DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.002
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

文章编号:1000-5404(2001)10-1133-03

论著

胸部爆炸伤后血浆及肺组织中NO、TNF-α和IL-8的变化及L-NAME的作用

李兵仓[1],刘 震[2],吴国萍[1],王丽丽[1],张良朝[1],陈志强[1],陈 菁[1] ([1]第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第六研究室,重庆 400042;[2]解放军254医院胸外科,天津 300142)

提 要:目的 研究胸部爆炸伤后细胞因子的变化规律,探讨L-NAME的作用。方法 用雷管和钢珠同步致伤家兔胸部后,测定血浆、支气管肺泡灌洗液及肺组织中NO、TNF-α和IL-8水平;光镜、电镜下观察肺组织的病理变化;测定肺含水量和肺通透指数;伤前静脉给予L-NAME。结果 伤后1 h血浆NO水平显著升高,3 h达高峰,TNF-α和IL-8水平随NO的升高而升高,但TNF-α出现的时间要早于IL-8;肺组织主要表现为出血、水肿、炎细胞浸润、内皮和上皮细胞变性及内皮细胞通透性增强;给予L-NAME后,不仅3种细胞因子水平降低,肺组织病变也有所减轻。结论 NO在胸部爆炸伤后病理生理改变中处于主导地位,早期应用L-NAME有助于胸部爆炸伤的早期救治。

关键词:胸部;爆炸伤;细胞因子
中图法分类号:R349.21;R826.63;R977.3 文献标识码:A

Changes of NO, TNF-α and IL-8 in plasma and lungs in explosive wound of thorax before and after the administration of L-NAME

LI Bing-cang, LIU Zhen, WU Guo-ping, WANG Li-li, ZHANG Liang-chao, CHEN Zhi-qiang, CEHN Jing (Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To study the changes of cytokines and the effects of L-NAME on it in explosive wound of thorax. Methods Thorax of rabbits were traumatized with steel sphere and detonator synchronously, level of NO, TNF-α and IL-8 in plasma, bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue were determined. Pathological changes of lung were observed under light and electron microscope. Water content and pulmonary microvascular permeability index were detected too. N_{ω}-nitro-L-arginine methyl ester(L-NAME) was given intravenously before wounding in experimental group. Results Level of NO in plasma was dramatically increased at 1 h, and reached its peak at 3 h after wounding. TNF-α and IL-8 were also increased with increasing of NO, TNF-α incresed earlier than that of IL-8. Bleeding, edema, inflammatory cells infiltration, degeneration of endothelial cell and epithelial cell and increased permeability of endothelial cell were observed in the lung. After L-NAME treatment decreased level of three kinds of cytokines and alleviated pathological changes of lung were seen in L-NAME treated grsup. Conclusion NO plays a major role in the pathophysiologyical changes of thoracic explosive wound, L-NAME administration is helpful for early therapy of thoracic explosive wound.

Key words: thorax; explosive wounding; cytokine

胸部爆炸伤不仅因为破片、冲击波等物理因素直接作用而损伤肺脏,也容易导致急性继发性肺损伤,并有可能发展成呼吸窘迫综合征(ARDS),从而危及生命。为此,本实验在探讨了破片和冲击波对肺损伤的基础上,借助于胸部爆炸伤模型[1],进一步观察了胸部爆炸伤后早期血浆、肺脏等组织内NO、TNF-α、IL-8的变化,及NO合酶抑制剂左旋硝基精胺酸甲酯(L-NAME)的保护作用,以期揭示胸部爆炸伤后急性继发性肺损伤的发生机制,为其早期救治提供理论指导和实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物致伤方法

新西兰大白兔27只(18只用于生化指标的测定和光镜观察,9只用于电镜观察),雌雄兼用,体重2.5~3.0 kg。致伤前结扎右侧6、7、8肋间动脉,致伤时将动物左侧卧位固定于致伤台。然后在同步控制仪控制下,用钢珠(质量0.25 g,初速690 m/s)和雷管(装药量1.3 g)同时于右侧胸壁致胸部贯通伤。致伤后立即封闭胸壁伤口,保持呼吸道通畅,胸腔指袢排气,呼吸机辅助呼吸。

1.2 动物分组

致伤后将实验动物随机分为3组,每组6只动物:①左旋硝基精胺酸甲酯(L-NAME)组:致伤后30 min静脉注射L-NAME 1 mg/kg。②L-精氨酸(L-arg)组:致伤前30 min静脉注射L-arg 360 mg/kg。③单纯致伤组:致伤前注射相同剂量的生理盐水。

1.3 生化检测

于致伤前(L-arg组给药前)和伤后1、3、6 h采取动脉血,经生化处理后进行以下指标的测定,同时于伤后6 h取肺组织和支气管灌洗液(BALF),进行相同指标的检测。

1.3.1 血浆及肺组织中NO含量测定 采用Griess法。

1.3.2 血浆及肺组织丙二醛(MDA)含量的测定 采用硫代巴比妥酸(TBA)显色法测定。

1.3.3 血浆及支气管灌洗液(BALF)中的TNF-α和IL-8含量测定 使用北京邦定公司提供的夹心法ELISA检测TNF-α和IL-8试剂盒测定。

基金项目:全军"九五"指令性课题(96L039)
作者简介:李兵仓(1956—),男,河北省景县人,博士,教授,主要从事火器伤和神经损伤方面的研究,发表论文60余篇。电话:(023)68757456
收稿日期:2001-03-16;修回日期:2001-06-08

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

1.4 肺含水量的测定和肺通透指数的计算

活杀动物后立即取右肺中叶，置于电子天平称取肺组织湿重，再将其放入 110 ℃烤箱烘干 72 h 至恒重，取出称取干重。肺组织含水量=（湿重－干重）/湿重×100%。肺通透指数在用 Lowry 法分别测定 BALF 蛋白和血浆蛋白的含量后得出，也即 BALF 蛋白和血浆蛋白的比值。

1.5 病理形态学观察

1.5.1 光镜 伤后 6 h 颈动脉放血处死动物，取右肺组织进行石蜡包埋，常规切片后光镜下观察。每组 6 只动物。

1.5.2 电镜 伤后 6 h 将动物麻醉后开胸，将灌注导管经右心室插入肺动脉，剪开左心房，先用生理盐水冲洗，至冲洗液无血色后用 2%硝酸镧进行灌注（150 ml/只，灌注压 1.0 kPa），20 min 后取 3 mm^3 大小的肺组织，投入镧醛固定液 4 ℃过夜，硝酸镧-二甲胂酸钠缓冲液洗涤 2 次，1%四氧化锇后固定，丙酮梯度脱水，环氧树脂包埋，LKB-Ⅲ型超薄切片机切片，醋酸钠-柠檬酸铅双层染色，JEM-1200E/X 透射电镜观察。每组 3 只动物。

1.6 统计学处理

所得资料均用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 EZSTAT2 统计程序作单因素方差分析，并作多重比较的显著性检验。

2 结果

2.1 血浆及肺组织中 NO 含量的变化

致伤后 1 h 致伤组和 L-arg 组血浆 NO 的含量明显升高，与伤前比较差别非常显著（$P<0.01$）。伤后 3 h NO 含量到达高峰，此后逐渐降低。L-NAME 组伤后血浆 NO 含量增高缓慢，3 h 时较伤前差异显著（$P<0.05$），6 h 时接近伤前水平。致伤后 L-NAME 组 NO 含量与 L-arg 组比较各时相点相差非常显著（$P<0.01$）。肺组织匀浆 NO 含量 L-NAME 组较 L-arg 组明显降低（$P<0.05$），见表 1。

表 1 家兔血浆及肺组织中 NO 含量变化（$\bar{x}\pm s$）

Tab 1 Changes of NO content in plasma and lung tissue of rabbits（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Before injury	Plasma (mmol/L)			Lung tissue (mmol/g)
			1 h	3 h	6 h	
Injury	6	0.071±0.021	0.131±0.021 **	0.178±0.027 **	0.107±0.018 *	0.771±0.201
L-NAME	6	0.063±0.018	0.087±0.026 △△	0.096±0.017 *△△	0.073±0.020 △△	0.570±0.145 △
L-arg	6	0.068±0.023	0.158±0.025 **	0.191±0.022 **	0.123±0.025 **	0.894±0.221

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* before injury; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* L-arg

2.2 血浆及肺组织中 MDA 含量变化

致伤后 1 h 致伤组和 L-arg 组 MDA 的含量与伤前比较明显升高（$P<0.01$），且在致伤后 6 h 内进行性升高。L-NAME 组 MDA 含量增高的趋势明显减缓，致伤后各时相点 L-NAME 组 MDA 的含量较 L-arg 组降低程度显著或非常显著。L-NAME 组肺组织 MDA 含量较 L-arg 组和致伤组的相比明显降低（$P<0.05$），见表 2。

2.3 血浆和 BALF 中 TNF-α 含量变化

致伤后 1 h 和 3 h 各组动物血浆 TNF-α 含量均较伤前明显增高（$P<0.01$）。伤后 6 h 各组 TNF-α 含量逐渐降低接近正常水平。L-NAME 组伤后血浆 TNF-α 含量升高幅度不如其它两组尤其 L-arg 组明显。L-NAME 组和 L-arg 组于伤后 1 h 和 3 h 相比，TNF-α 含量相差显著（$P<0.05$）。伤后 6 h BALF 中，L-NAME 组 TNF-α 含量非常显著（$P<0.01$）地低于 L-arg 组，见表 3。

表 2 家兔血浆及肺组织中 MDA 含量变化（$\bar{x}\pm s$）

Tab 2 Changes of MDA content in plasma and lung tissue of rabbits（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Before injury	Plasma (μmol/L)			Lung tissue (mmol/g)
			1 h	3 h	6 h	
Injury	6	2.83±0.79	4.54±1.01 **	7.5±1.56 **	10.39±1.75 **	178.26±18.90
L-NAME	6	2.75±0.65	3.85±0.59 *△	6.08±1.26 **△	7.25±1.25 **△△	150.51±18.50 △
L-arg	6	2.92±0.67	5.04±0.94 **	8.32±1.61 **	10.97±1.70 **	186.14±23.36

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* before injury; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* L-arg

表 3 家兔血浆和 BALF 中 TNF-α 含量变化（ng/ml, $\bar{x}\pm s$）

Tab 3 Changes of TNF-α content in plasma and BALF of rabbits（ng/ml, $\bar{x}\pm s$）

Group	n	Before injury	Plasma			BALF
			1 h	3 h	6 h	
Injury	6	0.18±0.09	0.97±0.29 **	0.66±0.21 **	0.28±0.11	1.17±0.44
L-NAME	6	0.17±0.08	0.63±0.24 **△	0.43±0.16 **△	0.23±0.13	0.64±0.40 △△
L-arg	6	0.19±0.10	1.12±0.38 **	0.79±0.22 **	0.32±0.16	1.59±0.58

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* before injury; △: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* L-arg

2.4 血浆和 BALF 中 IL-8 量变化

伤后 1 h 致伤组血浆 IL-8 含量变化不明显，致伤后 3 h IL-8 含量显著升高（与伤前比较 $P<0.01$），伤后 6 h 仍处于进一步增高的水平；L-NAME 组致伤后 IL-8 含量的上升速度较致伤组明显为缓，但伤后 6 h IL-8 含量与伤前相比差别非常显著（$P<0.01$）；L-arg 组致伤后 1 h IL-8 含量就显著升高（$P<0.05$），伤后 3 h 和 6 h 持续上升（$P<0.01$）。组间比较可见，伤后 3 h 和 6 h，L-NAME 组 IL-8 含量显著低于（$P<0.05$）L-arg 组水平。伤后 6 h BALF 中，L-NAME 组的 IL-8 含量较 L-arg 组的明显降低（$P<0.05$），见表 4。

表 4 家兔血浆和 BALF 中 IL-8 含量变化（ng/ml, $\bar{x}\pm s$）

Tab 4 Changes of IL-8 content in plasma and BALF of rabbits（ng/ml, $\bar{x}\pm s$）

Group	n	Before injury	Plasma			BALF
			1 h	3 h	6 h	
Injury	6	1.06±0.37	1.35±0.46	2.60±0.89 **	4.81±1.21 **	1.70±0.77
L-NAME	6	1.12±0.36	1.32±0.42	1.85±0.71 *△	2.98±1.28 **△	1.23±0.48 △
L-arg	6	1.07±0.38	1.97±0.87 *	2.88±1.26 **	4.85±1.24 **	2.23±0.99

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* before injury; △: $P<0.05$ *vs* L-arg

2.5 肺含水量和肺通透指数的变化

L-NAME 组的肺含水量和肺通透指数均比其他两组低，但只与 L-arg 的相差有统计学意义，见表 5。

表 5 肺含水量和肺通透指数变化（$\bar{x}\pm s$）

Tab 5 Changes of water content and filtration index of lung（$\bar{x}\pm s$）

Group	n	Water content (%)	Filtration index (×10^{-3})
Injury	6	85.4±2.5	53.5±21.2
L-NAME	6	83.3±1.4△	42.2±17.5△
L-arg	6	88.8±1.6	65.8±18.8

△: $P<0.05$ *vs* L-arg

2.6 病理组织学改变

致伤组光镜下可见弥漫性毛细血管扩张、充血和肺泡出血，出血区周围肺泡腔内积有大量的淡红色的水肿液，腔内白

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

细胞明显增多, 肺间质水肿, 肺泡隔呈不同程度增宽, 伴有大量白细胞浸润。小血管扩张充血, 腔内白细胞增多、聚集, 附壁现象明显。L-arg 组出血区周围肺泡腔和间质水肿更为突出, 白细胞浸润显著, 血管腔内白细胞聚集及附壁现象明显更加明显。与其他两组相比, L-NAME 组的肺泡及间质水肿、白细胞浸润、血管腔内白细胞聚集和附壁现象等明显减轻。

致伤组和 L-arg 组电镜下可见肺泡腔内红细胞、单核细胞、中性粒细胞、脱落的 II 型上皮细胞及水肿液和纤维蛋白渗出物; 部分 I 型上皮细胞肿胀, 出现大小不一的空泡, 严重者细胞呈空泡状; 多数 II 型上皮细胞板层体排空、减少, 少数表面微绒毛减少、变短或消失, 胞浆内线粒体肿胀、嵴减少, 并出现硝酸镧颗粒; 毛细血管有丰富的红细胞、中性粒细胞和血小板, 内皮细胞肿胀, 有大量空泡和硝酸镧颗粒, 胞浆不连续, 可见网孔样结构, 细胞间隙增宽, 有镧示踪剂通过。L-NAME 组无论是上述细胞成分的改变, 还是硝酸镧示踪剂通过内皮细胞的情况, 都较其他两组的为轻。

3　讨论

关于创伤后血浆 NO 含量变化以往结果很不一致。Jawb[2] 的实验结果显示 NO 的产生受抑制, 其原因可能涉及底物减少、肾廓清率增加、存有某种 NO 合酶抑制剂, 或内毒素等产生较少, 对细胞产生 NO 缺乏足够的刺激等; 而 Gebhard 等[3] 通过创伤早期取样, 发现伤后 30 min 血浆 NO 含量就已开始上升。本实验结果显示, 伤后 1 h 血浆 NO 含量的升高已经非常显著($P<0.01$), 3 h 仍维持在高水平, 6 h 方接近伤前水平, 且肺组织中的 NO 含量也显著升高。提示血浆升高的 NO 来自于损伤肺组织中的单核细胞[4] 和中性粒细胞[5]。本实验所见的单核细胞、中性粒细胞等为此提供了形态学证据, 而肺静脉 (出肺) 血比肺动脉 (入肺) 血 NO 含量更高[6] 对 NO 肺来源说也是有力的支持。

除 NO 外, 本实验也测定了血浆和肺组织内的 MDA 含量, 结果表明 MDA 的含量随 NO 含量的升高而升高。说明肺内产生的大量 NO 迅速与 O_2^- 结合形成 $ONOO^-$, 后者再分解成毒性更强的 $^{\cdot}OH$ 和 NO_2^-, 通过干扰三羧酸循环的电子传递和断裂 DNA 而对内皮细胞和上皮细胞产生杀伤作用, 从而使本实验在电镜下可以观察到内皮细胞和肺泡上皮细胞的肿胀和空泡样变性。

为进一步阐明胸部爆炸伤后病理机制, 本实验同时测定了血浆和 BALF 中 TNF-α 和 IL-8 的水平, 结果显示两者伤后的水平均升高, 只是前者的高峰出现在伤后 1 h, 6 h 则接近正常水平; 而后者于伤后 3 h 开始升高, 6 h 仍维持在高水平。这与所测 NO 的变化基本一致; 给予 L-arg 与 L-NAME 后, TNF-α 和 IL-8 也随着 NO 的升高而升高, 降低而降低, 说明 NO 除本身具有细胞毒性外, 对两者还具有正反馈作用[7]。虽然本实验结果未能澄清正反馈作用的机制, 但有资料认为 NO 对细胞转录产生了影响[8]。

从本实验所示几种细胞因子的反应时程上可以看出, NO 和 TNF-α 高峰期的到来较早, 而 IL-8 高峰期的出现迟后, 且在伤后 6 h 时仍有增高的趋势。虽然本实结果未能进一步显示 NO 和 TNF-α 反应顺序上的差异, 但结合 NO 对 TNF-α 的正反馈作用, 是否可以这样分析, NO 的升高通过转录机制增加了 TNF-α 的合成和释放, 而后者又增加炎性细胞和内皮细胞产生 IL-8。这种分析与 TNF-α 在细胞因子反应调节顺序中处于起始位置的观点相吻合。

本实验所见肺脏的病理组织改变归纳起来有以下几种, 一是肺组织出血和水肿, 伴单核细胞和中性粒细胞浸润; 二是血管内皮细胞变性, 间隙增宽, 镧通透性增强; 三是 I、II 肺泡上皮细胞变性, 伴板层体排空。给予 L-NAME 后, 组织水肿、细胞变性、通透性改变、炎细胞浸润等均明显减轻, 肺含水量和肺通透指数也明显降低。

显然, 爆炸时产生的冲击波和破片所携带的能量可导致肺脏出血和水肿[9], 是爆炸诸物理因素所造成的原发伤, 而内皮细胞和上皮细胞变性、细胞间隙增宽、通透性增强等应视为急性继发性肺损伤。自然, 继发性损伤中有原始物理因素所致, 但从本实验结果来看, 细胞因子在其中扮演了更重要的角色。综合本实验结果作者认为, 爆炸时的物理因素直接损伤了肺脏, 随即 NO 升高, NO 继而引起 TNF-α 和 IL-8 释放增加, 最终三者共同导致了肺脏的继发损伤, 给予 L-NAME 后减轻了继发性肺损伤的程度。这样也就不难理解为什么 IL-8 可以作为肺损伤的诊断指标[10], 而血浆 NO 水平又可判断病人的预后了[11]。因此, 早期给予 L-NAME 有助于胸部爆炸伤的救治。

参考文献:

[1] 刘　震, 李兵仓, 王大田, 等. 家兔胸部爆炸伤模型的建立及早期死亡原因分析[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(4): 328－330.

[2] Jawb T, Ochoa J, Udekwa A, *et al*. Nitric oxide production is inhibited in trauma patients[J]. J Trauma, 1993, 35(4): 590－596.

[3] Gebhard F, Andreas K, Margrit R, *et al*. Early posttraumatic increase in production of nitric oxide in humans[J]. Shock, 1998, 10(4): 237.

[4] Gebhard F, Kelbel M, Strecker W, *et al*. Chest trauma and its impact on the release of vasoactive mediators[J]. Shock, 1997, 7(5): 313－317.

[5] Dervort V, Liang Y, Madara J, *et al*. Nitric oxide regulates endotoxin-induced TNF-α production by human neutrophils[J]. J Immunol, 1994, 152(8): 4 102－4 109.

[6] 万　梅, 凌亦凌, 谷振勇. 内源性一氧化氮在内毒素引起的肺动脉高压和肺损伤中的作用[J]. 生理学报, 1999, 51(1): 80－86.

[7] Marcinkiewicz J, Grabowska A, Chain B. Nitric oxide up-regulates the release of inflammatory mediators by mouse macrophages[J]. Eur J Immunol, 1995, 25(4): 947－951.

[8] Remick D G, Villarete L. Regulation of cytokine gene expression by reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates[J]. J Leuko Biol, 1996, 59(4): 471－475.

[9] 李兵仓 刘鲁岳 陈志强, 等. 高能战斗部致绵羊胸部伤的实验研究[J]. 中华创伤杂志, 2000, 16(8): 495－498.

[10] Hamano K, Gohra H, Noda H, *et al*. Increased serum interleukin-8: correlation with poor prognosis in patients with postoperative multiple organ failure[J]. World J Surg, 1998, 22(10): 1 077－1 081.

[11] Rixen D, Sigel J, Espina N, *et al*. Plasma nitric oxide in posttrauma critical illness: A function of "sepsis" and the physiologic severity classification quantifying the probability of death[J]. Shock, 1997, 7(1): 17－28.

(编辑　薛国文)

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