

生长抑素对内毒素致小鼠急性肺损伤中炎症反应的影响和机制

徐丽艳 刘瑶 韩文文 南超 李冬 洪广亮 赵光举 卢中秋

【摘要】 目的 探讨生长抑素(SST)对内毒素致急性肺损伤(ALI)小鼠炎症反应的影响及其机制。**方法** 将72只SPF级雄性ICR小鼠按随机数字表法分为对照组、SST对照组、模型组和SST干预组,每组18只。采用腹腔注射内毒素40 mL/kg制备ALI模型,对照组则给予等量生理盐水;SST干预组于制模后0.5、2、6、12 h皮下注射SST(20 μ g, 20 mL/kg)。各组于首次给药后3、8、16 h分别取6只小鼠取血后活杀,用烘干法测定肺组织湿/干质量(W/D)比值;光镜下观察肺组织病理学改变;用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清SST、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-6、IL-10)的含量;采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)及蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织Toll样受体4(TLR4)和核转录因子- κ Bp65(NF- κ Bp65)的mRNA及蛋白表达。**结果** 对照组与SST对照组小鼠各指标比较差异均无统计学意义。与对照组比较,模型组肺组织W/D比值,血清SST、TNF- α 、IL-6、IL-10水平,肺组织TLR4、NF- κ Bp65的mRNA及蛋白表达均明显升高,其中W/D比值、IL-6、IL-10及TLR4的mRNA和蛋白表达均于16 h达峰值[W/D比值:6.32 $\pm$ 0.18比4.14 $\pm$ 0.14, IL-6 (ng/L):673.78 $\pm$ 56.13比50.17 $\pm$ 7.06, IL-10 (ng/L):481.13 $\pm$ 40.78比61.71 $\pm$ 10.05, TLR4 mRNA:0.740 $\pm$ 0.099比0.183 $\pm$ 0.021, TLR4蛋白:0.935 $\pm$ 0.067比0.222 $\pm$ 0.019, 均 $P < 0.05$], SST、TNF- α 及NF- κ Bp65的mRNA和蛋白表达均于8 h达峰值[SST (ng/L):254.97 $\pm$ 38.75比95.87 $\pm$ 13.95, TNF- α (ng/L):139.69 $\pm$ 19.06比21.90 $\pm$ 4.52, NF- κ Bp65 mRNA:0.753 $\pm$ 0.065比0.208 $\pm$ 0.029, NF- κ Bp65蛋白:1.214 $\pm$ 0.079比0.303 $\pm$ 0.067, 均 $P < 0.05$]。与模型组比较, SST干预组小鼠肺组织损伤程度明显减轻,除血清SST呈持续增加趋势外,其余指标均明显降低[16 h W/D比值:5.21 $\pm$ 0.14比6.32 $\pm$ 0.18, 8 h TNF- α (ng/L):80.48 $\pm$ 8.52比139.69 $\pm$ 19.06, 16 h IL-6 (ng/L):394.99 $\pm$ 37.17比673.78 $\pm$ 56.13, 16 h IL-10 (ng/L):326.95 $\pm$ 36.41比481.13 $\pm$ 40.78, 16 h TLR4 mRNA:0.240 $\pm$ 0.028比0.740 $\pm$ 0.099, 16 h TLR4蛋白:0.618 $\pm$ 0.066比0.935 $\pm$ 0.067, 8 h NF- κ Bp65 mRNA:0.240 $\pm$ 0.045比0.753 $\pm$ 0.065, 8 h NF- κ Bp65蛋白:0.784 $\pm$ 0.041比1.214 $\pm$ 0.079, 均 $P < 0.05$]。**结论** SST干预后对内毒素诱导的ALI小鼠炎症因子释放及组织因子基因、蛋白表达均起到明显的抑制作用;其机制可能是通过阻断TLR4-NF- κ B信号通路,从而减轻肺组织炎症反应。

【关键词】 急性肺损伤; 生长抑素; Toll样受体4; 核转录因子- κ B

Influences and mechanisms of somatostatin on inflammation in endotoxin-induced acute lung injury mice

Xu Liyan, Liu Yao, Han Wenwen, Nan Chao, Li Dong, Hong Guangliang, Zhao Guangju, Lu Zhongqiu. Department of Emergency, the First Affiliated Hospital, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, Zhejiang, China

Corresponding author: Lu Zhongqiu, Email: lzq640815@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of somatostatin on inflammation in endotoxin-induced acute lung injury mice and its underlying mechanisms. **Methods** 72 ICR male mice of specific pathogen free (SPF) were randomly divided into four groups: control group, SST control group, model group and SST intervention group, each group included 18 mice. The ALI model was reproduced by intraperitoneal injection of 40 mL/kg endotoxin, and the mice in control group was given intraperitoneal injection of equivalent normal saline. The mice in SST intervention group was given the subcutaneous injection of SST (20 μ g, 20 mL/kg) at 0.5, 2, 6 and 12 hours after model reproduction. Six mice were sacrificed at 3, 8 and 16 hours after the first injection of LPS or NS. The lung wet/dry ratio (W/D) was calculated with oven drying method. Pathological changes in lung tissues were observed by light microscope. Serum SST, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukins (IL-6, IL-10) levels were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The mRNA and protein expressions of Toll like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor- κ Bp65 (NF- κ Bp65) were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot. **Results** There were no significant differences in above indexes between control group and SST control

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.05.006

基金项目:浙江省“十二五”重点学科建设计划资助(2012-207);浙江省医学创新学科建设计划(11-CX26);浙江省中医药重点学科建设计划(2012-XK-A28);浙江省温州市高层次人才创新技术重点资助项目

作者单位:325000 浙江,温州医科大学附属第一医院急诊科

通信作者:卢中秋, Email: lzq640815@163.com

group. Compared with control group, lung W/D ratio, serum SST, TNF- α , IL-6, IL-10, and the mRNA and protein expressions of TLR4 and NF- κ Bp65 in model group were significantly increased. The W/D ratio, IL-6, IL-10, and the mRNA and protein expressions of TLR4 all peaked at 16 hours [W/D ratio: 6.32 ± 0.18 vs. 4.14 ± 0.14 , IL-6 (ng/L): 673.78 ± 56.13 vs. 50.17 ± 7.06 , IL-10 (ng/L): 481.13 ± 40.78 vs. 61.71 ± 10.05 , TLR4 mRNA: 0.740 ± 0.099 vs. 0.180 ± 0.028 , TLR4 protein: 0.935 ± 0.067 vs. 0.222 ± 0.019 , all $P < 0.05$], and SST, TNF- α , the mRNA and protein expressions of NF- κ Bp65 peaked at 8 hours [SST (ng/L): 254.97 ± 38.75 vs. 95.87 ± 13.95 , TNF- α (ng/L): 139.69 ± 19.06 vs. 21.90 ± 4.52 , NF- κ Bp65 mRNA: 0.753 ± 0.065 vs. 0.190 ± 0.026 , NF- κ Bp65 protein: 1.214 ± 0.079 vs. 0.303 ± 0.067 , all $P < 0.05$]. Compared with model group, the lung injury in SST intervention group was significantly improved, and the indexes were significantly decreased except for serum SST which was gradually increased [16-hour W/D ratio: 5.21 ± 0.14 vs. 6.32 ± 0.18 , 8-hour TNF- α (ng/L): 80.48 ± 8.52 vs. 139.69 ± 19.06 , 16-hour IL-6 (ng/L): 394.99 ± 37.17 vs. 673.78 ± 56.13 , 16-h IL-10 (ng/L): 326.95 ± 36.41 vs. 481.13 ± 40.78 , 16-hour TLR4 mRNA: 0.240 ± 0.028 vs. 0.740 ± 0.099 , 16-hour TLR4 protein: 0.618 ± 0.066 vs. 0.935 ± 0.067 , 8-hour NF- κ Bp65 mRNA: 0.240 ± 0.045 vs. 0.753 ± 0.065 , 8-hour NF- κ Bp65 protein: 0.784 ± 0.041 vs. 1.214 ± 0.079 , all $P < 0.05$]. **Conclusion** SST has significant protective effects on endotoxin-induced ALI via direct suppression of the TLR4-NF- κ B cytokine pathway, thus alleviate lung tissue inflammation.

[Key words] Acute lung injury; Somatostatin; Toll-like receptor 4; Nuclear factor- κ B

急性肺损伤(ALI)是临床常见的急危重症,进一步可发展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS),虽然采用了有效的抗菌药物、糖皮质激素及机械通气等措施,ALI的病死率仍居高不下^[1-2]。革兰阴性(G⁻)细菌感染和内毒素血症是导致ALI发生的重要病因。有研究证实,细菌内毒素能够激活Toll样受体4(TLR4),TLR4-核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路介导的炎症反应失控是导致ALI发生的关键环节。生长抑素(SST)能够抑制免疫过度激活,减轻炎症反应,已经广泛应用于胰腺炎等疾病的治疗中,但其对ALI的影响和机制尚不明确^[3]。本研究通过建立小鼠ALI模型,观察SST对ALI的保护作用,分析肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-6、IL-10)等炎症因子的表达变化及其与TLR4-NF- κ B通路的本质联系,从而为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要实验试剂:注射用SST(瑞士默克雪兰诺公司);内毒素(L2880型,美国Sigma公司);小鼠SST、TNF- α 、IL-6、IL-10酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海西唐生物科技有限公司);RNA提取试剂盒TRIzol Reagent(美国Invitrogen公司);逆转录试剂盒、聚合酶链反应(PCR)试剂盒(美国Fermentas公司);抗小鼠TLR4一抗(美国Santa cruz公司);NF- κ Bp65兔抗鼠多克隆抗体(美国Abcam公司);BCA蛋白浓度测定试剂盒,核蛋白抽取试剂盒,组蛋白H₂A抗体(HistoneH₂A)一抗,羊抗鼠IgG二抗和羊抗兔二抗(上海碧云天生物技术研究);三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)鼠单克隆抗体(杭州贤至生物科技有限公司);电化学发光(ECL)液(美国Thermo scientific公司)等。

1.2 动物分组与处理:SPF级雄性ICR小鼠72只,

18~22 g,由温州医科大学动物实验中心提供,动物合格证号:SCXK(2010-0044)。实验前8 h禁食、4 h禁水。按随机数字表法分为对照组、SST对照组、模型组和SST干预组,每组18只。对照组腹腔注射生理盐水40 mL/kg;SST对照组腹腔注射生理盐水后于0.5、2、6、12 h皮下注射SST(20 μ g,20 mL/kg);模型组腹腔注射内毒素(12 mg,40 mL/kg);SST干预组腹腔注射内毒素后0.5、2、6、12 h皮下注射SST(20 μ g,20 mL/kg)。

本研究动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 指标检测及方法:各组于首次给药后3、8、16 h分别取6只小鼠活杀留取标本。摘除眼球取血,离心取上清,冻存于-20 $^{\circ}$ C备用;取左下肺组织,用于观察病理学改变;取右肺中叶,用于测定肺组织湿/干质量(W/D)比值;余下肺组织,冻存管分装,-70 $^{\circ}$ C冰箱冻存备用。

1.3.1 烘干法测定肺组织W/D比值:开胸取出右肺中叶,滤纸吸干表面血液,称量湿质量后,于80 $^{\circ}$ C烘烤48 h至恒重,称其干质量,计算W/D比值。

1.3.2 观察肺组织病理学改变:取出固定于4%多聚甲醛中的肺组织,石蜡包埋、连续切片、苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织病理学改变。

1.3.3 ELISA法检测血清SST、TNF- α 、IL-6、IL-10水平:采用双抗体夹心ABC-ELISA法检测血清SST、TNF- α 、IL-6、IL-10水平,按照试剂盒说明书操作。

1.3.4 RT-PCR法检测肺组织TLR4和NF- κ Bp65的mRNA表达:按照RT-PCR试剂盒说明书操作,提取肺组织总RNA进行检测。TLR4、NF- κ Bp65、 β -肌动蛋白(β -actin)引物由上海基康生物有限公司合成。TLR4正义链:5'-AGTCCTGATGACATTCC TTCTT-3,反义链:5'-CAAGTTTGAGAGGTGGTGA

AGC-3', 产物大小 181 bp; NF- κ Bp65 正义链: 5'-AGGACCTATGAGACCTTCAAGAGTATC-3', 反义链: 5'-GTGCTGAGGGATGCTGGGA-3', 产物大小 161 bp; β -actin 正义链: 5'-AGAGGGAAATCGTGCCTGAC-3', 反义链: 5'-GAGGTCTTTACGGATGTCAACG-3', 产物大小 266 bp。4% 琼脂糖电泳检测 PCR 产物, 凝胶图像分析仪扫描图像, 并进行吸光度(A)分析, 以目的基因与内参 β -actin 基因的 A 值比值表示。

1.3.5 蛋白质免疫印迹试验 (Western Blot) 检测肺组织 TLR4 和 NF- κ Bp65 的蛋白表达: 按照细胞核抽提试剂盒说明书提取肺组织核蛋白和胞质蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, Western Blot 法检测 TLR4 和 NF- κ Bp65 的蛋白表达。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离胶浓度 8%, 浓缩胶浓度 3%。凝胶成像分析系统扫描胶片, Quantity One 分析软件分析条带, 以目的蛋白与内参 GAPDH 或 Histone H₂A 蛋白的 A 值比值表示。

1.4 统计学处理: 采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD-*t* 检验, 方差不齐则进行秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ALI 小鼠行为学改变及 SST 的影响: 对照组和 SST 对照组小鼠皮毛光滑, 反应敏捷, 呼吸平稳, 活动自如。模型组小鼠皮毛粗糙无光, 呼吸急促, 精神萎靡, 蜷缩少动, 嗜睡, 进食、饮水减少, 口唇、肢端紫绀, 眼周血性分泌物明显增多, 随时间推移, 症状逐渐加重。SST 干预组小鼠症状较模型组明显减轻。

2.2 ALI 小鼠肺组织 W/D 比值变化及 SST 的影响 (表 1): 4 组小鼠 3 h 时肺组织 W/D 比值差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与对照组相比, 模型组 8 h、16 h 时肺组织 W/D 比值增高明显 (均 $P < 0.05$); 与模型组比较, SST 干预组 8 h、16 h 时肺组织 W/D 比值明显下降 (均 $P < 0.05$)。

表 1 SST 对急性肺损伤小鼠首次给药后各时间点肺组织湿/干质量比值的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	湿/干质量比值		
		3 h	8 h	16 h
对照组	6	4.15 $\pm$ 0.13	4.17 $\pm$ 0.10	4.14 $\pm$ 0.14
SST 对照组	6	4.13 $\pm$ 0.16	4.13 $\pm$ 0.09	4.15 $\pm$ 0.08
模型组	6	4.32 $\pm$ 0.23	5.66 $\pm$ 0.22 ^a	6.32 $\pm$ 0.18 ^a
SST 干预组	6	4.26 $\pm$ 0.26	5.16 $\pm$ 0.16 ^b	5.21 $\pm$ 0.14 ^b
F 值		1.047	152.658	339.953
P 值		0.394	0.000	0.000

注: SST 为生长抑素; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较,

^b $P < 0.05$

2.3 ALI 小鼠肺组织病理学改变及 SST 的影响 (图 1): 对照组和 SST 对照组小鼠肺组织细胞结构清楚, 肺泡壁薄, 边缘完整, 肺泡腔内无液体和炎性细胞, 肺间质无炎性渗出。模型组小鼠肺组织充血, 肺泡塌陷, 肺泡隔增厚, 部分肺泡腔内可见液体渗出, 肺间质水肿, 可见大量炎性细胞浸润, 随时间推移逐渐加重, 16 h 时损害最明显。SST 干预组小鼠肺组织损伤程度较模型组明显减轻。

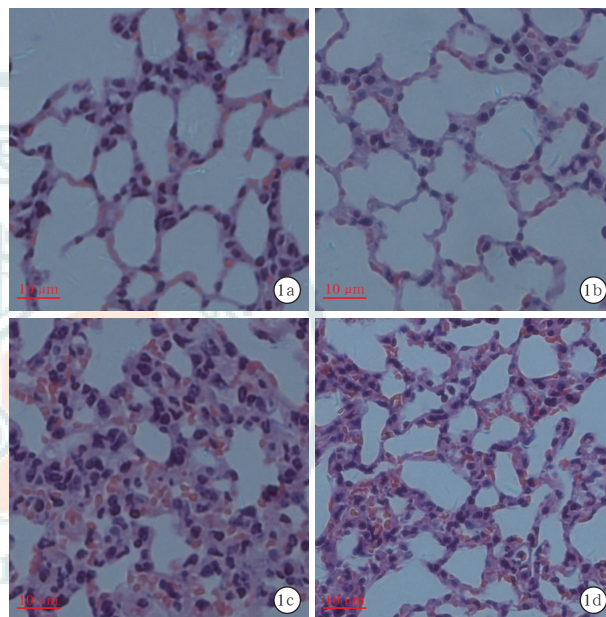


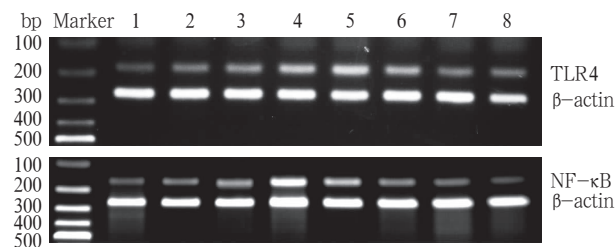
图 1 光镜下观察生长抑素(SST)对急性肺损伤(ALI)小鼠肺组织病理学改变的影响 对照组(a)和 SST 对照组(b)小鼠肺组织细胞结构清楚, 肺泡壁薄, 边缘完整, 肺泡腔内无液体和炎性细胞, 肺间质无炎性渗出; 模型组(c)16 h 时小鼠肺组织充血, 肺泡塌陷, 肺泡隔增厚, 部分肺泡腔内可见液体渗出, 肺间质水肿, 可见大量炎性细胞浸润; SST 干预组(d)16 h 时小鼠肺组织充血程度减轻, 肺泡塌陷, 炎性细胞浸润程度较模型组明显减轻, 肺间质水肿程度也有所减轻 HE 染色 高倍放大

2.4 ALI 小鼠血清 SST、TNF- α 、IL-6、IL-10 变化及 SST 的影响 (表 2): 与对照组比较, 模型组各时间点血清 SST、TNF- α 、IL-6、IL-10 水平均明显升高 (均 $P < 0.05$), 其中 SST、TNF- α 于 8 h 达峰值, IL-6、IL-10 于 16 h 达峰值。与模型组比较, SST 干预组各时间点血清 TNF- α 、IL-6 水平均明显降低, IL-10 则于 3 h、8 h 时显著升高, 16 h 时显著降低 (均 $P < 0.05$)。

2.5 ALI 小鼠肺组织 TLR4、NF- κ Bp65 的 mRNA 表达变化及 SST 的影响 (表 3; 图 2): 对照组和 SST 对照组肺组织 TLR4、NF- κ Bp65 的 mRNA 均呈低表达状态, 且两组比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。与对照组比较, 模型组各时间点肺组织 TLR4、

NF- κ Bp65 的 mRNA 表达均显著增高(均 $P<0.05$), 分别于 16 h、8 h 达峰值。与模型组比较, SST 干预组 8 h、16 h 时肺组织 TLR4、NF- κ Bp65 的 mRNA 表达均明显降低(均 $P<0.05$)。

2.6 ALI 小鼠肺组织 TLR4、NF- κ Bp65 的蛋白表达变化及 SST 的影响(表 3; 图 3): 对照组和 SST 对照组肺组织 TLR4、NF- κ Bp65 的蛋白表达较少, 两组比较差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。与对照组比较, 模型组各时间点肺组织 TLR4、NF- κ Bp65 的蛋白表达均显著增高(均 $P<0.05$), 分别于 16 h、8 h 达峰值。与模型组比较, SST 干预组各时间点肺组织 TLR4、NF- κ Bp65 的蛋白表达均明显降低



RT-PCR 为逆转录-聚合酶链反应, TLR4 为 Toll 样受体 4, NF- κ B 为核转录因子- κ B, β -actin 为 β -肌动蛋白; 1 为对照组, 2 为 SST 对照组, 3~5 为模型组 3、8、16 h, 6~8 为 SST 干预组 3、8、16 h

图 2 RT-PCR 检测急性肺损伤小鼠首次给药后各时间点肺组织 TLR4、NF- κ Bp65 的 mRNA 表达

(均 $P<0.05$)。

表 2 SST 对急性肺损伤小鼠首次给药后各时间点血清 SST、TNF- α 、IL-6、IL-10 变化的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	SST (ng/L)			TNF- α (ng/L)		
		3 h	8 h	16 h	3 h	8 h	16 h
对照组	6	88.79 $\pm$ 17.59	95.87 $\pm$ 13.95	90.27 $\pm$ 11.33	19.84 $\pm$ 2.95	21.90 $\pm$ 4.52	20.51 $\pm$ 4.31
SST 对照组	6	426.57 $\pm$ 62.83	608.84 $\pm$ 73.62	714.26 $\pm$ 56.69	21.11 $\pm$ 4.53	20.96 $\pm$ 3.11	19.59 $\pm$ 3.62
模型组	6	158.70 $\pm$ 32.87 ^a	254.97 $\pm$ 38.75 ^a	188.38 $\pm$ 30.02 ^a	67.65 $\pm$ 7.66 ^a	139.69 $\pm$ 19.06 ^a	70.25 $\pm$ 11.85 ^a
SST 干预组	6	391.06 $\pm$ 40.09	615.49 $\pm$ 76.93	671.46 $\pm$ 50.04	41.99 $\pm$ 4.83 ^b	80.48 $\pm$ 8.52 ^b	31.94 $\pm$ 5.99 ^b
F 值		58.022	258.834	379.411	108.516	164.981	23.522
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

组别	动物数 (只)	IL-6 (ng/L)			IL-10 (ng/L)		
		3 h	8 h	16 h	3 h	8 h	16 h
对照组	6	51.26 $\pm$ 8.56	53.84 $\pm$ 10.29	50.17 $\pm$ 7.06	62.88 $\pm$ 10.03	60.14 $\pm$ 11.52	61.71 $\pm$ 10.05
SST 对照组	6	50.95 $\pm$ 8.15	54.81 $\pm$ 8.65	49.75 $\pm$ 9.44	61.74 $\pm$ 10.27	63.72 $\pm$ 12.81	60.63 $\pm$ 7.69
模型组	6	237.37 $\pm$ 22.54 ^a	464.25 $\pm$ 22.35 ^a	673.78 $\pm$ 56.13 ^a	216.95 $\pm$ 27.91 ^a	322.96 $\pm$ 26.43 ^a	481.13 $\pm$ 40.78 ^a
SST 干预组	6	196.81 $\pm$ 29.37 ^b	291.47 $\pm$ 33.29 ^b	394.99 $\pm$ 37.17 ^b	273.32 $\pm$ 16.41 ^b	410.53 $\pm$ 28.13 ^b	326.95 $\pm$ 36.41 ^b
F 值		150.295	534.901	468.433	223.345	433.244	326.323
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

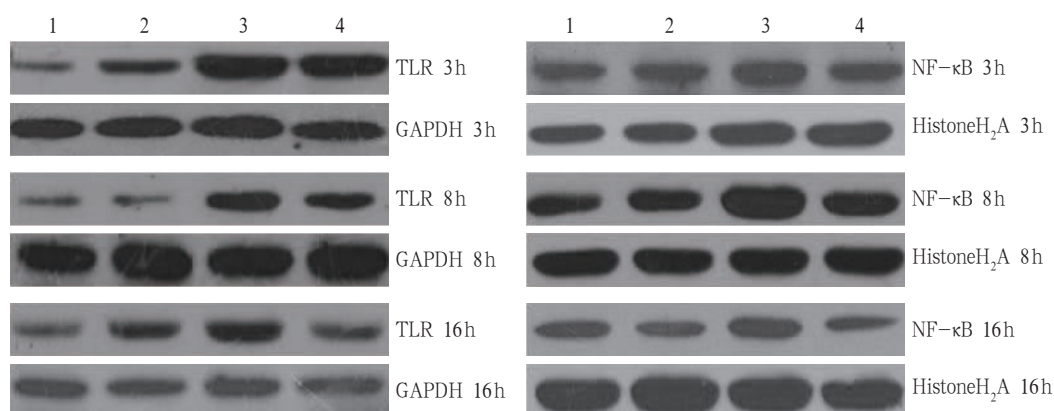
注: SST 为生长抑素, TNF- α 为肿瘤坏死因子- α , IL-6 为白细胞介素-6, IL-10 为白细胞介素-10; 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$

表 3 SST 对急性肺损伤小鼠首次给药后各时间点 TLR4、NF- κ Bp65 的 mRNA 和蛋白表达变化的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	TLR4 mRNA			NF- κ Bp65 mRNA		
		3 h	8 h	16 h	3 h	8 h	16 h
对照组	6	0.180 $\pm$ 0.029	0.191 $\pm$ 0.019	0.183 $\pm$ 0.021	0.190 $\pm$ 0.026	0.208 $\pm$ 0.029	0.195 $\pm$ 0.023
SST 对照组	6	0.218 $\pm$ 0.034	0.228 $\pm$ 0.027	0.231 $\pm$ 0.025	0.226 $\pm$ 0.032	0.240 $\pm$ 0.037	0.221 $\pm$ 0.032
模型组	6	0.441 $\pm$ 0.040 ^a	0.585 $\pm$ 0.087 ^a	0.740 $\pm$ 0.099 ^a	0.420 $\pm$ 0.049 ^a	0.753 $\pm$ 0.065 ^a	0.546 $\pm$ 0.063 ^a
SST 干预组	6	0.410 $\pm$ 0.035	0.270 $\pm$ 0.024 ^b	0.240 $\pm$ 0.028 ^b	0.380 $\pm$ 0.031	0.240 $\pm$ 0.045 ^b	0.190 $\pm$ 0.059 ^b
F 值		63.406	73.623	161.866	54.791	188.968	82.966
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

组别	动物数 (只)	TLR4 蛋白			NF- κ Bp65 蛋白		
		3 h	8 h	16 h	3 h	8 h	16 h
对照组	6	0.202 $\pm$ 0.025	0.193 $\pm$ 0.012	0.222 $\pm$ 0.019	0.271 $\pm$ 0.045	0.303 $\pm$ 0.067	0.283 $\pm$ 0.032
SST 对照组	6	0.217 $\pm$ 0.020	0.206 $\pm$ 0.031	0.198 $\pm$ 0.022	0.302 $\pm$ 0.022	0.305 $\pm$ 0.063	0.252 $\pm$ 0.078
模型组	6	0.417 $\pm$ 0.052 ^a	0.814 $\pm$ 0.069 ^a	0.935 $\pm$ 0.067 ^a	0.672 $\pm$ 0.035 ^a	1.214 $\pm$ 0.079 ^a	0.832 $\pm$ 0.028 ^a
SST 干预组	6	0.321 $\pm$ 0.026 ^b	0.402 $\pm$ 0.038 ^b	0.618 $\pm$ 0.066 ^b	0.401 $\pm$ 0.025 ^b	0.784 $\pm$ 0.041 ^b	0.608 $\pm$ 0.050 ^b
F 值		54.082	326.840	301.719	176.362	277.485	168.459
P 值		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: SST 为生长抑素, TLR4 为 Toll 样受体 4, NF- κ B 为核转录因子- κ B; 与对照组比较, ^a $P<0.05$; 与模型组比较, ^b $P<0.05$



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验,TLR4 为 Toll 样受体 4,NF- κ B 为核转录因子 κ B,GAPDH 为三磷酸甘油醛脱氢酶,HistoneH₂A 为组蛋白 H₂A 抗体;1 为对照组,2 为 SST 对照组,3 为模型组,4 为 SST 干预组

图 3 Western Blot 检测急性肺损伤小鼠首次给药后各时间点肺组织 TLR4、NF- κ Bp65 的蛋白表达

3 讨论

ALI 的主要机制是由于 G-菌脂多糖(LPS)活化炎性细胞,导致肺部炎症反应失控,表现为肺泡-毛细血管的急性弥漫性损伤^[4]。本实验中观察到模型组小鼠肺组织 W/D 比值明显提高,提示有肺水肿。病理观察肺组织体积增大,光镜下可见肺泡塌陷,肺间质水肿以及炎性细胞浸润,进一步证实腹腔注射 LPS 致使小鼠 ALI 的发生。

业已证明,促炎细胞因子与抗炎细胞因子之间的失衡可能是脓毒症致 ALI 的重要原因^[5]。机体在各种致病因子打击下,释放出大量炎症因子,引起全身炎症反应综合征(SIRS),同时发生代偿性抗炎反应综合征(CARS),即美国学者 Bone 等^[6]提出的混合型抗炎反应综合征(MARS)假说。这一假说认为,如果促炎与抗炎二者处于动态平衡,机体不会出现 ALI 和 ARDS;如果 SIRS 失控,平衡被打破,则导致 ALI 和 ARDS;如果 CARS 强度明显超过 SIRS,则说明出现免疫抑制或免疫麻痹。TNF- α 在全身性炎症反应的早期即迅速合成,是导致机体失控性炎症反应和组织损害的关键介质,LPS 刺激单核/巨噬细胞可引起 TNF- α 迅速合成与释放,进而诱导 IL-1、IL-6、前列腺素等的分泌^[7-8]。IL-6 在 SIRS 患者血清中常呈现高表达,且可能与预后不良相关^[9]。IL-10 是机体分泌的重要的抗炎因子,能全面抑制单核/巨噬细胞等合成与释放炎症因子,是调控免疫抑制的关键因素^[10]。本研究表明,注射内毒素后小鼠血清 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 水平均显著升高,分别于 8、16、16 h 达峰值,ALI 中促炎和抗炎因子同时存在,说明二者均参与了 ALI 的致病过程。业已证明,过度的炎症反应能影响 T 细胞的功能分化^[11-12],辅助性 T 细胞 2(Th2)呈现高分泌状态,使抗炎因子

IL-10、IL-4 等释放增加,打破了促炎与抗炎平衡,出现低炎和免疫抑制状态。此时机体无法有效调控特异性免疫反应,易发生二次感染致使病情加重^[13]。

LPS 致使机体发生炎症反应,但其信号由胞外向胞内的转导机制一直不明确,近年 TLR4 的发现提供了新的线索。TLRs 作为一种典型的模式识别受体,对启动细胞固有免疫起到了关键作用。在用内毒素攻击复制小鼠 ALI 模型中,TLR4 突变型小鼠比野生型小鼠肺水肿程度以及髓过氧化物酶(MPO)水平都有所减轻^[14]。LPS 对 TLR4 表现出较高的亲合性^[15-17],其首先与 LPS 结合蛋白(LBP)形成复合物,然后与巨噬细胞上的髓样分化蛋白-2(MD2)和 CD14 分子结合,激活 TLR4。活化的 TLR4 通过髓样分化因子 88(MyD88)依赖型和非依赖型两条信号通路起作用^[18]。内毒素通过活化 MyD88 依赖型途径快速激活 NF- κ B,并促进炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的释放。非依赖型 MyD88 通路激活可引起干扰素快速释放并最终继发激活 NF- κ B^[19]。NF- κ B 是体内重要的转录因子,在静息状态下,与其抑制蛋白(I κ B)结合成三聚体存在于胞质中。内毒素、炎症因子等刺激使 I κ B 泛素化降解,NF- κ B 二聚体进入胞核,与靶基因启动子上的 κ B 位点结合,启动 TNF- α 、IL-6、IL-10 等细胞因子的基因表达,同时释放的细胞因子又使其进一步活化,通过正反馈,加速肺泡炎症的恶化^[20]。研究表明,注射 LPS 后,小鼠肺组织 NF- κ B 活性明显增高,表明 NF- κ B 的活化参与了 ALI 的发病过程^[21]。本实验结果显示,与对照组和 SST 对照组比较,模型组小鼠肺组织 TLR4 和 NF- κ Bp65 的表达均明显增加,分别于 16 h 和 8 h 达峰值,说明 TLR4-NF- κ B 通路参与了 ALI 的炎症反应,通过调控下游炎症因子的分泌和释放发挥重

要作用。

SST 是一种广泛分布于脑、胃肠道、内外分泌腺等组织的环状多肽,通过与细胞膜上的 SST 受体结合而发挥多种生物学效应。当机体遭受化学或电刺激时,辣椒素敏感的伤害性感受神经末端会释放 SST,随后进入血液循环,诱导机体产生抗炎和镇痛的作用^[22]。Suto 等^[23]研究显示,手术和脓毒症可以明显增加血中生长抑素样物质的表达,本实验也证实,腹腔注射 LPS 后,小鼠血清 SST 含量有所升高。但此时机体炎症反应仍很明显,提示通过外源性补充 SST 可能会有较好效果。在猕猴小肠缺血/再灌注模型中,SST 可以通过调控 TLR4-NF- κ B 通路,降低炎症因子的释放,改善预后^[24]。研究表明,SST 主要通过抑制 P 物质的释放或者对抗其活性发挥抗炎作用^[19]。P 物质可以引起动脉扩张,血浆蛋白外渗,毛细血管后小动脉白细胞蓄积,刺激免疫细胞等释放炎症因子,并可通过激活细胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2)来激活 NF- κ B^[25]。另外,SST 能够抑制免疫细胞的分泌活性,抑制活性 B 细胞合成免疫球蛋白,活性 T 细胞合成细胞因子,抑制单核细胞释放炎症细胞因子^[26]。随着这些介质分泌的减少,SST 受体的表达也发生相应变化,通过反馈,调节机体的免疫效应。本研究证实,与模型组相比,SST 干预组小鼠肺组织病理损害减轻,血清 TNF- α 、IL-6 含量降低,在 3 h 和 8 h 时 IL-10 水平较高,但 16 h 时出现降低趋势,肺组织 TLR4、NF- κ B 表达降低。

综上所述,SST 具有抗炎和免疫调节的双重功能,通过下调 TLR4-NF- κ B 通路的表达活性,使机体促炎与抗炎作用在较低水平达到一种平衡,从而缓解小鼠的 ALI。

参考文献

- [1] Bernard GR. Acute respiratory distress syndrome: a historical perspective [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172(7):798-806.
- [2] 姚咏明,黄立峰,林洪远.《2008 国际严重脓毒症和脓毒性休克治疗指南》概要 [J]. *中国危重病急救医学*, 2008, 20(3): 135-138.
- [3] 立彦,夏伟,瞿卫,等.生长抑素及其受体的研究与临床应用现状 [J]. *国外医学临床生物化学与检验学分册*, 2004, 25(6): 529-531, 535.
- [4] 李峥,黄华,陈凤坤,等.甘草酸二铵与黄芪注射液治疗急性肺损伤疗效分析 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2013, 20(4): 213-215.
- [5] 吴荣谦,宋旭华,徐迎新,等.促炎及抗炎细胞因子在脓毒症肺损伤中的作用 [J]. *军医进修学院学报*, 2000, 2(1):14-16.
- [6] Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine [J]. *Chest*, 1992, 101(6):1644-1655.
- [7] 杨丽萍,姚咏明,盛志勇.脓毒症发病的炎症反应与免疫紊乱机制 [J]. *感染、炎症、修复*, 2008, 9(1):48-51.
- [8] Marsh CB, Wewers MD. The pathogenesis of sepsis. Factors that modulate the response to gram-negative bacterial infection [J]. *Clin Chest Med*, 1996, 17(2):183-197.
- [9] 梅雪,李春盛,王烁.全身炎症反应综合征患者血清细胞因子动态变化的研究 [J]. *中国危重病急救医学*, 2006, 18(2):85-88.
- [10] Hawkins DL, MacKay RJ, MacKay SL, et al. Human interleukin 10 suppresses production of inflammatory mediators by LPS-stimulated equine peritoneal macrophages [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998, 66(1):1-10.
- [11] 刘艳存,柴艳芬,姚咏明.巨噬细胞在脓毒症发病机制中的作用研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25(4):247-250.
- [12] Menger MD, Vollmar B. Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2004, 389(6): 475-484.
- [13] 刘慧琳,刘桂花,田兆兴.脓毒症患者血中淋巴细胞水平的变化 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26(3):148-152.
- [14] 张进祥,王慧,徐建波,等. Toll 样受体 4 在急性肺损伤中的作用 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2006, 15(8):692-695.
- [15] Brown MA, Jones WK. NF-kappaB action in sepsis: the innate immune system and the heart [J]. *Front Biosci*, 2004, 9:1201-1217.
- [16] 杨建营,徐翔峰,向珍. NF- κ B 在炎症及脓毒症中的作用 [J]. *当代医学*, 2010, 16(36):26-27, 123.
- [17] Shimazu R, Akashi S, Ogata H, et al. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4 [J]. *J Exp Med*, 1999, 189(11):1777-1782.
- [18] 王俏,朱虹,朱健,等. TLR4 在脓毒症大鼠急性肺损伤中作用 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2011, 25(2):157-158, 161.
- [19] Konno K, Wakabayashi Y, Akashi-Takamura S, et al. A molecule that is associated with Toll-like receptor 4 and regulates its cell surface expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(4):1076-1082.
- [20] Baeuerle PA, Baichwal VR. NF-kappa B as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules [J]. *Adv Immunol*, 1997, 65:111-137.
- [21] 左祥荣,曹权,阙军,等.白藜芦醇对内毒素急性肺损伤小鼠核转录因子- κ B 及炎症反应的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2013, 20(1):16-19.
- [22] Pintér E, Helyes Z, Szolcsányi J. Inhibitory effect of somatostatin on inflammation and nociception [J]. *Pharmacol Ther*, 2006, 112(2):440-456.
- [23] Suto B, Bagoly T, Borzsei R, et al. Surgery and sepsis increase somatostatin-like immunoreactivity in the human plasma [J]. *Peptides*, 2010, 31(6):1208-1212.
- [24] Wu H, Liu L, Tan Q, et al. Somatostatin limits intestinal ischemia-reperfusion injury in macaques via suppression of TLR4-NF-kappaB cytokine pathway [J]. *J Gastrointest Surg*, 2009, 13(5):983-993.
- [25] Ang SF, Mochhala SM, MacAry PA, et al. Hydrogen sulfide and neurogenic inflammation in polymicrobial sepsis: involvement of substance P and ERK-NF- κ B signaling [J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e24535.
- [26] Krantic S, Goddard I, Saveanu A, et al. Novel modalities of somatostatin actions [J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151(6):643-655.

(收稿日期:2013-06-03)

(本文编辑:李银平)