基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0877-04

HSPTX 通过抑制 NF-κB 蛋白表达减轻失血性休克复苏诱发的肺部炎症反应

刘 玉[1],唐季春[2],张 焰[1],曾因明[2]

(1. 无锡市第四人民医院麻醉科,无锡 214062;2. 江苏省麻醉学重点实验室,徐州 221002)

【摘 要】目的:探讨 HSPTX(7%、5%氯化钠 + 己酮可可碱)对失血性休克大鼠肺损伤的保护作用。方法:24 只雄性 SD 大鼠随机分为 3 组:假失血性休克(Sham)组,仅接受动静脉插管操作,不放血及复苏、大容量等张乳酸钠林格氏液(RL)复苏组,接受 32 ml/kg RL、小容量高张(7%、5%氯化钠)液 + PTX 复苏组,接受 4 ml/kg 7.5%NaCl +25 mg/kg PTX,每组 8 只。测定各组动脉血氧分压(PaO_2)、pH 值、二氧化碳分压($PaCO_2$)、肺湿/干重比值、测定血清丙二醛(Malondialdehyde)含量以及超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase)活性;检测支气管肺泡灌洗液(Bronchoalveolor lavage fluid)中性粒细胞比例及肺通透性指数,采用 ELISA 法测定灌洗液上清中 TNF-α、IL-1β 含量;采用 Western blot 技术检测肺组织 NF-κB 蛋白表达。结果:与 RL 组相比,HSPTX 组 PaO_2 和 pH 值升高、$PaCO_2$ 降低($P<0.01$),HSPTX 组大鼠肺湿/干重(W/D)、支气管肺泡灌洗液中上清中 TNF-α、IL-1β 含量均低于 RL 组($P<0.01$),同时 HSPTX 组肺组织中核因子 κB 蛋白(NF-κB)表达显著低于 RL 组。结论:HSPTX 复苏通过抑制核因子 κB 蛋白的表达减少失血性休克大鼠炎性细胞因子的表达,减轻由失血性休克诱发的急性肺损伤。

【关键词】己酮可可碱;高渗盐溶液;失血性休克;急性肺损伤;肿瘤坏死因子 α;核因子 κB

【中国图书分类法分类号】R641 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-05-07

Hypertonic saline and pentoxifylline reduces hemorrhagic shock resuscitation-induced pulmonary inflammation through inhibiting the expression of NF-κB

LIU Yu, et al

(*Department of Anesthesiology, Wuxi 4th Hospital*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of hypertonic saline and pentoxifylline resuscitation on pulmonary inflammation following hemorrhagic shock in rats. *Methods*: Controlled hemorrhagic shock was induced by blood withdrawal (MAP, 40 mmHg) and maintained for 60 min. Animals were randomly divided into 3 groups: ① Sham animals ($n = 8$) underwent cannulation without shock or resuscitation and served as negative controls; ②RL-resuscitated animals ($n=8$) received 32 ml/kg RL; ③HSPTX group received 4 ml/kg of 7.5% NaCl+25 mg/kg of PTX. PaO_2, pH, $PaCO_2$, wet/dry lung weight ratio (W/D), and lung penetrating index were determined. The percentages of neutrophil in bronchoalveolar lavage fluid, the levels of malonadialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) were measured. The tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin 1β (IL-1β) in the supernatant of bronchoalveolor lavage fluid were determined by ELISA method, and the expression of NF-κB in the lung tissues was quantified by Western blot. *Results*: PaO_2 and pH were increased whereas $PaCO_2$ was decreased in HSPTX group when compared with that in RL group ($P<0.01$). The wet/dry lung weight ratio and the percentages of neutrophil in the supernatant of bronchoalveolar lavage fluid were significantly lower than that in RL group ($P<0.01$). The content of tumor TNF-α and IL-1β in HSPTX group was significantly reduced when compared with that in RL group ($P<0.01$). The protein expression of NF-κB in HSPTX group was significantly decreased than that in RL group ($P<0.01$). *Conclusion*: Attenuation of hemorrhagic shock-induced pulmonary inflammation with HSPTX is associated with HSPTX-induced inhibition of neutrophil activation and production of inflammatory cytokines via inhibiting the expression of NF-κB.

【Key words】Pentoxifylline; Hypertonic saline; Hemorrhagic shock; Acute lung injury; Tumor necrosis factor-α; Nuclear factor kappa-B

作者介绍:刘 玉(1976-),男,主治医师,硕士,
研究方向:脏器功能衰竭的防治与调控。

失血性休克的病理生理学变化首先是失血所致全身应激反应、循环血容量不足、组织灌注不良和缺氧,最后导致一系列严重后果如败血症、急性呼吸窘迫综合征(Acute respi-

ratory distress syndrome, ARDS)、多脏器功能衰竭综合征(Multiple system organ dysfunction, MODS)[1]。研究显示当前临床上应用复苏液体林格液(Ringer's lactate, RL)增强中性粒细胞的激活并且增加器官损伤,尤其表现在肺脏[2,3]。HS(高渗盐溶液,常用的是 7.5% NaCl 4 ml/kg)不仅可以快速的恢复血管内容量,减少肺水肿发生的几率,而且与 RL 相比它可以有效的减少失血性休克后中性粒细胞的激活。己酮可可碱(Pentoxifylline, PTX)是一种血管活性药物,临床上主要用于脑缺血以及外周血循环障碍性疾病,最近已经用来调节败血症和失血时的免疫反应。HS 和 PTX 在对巨噬细胞和微循环的影响上有相似的效应,但 HS 和 PTX 的作用机制并不相同[4]。据此本实验通过建立失血性休克模型探讨 HSPTX 复苏对肺炎症反应的影响及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 动物选择及分组

选择健康雄性 SD 大鼠 24 只,体重 300 ~ 400 g,由徐州医学院实验动物中心提供。随机分为 3 组(n=8):假失血性休克(Sham)组、大容量等张乳酸钠林格液复苏组(RL 组)和小容量高张液 +PTX 复苏组(HSPTX 组)。

1.2 失血性休克模型制作

大鼠于实验前适应饲养环境 7 d, 采用灯光照明的方法使昼夜时间均为 12 h, 实验前 12 h 禁食不禁饮。腹腔注射 2%戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉后,仰卧固定于大鼠手术台,分离一侧股动、静脉并置入 22G 套管,股动脉套管留作放血及监测平均动脉压,股静脉套管留作注入复苏液体和放出的血液。通过动脉以 0.5 ml/min 速度放血,使平均动脉压(MAP)达到 40 mmHg, 放出的血液储存于无菌加肝素的容器,通过放出或回输血液使 MAP 维持于 35 ~ 45 mmHg 之间,持续 60 min。复苏时 RL 组以 32 ml/kg 乳酸林格氏液于 30 min 内输入, HSPTX 组以 4 ml/kg 7.5% NaCl +25 mg/kg PTX 在 10 min 内输入,然后回输全部放出血液(15 min 内输完),Sham 组大鼠仅作动静脉置管并维持测压状态同样时程,然后拔除动、静脉置管,结扎血管,缝合切口,放回原饲养场所待其自然清醒和自由饮食。实验期间以白帜灯照大鼠,保持直肠温度 36.5℃ ~ 37.5℃。

1.3 标本制备

复苏 24 h 时,放血活杀动物之前,经由左心室采血 3 ml, 1 ml 作血气分析,剩余 2 ml 分离血清,按试剂盒说明测定血清 SOD、MDA 含量。

1.4 支气管肺泡灌洗液中性粒细胞比值、肺通透指数及细胞因子测定

大鼠处死后,取全肺,剪开气管,经气管插管缓慢注入 4℃无菌生理盐水灌洗 2 次,每次灌洗量为 5 ml;第 1 个 5 ml 生理盐水经气管插管缓慢注入动物肺脏,保留 0.5 ~ 1 min,同时轻轻按摩胸壁,反复灌洗 5 次后回收;第 2 个 5 ml 仅灌洗 1 次。将 2 次回收的支气管肺泡灌洗液(Bronchoalveolar lavage fluid, BALF)经双层无菌纱布过滤后 3 000 r/min 离心 15 min,取细胞沉淀涂片,显微镜下计数肺泡灌洗液中细胞总数及中性粒细胞并计算所占百分比;Lowry 法测定 BALF 和血浆蛋白含量,计算肺通透性指数(BALF 蛋白含量/血浆蛋白含量);上清液于 -20℃冻存,ELISA 法测定灌洗液上清中肿瘤坏死因子 -α(TNF-α)、IL-1β 含量。

1.5 肺湿/干重(W/D)比测定

取右下肺叶组织,滤纸沾干肺表面水分,精确称重后置烤箱 60℃干燥至恒重后测定肺脏干质量,计算肺湿干重以估计肺组织的水种程度。肺湿/干重比(mg/g) =(肺湿重 - 肺干重)/ 肺干重。

1.6 肺组织 NF-κB 蛋白水平

肺组织加入细胞裂解液于匀浆器中匀浆后提取总蛋白,考马斯亮蓝法测定样品总蛋白含量。每组各取 50 μg 蛋白质样品加上样缓冲液混匀,100℃加热 3 min,以质量分数为 12%的凝胶电泳分离,分离的蛋白用半干电转移法到 PVDF 膜,室温下用封闭液封闭 1 h 后加入适量 NF-κB P65(c-20)和 β-actin 多克隆抗体,摇床上室温反应 2 h,洗膜 3 次每次 20 min,辣根过酶标记的二抗室温孵育 2 h,用化学发光法显色,X 线底片曝光。各蛋白的相对含量以目的蛋白与内参照 β-actin 蛋白表的灰度比值表示。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 12.0 统计软件包进行分析。所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内比较采用 t 检验,组间比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 一般情况

Sham 组大鼠不进行放血及复苏,RL 组放血量(6.62 ± 0.55) ml,HSPTX 组大鼠放血量(6.11 ± 0.73) ml,组间比较差异无统计学意义(P>0.05)。

2.2 血清各项血气指标

与 Sham 组相比,RL 组 PaO_2 和 pH 值均明显降低,二氧化碳分压($PaCO_2$)明显升高(P<0.01);与 RL 组相比 HSPTX 组 PaO_2 和 pH 值升高,$PaCO_2$ 降低(P<0.05);HSPTX 组与 Sham 组相比,PaO_2、$PaCO_2$ 和 pH 值无显著性差异(P>0.05)(表 1)。

2.3 3 组大鼠肺通透指数(LPI)、肺湿/干重比值

与 Sham 组相比,RL 组大鼠肺通透指数、肺湿/干重比显著增大(P<0.01);与 RL 组相比,HSPTX 组大鼠肺通透指数、肺湿/干重比值明显下降(P<0.01),说明失血性休克诱发的肺毛细血管通透性增加在使用 HSPTX 复苏时能够得到一定程度上的改善(表 2)。

2.4 3 组大鼠支气管肺泡灌洗液中性粒细胞比值

结果见表 2,与 Sham 组相比,RL 组大鼠支气管肺泡灌洗液中细胞总数明显增多,中性粒细胞计数比显著增大(P<0.01),

HSPTX 组与 RL 组相比，大鼠支气管肺泡灌洗液中细胞总数、中性粒细胞计数比明显下降($P<0.01$)，说明 HSPTX 复苏失血性大鼠与林格液复苏相比可以明显的抑制休克诱发的中性粒细胞肺部聚集。

2.5 3 组大鼠血清中 SOD、MDA 含量的比较

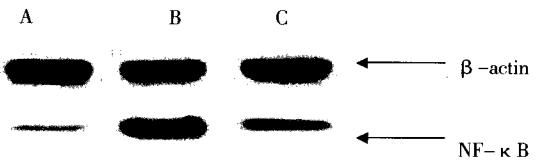
RL 组大鼠血清中 MDA 水平较 Sham 组显著增加($P<0.01$)，而 HSPTX 组较 RL 组则明显下降($P<0.01$)；RL 组大鼠血清中 SOD 水平较 Sham 组显著下降，而 HSPTX 组较 RL 组则显著增加($P<0.01$，表 3)。

2.6 各组大鼠支气管肺泡灌洗液上清 TNF-α、IL-1β 水平

RL 组大鼠支气管肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-1β 水平较 Sham 组显著升高($P<0.01$)，而 HSPTX 组较 RL 组则明显下降($P<0.01$，表 4)。

2.7 各组大鼠肺组织 NF-κB 蛋白表达水平

Western blot 结果及图像分析结果显示，Sham 组大鼠肺组织 NF-κB 蛋白表达很低(0.085 ± 0.009)，而 RL 组大鼠肺组织 NF-κB 蛋白(0.457 ± 0.011)显著增加($P<0.01$)，HSPTX 组大鼠肺组织 NF-κB 蛋白(0.265 ± 0.008)较 RL 组则明显下降($P<0.01$)(图 1)。



A. Sham 组；B. RL 组；C. HSPTX 组

图 1 Western blot 检测 NF-κB 蛋白蛋白表达水平

3 讨 论

失血性休克是创伤后病人死亡的主要原因之一。早期阶段病人死亡主要是由于出血没有得到控制，经历休克和复苏存活的患者往往会发生难以控制的系统性炎症反应最终导致终末器官损伤。而中性粒细胞的激活过度激活在休克诱发的急性肺损伤和 ARDS 中发挥关键的作用。

最近几年来大量的研究证实传统的复苏液体乳酸林格液 RL 能够导致中性粒细胞的激活和削弱内皮细胞的功能。在应用于休克病人中的经典的 RL 中包含 D 和 L 两种异构体形式，而研究发现 D 型乳酸能够增强中性粒细胞的氧化爆发。因此，最近几年来人们都在寻找可以替代的复苏液体。HS 能够快速的恢复血管内容量，降低肺水肿发生的机率，并且有几个研究证实 HS 能够减少中性粒细胞在肺部的扣押[5]。然而另有研究认为单纯应用 HS 并不能有效的改善失血性休

表 1 3 组大鼠各项血气指标的比较 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	PaO_2(kPa)	$PaCO_2$(kPa)	pH
Sham	12.42 ± 0.47	4.17 ± 0.53	7.40 ± 0.07
RL	6.58 ± 0.24▲	7.61 ± 0.38▲	7.25 ± 0.04▲
HSPTX	10.84 ± 0.35*	4.89 ± 0.32*	7.36 ± 0.03*

注：与 Sham 组比较，▲$P<0.01$；与 RL 组比较，*$P<0.01$

表 2 3 组大鼠 W/D 比值、LPI 和 BALF 中性粒细胞比值($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	W/D 比值	LPI(10-3)	BALF 中性粒细胞(%)
Sham	4.58 ± 0.27	4.32 ± 0.27	21.7 ± 3.7
RL	6.18 ± 0.53▲	11.73 ± 0.32▲	54.9 ± 7.2▲
HSPTX	5.29 ± 0.34*	5.29 ± 0.41*	31.4 ± 5.9*

注：与 Sham 组比较，▲$P<0.01$；与 RL 组比较，*$P<0.01$

表 3 3 组大鼠血清中 SOD 和 MDA 含量的比较($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	MDA 含量(nmol/ml)	SOD 含量(U/ml)
Sham	5.11 ± 1.13	184.39 ± 13.08
RL	10.87 ± 1.74▲	116.54 ± 18.92▲
HSPTX	6.28 ± 1.25*	157.13 ± 10.45*

注：与 Sham 组比较，▲$P<0.01$；与 RL 组比较，*$P<0.01$

表 4 3 组大鼠支气管肺泡关系液上清 TNF-α、IL-1β 水平($\bar{x} \pm s$, ng/L)

组别	TNF-α	IL-1β
Sham	218.9 ± 35.0	51.7 ± 8.2
RL	464.3 ± 27.1▲	156.9 ± 22.5▲
HSPTX	332.4 ± 30.8*	111.4 ± 17.9*

注：与 Sham 组比较，▲$P<0.01$；与 RL 组比较，*$P<0.01$

克患者的生存率，并且有离体研究表明在中性粒细胞激活前应用 HS 可以有效的抑制中性粒细胞的激活，而在中性粒细胞激活后应用 HS 不能有效地抑制甚至促进它的激活。我们的前期研究也发现单纯应有 HS 复苏似乎并不能改善休克大鼠的生存率。

由于失血性休克复苏后发生严重的系统性炎症反应从而导致 ALI 和 ARDS 最后导致多器官衰竭，许多研究在探寻一种能够显著抑制炎症反应的复苏液体。己酮可可碱（PTX）是一种血管活性药物，临床上主要用于脑缺血以及外周血循环障碍性疾病。己酮可可碱有剂量依赖性地降低血液粘度，提高红细胞变形性、改善白细胞的血液流变特性的作用，并能抵制嗜中性粒细胞的粘附和激活，但其确切的机制仍未阐明。由于 HS 和 PTX 的抗炎作用机制并不相同，国外几位学者提出把两者结合起来用于失学性休克复苏并取得了一定的研究成果[6,7]。本研究结果证明 HSPTX 复苏与 RL 相比在各项血气指标方面得到了很大的改善，说明 HSPTX 复苏与 RL 相比能够改善肺泡的氧合。结果显示 HSPTX 组大鼠肺湿/干重、肺通透指数与 RL 组大鼠相比均有明显的降低，HSPTX 组血清中 MDA 含量低于 RL 组，而 SOD 含量高于 RL 组，说明 HSPTX 复苏失血性休克大鼠能够降低肺毛细血管通透性。失血性休克时 TNF-α 的大量增加对急性肺损伤的发生发挥重要的作用，在失血性休克发生一小时 TNF-α 后即有明显的升高[8]，我们的研究结果显示 HSPTX 组大鼠 BALF 上清中 TNF-α、IL-1β 水平较 RL 组显著降低，表明 HSPTX复苏与 RL 相比可以有效的减轻肺部的炎症反应，这些与 Coimbra R 等[7]的研究结果一致。

在失血性休克复苏过程中，NF-κB 的不恰当表达是引起过度炎症反应和炎症损伤的关键因素，NF-κB 是可以调控炎症反应相关基因表达，调节炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β 的产生，而是 ALI 发生时的重要炎性细胞因子，其又能够作为 NF-κB 的细胞外刺激信号再次激活 NF-κB，从而形成了恶性循环，因此通过抑制 NF-κB 的表达而减轻炎症反应拥有诱人的前景[9]。本研究发现，RL 组大鼠肺组织 NF-κB活性与 Sham 组相比显著增加，与 RL 组 BALF 上清 TNF-α、IL-1β 水平相一致，而 HSPTX 组大鼠肺组织 NF-κB 与 RL 组相比则有显著的下降，其 BALF 上清 TNF-α、IL-1β 也明显低于 RL 组，这些都说明了 HSPTX 复苏失血性休克大鼠减轻机体的炎症反应可能与抑制 NF-κB 的表达有关。

有研究发现 HS 和 PTX 的作用机制并不相同：HS 作用于 PKC 的上游，而 PTX 则作用于 PKC 的下游；HS 在减少中性粒细胞激活的时候主要影响 MAPKp38，而 PTX 则减少中性粒细胞 MAPKp38 和 ERK 的激活[10,11]。因此，我们下一步的研究重点是比较单纯 HS 复苏和 HSPTX 复苏时机体的炎症反应状态以及 MAPKp38 和 ERK 的表达水平。

参 考 文 献

[1] Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma[J].Injury, 2005, 36(6): 691-709.

[2] Koustova E, Stanton K, Gushchin V, et al. Effects of lactated Ringer's solutions on human leukocytes [J]. J Trauma, 2002, 52 (5): 872- 878.

[3] Rhee P, Wang D, Ruff P, et al. Human neutrophil activation and increased adhesion by various resuscitation fluids[J].Crit Care Med, 2000, 28(1): 74-78.

[4] Coimbra R, Melbostad H, Hoyt D B. Effects of phosphodiesterase inhibition on the inflammatory response following shock: role of pentoxifylline[J]. J Trauma, 2004, 56(2): 442- 449.

[5] Pascual J L, Ferri L E, Seely A J, et al. Hypertonic saline resuscitation of hemorrhagic shock diminishes PMN rolling and adherence to endothelium and reduces in vivo vascular leakage[J].Ann Surg, 2002, 236(5): 634-642.

[6] Coimbra R, Loomis W, Melbostad H, et al. Role of hypertonic saline and pentoxifylline(HSPTX) on neutrophil activation and TNF-α synthesis: a novel resuscitation strategy[J].J Trauma, 2005, 59(2): 257-265.

[7] Coimbra R, Porcides R, Loomis W, et al.HSPTX protects against hemorrhagic shock resuscitation-induced tissue injury: An attractive alternative to ringer's lactate[J]. J Trauma, 2006, 60(1): 41-51 .

[8] 吴 彬，但 伶. CD40/CD40L 在兔失血性休克肺组织中的表达[J].重庆医科大学学报，2007，132(8)：891-893.

[9] Roman-Blas J A, Jimenez S A.Targeting NF-kappaB: a promising molecular therapy in inflammatory arthritis[J]. Int Rev Immunol, 2008, 27 (5): 351-374.

[10] Junger W G, Hoyt D B, Davis R E, et al.Hypertonicity regulates the function of human neutrophils by modulating chemoattractant receptor signaling and activating mitogen- activated protein kinase p38[J]. Clin Invest, 1998, 101(12): 2768-2779.

[11] Coimbra R, Loomis W, Melbostad H, et al. LPS-stimulated PMN activation and proinflammatory mediator synthesis is downregulated by phosphodiesterase inhibition: role of pentoxifylline[J].J Trauma, 2004, 57 (6): 1157-1163.

（责任编辑：冉明会）