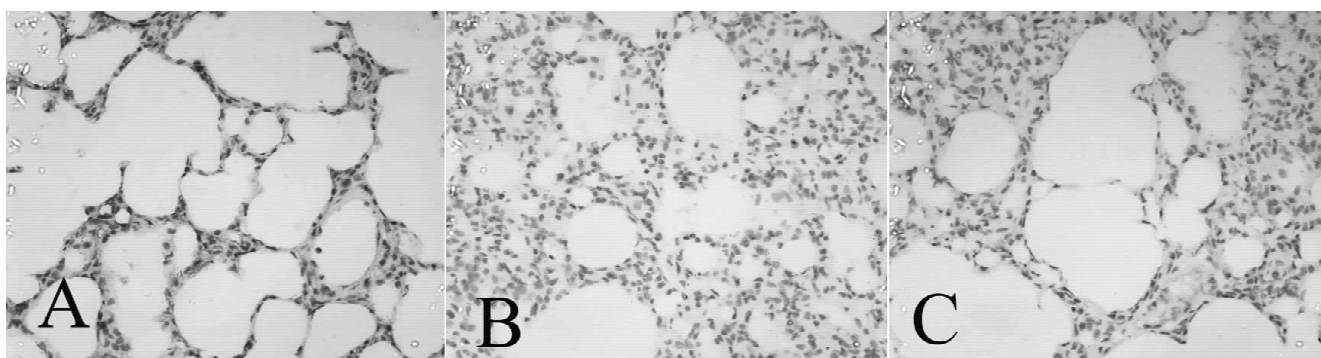
Figure 2 Lung histological performance of the three groups of rats



注：A 图示大鼠肺泡壁血管膜双层结构清晰，无融合和断裂；B 图示大鼠一侧肺泡壁血管膜双层结构的的上皮层完全断裂；C 图示大鼠肺泡壁血管膜双层结构清晰

图3 3组大鼠肺组织超微结构 (×20 000)

Figure 3 Lung ultrastructure of the three groups of rats



注：A 图示 Occludin 蛋白主要沿肺泡上皮细胞的胞膜顶端及胞质分布，呈棕褐色线状信号；B 图示沿肺泡上皮细胞的胞膜顶端及胞质分布的 Occludin 明显减少，呈浅褐色；C 图示沿肺泡上皮细胞的胞膜顶端及胞质分布的 Occludin 明显减少，呈浅棕褐色

图4 3组大鼠免疫组化染色结果 (×400)

Figure 4 Immunohistochemical staining results of the three groups of rats

2.6 血液和肺泡漏出液炎症因子水平 3组大鼠血液 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平比较，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；3组大鼠血液 IL-8 水平比较，差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。A 组大鼠血液 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平低于 B 组，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；C 组大鼠血液 TNF- $\alpha$  水平高于 A 组，血液 IL-1 $\beta$ 、IL-6 水平低

于 B 组，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ，见表 2)。3 组大鼠肺泡漏出液 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平比较，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；A 组大鼠肺泡漏出液 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平低于 B 组，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )；C 组大鼠肺泡漏出液 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平高于 A 组，肺泡漏出液 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平低

于 B 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 见表 3)。

表 2 3 组大鼠血液炎症因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of blood inflammatory cytokines levels among the three groups of rats

组别	只数	TNF- $\alpha$ (fmol/ml)	IL-1 $\beta$ (ng/ml)	IL-6(pg/ml)	IL-8(pg/ml)
A 组	22	6.111 8 $\pm$ 2.163 1	0.251 2 $\pm$ 0.056 1	89.051 9 $\pm$ 4.082 9	0.523 8 $\pm$ 0.139 0
B 组	29	12.328 9 $\pm$ 1.651 7 <sup>a</sup>	0.477 5 $\pm$ 0.047 4 <sup>a</sup>	135.261 0 $\pm$ 4.948 9 <sup>a</sup>	0.590 8 $\pm$ 0.135 2
C 组	22	11.169 4 $\pm$ 1.816 3 <sup>a</sup>	0.237 5 $\pm$ 0.037 5 <sup>b</sup>	82.286 9 $\pm$ 8.962 3 <sup>b</sup>	0.516 7 $\pm$ 0.125 4
F 值		51.478	222.244	266.282	2.423
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	>0.05

注: TNF- $\alpha$  = 肿瘤坏死因子  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  = 白介素 1 $\beta$ , IL-6 = 白介素 6, IL-8 = 白介素 8; 与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

表 3 3 组大鼠肺泡漏出液炎症因子水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of alveolar transudation inflammatory cytokines levels among the three groups of rats

组别	只数	TNF- $\alpha$ (fmol/ml)	IL-1 $\beta$ (ng/ml)	IL-6(pg/ml)	IL-8(pg/ml)
A 组	22	2.754 6 $\pm$ 0.968 7	0.141 7 $\pm$ 0.072 3	42.382 5 $\pm$ 5.190 4	0.183 8 $\pm$ 0.082 2
B 组	29	4.020 9 $\pm$ 2.877 5 <sup>a</sup>	0.273 0 $\pm$ 0.026 9 <sup>a</sup>	171.872 5 $\pm$ 4.437 6 <sup>a</sup>	0.294 5 $\pm$ 0.087 9 <sup>a</sup>
C 组	22	3.358 6 $\pm$ 3.524 2 <sup>a</sup>	0.194 5 $\pm$ 0.066 3 <sup>b</sup>	61.692 1 $\pm$ 5.586 5 <sup>ab</sup>	0.195 0 $\pm$ 0.092 1 <sup>b</sup>
F 值		13.613	27.403	175.352	15.518
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注: 与 A 组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 B 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

### 3 讨论

HAPE 是高原地区特发性疾病, 也是高原地区常见危重症, 具有起病急、病情较重、发展较快等特点, 若救治不及时则会危及患者生命安全。近年研究表明, HAPE 仍是威胁急进高原人群生命安全的主要原因<sup>[6-7]</sup>, 因此, 早发现、早诊断、早治疗 HAPE 对确保急进或移居高原者生命安全具有重要意义。2010 年 4 月, 中国青海省玉树州结古镇发生强烈地震, 造成数十万民房倒塌, 数万居民急需救援救治, HAPE 患者数量急剧增加, 给高原救援带来了极大的挑战, 而由于来自平原地区的救援人员缺乏高原救治知识, 部分救援队受到 HAPE 威胁而不得不在到达救援现场的第 3 天撤离, 因此, 深入探讨 HAPE 的发病机制, 寻找简便、快速、高效的 HAPE 救治方法具有重要现实意义。

HAPE 最可靠的救治方法是尽快脱离低氧环境, 下送平原地区并通过氧疗将血氧饱和度提高至 90% 以上<sup>[8]</sup>, 不能及时下送平原地区者应及时就地使用高压氧舱治疗<sup>[9]</sup>。药物治疗为 HAPE 的常用治疗方法, 主要为使用血管扩张剂降低肺动脉压力, 但口服给药起效时间长、见效慢, 并不是大批量救治 HAPE 患者的最佳救治方法<sup>[10]</sup>。研究表明, 吸入低浓度一氧化氮 (NO) 可有效缩短 HAPE 患者肺部啰音消失时间、胸部 X 线阴影消失时间及住院时间, 吸入低浓度 NO 治疗 HAPE 的效果

良好<sup>[8]</sup>, 但吸入 NO 须有专用设备, 受仪器设备限制而无法广泛应用; L-精氨酸能有效改善 HAPE 患者临床症状, 降低患者肺动脉高压<sup>[9]</sup>; 抗胆碱药治疗 HAPE 具有起效迅速、疗效确切、疗程短、不良反应少、治愈率高等优点<sup>[11]</sup>。地塞米松属于炎症反应阻断剂, 可通过阻断炎症通路而抑制炎症因子的活化, 降低炎症级联反应。CHEN 等<sup>[12]</sup>采用布地奈德吸入防治 HAPE, 结果显示, 其预防 HAPE 的效果优于口服地塞米松, 但吸入布地奈德是否适用于救治 HAPE 尚缺少相应临床证据。

HAPE 是一种免疫炎症反应, 患者早期支气管肺泡漏出液肺泡巨噬细胞、中性粒细胞、淋巴细胞及清蛋白、低密度脂蛋白、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  水平升高<sup>[13]</sup>, 而激活肺部炎症因子的信号可能来源于缺氧及应激损伤等。研究表明, 活性氧 (ROS) 具有直接损伤细胞作用, 可破坏正常组织和细胞, 而受损细胞释放损伤相关分子模式 (DAMPs) 可激活肺部模式识别受体 (PRRs) 和核因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 通路, 上调 IL-1 $\beta$  前体和 Caspase-1 的表达<sup>[14]</sup>; ROS 还可损伤邻近正常线粒体并形成连锁反应<sup>[15]</sup>, 因此, 为保护细胞免受过量产生的 ROS 损伤, 产 ROS 的损伤线粒体不断以自噬形式被清除<sup>[16]</sup>, 而抑制线粒体自噬会导致产 ROS 损伤线粒体累积, 造成 NLRP3 炎症小体过度活化和 IL-1 $\beta$  分泌增多<sup>[17-19]</sup>。此外, 还原型辅酶 II (NADPH) 氧化酶家族的产 ROS 酶可通过在肺细胞大量表达而放大内源性 ROS 信号, 进而调节缺氧反应<sup>[20]</sup>; 肺血管内皮细胞 NADPH 氧化酶家族产生的 ROS 可促进 NLRP3 与硫氧还原蛋白结合蛋白 (TXNIP) 相互作用, 诱导内皮细胞炎症小体活化和 IL-1 $\beta$  分泌; 中性粒细胞来源的 ROS 可增强内皮细胞 NADPH 氧化酶的活性, 进而放大缺血缺氧对炎症小体的活化作用<sup>[21]</sup>。IL-1 $\beta$  是引起肺损伤的最主要的炎症递质, 主要由 ROS 激活 P38 MAPk 信号通路而高表达; IL-1 $\beta$  与受体结合后可上调肺毛细血管内皮细胞黏附因子的表达, 趋化并激活白细胞释放更多炎症因子, 继而引发炎症瀑布效应, 同时还可通过未知效应蛋白使肌动蛋白重组, 进而影响内皮细胞间的紧密连接<sup>[22-23]</sup>。白介素 1 (IL-1) 受体激活 MYD88 - ARNO - ARF6 通路可引起血管内皮细胞钙黏蛋白内化, 进而破坏内皮细胞稳定性, 促进肺水肿的发生<sup>[24]</sup>。上述研究表明, 炎症信号通路在 HAPE 的发生发展过程中发挥着重要作用。

本研究结果显示, C 组大鼠肺表面光滑, 呈浅粉红色, 表面无出血和脓肿形成, 切面少有泡沫溢出; 仅部分肺泡壁增厚, 部分肺泡间隔增宽, 肺泡腔内未见红细胞和粉红色蛋白样物质, 肺泡壁血管膜双层结构清晰; C 组大鼠肺组织含水量、肺泡灌洗液蛋白质含量低于 B 组, A 组大鼠肺泡灌洗液蛋白质含量低于 C 组; C 组大鼠肺组织 Occludin 蛋白表达呈弱阳性, C 组大鼠肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白相对表达量低于 A 组, B 组

大鼠肺泡壁血管内皮细胞 Occludin 蛋白相对表达量低于 C 组; C 组大鼠血液 TNF- $\alpha$  水平高于 A 组, 肺泡漏出液 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平高于 A 组, 肺泡漏出液 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 水平低于 B 组。表明地塞米松治疗可有效降低 HAPE 大鼠肺组含水量、肺泡灌洗液蛋白质含量、血液及肺泡漏出液中炎性因子水平, 减轻肺水肿及炎症反应, 改善肺-气血屏障通透性, 有利于减少蛋白质的漏出。

综上所述, 地塞米松可有效减轻 HAPE 大鼠肺水肿及炎症反应, 改善肺-气血屏障通透性, 有利于减少蛋白质的漏出, 为临床应用地塞米松治疗 HAPE 提供了实验依据。

作者贡献: 胡小艳进行实验实施、资料收集整理、撰写论文; 汤恩杰进行实验设计、评估、资料收集整理、质量控制及审校并对文章负责。

本文无利益冲突。

#### 参考文献

- [1] TANG E, CHEN Y, LUO Y. Dexamethasone for the prevention of acute mountain sickness: systematic review and meta-analysis [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 173 (2): 133 - 138. DOI: 10. 1016/j. ijcard. 2014. 03. 019.
- [2] HACKETT P H, ROACH R C. High altitude cerebral edema [J]. *High Alt Med Biol*, 2004, 5 (2): 136 - 146.
- [3] BÄRTSCH P, MAIRBÄURL H, MAGGIORINI M, et al. Physiological aspects of high - altitude pulmonary edema [J]. *J Appl Physiol* (1985), 2005, 98 (3): 1101 - 1110.
- [4] XIAO - LIN M A, JIN R B, ZHANG X H, et al. Study on management of 726 victims in military hospitals following Yushu earthquake in Qinghai province [J]. *Journal of Traumatic Surgery*, 2010, 12 (4): 339 - 342.
- [5] SWENSON E R, MAGGIORINI M, MONGOVIN S P, et al. Pathogenesis of high - altitude pulmonary edema: inflammation is not an etiologic factor [J]. *JAMA*, 2002, 287 (17): 2228 - 2235.
- [6] GUO P, LUO H, FAN Y, et al. Establishment and evaluation of an experimental animal model of high altitude cerebral edema [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 547: 82 - 86. DOI: 10. 1016/j. neulet. 2013. 05. 008.
- [7] BASNYAT B, SUBEDI D, SLEGGES J, et al. Disoriented and ataxic pilgrims: an epidemiological study of acute mountain sickness and high - altitude cerebral edema at a sacred lake at 4300 m in the Nepal Himalayas [J]. *Wilderness Environ Med*, 2000, 11 (2): 89 - 93.
- [8] MAGGIORINI M. Prevention and treatment of high - altitude pulmonary edema [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2010, 52 (6): 500 - 506. DOI: 10. 1016/j. pead. 2010. 03. 001.
- [9] BHAGI S, SRIVASTAVA S, SINGH S B. High - altitude pulmonary edema: review [J]. *J Occup Health*, 2014, 56 (4): 235 - 243.
- [10] REN Y, FU Z, SHEN W, et al. Incidence of high altitude illnesses among unacclimatized persons who acutely ascended to Tibet [J]. *High Alt Med Biol*, 2010, 11 (1): 39 - 42. DOI: 10. 1089/ham. 2009. 1049.
- [11] ZHOU Q. Standardization of methods for early diagnosis and on - site treatment of high - altitude pulmonary edema [J]. *Pulm Med*, 2011; 190648. DOI: 10. 1155/2011/190648.
- [12] CHEN G Z, ZHENG C R, QIN J, et al. Inhaled budesonide prevents acute mountain sickness in young Chinese men [J]. *J Emerg Med*, 2015, 48 (2): 197 - 206. DOI: 10. 1016/j. jemered. 2014. 07. 047.
- [13] MOU X B, GANG - LIN Y E, TANG H Y. Clinical effects of L - arginine in patients with high altitude pulmonary edema and its hemodynamic changes [J]. *Chinese Journal of Critical Care Medicine*, 2003, 23 (12): 827 - 828.
- [14] ZHANG X. Study on anticholinergics for the treatment of high altitude pulmonary edema [J]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 1999, 22 (4): 234 - 236.
- [15] WANG W, ZHANG X, MA Y. Low - concentration nitrous oxide inhalation in the treatment of high - altitude pulmonary edema [J]. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 1998, 21 (4): 212 - 214.
- [16] KUBO K, HANAOKA M, HAYANO T, et al. Inflammatory cytokines in BAL fluid and pulmonary hemodynamics in high - altitude pulmonary edema [J]. *Respir Physiol*, 1998, 111 (3): 301 - 310.
- [17] KORDE A S, YADAV V R, ZHENG Y M, et al. Primary role of mitochondrial Rieske iron - sulfur protein in hypoxic ROS production in pulmonary artery myocytes [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 50 (8): 945 - 952. DOI: 10. 1016/j. freeradbiomed. 2011. 01. 010.
- [18] ZHOU L, AON M A, ALMAS T, et al. A reaction - diffusion model of ROS - induced ROS release in a mitochondrial network [J]. *PLoS Comput Biol*, 2010, 6 (1): e1000657. DOI: 10. 1371/journal. pcbi. 1000657.
- [19] LEMASTERS J J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. *Rejuvenation Res*, 2005, 8 (1): 3 - 5.
- [20] SAITOH T, FUJITA N, JANG M H, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin - induced IL-1 $\beta$  production [J]. *Nature*, 2008, 456 (7219): 264 - 268. DOI: 10. 1038/nature07383.
- [21] ZHOU R, TARDIVEL A, THORENS B, et al. Thioredoxin - interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11 (2): 136 - 140. DOI: 10. 1038/ni. 1831.
- [22] RATHORE R, ZHENG Y M, NIU C F, et al. Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS] i and [Ca<sup>2+</sup>] i through the mitochondrial ROS - PKCepsilon signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2008, 45 (9): 1223 - 1231. DOI: 10. 1016/j. freeradbiomed. 2008. 06. 012.
- [23] MAGGIORINI M, MÉLOT C, PIERRE S, et al. High - altitude pulmonary edema is initially caused by an increase in capillary pressure [J]. *Circulation*, 2001, 103 (16): 2078 - 2083.
- [24] ZHU W, LONDON N R, GIBSON C C, et al. Interleukin receptor activates a MYD88 - ARNO - ARF6 cascade to disrupt vascular stability [J]. *Nature*, 2012, 492 (7428): 252 - 255. DOI: 10. 1038/nature11603.

(收稿日期: 2017 - 01 - 05; 修回日期: 2017 - 04 - 08)

(本文编辑: 李洁晨)