

超声引导下注射肺表面活性物质预防早产兔肺损伤的实验研究

赖为桢 何韶铮 郑新颖 苏淇琛 吕国荣

摘要 **目的** 比较超声引导下羊膜腔内与胎肺注射肺表面活性物质(PS)预防早产兔肺损伤的效果。**方法** 将15只新西兰孕兔随机分为胎肺注射PS组(胎肺组)、羊膜腔内注射PS组(羊膜腔组)及对照组,每组各5只。于妊娠第27天注药1h后行剖宫产术,观察各组早产兔存活时间,检测支气管肺泡灌洗液中二棕榈胆碱酯磷酸(DPPC)和白细胞介素-6(IL-6)含量,取肺组织行肺损伤病理评分,检测PS相关蛋白-A(SP-A)表达水平和细胞凋亡指数,并用电镜观察Ⅱ型肺泡上皮细胞形态学改变。**结果** 与对照组比较,胎肺组和羊膜腔组早产兔存活时间均明显延长,DPPC含量和SP-A表达水平均增加,肺组织细胞凋亡指数、肺损伤病理评分及IL-6含量均降低,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$);Ⅱ型肺泡上皮细胞板层小体增多,内质网肿胀减少。与羊膜腔组比较,胎肺组早产兔DPPC含量、SP-A表达水平及IL-6含量均增加,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$),余指标比较差异均无统计学意义。**结论** 超声引导下羊膜腔内与胎肺注射PS均可有效预防早产兔肺损伤,但胎肺注射等量PS较羊膜腔注射效果更佳。

关键词 超声引导;肺损伤;肺表面活性物质;兔;早产

[中图分类号]R445.1

[文献标识码]A

Ultrasound guided injection of pulmonary surfactant for prevention of lung injury in premature rabbits: a experimental study

LAI Weicheng, HE Shaozheng, ZHENG Xinying, SU Qichen, LV Guorong

Department of Ultrasound, the Second Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fujian 362000, China

ABSTRACT **Objective** To compare the effect of ultrasound guided intra-amniotic cavity and fetal lung injection of pulmonary surfactant (PS) to prevent lung injury in premature rabbits. **Methods** Fifteen pregnant New Zealand rabbits were randomly divided into fetal lung injection PS group (lung group), amniotic cavity injection PS group (amniotic cavity group) and control group, each group has 5 rabbits. On the 27th day of pregnancy, rabbit fetuses were removed through cesarean section 1 h after injection. The survival time of premature rabbits in each group was observed, the content of dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) and interleukin-6 (IL-6) in bronchoalveolar lavage fluid were detected. Lung tissue was taken for lung injury pathological score, the expression level of PS-active substance associated protein-A (SP-A) and apoptosis index were detected. Morphological changes of type II alveolar epithelial cells were observed by electron microscopy. **Results** Compared with the control group, the survival time of premature rabbits in lung group and amniotic cavity group was significantly prolonged, the content of DPPC and SP-A expression level were increased, the apoptosis index of lung tissue and the pathological score of lung injury and IL-6 content were decreased. All were statistically significant (all $P<0.05$). The lamellar bodies of type II alveolar epithelial cells was increased, and the swelling of endoplasmic reticulum was decreased. Compared with the amniotic cavity group, the content of DPPC, SP-A expression level and IL-6 content in preterm rabbits of lung group were increased, and the differences were statistically significant (all $P<0.05$), and there were no significant difference between the remaining indicators. **Conclusion** Both intra-amniotic and fetal lung injection PS can prevent lung injury in premature rabbits effectively. Compared

基金项目:泉州市科技计划项目(2018C071R);福建省自然科学基金项目(2018J01287);福建省临床重点专科建设项目资助[(2017)739]

作者单位:362000 福建省泉州市,福建医科大学附属第二医院超声科(赖为桢、何韶铮、郑新颖、苏淇琛);教育部泉州医学高等专科学校(吕国荣)

通讯作者:吕国荣,Email:lgr_feus@sina.com

with PS injected into amniotic cavity, PS injection into fetal lung with the same amount can obtain greater benefits, which is expected to be a new treatment to prevent lung injury in premature infants.

KEY WORDS Ultrasound guidance; Lung injury; Pulmonary surfactant; Rabbit, preterm birth

早产儿由于肺表面活性物质(pulmonary surfactant, PS)合成不足,机体抗氧化系统未发育完善,常发生急性肺损伤,导致呼吸窘迫综合征等疾病,是早产儿死亡的主要原因之一^[1]。本课题组前期研究^[2]证实在羊膜腔内注射 PS 可有效预防早产儿肺损伤,其原理是 PS 通过胎儿宫内呼吸运动进入胎儿呼吸道,从而发挥作用。在此基础上,本实验旨在探讨将 PS 直接注入胎肺效果是否有更佳,以及该方法预防早产儿肺损伤的可行性和有效性。

材料与方 法

一、实验动物

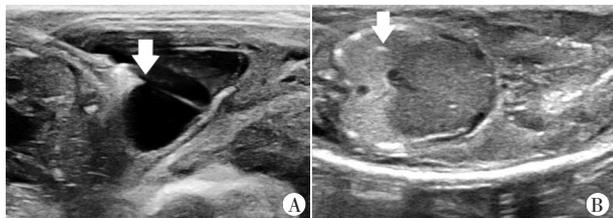
健康新西兰孕兔 15 只,体质量 4.0~5.0 kg,购于泉州医学高等专科学校实验动物中心,许可证号:SYXK(闽)2016-0001。

二、主要实验仪器

使用 Supersonic Imagine Aixplorer 彩色多普勒超声诊断仪,线阵探头,频率 4~15 MHz;FEI 公司透射电镜 QUANTA 450。

三、实验方法

将孕兔随机分为胎肺注射 PS 组(胎肺组)、羊膜腔内注射 PS 组(羊膜腔组)及对照组,每组各 5 只(共 15 窝胎兔)。参照文献^[2-3]于妊娠第 27 d 剖宫产术前 1 h 行超声引导下穿刺(穿刺针 22 G):胎肺组每只胎兔肺内注射 0.1 ml PS,羊膜腔组每只胎兔羊膜腔内注射 0.1 ml PS(图 1),对照组每只胎兔羊膜腔内注射 0.1 ml 生理盐水;注药后超声观察确认药物或生理盐水弥散。术后 1 h 行剖宫产取出早产兔。



A:胎兔羊膜腔内注射 PS;B:胎兔肺内注射 PS

图 1 超声引导下注射 PS 示意图(箭头示穿刺针)

每窝随机选取 2 只早产兔记录存活时间。剖出早产兔 30 min 后,每窝随机选取 2 只行支气管肺泡灌洗测量二棕榈磷脂酰胆碱(DPPC)和白细胞介素-6(IL-6)含量。取早产兔左肺下叶,行 HE 染色观察病理学改变,

参照文献^[4]行肺组织病理损伤评分。取右肺下叶,使用透射电镜观察 II 型肺泡上皮细胞(AEC II)超微结构改变;取肺组织切片行免疫组化测量 PS 相关蛋白-A(SP-A)表达水平并计算平均光密度,TUNEL 法检测其细胞凋亡并计算凋亡指数。

四、统计学处理

应用 SPSS 23.0 统计软件,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,两两比较行 LSD 法;肺组织病理损伤评分以中位数(四分位距)表示,组间比较行 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较行 Nemenyi 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、各组一般情况、存活时间及实验室检查结果比较
 各组早产兔均未见死胎和明显结构畸形,羊膜腔、胸腔及体表均未见出血等穿刺并发症。与对照组比较,胎肺组和羊膜腔组早产兔存活时间均明显延长,DPPC 含量和 SP-A 表达水平均增加,肺组织细胞凋亡指数和 IL-6 含量均降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与羊膜腔组比较,胎肺组早产兔 DPPC 含量、SP-A 表达水平及 IL-6 含量均增加,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);两组存活时间和凋亡指数比较差异均无统计学意义。见表 1。

表 1 各组早产兔存活时间和实验室检查指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	存活时间 (min)	DPPC 含量 ($\mu\text{g/ml}$)	SP-A 表达 水平	IL-6 含量 ($\mu\text{g/ml}$)	凋亡指数 (%)
胎肺组	333.30±60.05*	93.96±17.53*#	0.400±0.096*#	31.47±5.13*#	11.26±4.32*
羊膜腔组	326.20±53.13*	78.45±13.91*	0.280±0.070*	25.36±3.94*	15.61±3.90*
对照组	75.20±16.36	44.34±8.30	0.140±0.047	38.25±6.75	27.56±7.00
F 值	96.82	33.94	18.48	14.25	20.63
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与对照组比较,* $P < 0.05$;与羊膜腔组比较,# $P < 0.05$ 。DPPC:二棕榈磷脂酰胆碱;SP-A:肺表面活性物质相关蛋白-A;IL-6:白细胞介素-6

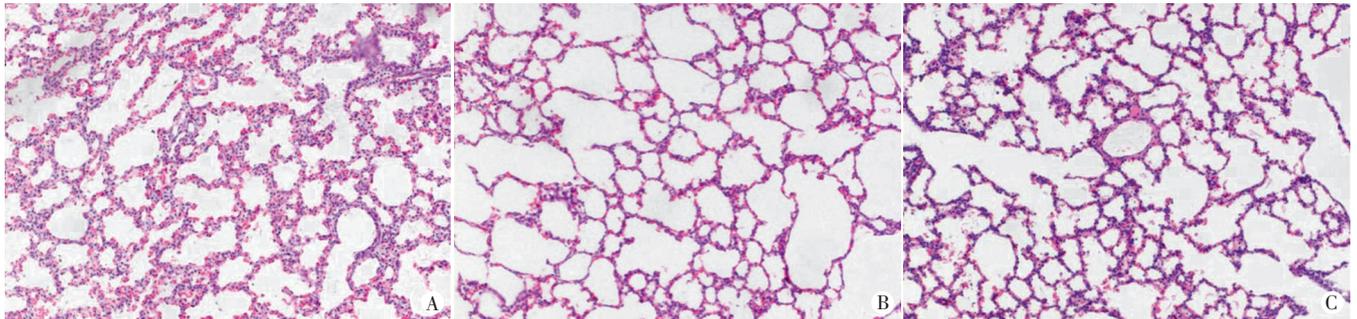
二、各组肺组织光镜下表现比较

对照组肺损伤病理评分为 5.67(4.67, 7.50)分;肺组织结构紊乱,肺泡部分萎缩,充气不均匀,肺泡隔较厚且厚薄不均,肺泡腔内多见水肿液、渗出物及红细胞。羊膜腔组肺损伤病理评分为 2.25(1.67, 3.04)分,胎肺组肺损伤病理评分为 2.17(1.58, 2.54)分,二者损伤程度均明显小于对照组,差异均有统计学意义(均

$P < 0.05$)。羊膜腔组与胎肺组镜下表现相似,肺泡结构基本完整,扩张较均匀,肺泡腔尚清晰,二者肺损伤病理评分比较差异无统计学意义。见图2。

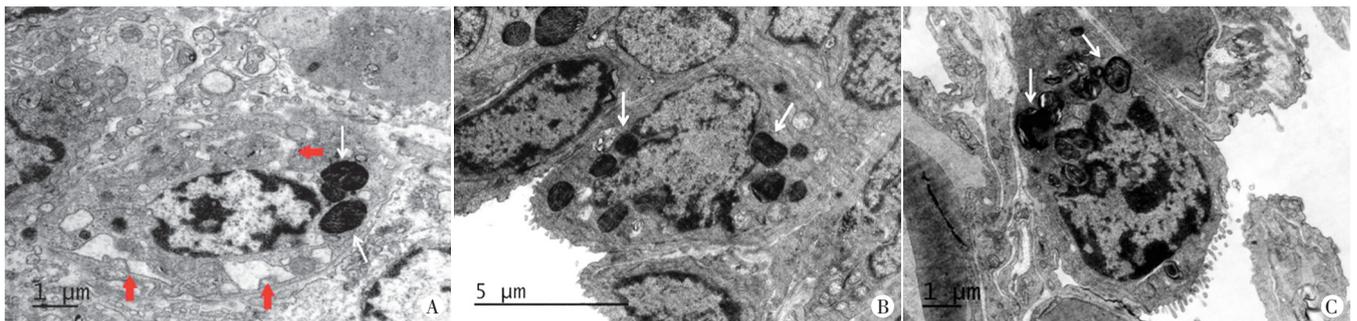
三、各组 AEC II 透射电镜下表现比较

对照组板层小体数量显著减少,排空现象明显,内质网多见不规则扩张、肿胀;羊膜腔组与胎肺组电镜下表现相似,可见较丰富的板层小体,内质网肿胀少见。见图3。



A: 对照组; B: 胎肺组; C: 羊膜腔组

图2 各组早产兔肺组织病理图(HE染色, ×100)



A: 对照组, 红色箭头示肿胀的内质网; B: 胎肺组; C: 羊膜腔组

图3 各组早产兔 AEC II 透射电镜下观(白色箭头示板层小体)

讨 论

早产儿由于出生过早,其PS含量不足且抗氧化应激系统未发育完善,易发生急性肺损伤,机制如下:①PS含量不足导致肺不张、肺顺应性下降,气体交换受限,随后出现低氧血症和代谢性酸中毒,从而使肺血管痉挛、血管内皮受损,导致以IL-6为主的细胞因子在炎症过程中的表达^[2];②在适应了胎儿期相对低氧的宫内环境后,新生儿出生后暴露于空气极易诱导大量活性氧自由基产生,而抗氧化系统尚不成熟的早产儿无法快速代谢过多的活性氧自由基,更易发生严重的氧化应激,直接影响细胞增殖、凋亡,继而引起细胞死亡和氧化损伤^[5-6]。新西兰兔的肺发育过程与人类相似,在其总妊娠时间的85%~90%时行剖宫产可获得早产动物肺损伤模型^[7]。

PS是储存于AEC II板层小体中的脂蛋白混合物,通过胞吐方式释放并铺展于肺泡内面,起到降低肺泡表面张力、稳定肺泡大小的作用。脂质中含量最高的是磷脂酰胆碱,其活性状态DPPC是PS主要生理作用

的活性成分。SP-A在蛋白质中表达量最丰富,是磷脂发挥功能的重要载体,具有抑制局部炎症介质、细胞因子的合成及释放、发挥免疫平衡的作用^[8]。本实验通过测量DPPC含量和SP-A表达水平来反映早产兔肺中PS含量,结果表明胎肺注射PS和羊膜腔内注射PS均可有效提高早产兔肺内DPPC含量和SP-A表达水平,降低肺损伤病理评分和凋亡指数,减少IL-6含量的释放,延长早产兔存活时间。相对于羊膜腔组,胎肺组DPPC含量和SP-A表达水平均更高(均 $P < 0.05$),说明超声引导下宫内微创给药能将药物更精准地作用于目标脏器,从而提高药物的利用率。虽然本实验中胎肺组和羊膜腔组肺组织病理损伤评分和凋亡指数比较差异均无统计学意义,但与羊膜腔组比较,胎肺组病理损伤评分和凋亡指数均呈下降趋势。本实验模型为兔早产后30 min的状态,时间较短,随着病程进展,肺中PS含量更高的胎肺组急性肺损伤程度是否较羊膜腔组向更好的方向发展尚有待今后进一步探究。

细胞凋亡是氧化应激相关肺损伤的一个重要组

织学特点,研究^[9-10]表明高氧诱导的细胞凋亡与肺损伤程度呈正相关。本实验中,相较于胎肺组和羊膜腔组,对照组早产兔 AEC II 板层小体数量显著减少,排空现象明显,这是一种代偿性表现,由于对照组早产兔肺 PS 含量少,机体代偿性加速释放已合成的 PS。对照组早产兔的 AEC II 内质网多出现不规则扩张、扭曲及肿胀,这是内质网应激的表现,长时间持续且严重的内质网应激会引发内质网相关性细胞凋亡。研究^[9]证实内质网应激启动的凋亡途径参与早产儿高氧肺损伤并发挥主要作用,其机制与内质网蛋白 57 和 CCAAT 增强子结合蛋白同源蛋白表达增加有关。文献^[11]报道 PS 应用于早产儿不仅可通过改善肺通换气功能、预防肺泡塌陷发挥治疗作用,还可减轻机体氧化应激反应程度,改善病情及临床预后,本实验结果亦与之一致。另外,本实验中胎肺组 IL-6 含量高于羊膜腔组($P < 0.05$),但两组早产兔均未见明显并发症,凋亡指数下降,胎肺组 IL-6 含量升高的原因可能是胎肺注射过程中对胎兔造成的应激刺激和穿刺损伤。IL-6 是机体急性应激反应中最敏感的一种标志物,在受到疼痛刺激、手术创伤后短期内可明显升高^[12]。本实验穿刺过程中胎兔亦存在胎动增多、心率加快等生理反应,若采用 25 G 或更细的穿刺针可能减少该生理反应。

综上所述,羊膜腔内和胎肺注射 PS 均可有效预防早产兔肺损伤。与羊膜腔内注射 PS 相比,胎肺注射相同剂量的 PS 效果可能更佳。随着超声介入技术的进一步发展和成熟,超声引导下胎肺注射 PS 有望成为预防早产儿肺损伤的新方法。

参考文献

[1] Surate Solaligue DE, Rodríguez-Castillo JA, Ahlbrecht K, et al.

Recent advances in our understanding of the mechanisms of late lung development and bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 313(6): 1101-1153.

[2] 朱思怡, 吕国荣, 陈秋月. 超声引导羊膜腔内注射肺表面活性物质联合氨溴索预防早产兔肺损伤[J]. *中国医学影像技术*, 2019, 35(5): 651-654.

[3] Agarwal N, Bathwal S, Kriplani A, et al. Intra-amniotic instillation of surfactants for the prevention of neonatal respiratory distress syndrome following preterm delivery[J]. *Int J Gynecol Obstet*, 2016, 135(2): 196-199.

[4] Ge Z, Jiang G, Zhao Y, et al. Systemic perfluorohexane attenuates lung injury induced by lipopolysaccharide in rats: the role of heme oxygenase-1[J]. *Pharmacol Rep*, 2010, 62(1): 170-177.

[5] Kalikkot Thekkevedu R, Guaman MC, Shivanna B. Bronchopulmonary dysplasia: a review of pathogenesis and pathophysiology[J]. *Respir Med*, 2017, 132(11): 170-177.

[6] Kulkarni AC, Kuppusamy P, Parinandi N. Oxygen, the lead actor in the pathophysiologic drama: enactment of the trinity of normoxia, hypoxia, and hyperoxia in disease and therapy[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9(10): 1717-1730.

[7] Nardiello C, Mižková I, Morty RE. Looking ahead: where to next for animal models of bronchopulmonary dysplasia?[J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 367(3): 457-468.

[8] Bates SR. P63 (CKAP4) as an SP-A receptor: implications for surfactant turnover[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2010, 25(1): 41-54.

[9] 王琴, 董文斌, 车忠丽, 等. 内质网应激与高氧诱导早产大鼠肺损伤的作用[J]. *临床儿科杂志*, 2014, 32(12): 1171-1175.

[10] Wu D, Liang M, Dang H, et al. Hydrogen protects against hyperoxia-induced apoptosis in type II alveolar epithelial cells via activation of PI3K/Akt/Foxo3a signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(2): 1620-1627.

[11] Dani C, Corsini I, Longini M, et al. Natural surfactant combined with superoxide dismutase and catalase decreases oxidative lung injury in the preterm lamb[J]. *Pediatr Pulmonol*, 2014, 49(9): 898-904.

[12] 吕卓辰, 熊晨君, 严估祺, 等. 实施加速康复外科麻醉管理对甲状腺手术应激水平的影响[J]. *临床麻醉学杂志*, 2017, 33(8): 733-737.

(收稿日期: 2020-01-05)

《临床超声医学杂志》征订启事

《临床超声医学杂志》是经国家科委批准,集超声影像诊断、治疗、工程及基础研究为一体的科技刊物。国内外公开发行,月刊。为“中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊”、“中国科技论文统计源期刊”、“中国科技核心期刊”。设有临床研究、实验研究、综述、经验交流、病例报道、述评、专家讲座及译文等栏目,报道超声医学领域影像诊断与治疗的先进技术和前沿进展,为广大临床超声医师和研究人员提供良好的学术交流平台。

本刊刊号:ISSN 1008-6978;CN 50-1116/R。邮发代号:78-116。

每期定价:19元,全年228元(含邮寄费)。请到全国各地邮局订阅,也可直接向本刊编辑部订阅。

地址:重庆市渝中区临江路74号,重庆医科大学附属第二医院内,临床超声医学杂志编辑部。邮编:400010

电话:023-63811304,023-63693117。Email:lccscq@vip.163.com