DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.02.038
第23卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 2
2001年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2001

文章编号:1000-5404(2001)02-0201-03

论著

地塞米松对家兔内毒素休克的防治作用及其与TNF的关系

刘 韧,刘 萍,田昆仑,刁有芳 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第二研究室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨预防性或治疗性给予地塞米松对家兔内毒素休克的防治作用及其与肿瘤坏死因子(TNF)的关系。方法 53只健康家兔分为对照组(n=13),内毒素休克组(n=16),地塞米松预防组(n=12)及治疗组(n=12)。地塞米松预防组和治疗组动物于脂多糖(LPS)输注前30 min或输注后20 min给予地塞米松5 mg/kg体重,观察MABP、动物死亡率、循环血中TNF水平及其它指标的变化。结果 与内毒素休克组相比,地塞米松预防和治疗组动物平均动脉压(MABP)有明显上升($P<0.05$, $P<0.01$),死亡率下降($P<0.05$, $P<0.01$),循环血中TNF水平的升高受到明显的抑制($P<0.01$)。同时,地塞米松预防和治疗能使内毒素休克动物血浆胰高血糖素、葡萄糖、乳酸和β-葡萄糖醛酸酶(β-G)的升高得到明显改善($P<0.05$, $P<0.01$)。体外实验亦表明地塞米松预防能完全抑制肝Kupffer细胞释放TNF。结论 地塞米松对内毒素休克的防治效果与其直接抑制LPS诱导TNF的产生有密切关系。

关键词:休克;内毒素;肿瘤坏死因子;地塞米松;Kupffer细胞
中图法分类号:R631.4;R977.11 文献标识码:A

Therapeutic and preventive effect of dexamethasone on endotoxin shock in rabbits and its relationship with TNF

LIU Ren, LIU Ping, TIAN Kun-lun, DIAO You-fang (Research Institute of Field Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstracts: Objective To explore the effect of dexamethasone (Dex) given with the intention of prevention or treatment on endotoxin shock in rabbits and its relationship with tumor necrosis factor (TNF). Methods Fifty-three health rabbits were divided into 4 groups, including normal control (n=13), endoxin shock group (n=16), preventive Dex group (n=12) and therapeutic Dex group (n=12). Except normal control was given with saline, the other 3 groups were administered with lipopolysaccharide (LPS) infusion, and the preventive Dex group was treated with Dex (5 mg/kg body weight) 30 min before LPS infusion and the therapeutic Dex group 20 min after LPS infusion. Mean arterial blood pressure (MABP), survival rate, TNF level in circulatory blood and other parameters were detected. Results In preventive and therapeutic Dex groups, MABP was increased and survival rate was reduced compared with the animals from endoxin shock group ($P<0.05$, $P<0.01$), and TNF activity in the circulating blood was significantly suppressed ($P<0.01$). In addition, dexamethasone administration could alleviate the elevation of plasma glucagon, glucose, lactic acid, and β-glucironidase ($P<0.05$, $P<0.01$) in shocked animals. It was also found that administration of dexamethasone *in vitro* prevented the release of TNF by Kupffer cells. Conclusion These results indicate that the preventive and therapeutic effect of dexamethasone on endotoxin shock, which may relate to its direct inhibition of the release of TNF induced by LPS.

Key words: shock; endotoxic; tumor necrosis factor; dexamethasone; Kupffer cells

肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor, TNF)在内毒素/感染性休克发病过程中的作用正在得到愈来愈多的研究证实[1,2],因此,抗TNF的一些防治措施无疑将成为内毒素/感染性休克防治的一条重要途径。糖皮质激素在临床上较早就用于败血症/感染性休克的防治,但对其抗休克的效果一直褒贬不一,其抗休克的机制也莫衷一是。本实验在家兔内毒素休克模型上,预防性或治疗性给予地塞米松(Dexamehtasone, Dex),观察地塞米松防治对内毒素休克兔平均动脉压(Mean arterial blood pressure, MABP)、存活数、循环血中TNF水平、血浆胰高血糖素、胰岛素、葡萄糖、乳酸、β-葡萄糖醛酸酶(β-glucuronidase)改变的影响。同时在体外观察地塞米松对脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)诱导肝Kupffer细胞合成释放TNF的抑制作用,以期探讨地塞米松对内毒素休克的防治作用及其与TNF的关系。

1 材料和方法

健康家兔53只,性别不拘,体重(2.65±0.29)kg,随机分为4组:等渗盐水对照组(n=13);内毒素休克组(n=16);Dex预防组(n=12);Dex治疗组(n=12)。实验前动物禁食过夜,自由饮水。实验当天3%戊巴比妥钠(30 mg/kg)经耳缘静脉麻醉后,动物固定于兔台上,常规气管切开插管,自主呼吸;右颈总动脉切开插管,以取血样;暴露左股动脉切开插管,接血压计监测血压;暴露左股静脉切开插管,供输注LPS、地塞米松或回输液体用。动物全身肝素化(800 U/kg体重),在记录正常血压、心率、呼吸或其他有关指标后,经左股静脉一次输注 *E. coli* (O_{26}: B_6) LPS 300 μg/kg体重,Dex预防组和治疗组动物分别于

作者简介:刘 韧(1966-),女,河南省固始县人,博士,助理研究员,主要从事创伤后继发性组织损伤的发生机制方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)68757452

收稿日期:2000-09-13;修回日期:2001-01-05

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

LPS 输注前 30 min 或输注后 20 min 经左股静脉一次输注地塞米松5 mg/kg 体重(浓度为 5 mg/ml)。于 LPS 输注前后各个预定时相从右颈动脉取血样测定有关指标,同时经左股静脉回输等量等渗盐水。对照组动物除以等量等渗盐水代替 LPS 外,其他操作同内毒素休克组。

LPS 系 DIFCO 产品,地塞米松购自天津和平制药厂。

肝 Kupffer 细胞的分离按分级离心法[3]。按 1×10^6 接种至 24 孔培养板,37℃、5% CO_2 培养 30 min 后,弃上清,加入 RPMI 1640 培养液 2 ml,分为 4 组:对照组($n=8$);LPS(终浓度 100 ng/ml)处理组($n=8$);地塞米松(终浓度 5 μg/ml)预防组($n=8$)和治疗组($n=8$)。地塞米松预防和治疗组于 LPS 加入前 30 min 或加入后 20 min 加入地塞米松使终浓度为 5 μg/ml,置 37℃、5%CO_2 继续培养,并于 LPS 处理前后各个预定时相取上清测定 TNF。对照组除加入等量等渗盐水代替 LPS 外,培养条件和时间同 LPS 处理组。

血浆和培养上清 TNF 活性的测定采用放线菌素 D 处理 L929 靶细胞法[4]。放线菌素 D 和重组鼠 TNF 分别购自 Sigma 和 Genzyme 公司,血浆胰高血糖素和胰岛素的测定采用放免法,胰高血糖素和胰岛素放免测定试剂盒分别购自美国 DPC 公司和成都同位素应用技术研究所,血糖、乳酸、β-G 的测定采用比色法,葡萄糖氧化酶测定试剂盒购自保定长城临床试剂公司,乳酸脱氢酶购自 Sigma 公司。

采用 t 检验、方差分析和 χ^2 检验行统计学处理,计量资料结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

2 结果

2.1 MABP 和动物存活情况

与内毒素休克组相比,地塞米松预防组和治疗组 MABP 在休克后 8 h 起有明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),并持续至 12 h($P<0.05$)。输注 LPS 后 18 h,休克组动物存活数为 4(4/16),而地塞米松预防组和治疗组动物存活数为 10(10/12)($P<0.01$)和 9(9/12)($P<0.05$);24 h 休克组动物存活数为 1(1/16),地塞米松预防组和治疗组存活数为 6(6/12)($P<0.05$)和 4(4/12)($P>0.05$),见表 1。

表 1 地塞米松对内毒素休克兔存活情况的影响

Tab 1 The effect of dexamethasone on survival condition of rabbits

Group	n	Number of survival		
		12 h	18 h	24 h
Control	13	13	13	13
Endotoxin shock	16	12	4	1
Dex pretreatment	12	12	10 **	6 *
Dex treatment	12	12	9 *	4

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* endotoxin shock group

2.2 血浆 TNF

地塞米松预防组与内毒素休克组相比,血浆 TNF 水平明显抑制,达 92%~95%($P<0.01$),且出现时相延后,消失时相提前。地塞米松治疗组血浆 TNF 水平也明显抑制($P<0.01$),但较预防组仍明显升高($P<0.01$),见表 2。

表 2 地塞米松对内毒素休克兔血浆 TNF 的作用(ρ_B/ng·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Therapeutic effect of dexamethasone on plasma TNF in rabbit(ρ_B/ng·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Before LPS administration	After LPS administration							
			0.25 h	0.5 h	1 h	1.5 h	2 h	3 h	4 h	6 h
Control	13	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Endotoxin shock	16	—	2.49±0.89	11.9±3.18	35.6±8.21	58.9±9.05	64.5±8.91	16.7±4.15	5.83±1.49	—
Dex pretreatment	12	—	—	—	2.61±0.91 **	4.77±1.24 **	3.09±1.22 **	—	—	—
Dex treatment	12	—	2.41±0.78	12.1±3.54	11.7±2.98 **##	10.6±3.13 **##	8.70±2.15 **##	5.70±2.03 **	—	—

—: Not detected; **: $P<0.01$ *vs* endotoxin shock group; ##: $P<0.01$ *vs* Dex pretreatment group

2.3 血浆胰高血糖素和胰岛素

与内毒素休克组相比,地塞米松预防组和治疗组血浆胰高血糖素明显降低($P<0.01$),但高于等渗盐水对照组($P<0.05$, $P<0.01$)。血浆胰岛素与内毒素休克组相比并无明显改变($P>0.05$),见表 3。

表 3 地塞米松对内毒素休克兔血浆胰高血糖素和胰岛素的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Effects of dexamethasone treatment on plasma glucagon and insulin ($\bar{x}\pm s$)

Parameter		n	Before LPS administration	After LPS administration				
				0.5 h	2 h	4 h	8 h	12 h
Glucagon(ρ_B/pg·ml^{-1})	Control	13	88.2±9.5	96.1±10.9	94.7±11.5	90.5±10.1	105.0±12.6	110.0±15.8
	Endotoxin shock	16	92.6±10.4	160.0±26.8 **	245.0±39.4 **	288.0±45.8 **	268.0±42.5 **	276.0±47.1 **
	Dex pretreatment	12	80.5±9.41	102.0±12.3 ##	154.0±14.3 **##	151.0±17.4 **##	167.0±15.4 **##	159.0±14.7 **##
	Dex treatment	12	86.3±10.7	113.0±11.9 *##	165.0±17.6 **##	168.0±15.9 **##	171.0±18.5 **##	155.0±18.4 **##
Insulin(μU/ml)	Control	13	8.76±1.76	8.90±1.68	7.96±1.52	9.25±1.99	8.10±1.77	7.45±2.01
	Endotoxin shock	16	8.21±1.80	14.30±2.17 **	19.70±3.48 **	8.17±1.56	7.61±1.44	6.20±1.33
	Dex pretreatment	12	8.95±1.71	13.20±2.24 **	16.40±3.01 **	8.07±1.36	8.14±1.56	8.44±1.35
	Dex treatment	12	8.09±1.59	12.10±2.00 *	15.70±3.14 **	8.55±1.37	8.36±1.41	7.96±1.76

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; ##: $P<0.01$ *vs* endotoxin shock group

2.4 血浆葡萄糖、乳酸和β-G

地塞米松预防组和治疗组与内毒素休克相比,血糖、乳酸和血浆β-G 水平明显下降($P<0.05$, $P<0.01$),但高于等渗盐水对照组($P<0.05$, $P<0.01$),见表 4。

2.5 体外实验

与 LPS 处理相比,地塞米松预防组能完全抑制肝 Kupffer 细胞释放 TNF,地塞米松治疗组在加入 LPS 后 2 h 起明显抑制细胞释放 TNF,抑制幅度达 48%~66%($P<0.01$),见表 5。

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

表 4　地塞米松对内毒素休克兔血浆葡萄糖、乳酸和β-G 改变的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Effects of dexamethasone treatment on plasma glucose, lactic acid and β-glucirconidase($\bar{x}\pm s$)

Parameter		n	Before LPS administration	After LPS administration				
				0.5 h	2 h	4 h	8 h	12 h
Glucagon(ρ_B/g·L^{-1})	Control	13	1.11±0.10	1.14±0.13	1.30±0.16	1.28±0.13	1.19±0.12	1.05±0.12
	Endotoxin shock	16	1.08±0.11	1.88±0.20**	3.29±0.51**	2.24±0.40**	1.18±0.25	1.01±0.17
	Dex pretreatment	12	1.15±0.12	1.24±0.16##	1.87±0.21**##	1.36±0.20##	1.37±0.18	1.29±0.16
	Dex treatment	12	1.21±0.12	1.33±0.15*##	1.80±0.24**##	1.41±0.25##	1.26±0.13	1.19±0.13
Lactic acid(C_B/mmol·L^{-1})	Control	13	2.19±0.33	2.24±0.30	2.33±0.29	2.45±0.35	2.50±0.42	2.61±0.39
	Endotoxin shock	16	2.31±0.34	3.05±0.46**	6.17±1.02**	8.84±1.92**	9.88±1.87**	9.58±2.11**
	Dex pretreatment	12	2.29±0.28	2.44±0.35#	3.14±0.45**##	3.34±0.52**##	5.76±1.02**##	5.99±1.34**##
	Dex treatment	12	2.11±0.35	2.37±0.37#	3.66±0.40**##	3.78±0.49**##	6.84±1.06**##	6.74±1.10**##
β-G(U)	Control	13	747±128	801±130	779±135	792±134	810±141	807±145
	Endotoxin shock	16	772±140	986±156	1 440±292**	1 802±251**	2 239±306**	2 334±356**
	Dex pretreatment	12	784±131	811±146	904±186##	1 128±204**##	1 291±205**##	1 176±198**##
	Dex treatment	12	805±129	798±138	941±174##	1 342±225**##	1 355±216**##	1 367±248**##

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control; #: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* endotoxin shock group

表 5　地塞米松对内毒素诱导肝 Kupffer 细胞释放 TNF 的作用(ρ_B/ng·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 5　Effect of dexamethasone on the releasing of TNF by Kupffer cells induced by LPS(ρ_B/ng·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Before LPS administration	After LPS administration				
			1 h	2 h	3 h	4 h	6 h
Control	8	—	—	—	—	—	—
Endotoxin shock	8	—	0.41±0.13	1.08±0.24	1.51±0.27	1.52±0.30	1.52±0.25
Dex pretreatment	8	—	—	—	—	—	—
Dex treatment	8	—	0.39±0.14	0.56±0.20**	0.59±0.19**	0.55±0.21**	0.51±0.20**

—: Not detected; **: $P<0.01$ *vs* endotoxin shock group

3　讨论

国外学者和我们的工作已经证实 TNF 在内毒素/感染性休克的发生和展过程中具有重要的作用[1,2,5], 因此对内毒素/感染性休克新的防治途径或者直接阻断 TNF 的致休克作用, 或者是阻断 LPS 诱导 TNF 的产生和释放。文献表明预先输注 TNF 单抗或 LPS 抗体都有效地保护内毒素/感染性休克动物, 表现为存活率和 MABP 升高, 器官组织病理改变减轻。

本实验结果表明, 输注 LPS 前 30 min 或输注后 20 min 给予地塞米松, 能够降低休克动物死亡率, 以预防给药明显。也能提高休克动物的 MABP, 抑制血浆胰高血糖素和血糖升高, 减轻休克动物的乳酸血症, 减少溶酶体的释放。预防给药能够明显抑制循环血中 TNF 的出现和升高, 而治疗给药则能明显降低输注 LPS 后 1h 起血浆 TNF 的升高, 这些结果表明地塞米松对内毒素休克动物的保护作用与其抑制循环血中 TNF 出现和升高有着密切的关系。

Ohtsuka 等[6] 报道地塞米松预处理能抑制内毒素的生理作用, 本研究结果显示, 预防性给予地塞米松能够完全阻止 LPS 诱导 Kupffer 细胞合成释放 TNF, 而治疗性给予地塞米松虽然不能完全阻止, 但仍能明显抑制 Kupffer 细胞合成释放 TNF, 抑制幅度达 48%~66%, 表明地塞米松能够直接抑制 LPS 诱导的 TNF 产生, 已有文献报告糖皮质激素抑制 LPS 诱导 TNF 产生的作用环节可能是抑制 TNF 的基因转录和转录后水平[7], 但是, 一旦 TNF mRNA 翻译过程已经开始, 糖皮质激素就不能阻止 TNF 的合成和释放。因此, 从这一角度而言, 应用糖皮质激素治疗内毒素/感染性休克的临床效果在很大程度上取决于用药的迟早, 本研究地塞米松体内和体外实验的结果也证实了这一点。

尽管本研究中地塞米松防治能明显抑制循环血中 TNF 的升高, 其峰值水平较内毒素休克组下降了 87%~95%。但是 18 h 和 24 h 动物的死亡率仍然分别达到 17%~50%。这些结果提示, 在 TNF 促使内毒素/感染性休克发生发展过程中, 还牵涉到其它多种休克介质的参与, 如前列腺素、自由基、血小板激活因子、白介素-6 的协同作用。

参考文献:

[1] 刘　韧, 汪江淮, 陈惠孙, 等. 家兔绿脓杆菌败血症时血浆 TNF 的改变[J]. 第三军医大学学报, 1993, 15(2): 145—149.

[2] 刘　韧, 汪江淮, 陈惠孙, 等. 肿瘤坏死因子在内毒素休克中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 1993, 5(1): 1—2.

[3] Doolittle R L, Richter G W. Isolation and culture of Kupffer cells and hepatocytes from single rat liver: With observation on iron-loaded Kupffer cells [J]. Lab Invest, 1981, 45(6): 558—566.

[4] Flick D A, Gifford G E. Comparison of *in vitro* cytotoxic assays for tumor necrosis factor[J]. J Immunol Methods, 1984, 68(1-2): 167—175.

[5] Wang D, Wei J, Hsu K, *et al*. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on systemic hypotension, cytokines and inducible nitric oxide synthase expression and lung injury following endotoxin administration in rats[J]. J Biomed Sci, 1999, 6(1): 28—35.

[6] Ohtsuka H, Higuchi T, Matsuzawa H, *et al*. Inhibitory effect on LPS—induced tumor necrosis factor in calves treated with chlorpromazine or pentoxifylline[J]. J Vet Med Sci, 1997, 59(11): 1 055—1 057.

[7] Giroir B P, Beutler B. Effect of amrinone on tumor necrosis factor production in endotoxic shock[J]. Circ Shock, 1992, 36(3): 200—207.

(编辑　谢义霞)

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