DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.15.010
第26卷第15期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 15
1354 2004年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)15-1354-03

油酸-内毒素序贯致伤大鼠血浆和肺泡灌洗液TNF-α、IL-1β和IL-6水平的变化

张 青,毛宝龄,钱桂生,李 琦,陈正堂,徐剑铖 (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)

提 要:目的 探讨促炎症细胞因子:肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白细胞介素-1β(IL-1β)和白细胞介素-6(IL-6)水平的变化,在全身炎症反应和急性肺损伤中的作用。方法 采用油酸加内毒素脂多糖(LPS)序贯致伤大鼠,在油酸致伤后1、4、12和24 h实施小剂量LPS第2次致伤,收集血浆和肺泡灌洗液,采用酶联免疫法(ELISA)检测TNF-α、IL-1β和IL-6蛋白含量。以单油酸致伤和单小剂量LPS致伤作为对照组进行比较分析。结果 TNF-α和IL-1β在油酸致伤4 h LPS第2次致伤后水平最高,IL-6的最高水平在油酸12 h加LPS致伤组;2次序贯致伤后IL-1β水平变化最大,增高最显著,血浆浓度达到(1 526±39.69) pg/ml,肺泡灌洗液内浓度为(840.4±95.29) pg/ml。结合肺组织病理学研究,肺组织损伤最严重大鼠,血浆和肺泡灌洗液TNF-α、IL-1β和IL-6水平最高。结论 TNF-α和IL-1β是早期释放的促炎症细胞因子,其中IL-1β的血浆和肺泡灌洗液中水平最高,它可能在全身炎症反应发生、发展和急性肺损伤中起非常重要的作用。肺组织损伤程度与这些促炎症细胞因子水平有密切关系。

关键词:油酸;内毒素脂多糖;两次打击;肿瘤坏死因子-α;白细胞介素-1β;白细胞介素-6;急性肺损伤;全身炎症反应综合征

中图法分类号:R392.11;R364.5;R563.02 文献标识码:A

Changes of TNF-α, IL-1β, and IL-6 levels in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of rats after seguential injury with oleic acid and lipopolysaccharide

ZHANG Qing, MAO Bao-ling, QIAN Gui-sheng, LI Qi, CHEN Zheng-tang, XU Jian-cheng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the roles of pro-inflammatory cytokines tumor necrosis factor-α (TNF-α), interleukin-1β (IL-1β), and interleukin-6 (IL-6) in acute lung injury and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). Methods Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was employed to determine the protein concentrations of TNF-α, IL-1β, and IL-6 in the plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rats after seguential injury with oleic acid and lipopolysaccharide at different time. Results The peak levels of TNF-α and IL-1β were found at 4 h after first hit with oleic acid. After second-hit, more severe pathologic changes were found in the lung tissues, and higher protein concentrations of TNF-α, IL-1β, and IL-6 were also found in the plasma and BALF. Conclusion TNF-α and IL-1β are present in the early phase of ALI. IL-6 may play an important role in the delayed-development. Increased release of pro-inflammatory cytokines, such as TNF-α, IL-1β, and IL-6, may be one of the mechanisms in the development of ARDS and SIRS.

Key words: oleic acid; lipopolysaccharide; sequential injury; tumor necrosis factor-α; interleukin-1β; interleukin-6; acute lung injury; systemic inflammatory response syndrome

---

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39730210)
Supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (39730210)

作者简介:张 青(1964—),男,湖北省黄石市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事急性肺损伤、肿瘤核素治疗方面的研究,现在第三军医大学新桥医院核医学科,发表论文16篇。电话:(023)68755639

通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603

收稿日期:2004-03-11;修回日期:2004-06-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)是由创伤、感染等严重损伤引起的全身炎症反应状态, 是机体对多种细胞因子及炎症介质的反应[1], 其发展结果是多器官功能障碍综合征(multiple organs dysfunctions syndrome, MODS)。在 SIRS 出现失控而发展成 MODS 病理过程中, 肺脏是最易受损伤的首位靶器官[2]。急性肺损伤(acute lung injury, ALI)或急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是 MODS 在肺部的表现。

在 SIRS 失控出现器官损害时, 损伤组织内部炎症介质水平与损伤情况直接相关。在参与 SIRS 众多介质中, 最有影响的促炎症细胞因子是 TNF-α、IL-1 和 IL-6, 它们与 SIRS 发病和死亡关系最密切[3]。在本研究中, 通过检测分析用油酸(oleic acid, OA)和内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)"2 次序贯"致伤大鼠的血浆和支气管肺泡灌洗液(BALF)促炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 蛋白水平的变化, 探讨 SIRS 失控和急性肺损伤病理生理机制中这些促炎症细胞因子可能的作用。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　标本来源　　复制"2 次序贯"肺损伤大鼠[4]: Wistar 大鼠, 体质量(200±50)g(由第三军医大学实验动物中心提供), 盐酸氯胺酮(80 mg/kg)腹腔麻醉。84 只大鼠分组如下: ①OA+LPS 实验组(每时相点 12 只): 油酸(OA)0.2 ml/kg, 经大鼠尾静脉穿刺注入; 分别在注入油酸后 1、4、12、24 h 实施第 2 次致伤, 择另一支尾静脉注入 LPS 2 mg/kg; 观察 2 h。②单 OA 对照组(每时相点6只): 仅注入油酸0.2 ml/kg, 方法同上, 对应观察 3、6、14、26 h。③生理盐水对照组(NS)和单 LPS 对照组(LPS)(每组6只), NS 用量与实验组注入液体总量同, LPS 剂量为 2 mg/kg, 均观察 2 h。

1.1.2　主要试剂及设备　　① Rat TNF-α ELISA Kit - DIACLONE(法国); ② Rat IL-1β ELISA Kit - Biosource(美国); ③ Rat IL-6 ELISA Kit - DIACLONE; ④ 低温离心机: Labofuge400R, 德国 Heraeus 公司; ⑤酶标检测仪: Kinetic Microplate Reader Vmax, 美国 GeneCore 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　标本制备

1.2.1.1　大鼠血液收集和处理　　①颈总动脉插管或直接心脏穿刺, 抽取血液 5~6 ml; ②分离血浆(离心): 4 ℃, 3 000 r/min, 10 min。

1.2.1.2　BALF 收集和处理　　①灌洗液配制参照文献[5]方法, ②灌洗方法: 大鼠颈正中皮肤切开并开胸, 从甲状腺水平将气管剪开一小口, 插入输液用 18 号针头并结扎固定, 针头后软管接注射器, 抽取 5ml 灌洗液缓慢注入气管内, 停留 1 min 左右回抽约 3~4 ml 时再次注入, 反复 3 次; 最后抽取灌洗液约 3.5~4 ml。③BALF 处理: 1 000 r/min 离心 10 min, 13 000× g 离心 30 min。

1.2.2　检测方法- 酶联免疫(ELISA)法　　操作流程依照试剂盒说明书。终止反应后, 将酶标板放入酶标仪槽内, 选择 450 nm 光波长进行检测, 确定标准品和空白对照区域, 由酶标检测仪自动检测计算并绘制标准曲线, 打印全部样本检测结果。

1.3　统计学处理

将所有检测样本(测定值为光密度)换算成浓度单位, 实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SPSS8.0 行方差分析和均数间多重比较。

2　结果

油酸加内毒素序贯致伤后, 血浆 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平与生理盐水基础组对比均有显著增高($P<0.01$), 具体数据见表 1。血浆 TNF-α 和 IL-1β 在油酸致伤 4 h 加 LPS 第 2 次致伤后水平最高, 而 IL-6 则在油酸 12 h 组为高峰。肺泡灌洗液中的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 含量变化与血浆中变化类似, TNF-α 和 IL-1β 在油酸 4 h 组最高, IL-6 在油酸 12 h 组最高; 与血浆水平比较, 肺泡灌洗液 TNF-α 在油酸致伤 4 h 后均降低, IL-1β 在不同时相点均增高, 而 IL-6 则均低于血浆水平。在油酸致伤 4 h 后加 LPS 第 2 次致伤组, BALF 中的 IL-1β 水平与其它时相点有非常显著的差异。

表 1　油酸-内毒素序贯致伤大鼠血浆和肺泡灌洗液 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Levels of TNF-α, IL-1β, and IL-6 in rat plasma and BALF at different time after "sequential injury" (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	TNF-α		IL-1β		IL-6	
	Plasma	BALF	Plasma	BALF	Plasma	BALF
Normal saline	89.52±9.892	43.55±7.601	89.47±24.81	66.67±9.542	57.72±8.475	41.80±8.162
LPS 2 h	212.5±32.41	165.9±12.71	408.8±39.45	212.5±12.41	92.07±25.41	78.84±21.61
OA 3 h	465.3±63.03	203.0±31.14	443.9±57.06	778.9±89.37	121.4±30.22	85.21±21.45
OA 6 h	592.5±71.47	209.9±34.89	290.4±36.20	622.8±75.46	286.6±72.31	205.50±39.52
OA 14 h	153.6±19.51	150.7±15.11	184.2±13.15	147.4±21.27	305.7±75.54	232.20±50.71
OA 26 h	126.2±15.78	121.5±10.18	143.0±13.65	130.2±11.73	302.1±42.46	198.40±44.23
OA 1 h+LPS	251.5±18.29	351.3±46.91	242.1±76.91	533.3±71.67	125.8±22.82	102.20±31.24
OA 4 h+LPS	617.0±90.75	506.4±70.78	1526±39.69 *	840.4±95.29 *	356.7±36.42	265.70±47.25
OA12 h+LPS	527.4±57.56	272.5±37.02	442.1±19.92	345.6±18.33	365.5±58.37	320.30±40.85
OA24 h+LPS	166.4±10.96	129.5±9.015	339.5±35.36	282.1±18.15	350.2±39.25	245.50±31.67

*: $P<0.01$, *vs* OA 6 h, LPS 2 h, and NS group

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

促炎症细胞因子 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 在SIRS 发生和发展病理过程中扮演重要角色，这些主要促炎症细胞因子的变化是决定 SIRS 走向的主要病理生理学分子机制之一。

TNF 是细胞因子网络的关键部分，当细菌或病毒进入机体后，TNF-α 在循环中出现较早并迅速达到高峰。TNF-α 对肺有强烈的毒性，能诱导肺内皮细胞活化、白细胞迁移、粒细胞脱颗粒和毛细血管渗漏，积聚的水肿液进一步阻碍了肺泡细胞的灌流和氧气交换，引起ARDS。TNF-α 亦可诱导内皮细胞和巨噬细胞释放 IL-1，而 IL-1 随后又刺激产生其他细胞因子的生物合成并反过来增强组织细胞对 TNF-α 的敏感性[6]。

给予药理剂量的 TNF-α，能使动物出现 SIRS 样病理生理反应[7]。临床研究表明，抑制 TNF-α 可降低手术后 SIRS 发生率[8]。ARDS 患者循环血液中的 TNF-α 和 IL-1β 水平增高，可反映肺损伤的严重程度[9]；但文献[10]报道认为循环血液中的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平增高与疾病严重程度不相关。

油酸致动物急性肺损伤是经典的疾病模型[4]，LPS 致急性肺损伤常规剂量是 5 mg/kg[11]。本研究中，在油酸和内毒素 2 次致伤后，油酸致伤 4 h 加小剂量 LPS 再次致伤，血浆和 BALF 中的 TNF-α 和 IL-1β 水平最高，而 IL-6 高峰在油酸第 1 次致伤 12 h 加 LPS 组；这种时间上的差异可能反映了不同炎症细胞因子在全身炎症反应中起不同的作用。本研究结果提示：①TNF-α 和 IL-1β 是早期释放的促炎症细胞因子，而 IL-6 峰值靠后，支持其可能由 TNF-α 和 IL-1β 刺激产生的理论；②3 种促炎症细胞因子中，IL-1β 的血浆和 BALF 中含量(浓度)均最高，它可能在 SIRS 发生、发展和急性肺损伤中起非常重要的作用；③经过肺组织病理学研究显示[4]，单 LPS 致伤组大鼠肺轻度充血、水肿；单油酸(OA)致伤大鼠肺表面呈暗红色，肺包膜下明显充血水肿；而 2 次致伤(OA＋LPS)大鼠肺表面大片包膜下出血病灶。光镜下，单 OA 组大鼠，肺间质水肿、增宽，大量炎性细胞浸润；OA 1 h＋LPS 组损伤更严重，胸膜下肺水肿、血管周围袖套样水肿；OA 4 h＋LPS 组肺组织普遍肺泡水肿，间质大量炎细胞浸润，以单个核细胞浸润为主。按病理形态指标及病变程度来比较，OA 4 h＋LPS 组肺损伤最严重，与单油酸 6 h 比较差异非常显著($P<0.01$)[4]。结合病理学检查和本研究显示，肺组织损伤最严重大鼠，血浆和 BALF 的 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 水平最高，表明肺组织损伤程度与这些促炎症细胞因子水平有密切关系。

在炎症反应中，促炎症细胞因子与抗炎症细胞因子经常处在平衡/失衡相互对立统一的变化之中，这种动态的平衡和失衡是确定炎症反应走向的主要因素之一。抗炎症细胞因子的变化是否直接参与全身炎症反应失控导致急性肺损伤，值得继续深入研究。

参考文献：

[1] 毛宝龄. 深入探讨全身炎症反应的失控与调控[J]. 中华内科杂志，1997，36(1)：3－4.

[2] 钱桂生. 全身炎症反应综合征、急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征[J]. 解放军医学杂志，1999，24(5)：313－316.

[3] Waage A，Brandtzaeg P，Halstensen A，*et al*. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6，interleukin 1，and fatal outcome[J]. J Exp Med，1989，169(1)：333－338.

[4] 张 青，毛宝龄，钱桂生，等. 油酸和内毒素两次打击大鼠急性肺损伤动物模型研究[J]. 第三军医大学学报，2000，22(6)：603－604.

[5] Syrbu S，Thrall R S，Smilowitz H M. Sequential appearance of inflammatory mediators in rat bronchoalveolar lavage fluid after oleic acid-induced lung injury[J]. Exp Lung Res，1996，22(1)：33－49.

[6] Tracey K J，Beutler B，Lowry S F，*et al*. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin[J]. Science，1986，234(4775)：470－474.

[7] Dinarello C A，Okusawa S，Gelfand J A，*et al*. Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits：Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition[J]. Prog Clin Biol Res，1989，286(4)：243－263.

[8] Ono S，Aosasa S，Mochizuki H. Effects of a protease inhibitor on reduction of surgical stress in esophagectomy[J]. Am J Surg，1999，177(1)：78－82.

[9] Bauer T T，Monton C，Torres A，*et al*. Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory distress syndrome，severe pneumonia，and controls[J]. Thorax，2000，55(1)：46－52.

[10] Antunes G，Evans S A，Lordan J L，*et al*. Systemic cytokine levels in community-acquired pneumonia and their association with disease severity[J]. Eur Respir J，2002，20(4)：990－995.

[11] 徐剑铖，毛宝龄，钱桂生，等. 己酮可可碱对内毒素肺损伤大鼠炎性细胞因子变化的干预作用[J]. 第三军医大学学报，2004，26(10)：845－847.

(编辑 王 红)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net