

· 论 著 ·

## 早期高容量血液滤过后多器官功能障碍综合征猪血清 IL-6 浓度及肺 IL-6 mRNA 表达的变化及意义

王 冰<sup>1</sup>, 方国恩<sup>2</sup>, 满晓波<sup>3</sup>, 杜成辉<sup>2</sup>

(1. 解放军南京军区福州总医院普通外科, 福州 350025; 2. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433; 3. 第二军医大学东方肝胆外科医院细胞信号转导研究中心, 上海 200438)

**[摘要]** **目的:**探讨早期高容量血液滤过(HVHF)后多器官功能障碍综合征(MODS)猪血清 IL-6 浓度及肺组织 IL-6 mRNA 表达水平的变化及意义。**方法:**雄性家猪 25 只随机分为模型组( $n=9$ )、滤过组( $n=10$ )、对照组( $n=6$ )。对照组输注生理盐水,模型组和滤过组采用二次打击建立 MODS 模型,而后滤过组采用 HVHF 治疗 3 d。双夹心 ELISA 法测定血清 IL-6,实时荧光定量 RT-PCR 技术定量检测肺 IL-6 mRNA 表达水平。应用 Annexin-V/PI 双标记流式细胞仪法检测淋巴细胞的凋亡。**结果:**滤过组滤过后各脏器功能有关指标水平、器官衰竭发生率、动物死亡率较模型组明显降低且有显著差异( $P<0.05$ );滤过组血清 IL-6 浓度及肺组织 IL-6 mRNA 表达水平较之模型组明显降低并相差显著( $P<0.05$ );滤过组淋巴细胞凋亡率较之模型组降低并相差非常显著( $P<0.01$ )。**结论:**早期应用 HVHF 可以降低创伤引起的血清 IL-6 及肺组织 IL-6 mRNA 表达升高,并使淋巴细胞凋亡率下降,降低肺衰竭发生率。

**[关键词]** 多器官功能障碍综合征;血液滤过;白细胞介素 6;细胞凋亡

**[中图分类号]** R 365 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)09-0961-04

### Changes of serum IL-6 levels and pulmonary IL-6 mRNA expression after high-volume hemofiltration in pigs with multiple organ dysfunction syndrome

WANG Bing<sup>1</sup>, FANG Guo-en<sup>2</sup>, MAN Xiao-bo<sup>3</sup>, DU Cheng-hui<sup>2</sup> (1. Department of General Surgery, General Hospital, PLA Fuzhou Military Area Command, Fuzhou 350002, China; 2. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433; 3. Cell Signal Transduction Center, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the effect of high-volume hemofiltration (HVHF) on serum levels of IL-6 and pulmonary expression of IL-6 mRNA in pigs with multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Methods:** Twenty-five pigs were randomly divided into model group, control group and HVHF group. Animals in control group were injected with normal saline, and those in the other 2 groups were treated with "a second hit" to establish MODS model, then animals in HVHF group was treated with HVHF for 3 days. Serum IL-6 levels were determined by ELISA and Real-time quantitative PCR was used to determine the expression level of IL-6mRNA. Lymphocyte apoptosis was detected by Annexin-V/PI flow cytometry. **Results:** After HVHF, the serum indices associated with organ-function and the morbidity and mortality were much lower than those in MODS model group ( $P<0.05$ ). The expression level of IL-6 mRNA in lung was reduced significantly in HVHF group compared with that in model group ( $P<0.05$ ); moreover, the lymphocyte apoptosis rate was also significantly decreased compared with model group ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** Early HVHF can decrease the high serum levels of IL-6 and the over-expression of IL-6 mRNA in lungs caused by trauma; it can also decrease the lymphocyte apoptosis rate, so as to prevent the incidence of lung failure.

**[KEY WORDS]** multiple organ dysfunction syndrome; hemofiltration; interleukin-6; apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(9):961-964]

多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)是危重患者死亡的主要原因之一。IL-6 等细胞因子在 MODS 发生过程中的过量表达可能起主要作用<sup>[1]</sup>。有效清除或减少炎症细胞因子可以阻断全身炎症反应综合征的形成或使全身炎症反应综合征减轻,有助于改善 MODS 患者的预后。本实验采取高容量血液滤过(highvol-

ume hemofiltration, HVHF)的方法,观察早期行 HVHF 后,MODS 猪血清 IL-6 浓度及肺脏 IL-6 基因表达水平的变化及与淋巴细胞凋亡之间的关系。

**[作者简介]** 王 冰,博士,主治医师。  
E-mail: wangbing213@263.net

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂及器材 猪 IL-6 免疫组化试剂盒(大连泛邦化工), TRIzol Reagent SuperScript II 逆转录试剂盒(美国 Invitrogen), Taq DNA 合成酶等 PCR 试剂(上海申能博彩), 引物及荧光探针(上海中科开瑞), 其他各种化学试剂均为进口或国产分析纯产品, BIO-RAD iCycler iQ 荧光定量 PCR 仪(美国), EPICS XL-MCL 型流式细胞仪(美国 Krefeld)。

1.2 动物分组和处理 健康雄性猪(第二军医大学实验动物中心提供)25只, 年龄2~4个月, 体质量20~30 kg, 随机分为模型组( $n=9$ )、滤过组( $n=10$ )、对照组( $n=6$ )。对照组输注生理盐水, 模型组和滤过组采用改良 Wiggers 方法复制失血性休克模型, 复苏12 h后, 在氯胺酮[15 mg/(kg·h)]、地西洋[0.8 mg/(kg·h)]维持麻醉下, 将人大肠杆菌内毒素(第二军医大学基础医学部微生物学教研室提供)于12 h内自静脉通道持续滴入, 剂量1.5 mg/kg。滤过组在内毒素注射完毕后开始 HVHF, 采用 BP-21 型自弹式血泵、F50 聚砜膜滤器(膜面积1.0 m<sup>2</sup>), 血流量200 ml/min, 前稀释法输入。连接前血路管道先用5 000 IU/L 的肝素生理盐水循环30 min, 肝素以1 500 IU/h 持续抗凝。治疗持续时间为12 h, 每12 h 更换滤器, 持续滤过3 d。

治疗前后每24 h 各时间点分别留取静脉出入端血液标本5 ml, 以4 000 r/min 离心10 min 留上清液, -70℃ 保存。查血常规、肝肾功能、电解质、动脉血血气、血氧饱和度等; 自动分析仪检测肝功能(胆红素、AST)、肾功能(Cr、Bun)、动脉血氧分压(PaO<sub>2</sub>)。

全部存活动物于第7天处死, 麻醉、消毒、铺无菌单, 以无菌器械开腹, 取器官标本。

1.3 MODS 诊断标准 参照 Hu 等<sup>[2]</sup> 的动物 MODS 诊断标准, 即动物致伤24 h 后出现2个或2个以上器官或系统功能障碍者称为 MODS。

1.4 血清 IL-6 浓度的测定 将血标本加到肝素抗凝管(每1 ml 血加5~10 IU 肝素)中, 加等量含5~10 IU/ml 肝素的无血清缓冲液(PBS)悬浮细胞。室温下离心20 min 后留取血清。双夹心 ELISA 法测定血清 IL-6 浓度

1.5 实时荧光定量 RT-PCR 技术测肺脏组织中 IL-6 mRNA 的表达

1.5.1 组织总 RNA 和 cDNA 制备 100 mg 肺组织中加入0.5 ml TRIzol Reagent, 制备总 RNA, 5

μg 总 RNA 采用 SuperScript II-RTaseI μl 逆转录制备 cDNA 第一链, 方法见文献<sup>[3]</sup>。

1.5.2 引物设计 β-actin 和 IL-6 基因 PCR 引物和 TaqMan 探针序列如下: ACTB-F: 5'-GCC AAC ACA GTG CTG TCT G -3', ACTB-R: 5'-CAC ATC TGC TGG AAG GTG G -3', ACTB-TMP: FAM 5'-AGG AGC AAT GAT CTT GAT CTT CA -3' TAMRA; IL6-F: 5'-TAT GAG CGT TAG GAC ACT ATT T -3', IL6-R: 5'-ATA CAT AAA ATA TTT CAA GTG GCA -3', IL6-TMP: FAM 5'-AAT ATG TGA TGT CGA GTT AAT TTA TAT AAG TGA TA -3' TAMRA。

1.5.3 定量 PCR 反应和分析 依照文献<sup>[3]</sup>, 同一组织中 IL-6 与 β-actin 的初始模板量的比值为  $2^{Ct(\beta\text{-actin}) - Ct(\text{IL-6})}$ , 代表肺组织中 IL-6 mRNA 表达水平。

1.6 Annexin-V/PI 双标记流式细胞仪检测淋巴细胞凋亡 细胞收集至流式细胞仪专用管中, 用预冷的含1% NBS 的磷酸盐缓冲液200 g 洗2遍(5 min), 弃上清, 以  $1 \times 10^5/100 \mu\text{l}$  重悬于  $1 \times \text{Binding buffer}$  中; 加入5 μl Annexin-V-FITC 染液, 轻轻混匀, 室温避光15 min; 每管内加入1 ml  $1 \times \text{Binding buffer}$  200 g 洗(5 min)后, 弃上清, 重悬于400 μl  $1 \times \text{Binding buffer}$  中上机检测。

1.7 统计学处理 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 主要器官的病理和功能改变 在模型组所观察的器官中, MODS 发生率88.9%, 2个器官功能障碍的有2例, 3个器官功能障碍的有4例, 发生4个或以上器官功能障碍的有2例, 其中肺功能障碍7例; 胃肠道功能障碍6例; 肝功能障碍5例; 肾功能障碍3例; 凝血系统功能障碍3例; 心功能障碍2例。

滤过组 MODS 发生率为20%, 其中肺功能障碍1例; 胃肠道功能障碍1例; 凝血系统功能障碍1例, 显著低于模型组 ( $P < 0.01$ )。模型组动物病死率为77.8%(7/9), 1例死于脓毒症早期(第3天)、6例死于脓毒症中晚期(3~6 d), 2例存活到7 d 后处死。滤过组动物病死率为20%(2/10), 差异显著 ( $P < 0.05$ )。对照组均存活。

观察结果显示, 模型组 AST、BUN 均出现明显升高, 动物死亡前明显高于正常值, PaO<sub>2</sub> 明显下降, 滤过组 PaO<sub>2</sub> 滤过后显著增高, PaCO<sub>2</sub> 滤过后降低, PAWP 降低, 差异显著 ( $P < 0.05$ , 表1)。

表 1 各组动物处死前部分器官功能指标

Tab 1 Plasma indices of organ function of pigs before killed

Group	n	$(\bar{x} \pm s)$					
		PaO <sub>2</sub> (p <sub>B</sub> /mmHg)	PaCO <sub>2</sub> (p <sub>B</sub> /mmHg)	CO(L/min)	PAWP (p <sub>B</sub> /mmHg)	AST (c <sub>B</sub> /mmol · L <sup>-1</sup> )	BUN (c <sub>B</sub> /mmol · L <sup>-1</sup> )
Control	6	113.2±10.5	36.4±3.5	6.9±1.2	7.8±0.8	47±12	2.1±0.8
MODS	9	90.3±7.7*	48.5±5.1**	7.0±0.5	10.0±1.4*	221±42*	4.7±2.6*
HVHF	10	103.9±5.8 <sup>△</sup>	39.6±3.2 <sup>△</sup>	9.5±2.5	7.5±0.9 <sup>△</sup>	56±17 <sup>△△</sup>	1.8±0.6 <sup>△</sup>

1 mmHg=0.133 kPa, \* P<0.05, \*\* P<0.01 vs control group; <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01 vs MODS group

2.2 HVHF 对猪血清 IL-6 水平的影响 模型组 IL-6 水平较滤过组明显升高且显著差异 (P<0.05); 组内比较, 模型组 (滤过后) 第 1~96 小时血清 IL-6 始终维持在较高水平。滤过起始时滤过组与模型组血清 IL-6 水平即较高, 与对照组差异非常显著 (P<0.01), 而此两组间无显著差异; 而后期模

型组血清 IL-6 水平继续增高, 与滤过组差异显著 (96 h, P<0.05)。滤过 6 h, 明显呈下降趋势, 血浆 IL-6 逐渐降低, 与模型组差异显著 (P<0.05); 滤过 12 h, 有升高趋势, 与模型组差异不显著; 更换血滤器后, 48 h 时, 与模型组相比较差异显著 (P<0.05)。见表 2。

表 2 HVHF 对猪血清 IL-6 水平的影响

Tab 2 Influence of HVHF on serum IL-6 levels in pigs

Group	n	$(\bar{x} \pm s, p_B/ng \cdot L^{-1})$						
		Time (t/h)						
		0	6	12	24	48	72	96
HVHF	10	4.21±1.78 <sup>△△</sup>	3.26±1.55* <sup>△△</sup>	4.93±2.27 <sup>△△</sup>	5.40±2.19* <sup>△△</sup>	5.71±2.58* <sup>△△</sup>	6.31±2.58* <sup>△△</sup>	6.43±2.26* <sup>△△</sup>
MODS	9	4.39±2.22 <sup>△△</sup>	5.99±3.18 <sup>△△</sup>	7.50±3.00 <sup>△△</sup>	8.76±2.82 <sup>△△</sup>	9.08±2.61 <sup>△△</sup>	9.34±2.82 <sup>△△</sup>	10.63±3.28 <sup>△△</sup>
Control	6	0.24±0.12	0.25±0.16	0.32±0.19	0.32±0.17	0.36±0.16	0.35±0.18	0.38±0.18

\* P<0.05 vs MODS group; <sup>△</sup>P<0.05, <sup>△△</sup>P<0.01 vs control group

2.3 猪肺 IL-6 mRNA 的表达 96 孔板 3 次重复, 结果 Ct 值基本一致, 说明荧光定量 PCR 的重复性好、可靠, 结果取 3 次反应的中位数。滤过组肺 IL-6 mRNA 表达 (0.221 8 ± 0.052 2) 比模型组 (0.274 1 ± 0.066 7) 明显减低, 差异显著 (P<0.01)。

细胞凋亡 血液滤过开始前, HVHF 组与 MODS 组淋巴细胞凋亡率均明显增加, 分别与自身放血前比较, 相差非常显著 (P<0.01)。HVHF 开始后, HVHF 组淋巴细胞凋亡率逐渐减少, 而 MODS 组淋巴细胞凋亡率仍有上升趋势, 两组间同一时间点比较相差非常显著 (P<0.01)。

2.4 Annexin-V/PI 双标记流式细胞仪检测淋巴

见表 3。

表 3 Annexin-V/PI 双标记流式细胞仪检测淋巴细胞凋亡率的变化

Tab 3 Ratio of lymphocyte apoptosis detected by flow cytometry

Group	n	$(\bar{x} \pm s, \%)$				
		Pre-bleeding	Before HVHF	24 h after HVHF	48 h after HVHF	Before executing
MODS	9	11.11±2.13	46.42±6.29**	50.30±6.72	54.03±7.80	60.77±9.22
HVHF	10	9.74±1.95	43.53±10.03**	28.30±4.63 <sup>△△</sup>	21.89±2.71 <sup>△△</sup>	18.17±4.55 <sup>△△</sup>

\*\* P<0.01 vs pre-bleeding in the same group; <sup>△△</sup>P<0.01 vs MODS group

### 3 讨论

MODS 是创伤及外科感染的严重并发症, 病死

率高。本实验采用可逆性休克和小剂量持续滴入人大肠杆菌内毒素的方法制备的模型, 成功地利用猪制备了 MODS, 发生率较高, 病死率高, 可重复性好,

致伤因素、发病过程、临床特征及诊断标准与临床典型的 MODS 相似等特点<sup>[4]</sup>。

目前认为 MODS 中引发器官实质损伤的基本机制是炎症细胞普遍激活和 TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-6、IL-8、前列腺素等炎症介质释放<sup>[5]</sup>。多项研究表明 IL-6 变化较敏感,与器官衰竭有关,可反映疾病的严重程度,IL-6 的大量释放对患者是一个危险信号<sup>[6~8]</sup>。滤过组在器官功能障碍发生率、病死率等方面,较模型组明显为低,提示采用 HVHF 可以达到对器官的保护作用。

本研究测定血清 IL-6 水平,观察 HVHF 滤过组与模型组的差异。结果显示,滤过起始时 IL-6 即明显增高;而后期模型组血清 IL-6 水平继续增高,与滤过组差异显著,死亡率亦差异显著。提示血清 IL-6 较敏感,动态检测循环中 IL-6 水平对 MODS 的发生和预后的判断可能具有预警意义。我们观察到,行 HVHF 治疗早期血浆 IL-6 逐渐降低(在滤过 6 h 后),提示 HVHF 具有清除动物体内上述细胞因子的作用。但随后,则无明显下降甚至有升高趋势,在滤过 12 h 时,与模型组相比较差异不显著;而在更换血滤器后,48 h 时,与模型组相比较差异显著( $P < 0.05$ ),显示 IL-6 清除有明显增多。提示血浆中炎症介质清除在更换滤器后增强。

在 MODS 模型组中肺衰竭的发生率最高(7/9)。本实验应用实时荧光定量 PCR 技术有效地进行了肺 IL-6 基因表达的定量分析。从实验结果看,发生肺功能衰竭的动物肺组织 IL-6 mRNA 与未发生者相较明显升高。提示 IL-6 mRNA 的表达水平高低与是否发生肺衰竭相关,表达较低的存活率高,表达高的衰竭率、死亡率亦高<sup>[9,10]</sup>。

本研究证明 HVHF 可明显降低血液循环中 IL-6 的浓度,并使淋巴细胞凋亡率下降。淋巴细胞是使机体快速、有效清除感染病源的特异性免疫效应细胞,败血症时淋巴细胞凋亡增加,降低了机体上调特异性免疫反应的能力,此时机体只有通过上调非特异性免疫反应来弥补,必然带来炎症过激所致的机体自身损害的不良反应。尽管细胞凋亡被认为是受基因调控的程序性细胞死亡,但研究发现细胞凋亡与细胞的损伤也密切相关<sup>[11,12]</sup>。HVHF 可通过对促炎/抗炎细胞因子平衡的调节,减少淋巴细胞凋亡,恢复其免疫功能,从而对 MODS 及 ARDS 起到防治作用。

本组研究测定 MODS 动物血清中炎症细胞因子的含量及肺组织基因表达,并观察其与淋巴细胞凋亡的关系,证明采用 HVHF 可有效清除血清细胞因子,从而阻断全身炎症反应综合征的形成与发展,达到改善 MODS 及 ARDS 预后的目的。一方面可以作为反映病情严重程度和评估预后的参考指标;另一方面可探讨和寻找对 MODS、ARDS 有效的治疗手段。

## [参考文献]

- [1] Welborn MB, Oldenburg HS, Hess PJ, et al. The relationship between visceral ischemia, proinflammatory cytokines, and organ injury in patients undergoing thoracoabdominal aortic aneurysm repair[J]. Crit Care Med, 2000, 28: 3191-3197.
- [2] Hu S, Sheng Z Y, Zhou B, et al. Study on delay two-phase multiple organ dysfunction syndrome[J]. Chin Med J, 1998, 111: 101-108.
- [3] 满晓波, 唐亮, 邱秀华, 等. 激光显微切割结合实时荧光聚合酶链反应定量检测肝脏中转化生长因子- $\beta$ 1 和- $\beta$ 2 的表达[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20: 890-892.
- [4] Van Griensven M, Kuau M, Breddin M, et al. Polymicrobial sepsis induces organ changes due to granulocyte adhesion in a murine two hit model of trauma[J]. Exp Toxicol Pathol, 2002, 54: 203-209.
- [5] 王冰, 方国恩, 杜成辉. 高容量血液滤过对 MODS 猪肺 TNF- $\alpha$  和 IL-8 mRNA 表达的影响[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26: 791-794.
- [6] Conrad SA, Bidani A. Management of the acute respiratory distress syndrome[J]. Chest Surg Clin N Am, 2002, 12: 325-354.
- [7] 杜斌, 陈德昌, 潘家绣, 等. 降钙素原与白介素-6 的相关性优于传统的炎症指标[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14: 474-477.
- [8] 方步武, 邱奇, 等. 急重症全身炎症反应综合征阶段细胞因子及炎症介质的变化特点[J]. 中国危重病急救医学, 2001, 131: 542-544.
- [9] Dougnac A, Riquelme A, Calvo M, et al. Study of cytokines kinetics in severe sepsis and its relationship with mortality and score of organic dysfunction [J]. Rew Med Chil, 2001, 129: 347-358.
- [10] Emre F, Tim Strate, Sharam Z. Impact of different modalities of continuous venovenous hemofiltration on sepsis-induced alterations in experimental pancreatitis[J]. Kidney Int, 2002, 62: 1806-1818.
- [11] 曾志勇, 王志农, 徐志云, 等. 缺血预处理对缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响[J]. 第二军医大学学报, 2003, 24: 255-257.
- [12] Ramakrishnan N, Mc Clain DE, Catravas G N. Membranes as sensitive targets in thymocyte apoptosis [J]. Int J Radiat Biol, 1993, 63: 693-701.

[收稿日期] 2006-05-22

[修回日期] 2006-08-29

[本文编辑] 曹静