

文章编号:1000-5404(2012)19-1965-03

论著

IL-18 增加烧伤休克复苏大鼠中性粒细胞中超氧阴离子的生成

杨 勇, 王晓娟, 刘德贵, 薛 刚 (610083 成都, 成都军区总医院烧伤整形科)

[摘要] 目的 探讨在烧伤休克复苏大鼠模型中, IL-18 与中性粒细胞释放氧自由基——超氧阴离子和羟自由基的关系以及相应的作用。方法 建立烧伤休克延迟复苏模型大鼠, 分别检测假烧伤组以及延迟复苏大鼠在模型建立后 6、12、24、48 h 体内白介素-18(interleukin 18, IL-18) 以及中性粒细胞的含量。腹腔注射 IL-18(20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 以及抗大鼠 IL-18 抗体(anti-rat-IL-18 antibody, 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$) 后, 检测模型大鼠中性粒细胞内超氧自由基以及羟自由基的含量。将新鲜分离的中性粒细胞体外培养, 分别加入 IL-18(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 以及 anti-rat-IL-18 抗体(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 共培养 24 h 后, 检测中性粒细胞内超氧自由基以及羟自由基的含量。结果 大鼠烫伤后 6、12、24、48 h 外周血 IL-18 的含量[(51.46 \pm 11.36)、(64.86 \pm 12.05)、(78.64 \pm 15.64)、(69.44 \pm 12.28) pg/ml] 以及中性粒细胞的数量[(38.46 \pm 13.57) $\times 10^5$ 、(128.45 \pm 45.78) $\times 10^5$ 、(245.25 \pm 84.15) $\times 10^5$ 、(179.56 \pm 49.27) $\times 10^5/\text{ml}$] 均显著提高, 且变化趋势相同($P < 0.01$)。腹腔注射 IL-18 大鼠中性粒细胞内超氧阴离子以及 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG) 的含量均显著高于假烧伤组[(0.45 \pm 0.03) *vs* (0.15 \pm 0.02)], (605 \pm 145) *vs* (152 \pm 21) pg/ml , $P < 0.01$], 而注射 anti-rat-IL-18 抗体的大鼠中性粒细胞内超氧阴离子以及 8-OHdG 的含量均显著低于烧伤大鼠延迟复苏组[(0.19 \pm 0.03) *vs* (0.32 \pm 0.04)], (198 \pm 45) *vs* (524 \pm 124) pg/ml , $P < 0.01$]。离体条件下, 加入 IL-18 的中性粒细胞在体外超氧阴离子以及 8-OHdG 的含量均显著高于对照组[(0.38 \pm 0.02) *vs* (0.13 \pm 0.02)], (505 \pm 99) *vs* (92 \pm 21) pg/ml , $P < 0.01$], 而注射 anti-rat-IL-18 抗体的大鼠中性粒细胞内超氧阴离子以及 8-OHdG 的含量均显著低于烧伤组大鼠[(0.16 \pm 0.03) *vs* (0.29 \pm 0.03)], (95 \pm 45) *vs* (324 \pm 68) pg/ml , $P < 0.01$]。结论 在烧伤休克延迟复苏大鼠中, IL-18 能够有效地与大鼠体内中性粒细胞结合, 促进烧伤休克延迟复苏大鼠模型中的氧自由基的生成, 进一步造成组织的损伤。

[关键词] 白细胞介素 18; 烧伤; 休克; 延迟复苏; 超氧化物类; 羟自由基

[中图分类号] R392.11; R392.12; R644.02

[文献标志码] A

IL-18 increases superoxide anion production in neutrophils of rats during resuscitation following burn shock

Yang Yong, Wang Xiaojuan, Liu Degui, Xue Gang (Department of Burn and Plastic Surgery, General Hospital of Chengdu Military Command, Chengdu, Sichuan Province, 610083, China)

[Abstract] **Objective** To study the role of IL-18 and its relation with superoxide anion production and hydroxyl free radical released from neutrophils in rat resuscitation model following burn shock. **Methods** At 6, 12, 24 and 48 h after a rat resuscitation model following burn shock was established, the peripheral IL-18 level was measured and the number of neutrophils in the blood sample was calculated. The number of superoxide free radicals and hydroxy free radicals in neutrophils of the rat model was calculated after intraperitoneal injection with IL-18 (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) and anti-rat-IL-18 antibody (80 $\mu\text{g}/\text{kg}$). The freshly isolated neutrophils were cultured *in vitro*, into which IL-18 (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and anti-rat-IL-18 antibody (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added. The number of superoxide free radicals and hydroxy free radicals in neutrophils was calculated in 24 h after culture. **Results** The level of peripheral IL-18 (51.46 \pm 11.36, 64.86 \pm 12.05, 78.64 \pm 15.64 and 69.44 \pm 12.28 pg/ml) and the number of peripheral neutrophils [(38.46 \pm 13.57) $\times 10^5/\text{ml}$, (128.45 \pm 45.78) $\times 10^5/\text{ml}$, (245.25 \pm 84.15) $\times 10^5/\text{ml}$ and (179.56 \pm 49.27) $\times 10^5/\text{ml}$] were significantly higher in resuscitation group than in control group at 6, 12, 24 and 48 h after burn ($P < 0.01$). The superoxide anion and 8-OHdG levels were significantly higher in rats injected with IL-18 than in those with sham burn (0.45 \pm 0.03 *vs* 0.15 \pm 0.02, 605 \pm 145 *vs* 152 \pm 21, 605 \pm 145 *vs* 152 \pm 21 pg/ml , $P < 0.01$) and significantly lower in rats injected with anti-rat-IL-18 antibody than in those after delayed resuscitation (0.19 \pm 0.03 *vs* 0.32 \pm 0.04, 198 \pm 45 *vs* 524 \pm 124 pg/ml , $P < 0.01$). The superoxide anion and 8-OHdG levels were significantly higher in neutrophils into which IL-18 was added than in those into which IL-18 was not added (0.38 \pm 0.02 *vs*

[基金项目] 国家自然科学基金(81101427)

[通信作者] 薛 刚, 电话:(028)86570630, E-mail:kpardan@163.com

0.13 ± 0.02, 505 ± 99 vs 92 ± 21 pg/ml, $P < 0.01$) and significantly lower in rats injected with anti-rat-IL-18 antibody than in those with burn (0.16 ± 0.03 vs 0.29 ± 0.04, 95 ± 45 vs 324 ± 68 pg/ml, $P < 0.01$).

Conclusion IL-18 can effectively bind to neutrophils in rats during delayed resuscitation and promote production of superoxide free radicals in rat resuscitation model following burn shock, thus leading to further tissue damage.

[**Key words**] interleukin-18; burn; shock; delayed fluid resuscitation; superoxide anion; hydroxy free radical

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81101427). Corresponding author: Xie Gang, Tel:86-28-86570630, E-mail: kpardan@163.com

烧伤休克延迟复苏是指烧伤休克已发生并持续了一段时间后才开始的液体复苏治疗。动物实验显示Ⅲ度烧伤面积为体表面积40%时,烧伤后6h开始的液体复苏治疗可被视为延迟性复苏^[1]。研究表明缺血再灌注损伤是延迟复苏发生组织器官损伤的主要原因,而延迟复苏加重氧化应激,诱发炎症反应是其主要机制^[2-3]。烧伤后损伤组织中含有大量的中性粒细胞,与损伤内皮细胞高表达的黏附分子黏附而活化,通过呼吸爆破产生大量氧自由基。白介素-18(interleukin 18, IL-18)是中性粒细胞的有效活化因子,而中性粒细胞表面表达IL-18的受体^[4]。本研究拟探讨在烧伤休克复苏大鼠模型中,IL-18与中性粒细胞释放氧自由基——超氧阴离子和羟自由基的关系以及相应的作用,为烧伤临床救治提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

健康成年雄性SD大鼠40只(购于成都医学院动物实验中心,许可证号:SCXK-10-2009),体质量250~280g。大鼠中性粒细胞分离液:天津灏洋生物产品(TBD分离液,LTS1091-1),大鼠IL-18 ELISA(酶联免疫吸附实验,enzyme-linked immunosorbent assay)试剂盒(R&D systems,美国),8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)ELISA试剂盒(eBioscience公司,美国),IL-18、anti-rat-IL-18抗体(Santa Cruz公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 烧伤休克延迟复苏模型的建立 雄性SD大鼠随机数字表法组分为4组:假烧伤组、烧伤大鼠延迟复苏组、烧伤大鼠延迟复苏+腹腔注射IL-18组以及烧伤大鼠延迟复苏+腹腔注射anti-rat-IL-18抗体组,每组10只。实验前24h用电推推去背部被毛,单笼饲养。实验前12h禁食、水。10g/L戊巴比妥钠40mg/kg腹腔注射麻醉后,除假烧伤组外,于大鼠背部建立40%Ⅲ度烫伤模型(病理证实)。致伤条件为90℃,20s。烧伤模型建立后,根据实验分组,大鼠分别给予腹腔注射:IL-18(20μg/kg)、anti-rat-IL-18抗体(80μg/kg)、同型IgG(80μg/kg)。伤后6h开始补液。假烧伤组大鼠不进行烫伤操作,其余操作均同实验组大鼠。在烧伤模型建立后6、12、24、48h分别检测假烧伤组、烧伤大鼠延迟复苏组大鼠体内IL-18含量以及中性粒细胞计数。在烧伤模型建立24h分别检测假烧伤组、烧伤大鼠延迟复苏组、烧伤大鼠延迟复苏+腹腔注射IL-18组以及烧伤大鼠延迟复苏+腹腔注射anti-rat-IL-18抗体组大鼠氧自由基——超氧阴离子和羟自由基的含量。

1.2.2 中性粒细胞的提取^[5] 心脏穿刺取血至肝素抗凝管中,1:2 PBS稀释血液,将稀释好的血液缓慢加入中性粒细胞分离液中,500×g离心40min。血液此时应该分为6层:血浆、单核细胞层、分离液、中性粒细胞、其余的分离液、红细胞沉淀层,吸取中性粒细胞层及其下面的分离液层,转移至干净的离心管中,应用红细胞裂解液裂解残余的红细胞,300×g离心5min得到大鼠的中性粒细胞。

1.2.3 应用ELISA检测IL-18 取不同时相点(烧伤模型建立后6、12、24、48h)大鼠血浆,根据ELISA试剂盒说明书步骤检测IL-18含量。

1.2.4 中性粒细胞超氧阴离子的检测 应用细胞色素炭还原法检测^[5]。分别将细胞色素C、细胞色素C与超氧化物歧化酶加入0.1ml的中性粒细胞(5×10^6 /ml)中培养,37℃,5min。500ng/ml PMA活化中性粒细胞。分光光度计550nm检测1h,超氧阴离子的峰值在中性粒细胞活化20~25min。

1.2.5 中性粒细胞羟自由基的检测 羟自由基难以直接测定,8-OHdG是由于羟自由基攻击DNA中脱氧鸟苷所形成,可以作为评价体内细胞氧化损伤的高灵敏性生物标记物^[6]。按照8-OHdG ELISA试剂盒说明,测定其含量。

1.2.6 离体条件下中性粒细胞的培养 在U底96孔板中将新分离的大鼠体内的中性粒细胞培养,每孔加入 10^7 个细胞。实验分为4组:新鲜分离的中性粒细胞组(对照组)、烧伤24h后大鼠中性粒细胞组、烧伤24h后大鼠中性粒细胞+IL-18(0.5μg/ml)组、烧伤24h后大鼠中性粒细胞+anti-rat-IL-18抗体(0.5μg/ml)组,每组3个复孔,1640+10%胎牛血清培养基置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。实验重复3次。

1.3 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本正态数据采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 烧伤休克延迟复苏大鼠体内IL-18表达升高,中性粒细胞计数增高

烧伤后6、12、24、48h,大鼠体内IL-18的含量以及中性粒细胞计数均显著增高($P < 0.01$),至烧伤24h时达到高峰,直至48h仍维持较高的水平($P < 0.01$),且IL-18的含量以及中性粒细胞计数的变化趋势相同(表1)。

2.2 IL-18增加烧伤休克复苏大鼠的超氧阴离子生成

腹腔注射IL-18实验大鼠中性粒细胞内超氧阴离子(0.45 ± 0.03)含量显著高于假烧伤组[(0.15 ± 0.02), $P < 0.01$]以及烧伤大鼠延迟复苏组[(0.32 ± 0.03), $P < 0.01$]。而注射了IL-18拮抗抗体的大鼠体内超氧阴离子的含量(0.19 ± 0.03)明显低于烧伤大鼠延迟复苏组($P < 0.01$)。

表1 不同时相点各组大鼠体内 IL-18 含量以及中性粒细胞计数
(n = 10, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-18 (pg/ml)	中性粒细胞计数 (10 ⁵ /ml)
假烧伤组		
6 h	12.36 ± 1.35	9.85 ± 1.47
12 h	13.25 ± 2.13	10.68 ± 1.58
24 h	11.56 ± 1.98	10.75 ± 2.09
48 h	14.24 ± 2.06	10.69 ± 2.46
烧伤大鼠延迟复苏组		
6 h	51.46 ± 11.36 ^a	38.46 ± 13.57 ^a
12 h	64.86 ± 12.05 ^a	128.45 ± 45.78 ^a
24 h	78.64 ± 15.64 ^a	245.25 ± 84.15 ^a
48 h	69.44 ± 12.28 ^a	179.56 ± 49.27 ^a

a; P < 0.01, 与假烧伤组比较

2.3 IL-18 增加烧伤休克复苏大鼠的羟自由基生成

腹腔注射 IL-18 大鼠中性粒细胞内 8-OHdG 含量 [(605 ± 145) pg/ml] 显著高于假烧伤组 [(152 ± 21) pg/ml] 以及烧伤大鼠延迟复苏组 [(524 ± 124) pg/ml, P < 0.01]。而注射了 IL-18 拮抗抗体的大鼠体内 8-OHdG 的含量 [(198 ± 45) pg/ml] 明显低于烧伤大鼠延迟复苏组 (P < 0.01)。

2.4 离体条件下 IL-18 增加中性粒细胞的超氧阴离子生成

加入 IL-18 的中性粒细胞在体外超氧阴离子含量 (0.38 ± 0.02) 显著高于对照组 (0.13 ± 0.02) 以及烧伤组大鼠 (0.29 ± 0.03, P < 0.01)。而加入 IL-18 拮抗抗体的中性粒细胞超氧阴离子的含量 (0.16 ± 0.03) 明显低于烧伤组大鼠 (P < 0.01)。

2.5 离体条件下 IL-18 增加烧伤休克复苏大鼠的羟自由基生成

加入 IL-18 的中性粒细胞在体外 8-OHdG 含量 [(505 ± 99) pg/ml] 显著高于对照组 [(92 ± 21) pg/ml] 以及烧伤组大鼠 [(324 ± 68) pg/ml, P < 0.01]，而加入 IL-18 拮抗抗体的中性粒细胞 8-OHdG 的含量 [(95 ± 45) pg/ml] 明显低于烧伤组大鼠 (P < 0.01)。

3 讨论

IL-18 是 IL-1 因子家族成员,由巨噬细胞和上皮细胞生成,同 IL-12 一样能够有效地促进 T 细胞向 Th1 细胞亚型分化,从而促进 IFN- γ 的分泌,它作为 IFN- γ 的主要诱导因子在机体的防御系统中发挥着重要的作用^[7],但是同时文献报道 IL-18 在多种炎症疾病中能够对组织造成一定的损伤^[8]。研究表明,由于 IL-18 能够有效地发挥中性粒细胞的趋化作用,通过气道吸入 IL-18 能够显著提高肺脏的中性粒细胞的浸润,从而造成肺组织通透性增加^[9];腹腔注射 IL-18 同样能够促进中性粒细胞在肠道的浸润,介导肠道组织水肿^[10],提示中性粒细胞在 IL-18 介导的组织损伤中发挥着重要的作用。本实验证实在烧伤休克延迟复苏大鼠体内 IL-18 及中性粒细胞显著增加,而烧伤休克后的缺血再灌注损伤导致机体炎症反应加重是各种炎症细胞因子增加的主要原因。烧伤后组织灌注不良,损伤组织中含有大量的中性粒细胞,再灌注时,大量的分子氧随血液进入缺血组织,激活的中性粒细胞耗氧量显著增加,产生大量氧自由基。正常情况下,中性粒细

胞释放氧自由基是机体杀伤病原菌的防御方式之一,而在烧伤损伤情况下,抗氧化物质如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽、维生素 E 以及维生素 C 等物质下降,造成机体抗氧化能力不足,引发氧化应激反应,造成组织损伤^[11-12]。通过腹腔注射外源性 IL-18 提高大鼠体内 IL-18 含量以及通过 IL-18 抗体中和体内升高的 IL-18 分别检测了大鼠体内氧自由基——超氧阴离子和羟自由基的含量,结果提示:IL-18 通过与中性粒细胞结合,促进了烧伤休克延迟复苏大鼠模型中的氧自由基的生成,进一步造成了组织的损伤。中性粒细胞在发挥了功能后,将自然凋亡,然后被巨噬细胞吞噬清除。文献报道在组织损伤后产生的一系列炎症因子不仅能够有效地活化中性粒细胞,同时能够有效地抑制其凋亡,延长其发挥功能的时间^[4]。综上,我们推测 IL-18 可能通过该机制加重组织的损伤。

参考文献:

- [1] 黎鳌. 黎鳌烧伤学[J]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001: 56.
- [2] Foldi V, Csontos C, Bogar L, et al. Effects of fluid resuscitation methods on burn trauma-induced oxidative stress [J]. J Burn Care Res, 2009, 30(6): 957-966.
- [3] Horton J W. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy [J]. Toxicology, 2003, 189(1/2): 75-88.
- [4] Akhtar S, Li X, Chaudry I H, et al. Neutrophil chemokines and their role in IL-18-mediated increase in neutrophil O₂- production and intestinal edema following alcohol intoxication and burn injury [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009, 297(2): G340-G347.
- [5] Li X, Schwacha M G, Chaudry I H, et al. Heme oxygenase-1 protects against neutrophil-mediated intestinal damage by down-regulation of neutrophil p47phox and p67phox activity and O₂- production in a two-hit model of alcohol intoxication and burn injury [J]. J Immunol, 2008, 180(10): 6933-6940.
- [6] Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis [J]. Mutat Res, 1997, 387(3): 147-163.
- [7] Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells [J]. Nature, 1995, 378(6552): 88-91.
- [8] Wang M, Markel T A, Meldrum D R. Interleukin 18 in the heart [J]. Shock, 2008, 30(1): 3-10.
- [9] Jordan J A, Guo R F, Yun E C, et al. Role of IL-18 in acute lung inflammation [J]. J Immunol, 2001, 167(12): 7060-7068.
- [10] Li X, Schwacha M G, Chaudry I H, et al. Acute alcohol intoxication potentiates neutrophil-mediated intestinal tissue damage after burn injury [J]. Shock, 2008, 29(3): 377-383.
- [11] Fang Y, Fu X J, Gu C, et al. Hydrogen-rich saline protects against acute lung injury induced by extensive burn in rat model [J]. J Burn Care Res, 2011, 32(3): e82-e91.
- [12] Zhang J, Sio S W, Mochhala S, et al. Role of hydrogen sulfide in severe burn injury-induced inflammation in mice [J]. Mol Med, 2010, 16(9/10): 417-424.

(收稿:2012-05-09;修回:2012-05-20)

(编辑 龙 亮)