

rhTNFR: Fc 对脓毒症大鼠血清中炎症介质的影响

宋均辉, 余又新, 方林森, 胡德林, 王春华, 董晓敏, 徐庆连

摘要 将清洁级 SD 大鼠 108 只随机分为 3 组: 对照组、脓毒症组以及脓毒症 + 益赛普组(治疗组), 采用盲肠结扎穿孔术(CLP) 建立脓毒症大鼠模型, 分别于术后 3、9、24、36、48 h 和 72 h 6 个时相点从腹主动脉抽取血标本; 采用酶联免疫分析法分别检测肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1) 的浓度。结果显示: ① 在脓毒症大鼠血清中细胞因子 TNF- α 、IL-1 表达水平在术后 3 h 时为最大值, 随着时间推移, 两组浓度水平呈下降趋势, 但仍高于对照组。② 治疗组中 TNF- α 、IL-1 的含量均显著高于对照组, 但却低于脓毒症组, 且组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明 rhTNFR: Fc 可影响脓毒症大鼠早期炎症反应过程。

关键词 脓毒症; TNF- α ; IL-1; 大鼠; 益赛普 (rhTNFR: Fc)

中图分类号 R 631

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)07-1024-03

脓毒症是由细菌感染引发的全身性炎症反应的临床过程, 是严重创伤、烧伤、休克、大手术后等的常见并发症, 进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)、多脏器功能衰竭 (multiple organ failure, MOF) 等, 是临床危重患者的最主要的死亡原因之

一, 死亡率高达 30% ~ 50%^[1-2]。注射用重组人 II 型 TNF 受体-抗体融合蛋白 (recombinant human tumor necrosis factor- α receptor II: IgG Fc fusion protein for injection, rhTNFR: Fc) 商品名为益赛普, 是由人的肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 膜外受体部分和人的免疫球蛋白 G1 (immunoglobulin G1, IgG1) 的 Fc 部分融合而制成的生物制品, 其作用机制为竞争性地与血中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 结合, 阻断 TNF- α 与细胞表面 TNF 受体结合, 降低其活性, 从而间接抑制 TNF- α 的生物学作用, 达到阻断疾病发生的作用, 进而减缓了炎症发生发展的速度, 降低了炎症反应程度。该研究采用盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and puncture, CLP) 建立脓毒症大鼠模型, 动态观察 TNF- α 及白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1) 的含量变化, 初步探讨益赛普对于脓毒症早期炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组 清洁级 SD 大鼠 108 只, 雌雄不拘, (230 ± 20) g, 购于安徽医科大学实验动物中心。将实验大鼠随机分为对照组、脓毒症组以及脓毒症 + 益赛普组(治疗组), 每组 36 只。

1.2 模型制备 动物购来后适应性饲养 1 周, 实验前禁食过夜, 自由饮水, 依照相关文献^[3-5]报道的方法行 CLP 复制脓毒症模型。将 108 只大鼠依次称

2014-03-20 接收

基金项目: 安徽省卫生厅科研基金 (编号: 09A067)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院烧伤科, 合肥 230022

作者简介: 宋均辉, 男, 硕士研究生;

方林森, 男, 副教授, 副主任医师, 硕士生导师, 责任作者,

E-mail: shaoshangke@126.com

Analysis of test results on HIV infection in syphilis patients

Liang Bo^{1,2}, Ding Yantao^{1,2}, Yang Sen^{1,2}

(¹ Dept of Dermatology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

² Institute of Dermatology, Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract 1 303 syphilis patients had seen their doctors at the STD clinic of our hospital in 2012. All first-visit syphilis patients were screened for HIV. The HIV-infected individuals were tested for syphilis. 8 cases were confirmed to be HIV-infected individual, which constituted 0.6% of syphilis cases. 4 cases were male and 4 cases were female among 8 cases. There were 4 cases of secondary syphilis and 4 cases of latent syphilis. Patients with syphilis and HIV infections accounted for 44% of all the HIV-infected individuals during the year.

Key words syphilis; HIV; co-infection

重后,以 10% 水合氯醛(3 ml/kg)腹腔内注射麻醉,待麻醉满意后,将大鼠固定于木板上,剪去腹部毛发,消毒后铺无菌巾。沿腹正中线作约 1.5 cm 切口,找到盲肠,在盲肠根部结扎盲肠,避免结扎回肠和盲肠系膜血管。用 18 号针穿刺盲肠 3 次,防止针孔闭合,挤压盲肠致有粪便溢出,之后将盲肠还纳腹腔,逐层缝合腹壁切口,术后均进行尾静脉注射生理盐水 5 ml 补充液体丢失。其中治疗组,在 CLP 术后,立即经尾静脉注射益赛普(上海中信国健药业股份有限公司,批号: S20050058) 2 ml/kg(1 g/L)。对照组麻醉后,打开腹腔找到盲肠后缝合腹壁切口,盲肠不作结扎穿刺。

1.3 炎症介质 TNF- α 、IL-1 的检测 分别于术后 3、9、24、36、48 h 和 72 h 6 个时相点(每个时相点 6 只大鼠),从腹主动脉抽取血标本,在 4 °C 条件下,将血标本静置 30 min,以 4 000 r/min 离心 15 min,分离出血浆后 -80 °C 冰箱(BD-498S 型,海尔集团青岛电冰柜总厂)中保存。采用酶联免疫检测试剂盒(美国 R&D 公司)分别检测 TNF- α 、IL-1 的含量,严格按照试剂盒说明书进行操作,结果以 pg/ml 表示。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析进行比较;组间比较采用两独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组大鼠血清 TNF- α 水平 在脓毒症组及治疗组中, TNF- α 的含量在 3 h 时为最大值,随着时间推移,两组浓度水平呈下降趋势,但仍明显高于对照组,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);脓毒症组中 TNF- α 含量高于治疗组,组间差异有统计学意义(P

< 0.01)。而 72 h 的 TNF- α 检测结果显示,组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。益赛普治疗可降低脓毒症大鼠血清中 TNF- α 含量。见表 1。

2.2 各组大鼠血清 IL-1 水平 在各组及各个时相点中, IL-1 的含量在 3 h 时为最大值,随着时间推移,两组浓度水平呈下降趋势,但脓毒症组及治疗组中的 IL-1 含量明显高于对照组,组间差异有统计学意义($P < 0.05$);脓毒症组中 IL-1 含量高于治疗组,组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。提示 TNF- α 影响了 IL-1 的变化趋势,在脓毒症大鼠血清中,益赛普治疗降低了脓毒症大鼠血清中游离 TNF- α 的含量,致使炎症细胞的 IL-1 的释放能力下降。见表 2。

3 讨论

脓毒症早期失控性的炎症反应考虑为脓毒症发生发展的中心环节,目前认为机体早期释放的内源性细胞因子在炎症反应中起到始动和调控作用^[6]。脓毒症时,体内内毒素大量增加,可刺激并释放大量的炎症介质和细胞因子;其中 TNF- α 是炎症反应中释放最早、最重要的内源性介质,进而诱导 IL-1 的大量释放;TNF- α 又可与 IL-1 协同刺激细胞间黏附分子-1 等其他炎症介质的释放,产生“细胞因子级联反应”,由此产生连锁放大效应,使机体从一般的应激反应进入组织损伤,进一步发展为器官功能不全阶段。因此,抑制炎症反应是治疗脓毒症的重点所在^[7]。

益赛普(rhTNFR:Fc)现已广泛应用在类风湿关节炎、强直性脊柱炎等疾病中,并有较好的疗效。有研究^[8]表明,益赛普可以明显降低类风湿患者血清中 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎症因子水平,同时可促进 IL-10 的分泌来增强抗炎作用。其主要的抗炎作用

表 1 各组大鼠血清 TNF- α 水平(pg/ml $n=36$ $\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	9 h	24 h	36 h	48 h	72 h
对照	50.92 \pm 3.42	48.23 \pm 2.60	40.73 \pm 4.51	34.24 \pm 1.24	32.71 \pm 5.10	32.65 \pm 6.73
脓毒症	385.72 \pm 5.96**	304.81 \pm 6.45**	265.03 \pm 11.81**	205.28 \pm 5.59**	149.24 \pm 1.37**	149.35 \pm 111.54
治疗	257.62 \pm 5.58 [#]	210.11 \pm 4.53 [#]	169.35 \pm 2.99 [#]	130.49 \pm 2.42 [#]	91.29 \pm 3.34 [#]	90.45 \pm 42.75

与脓毒症组比较: ** $P < 0.01$; 与对照组比较: [#] $P < 0.05$

表 2 各组大鼠血清 IL-1 水平(pg/ml $n=36$ $\bar{x} \pm s$)

组别	3 h	9 h	24 h	36 h	48 h	72 h
对照	39.95 \pm 1.68	32.15 \pm 3.59	30.44 \pm 3.46	30.15 \pm 4.26	28.18 \pm 3.55	28.10 \pm 4.80
脓毒症	271.21 \pm 7.82**	230.05 \pm 6.50**	174.53 \pm 23.39*	146.43 \pm 3.53**	115.96 \pm 2.04**	79.31 \pm 3.73**
治疗	179.23 \pm 2.51 ^{##}	153.78 \pm 2.54 ^{##}	129.88 \pm 5.71 ^{##}	103.37 \pm 3.79 ^{##}	74.37 \pm 2.61 ^{##}	51.78 \pm 1.70 [#]

与脓毒症组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与对照组比较: [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$

机制: 竞争性地与血清中 TNF-α 结合, 减少了 TNF-α 与细胞膜的 TNF 受体结合, 阻断炎症反应过程, 减少炎症介质的释放。国外动物实验研究^[9] 结果显示: 益赛普具有减轻烧伤后大鼠模型体内的炎症反应。目前, 国内外尚未见有对于脓毒症早期使用益赛普对炎症因子影响的研究报道。

本研究显示, 治疗组中 TNF-α 的含量显著高于对照组, 但却低于脓毒症组, 且组间差异有统计学意义。可能的机制是: rhTNFR: Fc 与 TNF-α 结合使治疗组大鼠血清中游离状态的 TNF-α 含量降低, 致使机体炎症反应启动因子 TNF-α 的血清水平下降, 干预机体炎症反应的链式环节。而 TNF-α 在 72 h 时, 各组间的比较差异无统计学意义, 可能与 TNF-α 在血清中的半衰期有关, 也可能是脓毒症大鼠炎症反应随时间推移而使炎症介质耗损有关。

本研究中脓毒症大鼠血清内 IL-1 的变化趋势与 TNF-α 基本相同, 可能为 rhTNFR: Fc 与血清中游离的 TNF-α 结合后, 使炎症细胞表面的 TNF-α 受体与 TNF-α 结合减少, 影响炎症反应的起始环节, 进而减弱炎症细胞内链式反应环节, 使 IL-1 等炎症介质合成释放下降。

由该实验结果可以推断, rhTNFR: Fc 作为 TNF-α 受体的竞争抑制剂, 可导致炎症介质释放减少, 降低炎症反应程度, 可能部分阻断脓毒症早期炎症反

应的过程, 为临床脓毒症早期干预性治疗探索出新思路, 但其更深层的机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Falagas M E, Makris G C, Matthaiou D K et al. Statins for infection and sepsis: a systematic review of the clinical evidence [J]. J Antimicrob Chemother 2008, 61(4): 774-85.
- [2] Weant K A, Cook A M. Potential roles for statins in critically ill patients [J]. Pharmacotherapy 2007, 27(9): 1279-96.
- [3] Matthay M A, Zimmerman G A, Esmon C et al. Future research directions in acute lung injury: summary of a national heart, lung, and blood institute working group [J]. Am J Respir Crit Care Med 2003, 167(7): 1027-35.
- [4] 毛宝岭, 钱桂生, 陈正堂. 急性呼吸窘迫综合征 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 231-41.
- [5] 汤耀卿, 李磊. 脓毒症动物模型制作方略及应用 [J]. 中华实验外科学杂志 2006, 23(12): 1433-4.
- [6] 杨宗城. 烧伤治疗学 [M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 121.
- [7] 俞森洋. 严重脓毒症和脓毒性休克的治疗新进展 [J]. 临床肺科杂志 2009, 14(4): 427-9.
- [8] 孙晓云, 苏茵, 任丽敏, 等. rhTNFR: Fc 对类风湿关节炎患者血清中致炎及抗炎性细胞因子的影响 [J]. 中华风湿病学杂志 2006, 10(4): 209-12.
- [9] Özer Şehirli, Bureu Ünlü, Şule Çetinel et al. Etanercept protects remote organ damage in a rat model of thermal injury [J]. Marmara Pharmaceutical J 2011, 15(3): 118-24.

Effect of etanercept(rhTNFR: FC) on level of inflammatory mediators in septic rats

Song Junhui, Yu Youxin, Fang Linsen et al

(Dept of Burn, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract 108 clean grade rats were randomly divided into three groups. The sepsis models of rats were manufactured by cecal ligation and puncture(CLP). At the time point of 3, 9, 24, 36, 48 and 72 h after operation, blood samples were obtained from the abdominal aorta, using enzyme-linked immunosorbent assay to detect levels of tumor necrosis factor-α(TNF-α), interleukin-1 (IL-1). Results showed that: ① The levels of serum TNF-α, IL-1 in sepsis group and treatment group were the maximum at the time point of 3 h, then as the time went by, the concentration level about two groups began to decline, but still higher than the control group. ② The levels of serum TNF-α, IL-1 in treatment group were higher than the control group, but still lower than sepsis group. There was significant difference among the two groups (P < 0.05). We conclude that etanercept can influence the course of the inflammatory response in sepsis rats.

Key words sepsis; TNF-α; IL-1; rat; etanercept