

# 内毒素介导的急性肺损伤大鼠白细胞介素 13 表达及肺组织激活剂蛋白 1 活性的变化

李琦 钱桂生 杨楠 王长征 徐建斌 张青

**【摘要】** 目的 观察内毒素/脂多糖(LPS)致伤大鼠的血浆白细胞介素(IL)13 含量及肺组织激活剂蛋白 1(AP-1)活性的变化,探讨 AP-1 与 IL-13 表达的关系。方法 将 120 只 Wistar 大鼠根据注射 LPS 剂量不同随机分为 A(2 mg/kg)、B(4 mg/kg)、C(6 mg/kg)、D(8 mg/kg)组,并设立相应的等渗盐水对照组(NS组),取伤后 1、2、4、6 h 为观察时相点,每组每时相点 6 只大鼠。致伤 Wistar 大鼠,复制全身炎症反应综合征-急性肺损伤(SIRS-ALI)模型。在致伤后 1、2、4、6 h,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血浆 IL-13 含量,采用凝胶迁移率分析法(EMSA)检测肺组织中 AP-1 活性。结果 LPS 可使 IL-13 含量及 AP-1 活性同步升高。A、B、C、D 组与 NS 组比较,差异均有显著性意义及非常显著性意义( $P < 0.05 \sim 0.01$ )。C、D 组的血浆 IL-13 含量及肺组织中的 AP-1 活性均显著增加,D 组两指标的峰值分别为(45.62 ± 5.78)pg/ml、(177.68 ± 6.81)NII%,均出现在伤后 2 h。结论 IL-13 表达增强时 AP-1 活性亦升高,并与 SIRS-ALI 发生有关。

**【关键词】** 脂多糖类; 脓毒症综合征; 白细胞介素 13; RNA,信使; 激活剂蛋白 1; 急性肺损伤

**Studies on the changes in the interleukin-13 expression and on activator protein-1 activity in rat pulmonary tissue with acute lung injury induced by endotoxin** LI Qi, QIAN Gui-sheng, YANG Nan, WANG Chang-zheng, XU Jian-cheng, ZHANG Qing. Institute of Respiratory Disease, Xinqiao Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400037, P. R. China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the changes in plasma level of interleukin-13 (IL-13) and the changes in the pulmonary IL-13 mRNA content and the pulmonary activator protein-1 (AP-1) activity of the rats inflicted with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS), so as to explore the relationship between IL-13 expression and AP-1 activity. **Methods** One hundred and twenty Wistar rats were employed in the study and were randomly divided into A (2 mg/kg), B (4 mg/kg), C (6 mg/kg) and D (8 mg/kg) groups according to different dosage of LPS administration and a control group (NS group) at each observing time point. The rats were observed at 1, 2, 4 and 6 postburn hours (PBHs) and every 6 rats were deployed in every group and each time points. A model of systemic inflammatory response syndrome-acute lung injury (SIRS-ALI) was replicated in Wistar rats. The plasma content of IL-13 was assayed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the pulmonary tissue content of IL-13 mRNA and AP-1 activity by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and electrophoretic mobility shift assays (EMSA). **Results** The plasma content of IL-13, pulmonary content of IL-13 mRNA and AP-1 activity increased simultaneously after LPS administration. All the above indices were significantly different statistically between the LPS groups and the control group ( $P < 0.05 - 0.01$ ). The plasma level of IL-13 and pulmonary tissue mRNA content and AP-1 activity in A, B, C and D groups were increased significantly with peak levels at 2 PBHs. **Conclusion** The pulmonary AP-1 activity increased with the enhanced expression of IL-13, which was related to the development of SIRS-ALI.

**【Key words】** Lipopolysaccharide(LPS); Sepsis; Interleukin-13; mRNA; Activator protein-1; Acute lung injury

严重烧伤后由于肠道细菌移位或继发细菌感染,通常存在内毒素血症,容易引发急性肺损伤(a-

cute lung injury, ALI)。目前认为,ALI 是全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)在肺脏的表现。SIRS 的本质是以炎症介质过度释放为特征的全身广泛性炎症反应;SIRS 失控的结果是多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)/多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF),在肺脏则表现为急性

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39730210);全军医学科学技术研究“十五”重点课题资助项目(01Z076)

作者单位:400037 重庆,第三军医大学新桥医院全军呼吸内科研究所(李琦、钱桂生、王长征、徐建斌、张青);北京解放军第三一六医院呼吸科(杨楠)

呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)<sup>[1,2]</sup>。有报道, SIRS 不仅有炎症介质过度释放, 而且伴有内源性抗炎介质的释放异常<sup>[3]</sup>。白细胞介素 (IL)13 是具有代表性的抗炎性细胞因子, 在其非表达调控基因序列中, 有激活剂蛋白 1 (activator protein-1, AP-1) 结合位点<sup>[4]</sup>。因此, 本研究采用递增剂量内毒素/脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 致伤 Wistar 大鼠, 观察大鼠血浆 IL-13 含量及肺组织 AP-1 活性的变化, 探讨 SIRS-ALI 发生过程中 AP-1 与 IL-13 表达的关系。

### 材 料 与 方 法

1. 动物分组与处理: Wistar 大鼠 120 只 (第三军医大学实验动物中心提供), 体重 (200 ± 50) g, 雌雄不拘。经盐酸氯胺酮 (80 mg/kg) 腹腔麻醉后, 由大鼠尾静脉注入 LPS (*E. coli* O<sub>111</sub>B<sub>4</sub>, 美国 Sigma 公司)。并根据致伤时注射 LPS 的不同剂量随机将大鼠分为 A (2 mg/kg)、B (4 mg/kg)、C (6 mg/kg)、D (8 mg/kg) 组, 设立相应的等渗盐水对照组 (NS 组) 伤后 1、2、4、6 h 为观察时相点, 每组每时相点 6 只大鼠。在各时相点采集动脉血并制备血浆, 然后处死大鼠取全肺备用。

2. 检测方法 & 指标: (1) 血浆 IL-13 含量的测定: 采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA, 试剂盒为法国 Diaclone Research 公司产品)。(2) 肺组织 AP-1 活性变化的测定: 采用凝胶迁移率分析法 [EMSA, 试剂盒 Gel Shift Assay System (E3300) 为美国 Promega 公司产品], 具体方法参照操作指南进行, 主要包括: ①肺组织的细胞核蛋白提取; ②核蛋白定量的标准曲线拟合; ③核蛋白的溶液浓度测定; ④AP-1 寡核苷酸探针的  $\gamma$ -32P 标记与纯化 (探针序列为 5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3'/3'-GCCAACTACTCAGTCCGCCTT-5'); ⑤DNA 结合反应; ⑥垂直电泳及放射自显影; ⑦积分光密度测定及半定量分析: EPSON Scanner 扫描胶片影像, 用图像分析方法测定电泳带的积分吸光度值 (integral optical density, IOD)。以 NS 组为参照, 计算 Target group/NS, 结果为观察组的 AP-1 活性标准化积分吸光度值 (normalized integrated intensity, NII)<sup>[5]</sup> 计算 NII × 100%, 以 NII% 为单位。

3. 统计学处理: 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 经 Excel 2000 统计软件作单因素方差分析和 *t* 检验。

### 结 果

1. 血浆 IL-13 含量的变化: LPS 致伤后, 大鼠血

浆 IL-13 含量显著升高; 与 NS 组比较, 差异有显著性意义或非常显著性意义 ( $P < 0.05 \sim 0.01$ )。相同时相点 LPS 剂量越大, 血浆 IL-13 含量越高; A、B 组血浆 IL-13 含量高峰均在伤后 4 h; 而 C、D 组高峰在伤后 2 h。见表 1。

表 1 内毒素/脂多糖致伤大鼠血浆白细胞介素 13 含量的变化 (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 1 Changes in plasma content of IL-13 in rats with ALI caused by LPS (pg/ml,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	伤后时间 (h)			
		1	2	4	6
NS 组	24	11.99 ± 5.13	12.13 ± 5.02	14.28 ± 5.37	13.55 ± 4.96
A 组	24	19.59 ± 6.09*	27.35 ± 5.90**	30.83 ± 5.11**	28.91 ± 5.13**
B 组	24	21.62 ± 5.21**	31.08 ± 5.25**	34.73 ± 5.40**	31.88 ± 5.06**
C 组	24	25.15 ± 5.24**	42.39 ± 5.13** $\Delta$	40.65 ± 5.18**	34.73 ± 5.04**
D 组	24	26.29 ± 5.14**	45.62 ± 5.78** $\Delta$	42.38 ± 5.01**	36.29 ± 5.19**

注: 与 NS 组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与 B 组比较,  $\Delta P < 0.01$

2. 肺组织 AP-1 活性的变化: LPS 致伤后, 肺组织 AP-1 活性升高; LPS 剂量越大, AP-1 活性越高, 且高峰均在伤后 2 h; C、D 组与 A、B 组比较, 差异有非常显著性意义 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 内毒素/脂多糖致伤大鼠肺组织激活剂蛋白 1 活性的变化 (NII%,  $\bar{x} \pm s$ )

Tab 2 Change in the AP-1 activity in pulmonary tissue of rats inflicted with ALI by LPS (NII%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	伤后时间 (h)			
		1	2	4	6
A 组	24	113.22 ± 6.21	137.61 ± 5.94	124.40 ± 6.18	106.74 ± 5.33
B 组	24	119.56 ± 5.88	147.21 ± 5.10	129.68 ± 5.41	114.37 ± 5.72
C 组	24	126.72 ± 6.04*	164.71 ± 5.87 $\Delta$	140.70 ± 5.36*	127.62 ± 5.57*
D 组	24	136.05 ± 5.99*	177.68 ± 6.81 $\Delta$	152.70 ± 6.92*	134.09 ± 5.68*

注: 与 B 组比较,  $\Delta P < 0.01$ ; 与 A、B 组比较, \*  $P < 0.05$

### 讨 论

目前认为, ALI 是 SIRS 在肺脏的表现, 其发生机制与炎症反应密切相关。机体受强致伤因子刺激引发炎症反应, 经过启动、放大、损伤出现一系列严重的病理生理紊乱。近年研究显示, SIRS 的基本特征不仅包括致炎因子的大量释放, 而且还伴有内源性抗炎因子的不足或过度释放, 即代偿性抗炎反应

综合征,两者均可加重炎症损害,导致 SIRS 失控。SIRS 发生、失控与机体致炎-抗炎因素失衡、机体稳态破坏,导致内环境紊乱有关<sup>[6]</sup>。肺脏的解剖、组织学特点,使其成为 SIRS 损伤的首位靶器官。ALI 大鼠肺组织中有大量炎症细胞浸润及细胞因子产生、释放,致炎因子与抗炎因子并存。因此,研究 ALI 大鼠肺组织中 IL-13 mRNA 表达与 AP-1 活性变化的关系,有助于认识 SIRS 发生过程中的抗炎机制。

革兰阴性菌感染或肠源性内毒素血症是严重烧伤的常见并发症,易引发 ALI/ARDS 或 MODS/MOF,使救治难度升高。LPS 是内毒素的主要成分,存在于革兰阴性菌的细胞壁外膜。LPS 作为致伤剂,可以激活免疫应答,使免疫细胞活化并分泌细胞因子。静脉注射 LPS 可以复制感染性肺损伤模型<sup>[7]</sup>,本研究采用递增剂量 LPS 致伤 Wistar 大鼠,目的是通过递增强度致伤,模拟临床严重感染因素引发脓毒症的过程。在以往的实验研究中,笔者已经观察到大鼠肺组织中 IL-13 mRNA 的变化与 ARDS 有关<sup>[8]</sup>。

IL-13 具有免疫调节和抗炎作用,能够抑制炎症因子产生,主要由单核细胞、淋巴细胞产生,可以受 LPS 诱导表达。研究表明,IL-13 可以保护小鼠接受致死剂量 LPS 攻击,减少肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、 $\gamma$  型干扰素 (IFN- $\gamma$ )、IL-12 等产生<sup>[8,9]</sup>。IL-13 可以下调单核巨噬细胞产生细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8 等。ALI 大鼠模型的肺组织中,有大量炎症细胞聚集,其中存在丰富的单核细胞和淋巴细胞,是肺组织产生、释放 IL-13 的主要来源。研究显示,IL-13 对 AP-1 的活性具有调节作用<sup>[10]</sup>。另一方面,在 IL-13 基因的非表达调控序列中又存在 AP-1 结合位点。因此,本研究通过观察动脉血浆中 IL-13 含量和肺组织 AP-1 活性的变化,探讨在 SIRS-ALI 发生过程中 AP-1 与 IL-13 基因表达的相互关系。

本研究观察到,递增剂量 LPS 致伤后,大鼠血浆 IL-13 含量和肺组织 AP-1 活性均显著升高;随着 LPS 剂量增加,血浆 IL-13 含量和肺组织 AP-1 活性同步升高。由此提示:LPS 能够触发机体抗炎机制增强,抗炎性细胞因子表达增强并过度释放,而且是 ALI/SIRS 发生和 SIRS 失控形成 ARDS 的又一重要机制,该机制发生在细胞因子基因转录及其调控环节;当 LPS  $\geq 6$ mg/kg 时,抗炎机制增强显著,IL-13 及其 mRNA 与 AP-1 活性的显著升高与肺组织损害及功能障碍密切相关;IL-13 基因表达异常与 AP-1 活化有关。

参 考 文 献

- 1 Moore FA, Moore EE. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. *Surg Clin North Am*, 1995, 75: 257 - 277.
- 2 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. *解放军医学杂志*, 1999, 24: 313 - 316.
- 3 Bone RC. Immunologic dissonance: A continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med*, 1996, 125: 680 - 687.
- 4 McKenzie AN, Li X, Largaespada DA, et al. Structural comparison and chromosomal localization of the human and mouse IL-13 genes. *J Immunol*, 1993, 150: 5436 - 5444.
- 5 Yan SF, Tritto I, Pinsky D, et al. Induction of interleukin 6 (IL-6) by hypoxia in vascular cells, central role of the binding site for nuclear factor-IL-6. *J Bio Chem*, 1995, 270: 11463 - 11471.
- 6 Bone RC, Sir IN. Sepsis, SIRS and CARS. *Crit Care Med*, 1996, 24: 1125 - 1128.
- 7 李琦, 钱桂生, 张青, 等. 递增剂量脂多糖致伤对大鼠 SIRS-肺损伤的影响. *第三军医大学学报*. 2001, 23: 1264 - 1266.
- 8 李琦, 钱桂生, 张青, 等. 急性肺损伤大鼠肺组织白介素 13 mRNA 的表达. *中华烧伤杂志*, 2002, 18: 145 - 148.
- 9 Di SE, Meazza C, Sironi M, et al. IL-13 inhibits TNF production but potentiates that of IL-6 in vivo and ex vivo in mice. *J Immunol*, 1997, 159: 379 - 382.
- 10 Muchamuel T, Menon S, Pisacane P, et al. IL-13 protects mice from lipopolysaccharide-induced lethal endotoxemia; correlation with down- modulation of TNF-alpha, IFN-gamma, and IL-12 production. *J Immunol*, 1997, 158: 2898 - 2903.

(收稿日期: 2003 - 11 - 11)

(本文编辑: 张 红)

· 消息 ·

山东省第十届烧伤整形学术交流会议通知

中华医学会山东省烧伤整形外科专业分会第十届学术交流会议将于 2004 年 9 月 9 日 ~ 13 日在山东省青岛市举行。届时将就烧伤外科、整形外科的热点问题进行研讨,并聘请全国著名的烧伤外科、整形外科专家举办专题讲座。同时举行国家级继续医学教育项目“休克期磨痂术在烧伤治疗中的应用”和省级继续医学教育项目“无细胞真皮基质在整形外科中应用”两个学习班。授予国家 I 类继续教育学分 10 分。

联系地址: 山东省济南市经五路 324 号山东省立医院烧伤整形外科。邮编: 250021。

联系电话: 0531 - 6881886; 联系人: 霍然、李强; Email: huoran@medmail.com.cn.