

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.10.007

炎症介质 IL-6 及 IL-8 在撞击伤肺组织中的表达研究

吴秋平, 蒋力, 张在永, 闵家新[△]

(第三军医大学新桥医院胸外科, 重庆 400037)

[摘要] 目的 探讨炎症介质白细胞介素(IL)-6 及 IL-8 在声门紧闭与开放状态下闭合性胸部撞击所致肺损伤组织中的表达。方法 采用 RT-PCR 法检测声门紧闭与开放状态下, 不同时相点胸部撞击伤侧与对照组肺组织 IL-6 和 IL-8 mRNA 的表达。结果 伤后 4、8、12 h 声门紧闭组 IL-6 和 IL-8 mRNA 的表达显著高于声门开放组($P < 0.05$)。伤侧肺组织中 IL-6 和 IL-8 mRNA 表达各时相点显著高于与对照组($P < 0.05$)。对照组、声门紧闭组和声门开放组的肺组织两种细胞因子 IL-8 和 IL-6 mRNA 的表达变化规律相似, 表达明显上调。结论 提示 IL-6 和 IL-8 可能在肺撞击伤后肺脏功能损害的发生、发展过程中发挥重要的作用。

[关键词] 胸部损伤; 撞击伤; 白细胞介素 6; 白细胞介素 8

[中图分类号] R826.63

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)10-1317-02

Expressions of IL-6 and IL-8 in lung injuries induced by blunt chest trauma

Wu Qiuping, Jiang Li, Zhang Zaiyong, Min Jiaxin[△]

(Department of Thoracic Surgery, Xinqiao Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To study the expression of IL-6 and IL-8 in the lung injuries induced by blunt chest trauma under the closure and open state of glottis. **Methods** The expressions of IL-6 and IL-8 mRNA were detected by RT-PCR in injured lung tissues under the closed and open glottis states and the control lung tissues at designed different time points. **Results** The expressions of IL-6 and IL-8 mRNA at 4, 8, 12h in the closed glottis group were obviously higher than those in the open glottis group ($P < 0.05$) and the expressions at designed various time points in the injured lung tissue were higher than those in the control lung tissues ($P < 0.05$). The change rule of IL-6 and IL-8 mRNA expression in the control group, closed glottis group and open glottis group was similar, the expression was up-regulated. **Conclusion** IL-6 and IL-8 might play an important role in the occurrence and development of functional lesion in the injured lung by blunt chest trauma.

[Key words] thoracic injuries; impact injury; interleukin-6; interleukin-8

创伤特别是伴有严重胸部创伤的患者, 因多发肋骨骨折和肺挫伤, 造成反常呼吸运动及肺组织出血、水肿, 通气功能、氧弥散功能障碍和肺内分流增加。肺是胸部撞击伤最常累及的人体重要器官, 胸部撞击伤后的肺挫伤、急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)、急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 都是常见的致死性器官继发性损伤。创伤性 ALI 主要表现在肺泡毛细血管膜通透性增高, 间质水肿, 临床上不一定有特殊症状, 但随着病变范围的扩大, 可出现进行性呼吸困难, 顽固性低氧血症, 常在 24 h 内发展成 ARDS^[1]。ALI 的实质是各种原因引起的全身炎症反应综合征在肺部的表现, ARDS 即是 ALI 发展的严重阶段。在病理、生理情况下, 机体多种细胞大量分泌促炎性细胞因子并上调细胞黏附分子的表达分泌, 进而引发一系列瀑布样炎症反应过程, 可能是 ALI 发生、发展的重要原因之一^[2]。目前国内外一致性认为创伤性 ALI 是一种“炎症介质病”, 但真正的发病机制仍有待于进一步阐明。为此, 本研究采用 RT-PCR 法检测伤侧 (右肺) 肺组织白细胞介素 (interleukin, IL)-6 及 IL-8 mRNA 的表达, 为撞击伤后继发性创伤性肺损伤的病因及防治提供一定的理论依据。

1 材料与方

1.1 材料 动物: 选取新西兰实验兔 54 只, 雌雄不限, 体质量 (2.28 ± 0.35) kg, 4 月龄。主要试剂: dNTP、TaqDNA 聚合酶、RNA 酶抑制剂、Oligo(dt)、AMV 购自上海生物工程有限公司, 总 RNA 提取试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, PCR

Marker 购自华美生物工程公司; RT-PCR 引物为上海生工公司合成, 其引物序列见表 1。

表 1 RT-PCR 引物序列

名称	引物(5'-3')	片段长度(bp)
IL-6	上游: CCT GGT GGT TAC CGC TTT C	417
	下游: GCT GGC TTG AGG GCT TCT T	
IL-8	上游: TTC CTG CTT TCT GCA GCT CT	456
	下游: GTC CAC TCT CAA TCA CTC TCA G	
β-Actin	上游: AGC CAT GTA CGT AGC CAT CC	227
	下游: CTC TCA GCT GTG GTG GTG GTG AA	

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组 将 54 只新西兰实验兔, 分为对照组 ($n=6$)、声门开放组 ($n=24$) 和声门紧闭组 ($n=24$)。声门开放、紧闭组根据不同时间 (伤后 2、4、8、12 h) 又各分为 4 组 ($n=6$)。观察伤后 2、4、8、12 h IL-6 及 IL-8 mRNA 的变化。撞击伤模型参照文献^[3]。对照组: 只进行麻醉, 不致伤; 通过开放和夹闭气管导管模拟声门开放和紧闭生理状态。声门开放、紧闭组: 经耳缘静脉注射 1.5% 戊巴比妥钠 1 mL/kg 麻醉, 行气管插管术, 通过开放和夹闭气管导管模拟声门开放和紧闭生理状态; 将兔固定于兔架上, 剪去撞击点处胸部毛发; 然后将兔架直立, 撞击中心点在兔右锁骨中线第 4 肋间, 撞击面积 1.77 cm。

表 2 各组动物右肺组织 IL-8 mRNA 的表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	伤前	伤后 2 h	伤后 4 h	伤后 8 h	伤后 12 h
对照组	0.113±0.016	—	—	—	—
声门紧闭组	0.112±0.015	0.211±0.044 ^a	0.979±0.456 ^a	1.334±0.122 ^a	0.334±0.114 ^a
声门开放组	0.113±0.013	0.176±0.009 ^{ab}	0.491±0.129 ^{ab}	0.787±0.132 ^{ab}	0.198±0.07 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与声门紧闭组同时间比较; —: 此项无数据。

表 3 各组动物右肺组织 IL-6 mRNA 的表达比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	伤前	伤后 2 h	伤后 4 h	伤后 8 h	伤后 12 h
对照组	0.211±0.016	—	—	—	—
声门紧闭组	0.210±0.015	0.313±0.112 ^a	1.957±0.128 ^a	2.098±0.117 ^a	0.567±0.057 ^a
声门开放组	0.211±0.018	0.255±0.009 ^{ab}	1.199±0.132 ^{ab}	1.573±0.098 ^{ab}	0.365±0.009 ^{ab}

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与声门紧闭组同时间比较; —: 此项无数据。

1.2.2 常规肺组织总 RNA 提取 参照 Boehringer Mannheim 公司说明书。组织 RNA 的提取按 Trizol 试剂盒说明书进行, 扩增条件: 盖部温度 105 ℃, 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 50 s, 60 ℃ 退火 58 s (CNTF 56 ℃, CNTFR 56 ℃), 72 ℃ 延伸 60 s, 30 个循环; 72 ℃ 再延伸 8 min, 产物 -20 ℃ 保存备用。

1.2.3 RT-PCR 检测肺组织 IL-6 及 IL-8 mRNA 表达 组织 RNA 的提取按 Trizol 试剂盒说明书进行, 扩增条件: 盖部温度 105 ℃, 94 ℃ 预变性 5 min, 94 ℃ 变性 50 s, 60 ℃ 退火 58 s (CNTF 56 ℃, CNTFR 56 ℃), 72 ℃ 延伸 60 s, 30 个循环; 72 ℃ 再延伸 8 min, 产物 -20 ℃ 保存备用。

1.2.4 琼脂糖凝胶电泳及图像分析 配 0.5×TBE 电泳缓冲液: 量取 110 mL 5×TBE, 加入 990 mL (稀释 10 倍) 三蒸水, 定容至 1 100 mL; 配胶: 见试剂配制; 配制加样样品: 样品及内参 PCR 产物各 8 μL, 2 mL 6×凝胶加样缓冲液, 充分混匀; 加样: 每孔加 18 μL 样品, Marker 18 μL; 电泳: 电压 80 V, 电泳时间 1 h; 紫外灯下观察, 凝胶图像扫描。

1.3 统计学处理 数据采用 SAS6.12 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验、方差分析、*q* 检验等。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组动物右肺组织 IL-8 mRNA 的表达比较 伤后不同时间相点撞击侧(右肺)肺组织中 IL-8 mRNA 有不同的表达, 伤后同一时相点声门紧闭、开放组 IL-8 mRNA 值显著高于对照组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。撞击后, 声门紧闭组和声门开放组的 IL-8 mRNA 水平逐渐上升, 8 h 时达到达到峰值, 后该值逐渐下降。声门紧闭组 IL-8 mRNA 水平明显高于声门开放组 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.2 各组动物右肺组织 IL-6 mRNA 的表达比较 伤后不同时间在右肺组织中 IL-6 mRNA 有不同的表达, IL-6 mRNA 的表达趋势与 IL-8 mRNA 在肺组织中的表达趋势类似。声门不同状态下各组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在伤后 IL-6 mRNA 逐渐上升, 在 8 h 时达到右肺组织 IL-6 mRNA 达到峰值。之后该值逐渐下降, 到 12 h 时, 各组的 IL-6 mRNA 值差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 3。

3 讨论

严重创伤引起机体神经、内分泌和免疫系统的网络反应, 在促炎性细胞因子作用下, 表现为全身性瀑布式炎症反应, 发展到一定程度则演变为多器官功能障碍综合征 (MODS)^[3]。肺脏首先遭到损害, 表现为持续的顽固性低氧血症及呼吸窘迫的临床特点。Meade 等^[4]发现, 肺损伤患者的 IL-6、IL-8 升高, 但 Donnelly 等^[5]测定了严重创伤患者的肿瘤坏死因子 α (TNF-α)、IL-1、IL-6、IL-8、补体 C3a、内毒素、心排指数 (cardiac

index CI)。结果表明, 虽然 IL-6、IL-8、补体 C3a 及 CI 等介质和指标在 ARDS 发生中显示一定作用, 但都不能预测 ARDS 的发生, 即不是 ARDS 的始动因素。说明细胞因子在创伤性 ALI 中的作用还有争议^[2]。

本研究对动物受撞击后肺组织中的几种细胞因子的表达进行 RT-PCR 检测, 结果显示 IL-6、IL-8 mRNA 表达明显上调, 提示 IL-6、IL-8 参与了肺撞击伤后肺脏功能损害的发生、发展过程。IL-6、IL-8 主要来源于单核/巨噬细胞, 由于其对炎症, 特别是急性炎症有重要的诱导与调控作用而被称为前炎症细胞因子^[6]。IL-6 是一种典型的具有广泛生物学活性的多功能的单链糖蛋白细胞因子, 参加机体的细胞免疫、炎症反应及造血调控等, 与机体的炎症反应和抗感染防御机制密切相关, 是一种重要的促炎性因子^[7]。IL-8 是一种招募中性粒细胞渗出到炎症部位的主要趋化因子, 中性多核白细胞表面特异性受体结合后, 导致细胞变形、脱颗粒反应、呼吸爆发、释放溶酶体和过氧化物, 从而促进炎症反应, 引起肺组织损伤^[8]。

本实验中, 声门紧闭组和声门开放组肺组织 IL-8、IL-6 mRNA 水平在伤后 8 h 时达到峰值, 伤后 12 h 仍有较高表达。IL-8、IL-6 mRNA 的表达规律相似, 说明它们在肺损伤后的炎症反应中的作用具有相似性, 且 IL-8、IL-6 mRNA 在声门紧闭组的表达明显高于声门开放组, 提示声门紧闭组的肺损伤程度大于声门开放组, 这一结果与本研究前期的结果非常吻合^[3]。IL-8、IL-6 mRNA 在肺组织中的表达趋势十分相似, 说明 IL-8、IL-6 mRNA 在功能上具有重叠或相关性。IL-6、IL-8 在撞击伤组织中的高表达, 是机体对创伤的免疫应答的一部分, 它的表达水平与撞击伤后局部组织的急性炎症反应密切相关, 正常水平的表达对创伤愈合是有利的, 而过高往往会导致诸如炎性渗出过多、过度水肿、坏死加重、脓肿形成等过度炎症反应。前炎症细胞因子在创伤后局部的表达对机体组织的影响较在全身血液循环的表达重要。

本实验中无论声门紧闭与否, 撞击后肺组织 IL-6 mRNA 水平均增高, 与 Li 等^[9]报道的严重创伤患者血清 IL-6 mRNA 水平明显升高一致, 创伤后并发 ARDS 患者其血清及支气管肺泡灌洗液 (BAL) 中 IL-6 水平明显高于非 ARDS 患者, 且与肺功能恶化、血管通透性增高密切相关。IL-8 在撞击后 2 h 升高, 8 h 后达到峰值, 持续时间较长, 可能与创伤刺激后, 粒细胞的持续和过度活化有关。与肺血管内皮细胞表面相连的 IL-8 能增强中性粒细胞表面的白细胞整合素 (CD11/CD18) 的活性, 改变其构形, 掩盖在白细胞黏附和滚动中起作用的 L-选择素, 形成牢固黏附, 促使中性粒细胞跨越内皮移行到肺组织^[10], 发生炎症反应, 引起肺组织损伤。

撞击直接损伤可导致肺脏出血和水肿, (下转第 1321 页)

相互作用产生的级联反应参与了脂代谢紊乱所致的糖尿病视网膜病变。

参考文献

- [1] Ishibashi T. Cell biology of intraocular vascular diseases [J]. *Jpn J Ophthalmol*, 2000, 44(3): 323-324.
- [2] Han D, Yamamoto Y, Munesue S, et al. Induction of receptor for advanced glycation end products by insufficient leptin action triggers pancreatic β -cell failure in type 2 diabetes [J]. *Genes Cells*, 2013, 18(4): 302-314.
- [3] Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, et al. RAGE blockade stabilizes established athero-sclerosis in diabetic apolipoprotein E-null mice [J]. *Circulation*, 2002, 106(22): 2827-2835.
- [4] Chisolm GM, Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview [J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(12): 1815-1826.
- [5] Matsumoto T, Kobayashi T, Kamata K. Role of lysophosphatidylcholine (LPC) in atherosclerosis [J]. *Curr Med Chem*, 2007, 14(30): 3209-3220.
- [6] Cines DB, Pollak ES, Buck CA, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders [J]. *Blood*, 1998, 91(10): 3527-3561.
- [7] Murugesan G, Sandhya Rani MR, Gerber CE, et al. Lysophosphatidylcholine regulates human microvascular endothelial cell expression of chemokines [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2003, 35(11): 1375-1384.
- [8] Shi Y, Zhang P, Zhang L, et al. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in leukocyte activation and inflammatory responses [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 191(1): 54-

62.

- [9] Yu X, Xing C, Pan Y, et al. IGF-1 alleviates ox-LDL-induced inflammation via reducing HMGB1 release in HAECs [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2012, 44(9): 746-751.
- [10] Luan ZG, Zhang H, Yang PT, et al. HMGB1 activates nuclear factor- κ B signaling by RAGE and increases the production of TNF- α in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Immunobiology*, 2010, 215(12): 956-962.
- [11] Kenne WF. The role of lipids in renal disease future challenges [J]. *KidneyInt*, 2000, 57 Suppl 1: S27-31.
- [12] Van Geest RJ, Klaassen I, Lesnik-Oberstein SY, et al. Vitreous TIMP-1 levels associate with neovascularization and TGF- β 2 levels but not with fibrosis in the clinical course of proliferative diabetic retinopathy [J]. *Cell Commun Signal*, 2013, 7(1): 1-9.
- [13] Nawroth P, Bierhaus A, Marrero M, et al. Atherosclerosis and restenosis: is there a role for RAGE [J]. *Curr Diab Rep*, 2005, 5(1): 11-16.
- [14] Gao X, Zhang H, Schmidt AM, et al. AGE/RAGE produces endothelial dysfunction in coronary arterioles in type 2 diabetic mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(2): H491-498.
- [15] Feng L, Zhu MM, Zhang MH, et al. Protection of glycyrrhizic acid against AGEs-induced endothelial dysfunction through inhibiting RAGE/NF- κ B pathway activation in human umbilical vein endothelial cells [J]. *Ethnopharmacol*, 2013, 148(1): 27-36.

(收稿日期: 2014-10-20 修回日期: 2014-12-20)

(上接第 1318 页)

是物理因素所造成的原发性, 而内皮细胞和上皮细胞变性、细胞间隙增宽、通透性增强等均应视为急性继发性肺损伤。尽管继发性损伤中有撞击参数如驱动压和压缩量等物理因素所致, 但从本实验结果来看, 细胞因子 IL-6 和 IL-8 可能在肺撞击伤后肺脏功能损害的发生、发展过程中发挥重要的作用。由于与创伤有关的细胞因子很多, 各细胞因子之间相互影响、相互作用, 呈网络样^[11]。因此, 关于细胞因子 IL-6 和 IL-8 在加重肺撞击伤中的作用和地位, 有待进一步深入研究^[12]。

参考文献

- [1] Della Rocca G, Coccia C. Acute lung injury in thoracic surgery [J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2013, 26(1): 40-46.
- [2] Sauaia A, Moore FA, Moore EE, et al. Epidemiology of trauma death: a reassessment [J]. *J Trauma*, 1995, 38(2): 185-193.
- [3] 吴秋平, 蒋耀光, 闵家新. 声门紧闭与开放状态下兔肺撞击伤的损伤特点 [J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2005, 12(3): 189-193.
- [4] Meade P, Shoemaker WC, Donnelly TJ, et al. Temporal patterns of hemodynamics oxygen transport cytokine activity and complement activity in the development of adult respiratory distress syndrome after severe injury [J]. *J Trauma*, 1994, 36(5): 651-657.
- [5] Donnelly TJ, Meade P, Jagels M, et al. Cytokine, complement, and endotoxin profiles associated with the develop-

ment to the adult respiratory distress syndrome after severe injury [J]. *Crit Care Med*, 1994, 22(5): 768-776.

- [6] Hoch RC, Rodriguez R, Manning T, et al. Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production [J]. *Crit Care Med*, 1993, 21(6): 839-845.
- [7] Seeley EJ. Updates in the management of acute lung injury: a focus on the overlap between AKI and ARDS [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2013, 20(1): 14-20.
- [8] Donnelly SC, Strieter RM, Kunkel SL, et al. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at risk patient group [J]. *Lancet*, 1993, 341(8846): 643-647.
- [9] Li T, Luo N, Du L, et al. Tumor necrosis factor- α plays an initiating role in extracorporeal circulation-induced acute lung injury [J]. *Lung*, 2013, 191(2): 207-214.
- [10] Fujishima S, Aikawa N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation [J]. *Intensive Care Med*, 1995, 21(3): 277-285.
- [11] Fröhlich S, Boylan J, McLoughlin P. Hypoxia-induced inflammation in the lung: a potential therapeutic target in acute lung injury [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013, 48(3): 271-279.
- [12] 钱桂生. 全身炎症反应综合征、急性肺损伤与急性呼吸窘迫综合征 [J]. *解放军医学杂志*, 1999, 24(5): 313-316.

(收稿日期: 2014-08-30 修回日期: 2014-12-17)