

抗凝血酶-Ⅲ对多器官功能障碍综合征大鼠细胞因子的影响

任新生 乔佑杰 夏欣华 徐杰 贾洪艳

【摘要】目的 观察抗凝血酶-Ⅲ(AT-Ⅲ)对多器官功能障碍综合征(MODS)大鼠细胞因子的影响。**方法** Wistar 大鼠 70 只随机分为 3 组:正常对照组($n=10$)、模型组($n=30$)和 AT-Ⅲ 治疗组($n=30$)。经股静脉注射脂多糖(LPS)2 次($100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 和 $200 \mu\text{g}/\text{kg}$)制备大鼠全身炎症反应综合征(SIRS)/MODS 动物模型。AT-Ⅲ 治疗组在第 2 次 LPS 攻击后 1 h 股静脉注射 AT-Ⅲ $25 \text{ U}/\text{kg}$ ($0.5 \text{ ml}/100 \text{ g}$)。正常对照组和模型组注射等量生理盐水。4 h 后取血测定内毒素(ET)、白细胞介素-1(IL-1)、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量,同时取肺、肾、肝组织进行组织病理学观察。**结果** 模型组动物血清 ET、IL-1、IL-6 和 TNF- α 水平均明显升高(P 均 < 0.01)。AT-Ⅲ 治疗后血清 ET、IL-1、IL-6 和 TNF- α 水平均明显下降,与模型组比较差异均有显著性(P 均 < 0.01),但仍显著高于正常对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);肺、肾、肝组织的病理学变化较模型组明显减轻。**结论** AT-Ⅲ 能够拮抗炎症反应,对 SIRS/MODS 具有治疗作用。

【关键词】 抗凝血酶-Ⅲ; 多器官功能障碍综合征; 白细胞介素; 肿瘤坏死因子- α ; 内毒素

Effects of antithrombin -Ⅲ on cytokines in rats with multiple organ dysfunction syndrome REN Xin-sheng, QIAO You-jie, XIA Xin-hua, XU Jie, JIA Hong-yan. Tianjin Tianhe Hospital, Tianjin 300050, China

【Abstract】Objective To observe the effect of the antithrombin -Ⅲ (AT -Ⅲ) on cytokine levels in multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in rats. **Methods** Seventy Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control group, MODS group, and AT -Ⅲ treatment group. The rats in MODS group and the treatment group were given lipopolysaccharide (LPS) two times to replicate systemic inflammatory response syndrome(SIRS)/MODS model. One hour after the injections of LPS, the rats in the treatment group were given AT -Ⅲ ($25 \text{ U}/\text{kg}$, $0.5 \text{ ml}/100 \text{ g}$) intravenously. Four hours after treatment, blood samples were collected in rats. The tissue samples were collected and preserved in formalin. By use of radioimmunoassay and histopathology, the effect of the AT -Ⅲ was observed in rats with SIRS/MODS. **Results** Endotoxin (ET), interleukin -1 (IL -1), IL -6 and tumor necrosis factor - α (TNF - α) levels were all increased significantly in MODS animals (all $P < 0.01$), and they were decreased after AT -Ⅲ treatment (all $P < 0.01$), though still higher than those of the normal controls (all $P < 0.01$). The pathologic changes in lung, kidney, and liver in the treatment group were milder than in the MODS group. **Conclusion** These data suggest that AT -Ⅲ could inhibit systemic inflammatory response and it might be used in the treatment of SIRS/MODS.

【Key words】 antithrombin -Ⅲ; multiple organ dysfunction syndrome; interleukin; tumor necrosis factor - α ; endothelin

全身炎症反应综合征(SIRS)、多器官功能障碍综合征(MODS)或脓毒症的治疗基于两个假说,分别将内毒素(ET)和机体自身产生的炎症介质归结为导致死亡的主要因素。目前国内外学者均认为 SIRS/MODS 是由细胞因子和炎性介质释放失控引起,因此,有效调节这些反应是降低病死率的关键。我们设想天然抗凝剂抗凝血酶-Ⅲ(AT-Ⅲ)在拮抗凝血,改善组织供血、供氧,纠正微循环障碍同时,应能通过抑制丝氨酸蛋白酶抑制炎症反应。

1 材料与方法

1.1 动物:健康 Wistar 大鼠 70 只(天津市医学动

物实验中心提供),雌雄不拘,体重 $200 \sim 250 \text{ g}$,实验开始 1 周前购进,整个实验过程中自由饮食。

1.2 实验材料:大肠杆菌脂多糖(LPS)O111:B4、AT-Ⅲ 均购于美国 Sigma 公司;白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和 ET 试剂盒均购自天津洁瑞公司。

1.3 动物分组及模型制备:70 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组(10 只)、模型组(30 只)和 AT-Ⅲ 治疗组(30 只)。准确称量 LPS 2 mg ,加生理盐水配制成浓度为 $50 \text{ mg}/\text{L}$ 的液体。取 AT-Ⅲ 200 U 加生理盐水稀释后配制成浓度为 $5 \text{ kU}/\text{L}$ 的液体。制模方法:参照文献[1]的 MODS 模型制作方法。用无菌手术器械分离 3 组大鼠股静脉,模型组与治疗组大鼠经股静脉注射 LPS 2 次,第 1 次剂量为

基金项目:天津市卫生局科研课题(01KY17)

作者单位:300050 天津市天和医院 ICU

作者简介:任新生(1941-),男(汉族),北京市人,主任医师。

100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (相当于 0.2 ml/100 g LPS 液), 第 2 次为 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (相当于 0.4 ml/100 g LPS 液); 正常对照大鼠间隔 12 h 股静脉注射生理盐水 2 次, 第 1 次 0.2 ml/100 g, 第 2 次 0.4 ml/100 g。模型制备过程中模型组死亡 3 只, AT-III 治疗组死亡 5 只。

1.4 给药方法: AT-III 治疗组大鼠在第 2 次 LPS 攻击后 1 h 经股静脉注射 AT-III 25 U/kg (相当于 0.5 ml/100 g AT-III 溶液); 正常对照组与模型组于相应时间经股静脉注射生理盐水 0.5 ml/100 g。

1.5 观察项目: 治疗后 4 h 收集动物血标本, 测定 IL-1、IL-6、TNF- α 、ET 含量。

1.6 病理学观察: 治疗后 4 h 摘取肺、肾、肝标本置于体积分数为 10% 的甲醛溶液保存, 固定, 常规切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 光镜下观察。

1.7 统计学处理: 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多样本间均数比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两均数比较采用 SNK- q 检验; 所有数据经 SPSS10.0 统计软件包处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验室检查(表 1): AT-III 治疗组动物血清 IL-1、IL-6、TNF- α 和血浆 ET 水平均低于模型组 (P 均 < 0.01), 表明 AT-III 能拮抗炎症反应, 对 SIRS/MODS 具有治疗作用。AT-III 治疗组血清 IL-1、IL-6、TNF- α 和血浆 ET 水平明显高于正常对照组 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 考虑可能是因为 AT-III 治疗疗程短, 大鼠机体尚未恢复正常所致。

2.2 病理组织学观察结果

2.2.1 肺组织: 正常对照组肺组织肺泡壁、肺泡腔结构正常; 模型组肺组织出现肺泡萎缩、肺泡壁增厚、泡沫细胞灶和肺出血, 肺组织出现大量炎性细胞浸润; AT-III 治疗组肺组织仅见少量红细胞及炎性细胞浸润, 肺泡壁增厚及肺泡萎缩不明显。

2.2.2 肝脏组织: 正常对照组肝组织肝细胞条索结构正常; 模型组肝组织出现肝细胞条索紊乱, 细胞浊肿, 汇管区淋巴细胞浸润; AT-III 治疗组肝组织汇管区少量淋巴细胞浸润, 肝细胞浊肿及肝细胞条索

紊乱与模型组比较有所减轻。

2.2.3 肾脏组织: 正常对照组肾组织肾小球、肾小管结构正常; 模型组肾组织肾小球、肾小管结构紊乱, 肾小球与肾小管上皮细胞浊肿, 出现炎性细胞浸润; AT-III 治疗组肾组织肾小管、肾小球细胞浊肿, 炎性细胞浸润, 肾小体结构基本恢复正常, 仅见少量炎性细胞浸润。

3 讨论

机体在致病因素直接或间接作用下, 使多种细胞活化, 过度表达, 产生和释放大量的细胞因子。这些细胞因子主要是由单核/巨噬细胞产生, 但也可由中性粒细胞、内皮细胞、成纤维细胞和自然杀伤细胞等产生^[2]。一般来讲, 炎症反应本来是机体对抗外来致病因素侵袭的保护性反应, 在时间及空间上均具有自限性, 对正常组织及远隔器官并无明显的损害作用。但如果炎症反应过于强烈, 失去控制, 促炎性细胞因子过量产生, 则可造成全身性多器官细胞广泛受损。

LPS 是一种两性分子, 从菌体释放的 LPS 以多聚体形式存在, 其与内毒素结合蛋白结合后, 解聚为单体分子, 并被转运至髓样单核细胞, 随即与细胞膜上的受体 CD14 结合, LPS-CD14 复合物可直接与跨膜受体结合, 将外源信号转入细胞内, 活化单核细胞^[3], 诱生、释放多种炎症介质, 在细胞和亚细胞水平上激发一系列级联反应或瀑布效应^[4,5], 通过这些介质直接或间接发挥局部及全身效应, 激活凝血、纤溶、补体系统, 诱发弥散性血管内凝血(DIC)^[6]及炎症反应, 引起 SIRS 或 MODS。因此 DIC 也是 SIRS/MODS 的特征之一, 炎症和凝血系统激活的交叉是临床 DIC 的标志^[7]。

在炎性细胞因子中以 TNF- α 、IL-1 和 IL-6 与 SIRS/MODS 的关系最为密切, 且其血中水平与 MODS 的发生以及严重程度有很好的相关性, 在 SIRS 早期(24 h 内)血中细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 明显升高^[8]。有资料表明, TNF- α 在急性肺损伤(acute lung injury, ALI)、SIRS 和 MODS 的发生、发展中起关键作用^[9,10]。其致病机制为: TNF- α 与

表 1 各组血浆 ET 和血清 IL-1、IL-6、TNF- α 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Levels of plasma ET and serum IL-1, IL-6, TNF- α in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	ET(ng/L)	IL-1($\mu\text{g}/\text{L}$)	IL-6(ng/L)	TNF- α ($\mu\text{g}/\text{L}$)
AT-III 治疗组	25	233.472 \pm 97.203** Δ	0.471 \pm 0.229** Δ	467.708 \pm 136.651** Δ	0.934 \pm 0.735** Δ
模型组	27	363.907 \pm 101.683 Δ	1.260 \pm 0.399 Δ	793.407 \pm 426.545 Δ	1.634 \pm 0.623 Δ
正常对照组	10	118.287 \pm 28.162	0.074 \pm 0.038	170.137 \pm 68.306	0.273 \pm 0.084

注: 与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与正常对照组比较: $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

IL-1 的协同作用使内皮细胞表面成为促凝状态,促进血栓形成^[11];TNF- α 可诱导一氧化氮(NO)大量生成,过量的 NO 可通过舒血管作用造成持续性低血压,导致微循环淤血,加重微血栓的发展,造成组织细胞缺血、缺氧;NO 的心肌抑制和细胞基因毒性效应可造成组织细胞损伤;TNF- α 还可促进大量的氧自由基产生,造成组织细胞破坏。虎晓岷等^[12]在创伤性 ALI 实验中发现,动物血浆及支气管肺泡灌洗液中 TNF- α 含量显著升高,肺、肝、心、肾均发生不同程度的病理损害,说明 TNF- α 等炎性介质参与了创伤后内脏功能损害的发生、发展过程,SIRS 是 ALI 和 MODS 的共同发病基础,ALI 是 MODS 的重要组成部分。本实验中发现,模型大鼠肺组织有损伤,出现肺出血、泡沫样变病灶及支气管周围炎性细胞浸润等改变,也可以说明 ALI 是 MODS 的一部分。肝、肾组织也出现炎性细胞浸润、细胞浊肿,但损伤程度较肺组织轻,再次说明 SIRS/MODS 发生时最先受累的器官是肺脏^[13]。

Inthorn 和 Baudo 等^[14,15]证实 AT-III 能有效治疗脓毒症,且重度低 AT-III 水平脓毒症患者的预后极差。我们以前的动物实验研究已显示,AT-III 能改善多器官功能不全动物的脏器功能,纠正凝血功能紊乱^[1]。Baudo 等^[15]在一组随机对照试验中选择 120 例血浆 AT-III 活性小于 70% 的重症脓症患者,其中 60 例补充 AT-III,与安慰剂组比较,治疗组的病死率显著下降。

AT-III 的抗炎作用机制目前尚未完全阐明。Okajima^[16]发现,AT-III 和蛋白 C 系统可抑制核转录因子- κ B(NF- κ B)和蛋白激酶-1 的激活,从而抑制丝氨酸蛋白酶本身引起的细胞炎症反应。Baudo 等^[17]发现 AT-III 与内皮细胞表面的葡胺聚糖结合诱导前列环素(PGI₂)形成,PGI₂ 能抑制细胞因子合成和白细胞-内皮细胞相互反应。用 LPS 复制鼠、兔、狗、狒狒 DIC 模型,与对照组相比,使用 AT-III 实验组除 DIC 指标改善外,血浆中 TNF- α 、IL-1、IL-2、IL-6、IL-8 等细胞因子浓度及白细胞、内皮细胞在微血管中的相互反应都受到显著抑制,重要生命器官的病理改变也明显减轻,动物存活率显著增加。由此看来,AT-III 的疗效不仅局限于对凝血过程的抑制,主要还是来自于它的抗炎作用。Totzke 等^[18]用血管平滑肌细胞研究表明,AT-III 抑制了促炎物质 TNF- α 和 IL-1 的释放。目前对 AT-III 促使血管平滑肌细胞合成、释放 TNF- α 和 IL-1 的机制尚未研究清楚,但鉴于其对 SIRS/

MODS 的潜在治疗作用,AT-III 应该被认为是抗炎的调节因子。另外,Dickneite 等^[19]用猪脓毒症模型研究表明,大剂量 AT-III 可预防血管的炎性渗出,减轻炎症反应和抑制 DIC 的发生和发展,并不会增加出血的可能性,而且还能减少死亡。

参考文献:

- 1 任新生,乔佑杰,夏欣华,等.抗凝血酶 III 防治内毒素血症致多器官功能不全的实验研究[J].中国危重病急救医学,2000,12:613-616.
- 2 Dofferhoff A S, Vellenga E, Limburg P C, et al. Tumor necrosis factor (cachectin) and other cytokines in septic shock; a review of the literature[J]. Neth J Med, 1991, 39:45-62.
- 3 Bucova M. Role of cytokines in the development of local and systemic inflammation and septic shock[J]. Vnitr Lek, 2002, 48:755-762.
- 4 Bohunn C. Inflammatory cascade response to toxin release; therapeutic perspectives[J]. Ann Pharm Fr, 2001, 59:191-197.
- 5 Levi M, de Jonge E, van der Poll T. Therapeutic intervention in disseminated intravascular coagulation; have we made any progress in the last millennium[J]? Blood Rev, 2002, 16:S29-S34.
- 6 程尉新,林洪远,盛志勇.凝血系统紊乱在多脏器功能不全综合征发病中的作用[J].中国危重病急救医学,2000,12:632-635.
- 7 Scherer R U, Spangenberg P. Procoagulant activity in patients with isolated severe head trauma[J]. Crit Care Med, 1998, 26:149-156.
- 8 Molloy R G, Mannick J A, Rodrick M L. Cytokines, sepsis and immunomodulation[J]. Br J Surg, 1993, 80:289-297.
- 9 陈兵,王洪霞,刘健,等.危重病患者 SIRS 早期细胞因子水平动态变化的研究[J].中国急救医学,2001,21:707.
- 10 崔克亮,曹书华,王今达.大承气汤对多器官功能障碍综合征防治作用的临床研究[J].中国中西医结合急救杂志,2003,10:12-15.
- 11 Kochanek P M, Hallenbeck J M. Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophages in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke[J]. Stroke, 1992, 23:1367-1379.
- 12 虎晓岷,尹文,梁继河,等.丹参对创伤性急性肺损伤治疗作用的实验研究[J].中国危重病急救医学,2000,12:515-518.
- 13 郭仓. ARDS 与 MODS 二者发病机制的相互关联性[J].中国危重病急救医学,1999,11:69-70.
- 14 Inthorn D, Hoffmann J N, Hartl W H, et al. Effect of antithrombin III supplementation on inflammatory response in patients with severe sepsis[J]. Shock, 1998, 10:90-96.
- 15 Baudo F, Caimi T M, de Cataldo F, et al. Antithrombin III (AT III) replacement therapy in patients with sepsis and/or post-surgical complications; a controlled double-blind, randomized, multicenter study[J]. Intensive Care Med, 1998, 24:336-342.
- 16 Okajima K. Regulation of inflammatory responses by natural anticoagulants[J]. Immunol Rev, 2001, 184:258-274.
- 17 Baudo F, de Cataldo F. Antithrombin III concentrates in the treatment of sepsis and septic shock; indications, limits and future prospects[J]. Minerva Anestesiol, 2000, 66:3-23.
- 18 Totzke G, Schobersberger W, et al. Effects of antithrombin III on tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β synthesis in vascular smooth muscle cells [J]. J Interferon Cytokine Res, 2001, 21:1063-1069.
- 19 Dickneite G, Kroez M. Treatment of porcine sepsis with high-dose antithrombin III reduces tissue edema and effusion but does not increase risk for bleeding [J]. Blood Coagul Fibrinolysis, 2001, 12:459-467.

(收稿日期:2005-06-21 修回日期:2005-08-04)

(本文编辑:李银平)