

· 基础研究 ·

## 促炎细胞因子在细菌性肺炎老龄大鼠多器官损伤中的作用

王守富<sup>1</sup>, 秦金利<sup>2</sup>, 李建生<sup>2\*</sup>, 张慧俭<sup>2</sup>, 李素云<sup>2</sup>, 余海滨<sup>2</sup>, 王峰<sup>3</sup>,  
刘四化<sup>2</sup>, 李亚<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>河南省中医药研究院心血管病科, 郑州 450004; <sup>2</sup>河南中医学院老年医学研究所, 郑州 450008; <sup>3</sup>河南省中医院脑血管病科, 郑州 450002)

**【摘要】** 目的 探讨促炎细胞因子肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 (IL-1)、IL-6 在老年感染性多器官损伤中的意义。方法 将大鼠随机分为青年对照组、青年模型组和老龄对照组、老龄模型组; 采用气管插管法注入肺炎克雷伯杆菌, 由肺炎导致多器官损伤; 应用光学显微镜、免疫组织化学技术, 观察肺、心、小肠及肾脏组织病理改变与促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 变化情况。结果 与同龄对照组比较, 老龄模型组和青年模型组肺、心、肾、小肠组织 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 表达水平明显增高及脏器组织病理学改变明显 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); 而老龄模型组肺 IL-1、心 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和小肠 IL-1、IL-6 表达水平又较青年模型组显著增高 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 脏器损伤亦较重 ( $P < 0.05$ )。结论 促炎细胞因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6 参与了老年感染性多器官损伤, 并在其中发挥了重要作用。

**【关键词】** 感染; 大鼠; 多器官功能衰竭; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白细胞介素类

**【中图分类号】** R563.8

**【文献标识码】** A

**【DOI】** 10.3724/SP.J.1264.2011.00041

## Roles of proinflammatory factors in infectious multiple organ injury in aged rats

WANG Shoufu<sup>1</sup>, QIN Jinli<sup>2</sup>, LI Jiansheng<sup>2</sup>, ZHANG Huijian<sup>2</sup>, LI Suyun<sup>2</sup>, YU Haibin<sup>2</sup>, WANG Feng<sup>3</sup>,  
LIU Sihua<sup>2</sup>, LI Ya<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Cardiology, Institute of Traditional Chinese Medicine of He'nan Province, Zhengzhou 450004, China; <sup>2</sup>Institute of Geriatrics, He'nan College of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China; <sup>3</sup>Department of Cerebrovascular Diseases, Traditional Chinese Medicine Hospital of He'nan Province, Zheng Zhou 450008, China)

**【Abstract】 Objective** To investigate the roles of proinflammatory factors, including tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1(IL-1) and IL-6 in the infectious multiple organ injury in aged rats. **Methods** Male SD rats were randomly divided into young control group (YCG,  $n=10$ ), young model group(YMG,  $n=15$ ), elderly control group (ACG,  $n=10$ ) and elderly model group(AMG,  $n=25$ ). Multiple organ injury was induced by injection of *Klebsiella pneumoniae* through tracheal intubation in rat models of pneumonia. The pathological changes of lungs, heart, kidneys, and small intestine were investigated immunohistochemically. The changes of proinflammatory factors expression in these tissues were also observed. **Results** The expression levels of TNF- $\alpha$ , IL-1, and IL-6 in lungs, heart, kidneys and small intestine were significantly higher in YMG and AMG than in YCG and ACG ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The pathological changes of lungs, heart, kidney and small intestine were more obvious in YMG and AMG than in YCG and ACG ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). The expression levels of IL-1 in lungs, TNF- $\alpha$  and IL-6 in heart, and IL-1 and IL-6 in small intestine were significantly elevated, and organ injuries were severer in ACG than in YCG ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Proinflammatory factors, including TNF- $\alpha$ , IL-1 and IL-6, play important roles in the development of infectious multiple organ injury in the aged rats.

**【Key words】** inflammation; rat; multiple organ failure; tumor necrosis factor; interleukin

*This work was supported by Program for New Century Excellent Talents in Universities of He'nan Province (2006HANCET-05)*

近来研究显示, 过度炎症反应参与了多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 发病过程。然而, 有关促炎细胞因子在老年 MODS 发病中的作用报道较少。本研究拟采取气管

插管法注入肺炎克雷伯杆菌, 由肺炎导致多器官损伤, 观察肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6 的变化情况, 以阐明促炎细胞因子在老年感染性多

收稿日期: 2010-08-16; 修回日期: 2011-06-13

基金项目: 河南省高校新世纪优秀人才支持计划(NO.2006HANCET-05)

通讯作者: 李建生, Tel: 0371-65676568, E-mail: li\_js@163.com

器官损伤中的意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

清洁级 SD 老龄雄性大鼠 (21 月龄), 35 只, 体重 (550 ± 70) g; SD 青年雄性大鼠 (6 月龄), 25 只, 体重 (200 ± 20) g, 均由河南省实验动物中心提供。肺炎克雷伯杆菌由中国生物制品检验鉴定所提供 (种系号: K46114), 使用前用无菌生理盐水稀释至  $1.2 \times 10^{13}$  cfu/L。兔抗鼠 TNF- $\alpha$ , IL-1 和 IL-6 单克隆抗体由武汉博士德生物工程有限公司提供。

### 1.2 模型与分组

按李建生等<sup>[1]</sup>报道的方法复制大鼠多器官损伤模型。模型成功标准参照盛志勇、胡森主编的《多器官功能障碍综合征》提出的动物 MODS 时器官功能障碍分期诊断及评分标准<sup>[2]</sup>。老龄大鼠 35 只, 分为老龄对照组 10 只, 老龄模型组 25 只; 青年大鼠 25 只, 分为青年对照组 10 只, 青年模型组 15 只。造模 24~48h 老龄模型组死亡 15 只, 青年模型组死亡 5 只。造模 48h 后处死动物。

### 1.3 外周血白细胞

取尾静脉血, 计数白细胞 ( $\times 10^9/L$ ) 和中性粒细胞比率 (%) (XS-800i 自动血液分析仪自动分析、计数)。

### 1.4 脏器组织 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$ 表达检测

采用免疫组织化学 SP 法检测。免疫组织化学染色结果分析方法如下: 光学显微镜下观察, 在 400 倍视野下, 细胞膜、细胞浆呈棕色为免疫组织化学阳性。以光学显微镜观察, 用 Image-Pro Plus 5.1 专业图像采集与分析系统采集图像, 并进行半定量分析。每张切片随机选取不重叠的 5 个视野拍照, 测定其平均光密度值及阳性细胞数, 取其平均值代表各细胞因子的表达水平。

### 1.5 病理观察

取肺、心、肾、小肠组织 4% 多聚甲醛固定, 经脱水、透明、浸蜡、包埋, 切成 4~6 $\mu$ m 厚的切片, 常规脱蜡、脱水, 苏木素-伊红染色, 脱水、透明、封

片。光学显微镜观察各脏器组织病理形态学改变并进行组织损伤评分: 肺脏组织损伤评分按文献<sup>[3]</sup>标准, 记为 0~3 分; 心脏组织损伤评分按文献<sup>[4]</sup>标准, 记为 0~3 分; 肾脏损伤程度分级按文献<sup>[5,6]</sup>标准, 记为 0~4 分; 小肠组织损伤程度分级按文献<sup>[7]</sup>标准, 记为 0~4 分。

### 1.6 统计学处理

应用 SPSS13.0 统计分析软件, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 符合正态分布者采用单因素方差分析, 不符合正态分布者进行数据转化后比较。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠外周血白细胞计数和中性粒细胞比率的变化

表 1 结果表明, 青年模型组和老龄模型组白细胞计数、中性粒细胞比率分别较青年对照组和老龄对照组明显升高 ( $P < 0.01$ )。

### 2.2 各组大鼠不同脏器组织 TNF- $\alpha$ 表达水平

表 2 结果表明, 青年模型组和老龄模型组肺、心、小肠和肾组织 TNF- $\alpha$  阳性细胞数和平均光密度分别明显高于青年对照组和老龄对照组 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 而老龄模型组心脏组织 TNF- $\alpha$  阳性细胞数和平均光密度显著高于青年模型组 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

### 2.3 各组大鼠不同脏器组织 IL-1 表达水平

表 3 结果表明, 老龄模型组和青年模型组肺、心、小肠和肾组织 IL-1 阳性细胞数和 (或) 平均光密度分别显著高于老龄对照组和青年对照组 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ); 与青年模型组比较, 老龄模型组肺、小肠组织阳性细胞数明显增高 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 各组大鼠不同脏器组织 IL-6 表达水平

表 4 结果表明, 老龄模型组和青年模型组肺、心、小肠和肾组织 IL-6 阳性细胞数和平均光密度分别显著高于老龄对照组和青年对照组 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 而老龄模型组心脏组织平均光密度和小肠组织阳性细胞数明显高于青年模型组 ( $P < 0.01, P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠白细胞计数及中性粒细胞比率比较 (n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	WBC计数( $\times 10^9/L$ )		中性粒细胞比率(%)	
	24h	48h	24h	48h
青年对照组	5.1 ± 1.4	5.0 ± 1.1	25 ± 8	25 ± 6
青年模型组	16.5 ± 2.9**	18.3 ± 3.5**	60 ± 4**	62 ± 6**
老龄对照组	6.4 ± 1.2##	6.3 ± 1.3##	24 ± 6##	24 ± 5##
老龄模型组	13.5 ± 2.9	16.1 ± 3.4	56 ± 7	56 ± 6

注: 与青年对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ; 与老龄模型组比较, ## $P < 0.01$

表2 各组大鼠不同脏器组织 TNF-α 表达水平比较

(n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	肺		心		小肠		肾	
	阳性细胞数	平均光密度	阳性细胞数	平均光密度	阳性细胞数	平均光密度	阳性细胞数	平均光密度
青年对照组	32 ± 30	0.14 ± 0.07	32 ± 28	0.13 ± 0.05	26 ± 25	0.37 ± 0.20	42 ± 33	0.26 ± 0.07
青年模型组	269 ± 40**	0.77 ± 0.10**	149 ± 29* <sup>#</sup>	0.31 ± 0.05** <sup>#</sup>	148 ± 31**	0.62 ± 0.22*	207 ± 56**	0.49 ± 0.09*
老龄对照组	30 ± 27 <sup>#</sup>	0.19 ± 0.08 <sup>#</sup>	32 ± 31 <sup>#</sup>	0.13 ± 0.04 <sup>#</sup>	30 ± 25 <sup>#</sup>	0.37 ± 0.21 <sup>#</sup>	50 ± 33 <sup>#</sup>	0.30 ± 0.07 <sup>#</sup>
老龄模型组	271 ± 40	0.82 ± 0.08	185 ± 34	0.38 ± 0.05	182 ± 28	0.63 ± 0.24	207 ± 47	0.52 ± 0.08

注: 与青年对照组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 与老龄模型组比较, <sup>#</sup>P < 0.05, <sup>#</sup>#P < 0.01

表3 各组大鼠不同脏器组织 IL-1 表达水平比较

(n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	肺		心		小肠		肾	
	阳性细胞数	平均光密度	阳性细胞数	平均光密度	阳性细胞数	平均光密度	阳性细胞数	平均光密度
青年对照组	75 ± 42	0.31 ± 0.05	49 ± 43	0.18 ± 0.14	49 ± 34	0.24 ± 0.18	50 ± 42	0.35 ± 0.04
青年模型组	170 ± 51 <sup>#</sup>	0.40 ± 0.05**	130 ± 45**	0.36 ± 0.15**	99 ± 35 <sup>#</sup>	0.36 ± 0.18	181 ± 51**	0.39 ± 0.04*
老龄对照组	60 ± 59 <sup>#</sup>	0.35 ± 0.05 <sup>#</sup>	48 ± 37 <sup>#</sup>	0.18 ± 0.17 <sup>#</sup>	44 ± 34 <sup>#</sup>	0.20 ± 0.07 <sup>#</sup>	67 ± 57 <sup>#</sup>	0.36 ± 0.04 <sup>#</sup>
老龄模型组	310 ± 53	0.48 ± 0.05	142 ± 43	0.44 ± 0.14	158 ± 34	0.34 ± 0.08	264 ± 55	0.39 ± 0.05

注: 与青年对照组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 与老龄模型组比较, <sup>#</sup>P < 0.05, <sup>#</sup>#P < 0.01

表4 各组大鼠不同脏器组织 IL-6 表达水平比较

(n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	肺		心		小肠		肾	
	阳性细胞数	平均光密度	阳性细胞数	平均光密度	阳性细胞数	平均光密度	阳性细胞数	平均光密度
青年对照组	42 ± 29	0.21 ± 0.08	51 ± 43	0.19 ± 0.13	44 ± 29	0.34 ± 0.15	50 ± 45	0.16 ± 0.09
青年模型组	155 ± 42**	0.33 ± 0.09**	147 ± 55**	0.29 ± 0.10 <sup>#</sup>	161 ± 36 <sup>#</sup>	0.47 ± 0.14**	210 ± 57**	0.49 ± 0.07**
老龄对照组	44 ± 32 <sup>#</sup>	0.36 ± 0.18 <sup>#</sup>	56 ± 0 <sup>#</sup>	0.20 ± 0.10 <sup>#</sup>	42 ± 29 <sup>#</sup>	0.38 ± 0.15 <sup>#</sup>	48 ± 42 <sup>#</sup>	0.31 ± 0.11 <sup>#</sup>
老龄模型组	156 ± 39	0.60 ± 0.20	161 ± 34	0.61 ± 0.17	192 ± 32	0.53 ± 0.12	242 ± 56	0.50 ± 0.08

注: 与青年对照组比较, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01; 与老龄模型组比较, <sup>#</sup>P < 0.05, <sup>#</sup>#P < 0.01。

### 2.3 各组大鼠不同脏器损伤程度评分

表5 结果表明, 青年模型组和老龄模型组肺、心、肾、小肠病理损伤程度计分分别较青年对照

组和老龄对照组明显增高 (P 均 < 0.01), 老龄模型组肺、心、小肠又较青年模型组显著增高 (P < 0.05)。

表5 各组大鼠不同脏器损伤程度评分比较

(n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	肺	心	肾	小肠
青年对照组	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
青年模型组	7.1 ± 1.5 <sup>#</sup>	4.4 ± 1.5 <sup>#</sup>	1.9 ± 0.7**	1.5 ± 0.5 <sup>#</sup>
老龄对照组	1.0 ± 0.5 <sup>#</sup>	0.7 ± 0.5 <sup>#</sup>	0.5 ± 0.5 <sup>#</sup>	0.5 ± 0.3 <sup>#</sup>
老龄模型组	9.0 ± 0.0	7.2 ± 1.6	3.0 ± 0.7	2.5 ± 0.5

注: 与青年对照组比较, \*\*P < 0.01; 与老龄模型组比较, <sup>#</sup>P < 0.05, <sup>#</sup>#P < 0.01。

## 3 讨论

TNF-α是由单核/巨噬细胞在内毒素、炎症介质、IL-1等细胞因子的作用下以自分泌方式生成的一种多肽, 为机体应激反应产生最早和最起核心作用的炎症介质。有报道显示注射内毒素1h后, 血清中TNF-α的水平达到高峰, 这一促炎细胞因子, 在感染性休克中发挥关键作用, 直接导致某些脏器的损伤<sup>[8]</sup>。笔者研究发现老龄模型和青年模型肺、心、小肠和肾组织TNF-α表达水平明显增高, 提示TNF-α可能参与了多器官损伤。IL-1是体内调节免疫

和炎症反应的中心介质。它刺激单核细胞和巨噬细胞产生IL-6和TNF-α, 刺激中性粒细胞释放炎症介质; 诱导内皮细胞活化, 与TNF-α协同作用, 促进血管内皮-白细胞黏附分子的表达, 趋化中性粒细胞等炎症细胞进入病变部位, 增加血管内皮通透性, 加重组织损伤。本实验结果显示无论老年模型还是青年模型, 肺、心、小肠和肾组织IL-1表达水平均显著增高, 表明IL-1可能在多器官损伤中发挥了重要作用。IL-6则为又一种参与先天免疫的重要促炎细胞因子, 可抑制中性粒细胞凋亡, 促使中性粒细胞产

生内源性血小板活化因子; 以及激活B淋巴细胞, 介导免疫反应和刺激肝细胞分泌急性期蛋白等。笔者实验发现, 模型组肺、心、小肠和肾组织IL-6表达水平显著升高, 说明IL-6可能间接或直接导致器官损伤。

该实验由肺炎克雷伯杆菌导致老年多器官损伤模型肺、心、小肠、肾等脏器组织TNF- $\alpha$ 、IL-1和IL-6水平均显著增高, 同时脏器组织发生了明显的病理变化。表明TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6皆参与了感染性多器官损伤, 这与陈德晖等<sup>[9]</sup>研究一致。汪珺等<sup>[10]</sup>研究显示, 降低盲肠结扎穿孔术脓毒症大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6和NO的水平, 则可提高大鼠的生存率, 进一步说明了促炎因子参与感染性多器官损伤, 过度炎症反应是感染性多器官损伤的重要机制, 可见多器官损伤乃多种炎症因子所致, 这就解释了既往单一一种炎症因子抗体治疗MODS未取得预期临床疗效。因此, 推测老年感染性多器官损伤的机制可能是当细菌进入机体后, 由于细菌内毒素的作用, 引起TNF- $\alpha$ 、IL-1和IL-6迅速、大量释放, 致内皮细胞损伤, 并释放氧自由基和脂质代谢产物等, 在体内激活细胞级联反应, 引起过度炎症, 导致机体内环境改变及组织器官损伤<sup>[11-13]</sup>。

本研究还发现, 老年模型心、肺和小肠病理损伤较青年重, 其原因可能由于增龄因素引起细胞、组织衰老, 即使同样水平的致病因子, 老年脏器损伤也比青年的重。另外, TNF- $\alpha$ 在心脏组织、IL-1在肺和小肠组织、IL-6在心和小肠组织高水平是造成老年脏器损伤重的又一原因。

综上所述, 促炎细胞因子在老年感染性多器官损伤中发挥了重要作用, 下调或拮抗多种促炎细胞因子诸如TNF- $\alpha$ 、IL-1和IL-6等, 而非下调成拮抗单一一种, 对于防治老年MODS具有重要意义。

#### 【参考文献】

[1] 李建生, 王守富, 秦金利, 等. 克雷伯杆菌肺炎老龄大鼠多器官损伤模型的建立[J]. 中国危重病急救医学, 2009, 21(4): 226-229.  
[2] 胡森, 盛志勇. 多器官功能障碍综合征[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 186-204.

[3] Schmidt J, Lewandrowski K, Warshaw AL, *et al.* Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat[J]. *Int J Pancreatol*, 1992, 12(1): 41-51.  
[4] 张明辉, 阮英茆, 王清峙, 等. 大鼠心肌缺血性灌注损伤与心肌肽素的保护作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2005, 9(23): 86-88.  
[5] Furuichi K, Wada T, Iwata Y, *et al.* Administration of FR167653, a new anti-inflammatory compound, prevents renal ischaemia/reperfusion injury in mice[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(3): 399-407.  
[6] 李鹏, 丁小强, 曹长春, 等. 肾脏缺血预适应及白细胞间黏附因子1的作用[J]. 中华肾脏病杂志, 2004, 20(3): 49-51.  
[7] 严彩霞, 张丙宏, 付春花, 等. 肠三叶因子对新生鼠坏死性小肠结肠炎模型 iNOS 及 TNF- $\alpha$ 、NO 的影响及意义[J]. 中华围产医学杂志, 2005, 8(4): 251-254.  
[8] Andrzejczak D, Gorska D, Czarnecka E. Influence of amlodipine and atenolol on lipopolysaccharide(LPS)- induced serum concentrations of TNF-alpha, IL-1, IL-6 in spontaneously hypertensive rats(SHR)[J]. *Pharmacol Rep*, 2006, 58(5): 711-719.  
[9] 陈德晖, 黎毅敏, 陈福雄, 等. 致炎细胞因子在两次打击大鼠所致多器官功能障碍综合征的变化[J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(1): 30-33.  
[10] 汪珺, 吴洪翔, 方育. 氯胺酮对脓毒症大鼠及血清TNF- $\alpha$ 、IL-6和NO水平及生存率的影响[J]. 昆明医学院学报, 2007, 28(4): 79-83.  
[11] Yayama K, Hiyoshi H, Sugiyama K, *et al.* The lipopolysaccharide-induced up-regulation of bradykinin B2-receptor in the mouse heart is mediated by tumor necrosis factor-alpha and angiotensin II[J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(6): 1143-1147.  
[12] Yang J, Wang HD, Lu DX, *et al.* Effects of neutral sulfate berberine on LPS-induced cardiomyocyte TNF-alpha secretion, abnormal calcium cycling, and cardiac dysfunction in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2006, 27(2): 173-178.  
[13] Janssen SP, Gayan-Ramirez G, Van den Bergh A, *et al.* Interleukin-6 causes myocardial failure and skeletal muscle atrophy in rats[J]. *Circulation*, 2005, 111(8): 996-1005.

(编辑: 周宇红)