

连续观察兔油酸 ARDS 模型稳定性及血 IL-1、IL-8 近期变化 *

李英卓 张志培 范崇熙 汪 健 倪云峰 邓迎春 杨 菁 李小飞[△] 程庆书[△]

(第四军医大学 唐都医院胸外科 陕西 西安 710038)

摘要 目的:探讨油酸(OA)构建兔急性呼吸窘迫综合征(ARDS)模型 3 天内的稳定性及血浆炎症因子 IL-1、IL-8 含量变化的意义。**方法:**健康新西兰大耳白兔 30 只随机分为 5 组,每组 6 只,实验组(n=24)耳缘静脉注射油酸(0.1mL/kg)建立 ARDS 模型,对照组(n=6)注射等量生理盐水。分别检测对照组 6h 和实验组 6h、24h、48h、72h(n=6)动脉血 PH 值、PaO₂、PaO₂/FiO₂、PaCO₂、肺湿/干重比值(W/D),ELISA 法检测血浆细胞因子 IL-1、IL-8 含量,HE 染色观察肺组织病理学改变。**结果:**和对照组比较,实验组血中细胞因子 IL-1 在 6h、24h 组升高;细胞因子 IL-8 在 6h 组、24h 组、48h 组升高。6h 组、24h 组、48h 组氧合指数 <200mmHg。**结论:**兔油酸 ARDS 模型 48h 内稳定,炎症细胞和 IL-1、IL-8 可能是导致 ARDS 的发生和发展主要原因之一。

关键词:油酸;呼吸窘迫综合征 ARDS;IL-1;IL-8;兔

中图分类号:Q95-3,R563.8 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2011)04-637-05

The Stability and Changes of IL-1, IL-10 in Plasma of New Zealand Rabbits with Acute Respiratory Distress Syndrome*

LI Ying-zhuo, ZHANG Zhi-pei, FAN Chong-xi, WANG Jian, NI Yun-feng, DENG Ying-chun, YANG Jing,

LI Xiao-fei[△], CHENG Qing-shu[△]

(Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, Shaanxi, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the stability and the changes of IL-1, IL-10 in plasma of New Zealand rabbits with acute respiratory distress syndrome (ARDS) induced by oleic acid (OA) in 3 days. **Methods:** Thirty New Zealand rabbits were randomly divided into OA experimental groups which were injected with oleic acid (0.1mL/kg) via ear vein and control group which was injected with normal saline (0.1mL/kg). Histopathology, wet weight/dry weight ratio (W/D) of the lung, arterial plasma PH, PaO₂, PaCO₂ were observed at 6h, 24h, 48h 72h groups after injection. ELISA method was used to determine plasma IL-1 and IL-8. **Results:** Compared with control group, the levels of PO₂ of experimental groups decreased (p<0.01) while the levels of PaCO₂ of experimental groups increased (p<0.01). Compared with the 72h group, the levels of PO₂ of other experimental groups decreased (p<0.01) while the levels of PaCO₂ of 24h, 48h groups increased (p<0.01). The wet weight/dry weight ratios(W/D) of the lung increased in 6h, 24h, 48h groups (p<0.01) compared with control group while they decreased in 48h and 72h groups (p<0.01) compared with that of the 6h group. The levels of IL-1 in plasma were higher in 6h group (p<0.01) and in 24h group (p<0.05) than that in control group, while which were lower in 48h and 72h groups (p<0.01) than that in 6h group. And the levels of IL-8 in plasma were higher in 6h, 24h, 48h groups (p<0.01) than that in control group while which were lower in 24h, 48h groups (p<0.05) and in 72h group (p<0.01) than that in 6h group. The 6h, 24h, 48h groups could be diagnosed with ARDS by PaO₂/FiO₂<200mmHg but the 72h group's PaO₂/FiO₂>200mmHg. **Conclusion:** The ARDS model set up by oleic acid is stable in 48h, and the he inflammation cells and increase of IL-1, IL-8 might play important roles in ARDS.

Key words: Oleic acid; ARDS; IL-1; IL-8; Rabbit

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3, R563 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)04-637-05

前言

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是严重感染、创伤、休克等肺内外疾病袭击后出现的以肺泡毛细血管损伤、炎症反应为主要表现的临床综合征,死亡率高达 40%^[1,2]。临床上一旦发现病人出现 ARDS,立即采取各种措施进行抢救,很难进行临床研究,因此针对 ARDS 的研究主要通过动物实验。目前多数学者的研究多集中在 12h 之内,

而在 24h-72h 间油酸构建 ARDS 模型和观察血 IL-1、IL-8 在此期间的变化未见报道^[3,4]。本实验通过油酸(oleic acid, OA)建立兔 ARDS 动物模型,连续观察 72h 内模型稳定性及炎症细胞、炎症因子 IL-1、IL-8 的变化,探讨炎症细胞、炎症因子 IL-1、IL-8 在 ARDS 发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物和主要材料

* 基金项目:全军医药卫生科研项目(2008080202)

作者简介:李英卓,(1982-),男,硕士。E-mail: liyingzhuo_0@163.com, 电话:15929953732

△通讯作者:李小飞,E-mail: lxfchest@fmmu.edu.cn 程庆书,E-mail: CQS1255@163.com

(收稿日期:2010-11-21 接受日期:2010-12-15)

健康新西兰大耳白兔 30 只,雌雄不限,体重(2.25± 0.11) kg, 由第四军医大学动物实验中心提供。油酸由 Alfa Aesar GmbH & Co KG 公司提供,批号为 E01T019; 白细胞介素 1 (IL-1)、白细胞介素 8(IL-8)的 ELISA 检测试剂盒由美国 R&D 公司提供,批号为 201004;全自动血气分析仪由 Abbott 公司提供,型号为 i-STAT。

1.2 ARDS 动物模型的建立及分组

30 只健康新西兰白兔,实验前禁食 12 h、禁饮 4 h,肌肉注射速眠新 II (0.2mL/kg)全身麻醉,随机分成 5 组,每组 6 只。24 只兔经耳缘静脉缓慢注射油酸(0.1mL/kg)建立 ARDS 模型,6 只兔注射生理盐水(0.1mL/kg)作为对照组。分别在实验组注射油酸 6h、24h、48h、72h 和对照组注射生理盐水 6h 时将兔固定,小心暴露颈总动脉,抽取动脉血 10mL,迅速作动脉血气分析。动脉血氧分压与吸入氧浓度比值 (PaO₂/FiO₂ ratio, PPF)<200 mm Hg 达到 ARDS 诊断标准^[9]。

1.3 肺组织含水量测定

取血后用 KCl 溶液快速静注处死动物,迅速开胸取右肺上叶测量肺组织湿重,经 70℃脱水 24h 后,再称量干重,以湿重 / 干重(W/D)值表示肺组织含水量。

1.4 肺组织病理形态学观察

取右肺中叶约 1 cm× 1 cm× 1cm 大小的组织块,用 10% 的中性甲醛溶液固定 24 h,依次脱水、透明、浸透、石蜡包埋、切片(切片厚度 3 μ m),苏木素 - 伊红(HE)染色,封片,用光学显微镜检查肺组织的形态结构。

1.5 血细胞因子 IL-1、IL-8 含量测定

采用 ELISA 双抗体夹心法,经过加样、温育、洗涤、加酶、显色、测吸光度,绘制吸光度 - 标准品浓度的标准曲线,计算细胞因子 IL-1、IL-8 含量。

1.6 统计学分析

实验数据用 SPSS 12.0 统计学软件处理,以均数± 标准差 (x± s)表示,经 Levene 法方差齐性检验,采用单因素方差分析 (one-way ANOVA),以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察

所有动物在注射油酸后 3 分钟 ~5 分钟开始出现呼吸频率增快、鼻翼煽动、嘴唇粘膜紫绀等症状;部分动物口鼻出现白色泡沫。在观察时间内无动物死亡。

2.2 动脉血查血气分析结果

颈动脉血中,PH 值变化无统计学意义。和对照组相比,各实验组 PaO₂ 明显降低(p<0.01);72h 组比其它实验组明显升高 (p<0.01),但未达到对照组水平。和对照组比较,各实验组 Pa-CO₂ 都明显升高 (p<0.01);72h 组较 24h 组、48h 组降低明显 (p<0.01),但未达到对照组水平。6h 组、24h 组、48h 组氧合指数 (PaO₂/FiO₂)<200mmHg,结合症状,达到 ARDS 诊断标准(表 1)。

2.3 肺组织湿重 / 干重 (W/D) 比值的变化

与对照组相比,肺湿重 / 干重比值(W/D)在 6h 组、24h 组、48h 组明显升高 (p<0.01),72h 组升高未见统计学差异。和 6h 组相比,48h、72h 组明显降低(p<0.01)(表 1)。

表 1 各组动脉血氧指标和肺干重 / 湿重比值
Table 1 Changes of arterial oxygenation index and W/D of the lung

组别 Groups	PH	氧分压 PaO ₂ (mm Hg)	氧合指数 PaO ₂ /FiO ₂	二氧化碳分压 PaCO ₂ (mm Hg)	肺湿重 / 干重 W/D
对照 Control	7.29± 0.10	78.50± 7.48	373.81± 35.60	27.50± 3.98	4.12± 0.32
油酸 6h OA 6h	7.23± 0.06	39.00± 6.13**△△	185.71± 29.20**△△	36.55± 2.07**	6.81± 0.63**
油酸 24h OA 24h	7.31± 0.03	35.17± 3.87**△△	167.46± 18.42**△△	38.73± 1.06**△△	6.24± 0.57**
油酸 48h OA 48h	7.35± 0.13	36.17± 3.54**△△	172.22± 16.88**△△	38.00± 1.29**△△	5.60± 0.66**##△△
油酸 72h OA 72h	7.32± 0.05	60.00± 3.79**	285.71± 18.07**	33.00± 2.10**	4.92± 0.40##

和对照组相比 *p<0.05、**p<0.01,和 6h 组相比 #p<0.05、##p<0.01,和 72h 组相比,△p<0.05、△△p<0.01
*p <0.05, **p<0.01 compared with control group, #p<0.05, ##p<0.01 compared with 6h group, △p<0.05, △△p<0.01 compared with 72h group

2.4 ARDS 模型动脉血细胞因子 IL-1、IL-8 含量的变化

和对照组比较,血中细胞因子 IL-1 在 6h 组明显升高(p<0.01),24h 组升高(p<0.05);和 6h 组相比,IL-1 在 48h 组、72h 组明显降低(p<0.01)。和对照组比较,细胞因子 IL-8 在 6h 组、24h 组、48h 组明显升高(p<0.01);和 6h 组相比,24h 组、48h 组降低 (p<0.05),72h 组明显降低(p<0.01)(表 2)。

2.5 肺组织大体及病理形态学检查结果

与对照组(a)相比,注射油酸 6h 组(b)、24h 组(c)、48h 组

(d)、72h 组(e)可见大体肺组织明显充血、水肿。72h 组肺门部仍有大量出血,周围肺组织出血稍减少(图 1)。

肺组织石蜡切片结果显示,与对照组(A)相比,注射油酸 6h 组(B)、24h 组(C)、48h 组(D)、72h 组(E)肺泡腔内充满蛋白渗出液,肺泡萎陷,形成死腔;大部分肺泡有透明膜形成,炎症细胞浸润,肺组织局灶性坏死,部分肺泡呈代偿性肺气肿。提示油酸 ARDS 模型建立成功。72h 组肺泡内渗出蛋白和血细胞有少量吸收,但炎性细胞依然较多(图 2)。

表 2 各组血炎症因子 IL-1、IL-8 变化值
Table 2 Changes of IL-1, IL-8 in plasma

组别 Groups	IL-1 (ng/L)	IL-8 (ng/L)
对照 Control	46.73± 6.39	26.31± 4.65
油酸 6h OA 6h	102.14± 18.82**	77.36± 14.38**
油酸 24h OA 24h	80.34± 12.89*	53.14± 11.21**#
油酸 48h OA 48h	60.59± 15.78##	54.94± 15.69***#
油酸 72h OA 72h	68.10± 12.41##	40.40± 14.12##

和对照组相比 *p<0.05、**p<0.01,和 6h 相比 #p<0.05、##p<0.01
*p <0.05, **p<0.01 compared with control group, #p<0.05, ##p<0.01 compared with 6h group

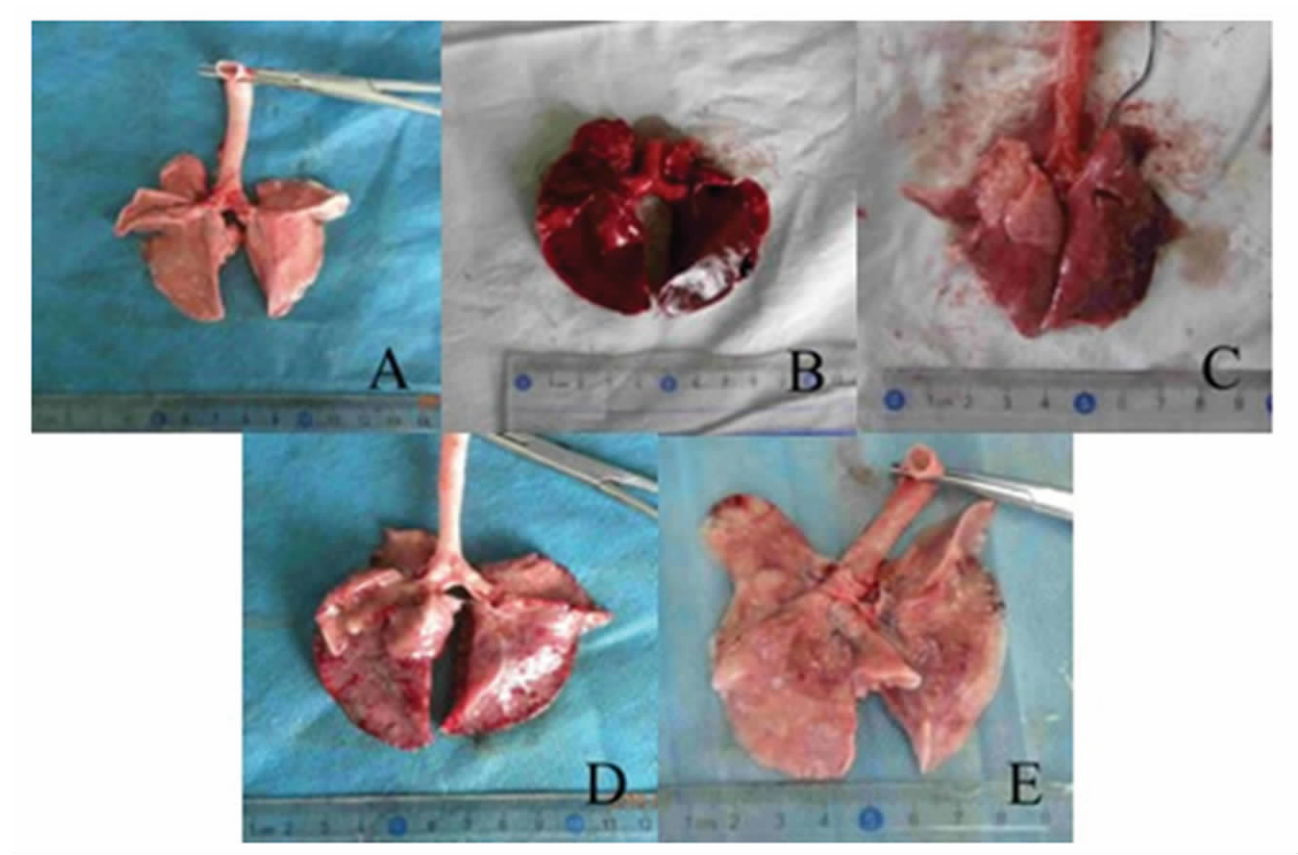


图 1 兔肺组织:A: 对照组;B :6h 组; C :24h 组 ;D: 48h 组; E :72h 组
Fig 1 Lungs of the rabbits: A:control group; B:6h group; C:24h group;D:48h group;E:72h group

3 讨论

动物实验表明，静脉注射油酸可引起肺血管收缩、肺泡 - 毛细血管膜的通透性增大,渗出增加,炎症细胞浸润,炎症因子释放增多，机体呼吸功能降低，可以模拟急性呼吸窘迫综合 (ARDS)^[6]。目前,多用油酸构建 ARDS 模型,但研究多集中在 12h 之内。本实验连续观察 72h 内模型稳定性及炎症细胞、炎症因子 IL-1、IL-8 的变化,并探讨炎症细胞、炎症因子 IL-1、IL-8 在 ARDS 发生发展中的作用。

实验中动物静脉注射油酸 5 分钟后,出现呼吸加快、窘迫、心跳加速等 ARDS 的临床表现，动脉血 PaO₂ 在 48h 内明显降低,PaCO₂、肺组织含水量在 48h 内明显升高,炎性细胞增多,渗出增加。主要原因可能是油酸致肺血管损伤后,肺泡通透性增加伴血管内容物大量渗出,炎症因子分泌明显增多,炎症细胞在细胞因子的趋化作用下浸润明显。病理切片显示肺泡出血、组织液、蛋白渗出,肺泡壁结构破坏、塌陷,形成死腔;肺间质和肺泡内大量炎性细胞浸润。和 Lai 等观察到的结果一致^[7-10],但

少见 72h 的研究报道。油酸注射 72h 后,动脉 PaO₂ 升高,PaCO₂ 降低,大体肺组织及镜下见肺内渗出物有少量吸收,呼吸功能改善,表明肺损伤有所恢复,但炎性细胞依然较多,肺组织含水量明显减少。以上表明油酸构建的 ARDS 模型 48h 内比较稳

定,渗出和炎症细胞增多,呼吸功能降低,满足 ARDS 诊断标准,6h 内肺损伤最重;72h 后损伤略有减轻,肺内渗出吸收,含水量减少,氧合指数 (PaO₂/FiO₂)<200mmHg,不符合 ARDS 的诊断标准。

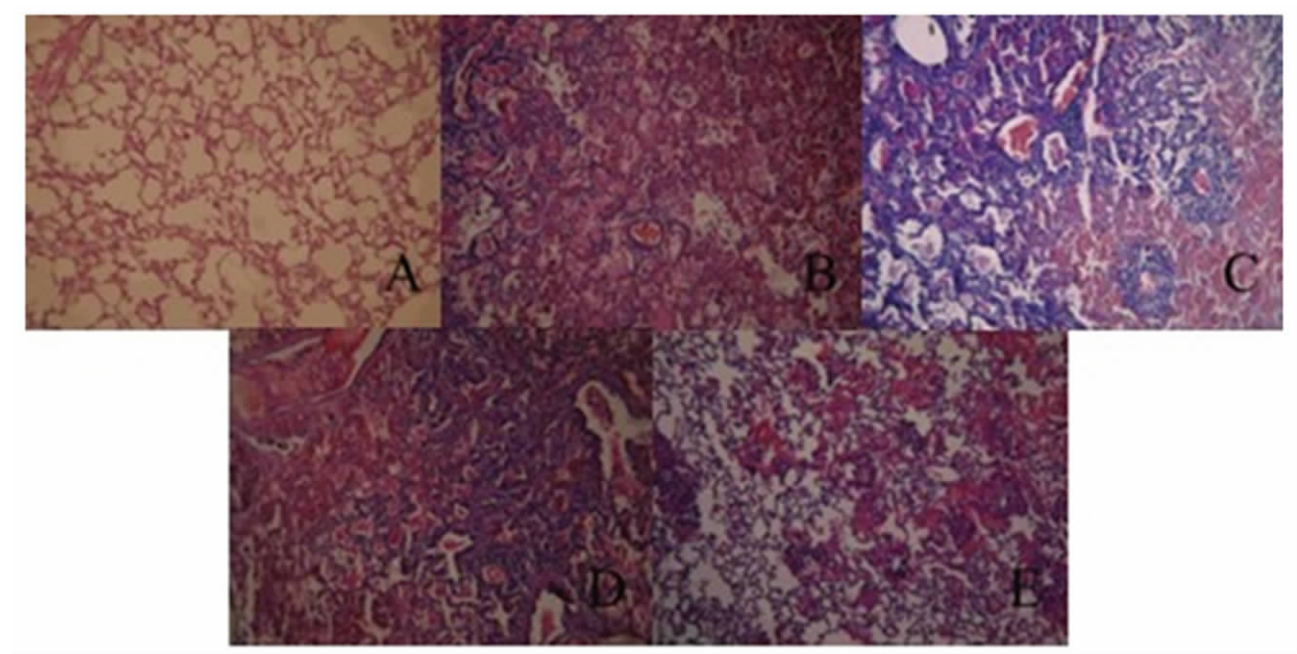


图 2 兔肺组织切片(HE×100):A :对照组;B: 6h 组;C: 24h 组;D:48h 组;E :72h 组

Fig 2 Histopathologic changes in lung tissues (HE×100): A :control group;B:6h group;C:4h group;D: 48h group;E :72h group

在生理状态下,细胞因子只在局部发挥作用,而在 ARDS 动物模型和临床研究中发现,肺组织、肺泡灌洗液及血液中炎症细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8 等含量大幅度增加^[11,12],表明炎症因子和 ARDS 的发生关系密切。

IL-1 是炎症因子级联反应的始动因子之一,它可刺激单核细胞和巨噬细胞产生 IL-6、TNF- α 、IL-8^[13],它还可诱导内皮细胞活化,刺激中性粒细胞释放炎症蛋白和炎症介质,参与炎症过程。本实验显示在油酸诱导 ARDS 发生 24h 内,机体炎症反映剧烈,IL-1 大量释放,肺组织明显充血、渗出增加,炎性细胞大量浸润;48h 后 IL-1 释放量减少,炎症反应减弱,肺组织含水量降低,肺内渗出物吸收,这与 Bauer TT 报道血浆 IL-1 和 TNF- α 可代表肺损伤的严重程度相一致^[14]。

IL-8 的主要生物学活性是上调内皮细胞的 β 2 黏着受体水平,吸引和激活中性粒细胞,后者定向游走到反应部位并释放活性氧、花生酸类物质、蛋白水解酶等,产生局部炎症和组织损伤^[15-18]。上皮细胞、成纤维细胞等多种细胞在刺激下均可产生 IL-8。本实验研究数据显示肺损伤后 48h 内,IL-8 含量升高,病理切片观察到中性粒细胞等炎性细胞大量浸润,肺组织损伤严重,W/D 值升高。IL-8 介导了炎性细胞的趋化,与 Bao 等^[9]观察到兔油酸诱导 ARDS 模型肺泡灌洗液中 IL-8 含量增高,使用人缘化小鼠源性 IL-8 单克隆抗体有效减轻了肺部炎症反应的研究结果一致。48h 后随着炎症反应的减轻,渗出减少,IL-8 的含量也随之下降,机体呼吸功能逐渐改善。

综上所述,兔油酸 ARDS 模型 48h 内表现稳定,满足 ARDS 诊断标准,炎性细胞渗出和炎症因子分泌增加,6h 损伤

最重;72h 渗出和炎症因子减少,呼吸功能改善,不满足 ARDS 诊断标准;炎性细胞和炎症因子 IL-1、IL-8 可能参与介导了 ARDS 的发生和发展,其生物学功能有待进一步研究。

参考文献(References)

[1] Rubenfeld GD, Herridge MS. Epidemiology and outcomes of acute lung injury[J]. Chest, 2007,131(2):554-562

[2] Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review [J]. Lancet, 2007,369 (9572): 1553-1564

[3] Xing JJ, Chen X, Tu PF, et al. Effects of salvianolic acids on erythrocyte deformability in oleic acid induced acute lung injury in rabbits [J]. Clin Hemorheol Microcirc, 2006,34(4):507-517

[4] Wang Yuanyuan. The effect of oleic acid induced ARDS on expressions of IL-1 β and IL-10 in rat liver [J]. Journal of Xinjiang Medical University, 2008, 31(4):405-408

[5] Bernard GR, Artigas A, Brigham KL et al. The American-European Consensus Conference on ARDS, definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1994,149:818-824

[6] Tang Zhaoli. The animal ARDS model induced by oleic acid[J]. Practical Journal of Cardiac Cerebral Pneumal and Vascular Disease, 2005,13(4):235-236

[7] Lai TS, Cai SX, Guo ZH. Serum and lung endothelin-1 increased in a canine model of ventilator-induced lung injury[J]. Chin Med J (Engl), 2010,123(8):1021-1027

[8] Nakazawa K, Yokoyama K, Yamakawa N, Makita K. Effect of positive

- end-expiratory pressure on inflammatory response in oleic acid-induced lung injury and whole-lung lavage-induced lung injury [J]. *J Anesth*, 2007,21(1):47-54
- [9] Xing JJ, Chen X, Tu PF, Jiang Y, Zhao JY. Effects of salvianolic acids on erythrocyte deformability in oleic acid induced acute lung injury in rabbits[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2006,34(4):507-517
- [10] 龚裕强, 陈毅军, 施小燕, 孙来芳, 孔万权, 庄荣, 陈大庆, 应斌宇. 不同途径茶多酚对兔急性呼吸窘迫综合征肺保护的研究[J]. *中西医结合急救杂志*, 2007,14(3):154-158
- [11] Kurdowska A, Noble JM, Grant IS, et al. Antiinterleukin-8 autoantibodies in patients at risk for acute respiratory distress syndrome[J]. *Crit Care Med*, 2002,30(10):2335-2337
- [12] McClintock D, Zhuo H, Wickersham N, et al. Biomarkers of inflammation, coagulation and fibrinolysis predict mortality in acute lung injury[J]. *Crit Care*, 2008,12(2):R41
- [13] Strieter RM, Kunkel SL, Keane MP, et al. Chemokines in lung injury [J]. *Chest*, 1999,116(1 Suppl):103S-110S
- [14] Bauer TT, Monton C, Torres A, et al. Comparison of systemic cytokine levels in patients with acute respiratory distress syndrome, severe pneumonia, and controls[J]. *Thorax*, 2000,55(1):46-52
- [15] Lee WL, Downey GP. Neutrophil activation and acute lung injury[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2001,7(1):1-7
- [16] Reutershan J, Ley K. Bench-to-bedside review: Acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung [J]. *Critical Care*, 2004,8(6):453-461
- [17] Zeilhofer HU, Schorr W. Role of interleukin-8 in neutrophil signaling [J]. *Curr Opin Hematol*, 2000,7(3):178-182
- [18] Downey GP, Dong Q, Kruger J, et al. Regulation of neutrophil activation in acute lung injury[J]. *Chest*, 1999,116(1 Suppl):46S-54S
- [19] Bao Z, Ye Q, Gong W, et al. Humanized monoclonal antibody against the chemokine CXCL-8 (IL-8) effectively prevents acute lung injury [J]. *Int Immunopharmacol*, 2010,10(2):259-263

(上接第 627 页)

- [16] Yannas IV, Tzeranis DS, Harley BA, et al. Biologically active collagen-based scaffolds: advances in processing and characterization [J]. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci*, 2010, 368(1917): 2123-2139
- [17] Madaghiele M, Sannino A, Yannas IV, et al. Collagen-based matrices with axially oriented pores [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 85(3): 757-767
- [18] O'Brien FJ, Harley BA, Yannas IV, et al. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds [J]. *Biomaterials*, 2004, 25(6): 1077-1086
- [19] Haugh MG, Murphy CM, O'Brien FJ. Novel freeze-drying methods to produce a range of collagen-glycosaminoglycan scaffolds with tailored mean pore sizes [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16(5): 887-894
- [20] Kim HW, Knowles JC, Kim HE. Hydroxyapatite and gelatin composite foams processed via novel freeze-drying and crosslinking for use as temporary hard tissue scaffolds [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2005, 72(2): 136-145