DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.008
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)05-0391-03

论著

氯喹对内毒素血症小鼠的保护作用以及对细胞因子的影响

郑 江[1],周 红[2],鲁永玲[2],肖光夏[3] (第三军医大学:[1]附属西南医院综合实验研究中心;[2]基础医学部药理学教研室;[3]附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨氯喹对内毒素血症小鼠的保护作用以及抑制内毒素引起的细胞因子释放情况。方法 清洁级昆明小鼠40只,随机分为LPS、氯喹、氯喹+LPS和对照组,每组动物10只。LPS组,给予10 mg/kg的LPS;氯喹组,给予20 mg/kg的氯喹;LPS+氯喹组在给予20 mg/kg氯喹后,立即给予10 mg/kg的LPS;对照组给予注射用水,注射体积为200 μl/20 g。观察尾静脉给药后7 h内小鼠的死亡率。体外培养小鼠ANA-1细胞,观察培养体系中预先加入氯喹3 h后,不同浓度的LPS引起的TNF-α、IL-6的释放情况。结果 氯喹可降低内毒素引起的小鼠死亡,死亡率由100%降低为50%($P<0.05$);培养体系中预先加入氯喹后LPS引起的TNF-α、IL-6的释放显著降低,尤其以IL-6的下降最明显,在LPS(4.0 μg/ml)刺激组IL-6降幅可达68倍之多。结论 氯喹对内毒素血症小鼠具有显著保护作用,可明显抑制内毒素引起的细胞因子释放,提示氯喹可能是治疗内毒素血症的有效药物。

关键词:氯喹;内毒素血症;死亡率;细胞因子
中图法分类号:R392.11;R515.3;R978.61 文献标识码:A

Protective effect of chloroquine on endotoxemia mice and its influence on cytokines

ZHENG Jiang, ZHOU Hong, LU Yong-Ling, XIAO Guang-xia (Medical Research Centre, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of chloroquine on endotoxemia mice and its inhibition on the release of cytokines induced by LPS. Methods A total of 40 mice of Kunming species were randomly divided into four groups: LPS group received LPS at 10 mg/kg, chloroquine group received chloroquine at 20 mg/kg, LPS plus chloroquine group received chloroquine at 20 mg/kg first, then LPS at 10 mg/kg and control group received only 0.9% sodium chloride at 200 μl/20 g. The mortality was observed within seven days after injection via caudal vein. ANA-1 cell lines were cultivated *in vitro*. After chloroquine was first added into the cells for 3 hours, the releases of TNF-α and IL-6 in the supernatants induced by different concentrations of LPS were measured. Results Chloroquine could decrease the death of mice due to endotoxin. Mortality dropped from 100% to 50% ($P<0.05$). Significant decrease of the release of TNF-α and IL-6 induced by LPS was found. The decrease of IL-6 level was most marked, being 68 times as high as that in the group challenged by LPS at 4.0 μg/ml. Conclusion Chloroquine is of significantly protective effect on endotoxemia mice, and can obviously inhibit the release of cytokines induced by LPS, suggesting that chloroquine might be an effective drug for the treatment of endotoxemia.

Key words: chloroquine; endotoxemia; mortality; cytokine

近年来临床感染患者因细菌引起的全身性炎症反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS)以及脓毒症的病死率呈上升趋势,已成为当前研究的焦点之一。

存在于革兰阴性杆菌外膜上的内毒素(Lipopolysaccharide, LPS)在SIRS发生中的作用已得到肯定。但目前国际上针对内毒素介导的SIRS尚无有效的防治措施,因此寻找有效的拮抗内毒素措施具有重要的意义。

氯喹是一临床常用的抗疟疾药物,对参与炎症过程中重要的关键酶COX-1和COX-2具有显著的抑制作用,因此临床上也用于关节炎等炎症性疾病的治疗。但对LPS引起的SIRS是否具有治疗作用尚未见明确的报道。本研究通过观察氯喹对LPS血症小鼠的保护作用以及细胞因子的释放抑制作用,为寻找有效的拮抗内毒素措施奠定理论基础。

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目("973"项目)(G19990542)
作者简介:郑 江(1961-),男,重庆市人,博士,副研究员,主要从事感染、炎症的发病机制及防治措施方面的研究。电话:(023)68754435
收稿日期:2002-03-19;修回日期:2002-06-05

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

1 材料与方法

1.1 材料

小鼠单核细胞 ANA-1 细胞系购自上海细胞生化所; LPS O111:B4、氯喹为 Sigma 公司产品; 低内毒素含量的胎牛血清购自 Hyclone 公司; 小鼠 TNF-α、IL-6 ELISA 检测试剂盒购自上海森雄科技有限公司; 试验所用塑料容器均经 ^{60}Co 辐照去热源; 玻璃容器清洁干燥后 250 ℃、1.5 h 处理。

1.2 方法

1.2.1 氯喹对 LPS 攻击小鼠的保护作用 清洁级昆明种小白鼠 40 只(本校实验动物中心提供), 体重(19.5±0.2) g, 雌雄不拘, 随机分为 LPS、LPS+ 氯喹、氯喹和对照组, 每组动物 10 只。LPS 组, 给予 10 mg/kg 的 LPS; 氯喹组, 给予 20 mg/kg 的氯喹; LPS+ 氯喹组在给予 20 mg/kg 氯喹后, 立即给予 10 mg/kg 的 LPS; 对照组给予注射用水, 注射体积为 200 μl/20 g。给药方式为尾静脉注射, 观察 7 h 内小鼠一般情况及死亡率。

1.2.2 氯喹抑制 LPS 诱导 ANA-1 细胞因子释放实验 采用含有 10% 胎牛血清 RPML 1640 培养 ANA-1, 于实验前日调整细胞浓度为 10^6/ml, 48 孔板中每孔加入 0.5 ml 细胞混悬液。共两块板, 并作复孔对照。

在加入 LPS 刺激的 3 h 前, 第 1 块 48 孔板中每孔加入终浓度为 1 mg/ml 的氯喹, 第 2 块 48 孔板则不加入氯喹。在加入 LPS 刺激之前, 弃细胞培养上清, 加入 0.5 ml 新鲜培养液, 然后加入终浓度为 1、0.1、0.01 μg/ml 的 LPS, 加入体积控制在 25 μl 内, 对照孔仅加入与实验组相同体积的去热原生理盐水。37 ℃ CO_2 孵箱中培养 20 h 后离心取上清, 备用。

1.2.3 细胞培养上清中 TNF-α、IL-6 浓度的测定 按照 ELISA 试剂盒内操作说明进行培养液中细胞因子浓度的检测。

1.3 统计学处理

细胞因子浓度采用 EXCEL 软件进行均数方差分析, 动物死亡率采用 χ^2 检验进行统计分析。

2 结果

2.1 氯喹对 LPS 攻击小鼠的保护作用

小鼠注射 LPS 后, 于 1 h 开始出现死亡, 4 h 内全部死亡, 而提前给予氯喹组仅有 5 只动物死亡, 单纯给予氯喹组和生理盐水对照组小鼠无死亡。LPS+ 氯喹组与 LPS 组死亡率相比相差显著($P<0.01$), 见表 1。

表 1 氯喹对 LPS 攻击小鼠的保护作用

Tab 1 Effects of chloroquine protecting mice from LPS challenge

Group	Mortality (%)
Chloroquine+LPS	50★
LPS	100
Chloroquine	0
0.9% sodium chloride	0

★: $P<0.05$ *vs* LPS group

2.2 氯喹抑制 LPS 诱导 ANA-1 细胞释放细胞因子实验

采用终浓度为 4.0 μg/ml、0.4 μg/ml 和 0.1 μg/ml LPS 刺激 ANA-1 细胞后, 细胞上清中的 TNF-α 和 IL-6 浓度较对照孔[(20.0±5.6) pg/ml 和(10.0±2.6) pg/ml] 显著增高; 而预先加入氯喹后再加入相同浓度的 LPS, TNF-α 和 IL-6 浓度显著降低($P<0.01$), 见表 2。说明: ① LPS 具有激活 ANA-1 细胞大量释放细胞因子的作用; ② 氯喹可明显降低 LPS 引起的单核细胞分泌细胞因子的作用, 尤其以降低 IL-6 释放能力为显著($P<0.01$), 在 LPS(4.0 μg/ml) 刺激组 IL-6 降幅可达 68 倍之多。

表 2 氯喹对 LPS 刺激 ANA-1 细胞分泌 IL-6 的抑制作用

Tab 2 Chloroquine inhibiting the release of IL-6 from ANA-1 cells induced by LPS

LPS(μg/ml)	IL-6(ρ_{IL-6}/pg·ml^{-1})	
	Chloroquine-free	Chloroquine
4.0	2 090.5±3.9	30.7±3.4★
0.4	1 317.0±10.6	25.4±3.4★
0.1	440.4±3.5	36.6±2.7★

★: $P<0.01$ *vs* Chloroquine-free group

表 3 氯喹对 LPS 刺激 ANA-1 细胞分泌 TNF-α 的抑制作用

Tab 3 Chloroquine inhibiting the TNF-α secretion from ANA-1 cells induced by LPS

LPS(μg/ml)	TNF-α($\rho_{TNF-\alpha}$/pg·ml^{-1})	
	Chloroquine-free	Chloroquine
4.0	41.9±14.7	35.8±13.5☆
0.4	40.0±15.3	34.3±14.1☆
0.1	36.7±13.8	23.6±3.3☆

☆: $P<0.01$ *vs* Chloroquine-free group

3 讨论

近年来, 随着对 SIRS 研究的深入, 存在于革兰阴性杆菌外膜上内毒素的作用日益受到重视。LPS 是 SIRS 的重要启动子[1], 其生物学作用主要包括与巨噬细胞接触后能诱生、释放多种炎症介质如 TNF-α、IL-6 等; 通过激活凝血、纤溶、补体系统, 诱发 DIC; 促进肾上腺儿茶酚胺分泌, 导致微循环障碍、血浆外渗, 直至发生休克等。尽管其作用机制日趋清晰, 但针对内毒素血症尚无有效的方法。如果能在现有药物中寻找到有效的治疗方法, 则可起到事半功倍的效果。

基于以上思路, 结合内毒素的作用机制, 我们首先将目标瞄准氯喹。

众所周知, 临床上氯喹除用于疟疾的治疗外, 还用于包括关节炎在内的炎症性疾病的治疗, 但对 LPS 引起的 SIRS 是否具有治疗作用, 尚未见明确的体内外研究报告。除此之外, 我们之所以将氯喹用于内毒素血症的治疗基于以下两点: ①对参与炎症过程的重要的关键酶 COX-1 and COX-1 具有显著的抑制作用[2]; ②文献[3, 4] 报道单核-巨噬细胞对内毒素的识别需要细胞对 LPS 的胞吞作用, 并且巨噬细胞吞噬异物的过程是 pH 依赖性的, 而氯喹可提高巨噬细胞内涵体的 pH 值, 从而达到抑制内涵体成熟的作用, 因此推测氯喹可

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

能对 LPS 引起的炎症反应具有一定抑制作用。

本研究首先观察了氯喹对内毒素血症小鼠的保护作用，结果显示氯喹可大大降低 LPS 引起的动物死亡，动物的死亡率由 100%降低为 50%，证实我们的推测是正确的。

在此基础上我们进一步观察与 SIRS 发生密切相关的细胞因子变化情况，由于 TNF-α、IL-6 水平的升高常被作为 SIRS 发生中细胞因子级联反应的启动及其严重程度的标志[5,6]，为此选择 TNF-α、IL-6 作为细胞因子的代表，观察给予氯喹后 LPS 刺激 TNF-α、IL-6 释放能力的变化。结果表明氯喹能明显降低 LPS 引起的 TNF-α、IL-6 释放，尤其以降低 IL-6 水平为显著，1 mg/ml 浓度的氯喹可使 4 μg/ml、0.4 μg/ml 和 0.1 μg/ml LPS 刺激的 IL-6 释放水平分别下降 68、52、12 倍。这与氯喹抑制疟原虫引起的细胞因子释放以抑制 IL-6 为主的结果不同，可能与不同炎症刺激因素触发炎症反应的途径不同有关[7]。

至于氯喹达不到对内毒素血症小鼠的完全保护可能与氯喹并非直接拮抗和中和内毒素有关。推测其作用机制可能为通过提高巨噬细胞内涵体的 pH 值，抑制吞噬 LPS 的内涵体的成熟，通过抑制信号转导、降低 TNF-α、IL-6 等关键细胞因子的释放达到对内毒素血症动物的保护作用。

因此，本研究提示在革兰阴性杆菌感染可能伴有高内毒素血症的情况下，尽早使用氯喹可能对改善病人的病情具有积极意义。

参考文献：

[1] Chaby R. Strategies for the control of LPS mediated pathophysiological disorders[J]. DDT, 1999, 4(5): 209—221.
[2] Mello S B, Barros D M, Silva A S, *et al*. Methotrexate as a preferential cycloxygenase 2 inhibitor in whole blood of patients with rheumatoid arthritis[J]. Rheumatology (Oxford), 2000, 39(5): 533—536.
[3] Nong S H, Seetoo K F, Levitz S M, *et al*. Cryptococcus neoformans resides in an acidic phagolysosome of human macrophages[J]. Infect Immun, 1999, 67(2): 885—890.
[4] Weber S M, Levitz S M, Harrison T S. Chloroquine and the fungal phagosome[J]. Curr Opin Microbiol, 2000, 3(4): 349—353.
[5] 陈基岱，景炳文，李 萍，等. 多系统器官衰竭及败血症患者肿瘤坏死因子和白介素 6 的水平和意义[J]. 中国危重病急救医学, 1993, 5(6): 325—327.
[6] Calandra T, Gerain J, Heumann D, *et al*. High circulating level of interleukin-6 in patients with septic shock: evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines[J]. Am J Med, 1991, 91(1): 23—29.
[7] Picot S, Peyron F, Donadille A, *et al*. Chloroquine-induced inhibition of the production of TNF, but not of IL-6, is affected by disruption of iron metabolism[J]. Immunology, 1993, 80(1): 127—133.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2003)05-0393-01

个案与短篇

纤维喉镜下间接喉钳口和喉咽异物取出的体会

Experience of extraction of oropharyngeal and laryngopharyngeal foreign body with indirect laryngeal forceps through laryngofiberoscope

刘庆顺，孟祥贵 （第三军医大学附属新桥医院耳鼻咽喉科，重庆 400037）

喉咽部异物是耳鼻咽喉科常见的急症。多采用间接喉镜、直接喉镜或纤维喉镜下行异物取出术；上述方法均有不足之处。我科自 1997 年 5 月至 2001 年 12 月以来对间接喉镜和纤维喉镜下取异物较困难者，采用日产 OlympusENF-T3 型纤维喉镜下行间接喉钳异物取出术，取得了较好的效果，现报告如下。

1 临床资料

本组 30 例异物病例均为本院门急诊病人，且经过间接喉镜和纤维喉镜下异物取出术未成功者。男性 22 例，女性 8 例，年龄最大者 68 岁，最小者 16 岁。异物种类：鱼刺 19 例，鱼鳃骨 3 例，鸡骨 2 例，鸭骨 1 例，竹签 1 例，青蛙骨 4 例。异物存留部位：舌根部 3 例，下咽侧壁 5 例，会厌溪 6 例，梨状窝 16 例。异物发生到就诊时间 2 h 至 7 d。本组病例均有明确的异物嵌入史，就诊前多数病人均采用吞咽食物、菜叶以及含饮食醋等方法，试图将异物软化或吞入胃内。就诊时有吞咽困难者 16 例，检查发现有感染者 10 例。多数病人能指出异物所在的大概部位。

2 治疗方法与结果

2.1 治疗方法

采用 1%地卡因溶液行咽喉部粘膜表面麻醉 2～3 次，鼻腔

作者简介：刘庆顺(1955—)，男，吉林省辉南县人，副主任技师，主要从事听力学及纤维喉镜检查方面的研究，发表论文 19 篇。电话：(023) 68755419

收稿日期：2002-01-03；修回日期：2002-06-24

（下转 399 页）

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