

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.012

油酸型急性呼吸窘迫综合征血清细胞因子 TNF- α 、IL-8、IL-10 变化及地塞米松干预的实验研究

黎 静, 韩利梅, 古丽鲜

(新疆医科大学第二附属医院呼吸内科, 乌鲁木齐 830063)

【摘要】目的:观察地塞米松在不同时间干预对兔油酸型急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-8(interleukin-8, IL-8)及 IL-10 的影响,探讨糖皮质激素治疗 ARDS 的理论基础。**方法:**将 40 只大白兔随机分成正常对照组($n=8$), ARDS 模型组($n=8$)和地塞米松治疗组($n=24$)。经耳缘静脉注射油酸复制兔 ARDS 模型,治疗组再分成 3 组(每组 $n=8$)分别于即刻、1、2 h 注射地塞米松治疗,用放射免疫及酶联免疫吸附试验测定血清中 TNF- α 、IL-8 及 IL-10 水平。**结果:**ARDS 组血清 TNF- α 、IL-8 水平高于对照组($P<0.01$);而 IL-10 水平低于对照组($P<0.01$)。经地塞米松治疗后, TNF- α 、IL-8 水平降低, IL-10 水平升高。TNF- α 、IL-8 水平与 ARDS 组相比有统计学差异($P<0.01$), IL-10 水平与 ARDS 组相比有统计学差异($P<0.01$)。并且不同时间应用地塞米松治疗后血清 TNF- α 、IL-8 及 IL-10 水平有相应的不同变化。**结论:** TNF- α 、IL-8 及 IL-10 在兔油酸型 ARDS 炎症过程中可能起重要作用。地塞米松可通过干预 TNF- α 、IL-8 及 IL-10 分泌而减轻肺损伤。同时地塞米松干预时间与炎症的发生、发展存在一定关系。

【关键词】急性呼吸窘迫综合征;细胞因子;地塞米松

【中国图书分类法分类号】R563.8

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-03-26

Experimental study of dexamethasone intervention on variation of serum cytokines TNF- α , IL-8 and IL-10 in rabbits with oleic acid ARDS

LI Jing, HAN Limei, GU Lixian

(Department of Respiratory, the Second Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University)

【Abstract】Objective: To observe the effects and mechanism of dexamethasone intervention on variations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-8 (IL-8) and IL-10 in serum of rabbits with acute respiratory distress syndrome (ARDS) induced by oleic acid at different time points. **Methods:** Totally 40 rabbits were randomly divided into normal control group ($n=8$), ARDS group ($n=8$) and dexamethasone-treated group ($n=24$). Animal model of ARDS was established by intravenous injection of oleic acid to rabbits' veins through ear margin. Dexamethasone-treated group was subdivided into three groups ($n=8$) by injecting dexamethasone at different time points (instantly, 1, 2 h). Levels of TNF- α , IL-8 and IL-10 in serum were measured using radioimmunoassay and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Levels of TNF- α and IL-8 in serum were significantly higher in ARDS group than in normal control group ($P<0.01$). Level of IL-10 in serum was significantly lower in ARDS group than in normal control group ($P<0.01$). After dexamethasone treatment, levels of TNF- α and IL-8 in serum were lowered while level of IL-10 in serum was increased. Levels of TNF- α , IL-8 and IL-10 in serum were statistically different between dexamethasone-treated group and ARDS group ($P<0.01$). Different variations of TNF- α , IL-8 and IL-10 levels in serum were observed when dexamethasone was given at different time points. **Conclusions:** TNF- α , IL-8 and IL-10 may play an important role in the inflammatory process of oleic acid ARDS in rabbits. Dexamethasone may relieve lung injuries by intervening the secretion process of TNF- α , IL-8 and IL-10. At the same time, the possible relationships may exist between the progression of inflammation and the intervention time of dexamethasone.

【Key words】acute respiratory distress syndrome; cytokines; dexamethasone

急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是由急性肺损伤引起的呼吸衰竭。

作者介绍:黎 静, Email: hlm81726@qq.com,

研究方向:急性呼吸窘迫综合征。

通信作者:古丽鲜, Email: gulixian3@sina.com。

其发病机制迄今尚未完全阐明,临床上亦缺乏有效的防治措施,故而一直是医学界尤其是呼吸危重医学的研究热点之一,特别是 2003 年以来严重急性呼吸道综合征的爆发流行,有关 ARDS 的深入研究显得更为重要。本实验拟用油酸复制兔 ARDS 模型,

观察油酸型 ARDS 时血清肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素-8(interleukin-8, IL-8)和 IL-10 水平不同时间变化以及应用地塞米松干预后对其产生的影响,探讨 ARDS 的发病机制并为该病的防治提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与分组

选用新西兰纯种大耳白兔 40 只,雌雄不拘,体质量 2.0~2.5 kg。随机分为 5 组:Ⅰ组为油酸型 ARDS 组;Ⅱ组为油酸型 ARDS 制成后即刻用药组(治疗 1 组);Ⅲ组为油酸型 ARDS 制成后 1 h 用药组(治疗 2 组);Ⅳ组为油酸型 ARDS 制成后 2 h 后用药组(治疗 3 组);Ⅴ组为生理盐水对照组,各组动物均为 8 只。

1.2 实验方法

自耳缘静脉注射油酸 0.1 ml/kg,Ⅰ组于注射油酸后 2、3 h 分别自股动脉取血 3 ml,分离血清备用;Ⅱ、Ⅲ组和Ⅳ组分别注射油酸后即刻、1 h、2 h 组兔耳缘静脉注射地塞米松(0.075 mg/kg),余同Ⅰ组;Ⅴ组以生理盐水代替油酸,余同Ⅰ组。实验结束后,取肺组织标本用 10%福尔马林液固定备用。

1.3 血清 TNF- α 、IL-8 和 IL-10 水平测定

采用酶联免疫吸附试验试剂盒(大连泛邦化工技术开发有限公司),按说明书要求测定肺组织石蜡包埋,切片 4~5 μ m 厚,脱蜡后使用常规 HE 染色。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。差异比较采用单因素方差分析,其两两比较采用 LSD- t 法。检验水准 $\alpha=0.01$,以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 油酸型 ARDS 血清 TNF- α 、IL-8 和 IL-10 水平不同时间的变化(表 1)

注射油酸后,兔血清 TNF- α 水平明显增高,除治疗 3 组外,与对照组相比差异均有统计学意义($P < 0.01$);用地塞米

松干预后 TNF- α 水平有所降低,各治疗组与 ARDS 组相比有统计学差异($P < 0.01$);用药后 3 h 检测治疗 3 组与治疗 1 组具有统计学差异($P < 0.01$)。IL-8 在注射油酸后水平有所上升,其中 ARDS 组和治疗 1 组与对照组相比有统计学差异($P < 0.01$);治疗 2 组和治疗 3 组有下降恢复,与 ARDS 组相比有统计学差异($P < 0.01$)。IL-10 在注射油酸后水平有所下降,ARDS 组和治疗 1、2 组与对照组相比有统计学差异($P < 0.01$);治疗 3 组有上升恢复,与 ARDS 组相比有统计学差异($P < 0.01$)。在 2 h 与 3 h 各指标水平检测比较无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 肺组织光学显微镜下形态学变化

对照组可见肺组织正常,未见明显病理性改变。

ARDS 组可见肺间质毛细血管明显扩张、充血,微血管内可见透明血栓;间质和肺泡水肿明显;出现点状出血伴灶状坏死以及肺泡萎陷;间质有多量炎细胞浸润;部分区肺泡腔扩张,呈肺气肿改变。

治疗 1 组显示间质和肺泡水肿情况较 ARDS 组稍微减轻,其余未见明显改变。

治疗 2 组显示间质和肺泡水肿情况较 ARDS 组明显减轻,病理改变较治疗 1 组好转。

治疗 3 组显示间质和肺泡水肿情况基本消失,肺泡萎陷已复张,肺组织基本恢复正常。

3 讨论

ARDS 是以肺泡-毛细血管膜损伤为特征的病理过程,肺部炎症反应是其病理基础。肺组织炎症反应的发生发展中最重要炎症细胞是多形核中性粒细胞(polymorphonuclear neutrophils, PMN),其被激活后释放一些炎症因子,而 IL-8 则是其中最重要的炎症因子,它是内毒素刺激后主要的产物,并持续保持高浓度和最大的 PMN 聚集相关^[1]。IL-8 具有使 PMN 向肺聚集而产生炎症介质,同时通过与 PMN 表面特异性受体结合,导致细胞变形,脱颗粒反应,呼吸爆发,释放溶酶体酶和过氧化物等,促进炎症反应,引起肺组织损伤^[2]。同时研究发现^[3-4],肺

表 1 油酸型 ARDS 血清细胞因子不同时间变化($\bar{x} \pm s$, ng/ml, $n=8$)

Tab.1 Serum cytokines variations in oleic acid ARDS at different time points ($\bar{x} \pm s$, ng/ml, $n=8$)

分组	TNF- α		IL-8		IL-10	
	2 h	3 h	2 h	3 h	2 h	3 h
对照组	8.87 $\pm$ 0.80	8.92 $\pm$ 0.91	2.25 $\pm$ 0.08	2.35 $\pm$ 0.25	67.85 $\pm$ 3.38	70.21 $\pm$ 4.27
ARDS组	13.68 $\pm$ 0.84 ^a	14.75 $\pm$ 0.73 ^a	3.46 $\pm$ 0.12 ^a	3.67 $\pm$ 0.11 ^a	43.06 $\pm$ 3.93 ^a	44.61 $\pm$ 2.49 ^a
治疗 1 组	10.23 $\pm$ 0.91 ^a	11.73 $\pm$ 0.83 ^{ab}	3.19 $\pm$ 0.19 ^a	3.29 $\pm$ 0.35 ^a	53.05 $\pm$ 3.88 ^a	48.96 $\pm$ 2.91 ^a
治疗 2 组	10.11 $\pm$ 0.80 ^{ab}	10.12 $\pm$ 0.94 ^{ab}	2.64 $\pm$ 0.14 ^b	2.66 $\pm$ 0.15 ^b	56.58 $\pm$ 2.38 ^b	54.08 $\pm$ 3.07 ^a
治疗 3 组	9.20 $\pm$ 0.72 ^b	9.49 $\pm$ 0.63 ^{bc}	2.36 $\pm$ 0.10 ^b	2.19 $\pm$ 0.75 ^b	63.36 $\pm$ 4.20 ^b	61.78 $\pm$ 3.07 ^{bc}

注:a,与对照组相比, $P < 0.01$;b,与 ARDS 组相比, $P < 0.01$;c,与治疗 1 组相比, $P < 0.01$

内巨噬细胞是 ARDS 过度炎性反应的始动因素,在本病发病的 6~24 h 内,肺内巨噬细胞的数量迅速增加且持续时间长,释放一系列前细胞炎性因子,包括 TNF- α 、IL-8、IL-10 等。而 TNF- α 又激发 PMN 释放大炎症介质及各种蛋白水解酶,诱发 ARDS。TNF- α 通过抑制肺 II 型上皮细胞合成,同时分泌肺泡表面活性物质,导致肺顺应性降低,最终影响肺氧合功能。大量动物实验和临床研究表明,ARDS 患者肺泡液和血清中 TNF- α 在 ARDS 患者中含量增加,同时发现不同的内毒素注入方式,TNF- α 增加的时相不同,故认为 TNF- α 峰值出现越早,损伤程度可能越重,预后越差^[5]。IL-10 主要由单核细胞,内皮细胞,T 辅助细胞等产生,在众多炎性因子中发挥着抑制免疫和炎症反应的作用,能抑制单核细胞,Th1 细胞和活化的自然杀伤细胞,产生多种细胞因子如 IL-6、TNF,干扰素等^[6]。IL-10 可能是在转录、转录后两个阶段上影响促炎型细胞因子的水平,抑制促炎型细胞因子相应基因的转录而阻断其合成。同时还能影响促炎性细胞因子 mRNA 的稳定性使其水平下降^[7]。本实验结果显示,注射油酸后血清中 TNF- α 、IL-8 均增高,而 IL-10 降低。肺组织病理改变明显,说明在 ARDS 时,致炎因子与抗炎因子比较,以致炎因子力量更强。

地塞米松是临床最常用的糖皮质激素,通过抑制 NF- κ B 的活性及 κ B 抑制蛋白的降解,从而抑制多种细胞因子的转录,使炎症细胞因子在全身炎症反应综合征中释放减少,对炎症反应有强烈的抑制作用^[8]。而通过抑制过度的炎症反应,降低如儿茶酚胺和炎症介质等神经内分泌激素的释放,从而减轻细胞损伤,最终起到保护机体的作用。糖皮质激素用于 ARDS 的治疗是近几年来研究的热点,但焦点不在于它对肺的保护作用,而由于本病病因和发病机制的不同与疗效差异的关系,和激素受体水平与功能状态对疗效的影响,故聚焦于糖皮质激素的给药时机,疗程,剂量对疗效的影响等。而文献[9]报道早期激素治疗或小剂量激素治疗能够降低 ARDS 患者的病死率;激素应用后氧合情况有显著改善;而激素治疗没有显著增加或减少感染性并发症的发病率。

本研究结果表明,在不同时间应用地塞米松治疗后,ARDS 兔血清中 TNF- α 、IL-8、IL-10 水平较未治疗组有明显改变,主要为致炎性细胞因子,如 TNF- α 、IL-8 的降低和抗炎性细胞因子,如 IL-10 的

升高,进一步观察发现在 ARDS 发生后 2 h 用药较 1 h 用药,细胞因子改变更为显著且与病理改变一致。提示在 ARDS 治疗过程中,并非必须早期、大剂量应用激素才能获得好的疗效。究竟何时应用激素才是最佳时间,尚有待于进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 彭 平,徐启勇,叶燕青,等.地塞米松磷酸钠微球对大鼠急性肺损伤的保护作用[J].武汉大学学报(医学版),2006,27(2):229-231.
Peng P,Xu Q Y,Ye Y Q,et al.Effect of dexamethasone sodium phosphate microspheres on murines of acute lung injury[J].Medical Journal of Wuhan University(Medical science),2006,27(2):229-231.
- [2] Arand M,Melzner H,Kinzel L,et al.Early inflammatory mediator response following isolated traumatic brain injury and other major trauma in humans[J].Langenbecks Arch Surg,2001,386(4):241-248.
- [3] Mandal R V,Mark E J,Kradin R L.Megakaryocytes and platelet homeostasis in diffuse alveolar damage[J].Exp Mol Pathol,2007,83(3):327-331.
- [4] 李英卓,范崇熙,陈 鹏,等.兔油酸 ARDS 模型 72 h 内炎性因子及凝血情况分析[J].广东医学,2011,32(8):976-978.
Li Y Z,Fan C X,Chen P,et al.Analysis of inflammatory factors and blood coagulation condition of rabbits model with oleic acid ARDS in 72 hours[J].Guangdong Medical Journal,2011,32(8):976-978.
- [5] 韩晓华,蔡栩栩,杜 悦,等.内毒素诱导新生大鼠肺损伤及地塞米松的保护作用[J].中华围产医学杂志,2007,10(5):322-326.
Han X H,Cai X X,Du Y,et al.Effects of Dexamethasone on neonatal rats with acute lung injury induced by lipopolysaccharide[J].Chinese Journal of Perinatal Medicine,2007,10(5):322-326.
- [6] 屠晓鸣,聂文成,傅国胜.氯沙坦对兔颈动脉球囊损伤后血 IL-1 β 和 IL-10 的影响[J].浙江临床医学,2007,9(8):1022-1023.
Tu X M,Nie W C,Fu G S.Effect of Losartan on IL-1 β and IL-10 after carotid artery injury of rabbits[J].Zhejiang Clinical Medicine Journal,2007,9(8):1022-1023.
- [7] 李风雷.白细胞介素-10 和急性肺损伤[J].国外医学·呼吸系统分册,2001,21(2):57-58.
Li F L.IL-10 and acute lung injury[J].Foreign Medical Sciences·Section of Respiratory system,2001,21(2):57-58.
- [8] 王 烁,聂秀红,郭德玉,等.地塞米松对家兔急性肺损伤早期中性粒细胞相关功能的影响[J].中国急救医学,2004,24(10):727-729.
Wang S,Nie X H,Guo D Y,et al.Effect of Dexamethasone on relative functional of neutrophils in early period of acute lung injury[J].Chinese Journal of Critical Care Medicine,2004,24(10):727-729.
- [9] 王洁心,胡琼瑶,丁超峰,等.糖皮质激素对成人急性呼吸窘迫综合征疗效的 Meta 分析[J].中华急诊医学杂志,2010,19(1):83-88.
Wang J X,Hu Q Y,Ding C F,et al.Effects of glucocorticoids on acute respiratory distress syndrome in adults patients:meta-analysis[J].Chinese Journal of Emergency Medicine,2010,19(1):83-88.

(责任编辑:关蕴良)