

• 论 著 •

脓毒症大鼠急性肺损伤血清抵抗素及 IL-6 的变化及其意义*

胡建慧¹, 张建国², 孙海春¹, 钱银环¹, 曹美林¹

(1. 江苏省镇江市中医院检验科, 江苏镇江 212001; 2. 江苏大学附属江滨医院重症医学科, 江苏镇江 212001)

摘要:目的 研究脓毒症大鼠急性肺损伤(ALI)血清抵抗素及白介素-6(IL-6)的水平,以探讨抵抗素及 IL-6 与 ALI 的关系及可能机制。方法 Wistar 雄性大鼠 45 只随机分为正常对照组、假手术组和模型组各 15 只。静脉注射脂多糖(10 mg/kg)复制 ALI 的动物模型,分别观察 6、12、24 h 后活杀。测定肺湿/干重比,用化学发光法检测血清 IL-6 及 ELISA 法检测抵抗素水平。结果 与对照组及假手术组相比,模型组肺湿/干重比,肺病理组织评分、血清 IL-6 水平、抵抗素水平均明显增高($P<0.05$)。肺组织损伤程度与血清 IL-6 和抵抗素水平呈正相关(r 值分别为 0.739、0.874, $P<0.05$)。结论 抵抗素可能参与了脓毒症所致的肺损伤过程。

关键词:脓毒症; 急性肺损伤; 白介素-6; 抵抗素

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.15.014 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2015)15-2158-03

The change of serum resistin, IL-6 on the acute lung injury of sepsis rats and its significance*

Hu Jianhui¹, Zhang Jianguo², Sun Haichun¹, Qian Yinhuan¹, Cao Meilin¹

(1. Department of Clinical Laboratory, TCM Hospital of ZhenJiang, ZhenJiang, JiangSu 212001, China;

2. Department of ICU, Jiangbin Hospital Affiliated to Jiangsu University, ZhenJiang, JiangSu 212001, China)

Abstract: Objective To study the serum level of resistin and IL-6 in the sepsis-induced acute lung injury(ALI) in rats and to probe the relation of IL-6 and resistin to ALI and its possible mechanism. **Methods** The forty-five Wistar rats were randomly assigned to three groups, a control group, a sham group and a model group. ALI was induced by intravenous injective of LPS(10 mg/kg) and those animals were killed after 6 hours, 12 hours, 24 hours. The lung wet/dry weight ratio, serum IL-6 was detected by chemiluminescence and resistin levels were detected by ELISA. **Results** Compared with the control group and the sham group, the lung wet/dry weight ratio, lung pathologic tissue score, the serum level of resistin and IL-6 were increased($P<0.05$). Positive correlation was observed between resistin and IL-6 in different time. **Conclusion** Resistin possibly participate the process of sepsis induces ALI.

Key words: sepsis; the acute lung injury; interleukin-6; resistin

脓毒症是由细菌感染引发的全身性炎症反应,是危重患者的常见并发症,是导致危重患者难以治愈并死亡的重要原因之一。肺是脓毒症时最易受损的靶器官,急性肺损伤(ALI)通常出现较早,且发生率最高^[1-2],其发生机制相当复杂,多种细胞因子参与并相互影响,目前的主流观点是 Th1/Th2 细胞失衡所致的“促炎反应综合征”(SIRS)和“抗炎反应综合征”(CARS),但仍有诸多问题尚待解决。抵抗素的结构与炎性过程中有关的蛋白相似,它是近年来发现的一种脂肪细胞因子,因此炎症的启动和发展被设想为一种炎性分子参与的过程,且诸多研究表明抵抗素与多种炎症因子呈正相关^[3]。目前,有关抵抗素与脓毒症性肺损伤的相关性研究较少,本研究通过观察脓毒症性肺损伤大鼠血清中白介素(IL)-6 及抵抗素水平的变化,探讨抵抗素对脓毒症性肺损伤的早期诊断及预后的判断价值。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 脂多糖为美国 Sigma 公司生产;移液器为德国 BRAND 品牌;抵抗素试剂为美国 Rapid Bio Lab Calabasas California 原装 ELISA 试剂盒;IL-6 为 Autolumo A2000 全自动化学发光仪检测。

1.2 动物分组及处理 45 只 Wistar 雄性大鼠,体质量(250±20)g,随机分为对照组、假手术组和模型组各 15 只。假手术组

采用注射与模型组相同剂量的生理盐水,模型组采用大鼠尾静脉注射脂多糖(10 mg/kg, 1.6 mL/kg)复制 ALI 模型,总注射时间不少于 3 min。分别在注射后 6、12、24 h 水合氯醛麻醉后活杀。

1.3 方法 各组动物经上述处理后,不同时间段处死,在离离心端剪断气管,沿胸腔背面从上至下分离全肺置于冰块上,除去表面的凝血及结缔组织等附属物,吸干表面液体称湿重,然后放入 80℃烤箱 72 h,称取干重,计算湿/干重比(W/D)值。血清抵抗素测定用 ELISA 方法,严格按试剂盒说明书操作;IL-6 用化学发光法,严格按仪器操作步骤进行。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件包行单因素方差分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据间的相关性用 Pearson 相关性分析,计数资料用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同指标检测水平结果 见表 1~3。

2.2 抵抗素与 IL-6、肺病理组织评分之间的相关性分析 相关性分析发现血清抵抗素水平与 IL-6 及肺病理组织评分均呈正相关,相关系数 r 分别为 0.739、0.874($P<0.05$)。在不同时间段内对照组的抵抗素差异无统计学意义($P>0.05$)。

* 基金项目:镇江市科技支撑计划(社会发展)指导性项目(镇科社 2013-125 号)。 作者简介:胡建慧,女,副主任技师,主要从事医学检验免疫学检验研究。

表 1 6 h 各组不同指标检测水平比较 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	肺 W/D	肺病理组织评分(分)	IL-6(pg/mL)	抵抗素(ng/mL)
对照组	4.124±0.024	0.864±0.286	759.225±127.765	4.398±1.287
假手术组	4.481±0.041	0.872±0.328	769.852±147.348	4.872±1.038
模型组	5.893±0.198*	2.875±0.784*	1 875.244±549.012*	15.369±3.498*

* : $P<0.05$,与对照组及假手术组比较。

表 2 12 h 各组不同指标检测水平比较 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	肺 W/D	肺病理组织评分(分)	IL-6(pg/mL)	抵抗素(ng/mL)
对照组	4.224±0.015	0.794±0.246	735.355±146.324	4.537±1.246
假手术组	4.321±0.035	0.858±0.356	785.467±146.468	4.846±1.246
模型组	5.383±0.124*	2.848±0.759*	1 953.344±563.456*	16.466±3.537*

* : $P<0.05$,与对照组及假手术组比较。

表 3 24 h 各组不同指标检测水平比较 (n=5, $\bar{x} \pm s$)

组别	肺 W/D	肺病理组织评分(分)	IL-6(pg/mL)	抵抗素(ng/mL)
对照组	4.157±0.057	0.846±0.293	757.468±135.278	4.357±1.358
假手术组	4.584±0.125	0.846±0.358	793.355±138.832	4.363±1.245
模型组	5.679±0.264*	2.747±0.849*	1 937.478±637.351*	15.843±3.472*

* : $P<0.05$,与对照组及假手术组比较。

3 讨 论

脓毒症是由感染引起的一种全身性炎症反应综合征,是当前创伤、烧伤外科以及 ICU 所面临的棘手问题,其进一步发展可导致脓毒症性休克及多脏器功能不全综合征(MODS)。目前研究较多的是脓毒症所致 ALI,其主流观点是“炎症细胞因子风暴”,被大多数学者所接受。抵抗素又名脂肪细胞分泌因子,2001 年,作为一种脂肪因子被首次报道^[4],主要由白色脂肪组织分泌,起初因其具有胰岛素抵抗作用而得名。既往研究发现抵抗素较多的表达于人类单核细胞和巨噬细胞,也有部分表达于人的胎盘组织,因为抵抗素的结构与参与炎症反应过程中的蛋白(尤其是 FIZZ3)相同,这也提示着炎症反应与抵抗素的参与^[5-6]在一定程度上具有相关性。

典型的脓毒症的发生、发展的病理、生理过程,可以概括为连续发展的动态过程:由最初全身炎症反应综合征发展为脓毒症、严重脓毒症、脓毒症性休克,最终致多器官功能障碍综合征。脓毒症是危重病患者病死率升高的主要原因。脓毒症早期阶段,机体的免疫防御系统被细菌内毒素激活,如单核巨噬细胞系统、内皮系统等,并释放出大量的炎症细胞因子,如 IL-1、IL-6、 α -肿瘤坏死因子等,随着炎症反应的加重,形成的级联放大效应,使得炎症反应在 SIRS 及 CARS 平衡中失控,最终导致全身炎症反应综合征。抵抗素在正常机体内仅有少量表达,但在机体出现感染或应激性损伤后,随着炎性介质、炎症因子的大量激活,导致抵抗素的表达明显加速。当炎症反应失控后导致自身组织广泛破坏,并最终导致多器官功能衰竭甚至死亡。

从本研究结果显示,脓毒症大鼠肺损伤的血清抵抗素、IL-6 水平较假手术组及对照组明显升高 ($P<0.05$)。Silswal 等^[7]在体外实验中,于人外周血单核细胞培养中加入抵抗素,发现炎症因子 IL-6、TNF- α 较对照组明显增加,认为抵抗素可能通过激活核转录因子(NF- κ B)途径促进巨噬细胞表达多种炎症因子^[8]。另外体外实验也表明,部分炎症因子如 IL-1、IL-

6、TNF- α 均能通过刺激单核巨噬细胞,导致抵抗素的分泌增加。因此推测脓症患者存在炎症-抵抗素-炎症的正反馈环路^[9],这也是脓毒症的炎症反应治疗困难、病死率高的主要原因。本研究结果显示,脓毒症各组血清中 IL-6 水平均明显高于对照组 ($P<0.05$),脓症患者血清中抵抗素水平与 IL-6 水平呈正相关,IL-6 是起关键始动作用的细胞因子,在机体受到损伤、刺激后最先分泌。而且,本研究中发现,随着脓毒症的进展,血清抵抗素水平虽有升高的趋势,但差异无统计学意义 ($P>0.05$),可能与实验时间较短且大鼠自身免疫调控所致。但抵抗素作为新近发现的炎症因子,在早期反映脓毒症的严重程度以及评估患者预后具有一定的潜在价值,其具体信号转导机制有待进一步研究。

参考文献

[1] Zimmerman JJ, Akhtar SR, Caldwell E, et al. Incidence and outcomes of pediatric acute lung injury[J]. Pediatrics, 2009, 124(1): 87-95.

[2] Duggal A, Mireles-Cabodevila E, Krishnan S, et al. Acute respiratory distress syndrome: Implications of recent studies[J]. Cleve Clin J Med, 2014, 81(11): 683-690.

[3] Lehrke M, Reilly MP, Millington SC, et al. An inflammatory cascade leading to hyperresistinemia in humans[J]. PLoS Med, 2004, 1(2): 45.

[4] Steppan CM, Bailey ST, Bhat S, et al. The hormone resistin links obesity to diabetes[J]. Nature, 2001, 409(6818): 307-312.

[5] Steppan CM, Lazar MA. The current biology of resistin[J]. J Intern Med, 2004, 255(4): 439-447.

[6] Holcomb IN, Kabakoff RC, Chan B, et al. FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family[J]. EMBO J, 2000, 19(15): 4046-4055.

[7] Silswal N, Singh AK, Aruna B, et al. Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and(下转第 2161 页)

验,确定仪器最佳消解条件见表 1。

表 1 微波消解程序

步骤	最大功率(W)	爬坡时间(min)	目标温度(℃)	保持时间(min)
1	800~1 600	3	120	3
2	800~1 600	5	150	5
3	800~1 600	5	180	12

2.2 仪器分析条件的选择 通过对空心阴极灯灯电流、原子化器高度、载气流速等仪器条件进行了优化试验,确定仪器最佳工作条件见表 2。

表 2 仪器工作条件

测定元素	灯电流(mA)	负高压(V)	载气流速(mL/min)	原子化器高度(mm)	延迟时间(s)	读数时间(s)
砷	60	280	400	8	1	12
汞	25	280	400	8	1	12

2.3 试剂的影响与用量的选择 硫脲-抗坏血酸是较强的预还原剂^[5-6],可以将样品中五价砷还原为三价砷,易于形成氢化物。本法采用文献^[7]方法加入 1 g 硫脲,0.5 g 抗坏血酸,作用 0.5~1 h 后上机测定。盐酸和硝酸都可以作为氢化物发生的理想酸度条件,为了保持与消化液酸度一致,本法选用了浓度为 4% (体积分数)的硝酸作为载流。

2.4 线性范围、检出限 原子荧光光谱法有较宽的线性范围^[8],在最佳仪器条件下,分别测定砷、汞标准系列。砷在 0~30 μg/L 线性范围内相关系数(r)>0.999 6。汞在 0~5.00 μg/L 线性范围内, r >0.999 6。对样品空白溶液连续进行 11 次荧光强度测定,用 3 倍空白的标准偏差除以标准曲线的斜率求出砷的检出限为 0.10 μg/L,汞的检出限为 0.022 μg/L。

2.5 精密度试验 测定 6 次鲜禽蛋样品,进行方法精密度试验,计算相对标准偏差见表 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。由表 3 可知,砷的相对标准偏差为 1.96% ($n=6$),汞的相对标准偏差为 3.90% ($n=6$),表明该方法的精密度良好,能够满足试验要求。

2.6 回收率试验和标准物质测定结果 取禽蛋样品分别加入低、中、高 3 种不同浓度砷、汞标准溶液,以及取动物性标准物质 GBW100051 猪肝,按照测定样品的方法操作。分别测定 6 个平行样品,进行准确度试验,试验结果见表 4、5(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。由表 4 可知,样品砷的加标回收率在 92.1%~97.0%,汞的加标回收率在 92.5%~97.1%,由表 5 可知,猪肝测定值与标准值相符。由此可见本法测量准确度较高。

3 讨 论

微波消解管易被砷、汞等金属元素污染,使用前需要进行预处理。于微波消解管中,加入浓硝酸 1.0 mL、水 7.0 mL,用

消解样品的微波消解程序消解处理,然后洗净晾干备用。食品样品较难消解,为防止样品前处理时反应剧烈,可在加入 1.0 mL 硝酸后浸泡过夜,冷消化后再进行微波消解。

微波消解技术具有试剂用量少、速度快、污染少、取样量少、一次可处理大批样品等特点,作为食品样品前处理技术已被广泛应用。微波功率、消解酸比例、消解时间可影响消解效果,本文采用少量酸微波消解、对禽蛋样品中砷、汞测定方法的研究,试验证明检出限、准确度均符合食品卫生标准的要求,具有很好的应用价值。

采用少量酸微波消解对样品进行前处理,测定食品用包装材料中金属元素已被应用,如测定食品包装纸中砷含量^[9],其他领域未见有研究报道。实际样品检测,用该法检测了 20 件禽蛋样品,有鸡蛋 10 件、鸭蛋 4 件、鹅蛋 2 件、鹌鹑蛋 2 件、乌鸡蛋 2 件,检测结果砷小于 0.005 mg/kg,汞小于 0.001 1 mg/kg 均未检出。该法适合于基层试验室日常检测。

参考文献

[1] 刘志皋. 食品营养学[M]. 北京:中国轻工业出版社,1993:104-115.

[2] 李庆山. 食品与营养卫生学[M]. 北京:人民卫生出版社,1981:24.

[3] 刘素华,刘岚铮,翟明霞. 微波消解测定食品中金属元素方法的探讨[J]. 中国食品卫生杂志,2004,16(4):342-344.

[4] 范柯,王鲜俊,郎经畅. 微波消解-端视 ICP-AES 法测定食用油中的微量元素[J]. 中国食品卫生杂志,2001,13(3):16-17.

[5] 谢柏艳,定天明,吴继洲. 微波消解-氢化物发生-原子荧光光谱法测定牛奶中的砷和汞[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(5A):1-41.

[6] 边学武,马全,郭淑英. 原子荧光光谱法测定牛奶中砷和锑[J]. 中国卫生检验杂志,2007,17(11):2087-2088.

[7] 翟明霞,李自强,曹若明. 微量酸微波消解-原子荧光光谱法同时测定食品中的砷、汞[J]. 中国食品卫生杂志,2006,18(6):538-539.

[8] 杜洪凤,沈月华,张坤. 微波消解-原子荧光光谱法同时测定油脂样品中的砷、汞[J]. 中国卫生检验杂志,2005,9(15):1060-1061.

[9] 翟明霞,刘素华,李自强. 微量酸微波消解-原子荧光法直接测定食品包装纸中砷含量[J]. 中国预防医学杂志,2007,2(8):142-143.

(收稿日期:2015-02-08)



(上接第 2159 页)

IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun,2005,334(4):1092-1101.

[8] Manduteanu I, Dragomir E, Calin M, et al. Resistin up-regulates fractalkine expression in human endothelial cells; lack of additive effect with TNF-alpha[J]. Biochem Biophys Res Commun,2009,

381(1):96-101.

[9] Kaser S, Kaser A, Sandhofer A. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro[J]. Biochem Biophys Res Commun,2003,309(2):286-290.

(收稿日期:2015-04-27)