

血必净干预对水下爆炸致兔急性肺损伤 血清和支气管肺泡灌洗液 NE, TNF- α 表达的影响*

李雪萍^{1,2}, 齐晓林^{1,2}, 叶长青², 王前进², 邵先安^{1,2}, 马宏昊³

(1. 蚌埠医学院医学检验系, 安徽蚌埠 233030; 2. 解放军第123医院, 安徽蚌埠 233015;
3. 中国科技大学近代力学系爆炸实验室, 合肥 230027)

摘要:目的 探讨血必净干预对水下爆炸致兔急性肺损伤肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor- α , TNF- α)、中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)在血清和支气管肺泡灌洗液(broncho alveolar lavage fluid, BALF)中表达的影响。方法 将20只实验兔随机分为爆炸损伤组和血必净治疗组,以水下爆炸装置对实验兔造成急性肺损伤,爆炸后24 h测定血清和BALF中的TNF- α 和NE含量。结果 血必净治疗组血清(353.30 ± 166.86 ng/L)TNF- α 浓度与爆炸损伤组(552.30 ± 169.64 ng/L)相比显著下降($t=2.645$, $P=0.016$)。血必净治疗组NE在血清中的表达(63.40 ± 36.09 ng/ml)显著低于爆炸损伤组(97.60 ± 36.20 ng/ml; $t=2.116$, $P=0.049$);在BALF的表达(102.10 ± 9.50 ng/ml)也低于爆炸损伤组(136.70 ± 13.60 ng/ml; $t=6.593$, $P=0.000$)。结论 血必净干预治疗能够显著降低水下爆炸致兔急性肺损伤血清TNF- α 水平以及NE在血清和BALF中的浓度。

关键词:水下爆炸;急性肺损伤;血必净;肿瘤坏死因子;中性粒细胞弹性蛋白酶

中图分类号:R-332 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-7414(2017)02-119-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2017.02.033

Investigation to the Expression of NE and TNF- α in Serum and BALF of Rabbits with Acute Lung Injury Interposed by XueBiJing in Underwater Explosion

LI Xue-ping^{1,2}, QI Xiao-lin^{1,2}, YE Chang-qing¹, WANG Qian-jin¹, SHAO Xian-an^{1,2}, MA Hong-hao³

(1. the Department of Clinical Laboratory Medicine, Bengbu Medical College,
Anhui Benbu 233030, China; 2. The 123rd Hospital of PLA, Anhui Bengbu 233015, China;
3. Laboratory of Explosion Mechanics of Department of Modern Mechanics
in the University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China)

Abstract: **Objective** The concentration of NE and TNF- α was detected for elucidating the change of them in sera and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of rabbits with acute lung injury interposed by XueBiJing therapy in underwater explosion. **Methods** Underwater explosion device was applied to cause acute lung injury of rabbits. The 20 rabbits were randomly divided into two groups which were injury group and XueBiJing therapy group, respectively. The concentration of NE and TNF- α in sera and BALF were detected by ELISA method in 24 hours after bursting. **Results** The concentration of TNF- α in sera (353.30 ± 166.86 ng/L) of rabbits in therapy group were significantly lower than those in injury group (552.30 ± 169.64 ng/L; $t=2.645$, $P=0.016$). The concentration of NE in sera (63.40 ± 36.09 ng/ml) were lower than that of rabbits in injury group (97.60 ± 36.20 ng/ml; $t=2.116$, $P=0.049$). At the same time the concentration of NE in BALF (102.10 ± 9.50 ng/ml) of rabbits in therapy group were significantly lower than those in injury group (136.70 ± 13.60 ng/ml; $t=6.593$, $P=0.000$). **Conclusion** The expression of TNF- α in sera and NE in sera and BALF in rabbits with acute lung injury interposed by XueBiJing in underwater explosion were lower than those of injury group.

Keywords: Underwater explosion; acute lung injury; XueBiJing; tumor necrosis factor- α ; neutrophil elastase

一般认为,空气中爆炸致实验动物胸部、腹部或脊髓等损伤较多^[1],而水下冲击伤是岛礁作战和海上恐怖袭击常见的一种损伤,水下冲击伤以肺部损伤最为严重,是伤者死亡的主要原因之一^[2]。但目前对水下爆炸冲击波致实验动物心肺损伤及救

治的研究甚少。已知空气爆炸伤引起的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是由多种炎性递质及效应细胞共同参与,一般是呈级联放大的瀑布样炎症并伴随继发性弥漫性肺实质损伤。在参与肺损伤炎症反应中的众多递质中,肿瘤坏死因子- α (tumor

* 基金项目:南京军区医学重点课题资助项目(14ZD20)。

作者简介:李雪萍(1991—),女,在读研究生,主要从事分子免疫研究, Tel:18895636416。

通讯作者:齐晓林,男,硕士生导师,研究方向:临床输血/医院管理, E-mail: XAShao@126.com。

necrosis factor- α , TNF- α)是最有影响的促炎症细胞因子,其与ALI发病和严重程度密切相关^[3,4]。而中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)作为中性粒细胞激活的标志物,是ALI的炎症级联反应主效应细胞,对这两个细胞因子的研究将有助于ALI患者病因探究和有效治疗。因此,我们采用水下爆炸装置复制兔ALI模型,并使用肺损伤的有效救治药物血必净进行干预治疗,通过观察血清和肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)中TNF- α , NE的表达变化,以期对ALI的保护作用的机制探讨提供有益数据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂 DN-9602 酶标分析仪(北京普朗);80-2 低速离心机及恒温水浴箱(上海医疗器械公司);-80℃冰箱(日本三洋);兔肿瘤坏死因子- α ELISA 检测试剂盒(上海江莱生物科技有限公司,批号 201602);兔中性粒细胞弹性蛋白酶 ELISA 检测试剂盒(上海朗顿生物科技有限公司,批号 20160127FR);血必净注射剂(天津红日药业股份有限公司,批号 1509161)。

1.2 实验动物及方法

1.2.1 实验动物及分组:健康成年新西兰兔 20 只[安徽长临河医药科技有限公司,许可证号 syxk(皖)2007-002],体重 1.84 ± 0.29 kg。实验前适应性喂养 3 天,自由饮食饮水,密切观察一般情况。实验当天禁食 6 h^[5],将实验动物随机分为爆炸损伤组($n=10$)和血必净治疗组($n=10$)。

1.2.2 实验方法:取氯胺酮 40 mg/kg,氟哌利多 1.6 mg/kg 经肌肉注射,麻醉时间 3~5 min^[6]。麻醉后,仰卧位固定,去颈前部和胸部毛,尽量完全暴露胸部,经左颈总动脉和右颈外静脉向心方向放置留置针,并将留置针的体外部分绕颈固定以防脱

落。爆炸前再次检查动物上肢固定情况。使用水下爆炸装置按爆炸力学相关公式及预试验结果设定合理爆炸剂量、距离^[7]。具体做法是:将兔固定于实验平台上,暴露前胸及侧胸壁,其余部位由设计的保护装置进行防护,记录实验兔的呼吸频率、心率、血氧分压。爆炸后立即解绑,清理呼吸道,使其右侧卧位,并记录家兔呼吸、精神状态、应激反应等情况,同时注意动物保暖。血必净治疗组立即通过静脉输液的方法给予 50 ml/kg 的血必净药物,缓慢滴注。

1.3 血清和 BALF 的采集 爆炸后 24 h 通过左颈总动脉置管抽取血液 5 ml,注入干管内,静置 30 min 后 4 000 r/min 离心 15 min,并将血清吸收到 EP 管内,放置在一 80℃ 冰箱备用。血液抽取后将动物处死,打开胸腔,解剖出支气管和两侧肺,血管钳夹住左侧支气管,从右侧支气管插入粗针头,每次抽取 5ml 生理盐水进行灌注,分三次灌注。每次灌入后轻轻按摩肺叶后抽出,注入干管内,总回收率为 70%~80%。

1.4 统计学分析 数据采用 SPSS17.0 统计软件处理, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果 细胞因子 NE, TNF- α 在炎症性疾病中扮演着极其重要的作用^[3],基于此,我们对爆炸后血必净治疗肺损伤兔血清和肺泡灌洗液这两种细胞因子的表达进行了检测,见表 1:血必净组血清 TNF- α 浓度与爆炸损伤组相比显著下降($t=2.645$, $P=0.016$),而 BALF 中两组 TNF- α 的表达差异无统计学意义($t=1.738$, $P=0.099$)。血必净组 NE 在血清中无统计学意义($t=2.116$, $P=0.049$)和 BALF 中的表达均显著低于爆炸损伤组($t=6.593$, $P=0.000$)。提示血必净治疗下调了 NE, TNF- α 的表达,可能有助于 ALI 炎症的缓解。

表 1

兔血清和 BALF 中 TNF- α , NE 水平比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

项 目		爆炸损伤组	血必净组	t	P
TNF- α (ng/ml)	Serum	552.30 \pm 169.64	353.30 \pm 166.86	2.645	0.016
	BALF	620.30 \pm 216.94	470.90 \pm 163.84	1.738	0.099
NE(ng/ml)	Serum	97.60 \pm 36.20	63.40 \pm 36.09	2.116	0.049
	BALF	136.70 \pm 13.60	102.10 \pm 9.50	6.593	0.000

3 讨论 目前建立 ALI 模型的方法主要有油酸、LPS 诱导等方法,但是兔胸部水下爆炸 ALI 模型罕有报道,本实验在前期兔胸部爆炸致 ALI 的基础上复制水下爆炸致兔 ALI。ALI 是以肺内中性粒细胞为主的炎症细胞浸润,伴有肺间质水肿以及细胞因子、黏附分子的过度表达和炎症介质释放引

起的炎症反应,可能还会出现广泛肺水肿和微小肺不张,严重的发展为呼吸窘迫和顽固性低氧血症等^[4,8],因此对 ALI 的及时处理显得尤为重要。在引起 ALI 的炎症因子中,NE 是含 218 个氨基酸残基和 4 个二硫键的单链糖蛋白,属于丝氨酸蛋白酶超家族,主要来源于中性粒细胞^[8,9]。生理情况下,

NE 储存在中性粒细胞嗜天青颗粒内,炎症时释放出来。释放到细胞外的 NE 能够分解几乎所有细胞外基质和许多重要的血浆蛋白,被认为是最具破坏力的酶类之一^[4]。有研究表明,给予实验动物局部或全身应用 NE 可引起典型 ALI 症状,NE 还可以增强 IL-8, TNF- α 等趋化因子的表达和释放^[10],而这些炎性介质又能吸引和激活中性粒细胞释放更多的 NE,由此形成一个恶性循环,构成级联炎症反应,加重肺损伤,而 NE 阻断试验可以显著提高 ALI 动物的存活率^[11]。TNF- α 是 ALI 炎症反应中提早释放的介质,诱导 IL-6, IL-8 等其他细胞因子的释放。活化的单核/巨噬细胞产生的 TNF- α 与 TNF- α 受体结合进一步诱导血管内皮细胞和白细胞表达黏附分子,促进炎性细胞渗出并在肺内聚集。这些炎性细胞通过释放氧自由基、溶酶体酶和炎症介质,进而增加肺毛细血管通透性,损害内皮细胞屏障功能而损害肺实质^[12]。TNF- α 还能促使中性粒细胞在肺毛细血管黏附、聚集,产生大量过氧化物和蛋白水解酶,造成血管壁损伤,血管通透性增高^[4]。我们的实验研究显示具有拮抗内毒素并抑制内源性炎性介质作用的血必净的使用可使 ALI 实验兔血清 NE, TNF- α 水平显著降低,这将有利于炎症的减轻,促进机体内环境的稳定,这与有关研究具有相似性^[13,14]。血必净治疗组 BALF 中的 NE 水平比损伤组显著降低,而 TNF- α 未见降低,表明具有丰富毛细血管的肺脏,在 ALI 时肺血管通透性增高,NE 可能很快渗出到肺组织, TNF- α 则不具有这一特征。

综上所述,血必净能够显著降低水下爆炸致兔急性肺损伤血清和 BALF 中的 NE 浓度以及血清中的 TNF- α 水平,在肺损伤中发挥保护机体的作用。

参考文献:

- [1] 代庆春,李娜,苗晓云,等. H₂S 对急性肺损伤大鼠 PMN 功能的影响机制[J]. 现代检验医学杂志, 2012, 27(6):25-29.
Dai QC, Li N, Miao XY, et al. Mechanism of the effect H₂S on PMN function in acute lung injury rats[J]. J Mod Lab Med, 2012, 27(6):25-29.
- [2] Perl M, Hohmann C, Denk S, et al. Role of activated neutrophils in chest trauma-induced septic acute lung injury[J]. Shock, 2012, 38(1):98-106.
- [3] Weckbach S, Hohmann C, Denk S, et al. Apoptotic and inflammatory signaling via Fas and tumor necrosis factor receptor I contribute to the development of chest trauma-induced septic acute lung injury[J]. J Trauma Acute Care Surg, 2013, 74(3):792-800.
- [4] Hafner S, Wagner K, Wepler M, et al. Physiological and immune-biological characterization of along-term murine model of blunt chest trauma[J]. Shock, 2015, 43(2):140-147.
- [5] 侯晓彬,李廷慧,金文波,等. 地塞米松和山莨菪碱在胸部爆炸伤致急性肺损伤中的防治作用[J]. 中国急救医学, 2008, 28(6):531-535.
Hou XB, Li TH, Jin WB, et al. Prophylaxis and treatment role of dexamethasone and anisodamine on ALI after chest explosive trauma[J]. Chinese Journal of Critical Care Medicine, 2008, 28(6):531-535.
- [6] 欧阳毅,夏媛优,张一辰,等. 3 种麻醉方法在兔骨缺损修复术中的比较[J]. 重庆医学, 2014, 43(11):1348-1350.
Ouyang Y, Xia YY, Zhang YC, et al. Comparison of three anesthetic methods in rabbit bone defect repair[J]. Chongqing Medicine, 2014, 43(11):1348-1350.
- [7] 齐晓林,吴升,马宏昊,等. 爆炸致兔急性肺损伤时细胞凋亡作用机制的实验研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2016, 41(2):155-158.
Qi XL, Wu S, Ma HH, et al. The mechanism of cell apoptosis in rabbit with acute lung injury induced by blast[J]. Journal of Bengbu Medical college, 2016, 41(2):155-158.
- [8] 杨斌,陈海龙. 中性粒细胞弹性蛋白酶在重症急性胰腺炎并急性肺损伤发病中的表达和意义[J]. 临床军医杂志, 2012, 40(4):765-769, 封 4.
Yang B, Chen HL. Expression and significance of neutrophil elastase in the pathogenesis of severe acute pancreatitis combined with acute lung injury[J]. Clinical Journal of Medical Officers, 2012, 40(4):765-769, Letter4.
- [9] 夏爱军,白艳丽,张献清,等. 紫外线照射充氧自血回输对光气中毒家兔急性肺损伤治疗实验观察[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 25(1):85-86.
Xia AJ, Bai YL, Zhang XQ, et al. Therapeutic effects of autotransfusion of ultraviolet irradiated blood on pulmonary damages induced by phosgene in rabbits[J]. J Mod Lab Med, 2010, 25(1):85-86.
- [10] Guarino C, Legowska M, Epinette C, et al. New selective peptidyl di(chlorophenyl) phosphonate esters for visualizing and blocking neutrophil proteinase 3 in human disease[J]. J Biol Chem, 2014, 289(46):31777-31791.
- [11] Guo YF, Ma LY, Zhang F, et al. Neutrophil elastase ameliorates matrix metalloproteinase-9 to promote lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J]. J Acta Cirurgica Brasileira, 2016, 31(6):382-388.
- [12] Bae HB, Li M, Lee SH, et al. Propofol attenuates pulmonary injury induced by collapse and reventilation of lung in rabbits[J]. Inflammation, 2013, 36(3):680-688.

- [13] 王利民,叶健,王娇莉,等.血必净联合糖皮质激素治疗特发性肺纤维化急性加重的临床观察[J].全科医学临床与教育,2015,13(3):280-282.

Wang LM, Ye J, Wang JL, et al. Clinical observation on combination therapy of xuebijing and corticosteroid for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Clinical Education of General Practice, 2015, 13(3): 280-282.

(上接 118 页)合成并且分泌更多的 LP-PLA2, LP-PLA2 又会加入到这个反应当中刺激分泌更多的黏附分子和细胞因子,这就形成了一个正反馈循环,LP-PLA2 含量的升高说明这个循环被开启,因此我们可以通过检测血浆中的 LP-PLA2 含量来反映斑块病变的严重程度。血浆中 LP-PLA2 水平的升高可以特异性地反映血管周围炎症状态的存在^[5]。

本研究我们就脑梗死患者 LP-PLA2 水平进行了观察,结果显示颈动脉斑块性脑梗死组的 LP-PLA2 水平明显高于非颈动脉斑块性脑梗死组及健康对照组,差异有统计学意义($P < 0.01$);非颈动脉斑块性脑梗死组 LP-PLA2 水平与健康对照组无明显差异($P > 0.05$)。提示血浆 LP-PLA2 与颈动脉斑块性脑梗死存在一定的相关性,可能对颈动脉斑块性脑梗死有鉴别诊断价值。同时,我们对颈动脉斑块性脑梗死患者斑块稳定组与不稳定组患者血浆 LP-PLA2 水平进行了观察,结果显示不稳定斑块组血浆 LP-PLA2 水平明显高于稳定斑块组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与国内有关报道一致^[6,7],这可能是由于不稳定斑块组上述循环被打开,斑块形成部位产生高活性、高浓度的 LP-PLA2,引起单核-巨噬细胞介导更强的炎症反应,导致氧化应激和内皮损伤,同时证明 LP-PLA2 参与了粥样斑块的形成、发展和最终破裂的全过程。本研究两组 LP-PLA2 数据绘制的 ROC 曲线显示, AUC 为 0.701,在 203.13 ng/ml 时,敏感度为 52.1%,特异度为 86.7%,说明 LP-PLA2 对评估颈动脉斑块稳定性可能有一定的预测价值,与钟萍等^[8]的研究报道相一致。

综上所述,血浆 LP-PLA2 与颈动脉斑块性脑梗死有一定的相关性,其水平对脑梗死的鉴别诊断和评估颈动脉斑块稳定性可能有一定的价值,且检测方便、准确,有较强的可行性和实用性。

参考文献:

- [1] Kazmierski MK. Stenosis of the carotid arteries[J]. Wiad Lek, 2003, 56(5/6): 260-265.
- [2] Epps KC, Wilensky RL. Lp-PLA2-a novel risk factor for high-risk coronary and carotid artery disease[J]. J

- [14] 张之龄,童小文,徐兵,等.血必净对脂多糖诱导急性肺损伤大鼠的保护作用[J].中国临床保健杂志, 2014, 17(4): 373-375.

Zhang ZL, Tong XW, Xu B, et al. The protective effect of Xuebijing on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats[J]. Chinese Journal of Clinical Healthcare, 2014, 17(4): 373-375.

收稿日期:2016-10-29

修回日期:2016-11-05

Intern Med, 2011, 269(1): 94-106.

- [3] 中华医学会神经病学分会脑血管病学组急性缺血性脑卒中诊治指南撰写组.中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2010[J].中华神经科杂志, 2010, 43(2): 146-153.

Neurology branch of cerebrovascular disease diagnosis and treatment of acute ischemic stroke group guidelines writing group of Chinese Medical Association. Guide for diagnosis and treatment of acute ischemic stroke in China 2010[J]. Chinese Journal Neurology, 2010, 43(2): 146-153.

- [4] Lavi S, Herrman J, Lavi R, et al. Role of lipoprotein-associated phospholipase A2 in atherosclerosis[J]. Curr Atheroscler Rep, 2008, 10(3): 230-235.

- [5] 王磊,储照虎.脂蛋白相关磷脂酶 A2 与缺血性卒中[J].国际脑血管病杂志, 2009, 17(6): 463-466.

Wang L, Chu ZH. Lipoprotein-associated phospholipase A2 and ischemic stroke[J]. International Journal of Cerebrovascular Disease, 2009, 17(6): 463-466.

- [6] 徐冬玲,刘军妮,杜贻萌,等.脂蛋白相关磷脂酶与冠状动脉易损斑块的相关性[J].中华内科杂志, 2009, 48(8): 651-654.

Xu DL, Liu JN, Du YM, et al. Correlation of human serum LP-PLA2 and hs-EPR and stability of coronary atherosclerotic plaques[J]. Chinese Journal Intern Med, 2009, 48(8): 651-654.

- [7] 李青芳,梁江红,邓胜玲.脂蛋白相关磷脂酶 A2 与脑梗死患者颈动脉不稳定粥样斑块的关系[J].实用医学杂志, 2009, 25(2): 224-226.

Li QF, Liang JH, Deng SL. Relationship between LP-PLA2 and carotid atherosclerotic plaque in patients with cerebral infarction[J]. Journal of Practical Medicine, 2009, 25(2): 224-226.

- [8] 钟萍,吴丹红,吴计划,等.血清脂蛋白相关磷脂酶 A2 和超敏 C-反应蛋白水平与大动脉粥样硬化性脑梗死关系的临床研究[J].中华临床医师杂志(电子版), 2012, 6(4): 924-927.

Zhong P, Wu DH, Wu JH, et al. The roles of LP-PLA2 and hs-CRP levels in large artery atherosclerosis ischemic stroke[J]. Chinese Journal of Clinical Medicine (Electronic Edition), 2012, 6(4): 924-927.

收稿日期:2016-12-20

修回日期:2017-01-30