

[文章编号] 1000 - 4718(2007)03 - 0492 - 03

重症肺炎大鼠干扰素 - γ 、白细胞介素 - 6 和肿瘤坏死因子 - α 含量变化

陈业民, 黄文杰[△], 李胜利, 梁 坤
(广州军区广州总医院呼吸科, 广东 广州 510010)

[摘 要] 目的: 研究 SD 大鼠细菌性重症肺炎模型中的 IFN - γ 、IL - 6、TNF - α 含量变化。方法: SD 大鼠随机分为模型 II 组、模型 I 组和对照组, 每组分为 3 小组, 前两组每小组 8 只, 对照组每小组 4 只。其中, 模型 II 组和模型 I 组分别接种相同浓度不同剂量的肺炎克雷伯菌菌液, 对照组接种剂量相同的生理盐水。分别与接种后的第 2、4、6 d 分批处死动物, 动态观察动物的干扰素 - γ (IFN - γ)、白细胞介素 - 6(IL - 6)、肿瘤坏死因子 - α (TNF - α) 的变化情况。结果: 模型 II 组和模型 I 组的 IL - 6、TNF - α 于接种后第 2、4、6 d 呈逐渐升高的趋势, 尤以接种高剂量菌液模型 II 组升高明显; IFN - γ 呈逐渐下降的趋势, 尤以接种高剂量菌液模型 II 组下降明显; 而模型 I 组则无明显变化。结论: 诸多细胞因子可能参与重症肺炎发病的病理生理过程。随着接种一定浓度菌液剂量的增加, 致使大鼠肺炎明显加重, IL - 6、TNF - α 、IFN - γ 较一般肺炎变化更显著。

[关键词] 肺炎, 克雷伯菌; 白细胞介素 6; 肿瘤坏死因子; 干扰素 II 型

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Changes of IFN - γ , IL - 6 and TNF - α levels in rats with severe pneumonia

CHEN Ye - min, HUANG Wen - jie, LI Sheng - li, LIANG Kun

(Department of Respiratory Diseases, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China. E - mail: Huangyelu1029@VIP. 163. com)

[ABSTRACT] AIM: To study the variety of cytokines in severe bacterial pneumonia of Sprague Dawleg (SD) rats. METHODS: A total of 60 SD rats were randomly divided into three groups: model I group ($n = 24$), model II group ($n = 24$), and control group ($n = 12$). Rats in the model I group and the model II group were intratracheally instilled with suspension of klebsiella pneumoniae at different doses. Rats in the control group were intratracheally injected with 1 mL saline. On the 2nd, 4th and 6th day after intratracheal instillation, 1/3 rats in each group were killed to determine the concentration of IFN - γ , IL - 6 and TNF - α in blood. RESULTS: The levels of IL - 6 and TNF - α in model groups were higher than those in control group, while the level of IFN - γ was lower. The change of cytokines was more significant in the model II group (severe pneumonia) than those in the model I group. CONCLUSION: The cytokines we studied may play an important role in the pathogenesis of severe pneumonia. The change of cytokines is more significant in severe pneumonia than those in common pneumonia.

[KEY WORDS] Pneumonia, Klebsiella; Interleukin - 6; Tumor necrosis factor; Interferon type II

重症肺炎一直是临床诊治的难题。我们于 2005 年成功建立重症肺炎动物模型^[1], 此模型为研究肺炎的发病机制和病理生理过程奠定了基础。本研究拟在此基础上, 测定重症肺炎动物模型细胞因子的变化情况, 为探讨重症肺炎的发病机制做初步探索。

材 料 和 方 法

1 病原

肺炎克雷伯菌临床株由本院检验科细菌室提供, 分离于慢性支气管炎急性发作病人的痰液。接

[收稿日期] 2006 - 05 - 08 [修回日期] 2006 - 08 - 08

* [基金项目] 广东省科技厅社会发展基金资助项目 (No. 2005B30601011)

△通讯作者. Tel: 020 - 61653555; E - mail: Huangyelu1029@VIP. 163. com

种前生理盐水稀释至适当浓度(相当于 1.2×10^{12} CFU/L)。

2 动物与分组

清洁级 Sprague Dawley (SD) 雄性大鼠, 由本院动物实验中心提供 [实验动物使用许可证号: SYXK (军) 2002—039; 使用实验动物质量合格证编号: No. 0008327], 鼠龄为 5—8 个月, 体重 180—260 g。随机分为模型 II 组、模型 I 组和对照组, 每组又分 3 小组, 每小组 8 只, 对照组每小组 4 只, 共 60 只。分别于接种后的第 2 d、4 d、6 d 分批处死动物。其中模型 II 组分别于接种后的第 5 d、6 d 各死亡 1 只, 后补做。

3 接种

大鼠经腹腔注射 50—100 mg/kg 氯胺酮麻醉后, 颈部消毒、备皮无菌操作, 暴露大鼠上段气管, 用 1 mL 注射器经气管滴入菌液。其中, 模型 I 组(普通肺炎组)滴入 0.15 mL, 模型 II 组(重症肺炎组)滴入 0.3 mL, 对照组滴入相同剂量的生理盐水。接种后立即竖立大鼠固定台, 使大鼠保持直立位约 20 s, 以保证接种菌液因重力作用而入肺。

4 取材和样品收集

分别于接种后的第 2、4、6 d 分批处死动物。尾静脉取血, 3 500 r/min 离心 15 min 后制备血清置于 $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

5 主要仪器和试剂

检测方法用 ELISA 方法, IL-6 试剂盒由奥地利 Bender Medsystems 公司提供, IFN- γ 、TNF- α 由美国 eBioscience 公司提供, 按说明书要求严格操作。酶标仪购自郑州博塞生物工程公司的 biocell HT₂ 酶标仪。

6 统计学处理

数据采用 SPSS 10.0 统计分析软件处理, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 采用析因设计的方差分析检验。

结 果

1 临床表现

动物接种第 1 d, 模型 I 组和模型 II 组均出现烦躁、活动增强, 体温升高达 (39.4 ± 1.6) $^{\circ}\text{C}$ 。第 2、3 d, 动物进食及活动度明显下降, 毛发直竖, 卷曲于饲养笼角落, 尤以模型 II 组动物明显。从第 4 d 起, 动物食欲、活动度进一步下降, 模型 II 组大鼠部分出现嗜睡(触之可醒), 可闻及明显呼吸喘鸣声, 最高体温达 (41.3 ± 2.1) $^{\circ}\text{C}$, 模型 I 组最高体温达 ($40.1 \pm$

1.8) $^{\circ}\text{C}$, 第 5、6 d, 模型 I 组和模型 II 组上述症状进一步加重, 体重减轻, 尤以模型 II 组动物明显。模型 II 组部分大鼠颜面部、四肢出现紫绀, 呼吸急促, 呼吸困难。模型 II 组于第 5、6 d 各死亡 1 只(后补做)。对照组大鼠进食、活动度、体重、体温较接种前无明显变化。

2 各组血清 IFN- γ 含量变化

模型 I 组、模型 II 组随着接种时间的延长, IFN- γ 含量逐渐下降, 尤以模型 II 组的下降更为明显, 在同一时间点与模型 I 组、对照组比较具有显著差异 ($P < 0.01$)。随着接种时间的延长, 模型 I 组、模型 II 组组间比较有显著差异 ($P < 0.01$), 对照组也有逐渐下降的趋势, 但无统计学意义 ($P > 0.05$), 见表 1。

3 各组血清 IL-6 含量变化

模型 I 组、模型 II 组随着接种时间的延长, IL-6 逐渐升高, 尤以模型 II 组的升高更为明显, 在同一时间点与模型 I 组、对照组比较具有显著差异 ($P < 0.01$)。随着接种时间的延长, 模型 I 组、模型 II 组组间比较有显著差异 ($P < 0.01$), 对照组 IL-6 则无明显变化, 见表 1。

4 各组 TNF- α 含量变化

模型 I 组、模型 II 组随着接种时间的延长, TNF- α 逐渐升高, 尤以模型 II 组的升高更为明显, 在同一时间点与模型 I 组、对照组比较具有显著差异 ($P < 0.01$)。随着接种时间的延长, 模型 I 组、模型 II 组组间比较有显著差异 ($P < 0.01$), 对照组 TNF- α 则无明显变化, 见表 1。

表 1 各组大鼠血清干扰素- γ 、白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- α 的含量

Tab 1 Serum levels of IL-6, TNF- α , IFN- γ of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Group	Day	IFN- γ (ng/L)	IL-6(ng/L)	TNF- α ($\mu\text{g/L}$)
Control	2	407.7250 \pm 35.4900	117.0900 \pm 7.7264	0.8025 \pm 0.2790
	4	404.0225 \pm 41.2074	111.0600 \pm 11.3398	0.7650 \pm 0.2121
	6	395.0725 \pm 28.1171	120.7825 \pm 11.2162	0.8450 \pm 0.2661
Model I (Common pneumonia)	2	373.3112 \pm 20.0001 *	164.7463 \pm 27.5011 *	2.4425 \pm 0.3885 *
	4	319.3287 \pm 26.9462 **	220.4938 \pm 24.7578 **	6.1100 \pm 0.7877 **
Model II (Severe pneumonia)	2	251.1800 \pm 17.7730 **	362.3212 \pm 30.9145 **	8.7725 \pm 0.9594 **
	4	351.1550 \pm 16.4535 **	194.4875 \pm 25.6759 **	3.3188 \pm 0.4096 **
	6	264.4450 \pm 30.9062 ***	292.6025 \pm 20.5084 ***	8.3688 \pm 0.9892 ***
	6	200.5238 \pm 19.1261 ***	474.5813 \pm 30.0760 ***	11.2575 \pm 1.1512 ***

* $P < 0.01$ vs control group at the same time point; # $P < 0.01$ vs model I group at the same time; * $P < 0.01$ vs the 2nd day after inoculation inside each group.

讨 论

肺炎是威胁人类健康的重要疾病,其患病率为1.2%。随着社会人口的老齡化、免疫受损宿主的增加、病原体的变迁和抗生素耐药性的上升,肺炎尤其是重症肺炎表现为治疗困难、病死率高、预后差等特点。本实验通过对不同分组的动物接种不同剂量细菌的方式,发现IFN- γ 、IL-6、TNF- α 等细胞因子随着动物肺炎病变的轻重而发生显著的变化。

IFN- γ 是一种调节细胞功能的小分子多肽,它具有重要的细胞免疫调节作用,对巨噬细胞的产生起重要刺激作用;同时促进T细胞分化为CD4⁺T_{H1}、CD8⁺T_{C1}亚群,促进细胞毒性T细胞(CTL)的分化^[2];还可激活中性粒细胞,促使其呼吸爆发,并激活血管内皮细胞,促进内皮细胞黏附和渗出。本实验发现,模型I组(普通肺炎组)、模型II组(重症肺炎组)血清IFN- γ 显著低于对照组,随着动物罹患肺炎时间的延长、肺炎严重程度的加重,血清IFN- γ 的含量逐渐降低,尤以模型II组(重症肺炎组)降低的更为明显($P < 0.01$)。而对照组则无明显变化。其机制可能是重症肺炎时,细菌释放的内毒素作用于活化的T细胞,致使T细胞的数量下降、活性降低,从而抑制IFN- γ 的生成或加速其降解。

IL-6是由多种免疫和非免疫细胞分泌的一种具有广泛生物学活性的细胞因子。在炎症反应时,IL-6作为肝细胞刺激因子,诱导肝细胞产生急性反应蛋白,对宿主自身破坏性炎症起增强作用^[3]。Kragstbjerg等^[4]认为检测血清中IL-6对细菌性肺炎具有诊断性意义。本实验显示,接种细菌后,随着时间的延长,肺炎大鼠病情逐渐加重,模型I组(普通肺炎组)、模型II组(重症肺炎组)IL-6逐渐升高,两组均显著高于对照组,其中模型II组则升高更为明显($P < 0.01$)。表明血清IL-6的含量与肺炎病变程度呈正相关,它可反应炎症的轻重程度。在多项感染性疾病研究中说明,血清IL-6水平与疾病严重程度相关,IL-6可用于评价全身炎症反应的程度,可作为监测炎症疗效的指标^[5]。

严重急性感染的特征之一是炎性因子的过度表达^[6]。TNF- α 是激活巨噬细胞分泌的一种具有多种免疫功能的调节因子,在炎症反应的启动中发挥关键作用。本实验表明,随着接种时间的延长,模型I组动物血清中TNF- α 的含量逐渐升高,而模型II组动物血清中TNF- α 的含量升高更为明显($P < 0.01$),两组均显著高于对照组,其趋势与程龙等^[7]的研究结果相一致。这表明肺部感染时机体释放大量的TNF- α ,血清TNF- α 水平是反应肺部感染及病变程度的良好指标,可作为重症肺炎的标志物^[8]。

[参 考 文 献]

- [1] 陈业民,黄文杰,李胜利,等. 肺炎克雷伯菌致大鼠重症肺炎模型的建立[J]. 第一军医大学学报,2005,25(12):1498-1502.
- [2] Cosio MG, Guerassimov A. Chronic obstructive pulmonary disease inflammation of small airways and lung parenchyma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1999,160(5 Pt 2):S21-S25.
- [3] 张青,徐剑斌,毛宝龄,等. 内毒素致伤大鼠肺组织TNF α 、IL-6的mRNA表达及NF- κ B活化研究[J]. 中国危重病急救医学,2001,13(9):523-526.
- [4] Kragstbjerg P, Jones I, Vikerfors T, et al. Diagnostic value of blood cytokine concentrations in acute pneumonia [J]. Thorax, 1995,50(12):1253-1257.
- [5] Svoboda P, Kantorva L, Ochmann J, et al. Dynamics of interleukin1,2 and 6 and tumor necrosis factor alpha in multiple trauma patients[J]. Trauma, 1994,36(3):336-340.
- [6] Morrison DF, Foss DL, Murtaugh MP. Interleukin-10 gene therapy mediated amelioration of bacterial pneumonia [J]. Infect Immun, 2000,68(8):4752-4758.
- [7] 程龙,李建生,马利军,等. 老年细菌性肺炎患者免疫功能的变化[J]. 中华老年医学杂志,2001,20(6):433-436.
- [8] Bruunsgaard H, Skinh P, Qvist J, et al. Elderly humans show prolonged *in vivo* inflammatory activity during pneumococcal infections [J]. J Infect Dis, 1999,180(2):551-554.