DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.039

文章编号:1000-5404(2001)08-0957-03

论著

PDTC对创伤性肺损伤大鼠肺组织TNFα、IL-8含量及其mRNA表达的影响

廖克龙[1],朱佩芳[2],王正国[2],李 磊[2],尹志勇[2],蒋建新[2] (第三军医大学:[1]附属西南医院胸心外科,重庆 400038;[2]附属大坪医院野战外科研究所第四研究室,重庆 400042)

提 要:目的 观察PDTC对创伤后肺组织TNFα、IL-8含量及其mRNA表达的影响。**方法** 80只大鼠分为创伤组(T组)、PDTC预处理组(P组)及对照组(C组),利用多功能小型生物撞击机致伤,观测伤后各组0.5、1、2、4、8 h肺组织TNFα、IL-8及其mRNA变化。**结果** 致伤后TNFα、IL-8含量及其mRNA表达明显升高,TNFα在伤后1 h达到峰值,IL-8在伤后4 h达到峰值;PDTC组TNFα、IL-8含量及其mRNA表达显著低于创伤组($P<0.01$)。**结论** PDTC可以通过抑制TNFα、IL-8 mRNA表达,减少致炎细胞因子的释放,减轻创伤后全身及肺组织的炎症损害。

关键词:创伤;急性肺损伤;肿瘤坏死因子-α;白细胞介素-8;基因表达
中图法分类号:R392.3;R655.3;R979.9 **文献标识码**:A

Effect of pyrrolidine dithiocarbamate on TNFα, IL-8 content and their mRNA expression in traumatic acute lung injury in rats

LIAO Ke-long, ZHU Pei-fang, WANG Zheng-guo, LI Lei, YIN Zhi-yong, JIANG Jian-xin (Department of Cardiothoracic Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investgate the effect of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) on TNFα, IL-8 content and their mRNA expression in traumatic acute lung injury in rats. **Methods** A total of 80 Wistar rats were divided into traumatic group (T), PDTC pretreatment group (P) and control groups. The traumatic acute lung injury was obtained by multi-function minitype bio-impact machine with driving pressure of 350 kPa on the right superior lateral chest wall of rats. The contents of TNFα, IL-8 and the expression of TNFα, IL-8 mRNA were determined by ELISA or RT-PCR respectively. **Results** The TNFα, IL-8 content and the expression of TNFα, IL-8 mRNA in traumatic group were markedly increased, the peak of TNFα, IL-8 were at 1 h, 4 h after trauma respectively. The TNFα, IL-8 contents and the expression of TNFα, IL-8 mRNA were markedly lower in PDTC group($P<0.01$) than that in group T. **Conclusion** PDTC can alleviate the traumatic acute lung injury by inhibiting the expression of TNFα and IL-8 mRNA.

Key words: trauma; acute lung injury; tumor necrosis factor-α; Interleukin-8; gene expression

创伤性急性肺损伤是胸部闭合创伤后严重的并发症,其发病机制目前仍不十分清楚。研究发现:创伤后机体过度释放出致炎细胞因子与介质,这些致炎细胞因子与介质介导了机体局部与全身的炎症反应[1],在肺损伤的发生、发展中有重要意义。本研究采用创伤性急性肺损伤模型,观测抗氧化剂吡咯烷二硫代氨基甲酸盐(Pyrralidine dithiocarbamates, PDTC)对创伤后肺组织中TNFα、IL-8含量及其mRNA表达的影响,探讨PDTC对创伤性急性肺损伤的保护作用及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 动物模型分组

Wistar大鼠80只,体重240~260 g,雌雄不限(由本所动物室提供),分为撞击伤组(T组,30只)、PDTC预处理组(P组,30只)及正常对照组(C组,20只)3组。大鼠用1.5%戊巴比妥钠肌肉注射麻醉(30 mg/kg)。T组取左侧卧位45°,右前肢上抬、外展固定,取腋前线3、4肋间为撞击点,剪除撞击区毛发,用我室研制的多功能小型生物撞击机以350 kPa压力驱动撞击弹头进行致伤;P组先经尾静脉注射PDTC(Sigma公司)120 mg/kg,然后按T组方法进行致伤,C组大鼠剪除撞击区毛发,经尾静脉注射消毒生理盐水0.2 ml/kg。致伤使T组、P组大鼠早期各死亡10只,未预检测。

1.2 观测指标与检测方法

各组动物于致伤后0.5、1、2、4、8 h活杀。活杀前经腹主动脉抽血,作血气分析;取伤后8 h右肺组织用4%多聚甲醛固定,行光镜病理检查;各组大鼠剖胸取出右肺,分成两部分保存,①肺组织TNFα、IL-8检测:肺组织秤重、匀浆、离心,上清用Beckman 640型核酸蛋白分析仪在280 nm波长处,测蛋白含量,用ELISA方法进行TNFα、IL-8含量测定(试剂盒购自上海森雄公司,按说明书进行操作)。②肺组织TNFα、IL-8 mRNA检测:用Tripure试剂盒(购自保丽曼公司)一步法提取肺组织总mRNA。采用RT-PCR技术对TNFα、IL-8 mRNA进行扩增,引物由上海基康公司合成。以β-actin为内参照,35个循环后进行琼脂糖电泳,紫外扫描后进行图像分析,结果以各组的校正光密度与

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(G1999054203);高等院校全国优秀博士论文作者专项基金(199948)
作者简介:廖克龙(1964-),男,广西省岑溪县人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事胸部创伤方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68754183
收稿日期:2001-01-15;修回日期:2001-06-07

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

其β-actin校正光密度的比值表示。

1.3 统计学处理

数据以 $x \pm s$ 表示，均数间比较用 t 检验。

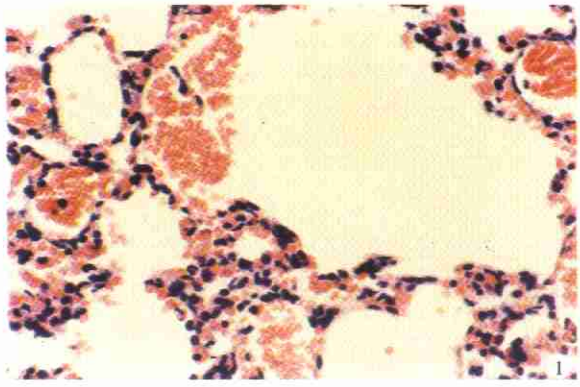
2 结果

2.1 各组光镜下病理改变

T组右上肺伤后8 h在肺泡腔及肺间质内见大量红细胞，肺间质内大量炎细胞浸润，肺泡隔增厚；P组右上肺伤后8 h见肺泡腔及肺间质内红细胞、肺间质内少量炎细胞浸润，肺泡隔轻度增厚，见图1、2。

2.2 各组动脉氧分压变化

P组、T组在致伤后动脉氧分压在观察时间内呈进行性降低，二组与对照组相差非常显著；撞击伤组在伤后4、8 h的动脉氧分压显著低于PDTC预处理组，见表1。



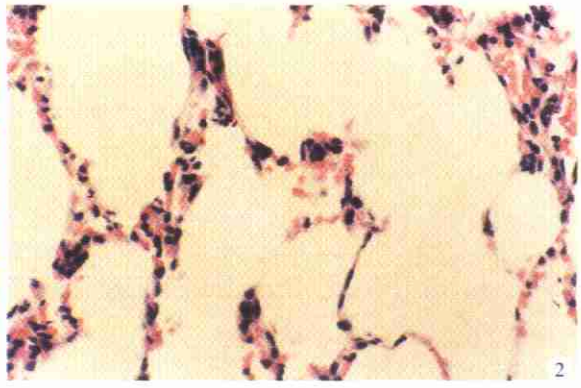


图1 右侧肺组织伤后8 h肺出血及炎细胞浸润、水肿 (HE×400)

Fig 1 Hemorrhage, inflammatory cell infiltration and edema of right lung tissue 8 h after injury (HE×400)

图2 PDTC预处理伤后8 h右侧肺组织轻度炎细胞浸润、水肿 (HE×400)

Fig 2 Decrease of inflammatory cell infiltration and edema in the right lung tissue 8 h after injury in PDTC pretreatment group (HE×400)

表1 各组伤后不同时间动脉氧分压变化(p/mmHg)

Tab 1 Changes of PaO_2 at different time (p/mmHg)

Group	Time				
	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
C(n=4)	104±7.3	98.5±6.4	101±6.8	102±7.1	98±7.5
T(n=4)	84.7±6.3*	80.2±5.2*	75.3±6.7*	63.4±5.9*△	62.5±4.2*△
P(n=4)	86.7±5.6*	85.8±5.7*	80.2±5.9*	73.6±4.2*	72.4±5.6*

*: $P<0.01$ *vs* group C; △: $P<0.01$ *vs* group P

2.3 各组右肺组织中TNFα含量变化

T组在致伤后0.5 h TNFα含量开始明显升高，1 h达到峰值，随后下降；0.5、1、2、4 h显著高于C组。P组变化趋势与T组相同，在1、2 h显著低于T组，见表2。

表2 各组右上肺组织内TNFα含量变化(ρ_B/pg·ml^{-1})

Tab 2 Changes of TNFα content in the right lung tissue (ρ_B/pg·ml^{-1})

Group	Time				
	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
C(n=4)	1.80±0.08	1.90±0.13	1.78±0.08	1.93±0.09	1.87±0.09
T(n=4)	2.50±0.09**	8.71±0.19**△	7.25±0.18**△	2.59±0.10*	2.23±0.11
P(n=4)	2.40±0.15*	5.57±0.14**	5.15±0.16**	2.41±0.12*	2.05±0.12

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* group C; △: $P<0.01$ *vs* group P

2.4 各组右肺组织中IL-8含量变化

T组在致伤后2 h IL-8含量开始明显升高，4 h达到峰值，随后下降；2、4、8 h显著高于C组。P组变化趋势与T组相同，在4、8 h显著低于T组，见表3。

2.5 各组右肺组织TNFα和IL-8 mRNA表达

对照组右肺组织各时间点TNFα和IL-8 mRNA表达量较低。TNFα mRNA在致伤后0.5、1、2 h有较强的表达，且P组显著低于T组，见表4，图3。IL-8 mRNA在致伤后2、4、8 h有较强的表达，且P组显著低于T组，见表5，图4。

表3 各组右上肺组织内IL-8含量变化(ρ_B/pg·ml^{-1})

Tab 3 Changes of IL-8 content in the right lung tissue (ρ_B/pg·ml^{-1})

Group	Time				
	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
C(n=4)	0.18±0.09	0.20±0.11	0.20±0.10	0.19±0.11	0.22±0.12
T(n=4)	0.22±0.10	0.37±0.18	0.67±0.22*	1.59±0.24**△	1.03±0.21**△
P(n=4)	0.20±0.09	0.36±0.12	0.48±0.11	0.77±0.09*	0.60±0.13*

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* group C; △: $P<0.01$ *vs* group P

表4 两组右上肺组织内TNFα mRNA表达变化

Tab 4 Changes of expression of TNFα mRNA in the right lung tissue

Group	Time				
	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
C(n=4)	0.28±0.04	0.29±0.03	0.27±0.04	0.31±0.05	0.30±0.03
T(n=4)	1.01±0.24△	1.67±0.31△	0.77±0.17△	0.46±0.15	0.37±0.16
P(n=4)	0.54±0.16	0.85±0.20	0.45±0.14	0.31±0.13	0.32±0.13

△: $P<0.01$ *vs* group P

表5 两组右上肺组织内IL-8 mRNA表达变化

Tab 5 Changes of expression of IL-8 mRNA in the right lung tissue

Group	Time				
	0.5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
C(n=4)	0.20±0.07	0.21±0.08	0.21±0.09	0.20±0.08	0.19±0.09
T(n=4)	0.22±0.10	0.37±0.18	0.67±0.22△	1.59±0.28△	1.24±0.27△
P(n=4)	0.20±0.09	0.36±0.12	0.37±0.11	0.83±0.14	0.56±0.13

△: $P<0.01$ *vs* group P

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

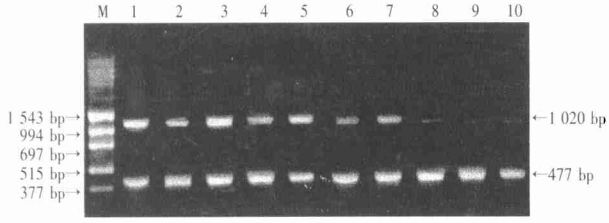


图 3　两组肺组织 TNFα mRNA 表达结果

Fig 3　Results of expression of TNFα mRNA in lung tissues of in the two groups

M: Marker; 1,3,5,7,9: Expression of TNFα mRNA in the right lung itssue 0.5,1,2,4,8 h after trauma; 2,4,6,8,10: Expression of TNFα mRNA in the right lung tissues 0.5,1,2,4,8 h after trauma with PDTC pretreatment

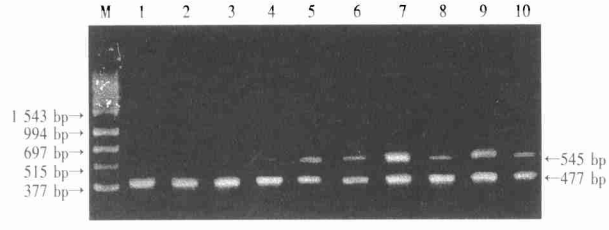


图 4　两组肺组织 IL-8 mRNA 表达结果

Fig 4　Results of expression of IL-8 mRNA in lung tissues of in the two groups

M: Marker; 1,3,5,7,9: Expression of IL-8 in the right lung itssue 0.5,1,2,4,8 h after trauma; 2,4,6,8,10: Expression of IL-8 in the right lung tissues 0.5,1,2,4,8 h after trauma with PDTC pretreatment

3　讨论

创伤性急性肺损伤(Acute lung injury, ALI)是创伤尤其是闭合性胸部创伤后常见的继发损伤，常发展为急性呼吸窘迫综合征(Acute respiratory distress syndrome, ARDS)，并可导致 MODS、MOF 发生[2,3]。ALI 的发病机制目前仍不清楚，研究认为，创伤后炎症介质的失控性表达与释放在 ALI 的始动与发展中起关键作用[1,4,5]。目前发现的炎症介质种类众多，其中细胞因子 TNFα、IL-8 是重要的致炎介质，在创伤后的炎症反应和 MODS 中发挥重要的作用[6]。

本研究发现，创伤后肺组织中 TNFα、IL-8 的蛋白含量与其 mRNA 表达的变化趋势相似，提示两种因子的 mRNA 表达与蛋白合成呈同步进行。创伤后 TNFα、IL-8mRNA 表达明显上调，提示内源性细胞因子作为致炎介质在创伤性 ALI 发病过程中发挥作用。TNFα 在伤后 0.5 h 即有明显的升高，1 h 达到峰值，而 IL-8 在伤后 2 h 开始明显升高，4 h 达到峰值，至伤后 8 h 仍显著高于正常，提示 TNFα 与 IL-8 在其致伤过程中的作用有所不同，TNFα 升高出现的早，可能是创伤后急性肺损伤及全身炎症反应的始动因素；而 IL-8 升高较 TNFα 晚、持续时间长，可能与急性肺损伤及全身炎症反应的进一步发展有关[7]。

PDTC 是一种抗氧化剂，近年来体外实验发现，PDTC 能够通过选择性的抑制核因子-κB 的活化，使致炎细胞因子基因的表达受到抑制，从而减少致炎细胞因子的释放[8]。Pilar 等[9]对 LPS 诱导的小鼠脓毒性休克模型的研究发现，PDTC 是通过抑制 IκB 的降解，减少核因子-κB 核转位，抑制核因子-κB 的活化，使致炎细胞因子 TNFα、IL-1、IL-6 基因的表达减少，使炎症反应减轻，降低了小鼠的死亡率，其保护作用与 PDTC 的剂量呈正相关。本研究发现，PDTC 预处理使撞伤后大鼠的伤后 4、8 h 的低氧血症显著缓解，使右肺组织的炎细胞浸润和肺间质水肿减轻，同时 PDTC 预处理的大鼠其肺组织 TNFα、IL-8 含量明显减少，mRNA 表达受到明显抑制，提示 PDTC 不仅能够通过抑制自由基的作用减轻严重创伤对机体的炎症损害，而且能够通过抑制机体致炎细胞因子的产生起到保护作用。以上研究表明，PDTC 对大鼠创伤性急性肺损伤具有保护作用，通过对其进一步的研究，有助于加深对其保护机制的认识，为临床应用奠定理论基础。

参考文献：

[1] Khalid M A, John A K, Gary R M, *et al*. Unintended immunomodulation: part Ⅰ. effects of commen clinical conditions on cytokine biosynthesis[J]. Shock, 2000, 13(5): 333 - 345.

[2] 石应康. 急性肺损伤的研究进展[J]. 中华创伤杂志, 2000, 16(11): 645 - 647.

[3] 蒋耀光. 肺挫伤[J]. 中华胸心血管外科临床杂志, 1998, 5(3): 8 - 9.

[4] Hasleton F, Roberts T E. Acute respiratory distress syndrome-an update [J]. Histopathology, 1999, 34(4): 285 - 294.

[5] Khalid M A, John A K, Gary R M, *et al*. Unintended immunomodulation part II: effects of pharmacological agents on cytokine activity[J]. Shock, 2000, 13(5): 346 - 360.

[6] Zallen G, Moore E E, Johnson J L, *et al*. Postinjury suppression of human neutrophil cytokine production results from the stabilization of inhibitory κB [J]. Shock, 1999, 11(2): 77 - 81.

[7] Sames B D, Zallen G S, Mclntyre R C, *et al*. Cytokines as mediators of diseases related to surgical condition[J]. Shock, 2000, 14(1): 1 - 7.

[8] Liu S F, Ye X B, Malik A B. Inhibition of NF-κB activation by pyrrolidine dithiocarbamate prevents *in vivo* expression of proinflammatory genes[J]. Circulation, 1999, 21(7): 1 330 - 1 337.

[9] Pilar L, Sara M M, Pablo G D, *et al*. Pyrrolidine dithiocarbamate protects mice from lethal shock induced by LPS or TNFα[J]. Eur J Immunol, 1999, 29(6): 1 890 - 1 900.

(编辑　王　红)

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