DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.12.005

论著

文章编号:1000-5404(2003)12-1038-04

硫芥中毒犬外周血IL-2、IL-6含量变化和淋巴细胞DNA损伤

林 海[1],陈志龙[2],董兆君[1],王仕丽[1] ([1]第三军医大学预防医学系军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]第二军医大学海医系,上海 200433)

提 要:目的 研究硫芥中毒犬外周血IL-2、IL-6变化和淋巴细胞DNA损伤的规律。方法 重庆家犬硫芥中毒(16 mg/kg, sc)。中毒后不同时相点取血,分离血清和淋巴细胞。采用放射免疫方法测定血清中IL-2、IL-6含量,以单细胞凝胶电泳技术测淋巴细胞DNA损伤程度。结果 中毒后4 h血清IL-2、IL-6含量开始下降,72 h达最低值,120 h开始恢复。单细胞电泳检测结果提示,硫芥导致明显的淋巴细胞彗星现象。受损细胞率、淋巴细胞DNA片段迁徙度于中毒4 h即开始升高,24~72 h持续升高。结论 硫芥中毒导致发生早且持续时间较长的犬外周血IL-2、IL-6含量下降和淋巴细胞DNA损伤。

关键词:硫芥;白介素;单细胞电泳

中图法分类号:R446.62;R446.9;R827.172 文献标识码:A

Sulfur mustard-induced changes of IL-2 and IL-6 concentrations and lymphocyte DNA damage in dog peripheral blood

LIN Hai, CHEN Zhi-long, DONG Zhao-jun, WANG Shi-li (Department of Military Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the changes of IL-2 and IL-6 levels and lymphocyte DNA damage in peripheral blood of dog intoxicated by sulfur mustard. Methods Chongqing dogs were subcutaneously injected with sulfur mustard at the dose of 16 mg/kg. Lymphocytes and serum were isolated from dog peripheral blood at different time points as designed. The IL-2 and IL-6 levels in blood serum were measured by radioimmunoassay and lymphocyte DNA damage represented as comet tail-length was determined by single cell gel electrophoresis (SCGE). Results Four hours after administration of sulfur mustard, the serum IL-2 and IL-6 levels dogs injected with sulfur mustard decreased and reached the lowest level at 72 h. A significant recovery was found at the time point of 120 h. SCG revealed sulfur mustard-induced DNA fragmentation (comet) in dog peripheral lymphocytes. The rate of the damaged lymphocytes and the degree of DNA fragment migration began to increase at 4 h and progressively increased from 24 h to 72 h after sulfur mustard treatment. Conclusion Sulfur mustard intoxication induces early and long-lasting decreases in serum IL-2 and IL-6 levels and lymphocyte DNA fragmentation in dog peripheral blood.

Key words: sulfur mustard; interleukin; single cell gel electrophoresis

硫芥是一种具有糜烂作用的化学物质,第一次世界大战期间德国军队首次将其用于战场,收到很好的战果[1]。由于硫芥具有杀伤作用大、防护困难、没有特效救治药物等问题,至今仍受到外军的高度重视[2]。硫芥的脂溶性很强,接触后很快被吸收入血并分布全身。因其具有双功能烃化作用,进入机体的硫芥极易与生物大分子中的亲核原子结合,并发挥其毒性作用。DNA是硫芥的主要攻击对象之一。在体内生理环境下,硫芥分子两端的氯原子解离后所形成的锍离子能与DNA双链形成交叉联结(Cross linking),导致DNA的段裂、缺损等变化。硫芥对DNA的损伤是其细胞毒作用的物质基础,增殖旺盛的细胞如肠上皮细胞、生精细胞、淋巴细胞等对其比较敏感。目前对于硫芥中毒尚缺少特异性抗毒手段,早期诊断和对症治疗是临床处理的关键环节[3]。杨清武等[4]以硫芥处理体外培养的大鼠脾脏淋巴细胞,中毒早期即出现DNA损伤和IL-2、IL-6水平升高。但整体中毒动物外周血淋巴细胞DNA损伤和IL-2、IL-6水平变化尚不清楚。本研究运用放射免疫技术和单细胞凝胶电泳技术(Single cell gel electrophoresis, SCGE),检测犬硫芥中毒后外周血IL-2、IL-6水平及淋巴细胞DNA损伤。旨在探索硫芥中毒早期诊断的敏感指标,为提高硫芥中毒的防治水平提供必

基金项目:全军"十五"重点课题资助项目(01L054)

作者简介:林 海(1975-),男,贵州省都匀市人,助教,主要从事军事毒理学方面的研究。电话:(023)68752285

收稿日期:2003-03-12;修回日期:2003-05-16

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

要的手段。

1　材料

1.1　试剂

蒸馏硫芥, 纯度 97.5%, 由军事医学科学院毒物药物研究所提供, 实验当天以无菌注射用水稀释至所需浓度。IL-2、IL-6 放免试剂盒购自解放军总医院东亚免疫技术研究所。淋巴细胞分离液购自上海化学试剂二厂。D-Hanks 液、常熔点和低熔点琼脂糖、十二烷基肌氨酸钠、Tris Base、溴化已啶、对氨基苯磺酸、α 萘胺、SDS 等购自 Sigma 公司。其它试剂均为国产分析纯。电泳仪为北京六一厂产品。

1.2　动物和中毒模型

健康重庆家犬 6 条, 体质量 15~20 kg, 雌雄不限, 由第三军医大学实验动物中心提供。动物进入实验室后, 正常饮水、进食。驱虫、检疫 2 周后用于实验。动物称质量后皮下注射硫芥, 剂量为 16 mg/kg (0.8 LD_{50})。

1.3　IL-2、IL-6 测定

实验动物皮下注射硫芥后, 分别于 0、4、24、72、120 h 等时相点经股静脉取血。血样不加抗凝剂, 室温下静置, 待血清分离后, 取血清置－20 ℃保存待测。测定前置室温复融、混匀后, 4 ℃ 3 000 r/min 离心 5 min。取上清液 100 μl, 按照放免试剂盒说明测定 IL-2、IL-6 浓度。

1.4　淋巴细胞单细胞电泳

于中毒 0、4、24、72 h 取外周血 5 ml, 按 1∶1 比例沿管壁轻柔加至淋巴细胞分离液上层, 3 500 r/min× 20 min 离心, 吸取中层淋巴细胞, 按照 Singh[5] 和 Schmezer[6] 方法进行单细胞凝胶电泳 (Singal cell gel electrophoresis, SCG)。主要步骤是, 以 25.4 mm× 76.2 mm 的磨沙载玻片制备胶板: 第一层为 0.5% 普通熔点琼脂糖, 第二层为细胞悬液与 1% 低熔点琼脂糖的混悬液, 第三层为0.5% 低熔点琼脂糖。将胶板浸没于 4 ℃裂解液中 1 h, 25 V, 300 mA 电泳, 中和 15 min, 溴化已啶染色。荧光显微镜下观察计数拖尾细胞数, 每组 100 个细胞。以接目测微器 (经镜台测微器校准) 于高倍镜下测量 100 个细胞的核直径和尾长度, 计算迁移度、迁徙率及受损细胞百分率[7]。选典型视野和适当倍数照相。

1.5　统计学处理

实验数据计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 医用统计程序包进行单因素 t 检验。对计数资料采用 χ^2 检验。

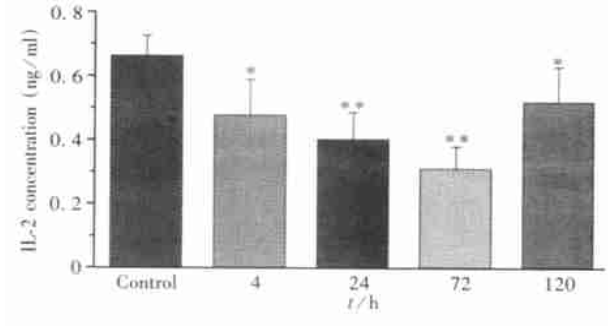
2　结果

2.1　硫芥中毒犬血清 IL-2 含量变化

如图 1 所示, 硫芥中毒后 4 h 血清中 IL-2 的含量开始下降, 与对照组比较差别有显著性意义 ($P<0.05$)。中毒 24 h, 血清 IL-2 浓度继续下降, 72 h 降至最低水平。中毒 120 h, 血清 IL-2 含量开始回升, 但仍与对照水平有显著差异 ($P<0.05$)。

2.2　硫芥中毒犬血清中 IL-6 含量变化

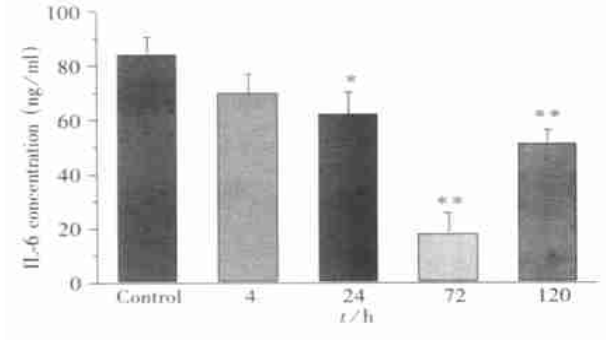
图 2 显示, 中毒后 4 h, IL-6 水平降低, 但与对照组差别无显著性意义 ($P>0.05$)。中毒 24 h 血清 IL-6 明显低于对照水平 ($P<0.01$), 中毒 72 h 进一步下降 ($P<0.01$), 中毒 120 h 血清 IL-6 有恢复趋势, 但仍显著低于对照水平 ($P<0.01$)。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

图 1　硫芥中毒犬血清 IL-2 含量的变化

Fig 1　Changes of serum IL-2 level in sulfur mustard intoxicated dogs



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

图 2　硫芥中毒犬血清中 IL-6 含量的变化

Fig 2　Changes of serum IL-6 level in sulfur mustard intoxicated dogs

2.3　淋巴细胞迁移度和迁徙率及受损细胞百分率变化

硫芥中毒 4 h, 受损细胞比对照组增加了 17.32% ($P<0.05$), 24 h 继续增加, 72 h 的淋巴细胞受损率高达 88.64%, 与对照组比较相差非常显著 ($P<0.01$)。受损淋巴细胞的迁移度和迁移率也随中毒时间的延长而逐渐增加。中毒 4 h, 迁移度和迁移率, 均显著高于对照组, 见表 1、图 3。中毒 72 h, 迁移度和迁移率分别比对照组增加了 97.7% 和 252% ($P<0.01$)。

表 1　淋巴细胞迁移度、迁移率和受损细胞百分率 (%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The commeted cell rate, the comet tail-length and the migration rate of dog peripheral lymphocytes (%, $\bar{x}\pm s$)

	Control	Time (hour after sulfur mustard administation)		
		4	24	72
Comet tail -length (μm)	40.18±2.84	48.06±5.97 **	56.36±10.40 **	79.44±8.96 **
Migration rate (%)	22.32±2.88	40.50±5.32 *	51.23±4.76 **	78.55±9.37 **
Control cometed cell rate (%)	15.23±0.36	32.55±3.00 *	71.56±2.00 **	88.64±0.50 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

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

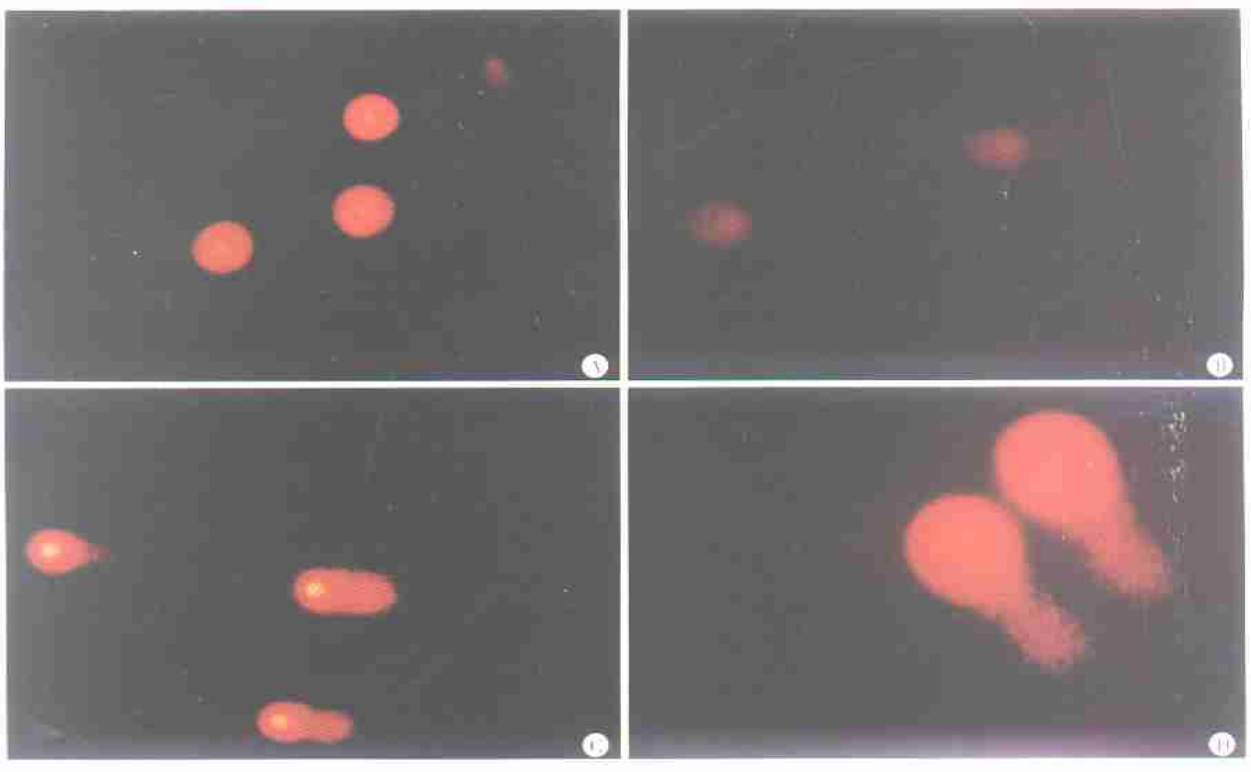


图 3 硫芥中毒犬血液淋巴细胞单细胞电泳图像 (EB× 400)

Fig 3 SCGE analysis of mustard-treated dog peripheral lymphocytes (EB× 400)

3 讨论

3.1 硫芥对犬外周血细胞因子的影响

IL-2 又称 T 细胞生长因子, 在生理状态下表现出强烈的免疫增强作用, 可以激活 T 细胞功能, 是目前所知的促进 T 细胞由 G_1 期进入 S 期的最重要的细胞因子。IL-6 具有广泛的生物学活性, 能促进 B 细胞的分化和抗体的产生, 对 T 细胞及胸腺具有活化作用等。对于硫芥中毒后细胞因子的变化, 如 IL-1、IL-2、IL-6、TNFα 的变化已经报道, 认为细胞因子在硫芥中毒的机制中具有重要意义[8]。我们主要观察硫芥中毒后犬外周血淋巴细胞分泌的 IL-2、IL-6 的变化。结果表明: 0.8 LD_{50} 硫芥中毒早期(4 h), 这两种细胞因子在外周血的浓度即开始下降。IL-6 也呈现下降趋势。至 72 h, 外周血 IL-2 和 IL-6 水平达最低值, IL-2 和 IL-6 分别只有对照水平的 46.9%和 55.6%。中毒后 120 h 两者均有明显回升, 但尚未恢复到对照水平。杨清武等[3]报道, 硫芥导致培养大鼠脾淋巴细胞一氧化氮含量增加, 其发生发展的时间关系与本文结果相吻合。这些结果说明, 淋巴细胞因子对硫芥中毒反应敏感, 具有变化出现早, 发展快, 恢复比较迅速的特点。

3.2 硫芥中毒后淋巴细胞的 DNA 损伤

DNA 是硫芥作用的靶分子之一, 也是硫芥的细胞毒性的基础。对硫芥中毒后 DNA 的损伤的研究国内外已有不少的报道[9], 但方法复杂, 设备条件要求高。单细胞凝胶电泳技术是近年来发展起来的一种检测 DNA 损伤的新技术[10], 具有简便、快速、灵敏、无需放射性标记等特点, 适于细胞 DNA 损伤的研究。在正常情况下, DNA 双链以组蛋白为核心形成核小体, 若有去垢剂进入细胞, 核蛋白被浓盐提取, DNA 便形成残留的类核。在内外因素致核 DNA 断裂时, 将引起超螺旋松解, 电泳时 DNA 断片向阳极伸展, 形成特征性的彗星现象。DNA 受损越严重, 含片段越多, 彗星的慧尾越长。因此慧尾中 DNA 百分含量和尾长就成了 DNA 断裂的重要定量参数。我们用本方法检测硫芥引起的 DNA 损伤, 从图 3 可见, 中毒 4 h 淋巴细胞即发生明显的拖尾现象, 随着中毒时间的延长, 慧尾逐渐延伸。测定结果显示, 硫芥中毒后淋巴细胞受损百分率、迁徙度、迁徙率均随中毒时间的延长而增加。这些变化与上述 IL-2、IL-6 结果相一致, 说明外周血淋巴细胞 DNA 对硫芥中毒很敏感, SCG 检测硫芥 DNA 损伤有可能发展成为预测硫芥中毒的敏感指标, 相关研究正在继续中。

参考文献:

[1] Ghamei M, Vosoghi A A. An epidemiologic study to screen for chronic my-

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

elocytic leukemia in war victims exposed to mustard gas[J]. Environ Health Perspect, 2002, 110(5): 519—521.
[2] Dachir S, Fishbeine E, Meshulam Y, *et al*. Potential anti-inflammatory treatments against cutaneous sulfur mustard injury using the mouse ear vesicant model[J]. Hum Exp Toxicol, 2002 21(4): 197—203.
[3] Graham J S, Schomacker K T, Glatter R D, *et al*. Bioengineering methods employed in the study of wound healing of sulphur mustard burns[J]. Skin Res Technol, 2002, 8(1): 57—69.
[4] 杨清武, 董兆君, 魏相德, 等. 硫芥对大鼠淋巴细胞毒性作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1): 27—30.
[5] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al*. A simple technique of quantiation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Exp Cell Res, 1988, 175(1): 184—191.
[6] Schmezer P, Eckert C, Liegibel U M. Tissue-specific induction of mutation by streptozotocin *in vivo*[J]. Mutat Res, 1994, 307(2): 295—299.
[7] 余 卫, 孙金苏, 闫长会, 等. 体外硫芥对人外周血淋巴细胞 DNA 的损伤[J]. 癌变·畸变·突变, 2001, 13(1): 17—19.
[8] Arroyo C M, Von Tersch R T, Broomfield C A. Activation of TNF-α by human monocytes(THP-1) exposed to H-MG[J]. Hum Exp Toxical Appl Pharmacol, 1995, 14(7): 247—253.
[9] Lin P, Vaughan F L, Bernstein I A. Formation of interstrand DNA cross links by bis(2-chloroethyl)sulfide: a possible cytotoxic mechanism in rat keratinocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 218(2): 556—558.
[10] 张慧丽, 余 卫, 闫长会. 单细胞凝胶电泳技术在军事毒理学中的应用[J]. 卫生毒理学杂志, 1999, 13(3): 182—184.

(编辑 汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2003)12-1041-02

个案与短篇

误诊为急性肠梗阻的小儿穿孔性阑尾炎的分析

Perforating appendicitis in children misdiagnosed as ileus: a report of 16 cases

靳明林, 石 彦 (第三军医大学附属西南医院普通外科, 重庆 400038)

小儿穿孔性阑尾炎是一个常见的急腹症, 有时因诊断困难而致病情延误。我院 1989 年 8 月至 2003 年 2 月共收治小儿急性阑尾炎 547 例, 穿孔性阑尾炎占 67 例(12.25%), 其中 16(16/67)例误诊为急性肠梗阻而手术, 约占穿孔性阑尾炎病例的 23.88%。本研究分析 16 例误诊原因, 并提出早期诊疗措施。

1 临床资料

本组 16 例中, 男性 11 例, 女性 5 例, 年龄在 3~12 岁, 6~11 岁居多(13/16)。就诊时间平均在 72 h 以上(指在本院就诊时间)。诱因: 不洁饮食、暴饮暴食(3/16)、服用某些药物(2/16)、上呼吸道感染(1/16)等。临床表现: 症状和体征及腹部 X 线检查, 提示有肠梗阻, 经短期术前准备后, 急诊行剖腹探查。术中探查见: 17 例阑尾坏疽、穿孔, 形成阑尾周围脓肿; 腹腔内脓性渗出液 800~1 000 ml。渗出所形成的粘连带压迫回肠而致肠腔梗阻, 粘连带距回盲部最近为 10 cm, 最远为 120 cm。手术方式: 阑尾切除、腹腔引流; 其中有 7 例行了肠减压, 4 例行了部分肠切除术。术后全部病例痊愈出院, 无 1 例死亡。

2 讨论

2.1 误诊原因

小儿急性阑尾炎是小儿腹部外科最常见的急症, 病情比成人严重, 一是穿孔率高, 如得不到早期及时的诊断和治疗, 穿孔率可达 30%~60%[1]。二是误诊率高, 但误诊为肠梗阻的较为少见。所以, 小儿急性阑尾炎的及时早期诊断和正确处理极为重要。分析本组 16 例误诊为肠梗阻的原因有几点: ①起病诱因所致的假象: 本组有 2 例因服用驱虫药后出现腹痛、腹胀、呕吐等, 很易想到蛔虫性肠梗阻; 有 3 例因暴饮暴食后剧烈活动, 出现腹痛、腹胀、呕吐等, 而很易想到肠扭转。②症状、体征不典型所致的假象: 本组 16 例均缺乏典型的临床表现, 在诊断上有困难时, 经腹部 X 线摄片显示: 肠管扩张积气、多个液平面, 而误诊为肠梗阻。③就诊晚(指到本院就诊时间)掩盖了病情: 本组病例就诊时间平均为 72 h 以上, 小儿急性阑尾炎的早期, 通常是被误诊为呼吸道感染、肠炎、肠蛔虫症等, 常常经过多个医疗单位或多次就诊后方得到确诊, 但此时, 多数病例已发生阑尾穿孔、脓肿形成, 使病情复杂化; 另外, 小儿大网膜发育不全, 短、薄而小, 阑尾穿孔后易形成弥漫性腹膜炎, 随着病程的发展, 腹腔内渗出液增多, 当形成的粘连带束缚肠管时, 完全掩盖了阑尾炎的表现而误诊为肠梗阻。④阑尾位置异常所致的假象: 本组有 2 例盲肠后腹膜外阑尾炎, 早期腹痛轻、部位不定, 当阑尾穿孔后形成肠腔梗阻时而误诊。⑤小儿本身因素: 小儿阑尾炎诱发因素多, 不能如实反应病情, 检查时不能很好地配合, 不易准确查出腹部压痛点或压痛明显点及其范围而误诊。⑥医生忽视病史资料, 对临床表现和实验室检查结果未经全面综合分析判断, 最主要的症状往往被忽略而致误诊[2]。

2.2 如何早期诊断小儿急性阑尾炎

小儿急性阑尾炎发生在 2 岁以下的相当少见, 5 岁以后随着年龄增长发病率亦增高, 10 岁达高峰, 男多于女。临床表现特点有: ①不能如实详述病史, 检查不配合。②对炎症反应较敏感, 恶心、呕吐、发热比成人显著且出现早。③症状、体征不典型, 转移性腹痛不明显。④阑尾壁较薄, 血液循环障碍时, 很

(下转 1044 页)

作者简介: 靳明林(1955—), 男, 河北省邯郸市人, 硕士, 副主任医师, 副教授, 主要从事普通外科疾病诊断和治疗方面的研究, 发表论文 30 余篇。电话: (023)68754158

收稿日期: 2003-03-11; 修回日期: 2003-05-12

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