DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.002
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
410 2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

论著

文章编号:1000-5404(2000)05-0410-04

山莨菪碱对LPS诱导的急性肺损伤大鼠肺组织TNFα、IL-8表达的影响

郭振辉,洪 新,毛宝龄,钱桂生,陈正堂 (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 探讨山莨菪碱(654-2)对内毒素致伤急性肺损伤(ALI)大鼠的防治作用和可能机制。方法 观察654-2对ALI大鼠血气分析和肺组织损伤的影响,并采用原位杂交法检测肺组织TNFα、IL-8 mRNA表达和ELISA检测肺组织匀浆TNFα、IL-8含量的改变。结果 654-2干预后可减轻ALI大鼠肺组织损伤程度,减少肺组织TNFα、IL-8 mRNA表达及其肺组织匀浆含量。结论 654-2可能通过抑制TNFα、IL-8 mRNA表达,减少肺组织中TNFα、IL-8产生而对ALI发挥防治作用。

关键词:急性肺损伤;山莨菪碱;肿瘤坏死因子α;白介素-8
中图法分类号:R392.11;R563.02 文献标识码:A

Effects of anisodamine on the expression of TNFα and IL-8 in pulmonary tissue of rats with LPS-induced acute lung injury

Guo Zheng-hui, Hong Xin, Mao Bao-ling, QIAN Gui-sheng, CHEN Zheng-tang (Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the preventive and therapeutic effects of anisodamine(654-2) on LPS-induced acute lung injury (ALI) and its mechanism. Methods The change of the expression and the content of tumor necrosis factor α (TNFα), interleukin-8(IL-8) mRNA and protein in pulmonary tissue of ansodamine-treated rats with ALI were measared with *in situ* hybridization and ELISA. Meanwhile, the pathologic changes were examined with light microscope. Results The administration of 654-2 inhibited the expression of TNFα, IL-8 mRNA and protein, and alleviated the pulmonary tissue damage. Conclusion 654-2 has a protective effect on rats with ALI through down regulating of the expression of TNFα and IL-8.

Key words: acute lung injury; anisodamine; tumor necrosis factor-α; interleukin-8

机体遭受严重损伤时,可诱发全身炎症反应综合征(Systemic inflammatory respones syndrome, SIRS),进而导致多脏器功能障碍综合征(MODS)。肺是首发靶器官,表现为急性肺损伤(Acute lung injury, ALI),促炎细胞因子,如TNFα、IL-8等是SIRS触发和"级联(Cascade)"效应的关键因素[1]。抑制炎症介质的释放已成为防治ALI的重要策略[2]。山莨菪碱(654-2)应用于ALI防治已显示良好效果,但其作用机制仍有待阐明。为此,本研究拟通过制备内毒素大鼠ALI模型,观察其肺组织TNFα、IL-8 mRNA表达,肺组织匀浆TNFα、IL-8水平改变及应用654-2干预后对TNFα、IL-8的影响。

基金项目:国家自然科学基金重点资助项目(39730210)

作者简介:郭振辉(1962—),男,福建省晋江市人,博士,主治医师,主要从事急性肺损伤、慢性阻塞性肺病方面的研究,发表论文10篇,现在广州军区总医院呼吸内科,广州510010。电话:(020)86662205—53555

收稿日期:1999-09-15;修回日期:1999-12-22

1 材料与方法

1.1 实验动物模型与分组

健康Wistar大鼠18只,体重180~230 g,由本校实验动物中心提供,随机分为3组:①内毒素致伤组:颈静脉注射LPS 5 mg/kg;②654-2干预组:注射LPS 5 mg/kg同时注射654-2 10 mg/kg;③对照组:颈静脉注射生理盐水0.2 ml/100 g。每组6只大鼠,观察4个时期点:处理后1、2、4、6 h。

1.2 观察指标与方法

血气分析,真空热干燥法测定肺组织湿干(W/D)比值;病理观察;原位杂交法测定TNFα、IL-8 mRNA表达。TNFα cDNA、IL-8 cDNA探针采用宝灵曼的地高辛标记检测试剂盒进行标记,组织取材,切片和原位杂交均参照文献[3]的方法,ELISA法测定肺组织匀浆TNFα、IL-8含量,ELISA试剂盒购自第四军医大学免疫教研室,按试剂盒说明书进行。

1.3 统计学分析

用$\bar{x} \pm s$表示,采用t检验或方差分析。

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

2　结果

2.1　动脉氧分压和 W/D 比值的变化

内毒素注射 4 h 后 PaO_2 显著降低, 而 W/D 则于 LPS 注射后 2 h 显著增加, 654-2 干预后 PaO_2 降低和 W/D 升高幅度显著减少, 见表 1。

2.2　病理观察

LPS 致伤 6 h 后, 肺组织肿胀, 表面见散在淤血, 光镜下见肺间质及肺泡腔水肿, 渗出, 出血, 粒细胞浸润, 654-2 干预后病理改变减轻, 见图 1、2。

2.3　肺组织细胞 TNFα、IL-8 mRNA 表达变化

LPS 致伤 1 h 后 TNFα mRNA 见最强阳性信号, 而 IL-8 mRNA 最强阳性表达则见致伤后 4 h, 见图 3、4。654-2 干预后相应时点的 mRNA 表达阳性信号减弱, 肺组织湿干比值减少见表 2。

表 1　654-2 对 LPS 致伤 ALI 大鼠 PaO_2 的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effect of 654-2 on PaO_2 in LPS induced ALI rats($\bar{x}\pm s$)

Group	LPS-induced	654-2 treated
Control(n=6)	11.95±1.48	12.13±0.48
1 h(n=6)	11.25±1.30	11.75±0.56
2 h(n=6)	10.77±0.78	11.40±0.75
4 h(n=6)	9.40±0.60△	11.31±0.55△*
6 h(n=6)	9.02±0.97△	9.78±0.62△*

△: $P<0.05$ *vs* control; *: $P<0.05$ *vs* LPS-induced

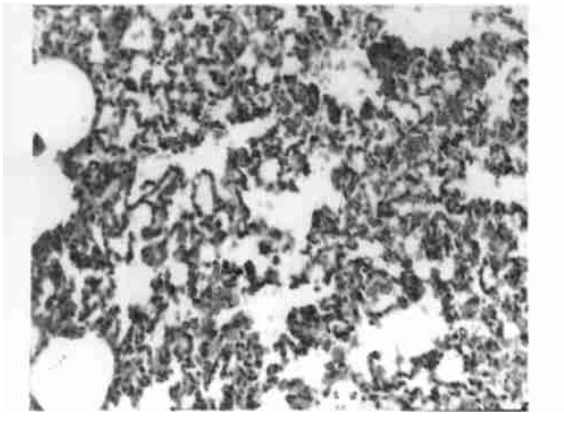


图 1　LPS 致伤 6 h 大鼠肺组织病理切片 (HE× 200)

Fig 1　Pathological changes of rat lung tissue treated with LPS for 6 h (HE× 200)

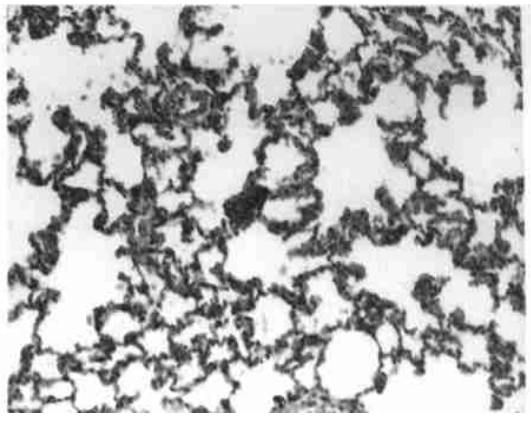


图 2　LPS+654-2 干预 6 h 大鼠肺病理切片 (HE× 200)

Fig 2　Pathological changes of rat lung tissue treated with LPS and 654-2 for 6 h (HE× 200)

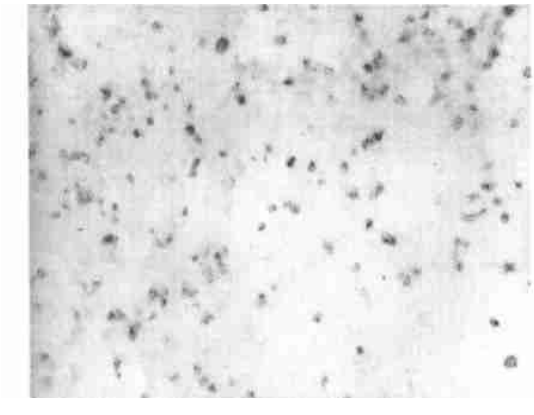


图 3　LPS 致伤 6 h 大鼠肺组织 TNF-α 原位杂交照片 (HE× 200)

Fig 3　*In situ* hybridization of TNF-α in rat lung tissue treated with LPS for 6 h (HE× 200)



图 4　LPS 致伤 6 h 大鼠肺组织 IL-8 原位杂交照片 (HE× 200)

Fig 4　*In situ* hybridization of IL-8 in rat lung tissue treated with LPS for 6 h (HE× 200)

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

表 2 654-2 对 ALI 大鼠肺组织 W/D 比值的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Effect of 654-2 on W/D in LPS induced ALI rats($\bar{x}\pm s$)

Group	W/D
LPS 6 h(n=6)	4.93±0.39△△
654-2 6 h(n=6)	4.71±0.28△*
Control (n=6)	4.56±0.15

△: $P<0.05$, △△: $P<0.01$ *vs* control;
*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* LPS-induced

2.4 肺组织匀浆 TNFα、IL-8 水平的变化

LPS 致伤后 TNFα、IL-8 水平均显著升高, 分别于致伤后 1、4 h 达到峰值, 654-2 干预后显著抑制 TNFα、IL-8 的升高水平, 见表 3。

表 3 654-2 对 ALI 大鼠肺组织中 TNFα、IL-8 mRNA 表达的影

Tab 3 Effects of 654-2 on the expression of TNFα, IL-8 mRNA in lung tissue LPS induced ALI rats

Group	TNFα mRNA	IL-8 mRNA
LPS 1 h	++++(++~++++)	±(−~±)
LPS/654-2 1 h	++(+~++)	−
LPS 4 h	+(−~+)	++++(++~++++)
LPS/654-2 4 h	±(−~±)	++(+~++)
Control	−	−

−: Negativity; +: Low postivity; ++: Positivity; +++: Moderate positivity; ++++: Intensive positivity

表 4 LPS 致伤+654-2 干预对肺组织匀浆 TNFα、IL-8 水平的影响(ρ_B/ng·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Effect of 654-2 on TNFα, IL-8 level in lung tissue of with LPS induced ALI rats (ρ_B/ng·ml^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

	TNFα		IL-8	
	LPS	654-2 treatment	LPS	654-2 treatment
Control	39.8±31.5		176.9±11.1	
1 h	1784.6±190.8△△	1370.9±175.2△△★★	349.0±157.3△△	222.2±13.2△△★★
2 h	1604.4±167.6△△	995.6±250.7△△★★	1505.3±95.5△△	907.1±151.8△△★★
8 h	538.7±119.4△△	376.7±48.5△△★	841.7±187.7△△	600.7±154.6△△★★

△△: $P<0.01$ *vs* control;
★: $P<0.05$, ★★: $P<0.01$ *vs* LPS-treatment

3 讨论

G^-菌感染在临床感染中占有重要地位, 内毒素是其主要毒性物质。LPS 可引起 ALI, 本实验中, 静注 LPS 后出现 PaO_2 显著降低, W/D 显著增多, 肺组织病理可见间质、肺泡水肿、渗出、出血, 粒细胞浸润, 说明 LPS 致伤(5 mg/kg)可致肺组织急性损伤, LPS 致伤同时应用 654-2 干预后, 显著改善 ALI 大鼠的动脉氧分压和减少肺组织湿干比值, 病理观察也发现其减轻肺组织的病理反应和炎症损伤。这与既往有关 654-2 对 ALI 的防治作用结果相符。

有研究表明[4,5]: TNFα 主要来源于 LPS 刺激的单核、巨噬细胞等, 在各种原因所致的 ALI 过程中, TNFα 主要通过下列途径发挥作用。①诱导其它细胞因子, 如 IL-1β, IL-6, IL-8 等前炎细胞因子产生和释放, 造成机体损伤的同时, 因可通过再激活炎症效应细胞, 释放更多的炎性因子, 使炎症信号进一步放大和加强, 产生"级联放大"作用; ②直接损伤肺血管内皮细胞和肺泡Ⅱ型上皮; ③与其它细胞因子相互作用引起肺组织损伤; ④激活补体和凝血系统, 促进炎症在肺组织中的扩散。本实验的结果显示, 大鼠注射 LPS 后, 肺组织 TNFα mRNA 表达和肺组织匀浆 TNFα 水平显著升高。TNFα mRNA 主要表达于肺泡巨噬细胞, PMN 也见表达。于 LPS 致伤后 1 h, 表达阳性信号最强; 肺组织匀浆 TNFα 峰值出现于伤后 1~2 h, 与文献报道的 TNFα 出现峰值时间为 90 min 的结果基本一致。上述结果说明: 一方面, 同一致伤因素 TNFα mRNA 表达先于其蛋白合成; 另一方面, LPS 静注直接产生内毒素血症, 通过肺循环, LPS 直接刺激肺组织中炎症效应细胞产生 TNFα, 显示肺组织匀浆 TNFα 水平与同致伤因素的血清 TNFα 水平的动态变化相类似。

另有研究发现[6~8]: IL-8 主要由受 LPS 或其它细胞因子作用的单核细胞, 巨噬细胞和血管内皮细胞介导产生。IL-8 的主要靶细胞是 PMN, 它通过影响粒细胞的生物活性而参与 ALI 的发生和发展: 诱导 PMN 趋化进入组织间隙和炎症区域; 对 PMN 强烈趋化同时激活 PMN, 促进其脱颗粒, 产生氧自由基, 蛋白酶等介质, 直接损伤肺组织细胞; 增加 PMN 对内皮细胞层的穿透力和血管内皮层的通透性, 促进 PMN 跨膜运动和在肺组织的"扣押"。本实验的结果显示: 大鼠注射 LPS 后, 肺组织 IL-8 mRNA 表达及匀浆 IL-8 水平显著升高, IL-8 mRNA 主要表达于肺泡巨噬细胞和 PMN, 尚见于血管内皮细胞, LPS 致伤后 2 h 始见阳性信号, LPS 致伤后 4 h 阳性信号最强; 同时, 肺组织匀浆 IL-8 水平达峰值, 在同一因素作用下, IL-8 mRNA 表达先于其蛋白表达, 符合 IL-8 表达与转录的时间顺序, 与此同时, 同一致伤因素, 从 TNFα IL-8 表达及其水平的动态变化中, 可以发现 TNFα mRNA 表达及其蛋白水平峰值出现时间均早于 IL-8, 提示 TNFα 产生后可能进一步刺激效应细胞表达和释放 IL-8。

654-2 具有 M 受体的拮抗作用, 通过解痉, 改善微循环而广泛用于抗休克和平滑肌解痉治疗; 进一步研究发现, 654-2 具有拮抗钙内流和抗氧化作用, 抑制细胞钙超载和生物膜的脂质过氧化, 对组织细胞起保护作用, 同时, 654-2 可抑制休克因子(或炎症介质), 如前列腺素, 白三烯等产生, 因而 654-2 用于抗休克的同时, 也用于各种原因所致的包括 ALI 在内的 MODS 防治并取得良好疗效[9]。已知 TNFα、IL-8 等在炎症细胞因子在诱导 ALI 中起重要作用。654-2 是通过上述固

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

有作用还是其它机制发挥其 ALI 的防治效果是目前研究的重点。本实验中, 654-2 可显著抑制 LPS 致伤时 ALI 肺组织 TNFα mRNA、IL-8 mRNA 的表达, 降低其肺组织匀浆中的水平。上述结果表明, 654-2 通过抑制前细胞因子 TNFα、IL-8 表达而发挥其抗炎效应, 达到减轻肺组织的炎症反应和炎症损伤的作用。

参考文献:

[1] American college of chest physicians/society of critical care medicine consensus conference: definitions 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] Sessler C N, Bloomfield G L, Fowler A A. Current concepts of sepsis acute lung injury[J]. Clin Chest Med, 1996, 17(2): 213—235.
[3] 蔡文琴, 王伯云 主编. 应用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1994. 403—427.
[4] Aggarwal B B, Konr W J, Hass P E, *et al*. Human TNF: production, purification and characterization[J]. J Biol Chem, 1985, 260(4): 2 345—2 354.
[5] Allen J N, Herzyk D J, Allen E D, *et al*. Human whole blood interleukin-1β production: kinetics, cell source, and comparison with TNF-α[J]. J Lab Clin Med, 1992, 119(5): 534—546.
[6] Akahoshi T, Endo H, Kondo H, *et al*. Essential involvement of interleukin-8 in neutrophil recruitment in rabbits with acute experimental arthritis induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 [J]. Lymphokine Cytokine Res, 1994, 13(2): 113—116.
[7] Baggiolini M, Dewald B, Moser B. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines-CXC and CC chemokines[J]. Adv Immunol, 1994, 55: 97—179.
[8] Goodman R B, Strieter R M, Martin D P, *et al*. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the ARDS[J]. Am J Respir Crit Care Med, 1996, 154(3 pt 1): 602—611.
[9] 诏兆新, 李培英, 王炫英, 等. 山羊四毒素休克诱发脂质过氧化作用及 654-2 对其影响的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1998, 29(2): 179—185.

(编辑 陈聪连)

文章编号: 1000-5404(2000)05-0413-01

经验与短篇

5-FU 治疗输卵管妊娠致直肠炎性狭窄 1 例

Treatment of a case of rectostenosis caused by tubal pregnancy with 5-Fu

刘作金, 罗云生, 周洪伟, 张敬如, 文仁国, 郑宏庭 (第三军医大学附属新桥医院普通外科, 重庆 400037)

患者, 女, 27 岁。因渐进性排便困难 4 月余入院。4 月前, 患者因输卵管妊娠于当地医院以 5-FU 静滴 100 mg/d× 10 d 治疗。治疗期间无异常。疗程结束后 4 d 出现持续高热(38.0~39.8℃, 咳嗽, 咯脓痰, 口角溃疡, 水样在腹泻(无粘液, 脓血, 无里急后重), 辅查血常规 WBC 0.9× 10^9/L, 肝、肾功能, 大小便常规检查正常; 妇科检查双附件及子宫压痛明显, 直肠指检粘膜光滑, 直肠空虚。考虑为 5-FU 致骨髓抑制并发感染, 给予抗感染, 对症支持治疗后体温下降, 血象恢复正常, 一般情况好转; 但大便逐渐变细、硬。排便困难, 有肛周坠胀感, 经湿热敷后可解出少许屎样大便, 10~15 次/d, 无粘液脓血。转入我院后, 指肛检查: 距肛门 7 cm 处有一环行狭窄, 食指尖不能通过, 边缘呈锯齿状, 指套无血染。肛镜检直肠粘膜光滑, 钳取狭窄粘膜边缘组织, 病检为直肠粘膜慢性增生(息肉样)伴慢性炎症。纤维结肠镜不能通过狭窄部。给予一期乙状结肠造瘘, 6 月后一般情况恢复良好, 行直肠狭窄段成形, 乙状结肠造瘘回纳术。术后 14 d 痊愈出院。大便成形, 1~2 次/d。

讨论

5-FU 是滋养细胞敏感药物, 可抑制其生长并导致其死亡。但对输卵管正常组织无破坏作用, 病灶吸收后可保持输卵管通畅, 故有人将 5-FU 用于异位妊娠治疗[1]。5-FU 主要副作用为消化道粘膜反应及骨髓抑制。但如本例严重并发症罕见。本例直肠狭窄原因可能是①严重骨髓抑制, 白细胞数极度低下, 全身免疫力严重受损; ②胃肠道(直肠)粘膜为更新型组织, 对 5-FU 敏感, 易受损脱落, 局部抗感染能力下降; 继发感染, 导致炎性增生性狭窄。但该病人仅出现直肠局限狭窄, 我们推测除上述原因外, 可能还与局部尚存的未查明的潜在疾患有关。鉴于 5-FU 静脉给药的潜在危险性, 同样有效的腹腔镜病灶内给药似更安全[2]。

关键词: 5-Fu; 输卵管妊娠; 直肠狭窄
中图法分类号: R657.17 文献标识码: B

参考文献:

[1] 陈建新. 异位妊娠治疗的新进展[J]. 实用妇产科杂志, 1993, 9(2): 21—23.
[2] 王庆一. 腹腔镜下注射 5-FU 治疗输卵管妊娠[J]. 实用妇产科杂志, 1996, 12(4): 202—203.

(编辑 薛国文)

作者简介: 刘作金(1971—), 男, 四川省内江市人, 硕士, 医师, 主要从事动脉粥样硬化的早期诊治, 发表论文 2 篇。电话: (023)68755114-74605

收稿日期: 1999-10-20; 修回日期: 2000-03-07

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