

5-氟尿嘧啶对重症感染大鼠细胞因子的双相调节作用

芦灵军 胥楠 陈晓理

【摘要】 目的 观察 5-氟尿嘧啶(5-FU)对重症感染大鼠致炎细胞因子和抗炎细胞因子的调节作用,探讨 5-FU 对重症感染大鼠保护作用的机制。**方法** 将 30 只健康雌性 Wistar 大鼠随机分成正常对照组、重症感染组和 5-FU 治疗组,每组 10 只。重症感染组以无菌操作技术将大肠杆菌悬液(1.8×10^{12} cfu/L)注入大鼠腹腔(10 ml/kg),制成重症感染模型;5-FU 治疗组在重症感染模型制作成功后 40 min 再经腹腔注射 5-FU (50 mg/kg)。观察各组大鼠 6 h 死亡率和腹水率,然后处死大鼠,抽取下腔静脉血测定血浆中白细胞介素-6 (IL-6)和 IL-10 的含量,称取肺组织湿重。**结果** 5-FU 治疗组大鼠 6 h 死亡率和腹水率均低于重症感染组($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$);重症感染组大鼠肺湿重较正常对照组增加($P < 0.01$),5-FU 治疗组大鼠肺湿重较重症感染组降低($P < 0.05$),并恢复到正常水平。重症感染组血浆 IL-6 和 IL-10 水平明显升高(P 均 < 0.01);5-FU 治疗组 IL-6 水平较重症感染组降低($P < 0.01$),并恢复到正常水平,IL-10 水平较重症感染组降低,但仍高于正常对照组(P 均 < 0.01)。**结论** 5-FU 可减少大鼠血浆致炎细胞因子和抗炎细胞因子的释放,减轻肺水肿,对重症感染具有保护作用。

【关键词】 5-氟尿嘧啶; 感染,重症; 动物模型; 细胞因子

Effect of 5-fluorouracil on modulation of immunity-associated cytokine during severe sepsis in rat LU Ling-jun*, XU Nan, CHEN Xiao-li. *Department of General Surgery, the First People's Hospital of Yibin City, Yibin 644000, Sichuan, China

Corresponding author: CHEN Xiao-li (Email: zeang_z@yahoo.com.cn)

【Abstract】 Objective To observe the effect of 5-fluorouracil (5-FU) on modulation of the disorders of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in the severe sepsis as a result of intra-abdominal infection in rat, and to investigate the mechanism of efficacy of 5-FU in the treatment of severe sepsis. **Methods** Thirty female Wistar rats were randomly divided into three groups: control group, severe sepsis group and 5-FU group. Healthy rats served as control ($n=10$). Severe sepsis was induced by peritoneal injection of 1.8×10^{12} cfu/L *E. coli* with the volume of 10 ml/kg body weight. In the 5-FU group, 50 mg/kg of 5-FU was injected intraperitoneally 40 minutes after severe sepsis was induced. All rats were sacrificed 6 hours after operation. The mortality and the ascites rate were assessed 6 hours after sepsis. At the same time the wet weight of the lung was measured and venous blood was collected for determination of concentrations of interleukin-6 (IL-6) and IL-10. **Results** Compared with those of severe sepsis group, the mortality and the ascites rate at 6 hours were decreased significantly in 5-FU group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). The wet weight of lung in severe sepsis group was higher significantly than that in control group ($P < 0.01$). The lung tissue wet weight in 5-FU group was lower than that of severe sepsis group ($P < 0.05$), but it showed no difference when compared with that of control group. The levels of IL-6 and IL-10 in severe sepsis group were higher significantly than those in control group (both $P < 0.01$). The level of IL-6 in 5-FU group was lower than that in severe sepsis group, but with no difference compared with that of control group. The level of IL-10 in 5-FU group was also lower than that in severe sepsis group, but higher than that in control group (both $P < 0.01$). **Conclusion** 5-FU may lower simultaneously the level of proinflammatory IL-6 and anti-inflammatory IL-10, alleviate lung edema and inflammation. 5-FU has the protective effect against severe sepsis in rat.

【Key words】 5-fluorouracil; severe sepsis; animal model; cytokine

重症感染引起的脓毒性休克和多器官功能障碍综合征(MODS)是外科重症加强治疗病房(ICU)患者主要的发病和死亡原因。20 世纪 90 年代以来,调

节炎症介质疗法先后在临床试验中失败,一个重要的原因是脓毒症的病理生理过程复杂^[1],各种细胞因子和炎症介质交织在一起相互促进或拮抗,其作用更像是网络式效应而不像是“瀑布样”级联反应,因此,企图用拮抗某一所谓早期炎症介质的方法来治疗脓毒性休克和 MODS 往往起不到预期的效果。另外,将炎症反应简单归结为一种“不受控制的自我破坏过程”实际上是不够的,因为在死于多器官功能衰竭(MOF)的患者中,促炎因子和抗炎因子都持续

基金项目:四川省宜宾市重点科技计划项目(200603012)

作者单位:644000 四川省宜宾市第一人民医院普外科(芦灵军),610041 成都,四川大学华西医院普外科(胥楠,陈晓理)

通讯作者:陈晓理,教授,Email:zeang_z@yahoo.com.cn

作者简介:芦灵军(1971-),男(汉族),河南省人,医学硕士,主治医师,Email:lingjun-lu@163.com。

保持在高水平^[2],这种不协调的刺激相互对抗,可能导致免疫细胞功能障碍,增加继发感染的几率。临床试验的失败,说明人们对机体复杂的炎症与免疫反应本质认识不足,寻找和选择适宜的监控及治疗靶点,对脓毒症患者免疫系统进行调节并改善预后,已成为现代脓毒症研究的热点和难点问题^[3]。我们前期实验研究表明,5-氟尿嘧啶(5-FU)可以缓解胰腺炎大鼠血中过高的肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)、IL-6、IL-10 和转化生长因子- β (TGF- β)等细胞因子水平,胰腺湿重和淀粉酶指标也明显好转^[4]。既然 5-FU 对非感染因素引起的急性胰腺炎具有治疗作用,那么从理论上说,它应该对感染引起的 MODS 也有治疗性作用。本研究中应用 5-FU 干预重症感染大鼠,观察其对机体的影响并探讨其治疗作用的可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料:清洁级成年健康雌性 Wistar 大鼠 30 只,体重 195~215 g,由四川大学华西动物实验中心提供。5-FU 注射液每支 250 mg(10 ml),由天津金耀氨基酸有限公司生产。大肠杆菌国际标准菌株 ATCC 25922 由四川大学华西医院检验科提供。大鼠 IL-6 定量酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自深圳晶美生物工程北京有限公司,大鼠 IL-10 定量 ELISA 试剂盒购自上海森雄科技实业有限公司。

1.2 动物分组与处理:30 只大鼠按随机数字表法分为正常对照组、重症感染组和 5-FU 治疗组,每组 10 只。重症感染组:将 1.8×10^{12} cfu/L 大肠杆菌悬液以 10 ml/kg 注入大鼠腹腔,制成重症感染模型;5-FU 治疗组在重症感染模型制作成功后 40 min 再经腹腔注射 5-FU(50 mg/kg)。

1.3 死亡率、腹水率观察及标本收集:①观察实验 6 h 后各组大鼠死亡率。②对未死亡大鼠用乙醚麻醉,剖腹观察腹水发生情况并留取腹水标本,自大鼠下腔静脉抽取静脉血约 2 ml,然后开胸取全部肺组织称重。取大鼠静脉血,离心后抽取上清液(血浆)置 1 ml 标本管于 -20℃ 冰箱内冷冻保存,待测细胞因子水平。重症感染组大鼠有 6 只死亡,其中 3 只在濒死状态下抽取静脉血失败。

1.4 细胞因子检测:采用双抗体夹心 ELISA 法,操作按试剂盒说明书进行,在酶标仪测定波长 450 nm(IL-6)和 492 nm(IL-10)处测定吸光度(A)值,绘制标准曲线,计算 IL-6 和 IL-10 的含量。

1.5 统计学处理:用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析。死亡率和腹水率采用 χ^2 检验;肺湿重、细胞因

子用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-FU 对重症感染大鼠 6 h 死亡率的影响:正常对照组大鼠饮食、活动正常,无死亡。重症感染组大鼠 1.5 h 后出现呼吸急促、精神萎靡、蜷缩无力、少食少动,继之嗜睡、呼吸减慢、口唇青紫,4.5~6 h 有 6 只相继抽搐死亡,死亡率为 60%。5-FU 治疗组大鼠仅出现蜷缩无力、活动减少等,很少有嗜睡、发绀等症状,6 h 内无死亡,死亡率为 0,显著低于重症感染组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 5-FU 对重症感染大鼠腹水率的影响:正常对照组大鼠未出现腹水。重症感染组有 9 只(90%)大鼠出现黄色、微浑浊腹水,平均腹水量 3~4 ml,腹水涂片见较多的大肠杆菌。5-FU 治疗组有 1 只(10%)大鼠出现黄色、微浑浊腹水,量约 2.5 ml,腹水涂片仅见极少量的细菌,腹水发生率显著低于重症感染组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 5-FU 对重症感染大鼠肺湿重的影响(表 1):重症感染组大鼠肺湿重较正常对照组显著增加($P < 0.01$)。5-FU 可将肺湿重恢复到正常水平。

表 1 5-FU 对大鼠肺湿重和细胞因子的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	肺湿重(g)	IL-6(ng/L)	IL-10(ng/L)
正常对照组	10	1.23 $\pm$ 0.16	14.90 $\pm$ 3.17	71.57 $\pm$ 21.76
重症感染组	7	1.55 $\pm$ 0.17 ^a	54.22 $\pm$ 15.30 ^a	178.79 $\pm$ 39.49 ^a
5-FU 治疗组	10	1.36 $\pm$ 0.14 ^b	15.75 $\pm$ 4.30 ^b	136.01 $\pm$ 31.19 ^{ab}

注:与正常对照组比较,^a $P < 0.01$;与重症感染组比较,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

2.4 5-FU 对重症感染大鼠细胞因子的影响(表 1):重症感染组大鼠 IL-6、IL-10 水平较正常对照组显著升高(P 均 < 0.01)。5-FU 治疗组 IL-6、IL-10 水平较重症感染组降低(P 均 < 0.01);但 IL-10 仍然高于正常水平($P < 0.01$),而 IL-6 水平回到正常水平。

3 讨论

脓毒症发展成为脓毒性休克和 MODS 是炎症反应失控的结果,炎症反应失控可能是 MODS 形成的根本原因和病理学基础^[5-8]。在严重创伤、休克、感染等致伤因素的刺激下,单核/巨噬细胞、内皮细胞和中性粒细胞等免疫炎性细胞相继被激活,并释放出大量炎症介质,引起全身炎症反应。在致炎介质大量释放的同时,抗炎介质的合成和释放也相应启动。脓毒症时非特异性的炎症反应普遍存在^[9-10],促炎

和抗炎介质相互促进,此消彼涨的变化促进了脓毒症向脓毒性休克和 MODS 的发展,正是早期免疫炎症性细胞的过度活化才使炎症反应得以级联和扩大。从整体上抑制过度活化的免疫炎症细胞入手来调节机体的炎症反应是治疗脓毒性休克和 MODS 的一种新思路。

血浆中 IL-6 是脓毒症和其他炎症性疾病中细胞因子被激活的重要标志,能预示 MOF 和死亡的发生。有研究发现,血清 IL-6 的峰值浓度与 TNF- α 的峰值浓度相关,与急性生理学与慢性健康状况评分系统 I (APACHE I) 评分及死亡率增加也相关^[11]。IL-10 曾被称为细胞因子合成抑制因子,它全面抑制单核/巨噬细胞、T 细胞和自然杀伤细胞(NK 细胞)的活性,同时抑制这些细胞合成和释放其他炎症细胞因子。在主要抗炎细胞因子中,IL-10 常在血液循环中出现,显示出对一系列细胞如巨噬细胞、内皮细胞、组织成纤维细胞有直接的抗炎和免疫抑制特性^[12]。本实验结果显示,重症感染时血液中的致炎细胞因子 IL-6 和抗炎细胞因子 IL-10 均显著升高,5-FU 可以减轻早期免疫炎症性细胞的过度活化,同时降低致炎细胞因子和抗炎细胞因子的水平,使整个免疫系统和炎症反应处于一种低水平的平衡状态,从而避免全身炎症反应综合征(SIRS)和代偿性抗炎反应综合征(CARS)引起的继发损害。从这一角度出发,5-FU 对重症感染的调节是一种双相作用,即同时抑制致炎细胞因子和抗炎细胞因子,从整体上减轻免疫炎症性细胞的过激反应,减轻过激炎症反应对机体的损害。

5-FU 是一种不典型的细胞周期特异性药物,对增殖细胞各期均有杀伤作用。5-FU 在体内经酶转变为 5-氟尿嘧啶脱氧核苷,与胸腺嘧啶核苷合成酶的活性中心形成共价结合,导致 DNA 的生物合成受阻;此外,它还可变成三磷酸氟尿嘧啶核苷,以伪代谢物形式掺入 RNA 中,从而干扰 RNA 的正常生理功能,影响蛋白质的生物合成。这一作用在治疗重症感染时表现为对 DNA 合成的抑制从而减少代谢活跃细胞如单核/巨噬细胞的增殖,而对 RNA 的抑制则可减少蛋白质的合成,包括减少各种细胞因子的生成和释放,甚至可能对中性粒细胞产生的多种蛋白酶类具有抑制效果,从而减少炎症过程中蛋白酶类对组织的破坏作用。本结果显示,5-FU 同时抑制了重症感染时促炎和抗炎细胞因子的活性,反映肺脏病理损害严重程度的肺湿重明显减轻,说明

5-FU 能从多层面调节和缓解重症感染的炎症损害。与使用单一拮抗某种炎症因子相比,使用 5-FU 可能是更为有效的治疗方法。

参考文献

- [1] 李春盛. 关于脓毒症治疗的哲学思考[J]. 中国危重病急救医学, 2008, 20(1): 插页.
- [2] van der Poll T, de Waal Malefyt R, Coyle SM, et al. Anti-inflammatory cytokine responses during clinical sepsis and experimental endotoxemia; sequential measurements of plasma soluble interleukin (IL)-1 receptor type II, IL-10, and IL-13[J]. J Infect Dis, 1997, 175(1): 118-122.
- [3] 姚咏明. 免疫功能紊乱在脓毒症发病中的作用及意义[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(3): 138-141.
- [4] 陈晓理, 黄兴兰, 吴浩, 等. 5-Fu 对急性胰腺炎炎症相关细胞因子的调节作用[J]. 中华外科杂志, 2001, 39(4): 271.
- [5] Bone RC. Toward a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome; what we do and do not know about cytokine regulation[J]? Crit Care Med, 1996, 24(1): 163-172.
- [6] Curran CA. Multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in the obstetric population[J]. J Perinat Neonatal Nurs, 2002, 15(4): 37-55.
- [7] Asimakopoulous G. Mechanisms of the systemic inflammatory response[J]. Perfusion, 1999, 14(4): 269-277.
- [8] Murata A, Kikuchi M, Mishima S, et al. Cytokine imbalance in critically ill patients; SIRS and CARS[J]. Nippon Geka Gakkai Zasshi, 1999, 100(7): 414-418.
- [9] 北京市科委重大项目“MODS 中西医结合诊治/降低病死率研究”课题组. 多器官功能障碍综合征/严重脓毒症的中西医结合治疗方案[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(10): 577-579.
- [10] Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis[J]. N Engl J Med, 2003, 348(2): 138-150.
- [11] Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, et al. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(3): 396-402.
- [12] Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, et al. Interleukin 10[J]. Annu Rev Immunol, 1993, 11: 165-190.

(收稿日期: 2008-03-12 修回日期: 2008-04-03)

(本文编辑: 李银平)

• 广告目次 •

- ①深圳迈瑞: 监护仪 (封二)
- ②天津生化制药: 琥珀氢可 (插页)
- ③廊坊爱尔: 炭肾 (插页)
- ④恩华药业: 力月西 (插页)
- ⑤日本旭化成株式会社: 全自动
和持续徐缓式血液净化装置 (插页)
- ⑥广东天普药业: 天普洛安 (插页)
- ⑦珠海丽珠: 丽珠血液灌流器 (插页)
- ⑧天津红日药业: 血必净注射液 (插页)
- ⑨德尔格: SmartCare™ 智能化
自动脱机系统 (封三)
- ⑩瑞士雅培: i-STAT 血液分析仪 (封底)