DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.03.006

重组人TNF对正常家兔致休克作用的研究*

——脂质过氧化作用和白细胞吞噬功能的改变

刘 韧 汪江淮 陈惠孙 王正国 王 涛 蒋建新 刁有芳 田昆仑
(第三军医大学野战外科研究所) 630042

提 要 给正常家兔静脉一次输注重组人肿瘤坏死因子(TNF)60μg/kg体重或130μg/kg体重后,血浆丙二醛(MDA)明显升高($P<0.01$),血浆或溶血液超氧化物歧化酶(SOD)明显下降($P<0.05\sim0.01$),上述变化在130μg/kg体重组要甚于60μg/kg体重组($P<0.05\sim0.01$)。同时130μg/kg体重组动物其外周血白细胞数较对照组有明显下降($P<0.05\sim0.01$),血浆调理时间明显缩短($P<0.01$),此外白细胞的基础吞噬活性、基础总吞噬活性、最大吞噬活性和最大总吞噬活性均有明显改变($P<0.05\sim0.01$)。上述结果表明重组人TNF能够引起正常家兔的脂质过氧化损伤效应,以及白细胞数量和吞噬功能的改变。

关键词 肿瘤坏死因子;丙二醛;超氧化物歧化酶;吞噬作用;白细胞

我们既往的研究工作已经证实氧自由基介导的脂质过氧化作用与多种休克条件下的细胞损伤密切相关[1,2],同时还证实了休克时外周血白细胞数和多种吞噬功能的改变,以及这种改变与脂质过氧化损伤发生之间的联系[3,4]。近年来国外学者的研究表明,一种由单核/巨噬细胞在内毒素诱导下释放的细胞因子——肿瘤坏死因子(Tumor Necrosis Factor,TNF)在内毒素/感染性休克的发病过程中起着重要的介导作用[5,6],但是有关TNF与氧自由基、白细胞吞噬功能改变的关系,特别是TNF能否直接引起脂质过氧化损伤和白细胞吞噬功能的改变尚未见文献报道。

本实验采用给正常家兔输注不同剂量的重组人TNF,测定血浆丙二醛(Malondialdehyde,MDA)含量,血浆和溶血液超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase,SOD)活性,并应用鲁米诺依赖酵母多糖诱导的全血化学发光技术,检测全血白细胞吞噬功能的改变,探讨重组人TNF对正常家兔脂质过氧化作用、外周血白细胞数和吞噬功能的影响,以及与TNF致休克作用的关系。

1 材料与方法

健康家兔28只,性别不拘,体重2.58±0.19 kg,随机分为下列3组:生理盐水对照组($n=12$);低剂量TNF(60μg/kg体重)处理组($n=8$);高剂量TNF(130μg/kg体重)处理组($n=8$)。实验前动物禁食过夜,自由饮水,实验当天3%戊巴比妥钠(30mg/kg体重)经耳缘静脉麻醉后,动物固定于兔台上,为保持呼吸道通畅,常规气管切开插管,自主呼吸;暴露右颈总动脉和左股动脉切开插管,备取血样和接血压计监测血压;暴露左股静脉切开插管,供输注重组人TNF或回输液体用。动物全身肝素化(800U/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重组人TNF(第三军医大学野战外科研究所制备生产,活性为2.6×10^7/mg,纯度≥95%,内毒素含量<50EU/mg)60μg/kg体重或130μg/kg体重,重组人TNF的浓度分别为60μg/ml和130μg/ml。于重组人TNF输注前后各个预定时相从右颈总动脉取血测定MDA、SOD、全血白细胞吞噬功能和β-葡萄糖醛酸酶(β-glucuronidase,β-G),同时经左股静脉输注等量生理盐水。对照组动物除以等量生理盐水代替重组人TNF外,其他操作同TNF处理组。分别观察12、18、24 h动物死亡率。

* 国家自然科学基金资助项目

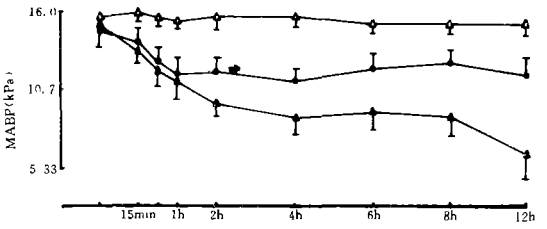
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

血浆 MDA 含量的测定按 TBA 荧光法[7]，结果以 nmol/ml 表示。血浆和溶血液 SOD 活性的测定按化学发光法[8]，以黄嘌呤氧化酶(Sigma)、次黄嘌呤(Fluka)、Luminol(北京化工厂)和碳酸钠缓冲液构成测定体系，结果以 μ/ml 表示。β-G 的测定按比色法[9]。全血白细胞吞噬功能和血浆调理活性按 Lominol 依赖酵母多糖诱导的全血化学发光技术[10]测定，酵母多糖为 Sigma 产品，白细胞计数按常规方法，结果表示为个/μl。白细胞吞噬活性以 mv 表示，血浆调理活性以分钟表示。各测定参数及意义：(1)基础吞噬活性(mv)：1×10^3 白细胞的发光本底值，反映体内单位白细胞吞噬功能的预激活状态。(2)基础总吞噬活性(mv)：白细胞总数发光本底值，反映体内白细胞吞噬功能总的预激活状态，受白细胞总数的影响。(3)最大吞噬活性(mv)：1×10^3 白细胞的发光峰值，反映经调理后单位白细胞所能达到的最大吞噬功能。(4)最大总吞噬活性(mv)：白细胞总数的发光峰值，反映经调理后白细胞总的最大吞噬功能，也受白细胞总数的影响。(5)血浆调理时间(min)：加入酵母多糖至出现峰值的时间，主要反映补体(特别是 C3)的调理活性。

所有数据依 t 检验、方差分析和 χ^2 检验进行统计学处理，$P<0.05$ 示差异有显著性，$P<0.01$ 示差异非常显著，计量资料结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

给正常家兔输注重组人 TNF 后，60μg 组的 MABP 在开始 1 h 持续下降，以后维持在 12kPa 左右，而 130μg 组 MABP 较 60μg 组下降更为明显($P<0.05\sim0.01$，12 h MABP 降至 6.3kPa)(附图)。动物并出现心率增快，呼吸急促和稀便。60μg 和 130μg 两组动物死亡率在输注 TNF 后 12、18、24 h 分别为 0%和 38%($P>0.05$)、0%和 75%($P<0.01$)、23%和 100%($P<0.01$)。



附图 输注重组人 TNF 后 MABP 的改变

Fig Changes of MABP after infusion of recombinant human TNF

△—△:control group; •—• :60 μg/kg group; ▲—▲:130μg/kg group

与生理盐水对照组相比，输注 TNF 后，130μg 组血浆 MDA 明显升高($P<0.01$)，血浆和溶血液 SOD 活性明显下降($P<0.05\sim0.01$)，其中血浆 MDA 和溶血液 SOD 活性与 60μg 组相比，也有明显的改变($P<0.05\sim0.01$)(表 1)。60μg 组血浆 MDA 的升高和溶血液 SOD 的降低发生时相较晚(表 1)。

表 1 输注不同剂量重组人 TNF 后血浆、溶血液 MDA 和 SOD 的改变

Tab 1 Changes of MDA and SOD in plasma and hemolytic blood after infusion of different doses of recombinant human TNF

parameters	group	before infusing TNF	after infusing TNF					
			0.5 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
plasma MDA (nmol/L)	control	2.14±0.31	2.17±0.29	2.21±0.28	2.19±0.32	2.03±0.28	2.27±0.30	2.18±0.26
	60 μg/kg	2.20±0.29	2.31±0.28	2.41±0.35	3.41±0.45**	3.07±0.36**	3.11±0.39**	3.22±0.40**
	130μg/kg	2.17±0.31	2.48±0.38	3.02±0.49**△	4.36±0.51**△	4.47±0.50**△△	4.33±0.49**△△	4.41±0.52**△△
plasma SOD (μ/ml)	control	118±10.2	108±11.2	121±11.9	117±11.3	111±11.5	124±15.4	109±10.8
	60 μg/kg	120±11.7	118±12.1	133±16.8	100±12.1	96.0±12.5	94.6±11.2**	96.2±10.7
	130μg/kg	115±10.8	114±11.8	101±10.9*△△	90.1±10.9*	88.2±11.3**	88.4±10.2**	82.4±10.0**△
hemolytic blood SOD (μ/ml)	control	6646±564	6433±577	6517±601	6489±622	6596±609	6042±598	6377±631
	60 μg/kg	6326±611	6045±607	6371±598	5126±588*	5233±601**	4876±501**	4533±476**
	130μg/kg	6456±607	5022±677**△	4033±498**△△	4122±501**△△	4178±478**△△	4024±436**△△	3904±451**△△

compared with control values $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$;

compared with 60μg/kg group $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$.

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

输注 TNF 后，130μg 组外周血白细胞数和吞噬功能也出现明显改变，表现为与输 TNF 前或对照组相比时外周血白细胞数明显下降（$P<0.05\sim0.01$），血浆调理时间明显缩短（$P<0.01$）。同时外周血白细胞最大总吞噬活性明显下降（$P<0.05\sim0.01$），基础吞噬活性、基础总吞噬活性在输注 TNF 后 0.5 h 至 4 h 明显升高（$P<0.01$），8 h 至 12 h 基础总吞噬活性和最大吞噬活性明显下降（$P<0.05\sim0.01$）（表 2）。

表 2 输注重组人 TNF 后白细胞吞噬功能的改变

Tab 2 Alterations of phagocytosis of leukocytes after infusion of recombinant human TNF

parameters	group	before infusing TNF	after infusing TNF					
			0.5 h	2 h	4 h	6 h	8 h	12 h
basic phagocytotic activity (mv)	control	0.39±0.10	0.41±0.12	0.39±0.11	0.38±0.12	0.37±0.10	0.40±0.11	0.39±0.12
	130μg/kg	0.40±0.12	0.85±0.20**	1.14±0.30**	1.07±0.28**	0.87±0.22**	0.58±0.18	0.49±0.15
basic total phagocytotic activity (mv)	control	1.91±0.30	2.04±0.33	1.98±0.29	1.96±0.27	2.11±0.31	2.08±0.29	1.97±0.31
	130μg/kg	2.06±0.32	3.38±0.47**	3.18±0.44**	2.64±0.39**	2.31±0.32	1.36±0.25**	1.20±0.21**
maximum phagocytotic activity (mv)	control	1.01±0.21	1.08±0.22	0.97±0.33	1.11±0.21	0.98±0.18	0.99±0.20	1.03±0.25
	130μg/kg	0.98±0.23	1.07±0.28	1.20±0.27	1.12±0.26	0.89±0.20	0.62±0.17**	0.51±0.18**
maximum total phagocytotic activity (mv)	control	4.88±0.61	5.34±0.61	4.91±0.62	5.40±0.67	5.38±0.63	5.18±0.59	5.35±0.64
	130μg/kg	5.07±0.70	4.28±0.61*	3.45±0.48**	2.77±0.39**	2.36±0.38**	1.47±0.30**	1.29±0.29**

compared with control values $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$

输注 TNF 后，两组血浆 β-G 均较对照组明显升高（$P<0.01$），但 130μg 组 60μg 组相比，血浆 β-G 升高的时相更早，程度更重（$P<0.05\sim0.01$）。

3 讨论

败血症和感染性休克的特征之一就是中性白细胞和巨噬细胞的激活和聚积，因此 TNF 与白细胞的作用关系已经受到广泛的关注。Klebanoff 等[10]的研究表明 TNF 能直接引起分离培养的中性白细胞发生脱颗粒，释放溶酶体酶，通过呼吸爆发过程产生活性氧如超氧自由基、羟基等一系列改变，TNF 也能增强多形核白细胞（Polymorphonuclear leucocytes，PMNL）的吞噬反应。休克过程中，外周血白细胞特别是 PMNL 的激活有着十分重要的作用，激活的白细胞聚积于微循环中，通过释放氧自由基而造成内皮细胞损伤，进而造成多个组织损伤，诱发 DIC 和 MOF。从本实验结果我们发现，正常家兔输注 TNF 后外周血白细胞数明显减少，而白细胞的基础吞噬活性显著升高，这就表明 TNF 能够激活外周血白细胞，并通过白细胞引起一系列的组织损伤。我们在实验中还注意到输注 TNF 后肺、肝组织中可见大量中性白细胞聚积（资料另发），这与外周血中白细胞数的持续减少也是相一致的。国外学者证实给正常动物输注 TNF 后的一个明显特征是外周血白细胞的显著下降[11]。

休克特别是内毒素休克过程中存在着氧自由基的明显增多，这些活性氧成份通过脂质过氧化反应导致细胞和亚细胞器的损伤，因而在多种休克和组织损伤中起着重要的作用[1~4]。TNF 能否引起类似休克时的脂质过氧化损伤是一个令人关注的问题。本实验结果表明输注 TNF 后血浆 MDA 明显升高，血浆和溶血液 SOD 明显下降，说明 TNF 能够抑制和破坏机体内源性氧自由基防御系统，导致膜结构和脂质过氧化损伤。Larrick 等[12]将重组 TNF 与粒细胞一起孵育后，粒细胞的硝基蓝四唑染料还原增加，粒细胞极化状态升高，超氧自由基释放增多，并出现粒细胞聚积，上述改变可被 TNF 单抗所抑制。尽管 TNF 经过何种途径引起氧自由基增多，进而导致细胞损伤尚需进一步研究，但是通过激活外周血白细胞无疑是其重要途径之一。

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

参考文献

1. Wang JH, Chen HS, Wang T, et al. Oxygen-derived free radicals induced cellular injury in superior mesenteric artery occlusion shock: Protective effect of superoxide dismutase. Circ Shock, 1990; 32:31
2. Wang JH, Chen HS, Diao YF, et al. Changes of lipid peroxides dismutase in visceral tissues during endotoxic shock in rats. J Med Colle PLA, 1990;5:141
3. 汪江淮 陈惠孙 王 涛,等。家兔创伤性休克时氧自由基和白细胞吞噬功能的变化。中华实验外科杂志,1990;7:78
4. 汪江淮 陈惠孙 王 涛,等。高速投射物伤时白细胞吞噬功能的改变及意义。中华创伤杂志,1990; 6:223
5. Offner F, Philippe J, Vogelaers D, et al. Serum tumor necrosis factor levels in patients with infectious disease and septic shock. J Lab Clin Med, 1990;116:100
6. Mayoral JL, Schwelch CJ, Dunn DL. Decreased tumor necrosis factor production during the initial stages of infection correlates with survival during murine gram-negative sepsis. Arch Surg, 1990;125:24
7. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K, et al. Assay for lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem, 1979;95:351
8. 汪江淮 陈惠孙 刁有芳,等。内毒素休克时自由基对肝脏细胞和亚细胞器的损伤。中国病理生理杂志,1990;6:28
9. 程世模 蒋耀光 陈昌荣。胃液 β-葡萄糖醛酸酶活力测定对胃癌诊断的价值。第三军医大学学报, 1981;3:70
10. Klebanoff SJ, Vadas MA, Harlan JM, et al. Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. J Immunol, 1986;136:4220
11. Okusawa S, Gelfard JA, Ikejima T, et al. Interleukin-1 induces a shock-like state in rabbits: Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cycloxygenase inhibition. J Clin Invest, 1988;81:1162
12. Larrick JW, Graham D, Toy K, et al. Recombinant tumor necrosis factor causes activation of human granulocytes. Blood, 1987;69:640

(收稿:1992-07-06;修回:1993-03-21)

Study on the shock-inducing effect of recombinant human tumor necrosis factor: Changes of lipid peroxidation and leucocytic phagocytosis

Liu Ren, Wang Jianghuai, Chen Huisun, et al (Research Institute of Field surgery, Third Military Medical College, Chongqing, 630042)

Abstract After intravenous infusion of recombinant human tumor necrosis factor (TNF) in the dosage of 60μg/kg or 130μg/kg to rabbits. it was found that their plasma malondialdehyde (MDA) was significantly increased ($P<0.01$), and superoxide dismutase (SOD) in plasma or hemolytic blood decreased ($P<0.05\sim0.01$) The increase of MDA and the decrease of SOD were more prominent in the 130μg group than in the 60μg group ($P<0.05\sim0.01$). In addition, in the 130μg group, the peripheral leucocytic count was decreased ($P<0.05\sim0.01$ as compared with the control) and the plasma opsonin time shortened ($P<0.01$). Moreover, the basic phagocytic activity, basic total phagocytic activity, maximun phagocytic activity and maximun total phagocytic activity of leucocytes were all changed ($P<0.05\sim0.01$). These findings indicate that recombinant human TNF can induce tissue damages due to lipid peroxidation and changes of leucocytic count and phagocytic activities in normal rabbits.

Key words tumor necrosis factor; malondialdehyde; superoxide dismutases; phagocytosis; leucocytes

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