DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.10.028
第23卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 10
1194 2001年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)10-1194-03

不同因素致急性肺损伤大鼠 TNF-α、IL-6 的释放水平及地塞米松的影响

洪 新[1],郭振辉[2],毛宝龄[3],钱桂生[3] (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所呼吸内科,重庆 400042;[2] 广州军区总医院呼吸内科,广州 510010;[3] 第三军医大学附属新桥医院全军呼吸内科研究所,重庆 400037)

提 要:目的 探讨 TNF-α 和 IL-6 在急性肺损伤中(ALI)的作用和地塞米松的治疗意义;方法 本实验通过静脉注射内毒素(LPS)和盲肠结扎穿孔(CLP)复制大鼠 ALI 模型,观察在这两种 ALI 模型早期,动脉血氧分压(PaO_2)和肺湿干重比率(W/D)、血浆促炎症细胞因子 TNF-α、IL-6 的变化,以及地塞米松干预的影响。结果 ①在 LPS 刺激 12 h 和 CLP 24 h 大鼠 PaO_2 均显著降低,W/D 显著增加,在同一时相 LPS 组损伤较 CLP 组重;地塞米松能减轻两组 ALI 模型大鼠 PaO_2 的降低和 W/D 的增加。②两种模型大鼠血浆中 TNF-α 的含量先迅速增加,后逐渐降低,IL-6 的浓度逐渐增加;LPS 组 TNF-α 的峰值浓度出现较 CLP 组早,IL-6 的浓度高于 CLP 组;地塞米松能显著降低两组模型中 TNF-α 的峰值浓度和 IL-6 浓度的增加。结论 血浆 TNF-α 峰值浓度出现的早晚和 IL-6 浓度的水平可能反映损伤的严重程度。糖皮质激素对 LPS 刺激和 CLP 大鼠 ALI 有保护作用,可能在 ALI 早期有治疗应用价值。

关键词:急性肺损伤;脂多糖;肿瘤坏死因子;白细胞介素-6;大鼠
中图法分类号:R392.11;R563.02;R977.1 文献标识码:A

The release level of TNF-α and IL-6 and the effect of dexamethasone in the acute lung injury rats of which induced by different injuries

HONG Xin, GUO Zhen-hui, MAO Bao-ling, QIAN Gui-sheng (Department of Respiratory Diseases, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the effects of tumor necrosis factor-α (TNF-α) and interleukin-6 (IL-6) on acute lung injury (ALI) and the therapeutic value of dexamethasone. Methods Two acute lung injury models were replicated by intravenous injection of lipopolysaccharide (LPS) and by cecum ligation and puncture (CLP) in rats. The changes of arterial blood pressure (PaO_2), wet (W) and dry (D) ratio (W/D) of lung weight, plasma levels of TNF-α and IL-6 and the effects of dexamethasone on the changes were observed. Results In the groups of treated with LPS for 12 h and CLP for 24 h, PaO_2 was significantly decreased and W/D ratio was markedly increased. The lung injury were more serious in LPS treated groups than CLP groups in the same stage. Dexamethasone could abate the decrease of PaO_2 and increase of W/D ratio. In the two models, TNF-α levels in plasma were increased at first and then decreased, but IL-6 levels were increased gradually. In LPS treated groups, the peak levels of TNF-α were appeared earlier and IL-6 levels were higher than in CLP groups. Dexamethasone could decrease the TNF-α peak levels and IL-6 levels significantly. Conclusion The time of peak level of TNF-α and IL-6 level may reflex the severity of the acute lung injury. Glucocorticoids have an effect for protecting acute lung injury and may be used to treat ALI in early stage.

Key words: acute lung injury; lipopolysaccharide; tumor necrosis factor; interleukin-6; rat

全身炎症反应综合症(SIRS)的发生与大量炎症介质如 TNF-α、IL-1β、IL-6、IL-8、IL-12 等促炎细胞因子和其它的炎症介质如 PLA_2、PAF、MIP、MCP、粘附分子等的失控性释放有关[1~3]。肿瘤坏死因子-α(TNF-α)可能在 SIRS 的发生中发挥着极为重要的作用[1],而 IL-6 的表达与脓毒症病情的变化有一定相关。肺是这 SIRS 病程中最易受损害的首位靶器官。此过程中肺脏的损害被称为急性肺损伤(ALI)。在实验研究中常采用内毒素(LPS)直接注射的方法模拟脓毒症样改变[4]。本实验部分即采用静脉注射 LPS,以及盲肠结扎穿孔(Cecum ligated puncture, CLP)的方法分别制作动物模型,观察这两种模型中的肺损伤改变和 TNF-α 和 IL-6 这两种有一定代表性的细胞因子变化规律,并观察地塞米松对 ALI 和对细胞因子释放的影响,探讨细胞因子的变化规律与 ALI 的关系及糖皮质激素的抗炎机制。

作者简介:洪 新(1965—),男,云南省丽江县人,博士,副教授,主要从事急性肺损伤和哮喘发病机制方面的研究,发表论文 12 篇。电话:(023)68757245

收稿日期:2001-06-28;修回日期:2001-09-29

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康 Wistar 大鼠,体重 180~250 g,由本校实验动物中心提供。大肠杆菌(O_{111}:B_4)内毒素,购自 Sigma 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 内毒素血症大鼠模型的制备 ①实验分组:74 只大鼠随机分为:内毒素 1、2、4、6、12 h 组;地塞米松干预 1、2、4、6、12 h 组及生理盐水对照组。每组 6~8 只。②模型制作:大鼠经 10%乌拉坦 1 g/kg 腹腔注射麻醉后,颈静脉插管并注入 LPS 5 mg/kg。地塞米松干组在注射 LPS 5 mg/kg 后,立即腹腔注射地塞米松 2 mg/kg,其余处理完全同 LPS 处理动物。③标本采集:所有动物均于设定的时相点,颈动脉插管放血活杀(对照组于 6 h 时活杀)。所采集血液部分在密闭状态下用于测血气分析,其余立即离心(800× g 10 min),血浆-70 ℃保存备用;取每组动物左全肺测肺/干湿重比(W/D)。

1.2.2 CLP 脓毒症大鼠模型的制备 ①实验分组:67 只大鼠随机分为:CLP1、3、6、12、24 h 组;地塞米松干预 1、3、6、12、24 h 组及假手术对照组。每组 5~6 只。②模型制备:参照 Villar[5] 的方法。假手术组除不结扎、不刺破盲肠外,其余处理同脓毒

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

症组。③标本采集: 各组存活的动物于设定的时相点, 颈动脉插管放血活杀(对照组于 6 h 时活杀)。标本的采集和处理同 LPS 组。

1.3　血气分析

所采集血液部分在密闭状态下立即送血气分析室测血气分析。

1.4　肺 W/D 比值测定

采用真空加热干燥法。

1.5　病理观察

HE 染色, 光镜下观察。

1.6　酶联免疫法检测 TNF-α 和 IL-6

按照试剂盒操作说明书进行。

1.7　统计学处理方法

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验。

2　结果

2.1　病理观察

2.1.1　大体观察　　正常对照组肺组织颜色均匀, 呈白色略显粉红, 组织柔软弹性好。注射 LPS 组 1 h 肺脏即可观察到有肿胀及表面散在淤斑出现, 组织弹性降低。2 h 后即较明显, 以后各组除肺肿胀外还可见弥漫和大片的淤斑和出血。地塞米松干预组肺组织损伤较同时相点 LPS 损伤组明显减轻。CLP 3 h 组后可观察到肺脏肿胀及表面散在淤斑出现, 12 h 后可见肺明显的肿胀、淤斑和出血。地塞米松干预组肺组织损伤较同时相点 CLP 组明显减轻。

2.1.2　光镜观察　　与大体观察的结果基本相一致, 正常对照组肺组织结构清楚, 肺泡内无白细胞浸润和红细胞。注射 LPS 1 h 组肺间质即见渗液和少量红细胞, 肺泡腔可见少量红细胞。2 h 以后各组可见间质水肿和间质肺泡出血; 地塞米松干预组各时相点较 LPS 损伤组减轻。CLP 组 1 h 组未见明显改变, 3 h 组可观察到部分肺间质水肿和轻微肺泡间质出血。6 h 组可见肺间质水肿和间质肺泡出血较 3 h 组明显。12 h 和 24 h 组可见间质明显渗出水肿和间质肺泡出血; 地塞米松干预组各时相点的损伤较 LPS 组有不同程度的减轻。

2.2　动脉血氧分压和肺 W/D 变化

内毒素组注射 LPS 1、2 h 后 PaO_2 无显著变化, 4 h 以后 PaO_2 较对照组显著下降($P<0.01$), 肺 W/D 也显著高于对照组。而地塞米松干预组 PaO_2 及 W/D 6 h 后才显著增加, 见表 1。

表 1　LPS 注射组 PaO_2 及 W/D 的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of PaO_2 and W/D in LPS treated groups($\bar{x}\pm s$)

Group	n	PaO_2(kPa)	W/D
Control	8	12.23±1.48	4.46±0.37
LPS			
1 h	6	12.25±1.30	4.56±0.31
2 h	6	11.77±0.78	4.76±0.26
4 h	6	10.78±1.06**	4.95±0.34**
6 h	7	9.02±0.97**	5.44±0.54**
12 h	6	8.12±1.14**	5.88±0.43**
LPS+Dexamethasone			
1 h	6	12.31±0.85	4.41±0.32
2 h	6	12.07±0.92	4.61±0.21
4 h	5	11.36±1.11	4.77±0.39
6 h	6	10.25±1.19**	4.99±0.37**
12 h	6	9.56±1.03**△	5.17±0.41**△

**: $P<0.01$ *vs* control; △: $P<0.05$ *vs* LPS group

CLP 组致伤组 6 h 以前 PaO_2 与对照组无显著差别, 但致伤 12 h 以后 PaO_2 较对照组显著降低($P<0.01$), 肺组织 W/D 也显著高于对照组。地塞米松干预组 PaO_2 及肺组织 W/D 的变化规律与 CLP 组相近, 但 PaO_2 的下降程度及肺组织 W/D 较同时相 CLP 组有不同程度降低, 见表 2。

表 2　盲肠结扎穿孔组 PaO_2 及 W/D 变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of PaO_2 and W/D in cecum ligation and puncture groups($\bar{x}\pm s$)

Group	n	PaO_2(kPa)	W/D
Sham operated group	6	11.20±0.87	4.45±0.47
CLP			
1 h	6	11.25±0.94	4.46±0.38
3 h	6	11.14±1.03	4.56±0.15
6 h	5	11.02±0.95	4.67±0.36
12 h	6	9.12±1.07**	4.93±0.39**
24 h	6	8.23±1.07**	5.32±0.44**
CLP+Dexamethasone			
1 h	6	11.30±0.86	4.41±0.38
3 h	6	11.23±1.54	4.49±0.33
6 h	6	11.12±0.85	4.61±0.22
12 h	6	9.81±1.00**	4.83±0.25**
24 h	5	9.55±1.02**	5.06±0.31**

**: $P<0.01$ *vs* sham operated group

2.3　LPS 和 CLP 大鼠血浆 TNF-α 和 IL-6 的变化

内毒素干预组 TNF-α 水平在 LPS 注射后 1 h 即达高峰, 以后逐步下降; 地塞米松干预组 TNF-α 的峰值浓度被显著降低。内毒素干预后 IL-6 的水平则表现为随病程的发展而逐步升高, 在 LPS 注射后 4 h 显著高于正常对照; 地塞米松干预组 IL-6 的释放明显降低, 见表 3。

CLP 组 TNF-α 水平在致伤后 6 h 达高峰, 12 h 仍显著高于正常对照组, 但 24 h 组又降到接近正常水平; 地塞米松干预同样显著抑制 TNF-α 的峰值浓度。CLP 组 IL-6 水平也随时间逐渐增高, 在 6 h 才显著高于正常对照组; 地塞米松干预使 IL-6 产生显著降低, 见表 4。

表 3　LPS 致伤组 TNF-α 和 IL-6 水平变化和地塞米松的影响(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Changes of TNF-α and IL-6 levels in LPS treated groups and the effects of dexamethasone(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	TNF-α	IL-6
Control	5	36.0±22.4	521.3±167.4
LPS			
1 h	5	659.1±163.1**	680.4±205.1
2 h	5	444.0±121.9**	842.9±184.7
4 h	5	369.3±89.5**	1 030.2±218.7**
6 h	5	265.6±83.4**	1 281.8±177.3**
12 h	5	131.9±47.7**	1 620.0±256.7**
LPS+Dexamethasone			
1 h	5	431.4±124.5**▲	622.1±142.8
2 h	5	312.1±102.6**▲	751.5±166.5
4 h	5	219.7±70.1**▲	814.1±138.2
6 h	5	176.6±61.7**	989.1±181.3**▲
12 h	5	112.5±44.2**	1159.4±229.0**▲

**: $P<0.01$ *vs* control; ▲: $P<0.01$ *vs* LPS group

表 4　盲肠结扎穿孔组 TNF-α、IL-6 水平变化和地塞米松的影响(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Change of TNF-α and IL-6 leves in esch groups of acute lung injury rats induced by cecum ligated puncture and the effects of dexamethasone (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	TNF-α	IL-6
Sham operated group	5	74.3±28.4	616.2±196.8
CLP			
1 h	5	113.1±55.2	669.9±258.2
3 h	5	297.0±93.9**	786.8±150.9
6 h	5	534.1±166.7**	977.8±205.5*
12 h	5	363.7±121.1**	1 366.4±323.8**
24 h	5	143.6±38.3	1 468.7±171.4**
CLP+Dexamethasone			
1 h	5	93.4±51.3	642.8±187.8
3 h	5	141.7±64.8	686.8±156.9
6 h	5	317.4±134.8**▲	867.5±211.3
12 h	5	189.5±81.6**	967.5±203.7**▲
24 h	5	121.1±55.4	1 167.6±182.2**▲

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* sham operated group; ▲: $P<0.01$ *vs* CLP group

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

3 讨论

本实验采用 LPS 直接注射和盲肠结扎穿孔复制 ALI 模型，结果表明，CLP 组动物 3～6 h 开始部分出现 ALI 表现，动脉氧分压有下降趋势，病理观察肺间质有部分炎细胞、红细胞渗出，约 12 h 出现较为典型的 ALI 表现。而注射 LPS 组在 1 h 后即开始出现 ALI 表现，3 h出现较为典型的 ALI 表现。本研究结果发现用静脉注射 LPS 5 mg/kg 可复制出典型的全身炎症反应失控后的ALI，但 ALI 表现较 CLP 组出现得早，表现更严重。这可能与 CLP 组从局部感染向全身扩散有一转变过程有关。本实验的结果同时发现，虽然 CLP 动物在严重创伤和感染后约 12 h 才出现较典型的 ALI 表现，然而在其早期（约 3～6 h 内），血气改变虽不典型却已有部分 ALI 的病理改变，提示我们在临床上 ALI 的防治宜在损伤早期着手。

TNF-α 主要由激活的单核/巨噬细胞、肝 Kuffer 细胞、淋巴细胞等分泌。它能诱导其它细胞因子如IL-1、IL-6、IL-8 等的产生，刺激花生四烯酸的代谢和脂类介质的产生，促进微血栓形成等[6]。IL-6 是一种多功能的细胞因子，能激活 T、B 淋巴细胞的免疫反应而调节免疫反应[7]，刺激造血干细胞的生长和增加急性相蛋白的合成。也有一些学者认为 IL-6 是 TNF-α 和 IL-1β 的反调控/抗炎因子，具有抑制炎症反应的作用。

本实验对两种致伤模型中 TNF-α 和 IL-6 的变化规律进行了研究，结果发现炎症中它们的表达时相各有特点，表达的高峰及持续时间也各有不同。TNF-α 水平在内毒素干预 1 h 达高峰，在 2～6 h 逐渐降低，12 h 降至接近对照水平；CLP 组TNF-α 水平在致伤后 6 h 才达高峰，12 h 下降，24 h 后接近对照水平。这两种模型的 TNF-α 峰值出现的规律，结合血气和病理改变，提示TNF-α 峰值出现越早，则损伤程度可能越重，预后可能越差。

国外对严重感染和创伤患者 IL-6 的检测比较普遍，倾向于血清中 IL-6 的浓度可作为判断预后的指标[8,9]。本实验两种致伤模型中 IL-6 的水平都表现为随时间的延长逐渐增高，但内毒素刺激组 IL-6 水平4 h 即显著超过对照水平（$P<0.01$），而 CLP 大鼠 6 h 后 IL-6 水平也才显著超过对照水平（$P<0.05$）。同在损伤 12 h 时相比较，LPS 组 IL-6 的水平显著高于 CLP 组。这些结果表明血中 IL-6 水平确与病情严重程度有关，在临床医疗中值得关注和应用。

糖皮质激素在体内炎症调节机制中有重要作用。本实验的结果表明，地塞米松作为外源性糖皮质激素，能一定程度上缓解 LPS 及脓毒症所造成的 ALI，对 TNF-α 和 IL-6 的产生有显著的抑制作用。但对于糖皮质激素在脓毒症中的使用，临床上一直存在不同看法，主要是考虑到糖皮质激素的作用广泛，有可能造成免疫抑制及二重感染等严重副作用。从本研究的结果来看，我们认为糖皮质激素在脓毒症治疗中，特别是早期适时应用可能有积极的治疗意义。

参考文献：

[1] Members of the American college of chest physician/society of critical care medicine consensus conferrence committee. Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis[J]. Crit Care Med, 1992, 20(6): 864—874.

[2] Blanckwell T S, Christman J W. Sepsis and cytokine: current status[J]. Br J Anaesth, 1996, 77(1): 110—117.

[3] 毛宝龄. 深入探讨全身炎症反应的失控与调控[J]. 中华内科杂志, 1997, 36(1): 3—4.

[4] Marsh C B, Wewer M D. The pathogenesis of sepsis: factors that modulate the response to gram-negative bacterial infection[J]. Clin Chest Med, 1996, 17(2): 183—197.

[5] Villar J, Ribeiro S P, Mullen J B M, *et al*. Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model[J]. Crit Care Med, 1994, 22(6): 914—921.

[6] Marsh C B, Wewers M D. The pathogenesis of sepsis: factors that modulate the response to gram-negative bacterial infection[J]. Clin Chest Med, 1996, 17(2): 183—197.

[7] Kopf M, Baumann H, Freer G, *et al*. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin 6-deficient mice[J]. Nature, 1994, 368(6 469): 339—342.

[8] Guirao X, Lowry S F. Biologic control of injury and inflammation: much more than too little or too late[J]. World J Surg, 1996, 20(4): 437—446.

[9] Barriere S L, Lowry S F. An overview of mortality risk prediction in sepsis [J]. Crit Care Med, 1995, 23(2): 376—393.

（编辑 薛国文）

（上接 1190 页）

难与胃息肉、平滑肌瘤鉴别，其确诊有赖于胃镜下病理活检。异位胰腺在胃镜下的表现主要为：病变大多数在胃窦部，见粘膜呈半球形、乳头状隆起，界限清楚，周围粘膜光滑，隆起表面粘膜正常，中央有脐样凹陷及开口，内镜下插入导管可作冲洗液淀粉酶检查或注入造影剂作造影检查。本组病例 8 例行胃镜检查，仅 2 例确诊为异位胰腺，5 例误诊为慢性胃炎、十二指肠肠炎，另 1 例诊断为胃窦印戒细胞癌而手术中发现同时合并近端空肠的异位胰腺。考虑原因主要为局部病变组织粘膜炎症水肿，易导致取材深度不够。由于异位胰腺临床表现复杂，缺乏特异性，因此应加强对该疾病的认识和重视。对于怀疑可能为异位胰腺的粘膜下肿块行高频电凝切除可提高异位胰腺的确诊率，必要时通过剖腹探查手术明确诊断。

对于异位胰腺的治疗目前认为内科治疗效果差，且由于受胃酸及自身酶的刺激易发生溃疡、出血，甚至恶变，故一经明确诊断即应手术治疗[3]。手术方式及范围应根据异位胰腺的位置和病理类型而定。对于可疑恶变者应扩大手术范围。对于病灶直径小、深度浅无明显并发症的患者可行高频电凝切除治疗，由于创伤小、并发症少且对预后无明显影响，不失为一种安全有效的治疗方法。

关键词：异位胰腺；诊断
中图法分类号：R657.53 文献标识码：B

参考文献：

[1] Jeng K S. Malignant degeneration of heterotopic pancreas[J]. Gastrointest Endosc, 1991, 37(2): 196—198.

[2] 王言飞，王合富，郭执乾. 食管、胃异位胰腺 10 例诊断与治疗[J]. 临床荟萃, 1999, 14(16): 736—737.

[3] 杨慈元，蒋传成. 迷走胰腺(附 7 例报告)[J]. 临床医学, 1997, 17(7): 10.

（编辑 汪勤俭）

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