

急性肺水肿大鼠肺组织中 IL-6, SOD 和 MDA 的变化

王娟¹, 贾合磊¹, 吉红亮², 任冬冬¹, 卢长青¹

(1. 河南中医药大学第二临床医学院急诊科, 郑州 450002; 2. 郑州市郑荣医院普内科, 郑州 450002)

【摘要】 目的 探讨急性缺氧致大鼠急性肺水肿模型肺组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和白细胞介素-6(Interleukin 6, IL-6)的变化及其意义。**方法** 成年 Wistar 大鼠 50 只, 随机分为 A 组(正常组)、B 组(急性肺水肿模型, 缺氧 24 h)、C 组(急性肺水肿模型, 缺氧 48 h)、D 组(急性肺水肿模型, 缺氧 72 h)和 E 组(急性肺水肿激素治疗组, 缺氧 72 h)。对 B、C、D、E 组大鼠腹腔内注射 6% 氯化铵建立急性肺水肿模型, E 组在注入 6% 氯化铵 30 min 后经尾静脉给药, 给予地塞米松 6.0 mg/kg。造模成功后的 24 h、48 h、72 h, 分别处死 4 组大鼠, 分离大鼠血浆, 摘取大鼠肺脏, 制备 10% 肺组织匀浆, 用 ELISA 检测肺组织中 MDA、SOD、IL-6 和血浆中 IL-6 的含量和活性。**结果** B、C、D 三组可见大鼠肺组织水肿明显, 湿重明显增加, 与 A 组相比, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。A 组大鼠肺组织无明显充血水肿, 肺组织形态大致正常。B、C、D 大鼠模型肺组织充血水肿, 肺组织间质间隙、肺泡和细支气管内充满含有蛋白质的液体, 肺泡内有透明膜形成。且 D 组大鼠肺组织充血水肿最为明显。而 E 组大鼠全肺组织水肿普遍较轻, HE 染色显示 E 组大鼠肺组织肺泡融合, 间隔较小, 水肿液大多已吸收, 肺泡内散在少量嗜伊红液体。B 组与 A 组比较, 肺组织中 MDA、IL-6 升高, SOD 降低, 但差异无统计学意义($P > 0.05$), 随着肺水肿时间的延长, C、D 组大鼠肺组织中 MDA 升高, SOD 降低, 血浆中的 IL-6 升高, 和 A 组相比变化明显, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。和 D 组相比, E 组大鼠肺组织中 MDA 降低, SOD 升高, 血浆中的 IL-6 降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 急性肺水肿的发生和氧化应激有关, 机体抗氧化能力降低、自由基增加是肺水肿发生的重要机制, 肺组织中 IL-6、SOD 和 MDA 含量对病情变化有指导意义。

【关键词】 急性肺水肿; 大鼠模型; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 白细胞介素-6

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0038-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.007

Study on SOD, MDA and IL-6 in a rat model of acute pulmonary edema

WANG Juan¹, JIA He-lei¹, JI Hong-liang², REN Dong-dong¹, LU Chang-qing¹

(1. Emergency department of Henan University of traditional Chinese medicine, Henan 450002, China;

2. Department of internal medicine, general hospital, Zheng Rong hospital, Zhengzhou 450002, China)

【Abstract】 Objective To investigate Interleukin 6 (IL-6), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) in lung tissues of a rat acute pulmonary edema model induced by acute hypoxia. **Methods** 50 adult Wistar rats were randomly divided into group A (normal), B (acute pulmonary edema, hypoxia for 24 h), C (acute pulmonary edema, hypoxia for 48h), D (acute pulmonary edema, hypoxia for 72 h) and E (dexamethasone treatment, hypoxia for 72h). The model of acute pulmonary edema was established by intraperitoneal injection with 6% ammonium chloride. In group E, dexamethasone (6mg/kg) was injected in tail vein following intraperitoneal injection of 6% ammonium chloride. The rats were killed 24 (group B), 48 (C) and 72 hours (D&E) later. Plasma was isolated and lungs were removed. MDA, SOD in lung tissues and IL-6 in plasma were analyzed by ELISA. **Results** The wet weight of lung tissues were significantly increased in group B, C and D compared to group A ($P < 0.05$). The lung tissues of group A had no obvious congestion

[作者简介] 王娟(1975-), 女, 硕士生, 讲师研究方向: 心脑血管疾病及急危重症的救治。E-mail: m15138690803@163.com。

[通讯作者] 卢长青(1965-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向: 心血管病及急危重症的急救, 急性心梗的介入治疗。E-mail: lcq0217@163.com。

and edema, and the morphology of lung tissues was normal ($P > 0.05$). Pulmonary edema, interstitial spaces and alveolar filled fluid can be seen in group B, C, D and transparent membrane formed within alveoli. The lung tissue congestion and edema in group D were the most obvious ($P < 0.05$). The above changes obviously improved in group E. Compared with group A, MDA, IL-6 increased and SOD decreased in lung tissues of group C and D. Compared with group D, MDA was decreased and SOD was increased in lung tissues of group E and IL-6 was also decreased significantly in plasma ($P < 0.05$). **Conclusion** The occurrence of acute pulmonary edema related to oxidative stress and decreased antioxidant capacity. Increased free radical is an important mechanism of pulmonary edema. SOD, MDA and IL-6 in the lung tissue may be indexes for the prognosis.

【Key words】 Acute pulmonary edema; Rat model; Malondialdehyde (MDA); Superoxide dismutase (SOD); Interleukin 6 (IL-6)

急性肺水肿是急诊科、心内科及重症医学科的常见的急症之一,其临床表现为:突然出现的严重的呼吸困难,端坐呼吸,伴咳嗽,常咳出粉红色泡沫样痰,病人烦躁不安,口唇紫绀,大汗淋漓,心率增快,两肺布满湿罗音及哮鸣音,严重者还可引起晕厥及心脏骤停^[1]。由于急性肺水肿病程凶险,致死率高,因而急性肺水肿的发病机制和病程中的病理生理变化已成为近年来研究的热门领域之一^[2]。目前关于急性肺水肿的发病机制尚未完全清楚,但有研究显示,缺氧引起肺血管过度收缩、肺毛细血管通透性增加和肺泡对液体的清除能力降低是急性肺水肿发生的重要机制之一^[2]。利用模拟肺组织受损的动物模型,再现人体病理状态和病理生理过程,对于掌握急性肺水肿发生发展、疾病特征和寻求新的治疗途径显得尤为重要。

急性肺水肿的动物模型的建立,目前国内外已有了一定的研究^[3]。有研究显示,丙二醛(malondialdehyde, MDA),超氧化物歧化酶(superoxide Dismutase, SOD)和白介素-6(IL-6)的变化可能在缺氧引起的急性肺水肿中发挥了重要作用^[4],为明确三者其中的作用,我们建立了急性肺水肿的大鼠模型,重点研究了急性肺水肿大鼠肺组织中 IL-6, SOD 和 MDA 的变化,以明确缺氧在引发急性肺水肿中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

6% 氯化氨购自上海博湖生物科技有限公司, 10% 乌拉坦, BCA 法蛋白测定试剂盒购自武汉能仁医药化工有限公司, SOD、MDA 测定试剂盒, 大鼠 IL-6、ELISA 试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司, 多功能酶标仪由美国 Sigma 公司生产。

1.2 实验动物及分组

成年 Wistar 大鼠 50 只, 雌雄不限, 体重为 (200 ± 20) g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0006】。随机将 50 只大鼠分为 5 组, 即 A 组(正常组)、B 组(急性肺水肿模型缺氧 24 h)、C 组(急性肺水肿模型缺氧 48 h)、D 组(急性肺水肿模型缺氧 72 h)、E 组(急性肺水肿模型激素治疗组), 每组 10 只。

1.3 动物模型的建立和实验程序

无菌操作, 在河南中医药大学实验动物中心设施进行【SYXK(豫)2012-0017】。对 B, C, D 和 E 组的 50 只大鼠腹腔内分别注入 6% 氯化氨(雌鼠: $6 \sim 8$ mL/kg, 雄鼠: $9 \sim 12$ mL/kg, 购自上海博湖生物科技有限公司), 制作急性肺水肿大鼠模型^[3]。E 组在注入 6% 氯化氨 30 min 后经尾静脉给药, 给予地塞米松 6.0 mg/kg。所有大鼠均自由摄食及饮水, 取材前 24 h 禁食水。正常组同时饲养。由专人统一时间进行取材。B, C, D 和 E 组大鼠分别在氯化氨注入后的 24 h, 48 h, 72 h, 用 10% 乌拉坦腹腔注射麻醉大鼠, 肝素抗凝管腹主动脉采血, 4°C 离心, 3000 r/min, 离心 15 min, 分离血浆, 分装后 -70°C 冰箱保存待测; 分离并摘取大鼠肺脏, 留取左侧肺叶, 用于肺含水量的测定, 其余肺组织分装在 3 个冻存管中立刻放入液氮冷冻保存。取右侧肺叶, 按照说明书制备 10% 肺组织匀浆, 分别用于检测肺组织中 MDA、SOD、IL-6 的含量和活性。

1.4 大鼠肺组织含水率测定

取大鼠左肺用吸水纸吸干表面血迹, 迅速称重后放入烤箱内 60°C 烘烤 72 h, 至质量不再减轻, 并计算肺组织干质量。肺组织含水率用 $[(\text{湿质量} - \text{干质量}) / \text{湿质量} \times 100\%]$ 表示。

1.5 大鼠肺组织病理学检查

将 5 组大鼠肺组织标本 $4 \mu\text{m}$ 厚度连续石蜡切片, 并行脱蜡, 染色, 脱水, 透明, 对切片进行 PBS 冲

洗,最后加入 DAB 显色液,用苏木素复染色,并用中性树脂封片。封片完毕后将切片放置显微镜下观察大鼠肺组织是否有充血水肿及肺组织间质间隙、肺泡和细支气管情况等。

1.6 大鼠肺组织中的氧化应激指标测定

取右侧肺叶,按照说明书制备 10% 肺组织匀浆,检测 5 组大鼠肺组织中的 MDA 和 SOD 等氧化应激相关指标。试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,按说明书进行检测。

1.7 ELISA 法检测大鼠肺组织和血浆中的 IL-6 测定

应用 ELISA 法检测试剂盒检测 5 组大鼠血浆和肺组织中 IL-6 的含量,按说明书进行操作。

1.8 统计学分析

收集 5 组大鼠肺组织中 MDA, SOD 和 IL-6 含量变化,统计学处理数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 18.0 统计软件,各组间差异比较用单因素方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠肺组织大体和病理学情况

处死 5 组大鼠模型,取出其肺组织,可见 A 组对照组大鼠肺组织均匀,无明显肺水肿表现,湿重无明显增加。B, C, D 三组可见大鼠肺组织水肿明显,湿重明显增加,与 A 组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对 4 组大鼠模型肺组织行 HE 染色,显示 A 组大鼠肺组织无明显充血水肿,肺组织形态大致正常。B, C, D 大鼠模型肺组织充血水肿,肺组织间质间隙、肺泡和细支气管内充满含有蛋白质的液体,肺泡内有透明膜形成。且 D 组大鼠肺组织充血水肿最为明显(图 1-4)。而 E 组大鼠全肺组织水肿普遍较轻,未见明显渗出液。HE 染色显示 E 组大鼠肺组织肺间质水肿及炎症细胞浸润程度显著减轻,水肿液大多已吸收,肺泡内散在少量嗜伊红液体(图 5)。

2.2 各组大鼠肺组织中 MDA 和 SOD 的变化

比较 4 组大鼠在急性缺氧不同时间其肺组织中 MDA、SOD 的变化,并与 A 组做对比,研究结果显示, B 组大鼠与 A 组对照组比较,肺组织中 MDA 升高、SOD 降低,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$),随着肺水肿时间的延长, C, D 组大鼠在缺氧 48 h 和 72 h 后肺组织中 MDA、SOD 和 A 组相比变化明显,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。经过激素治疗后, E 组和 D 组相比,肺组织中 MDA 降低、SOD 升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

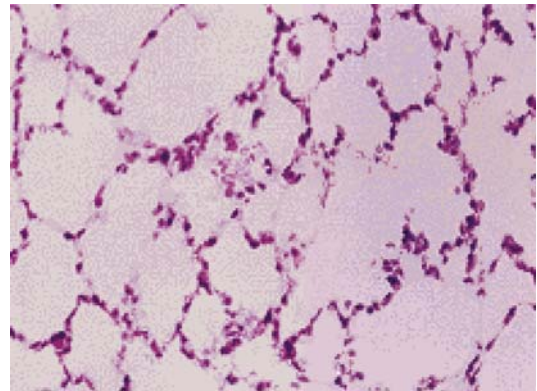


图 1 A 组大鼠模型肺组织:肺泡结构完整,肺泡壁无水肿(HE × 100)。

Fig. 1 Lung tissue of rats in group A: the alveolar structure was complete, and there was no edema in the alveolar wall (HE × 100).

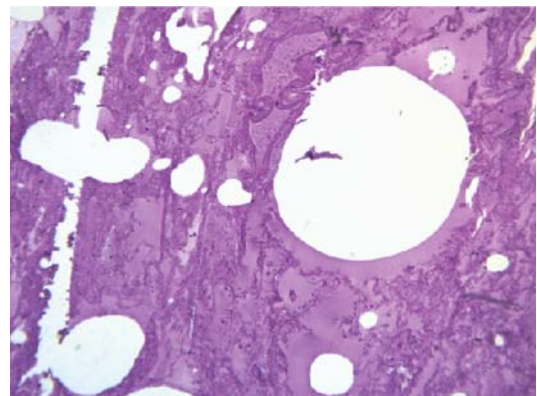


图 2 B 组大鼠模型肺组织:肺充血水肿,肺间质间隙、肺泡细支气管充满蛋白液体(HE × 40)。

Fig. 2 Lung tissue of rats in group B: pulmonary congestion and edema, interstitial spaces of lung, alveolar fluid (HE × 40).

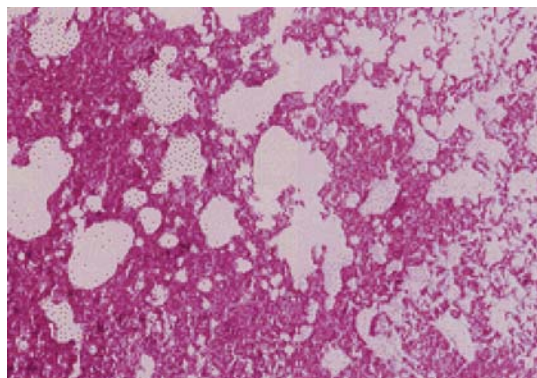


图 3 C 组大鼠模型肺组织:肺充血水肿,肺间质间隙、肺泡细支气管充满蛋白液体(HE × 10)。

Fig. 3 Lung tissue of rats in group C: Pulmonary congestion and edema, interstitial spaces of lung, alveolar fluid filled with protein (HE × 10).

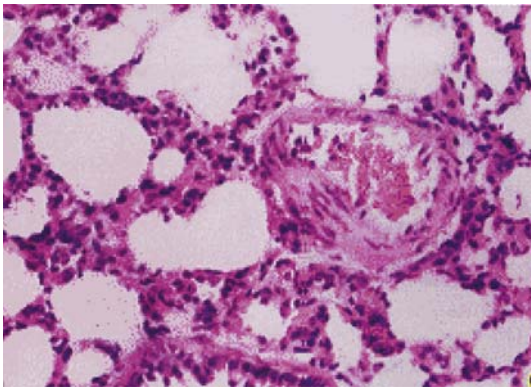


图 4 D 组大鼠模型肺组织:肺间质明显充血、水肿、增厚、炎症细胞浸润,肺泡腔内渗出物(HE ×20)。

Fig.4 Lung tissue of rats in group D:Obvious congestion, edema,thickening,inflammatory cell infiltration and alveolar effusion(HE ×20).

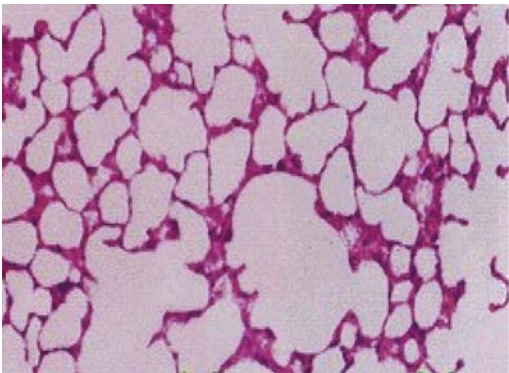


图 5 E 组大鼠模型肺组织:肺间质水肿及炎症细胞浸润程度显著减轻。

Fig.5 Lung tissue of rats in group E:The degree of edema and inflammatory cell infiltration in lung significantly reduced.

表 1 5 组大鼠肺组织中 SOD 和 MDA 的变化($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 Changes of SOD and MDA in lung tissue of rats

指标/组别 Index/ group	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C	D 组 Group D	E 组 Group E
SOD (103U/g)	3.64 ± 0.69	3.42 ± 0.61	2.82 ± 0.59 *	2.63 ± 0.55 *	3.25 ± 0.64 *
MDA (mmol/g)	1.06 ± 0.51	1.18 ± 0.63	1.48 ± 0.67 *	1.60 ± 0.79 *	1.22 ± 0.55 *

注: * C,D 组与 A 组相比变化明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。
Note: * Compared with group A, group C and D change significantly, the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

表 2 4 组大鼠肺组织和血浆中 IL-6 的变化($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Changes of IL-6 in lung tissue and plasma of rats

指标/组别 Index/ group	A 组 Group A	B 组 Group B	C 组 Group C	D 组 Group D	E 组 Group E
血浆 IL-6($\mu\text{g/L}$) IL-6 in plasma($\mu\text{g/L}$)	107.48 ± 33.51	161.73 ± 40.26 *	182.84 ± 46.94 *	196.38 ± 55.26 *	145.18 ± 37.20 *
肺组织 IL-6($\mu\text{g/L}$) IL-6 in lung tissue($\mu\text{g/L}$)	99.73 ± 32.16	119.37 ± 36.27	149.52 ± 44.12 *	164.53 ± 47.25 *	112.64 ± 35.03 *

注: * B,C,D 组血浆 IL-6 含量和 A 组相比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),C,D 组肺组织中 IL-6 含量和 A 组相比升高明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)。
Note: * Compared with group A, IL-6 in plasma of group B,C,D were significantly higher, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with group A IL-6 in lung tissue of group C,D were significantly higher, the difference was statistically significant ($P < 0.05$).

2.3 各组大鼠血浆和肺组织 IL-6 变化

比较 3 组大鼠在急性缺氧导致肺水肿不同时间其肺组织和血浆中 IL-6 的变化,并与 A 组进行比较。结果显示,B,C,D 组大鼠血浆中的 IL-6 和 A 组相比明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),B 组大鼠与 A 组对照组比较,肺组织中 IL-6 有所升高,但差异无统计学意义($P > 0.05$),随着肺水肿时间的延长,C,D 组大鼠肺组织中的 IL-6 和 A 组相比升高明显,差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 2)。经过激素治疗后,E 组和 D 组相比,肺组织中 IL-6 明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

急性肺水肿多发生于急性广泛性心肌梗死、急

性心肌炎等,严重高血压、主动脉瓣狭窄或二尖瓣狭窄,感染性心内膜炎、心脏外伤等一系列疾病,其发病迅速,往往会造成心肺功能衰竭,患者致死率高^[1,4]。近年来,急性肺水肿的发病率逐渐增高,对于急性肺水肿的患者,重视其的预防和治疗,可明显提高肺水肿患者的存活率,减少后遗症并发症,因而日益引起医学界的重视^[5]。

目前认为,急性缺氧造成的肺血管过度收缩、肺毛细血管通透性增加和肺泡对液体的清除能力降低是肺水肿发生的重要机制^[6]。有研究显示,急性缺氧可引起氧化应激,后者具有调节炎症反应、减少肺组织 NO 合成释放和降低肺 Na⁺ - K⁺ + ATP 酶活力等多种生物学作用^[7]。缺氧可改变氧自由基/一氧化氮平衡,能通过过氧化物的分解产物引

起细胞损伤。因此,测定氧化应激反应中的重要指标:抗氧化酶 SOD、脂质过氧化产物 MDA 及 IL-6 含量或活性可反映机体内脂质过氧化的程度,反映出细胞损伤的程度^[8]。

SOD 是生物体内重要的抗氧化酶,其具有特殊的生理活性,是生物体内清除自由基的首要物质。当机体自由基产生大幅激增时会很快引起氧化应激,并影响到蛋白质表达等调节、应答机制。在自由基的诱导及机体代偿应激下,细胞或机体会诱导性地增强抗氧化能力,一般会出现一过性 SOD 水平增高现象^[9]。急性肺水肿的患者由于氧化应激,肺组织中的 SOD 会明显升高。由于肺组织中的炎症反应和氧化应激,肺组织和血浆中的 IL-6 也会明显升高^[10]。MDA 是膜脂过氧化最重要的产物之一,它的产生还能加剧膜的损伤,因此,通过 MDA 了解膜脂过氧化的程度,以间接测定膜系统受损程度以及动植物的抗逆性^[11]。这 3 种指标均可反映机体内过氧化的程度,反映出细胞损伤的程度。

在本研究中,我们比较了 3 组大鼠在急性缺氧不同时间其肺组织中 MDA、SOD 的变化,B 组大鼠肺组织中 MDA 升高、SOD 降低,随着肺水肿时间的延长,C、D 组大鼠在缺氧 48、72h 后肺组织中 MDA、SOD 的变化更加明显,同时,B、C、D 组大鼠血浆中的 IL-6 和 A 组相比明显升高,C、D 组大鼠肺组织中的 IL-6 和 A 组相比升高明显,差异有统计学意义。

为了观察肺水肿经治疗减轻后,MDA、SOD 和 IL-6 等指标的变化。我们设计了 E 组大鼠接受激素尾静脉注射治疗。结果表明,经糖皮质激素治疗后,和 D 组相比,E 组大鼠肺组织水肿普遍较轻,HE 染色显示肺组织肺泡融合,间隔较小,水肿液大多已吸收,肺泡内仅散在少量嗜伊红液体。大鼠肺组织和血浆中 MDA 和 IL-6 明显下降,SOD 升高,提示糖皮质激素对治疗急性肺水肿明显有效。可能的作用是改善毛细血管的通透性,减少渗出,随着肺水肿的改善,MDA 等分泌减少,同时因肺组织对 MDA 具清除作用,故 MDA 和 IL-6 明显下降。

糖皮质激素-糖皮质激素受体(GC-GCR)为体内主要的抗炎因子,使多种炎症因子的表达受到抑制,起到抑制炎症反应的作用^[12]。实验结果显示,糖皮质激素可抑制刺激性气体所致肺水肿的炎症反应,抑制 IL-10、IL-6、IFN- α 等炎症因子,早期给予外源性糖皮质激素,可有效增加其与 GCR 的结合,发挥抗炎效果,减少炎症因子的释放^[13-14]。同时,糖皮质激素治疗对全血中 SOD 活力产生影响,因为在肺水肿时,SOD 因对抗缺氧产生的氧自由基以及

TXA₂、ET 等而消耗性减少,经激素治疗后炎症减轻,SOD 活力部分恢复,激素肺脏抗氧化能力增强^[15]。

综上所述,肺水肿大鼠肺组织抗氧化能力和相关抗氧化酶活力显著降低,而 MDA 却显著增加,血浆及肺组织 IL-6 水平亦显著增加,提示我们氧化应激诱导在急性肺水肿造成的肺组织损伤中可能起到了重要作用。本研究得出的结论提示我们同时检测肺组织和血浆中 MDA、SOD 和 IL-6 等的改变对急性肺水肿、病情评估、指导用药及预后提供重要指导,值得在临床工作中普及应用。

参考文献:

- [1] Smith WS, Matthay MA. Evidence for a hydrostatic mechanism in human neurogenic pulmonary edema[J]. *Chest*, 1997, 111: 1326-33.
- [2] Theodore J, Robin ED. Pathogenesis of neurogenic pulmonary oedema[J]. *Lancet*, 1975, 18(2): 749-751.
- [3] Minnear FL, Kite C, Hill LA, *et al.* Endothelial injury and pulmonary congestion characterize neurogenic pulmonary edema in rabbits[J]. *J Appl Physiol*, 1987, 63(1): 335-341.
- [4] Hamdy O, Maekawa H, Shimada Y. Role of central nervous system nitric oxide in the development of neurogenic pulmonary edema in rats[J]. *Crit Care Med*, 2001, 29(6): 1222-1228.
- [5] Lionte C, Sorodoc L, Laba Y. Respiratory syndromes in acute poisoning[J]. *Rev Med Chir Soc Med Natiasi*, 2004, 108(3): 544-548.
- [6] Bur A, Wagner A, Roggla M, *et al.* Fatal pulmonary edema after nitric acid inhalation[J]. *Resuscitation*, 1997, 35(1): 33-36.
- [8] Prys-Roberts C. Principles of treatment of poisoning by higher oxides of nitrogen[J]. *Br J Anaesth*, 1967, 39(5): 432-439.
- [9] Parsons PE. Respiratory failure as a result of drugs, overdoses, and poisonings[J]. *Clin Chest Med*, 1994, 15(1): 93-102.
- [10] Theodore J, Robin ED. Pathogenesis of neurogenic pulmonary oedema[J]. *Lancet*, 1975, 18; 2(7938): 749-751.
- [11] 缪捷飞. 益气活血方对大鼠胸部照射肺组织 SOD 活性、MDA 及 HP 含量的影响[J]. *南通大学学报:医学版*, 2010, 30(4): 255-257.
- [12] Drobinski G, Eugene M. Exploration Hemodynamique Cardiovasculaire[M]. 1982; Masson, Paris.
- [13] Elsayed NM, Gorbunov NV, Mayorga MA, *et al.* Significant pulmonary response to a brief high-level, nose-only nitrogen dioxide exposure: an interspecies dosimetry perspective [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002, 184(6): 1-10.
- [14] 马钧. 急性呼吸窘迫综合征患者糖皮质激素合理使用方案及受体机制[J]. *中国危重病急救医学*. 2003, 15(3): 680-682.
- [15] 徐仁宝. 大剂基激素作用的受体机制以及危重病人激素治疗的新策略[J]. *外科理论与实践*, 2000, 5(2): 76-78.