DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.002
第26卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 10
2004年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2004

文章编号:1000-5404(2004)10-0845-03

论著

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

徐剑铖,毛宝龄,钱桂生,冯英凯,田玉恒 (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 观察内毒素性肺损伤大鼠肺组织及外周血炎性细胞因子的变化,探讨己酮可可碱(pentoxifylline, PTX)的干预作用。方法 72只雄性Wistar大鼠分为:①内毒素1 h组(n=6),②内毒素2 h组(n=6),③内毒素4 h组(n=6),④内毒素6 h组(n=12),⑤生理盐水对照组(n=12),⑥PTX 1 h组(n=6),⑦PTX 2 h组(n=6),⑧PTX 4 h组(n=6),⑨PTX 6 h组(n=12)。采用静脉注射LPS的方法复制内毒素性肺损伤模型,PTX组致伤后立即静脉注射PTX 20 mg/kg,并以6 mg·kg^{-1}·h^{-1}维持。各组动物于设定的时相点放血活杀,用ELISA法或胸腺细胞增殖法测定血清TNF-α、IL-6、IL-8含量及IL-1活性;斑点杂交检测肺组织中TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA表达。结果 ①内毒素致伤后各组肺组织内TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8mRNA的表达强度,均非常显著高于生理盐水对照组(P<0.01)。PTX治疗后,内毒素致伤大鼠肺组织内TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8mRNA的相对含量较未接受PTX治疗大鼠有一定程度的减少。②内毒素致伤后各组血清中TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8含量或活性均非常明显高于生理盐水对照组(P<0.01)。PTX 6 h组血清中TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8含量或活性,明显低于内毒素6 h组(P<0.01)。结论 内毒素肺损伤大鼠肺组织内TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA表达及血清中相应细胞因子含量或活性均不同程度显著升高,PTX可在一定程度上抑制体内TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8的产生、抑制其在肺组织内mRNA的表达。

关键词:急性肺损伤;炎症细胞因子;内毒素;己酮可可碱
中图法分类号:R392.11;R563;R972.4 文献标识码:A

Interventional effect of pentoxifylline on the changes of inflammatory cytokine genes in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats

XU Jian-cheng, MAO Bao-ling, QIAN Gui-sheng, FENG Ying-kai, TIAN Yu-heng (Institute of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the interventional effect of pentoxifylline (PTX) on the expressions of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 mRNA in the lung and the levels of TNF-α, IL-1, IL-6, and IL-8 in serum in rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury (ALI). **Methods** A total of 72 Wistar rats were divided into 9 groups randomly: (LPS) 1 h group (n=6), 2 h group (n=6), 4 h group (n=6), 6 h group (n=12); and normal saline control group (n=12), and PTX 1 h group (n=6), 2 h group (n=6), 4 h group (n=6), 6 h group (n=12). The expressions of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 mRNA were detected by Dot Blotting. The levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 were determined by ELISA. **Results** Compared with those in the normal saline control group, the expression levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 mRNA in the injured lungs increased significantly (P<0.01), and the levels of these cytokines in serum increased in LPS-treated groups (P<0.01). The expressions of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 mRNA were inhibited markedly in PTX-treated groups. The levels of these cytokines in serum were lower in PTX groups than those in LPS-treated groups (P<0.01). **Conclusion** Increased expression levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 mRNA are found in rat lungs with lipopolysaccharide-induced ALI. The levels of these cytokines in serum also increase significantly. TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 may contribute to lipopolysaccharide-induced ALI, since these cytokines are highly expressed at both the mRNA and the protein levels. PTX can inhibit the production of these inflammatory cytokines *in vivo* and the mRNA expression in the lung tissues.

Key words: acute lung injury; inflammatory cytokine; lipopolysaccharide; pentoxifylline

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的严重阶段是急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),严重感染是ALI/ARDS最多见的病因之一,即使不是感染诱发者,病程中因继发感染,或者由于细菌易位和肠道毒素吸收等缘故,也有感染因素参与ALI/ARDS损害[1~3],感染的重要致病因素是内毒素,其主要成分是脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)。己酮可可碱

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39500064);重庆市科技计划资助项目(1997-6)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (39500064) and the Research Project of Sci & Tech Plan of Chongqing (1997-6)
作者简介:徐剑铖(1963-),男,湖北省鄂州市人,博士,主任医师,教授,主要从事急性呼吸窘迫综合征发病机制及防治方面的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68755016
收稿日期:2004-02-24;修回日期:2004-04-02

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

(pentoxifylline, PTX)是甲基黄嘌呤衍化物,我们在既往的实验中曾发现,PTX 可抑制静脉注射同种犬脂肪提取液所致的犬 ARDS 肺内白细胞的激活[4]。为观察内毒素性 ALI 发病过程中,炎性细胞因子的变化及 PTX 对其变化的干预作用,本实验采用内毒素性 ALI 模型,观察 ALI 发生过程中,肺组织内 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8mRNA 表达,以及血清中相应细胞因子含量或活性的变化,并探讨 PTX 对这些细胞因子表达等的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

体质量 180~250 g 的健康雄性 Wistar 大鼠 72 只(第三军医大学实验动物中心提供)分为下列各组:①内毒素 1 h 组(n=6);②内毒素 2 h 组(n=6);③内毒素 4 h 组(n=6);④内毒素 6 h 组(n=12);⑤生理盐水对照组(n=12);⑥PTX 1 h 组(n=6);⑦PTX 2 h 组(n=6);⑧PTX 4 h 组(n=6);⑨PTX 6 h 组(n=12)。

1.2 方法

大鼠经 1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔麻醉,做颈动、静脉插管,稳定 15 min 后,静脉注射 LPS(O111: B4, sigma 产品)5 mg/kg。PTX 各组注射 5 mg/kg LPS 后,立即静脉注射 PTX(上海第十六制药厂惠赠,含量 98.77%,批号 910101)20 mg/kg,并以 6 $mg\cdot kg^{-1}\cdot h^{-1}$维持。

各组动物均于设定的时相点经颈动脉放血活杀(对照组于 6 h 时活杀)。其中,内毒素 6 h 组和生理盐水对照组各 6 只动物,取右肺后叶经 10%福尔马林固定做病理观察;其余动物活杀后,取左肺及右肺后叶经液氮冻实后-70 ℃保存,采用 Chomczynski 的一步热酚法提取肺组织总 RNA 后,分别用 α-^{32}P dATP 标记的 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 cDNA 探针进行斑点杂交(TNF-α 及 IL-1β cDNA 质粒由 Thomas A. Hamilton 博士惠赠;IL-6 cDNA 质粒,由西南医院病理科王晓东博士赠送;IL-8 cDNA 质粒由 Teizo Yoshimura 博士赠送),放射自显影冲洗后的 X 光胶片晾干后,用 CS-9000 型薄层扫描仪,在 460 nm 波长处扫描,参比波长用 600 nm。以不同浓度的 cDNA marker 各点的扫描峰面积为纵坐标,浓度取对数为横坐标,在半对数坐标纸上作图,根据各样品点的扫描峰面积确定细胞因子 mRNA 的相对含量。所有动物均于注射内毒素前(伤前)及活杀时,取动脉血做血气分析;活杀时收集全部血液,500× g 离心 10 min,收集血清,采用 ELISA 法测定 TNF-α、IL-6、IL-8 含量,用胸腺细胞增殖法测定 IL-1 活性。

1.3 统计学方法

数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差分析、多个处理组与对照组比较及均数间多重比较。

2 结果

2.1 PTX 对 ALI 大鼠肺组织 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 表达的影响

结果表明,内毒素致伤后各组肺组织内 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 的表达强度,均非常显著高于生理盐水对照组(P<0.01)。其中 TNF-α mRNA 在注射内毒素后 1 h、IL-1β mRNA 在 2 h 时表达最强;而 IL-6、IL-8 mRNA 在注射内毒素后 4 h 时表达最强。PTX 治疗后内毒素致伤大鼠,肺组织内 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 的相对含量仍然显著高于生理盐水对照组,但较未接受 PTX 治疗的内毒素致伤大鼠有一定程度的减少(表 1)。

表 1 PTX 对内毒素所致肺组织 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 表达变化的影响(n=6)

Tab 1 Effects of PTX on the expression of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 mRNA in the lung in rats with LPS-induced ALI (n=6)

Group	Relative content of inflammatory cytokines mRNA in the lung (pg/10^{4}pg total RNA)			
	TNF-α	IL-1β	IL-6	IL-8
LPS 1 h	194.00±15.44△△	112.67±17.69△△	176.00±14.04△△	271.33±17.56△△
LPS 2 h	179.50±10.78△△	117.17±11.75△△	201.50±13.87△△	298.00±15.58△△
LPS 4 h	175.17±14.19△△	100.83±17.30△△	208.17±17.74△△	309.00±17.29△△
LPS 6 h	167.33±11.40△△	89.67±20.27△△	185.00±14.46△△	279.67±54.31△△
PTX 1 h	164.00±13.76△△**	87.00±12.57△△*	113.83±27.02△△**	155.83±50.25△△**
PTX 2 h	155.33±12.49△△**	97.00±13.65△△**	178.33±17.80△△*	265.83±23.54△△**
PTX 4 h	154.00±6.48△△**	74.17±12.45△△**	183.00±15.05△△*	275.17±18.20△△**
PTX 6 h	117.33±27.72△△**	49.50±21.04△△**	161.67±16.50△△*	262.83±20.53△△**
NS control	0.75±0.58	0.69±0.26	0.93±0.55	1.09±0.75

△△: P<0.01, *vs* control; *: P<0.05 **: P<0.01, *vs* LPS group of the corresponding time points

2.2 PTX 对 ALI 大鼠血清 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 含量或活性的影响

内毒素致伤后各组血清中 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 含量或活性均非常明显高于生理盐水对照组(P<0.01)。其中 TNF-α 含量在 1h 时最高,2、4、6 h 时呈递减趋势,但与对照组相比仍处在高水平;IL-1 活性在 2 h,IL-6、IL-8 含量在 4 h 时达高峰(表 2)。PTX 治疗后,PTX 6 h 组血清中 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 含量或活性,虽然仍显著高于对照组(P<0.01),但已明显低于内毒素 6 h 组(P<0.01,表 3)。

表 2 内毒素致伤各组血清中炎性细胞因子含量或活性的变化(n=6)

Tab 2 Levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 in the serum in different groups of rats with LPS-induced ALI (n=6)

Group	TNF-α (ng/ml)	IL-1 (cpm/10^5 cells)	IL-6 (ng/ml)	IL-8 (ng/ml)
LPS 1 h	5.71±0.50△△	5 838±305△△	4.99±0.62△△	1.60±0.71△△
LPS 2 h	5.35±0.36△△	6 200±588△△	5.95±0.63△△	2.35±0.70△△
LPS 4 h	4.85±0.44△△	5 068±398△△	6.31±0.69△△	3.78±0.68△△
LPS 6 h	4.33±0.48△△	4 843±565△△	5.64±0.61	3.65±0.55△△
NS control	0.04±0.04	363±51	0.05±0.03	0.07±0.08

△△: P<0.01, *vs* NS control group

表 3 PTX 对内毒素所致 ALI 大鼠血清 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 含量或活性改变的影响(n=6)

Tab 3 Effects of PTX on the levels of TNF-α, IL-1β, IL-6, and IL-8 in the serum in rats with LPS-induced ALI (n=6)

Group	TNF-α (ng/ml)	IL-1 (cpm/10^5 cells)	IL-6 (ng/ml)	IL-8 (ng/ml)
LPS 6 h	4.33±0.48△△	4 843±565△△	5.64±0.61△△	3.65±0.55△△
PTX 6 h	3.60±0.38△△**	4 086±316△△**	4.22±0.74△△**	1.72±0.80△△**
NS control	0.04±0.04	363±51	0.05±0.03	0.07±0.08

△△: P<0.01, *vs* NS control group; **: P<0.01, *vs* LPS 6 h group

3 讨论

ARDS 是一种严重的 ALI,由于临床病例选择和标本

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

采集(主要是肺组织样本),以及伦理方面存在种种困难,所以其发病机制等的研究多在动物实验中进行[1]。所谓 ALI 实际上是一种肺脏的炎症和通透性增加综合征[2],临床上主要表现为低氧血症等。本研究采用静脉注射 LPS (O111: B4)的方法复制 ALI 模型,结果表明,注射 LPS 后 2 ~6 h PaO_2 呈下降趋势,注射 LPS 后 6 h 时肺 W/D 值显著高于对照组,提示致伤后肺组织含水量增多;病理下均可见肺脏体积增大、肺内白细胞渗出增加,以及肺间质和肺泡水肿等改变。说明注射 LPS 后有肺脏损伤发生。

LPS 是一些炎症介质与细胞因子的强诱导剂,注射 LPS 后除了 LPS 对肺脏的直接损伤作用外,更主要的可能是它所诱发的全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),后者激活的多种炎症细胞或效应细胞,及其释放的大量炎症介质或细胞因子等,可间接导致肺脏损伤[2,3]。炎症反应是从细胞与细胞之间的相互作用开始的,这种相互作用,包括细胞间的直接接触和由介质介导的间接联系,控制细胞间信息传递的可溶性蛋白,是免疫细胞和非免疫细胞合成的细胞因子,在高浓度状态下,这些细胞因子可介导机体局部和全身的炎症反应。严重全身炎症反应导致肺损伤的发展过程中的一个重要特征,是细胞因子进入循环[3]。TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 被认为是感染诱发的 SIRS[5],及感染性 ALI 或 ARDS[2,6] 发病中意义较为重要的细胞因子。有研究证明,给动物注射 IL-1[7] 或 TNF[8] 均可诱发 ALI,其病理改变酷似 ARDS;在肺灌注模型,气管内注入 IL-1 或 IL-8 可导致肺水肿形成[9]。

本实验观察到,大鼠注射 LPS 后,外周血 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 含量或活性均明显升高,从而为它们参与 LPS 诱发的全身炎症反应,以及最后形成的 ALI 的发病提供了可能。大鼠注射 LPS 后,血清 TNF-α 在 1h 时即达高峰,2、4、6 h 时呈逐渐下降趋势,与文献[3]报道的注射 LPS 后 90 min 才达高峰的结果似不一致,这可能是由于我们实验中没有设立 90 min 时相点的缘故,也就是 1 h 时 TNF-α 可能还处在上升阶段,而 2 h 时 TNF-α 已在下降过程中。实验中我们还观察到,血清 IL-1 活性高峰出现在注射 LPS 后 2 h,而 IL-6、IL-8 含量 4 h 时才升至最高,这一结果与文献[3]记载基本相符,其机制可能与 LPS 介导 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 释放后,TNF-α 又刺激 IL-1β,以及 TNF-α、IL-1β 再刺激 IL-6、IL-8 释放有关。

肺脏产生细胞因子的细胞有两类:①肺脏的常住细胞如肺泡巨噬细胞(AM)、肺细胞(pneumocyts)、内皮细胞、成纤维细胞;②因局部或全身炎症刺激而"招募"到肺部的细胞,如 PMN、淋巴细胞、血小板等。在本实验中,我们采用直接观测肺组织 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 表达的方法,反映的是肺组织自身在机体注射内毒素诱发 ALI 后,这些细胞因子在 RNA 水平的变化,避免了测定支气管肺泡灌洗液(BALF)中细胞因子时,有血清细胞因子渗漏至 BALF 中的嫌疑。实验中,以 TNF-α、IL-1β cDNA 为探针,采用 Northern blot 的方法证实注射 LPS 后肺内有细胞因子 mRNA 表达。应用斑点杂交对细胞因子 mRNA 进行相对定量后,结果表明,注射 LPS 后肺组织 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 表达高峰分别在 1、2、4、4 h,与血清中相应细胞因子蛋白水平的变化特点有相似之处,其原因可能也类似。肺组织内这些细胞因子 mRNA 的高表达,为它们在肺内发挥作用提供了前提。

PTX 是甲基黄嘌呤衍化物,曾作为血管扩张剂,用于治疗血管性疾病,因发现其具有显著抗炎作用,因而用于防治 ALI/ARDS[10]。我们曾在犬 ARDS 模型试用 PTX 进行早期治疗,结果取得一些疗效[4]。本实验中,我们采用早期给药的方法,就 PTX 对内毒素肺损伤大鼠炎性细胞因子变化的干预作用进行了观察,结果显示,PTX 6 h 组,肺组织内 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8 mRNA 的表达,可被 PTX 部分地抑制,血清中 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-8 含量或活性,虽然显著高于对照组,但较未治疗组已有明显减低,说明 PTX 对这些炎症细胞因子有一定的抑制作用,除了推测可能与抑制单核细胞等激活有关外,其确切机制尚需进一步探讨。

参考文献:

[1] Burck R. Challenges of treating on the basis of knowledge: The ARDS Network trials and the ensuing controversy[J]. Crit Care Med, 2004, 32(3): 904—905.

[2] Atabai K, Matthay M A. The pulmonary physician in critical care. 5: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definitions and epidemiology[J]. Thorax, 2002, 57(5): 452—458.

[3] Sessler C N, Bloomfield G L, Fowler A A 3rd. Current concepts of sepsis and acute lung injury[J]. Clin Chest Med, 1996, 17(2): 213—235.

[4] 徐剑铖, 郭先健, 毛宝龄, 等. 己酮可可碱防治犬呼吸窘迫综合征的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 1994, 17(2): 103—105.

[5] Darville T, Giroir B, Jacobs R. The systemic inflammatory response syndrome(SIRS): immunology and potential immunotherapy[J]. Infection, 1993, 21(5): 279—290.

[6] 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.

[7] Goldblum SE, Jay M, Yoneda K, et al. Monokine-induced acute lung injury in rabbits[J]. J Appl Physiol, 1987, 63(5): 2093—2100.

[8] Ferrari Baliviera E, Mealy K, Smith R J, *et al*. Tumor necrosis factor induced adult respiratory distress syndrome in rats[J]. Arch Surg, 1989, 124(12): 1400—1405.

[9] Guidot D M, Stevens E E, Repine M J, *et al*. Intratracheal but not intravascular interleukin-1 causes acute edematous injury in isolated neutrophil-perfused rat lungs through an oxygen radical mediated mechanism [J]. J Lab Clin Med, 1994, 123(4): 605—609.

[10] Wiedemann H P, Arroliga A C, Komara J J. Emerging systemic pharmacologic approaches in acute respiratory distress syndrome[J]. Respir Care Clin N Am, 2003, 9(4): 419—435.

(编辑　王　红)

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