文章编号:1000-5404(2005)04-0313-04

论著

油酸/脂多糖致伤老年大鼠多器官功能障碍综合征脏器损害规律及TNF-α作用的研究

王兴胜[1],吴国明[1],钱桂生[1],徐 智[1],陈维中[1],李淑平[1],薛 桥[2],王士雯[2] ([1]第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所,全军呼吸病研究重点实验室,重庆 400037; [2]中国人民解放军301医院老年心血管病研究所,北京 100853)

提 要: 目的 观察油酸/脂多糖致老年大鼠多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome in the elderly rats, MODSE)脏器损伤的规律,探讨肺损伤在这一过程中的作用,以及TNF-α在MODSE发生、发展中的作用。**方法** 80只SD大鼠(20月龄和3月龄各40只)分为老年组及青年组,予油酸(OA,0.25 ml/kg)和脂多糖(LPS,3.5 mg/kg)分次静脉注射(间隔4 h),建立二次打击MODSE和青年MODS(MODSY)模型。观察对照组及伤后2、6、24 h,重要器官(肺、心、肝、肾)病理及功能的变化,同时检测血清及肺、心、肝和肾组织中TNF-α含量。**结果** 相同剂量的OA+LPS均能导致青年及老年鼠发生MODS。OA+LPS致伤后2 h,老年组和青年组PaO_2即显著降低[分别为(67.5±8.66)、(59.3±7.41) mmHg, $P<0.01$],提示肺脏损害出现最早、程度最重。伤后6 h,心、肝、肾生化指标达峰值($P<0.05$),且老年组脏器损害较同时相点的青年组明显为重($P<0.05$)。伤后2 h,血清及肺、心、肝和肾组织中TNF-α含量即达峰值,且持续高于正常对照组($P<0.05$),其中以肺脏中TNF-α升高幅度最大。老年组TNF-α含量均显著高于同时相点的青年组($P<0.05$)。**结论** 油酸+脂多糖所致老年鼠多器官功能障碍重于青年鼠,其中以肺损伤出现最早、程度最重。致伤早期肺组织TNF-α含量的迅速升高在MODSE的发病机制中可能起重要作用。

关键词: 多器官功能障碍综合征;肿瘤坏死因子;油酸;脂多糖

中图法分类号: R392.11; R442.8; R914.3 **文献标识码:** A

Regularity in organ injuries and roles of TNF-α in multiple organ dysfunction syndrome induced by oleic acid and lipopolysaccharide in elderly rats

WANG Xing-sheng[1], WU Guo-ming[1], QIAN Gui-sheng[1], XU Zhi[1], CHEN Wei-zhong[1], LI Shu-ping[1], XUE Qiao[2], WANG Shi-wen[2] ([1]Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037; [2]Institute of Cardiovascular Diseases, No. 301 Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: Objective To investigate the regularity in organ injuries and the roles of tumor necrosis factor alpha (TNF-α) in multiple organ dysfunction syndrome in the elderly rats (MODSE). **Methods** Models of MODSE and multiple organ dysfunction syndromes in the young (MODSY) were established respectively by injection of oleic acid (OA) at the dose of 0.25 ml/kg and lipopolysaccharide (LPS) at the dose of 3.5 mg/kg) into SD rats (4 h interval). A total of 40 3-month-old and 40 20-month-old SD rats were randomly divided into four groups respectively: saline control group ($n=10$) and three model groups ($n=30$) including 2-, 6-, and 24-h groups. Incidences of MODS were diagnosed by their criteria. The changes of the partial pressure of arterial oxygen (PaO_2) level were observed. Serum levels of alanine aminotransferase (ALT), total bilirubin (TB), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Cr), and creatine phosphokinase (CPK) were measured by the automatic biochemistry analyzer. The TNF-α contents in plasma and in the lung, heart, liver, and kidney were determined with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Injection of OA and LPS into the young and the elderly rats led to multiple organs dysfunctions. PaO_2 of Young Group and Elderly Group decreased to minimum at 2 h [(67.5±8.66) and (59.3±7.41) mmHg, respectively, $P<0.01$]. While the biochemical indexes of the heart, liver, and kidney organ injuries increased to maximum at 6 h ($P<0.05$, $P<0.01$). Furthermore, the organs in Elderly Group were damaged more

基金项目: 国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G2000057004)
Supported by the National Key Basic Research and Development Plan of China ("973" Projects, G2000057004)

作者简介: 王兴胜(1973-),男,山东省聊城市人,博士研究生,主治医师,主要从事老年多器官功能不全的肺启动机制方面的研究,现在大坪医院呼吸内科。电话:(023) 68755320

通讯作者: 吴国明,电话:(023)68774603,E-mail: guomingwu@mail.tmmu.com.cn

收稿日期: 2004-12-01; **修回日期:** 2005-02-02

seriously than those in Young Group at the same time points ($P<0.05$, $P<0.01$). TNF-α concentrations in plasma and organs increased significantly (especially in the lungs) after LPS injection and peaked at 2 h after damage ($P<0.05$, $P<0.01$). TNF-α levels were higher in Elderly Group than those in Young Group at the same time points ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** OA and LPS injection can lead to more serious multiple organ injuries in elder rats than those in young rats. The lung is injured firstly and most seriously. Early and quickly increase of TNF-α concentration in the lungs may be an important pathophysiological mechanism of MODSE.

Key words: multiple organ dysfunction syndrome; tumor necrosis factor; oleic acid; lipopolysaccharide

严重创伤和感染,所致全身炎症反应综合征(severe systemic inflamatory kesponse syndrome, SIRS)和多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS),发病机制复杂。近年来 TNF-α 在其发病过程中的作用备受重视,但 TNF-α 在老年多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODSE)中的作用尚不明确。本研究通过复制油酸 + 内毒素(OA + LPS)两次致伤的 MODSE 及青年多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndromes in the young, MODSY)大鼠模型,观察其主要脏器功能的变化及其规律,同时检测大鼠血浆及各脏器组织中 TNF-α 含量的变化,探讨 MODSE 过程中脏器损伤的规律,以及 TNF-α 在 MODSE 发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 80 只,雌雄不拘,由第三军医大学大坪医院野战外科研究所动物中心提供。老年组 40 只,20 月龄,体质量(396 ± 48)g;青年组 40 只,3 月龄,体质量(225 ± 26)g。

1.2 主要试剂

脂多糖(*E. coli* lipopolysaccharide, LPS):血清型 O111:B4, Sigma,USA。油酸(oleic acid, OA):化学纯,苏州正兴化工研究所。TNF-α 检测试剂盒:北京晶美生物工程有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 油酸 + 脂多糖(OA + LPS)二次致伤 MODS 模型的建立

1.3.1.1 实验分组 老年组随机分为 4 组,各 10 只:生理盐水对照组(E-NSC)、OA + LPS 2 h 组(E-2 h)、6 h 组(E-6 h)、24 h 组(E-24 h)。青年组随机分为 4 组,各 10 只:生理盐水对照组(Y-NSC)、OA + LPS 2 h 组(Y-2h)、6 h 组(Y-6 h)、24 h 组(Y-24 h)。

1.3.1.2 模型制作与标本留取 大鼠处理前禁食不禁水 12 h,用盐酸氯胺酮溶液(50 mg/kg)腹腔麻醉,经颈静脉分次注射 OA 0.25 ml/kg 和 LPS 3.5 mg/kg,间隔 4 h,对照组注入等体积生理盐水。在规定时相点经颈总动脉取血测动脉血气后放血处死,并分别取血留血清检测各种生化指标和 TNF-α。取肺、心、肝、肾组织 0.4 g,加入生理盐水制成 10% 匀浆液,离心留取上清,-20 ℃保存备用。

1.4 观察指标

参照动物 MODS 诊断及评分标准[1]。

1.4.1 症状、体征观察 从致伤开始到 24 h,观察各时相点大鼠的精神状态、刺激反应、活动度及死亡率等。

1.4.2 病理变化 每组随机选取 4 只大鼠分别留少许肺、心、肝、肾组织,10% 甲醛固定,石蜡包埋切片行 HE 染色观察病理改变。

1.4.3 血气分析 各组动物处死前自右颈总动脉采血,用 IL1620 型自动血气分析仪(美国)进行测定。

1.4.4 生化指标 用自动生化分析仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TB)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)、肌酸磷酸激酶(CPK)。

1.4.5 血清及肺、心、肝、肾组织 TNF-α 含量 用酶联免疫吸附试验(ELISA)法测定,按试剂盒说明进行。

1.5 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,作单因素方差分析,计数资料采用 χ^2 检验,所有数据应用 SPSS10.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 大鼠症状、体征变化

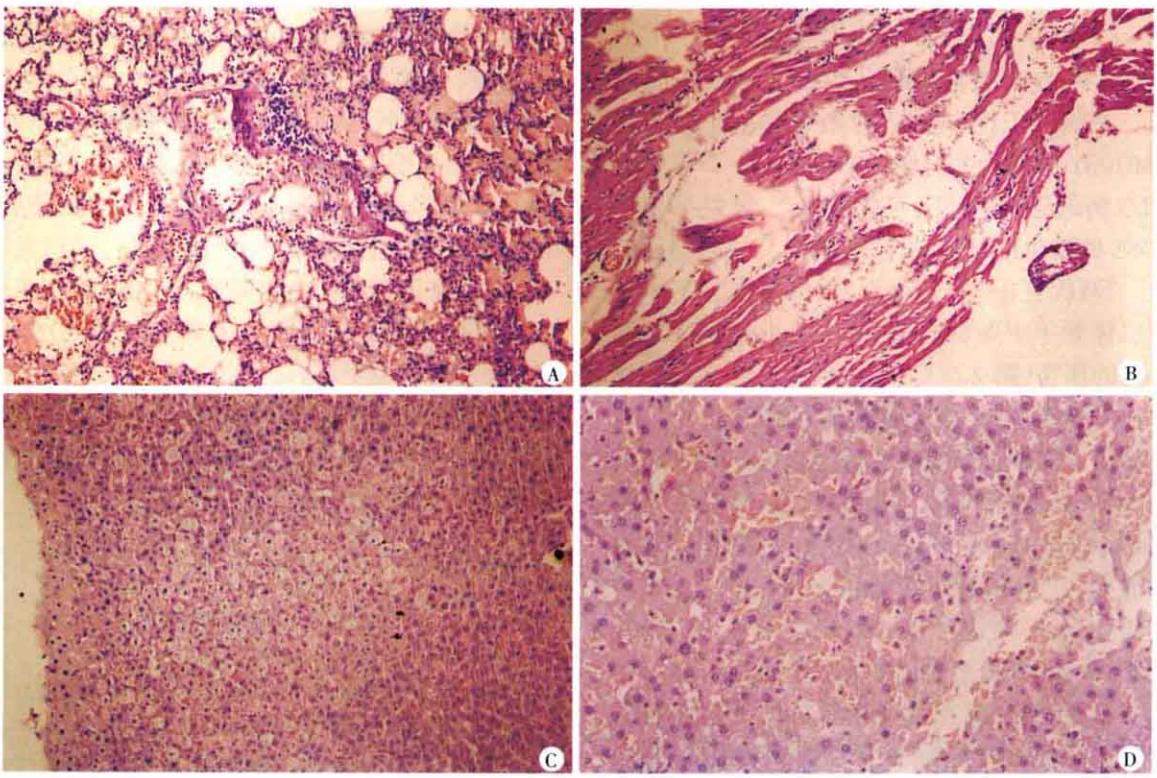
在注入 OA 后大鼠即刻出现呼吸急促、烦躁,然后稍有缓解,注入 LPS 后呼吸窘迫症状进一步加重,于 2 h 程度最重,有紫绀,部分可见血性泡沫样液体从鼻腔溢出,随着时间延长,表现为精神萎靡、懒动、对刺激反应差,多数出现稀便,部分有血尿。老年组症状、体征普遍较青年组严重,生理盐水组无明显变化。老年组死亡率 40%(12/30)显著高于青年组 16.7%(5/30)($P<0.05$)。

2.2 病理学观察

2 h 即可见肺组织充血、水肿,光镜下可见灶状出血、内皮受损、间质水肿、肺泡壁显著增厚,且有大量红、白细胞浸润和部分肺泡萎缩(图 1A)。而此时心、肝、肾组织仅有轻微的充血及炎细胞浸润改变,6 h 出现较明显的病理改变:心脏表现为小血管周围炎细胞浸润,血管扩张充血,心肌间质水肿,局部心肌纤维变性、断裂,浓染固缩,结构不清或空泡变(图 1B);肝脏可见肝细胞浊肿及胞浆疏松变性,肝窦充血,枯否细胞增生,多量中性粒细胞、淋巴细胞与大单核细胞浸润,汇管区炎细胞浸润,点灶状肝细胞坏死(图 1C);肾脏改变为肾小球充血或缺血,炎细胞浸润,肾小管上皮轻度浊肿,间质水肿;上皮空泡变性等(图 1D)。在同一时相点老年鼠的病理改变均较青年鼠严重。

2.3 动脉血氧分压(PaO_2)的变化

OA + LPS 2 次致伤后,大鼠 PaO_2 显著降低,达到急性肺损伤(ALI)或急性呼吸窘迫综合征(ARDS)标准,2 h 组降低幅度最大,并保持在较低水平;而在同一时相点老年组较青年组降低更明显($P<0.05$)(表 1)。



A: Pathomorphology of the lung tissue in E-2 h group; B: Pathomorphology of the myocardial tissue in E-6 h group; C: Pathomorphology of the liver tissue in E-6 h group; D: Pathomorphology of the kidney tissue in E-6 h group

图 1　病理学结果（HE × 200）

Fig 1　Pathological Results（HE × 200）

表 1　各组 PaO_2 变化（$\bar{x} \pm s$，mmHg）

Tab 1　Changes of PaO_2 in each group（$\bar{x} \pm s$，mmHg）

Group	Young	Elderly
NSC	100.2 ± 11.22	98.3 ± 9.11
2 h	67.5 ± 8.66**	59.3 ± 7.41**#
6 h	72.3 ± 8.84**	65.8 ± 6.07**#
24 h	75.7 ± 9.59**	67.6 ± 7.87**#

**：$P < 0.01$，*vs* NSC；#：$P < 0.05$，*vs* Young

2.4　心、肝、肾功能生化指标的变化

二次致伤后青年鼠与老年鼠的 ALT、TB、CPK、BUN 和 Cr 水平均较各自对照组显著升高，达到动物 MODS 诊断评分标准[1]，于 6 h 升高幅度最大，在该时相点老年组 ALT、T-BIL、CPK 和 Cr 四项指标均显著高于青年组（$P < 0.05$）。在 24 h 点 ALT、T-BIL、CPK 已明显下降，而 BUN 和 Cr 降低趋势不明显（表 2）。

2.5　血清及肺、心、肝、肾组织中 TNF-α 含量的变化

对照组大鼠血清中有较低浓度的 TNF-α，各脏器组织上清中也有一定的基础含量，由低至高依次为肺、心、肾和肝。二次致伤后 2 h 血清及各组织中 TNF-α 均明显升高（$P < 0.05$，$P < 0.01$），且老年组较青年组升高显著（$P < 0.05$，$P < 0.01$），在各组织中以肺脏升高幅度最大，青年鼠和老年鼠 2 h 点分别为各自对照组的 3.2 倍和 3.9 倍（表 3）。

表 2　各组心、肝、肾功能生化指标变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2　Changes of biochemical indexes of the heart, liver, and kidney in each group（$\bar{x} \pm s$）

Group	ALT (U/L)	TB(μmol/L)	CPK (U/L)	BUN (mmol/L)	Cr (μmol/L)
Y-NSC	29.70 ± 6.82	0.94 ± 0.355	314.90 ± 105.12	7.76 ± 0.997	22.10 ± 8.27
Y-2 h	59.50 ± 10.73**	1.52 ± 0.54	1 131.75 ± 374.06**	9.91 ± 1.81	25.62 ± 11.91
Y-6 h	70.80 ± 16.99**	2.28 ± 1.02*	2 356.20 ± 722.57**	12.66 ± 5.14*	30.43 ± 13.91*
Y-24 h	43.80 ± 8.07**	1.77 ± 0.96	950.57 ± 760.55*	9.74 ± 2.04*	29.99 ± 10.02*
E-NSC	37.25 ± 10.44	1.05 ± 0.89	420.50 ± 287.6	9.23 ± 1.97	29.03 ± 11.2
E-2 h	86.60 ± 40.09△△	2.88 ± 1.03△	1 984.20 ± 573.63△△	11.26 ± 1.17	31.48 ± 2.05
E-6 h	102.20 ± 32.86△△#	3.32 ± 1.39△△#	3 100.20 ± 1423.6△#	14.06 ± 5.16△	41.38 ± 12.83△#
E-24 h	64.30 ± 21.21△△#	1.42 ± 0.6	628.60 ± 507.56	14.02 ± 1.4#	36.35 ± 7.65△#

*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$，*vs* Y-NSC；△：$P < 0.05$，△△：$P < 0.01$，*vs* E-NSC；#：$P < 0.05$，*vs* Young

表 3　血清及肺、心、肝、肾组织中 TNF-α 含量的变化（$\bar{x} \pm s$，ng/L）

Tab 3　Changes of TNF-α concentrations in blood serum and tissues in each group（$\bar{x} \pm s$，ng/L）

Group	Serum	Lung	Heart	Liver	Kidney
Y-NSC	5.14 ± 0.68	246.21 ± 28.32	387.66 ± 51.41	1191.27 ± 148.54	884.33 ± 110.57
Y-2 h	41.92 ± 4.11**	788.35 ± 60.17**	634.33 ± 58.62*	1463.51 ± 167.32*	1356.83 ± 125.69*
Y-6 h	14.47 ± 1.84*	295.50 ± 24.64	607.66 ± 76.38	1253.58 ± 190.46	1231.67 ± 158.76*
Y-24 h	13.25 ± 1.56*	346.92 ± 21.59	662.66 ± 53.45*	1701.83 ± 145.77*	1415.17 ± 123.48*
E-NSC	5.38 ± 0.93	347.64 ± 24.84	669.33 ± 74.67	1485.17 ± 208.92	856.64 ± 150.49
E-2 h	149.78 ± 19.27△△##	974.78 ± 100.26△△#	757.67 ± 82.76△#	1857.66 ± 224.83△#	1608.54 ± 211.67△#
E-6 h	15.62 ± 1.49△	362.64 ± 42.34△#	741.36 ± 60.22#	1856.83 ± 197.54△#	1974.33 ± 258.31△△#
E-24 h	14.81 ± 0.95△	267.64 ± 23.60	773.50 ± 95.13△#	1627.67 ± 173.58	1602.67 ± 199.25△#

*：$P < 0.05$，**：$P < 0.01$，*vs* Y-NSC；△：$P < 0.05$，△△：$P < 0.01$，*vs* E-NSC；#：$P < 0.05$，##：$P < 0.01$，*vs* Young

3 讨论

近年来，MODSE 的临床和基础研究日益受到人们的重视。在临床工作中发现 MODSE 的发生较为普遍，其与 MODSY 有很大的区别，MODSE 的一个重要特点为：有 2/3 病例起因于呼吸系统疾病[2]，肺脏损伤可能在 MODSE 的发生中起启动作用，但对其机制的认识还很不足。“两次打击”模式认为，创伤等作为第 1 次打击导致机体处于中等状态的 SIRS，其后感染或非感染因素引起的损害（第 2 次打击）可放大已经存在的炎症状态而发生过度 SIRS，引起迟发型 MODS。

本实验通过 OA + LPS 两次致伤复制 MODSE 及 MODSY 大鼠模型，研究表明大鼠经致伤后肺脏最先受损，PaO_2 显著降低，达到 ALI 或 ARDS 标准，以 2 h 组降低幅度最大，并持续保持在较低水平；CPK、ALT、T-BIL、BUN 和 Cr 水平均较各自对照组显著升高，于 6h 升高幅度最大，表明心、肝、肾脏器损害最重的时间在肺损害之后，且在同一时相点老年鼠各脏器功能指标比青年鼠变化幅度更为明显，脏器功能损害也更严重。

内毒素在 MODS 的发生、发展中起着触发剂的作用，是刺激体内单核-巨噬细胞系统产生并分泌 TNF-α 的最强刺激之一，而 TNF-α 是 SIRS、ARDS 及 MODS 发生、发展的关键炎症介质之一[3,4]，能介导内毒素的多种生物学作用参与体内炎症反应[5~7]。本实验的结果显示，青年和老年大鼠注射 OA 和 LPS 后，肺组织 TNF-α 水平均显著升高，其峰值出现于伤后 2 h，分别为对照组的 3.2 和 3.9 倍，同时当 TNF-α 达峰值时，动脉血 PaO_2 显著降低至最低值。而心、肝、肾组织中 TNF-α 水平亦升高，但幅度较小而持续时间较长，心、肝、肾脏器功能损伤的指标于 6 h 达峰值。在同一时相点老年鼠的各指标变化幅度均大于青年鼠。我们以前的实验表明单用小剂量的 OA 或 LPS 通常不会导致肺心肝肾等多器官功能明显损害[8]。根据结果分析，两次致伤后肺组织中巨噬细胞、单核细胞等炎症效应细胞被激活，产生大量 TNF-α 等前炎症因子而参与了早期 ALI 和 ARDS 的发生；随着肺部炎症反应加重，大量炎症介质进入血液循环并作用于心、肝、肾等器官，刺激肺外组织中炎症细胞产生更多的炎症因子，发展为全身炎症反应，并最终导致 MODS 的发生。文献[9]报道 ARDS 肺部炎症反应激活，可进一步激活肺外器官炎症反应。表明肺脏可能为 MODS 发生中的启动器官。

本研究表明，油酸 + 脂多糖二次打击能够导致大鼠 MODS 的发生，以肺损伤出现最早，进而发展到心、肝、肾脏等其它器官功能障碍；在相同致伤条件下，老年大鼠较青年大鼠肺损伤及其它脏器功能障碍更严重，且死亡率也更高；这一结果可能与 MODSE 发生过程中，老年鼠致伤后肺部炎症反应更重有关，肺组织中快速产生大量 TNF-α 作为前炎症介质可能在 MODS 发病机制中起重要作用。

参考文献：

[1] 盛志勇，胡 森. 多器官功能障碍综合征[M]. 北京：北京科学技术出版社，1999. 186 - 187.

[2] 王士雯. 老年多器官功能不全综合征的肺启动机制[J]. 中华老年多器官疾病杂志，2002，1(1)：4 - 6.

[3] Hristova M, Yordanov M, Ivanovska N. Effect of fangchinoline in murine models of multiple organ dysfunction syndrome and septic shock[J]. Inflamm Res, 2003, 52(1): 1 - 7.

[4] Headley S, Tolley E, Meduri G U. Infections and the inflammatory response in acute respiratory distress syndrome[J]. Chest, 1997, 111: 1306 - 1321.

[5] 洪 新，郭振辉，毛宝龄，等. 不同因素致急性肺损伤大鼠 TNF-α、IL-6 的释放水平及地塞米松的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23(10)：1194 - 1196.

[6] Michetti C, Coimbra R, Hoyt D B, *et al*. Pentoxifylline reduces acute lung injury in chronic endotoxemia [J]. J Surg Res, 2003, 115(1): 92 - 99.

[7] Jaimes E A, del Castillo D, Rutherford M S, *et al*. Countervailing influence of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide in endotoxemia[J]. J Am Soc Nephrol, 2001, 12(6): 1204 - 1210.

[8] 徐 智，吴国明，钱桂生，等. 油酸-内毒素序贯致伤致老年鼠 MODS 模型的建立[J]. 第三军医大学学报，2004，26(10)：852 - 855.

[9] 燕艳丽，邱海波，杨 毅，等. 急性呼吸窘迫综合征家兔肺部及肺外器官炎症反应的变化[J]. 中国呼吸与危重监护杂志，2004，3(3)：147 - 151.

（编辑 刘洪娥）

关于修回稿件附软盘的说明

为缩短学报出版周期，减少编排错误，请作者根据学报编辑部提出的意见对文稿修改后，将修改稿以 Word 格式存入软盘，并请标明软盘中的文件名、作者姓名及稿件编号，连同修改稿一并送交本刊编辑部或 E-mail：aammt@mail.tmmu.com.cn（校外稿件请邮寄）

本刊编辑部