DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.10.011
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)10-0871-03

论著

不同剂量脂多糖对大鼠急性肺损伤效应的观察

李 琦,钱桂生,张 青,王长征 (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 观察脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤(ALI)大鼠血浆IL-4含量变化,探讨其在ALI发生发展过程中的意义。方法 120只Wistar大鼠根据注射LPS剂量随机分为2、4、6和8 mg/kg组,并设立生理盐水对照组(NS组),伤后1、2、4和6 h观察大鼠的一般情况、动脉血氧分压(PaO_2)、肺组织湿质量/干质量比值、肺组织病理改变,并检测血浆IL-4含量。结果 ①梯度剂量LPS可以引发程度不同的大鼠ALI;当LPS≥6 mg/kg时,发生急性呼吸窘迫综合征(ARDS)。②LPS可以诱导大鼠血浆IL-4含量升高;当LPS≥6 mg/kg时,血浆IL-4含量峰值显著提高。结论 ①尾静脉注射LPS可以复制出大鼠ALI模型。②LPS≥6 mg/kg是大鼠发生ARDS的临界剂量。③LPS诱导大鼠血浆IL-4含量升高可能与ARDS发生有关。

关键词:急性呼吸窘迫综合征;急性肺损伤;脂多糖;白细胞介素-4
中图法分类号:R392.11;R563.02;R977.7 文献标识码:A

Effects of different doses of lipopolysaccharide on acute lung injury in rats

LI Qi, QIAN Gui-sheng, ZHANG Qing, WANG Chang-zheng (Institute of Respiratory Diseases, Xingqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To investigate the changes of plasma interleukin-4 (IL-4) in rats with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) and to explore the relationship between IL-4 and ALI. **Methods** A total of 120 Wistar rats were randomly divided into 2, 4, 6, and 8 mg/kg groups according to different doses of LPS administration at each observing time point. A control group (NS), receiving saline injection, was also employed. The indexes of respiratory rate, PaO_2, wet weight/dry weight (W/D) of lung lobes, and pathological changes were observed at 1, 2, 4, and 6 h after injury. The plasma IL-4 content was detected by enzyme-linked immunosorbant assay. **Results** ① Various degrees of ALI in rats were induced by different doses of LPS. Acute respiratory distress syndrome (ARDS) was induced under the condition of LPS ≥6 mg/kg. ② LPS could induce increased plasma IL-4 in rats. The peak value of plasma IL-4 in rats increased significantly under the condition of LPS ≥6 mg/kg. **Conclusion** ① ALI model can be duplicated by injection of LPS. ② LPS ≥6 mg/kg is the critical dosage for ARDS in rats. ③ The obvious increase of plasma IL-4 may be associated with the occurrence of ALI/ARDS.

Key words: acute respiratory distress syndrome; acute lung injury; lipopolysaccharide; interleukin-4

严重的革兰阴性菌感染所产生的内毒素血症,容易引发急性肺损伤(acute lung injury, ALI)。急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是ALI的严重形式。ALI/ARDS的发病基础是全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)[1]。目前认为,SIRS的本质是过度的炎症反应,其中不仅有炎症介质过度释放,而且伴有内源性抗炎介质的释放异常[2]。白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)是一种重要的抗炎性细胞因子。本研究通过观察脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的ALI大鼠血浆IL-4含量的变化,探讨其在ALI发生、发展过程中的意义。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理

Wistar大鼠120只(本校实验动物中心提供),雌雄不拘,体质量(200±50)g。

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(39730210);全军医学科研"十五"计划重点课题(01Z074)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30070334, 39730210) and the Key Research Project of Medicine and Health of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01Z074)
作者简介:李 琦(1965-),男,福建省永春县人,博士,副主任医师,副教授,主要从事急性肺损伤发病机制及治疗的研究,发表论文16篇。电话:(023)68774603
通信作者:钱桂生,电话:(023)68755603
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

盐酸氯胺酮(80 mg/kg)腹腔麻醉。经大鼠尾静脉注射 LPS (O111:B4, Sigma)致伤。按 LPS 剂量(2、4、6、8 mg/kg)及时相点(1、2、4、6 h)分组,并设时相对应的生理盐水对照组(NS-C)。每组均6只。各时相点采集颈动脉血并制备血浆,然后处死大鼠取肺。

1.2 观察指标

观察大鼠的呼吸等一般情况;测定动脉血氧分压(PaO_2)和左肺组织的湿质量/干质量比值;肺大体观察,肺组织常规光镜观察并作病理形态学积分;透射电镜检查;ELISA 检测血浆 IL-4 含量。

1.3 肺组织含水量测定

游离大鼠左肺,称量湿质量(wet weight, W),经-0.06 kPa×70 ℃脱水 24 h 后,再称量干质量(dry weight, D),以湿质量/干质量(W/D)比值表示肺组织含水量。

1.4 病理形态学积分方法[3]

取右肺上叶组织,经固定、包埋、切片、HE 染色后,光镜下观察。主要依据肺间质水肿、肺泡水肿、炎细胞浸润、肺泡出血、透明膜形成、肺不张改变的等级,按程度的"无、轻、中、重"分别计"0、1、2、3 分",然后累计总分。

1.5 血浆 IL-4 的测定

采用固相三明治夹心、酶联免疫吸附试验(ELISA-Kit, Diaclone Research, FRENCE)检测血浆 IL-4 含量,具体操作参照试剂盒说明进行。

1.6 统计学处理

数据用均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 SPSS10.0 作单因素方差分析和均数间多重比较。

2 结果

2.1 呼吸频率及死亡率的变化

LPS 致伤以后,大鼠呼吸频率增快或呼吸困难;随着 LPS 剂量增大,呼吸困难程度加重。当 LPS≥6 mg/kg 时,主要表现为呼吸窘迫,常伴有粉红色泡沫样肺水肿液由鼻腔溢出,死亡率明显升高。

2.2 动脉血氧分压(PaO_2)的变化

LPS 可以诱导大鼠 PaO_2 显著降低;LPS 6 mg/kg 使 PaO_2 早期低于 8 kPa;LPS 8 mg/kg 则导致严重而持久的低氧血症(PaO_2<8 kPa),见表1。

表1 LPS 致伤的 ALI 大鼠 PaO_2 的变化(kPa $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 1 Changes of PaO_2 in rats with ALI/ARDS induced by LPS (kPa $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Group	Post-injury time (h)			
	1	2	4	6
NS-C	12.09±0.94	12.17±0.99	12.13±0.92	12.18±0.96
LPS 2 mg/kg	12.07±1.89	11.02±0.51*	12.10±1.60	11.73±1.46
LPS 4 mg/kg	11.55±1.86	10.13±1.90*	10.35±1.33*	11.68±1.57
LPS 6 mg/kg	7.93±1.43△	9.18±1.84△	8.77±1.94△	8.50±2.19△
LPS 8 mg/kg	7.72±1.39△	7.90±1.14△	7.77±1.11△	7.33±0.53△

NS-C: Normal saline control; *: $P<0.05$, *vs* NS-C at the same time point; △: $P<0.01$, *vs* NS-C at the same time point

2.3 肺组织湿质量/干质量比值的变化

LPS 可以诱导大鼠肺组织湿质量/干质量值升高,即使是小剂量 LPS,也可以使其早期升高,湿质量/干质量值升高依赖于 LPS 剂量增加;LPS≥6 mg/kg 时,湿质量/干质量值升高显著高于较低 LPS 剂量组,见表2。

表2 LPS 致伤的 ALI 大鼠肺组织湿质量/干质量值的变化($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 2 Changes of lung W/D in rats with ALI/ARDS induced by LPS ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Group	Post-injury time (h)			
	1	2	4	6
NS-C	4.26±0.09	4.28±0.12	4.26±0.10	4.29±0.13
LPS 2 mg/kg	4.53±0.41	4.69±0.14*	4.69±0.51*	4.27±0.73
LPS 4 mg/kg	4.67±0.26*	4.74±0.38*	5.06±0.43*	5.24±0.81*
LPS 6 mg/kg	4.83±0.35#△	5.54±0.43#△	5.88±0.53#△	6.40±0.71#△
LPS 8 mg/kg	5.62±0.55#△	5.84±0.50#△	6.12±0.68#△	6.45±0.80#△

NS-C: Normal saline control; *: $P<0.05$, *vs* NS-C at the same time point; #: $P<0.01$, *vs* NS-C at the same time point; △: $P<0.05$, *vs* LPS 2 mg/kg and LPS 4 mg/kg at the same time point

2.4 肺大体观察、肺组织常规光镜和透射电镜检查

NS-C 大鼠肺外观色泽粉红,无明显异常改变。LPS 致伤后,肺体积增大,重量增加,脏层胸膜张力较高,色泽暗红,可见包膜下点、片状出血,切面疏松,有黄色或淡红色液体溢出。LPS 剂量越大,大鼠肺水肿等病变越重;当 LPS≥6 mg/kg 时,易见出血等严重改变。光镜下,NS-C 各时点肺组织结构完整,肺泡腔清晰,肺泡隔无水肿、炎症等特殊改变。LPS 致伤时,主要病变为水肿、炎症、出血等病变。当 LPS 2 mg/kg 时,肺泡隔轻度增宽、少量炎细胞浸润、组织结构完整,病理学积分显著高于 NS-C($P<0.01$);当 LPS 4 mg/kg 时,可见渗出、间质增宽及肺泡内带状、片状水肿,间质炎细胞浸润,分类以单个核细胞浸润为主,小支气管内偶见少量渗出物,积分也显著高于 NS-C($P<0.01$);当 LPS≥6 mg/kg 时,水肿、炎细胞浸润以及出血等病变均加重,伴局灶性肺不张和肺气肿,可见微血栓及透明膜形成,积分非常显著高于 NS-C($P<0.01$),且 2 h 点及其以后时点的积分显著高于相同时相的 2、4 mg/kg 组($P<0.05$),见表3。

表3 LPS 致伤的 ALI 大鼠肺组织病理形态学积分的变化($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 3 Pathomorphological changes of the lung tissues in rats with ALI/ARDS induced by LPS ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Group	Post-injury time (h)			
	1	2	4	6
NS-C	1.65±1.03	1.83±1.17	1.69±1.21	1.71±1.18
LPS 2 mg/kg	4.01±1.85*	4.33±2.07*	4.59±1.92*	5.21±2.03*
LPS 4 mg/kg	6.26±1.81*	6.31±1.57*	6.82±2.05*	6.77±1.29*
LPS 6 mg/kg	7.63±2.88*	9.69±2.03*△	10.22±1.93*△	9.85±2.16*△
LPS 8 mg/kg	8.89±2.21*△	11.46±2.57*△	12.58±2.62*△	13.18±3.44*△

NS-C: Normal saline control; *: $P<0.01$, *vs* NS-C at the same time point; △: $P<0.05$, *vs* LPS 2 mg/kg and LPS 4mg/kg at the same time point

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

超微结构改变主要表现为肺泡上皮细胞水肿、核周间隙扩大、内质网扩张及退行性变; Ⅰ型肺泡上皮细胞轻度肿胀, 呈退行性变; Ⅱ型上皮微绒毛脱落减少或变短, 板层体排空, 可见胞体脱落或胞质崩解; 血管内皮细胞肿胀, 吞饮小泡增多, 染色质边集; 肺泡隔间质明显增宽, 电子密度减低。肺泡腔还可见红细胞、多形核白细胞、坏死细胞碎片和血浆样物质。大剂量 LPS 致伤的超微病理改变明显加重。

2.5　血浆 IL-4 含量的变化

LPS 致伤组的血浆 IL-4 含量非常显著或显著升高($P<0.01$, $P<0.05$, 与 NS-C 相比)。LPS 致伤剂量越大, 相同时相组血浆 IL-4 含量越高; 2、4 mg/kg LPS 致伤后, 血浆 IL-4 含量高峰在 4 h 点; 而 6、8 mg/kg LPS 致伤后, 血浆 IL-4 含量高峰提前到 2 h 点, 而且高峰值非常显著升高($P<0.01$, 与 2、4 mg/kg LPS 相同时点及 4 h 组峰值相比), 达到(167.98±11.51) ng/L 以上。各致伤组高峰以后仍然保持在较高水平, 见表 4。

表 4　LPS 致伤的 ALI 大鼠血浆 IL-4 含量的变化(ng/L, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Tab 4　Changes of plasma IL-4 in rats with ALI/ARDS induced by LPS LPS (ng/L, $\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Group	Post-injury time (h)			
	1	2	4	6
NS-C	61.25±13.26	64.12±14.17	68.33±16.26	65.52±15.08
LPS 2 mg/kg	89.69±10.97 #	112.98±10.14 *	126.68±10.55 *	124.54±12.62 *
LPS 4 mg/kg	98.66±11.25 *	132.46±11.71 *	142.62±11.69 *	132.45±13.34 *
LPS 6 mg/kg	106.44±13.13 *	167.98±11.51 *△	158.52±10.95 *	154.52±10.61 *
LPS 8 mg/kg	115.15±14.55 *	187.27±13.13 *△	165.51±12.67 *	160.42±15.04 *

NS-C: Normal saline control; *: $P<0.01$, *vs* NS-C at the same time point; #: $P<0.05$, *vs* NS-C at the same time point; △: $P<0.05$ *vs* LPS 2 mg/kg and LPS 4 mg/kg at 2 h or 4 h

3　讨论

革兰阴性菌感染是重症监护室十分常见的院内感染, 由此而产生的内毒素血症, 是引发 ALI 或 ARDS 的主要原因。合并革兰阴性菌感染的危重患者多数预后不良, 死亡率很高。研究显示, 以过度的全身炎症反应为特征的 SIRS 是 ALI 或 ARDS 的发病基础, 而代偿性抗炎反应综合征(compensatory anti-inflammatory response syndrome, CARS)也是重要的发病机制之一, 其特点就是内源性抗炎因子过度释放[4]。目前认为, ALI 就是 SIRS 在肺脏的主要表现, ARDS 是其严重的结果。

LPS 是内毒素的主要成分, 参与构成革兰阴性菌的胞壁外膜, 是强有力的致伤剂, 具有激活免疫应答的能力, 使免疫细胞活化分泌细胞因子。通常, LPS 用于静脉注射致伤小动物, 复制感染性损伤模型[5]。本研究采用梯度剂量 LPS 致伤 Wistar 大鼠, 通过递增强度致伤, 模拟临床严重感染引发脓毒症的发生、发展过程[6]。

IL-4 是由单核细胞、淋巴细胞产生和释放的抗炎细胞因子, 能够抑制 LPS 诱导的炎性细胞因子产生[7,8]。在 ALI 大鼠肺组织中, 有大量炎症细胞扣押, 含有较多的单核细胞和淋巴细胞, 是肺组织产生、释放 IL-4 的主要来源。如果机体产生 IL-4 过多, 可以引起继发性免疫抑制[9]。

观察梯度剂量 LPS 诱导的 ALI 大鼠的病理、病理生理变化[10], 以及血浆 IL-4 含量的变化, 对于研究 ALI 的发生与发展有着十分重要的意义。本研究表明: 梯度剂量 LPS 可引起不同程度的 ALI; 当 LPS≥6 mg/kg 时, 大鼠呼吸窘迫, 死亡率显著升高, PaO_2 早期低于 8 kPa, 肺水含量非常显著高于较低 LPS 剂量组, 病理变化显著加重, 透明膜形成, 符合 ARDS 的基本特征, 说明 LPS 6 mg/kg 是诱导大鼠发生 ARDS 的临界剂量。本研究还表明, LPS 可导致大鼠血浆 IL-4 含量升高; 当 LPS≥6 mg/kg 时, 大鼠血浆 IL-4 含量, 尤其是峰值含量显著高于较低 LPS 剂量组, 说明 LPS≥6 mg/kg 可以引发大鼠抗炎因子释放显著增多。

研究结果表明, 由大鼠尾静脉注射 LPS 可以复制出不同程度的 ALI 模型; 当 LPS≥6 mg/kg 时, 大鼠血浆 IL-4 含量异常升高; 血浆 IL-4 含量的异常变化与 ALI 发生、发展可能有密切关系。

参考文献:

[1] 钱桂生. 呼吸系统疾病研究进展与展望[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(2): 123-124.

[2] Bone R C. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS)[J]. Ann Intern Med, 1996, 125(8): 680-687.

[3] Sun D, Zhao M, Ma D, *et al*. Protective effect of interleukin-1 receptor antagonist on oleic acid-induced lung injury[J]. Chin Med J(Engl), 1996, 109(7): 522-526.

[4] Bone R C, Sir Isaac Newton. Sepsis, SIRS and CARS[J]. Crit Care Med, 1996, 24(7): 1125-1128.

[5] Yamasawa H, Ishii Y, Kitamura S. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant in a rat model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury[J]. Inflammation, 1999, 23(3): 263-274.

[6] 胡　森. MODS 动物模型研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 504-507.

[7] Choi P, Reiser H. IL-4: role in disease and regulation of production[J]. Clin Exp Immunol, 1998, 113(3): 317-319.

[8] Hart P H, Bonder C S, Balogh J, *et al*. Differential responses of human monocytes and macrophages to IL-4 and IL-13[J]. J Leukoc Biol, 1999, 66(4): 575-578.

[9] Zedler S, Bone R C, Baue A E, *et al*. T-cell reactivity and its predictive role in immunosuppression after burns[J]. Crit Care Med, 1999, 27(1): 66-72.

[10] 李　琦, 钱桂生, 张　青, 等. 递增剂量脂多糖致伤大鼠 SIRS-肺损伤的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(11): 1264-1266.

(编辑　王　红)

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