文章编号:1000-5404(2008)19-1803-04

论著

宫内给药对大鼠细菌性宫内感染胎盘 IL-6 与 MMP-9 表达的影响

刘 建,程 浩,邹姝丽,兰 易,甘小玲 (重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010)

摘 要:目的 探讨头孢曲松钠羊膜腔内和静脉给药对大肠埃希菌所致宫内感染的晚孕SD大鼠胎盘组织白细胞介素-6(IL-6)及基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)表达的影响。**方法** 妊娠15 d的SD孕鼠36只,完全随机分成4组,每组9只。①妊娠第15天,所有孕鼠一侧宫角行10^{10}/L大肠埃希菌菌液0.2 ml接种。②妊娠第16天,羊膜腔内给药组(IUA)和对照组(IUC)分别于接种侧各羊膜腔内注射头孢曲松钠和等体积的生理盐水,静脉给药组(IVA)和对照组(IVC)母鼠尾静脉分别注射头孢曲松钠和等体积的生理盐水。③4组孕鼠自妊娠第17天起,每组每天随机处死3只,随机抽取其接种侧宫角顶端3个胎囊之一的胎盘行IL-6、MMP-9免疫组化染色后行半定量分析。**结果** 胎盘IL-6和MMP-9表达水平在给药后第1、2、3天,各给药组低于各相应对照组($P<0.05$),IUA组低于IVA组($P<0.05$),IUC组高于IVC组($P<0.05$)。IUA组和IVA组IL-6水平于给药后第2天最低($P<0.05$),IUC组和IVC组IL-6表达水平及各组MMP-9表达水平逐日增高($P<0.05$)。**结论** 单次头孢曲松钠给药治疗晚孕SD大鼠大肠埃希菌宫内感染,羊膜腔内给药较母鼠静脉途径更有效,其可通过抑制IL-6和MMP-9在胎盘组织中的表达水平,降低炎症反应水平和胎膜早破的风险。

关键词: 绒毛膜羊膜炎,大肠杆菌;妊娠末期;投药,羊膜腔内;白细胞介素-6;基质金属蛋白酶9
中图法分类号: R392.11; R714.5; R715.3 **文献标识码:** A

Intraamniotic administration on placental IL-6 and MMP-9 expressions in rats with intrauterine infection of *E. coli*

LIU Jian, CHENG Hao, ZOU Shu-li, LAN Yi, GAN Xiao-ling (Department of Obstetrics and Gynecology, The Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To explore the effect of ceftriaxone sodium administered intraamniotically and by maternal intravenous injection on the expressions of placental interleukin-6 (IL-6) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in treatment of intrauterine infection with *E. coli* in late pregnant SD rats. **Methods** Thirty-six SD rats on gestation day 15 were randomly divided into four groups (9 in each). On gestation day 15, 0.2 ml *E. coli* suspension at a dose of 10^{10}/L was inoculated into one horn of uterus; On gestation day 16, each gestational sac in inoculated side of rats in intrauterine administration (IUA) group and control (IUC) group was given ceftriaxone sodium or appropriate volume of isotonic Na chloride (NS) intraamniotically, and each rat in maternal intravenous injection (IVA) group and control (IVC) group was given ceftriaxone sodium or appropriate volume of isotonic NS intravenously. From the gestation day 17 on, 3 rats of each group were sacrificed randomly each day. One of the top 3 sacs in inoculated side of each rat was randomly selected, and the expressions of IL-6 and MMP-9 were analyzed semi-quantitively by immunohistochemical method. **Results** After administration, the levels of IL-6 and MMP-9 in each treatment group were lower than those in the corresponding control groups ($P<0.05$), and those in IUA group were lower than those in IVA group ($P<0.05$), but those in IUC group were higher than those in IVC group ($P<0.05$). The levels of IL-6 decreased to the lowest on the 2nd day after administration in both treatment groups ($P<0.05$), but increased day by day in both control groups, while MMP-9 expressions increased gradually in each group ($P<0.05$). **Conclusion** Compared with maternal

基金项目: 重庆市自然科学基金(CSTC,2005BB5256)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5256)
作者简介: 刘 建,男,四川省乐山市人,硕士,主任医师,教授,电话:(023)63693493, E-mail:liu6898@sina.com
通信作者: 程 浩,E-mail: chenghaof1@163.com
收稿日期: 2007-12-06;**修回日期:** 2008-03-24

intravenous injection, ceftriaxone sodium administered intraamniotically with a single dose is more effective treatment for intrauterine infection of *E. coli* in late pregnant SD rats, through inhibiting the expressions of IL-6 and MMP-9 in placenta and reducing inflammation and risk of premature rupture of membranes.

Key words: chorioamnionitis; *Escherichia coli*; pregnancy trimester, third; intraamniotic administration; interleukin-6; matrix metalloproteinase-9

羊膜腔感染综合征(infection syndrome of amniotic cavity,IAIS)是导致围产儿病率、死亡率和产妇病率、死亡率升高的重要原因。引起 IAIS 的病原微生物很复杂,*E. coli* 是最常见的需氧菌之一。本研究建立了晚孕 SD 大鼠 *E. coli* 宫内感染模型,通过母体静脉和羊膜腔内给予头孢曲松钠,比较两者胎盘组织IL-6和MMP-9 的表达水平,探讨羊膜腔内给药对 IAIS 的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 资料

所有动物由重庆医科大学实验动物中心提供。选择 SPF 级孕 15 d SD 雌鼠 36 只,体质量(300 ± 10)g,清洁喂养。取大肠埃希菌(*E. coli*)标准菌株(ATCC25922 菌株)接种于 LB 平板上,37 ℃培养 16 ~ 18 h,挑取单个菌落接种于 LB 培养液中,37 ℃,60 r/min 细菌摇床过夜稀释至 10^{10}/L 后使用。实验使用注射用头孢曲松钠(山东鲁抗医药股份有限公司,批号 C060611,1.0 g/支)。IL-6、MMP-9 多克隆抗体于美国 Santa Cruz 购进。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 36 只孕鼠完全随机分为 4 组,每组 9 只,根据国内外的报道[1]并结合实验需要,所有孕鼠于妊娠第 15 天一侧宫角两胎囊间隙接种 10^{10}/L 大肠埃希菌菌液 0.2 ml,成功建立了接种后 1 d 的 SD 大鼠宫内感染模型,胎盘组织病理学检查显示炎症表现,羊水离心沉淀 LB 培养基划线培养阳性(图 1、2),各接种孕鼠在 3 d 内无早产发生。于妊娠第 16 天给药,羊膜腔内给药组各孕鼠开腹行接种侧各胎囊穿刺,以无菌注射器回抽见羊水确认穿刺针进入羊膜腔内后各胎囊注射 20 mg/ml 头孢曲松钠生理盐水溶液 2 mg/胎,以同法给予羊膜腔内对照组各孕鼠接种侧各胎囊生理盐水 0.1 ml 后关腹。尾静脉给药组各孕鼠尾静脉注射 100 mg/ml 头孢曲松钠生理盐水溶液(60 mg/只),尾静脉对照组各孕鼠同法给予生理盐水 0.6 ml。所有孕鼠接种、穿刺、给药、采集标本均采用无菌术,术前、术后清洁喂养,无饮食控制,在给药后连续 3 d 内均无早产发生。分别于给药后 1、2、3 d,每天每组随机处死 3 只取材。

1.2.2 标本采集 断头处死孕鼠,随机抽取接种侧宫角顶端三个胎囊之一的胎盘胎膜组织分别置于 4% 多聚甲醛液固定后,经脱水、透明、浸蜡、包埋后切片。

1.2.3 指标观察 每张胎盘组织切片用 S-P 法行免疫组织化学染色,在高倍镜(10 ×40)下随机选择 5 个染色适中的视野进行拍照,所有图片应用 Image-Pro Plus5.0 型病理影像多媒体图文操作系统测其阳性反应部位的平均光密度值,进行蛋白表达半定量分析。

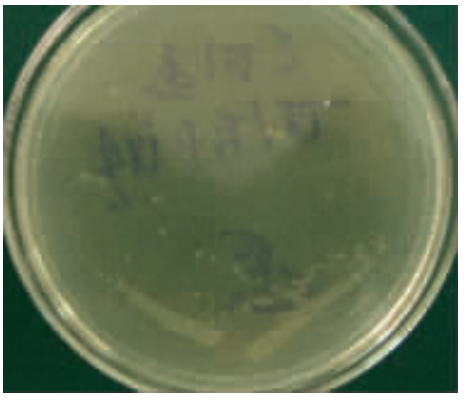


图 1 孕鼠接种后 1 d 接种侧胎囊羊水 LB 培养呈阳性反应

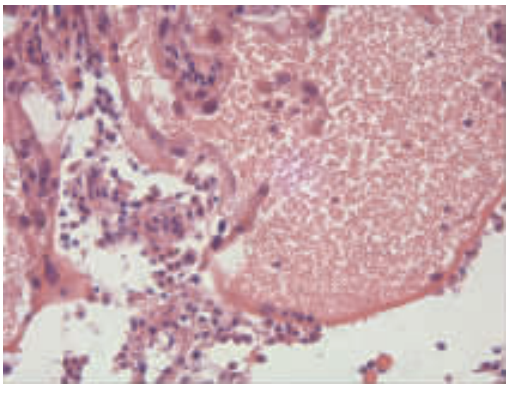


图 2 孕鼠接种后 1 天接种侧胎囊胎盘组织病理学呈现炎症反应 (HE ×100)

1.3 统计学方法

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 给药途径对胎盘组织 IL-6 表达的影响

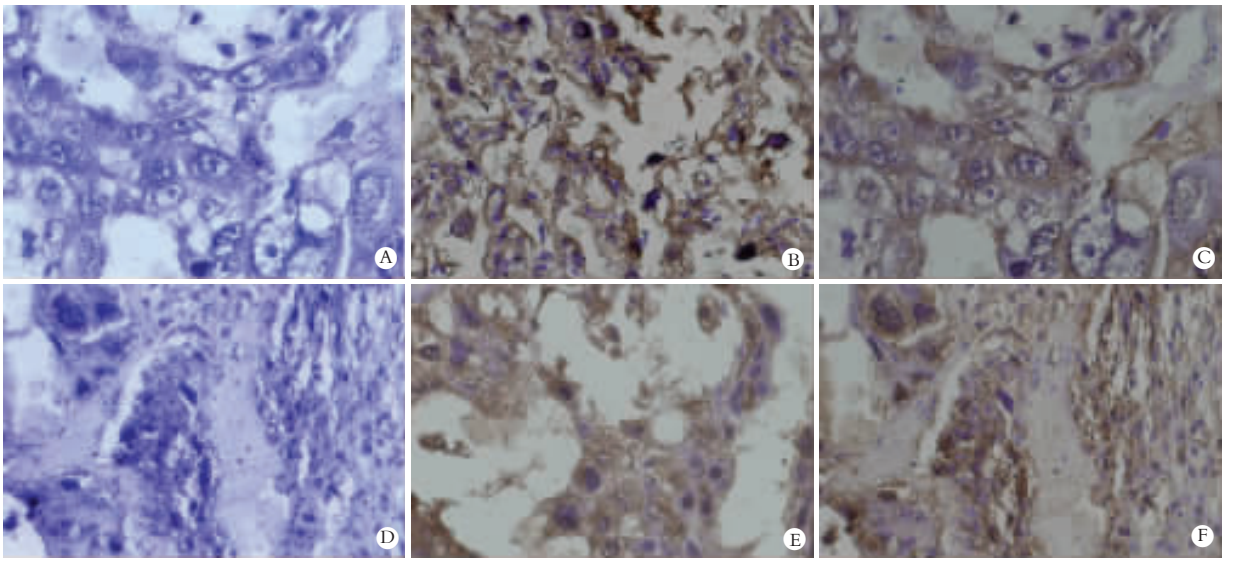
阳性反应主要位于绒毛膜层和其近蜕膜的区域(图 3)。给药后第 1、2、3 天,胎盘组织 IL-6 表达水平,各给药组低于相应的对照组($P<0.05$),羊膜腔内给药组低于母鼠静脉给药组($P<0.05$),羊膜腔内对照组高于母鼠静脉给药组($P<0.05$)。其在给药组给药后第 2 天较低($P<0.05$),在对照组呈逐渐增长的趋势($P<0.05$)(表 1)。

2.2 给药途径对胎盘组织 MMP-9 表达的影响

阳性反应主要分布于绒毛膜层和靠近蜕膜的区域(图 3)。胎盘 MMP-9 表达水平在给药后第 1、2、3 天,各给药组低于各相应对照组($P<0.05$),羊膜腔内给药组低于母鼠静脉给药组($P<0.05$),羊膜腔内对照组高于母鼠静脉对照组($P<0.05$)。各组 MMP-9 表达水平逐日升高($P<0.05$)(表 1)。

表 1　各组胎盘组织 IL-6 及 MMP-9 表达的平均光密度($n=15$, $\bar{x}\pm s$)

组别	IL-6			MMP-9		
	给药后 1 d	2 d	3 d	给药后 1 d	2 d	3 d
IUA	1.376 ±0.019	0.820 ±0.017	0.984 ±0.023	2.826 ±0.312	3.320 ±0.439	3.879 ±0.337
IUC	3.561 ±0.083	5.202 ±0.061	7.984 ±0.232	6.405 ±0.517	6.849 ±0.386	8.074 ±0.414
IVA	1.604 ±0.025	1.001 ±0.120	1.274 ±0.063	3.345 ±0.368	4.699 ±0.334	5.480 ±0.269
IVC	2.886 ±0.034	3.639 ±0.033	6.632 ±0.134	5.512 ±0.485	6.310 ±0.254	7.324 ±0.557



A:IL-6 阴性对照;B:IL-6 阳性对照;C:IL-6 阳性表达;D:MMP-9 阴性对照;E:MMP-9 阳性对照;F: MMP-9 阳性表达

图 3　接种侧胎盘组织 IL-6 与 MMP-9 表达　(S-P ×400)

3　讨论

IL-6 是一种多能炎性细胞因子,与炎症反应密切相关。IL-6 产生于滋养细胞,且其受体也存在于滋养细胞表面,宫内感染时,细菌侵犯羊膜腔,刺激蜕膜、羊膜和绒毛膜细胞及胎儿产生大量的 IL-6 等细胞因子,可促使 PGE_2 分泌,引起子宫收缩和促进宫颈成熟,引起早产。有学者认为,IL-6 是感染的急性期反应的标志物,其水平甚至可以直接反应病原体的侵入[2]。本实验结果显示,给药组胎盘组织 IL-6 表达水平较低,是为头孢曲松钠抗菌作用的体现。给药途径不同,导致了羊水即时药物浓度和其峰值以及药物代谢过程的差异,我们推测,羊膜腔内给药后,羊水中的药物浓度瞬时升高至峰值,并可通过扩散、转运以及羊膜的析出等方式达胎盘,迅速抑制宫内大肠埃希菌的生长和繁殖,从而减轻感染带来的炎症反应,因此,羊膜腔内给药组胎盘组织 IL-6 表达水平均低于母鼠静脉给药组,而羊膜腔穿刺对宫内环境的影响是羊膜腔内对照组较母鼠静脉对照组更高表达的主要原因。

IL-6 参与妊娠的全过程,并随孕期而增长,其在孕中、晚期保持一种相对稳定的水平,在分娩发动前明显升高[3,4]。本研究显示,给药后由于抗菌素的作用,胎盘组织 IL-6 表达于给药后第 2 天较低,此后呈增长态势,对照组炎性反应程度逐渐增强,IL-6 水平逐渐上升,这与前人的研究结果保持一致。

基质金属蛋白酶(MMPs)是一族内源性蛋白水解酶,能够降解细胞外基质的多种成分,参与细胞外基质的代谢,与组织重塑有关,并通过调节细胞外基质的含量和胎膜结构,与胎膜破裂关系密切[5]。MMP-9 激活后,促进包括Ⅳ型胶原在内的胞外基质快速崩解引发细胞发生形态学变化和引发凋亡,其在分娩、破膜、羊膜腔感染的羊水标本中明显升高[6,7]。与 IL-6 表达差异原因相同,给药组 MMP-9 表达水平较低,羊膜腔内给药组低于母鼠静脉给药组,羊膜腔内对照组高于母鼠静脉对照组。Locksmith[8] 认为,从孕中期至孕末期 MMP-9 一直处于相对稳定的较低水平,MMP-9 的出现和快速增高预示着胎膜即将破裂。又有学者指出[9,10] 感染或炎症过程中产生的 IL-6 等分泌增加可以诱导或激活 MMP-9 活性,故本实验各组胎盘 MMP-9 表达水平逐日增高是感染炎症刺激和妊娠进展共同作用的结果。

目前,羊膜腔途径给药作为侵入性操作尚未被临床广泛采用,仅胎儿宫内换血治疗被认可,宫内操作导致宫内感染风险增加以及胎儿胎盘损伤、早产等副作用使得羊膜腔给药途径的研究和应用滞后,国际上尚无羊膜腔内给药治疗宫内感染的实验及临床研究。然而,羊膜腔途径给药可以绕过胎盘屏障直接进入羊水,羊膜腔内注射氨基酸治疗胎儿宫内生长受限成功的报道[11] 更坚定了我们探讨羊膜腔内给药治疗细菌性宫内感染的决

心。本实验结果提示,单次头孢曲松钠给药治疗晚孕SD大鼠大肠埃希菌宫内感染,羊膜腔内较母鼠静脉途径更有效,其可通过抑制IL-6和MMP-9在胎盘组织中的表达水平,降低炎症反应程度和胎膜早破的风险。

参考文献:

[1] 袁天明, 俞惠民, 李建平. 细菌性宫内感染致早产大鼠模型的建立[J]. 浙江医学, 2004, 26(4):275-276,292.

[2] Menon R, Fortunato S J. Fetal membrane inflammatory cytokines: a switching mechanism between the preterm premature rupture of the membranes and preterm labor pathways[J]. J Perinat Med, 2004, 32(5):391-399.

[3] Putz I, Lohbreyer M, Winkler M, *et al*. Appearance of inflammatory cytokines interleukin-1 beta and interleukin-6 in amniotic fluid during labor and in intrauterine pathogen colonization [J]. Z Geburtshilfe Neonatol, 1998, 202(1):14-18.

[4] Jacobsson B, Mattsby-Baltzer I, Andersch B, *et al*. Microbial invasion and cytokine response in amniotic fluid in a Swedish population of women with preterm prelabor rupture of membranes[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2003, 82(5):423-431.

[5] Shapiro S D. Matrix metalloproteinase degradation of extracellular matrix: biological consequences[J]. Curr Opin Cell Biol, 1998, 10(5): 602-608.

[6] Lei H, Kalluri R, Furth E E, *et al*. Rat amnion type IV collagen composition and metabolism: implications for membrane breakdown[J]. Biol Reprod, 1999, 60(1):176-182.

[7] Maymon E, Romero R, Pacora P, *et al*. Evidence of *in vivo* differential bioavailability of the active forms of matrix metalloproteinases 9 and 2 in parturition, spontaneous rupture of membranes, and intra-amniotic infection [J]. Am J Obstet Gynecol, 2000, 183(4):887-894.

[8] Locksmith G J, Clark P, Duff P, *et al*. Amniotic fluid concentrations of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 during pregnancy and labor[J]. Am J Obstet Gynecol, 2001, 184(2):159-164.

[9] Kishida T, Yamada H, Furuta I, *et al*. Increased levels of interleukin-6 in cervical secretions and assessment of the uterine cervix by transvaginal ultrasonography predict preterm premature rupture of the membranes[J]. Fatal Dign Ther, 2003, 18(2): 98-104.

[10] Edwin S S, Romero R, Rathnasabapathy C M, *et al*. Protein kinase C stimulates release of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by human decidual cells[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2002,12(4):231-236.

[11] 卢海英,郭晓玲. 羊膜腔内注射氨基酸治疗胎儿生长受限的研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2005,13(4):62-63.

(编辑 汪勤俭)

(上接1802页)

20 s后增大,皮下出现多个组织疏松区,表现为胶原纤维断裂、缺失,排列致密的胶原变疏松。血管改变同20 s。深层肌肉均没有损伤性改变;冲洗60 s后,表皮多个缺损区,而且缺损区较大,皮下胶原纤维出现碎裂、缺失改变,排列紊乱且疏松,由束状变为点片状,呈弥漫性改变。深层肌肉均没有损伤性改变。

3 讨论

本所设计的超声波射流冲洗系统是利用超声波的空化作用原理来进行清创,通过超声波加载射流,即是超声波作用于流动的冲洗液对污染伤口实施清创。

空化作用是超声波的一种主要作用。超声空化是强超声在液体中引起的一种特有的物理现象[1]。此外,由于非线性效应会产生声流和微声流,而超声空化在固体和液体界面会产生高速的微射流,所有这些作用能够破坏污物,除去或消弱边界污层,增加搅拌作用,强化液体清洗剂的清洗作用。凡是液体能浸润到,且声场存在的地方就存在清洗作用[2,3]。因此,该仪器的清洗效果取决于冲洗液空化效果。

空化作用与超声波的强度(功率)和频率有关。超声波强度超过0.3 W/cm^{2}时,水溶液就能产生空化。超声波空化作用与超声频率的关系表现为:空化作用是随着超声波频率的降低而降低,低频时易激放空化。16~25 kHz时空化作用好。但是,低频、高强度超声波引起的生物损伤效应明显,因为,生物组织的损伤程度与频率的高低相反,与功率的大小相一致,频率越低,功率越大,生物组织的损伤程度就越大[3]。我们设计的超声波射流冲洗系统功率具有高、中、低,分别对应高频率、中等频率和低频率超声波输出。在此,我们观察了不同功率超声波冲洗不同时间正常皮肤和深层组织后的病理学变化,以评定该仪器的安全性。

低频率超声波固定冲洗20、40、60 s后,皮肤肌肉组织几乎无损伤性改变。中等频率超声波冲洗20、40 s后,仅镜下见皮下小血管轻微充血。但在中等频率超声波冲洗60 s后,皮肤组织开始出现比较明显的损伤性改变,除局部皮肤表面轻微发红外,显微镜下观察有明显的损伤性改变,皮下小血管充血中度充血,表皮与真皮出现分离,其胶原束变得疏松。但表皮是连续的,无缺损,真皮出现损伤性改变。深层肌肉没有损伤性改变。而高频率超声波冲洗后对皮肤损伤较重,大体病理变化表现为40、60 s后,局部皮肤表面有轻微发红,肿胀。镜下观察发现,冲洗20 s后,表皮开始出现不连续的缺损区域即表皮损伤改变。随着冲洗时间的增加,损伤有进行性加重的趋势。因此,高频率超声波冲洗60 s后皮肤的损伤程度最重。而深层肌肉组织均无损伤性改变,这可能与兔皮肤的结构特点有关。

由此可见,使用我们设计的超声波射流冲洗系统低、中功率的超声波是安全的,而高频率超声波的使用应具有选择性,对于污染较重、损伤较重的开放性创面是首选,因为较强的剥脱效应有利于细菌和坏死组织的清除。

关键词:超声波;正常皮肤

中图法分类号:R319 **文献标识码**:B

参考文献:

[1] 院建岗, 严碧歌, 杨艳妮. 超声空化强度测量的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2007, 7(2): 295-297.

[2] 陈荣凤, 薛广波, 顾春英. 超声波消毒研究进展[J]. 上海预防医学杂志, 1999, 11(11): 491-495.

[3] Munley P J, Goodell G G. Comparison of passive ultrasonic debridement between fluted and nonfluted instruments in root canals[J]. J Endod, 2007, 33(5): 578-580.

(编辑 王小寒)