

ω -3PUFAs 对 LPS 诱导急性肺损伤大鼠前炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的影响石计朋¹, 闫建国², 韩金芬³, 唐成和¹, 钱燕⁴

1 新乡医学院第一附属医院新生儿科, 河南 新乡 453003; 2 新乡医学院人体解剖教研室, 河南 新乡 453003;
3 新乡医学院第三附属医院新生儿科, 河南 新乡 453003; 4 温州医科大学附属第一医院新生儿科, 浙江 温州 325000

摘要: **目的** 分析 ω -3PUFAs 对脂多糖诱导的急性肺损伤大鼠(acute lung injury, ALI) TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 分泌的影响。**方法** 60 只 Sprague-Dawley 幼年大鼠按随机数字分为 Control 组(生理盐水+生理盐水)、LPS 组(生理盐水+脂多糖)和 Omega(10%脂肪乳尤文+脂多糖)组。各组分别采用生理盐水或尤文脂肪乳剂处理 7 d; 并均在取标本前 8 h 时于气管内滴入生理盐水或脂多糖, 建立 ALI 大鼠模型; 观察各组大鼠肺组织的病理改变, 测定肺泡灌洗液 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的表达。**结果** 1) ALI 模型组大鼠肺组织病理切片均可见明显炎症细胞浸润和出血; 2) ALI 模型组肺系数、病理评分均高于 Control 组(P 均 < 0.05); 3) BALF 中 Omega 组 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白水平低于 LPS 组, 差异具有统计学意义(P 均 < 0.05)。**结论** ω -3PUFAs 能够通过降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的分泌而减轻 ALI 大鼠炎症反应, 减轻肺部损伤。

关键词: ω -3PUFAs; 急性肺损伤; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素 1- β ; 白介素 6

中图分类号: Q954.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1008-6579(2014)01-0035-03

Effect of ω -3PUFAs on the TNF- α , IL-1 β and IL-6 expression on acute lung injury in young rats induced by endotoxin. SHI Ji-peng¹, YAN Jian-guo², HAN Jin-fen³, TANG Cheng-he¹, QIAN Yan⁴. (1 Department of Neonatology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China; 2 Department of Anatomy, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China; 3 Department of Paediatrics, the Third Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China; 4 Department of Neonatology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou, Zhejiang 325000, China)

Corresponding author: QIAN Yan, E-mail: qianyan11@126.com

Abstract: **Objective** To investigate the effects of ω -3 polyunsaturated fatty acids (ω -3PUFAs) to LPS-induced rat lung(ALI) of inflammatory; TNF- α , IL-1 β and IL-6. **Methods** Sixty young SD rats were divided into control group, LPS group and omega group and then used normal saline or different fat emulsions for seven days. The rat model of ALI was established by instill LPS. Those groups were sacrificed at 8 hours after intratracheal introduction of LPS. Each lung tissue section's pathologic changes was observed, meanwhile the concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in BALF were measured by enzyme-linked immunospecific assay (ELISA). **Results** 1) Pulmonary histopathology; ALI model groups showed inflammatory cells infiltrating around the bronchus and the vascular, even bleeding and more apoptosis cells. Omega group was significantly lighter than LPS group ($P < 0.01$). 2) Compared with control group, the lung indexes and pathological scores of ALI model groups were significantly higher ($P < 0.05$). 3) The levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in BALF of LPS group were significantly elevated than omega group (both $P < 0.05$). **Conclusion** 10% Omegaven can relieve inflammation by down-regulating the concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 and reduce lung injury.

Key words: ω -3PUFAs; acute lung injury; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6

早期、足量、全程的营养支持治疗在急性肺损伤等危重疾病治疗中尤为重要, 脂肪乳作为静脉营养支持治疗中热量的重要组成部分发挥了举足轻重的作用。临床常规使用的脂肪乳是以豆油为基础、富含 ω -6 多不饱和脂肪酸(ω -6 polyunsaturated fatty acids, ω -6PUFAs), 虽然长期大量应用这些脂肪乳

的安全性很高, 但在炎症反应与免疫方面, 常导致炎症加重, 其作用不甚满意^[1]。新型脂肪乳 ω -3 多不饱和脂肪酸(ω -3 polyunsaturated fatty acids, ω -3PUFAs)在免疫营养治疗中的优点日益受到关注。 ω -3PUFAs 来源于深海鱼油, 在降低炎症介质释放、改善机体免疫功能方面具有重要作用^[2]。机体的免疫应答与炎症反应需要通过细胞因子来调节, 维持适度的炎症反应对机体有益。导致急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的原发疾病多来自各种致病因素如脓毒血症、休克、严重创伤等, 目前认为, 急性肺损伤的发病机制与促炎因子与抗炎因子

【基金项目】 浙江省医学重点扶植学科“临床营养学”(2007-F03)

【作者简介】 石计朋(1981-), 男, 河南人, 硕士学位, 研究方向为新生儿疾病。

【通信作者】 钱燕, E-mail: qianyan11@126.com

的网络失衡有关^[3-4]。本研究以 ALI 大鼠为模型,比较 10% Omegaven(尤文脂肪乳)对前炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 分泌的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级幼年雄性 SD 大鼠 60 只,体重 160~180 g 之间,由上海斯莱克动物有限责任公司提供,许可证号:SCXK(沪)2003-0003。

1.1.2 脂肪乳剂 10% Omegaven(尤文脂肪乳)均购自上海华瑞制药有限公司。

1.1.3 主要试剂和仪器 苏木素染色液购自福建迈新生物公司;脂多糖(LPS, E. coli O111:B4)购自美国 Sigma-Aldrich 公司;LKB-V2088 型超薄切片机购自瑞典 GERMAN;ELISA 试剂盒购自上海西唐科技公司,Wellscan MK3 全自动多功能酶标仪购自芬兰 Thermo 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组和动物模型 60 只 SD 雄性幼年大鼠按随机数字表法分为三组,每组 20 只,分别是:1)Control(生理盐水+生理盐水)组;2)LPS 组(生理盐水+脂多糖);3)Omega(尤文+脂多糖)组。采用静脉留置针在尾静脉穿刺并固定,连续 7 d 分别向上述三组大鼠注射质量分数为生理盐水、生理盐水、10% Omegaven,剂量为 30 mL/(kg·d)。在支气管肺泡灌洗之前 8 h 向 Control 组气管内喷洒生理盐水,LPS 组和 Omega 组大鼠气管内喷洒脂多糖,剂量均为 0.5 mg/kg,制备 ALI 模型。

1.2.2 标本制备 喷洒 LPS 8 h 后将大鼠麻醉,打开胸腔,取肺标本,称重,计算肺系数;部分肺行支气管肺泡灌洗,收集 BALF 于 EP 管中,离心后,取上清液-80℃保存待检。部分肺标本置于 4% 甲醛液中保存,常规 HE 染色。

1.2.3 观察指标的检测 1)一般状况:观察大鼠的毛发、饮食、活动及死亡情况;2)计算肺系数(肺系数=肺湿重/体重 \times 100%);3)采用 HE 染色在光镜下观察肺泡上皮细胞病理变化;按 K Mikawa 等^[5]方法按以下 4 项指标对肺损伤进行评分:肺泡充血;出血;间隙或血管壁中性粒细胞浸润或聚集;肺泡间隔增厚或透明膜形成。由轻到重对每项指标进行 0~4 分半定量分析,累计相加各项评分的总分作为 ALI 的病理评分;4)采用 ELISA 法检测各组肺泡灌洗液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的蛋白水平。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组比较采用单因素方差分析,多组间两两比较,方差齐性的采用 LSD 法或

SNK 法,方差不齐的采用 Dunnet's T3 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠死亡情况及行为改变 应用脂肪乳静脉营养期间,Omega 组死亡 2 只。气管内喷洒 LPS 后,2 h 左右各组大鼠有部分发生死亡,其中 Omega 组死亡 2 只,LPS 组死亡 3 只。静脉营养期间存活的大鼠状态良好;活动可,摄食、饮水,毛发光亮整齐;LPS 处理后的大鼠均出现呼吸急促,精神较差,蜷缩成团,毛发竖起、蓬乱,少数伴有头部颤动,拒食。

2.2 肺系数 与 Control 组相比,LPS 组和 Omega 组的肺系数明显增高($P < 0.05$ 或 < 0.01);后两组间两两比较差异无统计学意义。见表 1。

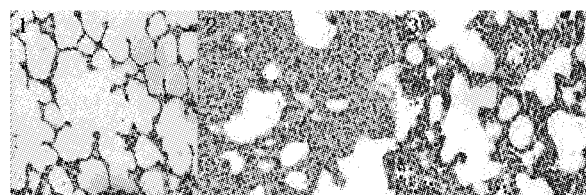
2.3 HE 染色结果 Control 组肺组织无炎症表现;LPS 组和 Omega 组光镜下见不同程度大鼠肺泡结构破坏,肺泡隔增厚,肺泡腔及间质内炎性细胞浸润,肺泡腔内有渗出液,弥漫性出血,部分肺泡塌陷、不张,甚至有透明膜形成。见图 1。ALI 评分:与 Control 组相比,LPS 组和 Omega 组明显增高($P < 0.05$);与 LPS 组相比,Omega 组显著降低($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组 SD 大鼠的肺系数、ALI 评分 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Lung coefficients and the ALI scores of SD rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	肺系数(%)	ALI 评分
Control 组	19	0.510 \pm 0.054	1.56 \pm 0.42
LPS 组	17	0.685 \pm 0.093*	12.23 \pm 2.1*
Omega 组	16	0.603 \pm 0.065*	8.89 \pm 0.85 \blacktriangle

注:与 Control 组相比较 * $P < 0.05$;与 LPS 组比较 $\blacktriangle P < 0.01$ 。



注:1)Control 组;2)LPS 组;3)Omega 组。

图 1 HE 染色结果(光镜 \times 200)

Fig. 1 Results of HE staining

2.4 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白浓度变化 Omega 组的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白浓度均明显低于 LPS 组($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

3.1 急性肺损伤与炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 急性肺损伤(ALI)常见于原发疾病过程中出现的急性进行性缺氧性呼吸衰竭,其特征性的病理改变是肺实质炎症反应所导致的弥漫性肺泡上皮和肺微血管内皮的严重损伤。TNF- α 主要由被激活的巨噬

表 2 各组大鼠 BALF 中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白浓度的变化 (pg/mL) ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Concentrations of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in BALF of SD rats (pg/mL) ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TNF- α	IL-1 β	IL-6
Control 组	19	6.753 \pm 1.023	33.775 \pm 6.524	12.119 \pm 3.462
LPS 组	17	12.878 \pm 2.412*	96.520 \pm 20.325*	56.323 \pm 18.795*
Omega 组	16	9.733 \pm 2.869* Δ	80.338 \pm 22.526* Δ	40.929 \pm 7.588* Δ

注:与 Control 组比较 * $P < 0.05$; 与 LPS 组比较 $\Delta P < 0.05$ 。

细胞产生,是 ALI 最早产生的促炎症细胞因子之一;能够诱导 IL-1、IL-6、IL-8 等炎症因子的分泌,促发炎症反应,其增长水平可反映 ARDS 患者肺部损伤的严重程度^[6]。白细胞介素-1 β (IL-1 β)是一种调节自然免疫的细胞因子,具有广泛的生物学活性,能诱导调控其他炎性反应介质在多种细胞中的分泌与释放,在炎症反应中起协同作用。体内众多的炎症因子中,IL-6 是启动全身炎症反应的最强的内源性炎症因子,能够催化和放大炎症反应,是机体炎症与疾病严重程度的重要指标^[7];它作为前炎症因子参与 ALI,可能直接导致内皮细胞损伤,致使毛细血管通透性增加、血栓形成,或者通过激活 T 淋巴细胞诱导细胞 T 淋巴细胞的增殖和分化,加大抗体依赖的细胞介导毒性作用。

3.2 ω -3 脂肪酸抑制炎症反应的机制 ω -3 脂肪酸来源于深海海鱼体内,机体自身只能极少量合成,必须经外源提取才能达到生理效应量;脂肪酸主要成份为二十碳五烯酸(EPA),二十二碳六烯酸(DHA)。尤文是 2006 年华瑞制药有限公司上市的一种新型脂肪乳剂,其主要成份为精制鱼油,作为免疫营养制剂可以在体内氧化供能,也可以调控机体的炎症反应和影响多种免疫细胞的功能,其调控机制可能为:1) ω -3 PUFAs 在脂氧合酶和环氧合酶的作用下产生前列腺素 3(PGE3)和白细胞三烯 B5(LTB5)对中性粒细胞的趋化、聚集和释放溶菌酶等的作用大约是 LTB4 的十分之一;2)使细胞膜的成分发生改变,影响与细胞膜受体有关的细胞因子的功能;3)调节细胞信号转导途径或影响酶或细胞因子的基因表达、抑制促炎性因子产生、调节黏附分子表达来调节免疫功能^[8-11]。

3.3 鱼油脂肪乳预处理后可减轻急性肺损伤中炎症因子的分泌 G-杆菌内毒素是临床上引起 ALI 的最常见致病因子,内毒素的有效成分是脂多糖;在脂多糖引起的全身炎症反应综合征的致病过程中,肺是早期容易损伤的器官。鱼油脂肪乳不仅能在营养方面维持机体的基本代谢,而且在具有一定的抗炎作用。本实验中经 LPS 处理后,大鼠出现呼吸急

促、精神较差等一系列肺部急性损伤表现;肺系数和 ALI 评分较对照组明显升高,结合 HE 染色图片提示 LPS 处理后大鼠肺泡结构破坏、肺泡隔增厚等病理变化,支持急性肺损伤模型的成功建立。本研究通过 ELISA 法检测出 Omega 组大鼠前炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 较未经 LPS 处理的 Control 组有升高,但远低于 LPS 组。这预示着鱼油脂肪乳能够显著降低前炎症因子,并减轻肺部炎症损伤,说明鱼油脂肪乳能够调节免疫功能;鱼油脂肪乳抑制了前炎症因子的释放,减轻了过度炎症反应对机体的严重打击及二次打击,对减少全身炎症反应有着积极作用,具有良好的临床应用前景。国内已有部分医院将鱼油脂肪乳应用于临床,证实在胃癌术后的病人中应用鱼油脂肪乳可显著下调可明显抑制术后病人的炎症反应^[12],降低烧伤后患者血清血清中内毒素水平,减轻炎症介质的释放^[13],抑制严重创伤患者血 IL-6 及 TNF- α 水平的上升^[14]。

以往实验多集中于体外细胞培养等实验,本研究使用活体大鼠实验更具有说服力。然而,减轻炎症反应对机体是其有利的一面,但也可能会降低机体对病原微生物的清除能力,致使病原菌的扩散。因而如何选择鱼油脂肪乳的时机仍需进一步研究。

参考文献

[1] Huschak G, Zur Nieden K, Hoell T, et al. Olive oil based nutrition in multiple trauma patients; a pilot study[J]. *Intensive Care Med*, 2005, 31:1202-1208.

[2] Singer P, Shapiro H, Theilla M, et al. Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness; novel mechanisms and an integrative perspective[J]. *Intensive Care Med*, 2008, 34(9):1580-1592.

[3] Goodman RB, Pugin J, Lee JS, et al. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(6):523-535.

[4] Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome [J]. *J Pathol*, 2004, 202(2):145-156.

[5] Mikawa K, Nishina K, Takao Y, et al. ONO-1714, a nitric oxide synthase inhibitor, attenuates endotoxin-induced acute lung in rabbits[J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(6):1751-1755.

[6] 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.

[7] De Gonzalo-Calvo D, Neitzert K, Fernandez M, et al. Differential inflammatory responses in aging and disease; TNF-alpha and IL-6 as possible biomarkers[J]. *Free Radic Biol Med*, 2010, 49(5):733-773.

[8] 鲍建民. 多不饱和脂肪酸的生理功能及安全性[J]. *中国食物与营养*, 2006, 12(1):45-46. (下转第 40 页)

强的抑制作用,主要是通过烷基化 Caspase-3 活化中心的半胱氨酸残基,使分解的 p20 亚单位表达减弱,阻断 Caspase-3 切断其底物,从而抑制 Caspase-3 的活性,减少细胞的凋亡。有学者对心肌梗死动物模型应用 Caspase 抑制剂,发现其可以抑制心肌细胞凋亡,改善心肌功能^[13]。故本实验建立了 HIBD 动物模型并给予 Caspase 的抑制剂 z-VAD-fmk,结果发现阻断组 AI 值和脑组织中 Caspase-3 mRNA 的表达高于对照组但小于 HIBD 组,提示 z-VAD-fmk 对 HIBD 大鼠脑神经细胞有保护作用,这与 T Saitoh 等^[13]对心肌梗死的研究结果相一致。推测在 HIBD 发生时应用 z-VAD-fmk 抑制了 Caspase-3 mRNA 的表达,减少细胞凋亡,减轻 HIBD 对神经细胞的损伤,因此对 HIBD 的康复具有一定的积极意义。实验还进一步说明了 HIBD 发生后的早期阶段是脑组织病理演变最重要的时刻,及早给予 Caspase 抑制剂有助于维持神经细胞的稳定性,减轻 HIBD 对细胞的损伤与破坏,改善神经细胞功能。在 HIBD 中神经细胞凋亡是其严重并发症的病理生理基础,是临床治疗的重要靶点。另外,神经细胞的凋亡也可以不通过 Caspase-3 依赖途径^[14-15],所以深入研究其发生机制和应用 Caspase 的抑制剂有望为 HIBD 的治疗提供新的方向。

参考文献

- [1] Okamura T, Miura T, Takuma G, et al. Effector caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart[J]. *Cardiovasc Res*, 2000, 45(3): 642-650.
- [2] 李荣堂, 杨廷桐, 刘玲玲. 缺血和缺血再灌注后交界区心肌细胞 Caspase-3 mRNA 的动态变化与药物影响的研究[J]. *中原医刊*, 2005, 32(18): 3-5.
- [3] Rice JE, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat[J]. *Ann Neurol*, 1981, 9(2): 131-141.
- [4] 陈惠军. GM1 对新生儿缺氧缺血性脑病 IL-1 β , NSE, ICAM-1 的影响[J]. *山东医药*, 2011, 51(41): 39-40.
- [5] 张媛媛, 李斐, 金星明, 等. 生命早期前爪感觉和精细动作剥夺对大鼠海马 Schaffer-CA1 通路突触可塑性的影响[J]. *中国儿童保健杂志*, 2010, 18(1): 45-47.
- [6] Abe T, Kunz A, Shimamura M, et al. The neuroprotective effect of pros-taglandin E2 EP1 receptor inhibition has a wide therapeutic window, is sustained in time and is not sexually dimorphic[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2009, 29(1): 66-71.
- [7] Xie NL, Zhang W, Li J, et al. Alpha-linolenic acid intake attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through anti-inflammatory and anti-oxidative stress effects in diabetic but not normal rats[J]. *Archives of Medical Research*, 2011, 42(3): 171-181.
- [8] Chichkova NV, Shaw J, Galiullina RA, et al. Phytaspasw a relocatable cell death promoting plant protease with caspase specificity[J]. *EMBO Journal*, 2010, 29(6): 1149-1161.
- [9] Mami Y, Yayoi E, Toshi I, et al. Quantification of activated and total caspase-14 with newly developed ELISA systems in normal and atopic skin[J]. *J Dermatol Sci*, 2011, 61(2): 110-117.
- [10] Sirbulescu RF, Zupanc CK. Inhibition of caspase-3 mediated apoptosis improves spinal cord repair a regeneration-competent vertebrate system[J]. *Neu Sci*, 2010, 26(2): 126-131.
- [11] Van Empel VP, Bertrand AT, Hofstra L, et al. Myocyte apoptosis in heart failure[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 67(1): 21-29.
- [12] Wang Y, Qin NH. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death [J]. *Apoptosis*, 2010, 7(5): 798-806.
- [13] Saitoh T, Nakajima T, Takahashi T, et al. Changes in cardiovascular function on treatment of inhibitors of apoptotic signal transduction pathways in left ventricular remodeling after myocardial infarction[J]. *Cardiovasc Path*, 2006, 15(3): 130-138.
- [14] Niizuma K, Yoshioka H, Chen H, et al. Mitochondrial and apoptotic neuronal death signaling pathways in cerebral ischemia[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(1): 92-99.
- [15] Matsuura S, Egi Y, Yuki S, et al. Mp-124 a novel poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitor ameliorates ischemic brain damage in a non-human primate model[J]. *Brain Res*, 2011, 1410(1): 122-131.

收稿日期: 2013-06-25

本刊网址: www.cjchc.net

(上接第 37 页)

- [9] Babcock TA, Kurland A, Hehon WS, et al. Inhibition of activator Protein-1 transcription factor activation by omega-3 fatty acid modulation of mitogen-activated Protein kinase signaling kinases[J]. *JPEN*, 2003, 27(3): 176-181.
- [10] Moon Y, Pestka JJ. Deoxyribose-induced mitogen-activated protein kinase phosphorylation and IL-6 expression in mice suppressed by fish oil[J]. *J Nutr Biochem*, 2003, 14(12): 717-726.
- [11] 王新颖, 黎介寿. ω -3 多不饱和脂肪酸影响炎症和免疫功能

的基础研究[J]. *肠外与肠内营养*, 2007, 14(1): 54-58.

- [12] 贾凯, 高泽锋, 马晋峰, 等. 鱼油脂肪乳剂对胃癌病人术后炎症反应的影响[J]. *肠外与肠内营养*, 2012, 19(1): 26-28.
- [13] 胡宏, 蔡晨, 徐庆连, 等. ω -3 多不饱和脂肪酸对严重烧伤患者炎症反应的影响[J]. *安徽医学*, 2010, 31(12): 1437-1439.
- [14] 徐建国, 徐敏, 潘娅静. ω -3 鱼油脂肪乳剂对严重创伤患者血白细胞介素-6 及肿瘤坏死因子- α 的影响[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(11): 1782-1784.

收稿日期: 2013-07-18

本刊网址: www.cjchc.net