

· 研究原著 ·

文章编号:1000-2790(2007)12-1094-04

呼吸道合胞病毒建立哮喘动物模型中气道胆碱能神经的分布

方丽萍, 戚好文, 林汉军, 陈洪谦 (第四军医大学西京医院呼吸内科, 陕西 西安 710033)

Distributions of airway cholinergic nerves in animal models of asthma induced by respiratory syncytial virus

FANG Li-Ping, QI Hao-Wen, LIN Han-Jun, CHEN Hong-Qian
Department of Respiratory Diseases, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To study the neuromechanism of respiratory syncytial virus (RSV) infection-induced asthma by measuring airway responsiveness (AR) and cholinergic nerve distributions in airway smooth muscle in asthmatic guinea pigs produced by RSV. **METHODS:** Guinea pigs ($n=34$) were randomly divided into 4 groups: Hep-2/NS group ($n=9$), RSV/NS group ($n=9$), Hep-2/OVA group ($n=8$) and RSV/OVA group ($n=8$). Hep-2 and RSV were given in the form of nose drops and NS (normal saline) and OVA (ovalbumin) were inspired in gas. On day 21 after infection, we tested AR, counted eosinophils in tracheal mucosa and submucosa and positive cholinergic fibers in smooth muscle by immunohistochemistry. **RESULTS:** Intra-airway pressure (IP) of RSV/NS group had no significant difference from that of Hep-2/NS group ($P>0.05$), but IP of Hep-2/OVA group was much higher than those of Hep-2/NS and RSV/NS groups (both $P<0.05$), and IP of RSV/OVA group was higher than that of Hep-2/OVA group ($P<0.01$). Eosinophils: There was no significant difference between Hep-2/NS and RSV/NS groups ($P>0.05$), but Hep-2/OVA group was much higher than Hep-2/NS group and RSV/NS group (both $P<0.05$), and RSV/OVA group was much higher than Hep-2/OVA group ($P<0.01$). Positive cholinergic fibers in smooth muscle: There was no significant difference between Hep-2/NS group and RSV/NS group ($P>0.05$), and Hep-2/OVA group was higher than Hep-2/NS group and RSV/NS group (both $P<0.01$), but there was no significant difference between Hep-2/OVA group and RSV/OVA group ($P>0.05$). **CONCLUSION:** ① RSV infection could enhance OVA-induced airway hyperresponsiveness; ② OVA could increase the expression of positive cholinergic fibers in smooth muscle in airway, but RSV had no significant impact on it.

【Keywords】 respiratory syncytial viruses; asthma; bronchial hyperreactivity; eosinophils; cholinergic fibers

【摘要】目的: 用呼吸道合胞病毒(RSV)诱发豚鼠哮喘模型, 通过检测气道反应性和气道平滑肌层胆碱能神经分布变化, 研究神经机制在哮喘发病中的作用。方法: 34只豚鼠随机分为4组: Hep-2滴鼻+生理盐水(NS)雾化(Hep-2/NS)组, RSV滴鼻+NS雾化(RSV/NS)组, Hep-2滴鼻+鸡卵白蛋白(OVA)雾化(Hep-2/OVA)组和RSV滴鼻+OVA雾化(RSV/OVA)组, 其中Hep-2/NS组和RSV/NS组动物各9只, Hep-2/OVA和RSV/OVA组动物各8只, 以Hep-2/NS组为对照组。电刺激迷走神经法检测气道反应性, 计数气管粘膜和粘膜下嗜酸性粒细胞(Eos), 行胆碱能神经纤维免疫组化并计数阳性纤维数目。结果: 气道内压力(IP): RSV/NS组与Hep-2/NS组之间差异无统计学意义($P>0.05$), Hep-2/OVA组IP明显高于Hep-2/NS组和RSV/NS组(P 均 <0.05), RSV/OVA组IP明显高于Hep-2/OVA组($P<0.01$); Eos: Hep-2/NS组与RSV/NS组之间差异无统计学意义($P>0.05$), Hep-2/OVA组高于Hep-2/NS组和RSV/NS组(P 均 <0.05), RSV/OVA组明显高于Hep-2/OVA组($P<0.01$); 平滑肌层有胆碱能阳性纤维分布: RSV/NS组与Hep-2/NS组之间差异无统计学意义($P>0.05$), Hep-2/OVA组阳性纤维数目明显高于Hep-2/NS组和RSV/NS组($P<0.01$), 但RSV/OVA组与Hep-2/OVA组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。结论: ① RSV感染可促进OVA引起的豚鼠AHR发生; ② OVA可导致气道平滑肌层胆碱能阳性纤维分布增多, 但RSV对其增多无明显影响。

【关键词】 呼吸道合胞病毒; 哮喘; 支气管高反应性; 嗜酸性粒细胞; 胆碱能纤维

【中图分类号】 R735.3 **【文献标识码】** A

0 引言

哮喘是困扰人类呼吸道健康的主要疾病之一, 其发病机制错综复杂, 至今尚未明确。目前, 大量调查研究证实呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)感染可诱发哮喘^[1]。动物实验中也发现, 呼吸道RSV感染后给予鸡卵白蛋白(ovalbumin, OVA)雾化吸入, 可导致小鼠发生明显的气道高反应性、肺泡灌洗液中嗜酸性粒细胞(eosinophils, Eos)数目增多等表现^[2], 气道反应性主要受气道胆碱能神经的支配。本实验中我们尝试以RSV感染结合OVA雾化吸入, 复

收稿日期:2006-11-21; 接受日期:2007-02-30

通讯作者:戚好文. Tel: (029) 84775577 Email: qihaowen@fmmu.edu.cn

作者简介:方丽萍. 硕士生(导师戚好文). Tel: (029) 82502074
Email: xiaofang@fmmu.edu.cn

制哮喘豚鼠模型,通过研究气道胆碱能阳性神经纤维的分布状况,探索 RSV 感染诱发哮喘的神经机制。

1 材料和方法

1.1 材料 雌性豚鼠 34 只,体重 250~300 g (由第四军医大学实验动物中心提供);RSV Long 株 A 型和 Hep-2 细胞(西京医院儿科实验室惠赠);RPMI 1640(美国 GIBCO 公司);胎牛血清(甘肃民海生物工程公司);OVA, II 级(美国 Sigma 公司);ChAT 试剂盒(美国 Chemicon 公司);超声波细胞粉碎机 JY92-II(宁波新芝科技股份有限公司);二道生理记录仪(甘肃国营永红器材厂);动物呼吸机(浙江医科大学医学仪器实验厂)。

1.2 方法

1.2.1 病毒培养 RSV 接种于 Hep-2 单细胞层,以含 20 g/L 胎牛血清的 RPMI 1640 为培养液,37℃,50 mL/L CO₂ 孵育,传代至 75% 以上的细胞发生病变。收集细胞,低温超声破碎细胞,4℃ 条件下离心 10 000 g, 10 min,收集上清,分成 4 份,-20℃ 冻存储备用。

1.2.2 动物分组及制模 34 只豚鼠随机分为 4 组: Hep-2 滴鼻 + 生理盐水(normal saline, NS)雾化(Hep-2/NS)组,RSV 滴鼻 + NS 雾化(RSV/NS)组, Hep-2 滴鼻 + OVA 雾化(Hep-2/OVA)组和 RSV 滴鼻 + OVA 雾化(RSV/OVA)组,其中 Hep-2/NS 和 RSV/NS 组动物各 9 只, Hep-2/OVA 和 RSV/OVA 组动物各 8 只,以 Hep-2/NS 组作为对照组。乙醚吸入麻醉下给予 Hep-2 细胞培养液或 RSV 悬液 250 mL 滴鼻吸入,第 2 日相同剂量加强 1 次。第 7 日开始给予 1 g/mL OVA 或者 NS 隔天雾化吸入,每次 30 min,持续 2 wk。第 4 日各取 Hep-2/NS 组和 RSV/NS 组豚鼠 1 只,心脏注射空气致死,无菌条件下取肺组织,均浆,接种于 Hep-2 细胞,观察细胞变化情况。

1.2.3 气道反应性检测 感染后第 21 日,豚鼠以乌拉坦 1.8 g/kg 腹腔注射麻醉,气管插管,一侧侧孔接压力传感器,经二道生理记录仪记录气道内压力(intra-airway pressure, IP)(cmH₂O, 1 cmH₂O = 0.1 kPa),另一侧连接动物呼吸机。参数设置:潮气量 10 mL/kg,频率:60 次/min,记录 IP。用蚊式止血钳钝性分离双侧迷走神经约 1 cm,结扎,剪断,浸入石蜡油以免坏死,远端置于保护电极上,连接电刺激器。参数设置:频率 2~25 Hz,脉冲宽度 0.20 ms,幅度 10 V,每段刺激时间 60 s,间歇时间 2 min。给予电刺激后记录 IP 的变化。

1.2.4 病理学观察 主动脉穿刺,同时剪开右心耳,生理盐水灌注冲洗,取主气管和左肺常规 40 g/L

甲醛溶液固定,24 h 后以 300 g/L 蔗糖缓冲液置换,冰冻包埋剂包埋,恒冷箱连续切片,片厚 16 μm,冷风干燥后,进行 HE 染色,400× 光镜下随机选 10 个视野,计数支气管粘膜,粘膜下细胞总数和 Eos 的数目,计算每视野平均数(个/视野)。

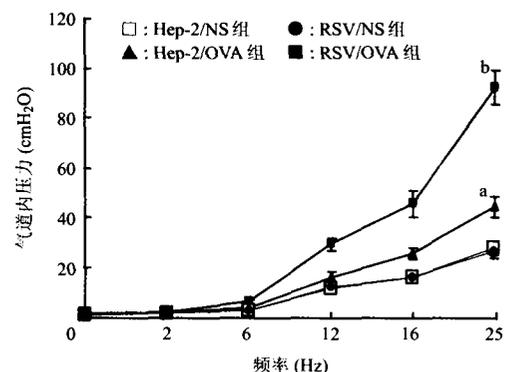
1.2.5 胆碱能神经免疫组化 免疫组化按 ChAT 试剂盒中的操作步骤进行。切片以 PBS 漂洗,100 g/L 正常牛血清中室温孵育 15 min,羊抗 ChAT (1:1000)孵育,4℃ 过夜,再于驴抗羊血清中室温孵育 4 h,然后于 1:200 的 A,B 混合液孵育 2 h,最后用 DAB 进行成色反应 10 min, PBS 漂洗,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,DPX 封片。阴性对照组给予抗体稀释液代替一抗,其余同上。以气管分叉处气道为分析对象,400× 光镜下图像分析,随机选取 10 个视野,测量每个视野下阳性纤维数目(条/视野)。

统计学处理:采用 SPSS 10.0 统计软件进行数据分析,各组间比较采用单因素方差分析及 LSD-*t* 检验,组间方差不齐时,采样秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 感染后症状 经 RSV 滴鼻的豚鼠在第 3 日出现打喷嚏,鼻腔有少量卡他样无色透明分泌物,其肺组织匀浆接种细胞后可观察到细胞发生融合性病变;而用 Hep-2 滴鼻的豚鼠无明显呼吸道异常表现,肺组织匀浆接种细胞后观察细胞也无明显变化。

2.2 气道反应性变化 给予电刺激后各组 IP 均呈频率依赖型增高。Hep-2/NS 组和 RSV/NS 组之间差异无统计学意义($P > 0.05$), Hep-2/OVA 组 IP 高于 Hep-2/NS 组和 RSV/NS 组(P 均 < 0.05),提示 OVA 雾化吸入可导致气道反应性增高。RSV/OVA 组 IP 明显高于 Hep-2/OVA 组($P < 0.01$),提示 RSV 感染再给予 OVA 雾化,可导致明显的气道高反应(图 1)。



* $P < 0.05$ vs Hep-2/NS 组和 RSV/NS 组; ^b $P < 0.01$ vs Hep-2/OVA 组。

图 1 不同频率刺激下各组豚鼠气道内压力的变化

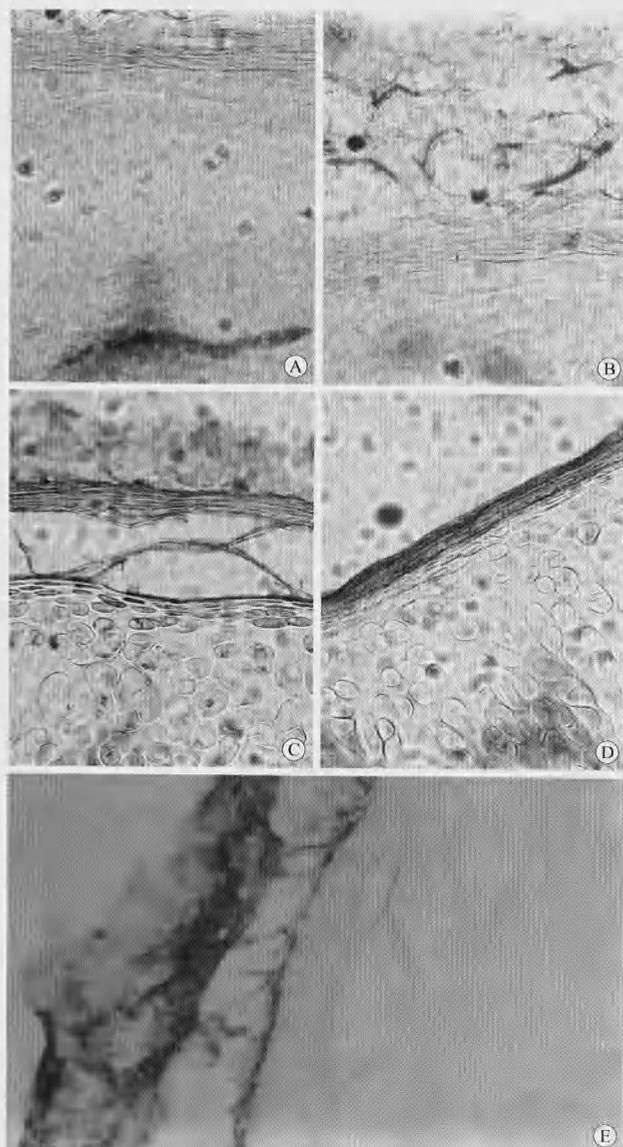
2.3 胆碱能神经阳性纤维计数 每个视野下 Hep-2/NS 组, RSV/NS 组, Hep-2/OVA 组和 RSV/OVA 组豚鼠气道平滑肌层胆碱能阳性神经纤维分布为: 7.20 ± 3.07 , 6.80 ± 3.29 , 12.80 ± 3.07 和 13.80 ± 2.76 . 其中 Hep-2/NS 组和 RSV/NS 组阳性纤维数目差异无统计学意义 ($P > 0.05$). Hep-2/OVA 组阳性纤维数目高于 Hep-2/NS 组和 RSV/NS 组 (P 均 < 0.01), 但 RSV/OVA 组和 Hep-2/OVA 组之间阳性纤维数目差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2).

2.4 细胞分类计数 每个视野下 Hep-2/NS 组, RSV/NS 组, Hep-2/OVA 组和 RSV/OVA 组豚鼠气道粘膜和粘膜下细胞总数分别为: 6.83 ± 0.87 , 6.55 ± 0.90 , 9.36 ± 1.14 和 17.11 ± 1.64 ; Eos 数目分别为: 0.88 ± 0.84 , 1.25 ± 1.04 , 6.38 ± 2.83 和 24.00 ± 5.93 . 其中 Hep-2/NS 组和 RSV/NS 组细胞总数和 Eos 数目差异无统计学意义 ($P > 0.05$). Hep-2/OVA 组细胞总数和 Eos 数目均明显高于 Hep-2/NS 组和 RSV/NS 组 ($P < 0.05$). RSV/OVA 组出现明显的细胞浸润, 细胞总数和 Eos 数均高于 Hep-2/OVA 组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$).

3 讨论

近年来, 哮喘的发病率和死亡率均有逐年增高趋势, 其中病毒感染为主要病因之一. 成人中以鼻病毒感染为主, 而婴幼儿中则以呼吸道 RSV 感染最为常见^[3]. 婴幼儿时期感染 RSV 后可引起喘息、气道高反应性等表现, 预示着日后可能出现哮喘^[4]. 气道高反应性是哮喘的重要特征, 主要受气道胆碱能神经的调控. 气道炎症对胆碱能神经的影响直接导致气道反应性的变化^[1]. 直接刺激迷走神经, 可以明确气道反应性增高与迷走神经功能亢进有关, 避免了气道炎症和其它因素的干扰. RSV 感染导致气道高反应性的机制很复杂. 有研究发现 RSV 急性感染可导致以 IFN- γ 为代表的 Th1 样细胞因子上调, 再次接触过敏原可引起 Th1 样细胞因子转变为类似哮喘的 Th2 样细胞因子, IL-4, IL-5 水平上调, 而 IFN- γ 下调, 提示 RSV 感染可能通过免疫-炎症机制导致气道高反应性, 从而诱发哮喘^[2,5]. RSV 感染同样可引起气道内感觉神经肽分泌失衡, i-NANC 神经功能抑制, e-NANC 功能亢进, 从而促进气道高反应性的发生^[6]. 国内学者通过灭活的呼吸道 RSV 成功复制了哮喘动物模型, 直接证实了 RSV 感染可以诱发哮喘^[7].

我们的结果显示, RSV 感染末期气道反应性恢复正常, 这提示 RSV 感染引起的气道高反应性为可逆的改变, 随着炎症消失而恢复正常水平. 但单纯吸入 OVA 即引起气道反应性增高, 且这种气道高反应性与气道胆碱能神经功能亢进、神经纤维分布增多有关. 在吸入 OVA 之前感染 RSV 则进一步加重气道高反应性, 提示 RSV 感染可以促进气道高反应性的发生. 但是值得指出的是, RSV 感染并不促进气道胆碱能神经的分布, 因此其促进气道高反应性发生的机制不是通过促进气道胆碱能神经分布来实现的, 这也为进一步研究 RSV 诱发哮喘的神经机制提出了新的挑战.



A: Hep-2/NS 组气道平滑肌层胆碱能阳性纤维数目较少; B: RSV/NS 组阳性纤维分布同样稀少; C: Hep-2/OVA 组阳性纤维密度增高; D: RSV/OVA 组阳性纤维的密度同样增高; E: 阴性对照, 平滑肌层未见阳性纤维.

图 2 各组豚鼠气道平滑肌层胆碱能阳性神经纤维的分布
SABC $\times 400$

【参考文献】

- [1] 林耀广. 现代哮喘病学[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 75-79.
- [2] Jurgen S, Mika JM, Grzegorz C, et al. Transfer of the enhancing effect of respiratory syncytial virus infection on subsequent allergic airway sensitization by T lymphocytes [J]. J Immunol, 1999, 163(10): 5729-5734.
- [3] 李明才, 何韶衡. 病毒感染在诱发和加重哮喘中的作用[J]. 中国呼吸和危重监护杂志, 2003, 2(3): 189-192.
- [4] Piedimonte G, Simoes EA. Respiratory syncytial virus and subsequent asthma: one step closer to unravelling the Gordian knot? [J]. Eur Respir J, 2002, 20(3): 515-517.
- [5] Bendejia K, Gagro A, Bace A, et al. Predominant type-2 response in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection demonstrated by cytokine flow cytometry [J]. Clin Exp Immunol, 2000, 121(2): 332-338.
- [6] Dakhama A, Park JW, Taube C, et al. Alteration of airway neuropeptide expression and development of airway hyperresponsiveness following respiratory syncytial virus infection [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 288(4): 761-770.
- [7] 张惠兰, 张珍祥, 徐永健, 等. 用紫外线灭活的呼吸道合胞病毒复制小鼠哮喘动物模型 [J]. 中国病理生理杂志, 2002, 18(12): 1561-1563.

编辑 杨湘华

· 经验交流 · 文章编号:1000-2790(2007)12-1097-01

血液灌流加血液透析抢救重症有机磷农药中毒 37 例疗效观察

黄洪涛

(河南大学附属淮河医院透析室, 河南 开封 475100)

【关键词】血液灌流; 血液透析; 有机磷; 中毒

【中图分类号】R459.5 【文献标识码】B

1 对象和方法

1.1 对象 我院 2000-05/2006-11 采用血液灌流 (HP) 加血液透析 (HD) 治疗重症有机磷中毒患者共 37 (男 11, 女 26) 例, 年龄 18~53 (平均 35) 岁。均符合我国卫生部职业性急性有机磷农药中毒诊断标准。患者由基层医院转入 28 例, 直接入院 9 例, 均为口服中毒, 服毒至就诊时间为 2~48 h。其中辛硫磷中毒 9 例, 甲胺磷 13 例, 氧化乐果 8 例, 敌敌畏 2 例, 混合有机磷中毒 5 例。中毒表现: 深昏迷 26 例, 脑水肿 21 例, 呼吸衰竭 12 例, 抽搐 17 例, 肌震颤 17 例, 消化道出血 2 例, 血压偏低 29 例, 心衰 4 例, 肾衰竭 5 例, 血清胆碱酯酶活力测定 10~342 μ /L。

1.2 方法 患者入院后按重度急性有机磷农药中毒治疗常规给予彻底洗胃、导泻, 吸氧, 氯磷定, 阿托品及充分输液 (转入者在首诊医院已处理者除外), 视患者病情行气管插管呼吸机给氧和心电监护等综合治疗。之后经家属同意对患者进行 HP+HD 的血液净化方法治疗。使用碳肾为 YTS-160, 透析器为 FB-130A, 透析机为金宝 AK-100 型。取桡动脉和肘正中静脉穿刺或股静脉置留双腔导管建立血管通路后进行治疗 1.5~2 h, 普通肝素首剂量 1~2 mg/kg, 维持剂量 8~10 mg/h, 血流量控制在 150~200 mL/min。根据病情进行超滤, 在灌流和透析过程中缩短阿托品治疗时间, 同时增加特异性拮抗药物用量, 治疗次数依病情而定。

2 结果 37 例重症患者中 2 例因服药量太大, 耽误时间过长, 终因深度昏迷合并脑水肿中枢性呼吸衰竭, 于血液净化后

2 h 后死亡。1 例因家属不同意第二次净化治疗抢救无效死亡, 其余 34 例均成功救治, 随诊无反跳及后遗症。在治疗过程中, 2 例患者血钙轻度下降, 1 例消化道出血 (有溃疡病史) 经调整肝素剂量并用鱼精蛋白对症处理解决。呕吐 4 例, 皮下瘀斑 3 例, 鼻衄 1 例, 血尿 1 例, 经对症治疗后症状均缓解, 未见其他明显副作用。

3 讨论

3.1 血液净化的时机和特点 我们的体会是: 对于①经保守治疗, 但病情进行性恶化者; ②先天性或后天性肝、肾功能异常者; ③服用毒物或药物超过自身清除能力的 30% 的患者, 均应早期进行血液净化治疗。此外, HD 适用于分子量 < 5000 道尔顿、水溶性、分布体积 < 1 mL/kg, 低血浆蛋白结合力的毒物或药物中毒者, 如并发急性肾衰者尤以 HD 为佳。HP 适用于脂溶性高、分布体积大、易与血浆蛋白结合的毒物或药物中毒者。对于有机磷中毒者多采用活性炭罐做 HP 而不宜使用树脂罐。HD+HP 适用于所服毒物或药物不明者, 特别是针对中毒在 8 h 以内的治疗效果显著^[1]。

3.2 血液净化的并发症 ①血小板减少是血液灌流最典型的副作用, 在灌流开始后 0.5~1 h 最为显著。此外, 活性炭也会吸附纤维蛋白原, 这都是造成出血倾向的原因, 应特别注意。②血液灌流能够清除如抗生素、升压药等, 治疗时应及时补充被吸附的部分。③若患者在灌流后 0.5~1 h 左右出现寒战、发热、胸闷、呼吸困难等症状, 提示吸附剂生物相容性差而出现炭肾过敏反应, 故在每次灌流前加用地塞米松 5~10 mg 静脉推注可以预防^[2]。

3.3 对症处理 血液净化治疗后, 仍需依据药物或毒物对人体不同脏器的损害, 继续给予相应的支持治疗, 对中毒严重, 持续深昏迷, 原有肝肾功能不全或发生反跳严重者, 应视病情适当间隔时间, 24 h 内进行重复治疗, 对病情恢复很有必要^[3]。

【参考文献】

- [1] 孙玉汾. 血液灌流治疗重症中毒 [J]. 中国临床医学, 2004, 11(3): 364-365.
- [2] 董素莲. 血液灌流串透析救治有机磷中毒的护理 87 例 [J]. 实用护理杂志, 2002, 18(6): 20.
- [3] 张晓光. 血液净化治疗重症药物中毒的临床疗效分析 [J]. 中国血液净化, 2004, 3(4): 224-225.

编辑 杨湘华

收稿日期: 2007-03-21; 接受日期: 2007-04-11

作者简介: 黄洪涛. 住院医师. Tel: (0378)3906316 Email: hhtyaz@

126.com