

细胞因子抗体及地塞米松对小鼠脓毒血症心肌及骨骼肌 ATP 含量的影响

欧阳彬¹, 王吉甫¹, 吴珏恒², 陈敏英¹, 刘仁斌¹, 张清秀³

(中山医科大学 1. 附属第一医院外科, 广东 广州 510080; 2. 分子医学中心, 广东 广州 510089; 3. 生物化学教研室, 广东 广州 510089)

摘要: 【目的】观察和比较细胞因子抗体及地塞米松(DXM)对脓毒血症心肌及骨骼肌细胞腺苷三磷酸(ATP)含量的影响。【方法】制作小鼠盲肠结扎穿孔(CLP)脓毒血症模型, 分别注射生理盐水、IL-1 β Ab、TNF α Ab、IFN γ Ab、IL-1 β Ab+TNF α Ab+IFN γ Ab, 以及 DXM, 观察各组小鼠心肌及骨骼肌 ATP 含量。【结果】① CLP 模型心肌及骨骼肌细胞 ATP 含量严重减少。② IL-1 β Ab、TNF α Ab 使 CLP 模型小鼠心肌和或骨骼肌 ATP 含量轻度增加。而 IL-1 β Ab+TNF α Ab+IFN γ Ab, 以及 DXM 使 CLP 模型小鼠心肌及骨骼肌 ATP 含量增加较为明显, 其中 DXM 使 CLP 模型心肌、骨骼肌细胞 ATP 含量增加 6~8 倍。【结论】IFN γ Ab、DXM 能显著改善脓毒血症小鼠心肌、骨骼肌细胞 ATP 储存。

关键词: 脓毒症; 地塞米松/药理学; 疾病模型, 动物; 腺苷三磷酸; 抗体, 白细胞介素; 抗体, 肿瘤坏死因子; 抗体, 干扰素

中图分类号: R6; 617 文章标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)06-0442-03

Influences of Antibody of Cytokine and Dexamethasone on the Content of ATP in Myocardium and Skeletal Muscle of Sepsis Mice

OUYANG Bin¹, WANG Ji-fu¹, WU Jue-heng², CHEN Min-ying¹, LIU Ren-bin¹, ZHANG Qing-xiu³

(1. Department of Surgery, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510080, China; 2. Centre of Molecular Medicine of Sun Yat-sen University of Medical Sciences; 3. Department of Biochemistry of Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510089, China)

Abstract: 【Objective】To observe the influences of antibody of cytokine and dexamethasone (DXM) on the content of ATP of myocardium in sepsis model. 【Methods】9 g/L NaCl, IL-1 β Ab, TNF α Ab, IFN γ Ab, IL-1 β Ab+TNF α Ab+IFN γ Ab, and DXM was injected into sepsis model of cecum ligation puncture (CLP) respectively. The content of ATP in myocardium and skeletal muscle was observed in each group. 【Results】① The content of ATP in myocardium and skeletal muscle was very low in the CLP group. ② IL-1 β Ab and TNF α Ab increased the ATP content of myocardium and/or skeletal muscle in CLP mice in some content. IFN γ Ab, IL-1 β Ab+TNF α Ab+IFN γ Ab and DXM made the ATP content increased more obviously. DXM made the ATP content increased 6~8 times compared with that of CLP group. 【Conclusions】DXM and IFN γ Ab increased the content of ATP of myocardium and skeletal muscle obviously in sepsis mice.

Key words: sepsis; dexamethasone/pharmacology; disease model, animal; adenosine triphosphate; antibodies, interleukin-1; antibodies, tumor necrosis factor; antibodies, interferon

腹腔感染所致脓毒血症在外科急症中发生率 达 7%~11%, 因其全身炎症反应失控往往使病情

收稿日期: 2000-06-08

基金项目: 中山医科大学青年科研基金资助项目(9824)

作者简介: 欧阳彬(1966-), 女, 湖南宁乡人, 医学博士, 讲师

© 1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

迅猛发展很快导致死亡。不少研究已表明阻断全身炎症反应能提高脓毒血症的生存率^[1], 本研究观察比较使用不同细胞因子抗体或地塞米松后, 脓毒血症模型小鼠心肌及骨骼肌细胞腺苷三磷酸(ATP)含量的变化, 以探索阻断全身炎症反应对不同组织细胞能量代谢的影响。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

雄性昆明鼠 200 只, 鼠龄 5 周, 体质量(12 ± 2.5) g。由中山医科大学实验动物中心提供及饲养。

1.2 试剂及仪器

1.2.1 主要试剂 白介素-1 β 抗体(IL-1 β Ab)、肿瘤坏死因子 α 抗体(TNF α Ab)、干扰素 γ 抗体(IFN γ Ab); Synergen Co。地塞米松(DXM); 中国海普药厂。ATP 标准品; Sigma Co。ID 4.6 mm × 300 mm × 5 μ m C₁₈ 色谱柱及 150 mmol/L 的磷酸氢二钾流动相; HYPERSIL BDS Co。

1.2.2 主要仪器 反相高效液相色谱分析系列: 510 泵, 810 工作站和 486 紫外探测器(waters company)。800 型离心沉淀器($r = 15$ cm, 上海手术器械厂)。

1.3 实验方法

1.3.1 实验设计 实验分 8 组: ①正常组(normal group, $n = 30$), ②假手术组(sham group, $n = 20$), ③CLP 模型组(CLP group, $n = 40$), ④IL-1 β Ab 组(IL-1 β Ab group, $n = 20$), ⑤TNF α Ab 组(TNF α Ab group, $n = 20$), ⑥IFN γ Ab 组(IFN γ Ab group, $n = 20$), ⑦IL-1 β Ab + TNF α Ab + IFN γ Ab 组(IL-1 β Ab + TNF α Ab + IFN γ Ab group, $n = 20$) 和 ⑧DXM 组(DXM group, $n = 30$)。正常组小鼠不作特殊处理, 假手术组小鼠在开腹找到盲肠后即关腹, 其余 5 组参照 Wichterman 等^[2] 小鼠盲肠结扎穿孔模型(CLP)制作方法制作脓毒血症模型。所有各组小鼠在实验开始前 12 h 和实验结束后 18 h 禁食不禁水, 实验完毕立即皮下注射容积均为 0.3 mL 的生理盐水、相应抗体 10 μ g/g^[3] 或 DXM 10 μ g/g。18 h 后, 留取小鼠心肌及骨骼肌标本, 提取 ATP, 用反相高效液相色谱法分析 ATP 含量。

1.3.2 小鼠盲肠结扎穿孔动物模型制作^[2] 模型制作前禁食 12 h, 10 g/L 戊巴比妥钠按 50 ~ 60 mg/kg 皮下注射麻醉, 腹正中切口 2 cm, 离盲肠出

口 1.5 cm 处用 4 号线结扎, 用 14G 套管针将盲肠贯通穿孔, 还纳肠管于腹腔, 间断缝合腹壁。术后皮下注射生理盐水或相应试剂 0.3 mL, 禁食不禁水。

1.3.3 心肌及骨骼肌标本留取 乙醚麻醉, 先取右侧股前骨骼肌肌群, 称量 200 ~ 300 mg, 置预冷试管中。后切开心包取出心脏, 迅速祛除心外膜及血管, 将心肌及骨骼肌于预冷试管中立即液氮冻存。并于随后探查确实盲肠坏死和腹腔感染。

1.3.4 ATP 含量测定 取出置液氮中冻存的心肌及骨骼肌标本, 电子天平精确称量记录后放回液氮, 移入 4 $^{\circ}$ C 冰库继续实验。将待测标本 1 份置预冷匀浆管内, 按 0.3 L/50 g 加入 0.4 mol/L 的高氯酸, 充分匀浆, 取上清液于 0 ~ 4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min 离心 15 min, 再提取上清液, 用 0.5 mol/L 的 KOH 中和使 pH 达到 7.5 ~ 8.0, 再次 10 000 r/min 离心 5 min, 留上清液冻存待检取所提取液 30 μ L, 反相高效液相色谱法分析 ATP 含量, 以 150 mmol/L 的磷酸氢二钾缓冲溶液(pH=6.25)为流动相, 采用 BD-SC₁₈ 不锈钢色谱柱, 紫外检测波长 254 nm, 流速 0.5 ml/min, 其 ATP 的检出限为 0.019 μ mol^[4]。ATP 最终结果以每克组织湿重的含量表示(μ mol/g)。

1.4 统计方法

SPSS 软件完全随机设计单因素方差分析比较各实验组心肌及骨骼肌细胞 ATP 含量。

2 结 果

2.1 CLP 模型组及正常组、假手术组小鼠心肌及骨骼肌 ATP 含量

CLP 模型小鼠心肌及骨骼肌细胞内 ATP 严重减少(0.10 ± 0.029, 0.21 ± 0.033) μ mol/g, 约为假手术组的 1/20(表 1)。

2.2 IL-1 β Ab、TNF α Ab 组小鼠心肌及骨骼肌细胞 ATP 含量

IL-1 β Ab 使心肌 ATP 含量增加(0.19 ± 0.01) μ mol/g, TNF α Ab 使心肌及骨骼肌 ATP 含量增加(0.19 ± 0.021, 0.32 ± 0.018) μ mol/g, 但程度均较轻(表 1)。

2.3 IFN γ Ab、IL-1 β Ab + TNF α Ab + IFN γ Ab, 以及 DXM 组小鼠心肌、骨骼肌细胞 ATP 含量

IFN γ Ab、IL-1 β Ab + TNF α Ab + IFN γ Ab, 以及 DXM 使 CLP 模型小鼠心肌及骨骼肌 ATP 含量增加较为明显, 其中 DXM 使 CLP 模型心肌、骨骼肌

表 1 各组小鼠心肌及骨骼肌 ATP 含量

Table 1 The content of ATP in myocardium and skeletal muscle of mouse in each group

b (ATP)/ ($\mu\text{mol/g}$)	Normal	Sham	CLP	IL-1 β Ab	TNF α Ab	IFN γ Ab	IL-1 β Ab+TNF α Ab+IFN γ Ab	DXM
Myocardium	3.69 \pm 0.027	2.39 \pm 0.031	0.10 \pm 0.029	0.19 \pm 0.017 ¹⁾	0.19 \pm 0.021 ¹⁾	0.36 \pm 0.031 ²⁾	0.26 \pm 0.031 ²⁾	0.88 \pm 0.017 ³⁾
Skeletal muscle	5.36 \pm 0.028	4.31 \pm 0.087	0.21 \pm 0.033	0.29 \pm 0.025	0.32 \pm 0.018 ¹⁾	0.41 \pm 0.029 ²⁾	0.43 \pm 0.018 ²⁾	1.20 \pm 0.007 ³⁾

1) Compared with CLP group, $P < 0.05$; 2) Compared with CLP group, $P < 0.01$; 3) Compared with CLP group, $P < 0.001$

细胞 ATP 含量增加 6 ~ 8 倍, 达 (0.88 \pm 0.017, 1.20 \pm 0.007) $\mu\text{mol/g}$ (表 1)。

3 讨论

3.1 CLP 模型小鼠心肌及骨骼肌细胞 ATP 含量

CLP 模型为一经典的腹腔感染脓毒症模型, 其死亡率达 80% 以上, 本文结果表明 CLP 模型小鼠心肌及骨骼肌细胞内 ATP 含量严重减少。正常内稳态环境下, 细胞内 ATP 的生成和消耗保持平衡, 维持细胞一定的 ATP 含量以保证细胞功能正常发挥, 而脓毒症时, 一方面 ATP 消耗增加, 另一方面毒素及细胞因子的大量释放使 ATP 生成减少和 ADP 获取能量转变成 ATP 障碍, 细胞内 ATP 储存严重减少而导致细胞功能障碍或死亡^[3]。

3.2 TNF α 、IL-1 β 、IFN γ 与脓毒症心肌及骨骼肌细胞的能量代谢

近年来的体外试验已表明细胞因子可通过多种途径影响细胞能量代谢, Schmidli^[6] 将 TNF α 、IL-1 β 和 IFN γ 与鼠胰岛朗格汉斯细胞共同培养, 发现 TNF α 、IL-1 β 和 IFN γ 能使谷氨酰胺脱羧酶的生物合成减少; Lewis^[7] 的研究表明: IFN 使线粒体内的电子传递酶系活力下降; 最近, Boekstegers^[8] 还发现 TNF α Ab 可以逆转 TNF α 对心肌细胞能量代谢的破坏。以上体外实验表明 IL-1 β 、IFN γ 、TNF α 与细胞能量代谢关系密切, 本研究观察和比较 IL-1 β Ab、IFN γ Ab、TNF α Ab 在脓毒症小鼠活体内使用对细胞能量代谢是否仍有影响, 结果表明体内投入细胞因子抗体能在一定程度上逆转脓毒症对心肌和骨骼肌细胞能量代谢的破坏, 其中 IFN γ Ab 的作用较为显著。

3.3 DXM 对 CLP 模型小鼠心肌及骨骼肌细胞能量代谢的影响

1993 年 Barber^[9] 给 23 个健康人注射内毒素并使用 DXM, 发现将 DXM 与 LPS 同时或预先给予,

能使外周血 C-反应蛋白、肾上腺素和 TNF 浓度明显降低; 1997 年 Chang 等^[10] 的研究表明: DXM 能抑制肝细胞核因子 KB 的激活至对照组的 23%, 减少循环中 TNF 浓度至对照组的 50%, 并使肝脏磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶的生成量出现明显减少。本文的研究表明, DXM 在 CLP 模型制作后即时给予能使心肌、骨骼肌细胞 ATP 含量明显增加, 且作用较 IL-1 β Ab、TNF α Ab、IFN γ Ab 更为显著, 可能因为 DXM 是一个作用更为广泛的抗炎因子, 更为全面地抑制了炎症反应的发生, 从而较单一使用细胞因子抗体更有效改善小鼠脓毒症模型细胞能量代谢。

参考文献:

- [1] Hinshaw L B, Tekamp-Olson P, Chang A C K, *et al.* Survival of primates in LD₁₀₀ septic shock following therapy with antibody to tumor necrosis factor(TNF α)[J]. *Circulatory Shock*, 1990, 30(3): 279.
- [2] Wichterman K A, Baue A E, Chaudry I H. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal [J]. *J Surg Res*, 1980, 29(2): 189.
- [3] Exley A R, Cohen J, Burman W, *et al.* Monoclonal antibody to TNF in severe septic shock[J]. *Lancet*, 1990, 335(5): 1275.
- [4] 吴珏珩, 汤丽芬, 谭炳炎, 等. 用反相高效液相色谱法测定小鼠心肌、骨骼肌中 ATP、ADP、AMP 的含量[J]. *分析测试学报*, 1999; 18(4): 55.
- [5] Mizobata Y, Prechek D, Rounds J D, *et al.* The duration of infection modifies mitochondrial oxidative capacity in rat skeletal muscle[J]. *J Surg Res* 1995, 59(1): 165.
- [6] Schmidli R S, Faulkner J B E, Harrison L C, *et al.* Cytokine regulation of glutamate decarboxylase biosynthesis in isolated rat islets of Langerhans[J]. *Biochem J*, 1996, 317(pt 3): 713.
- [7] Lewis J A, Huq A, Najarro P. Inhibition of mitochondrial function by interferon[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(22): 13184.

(下转第 447 页)

个片段,大小约3 000 bp和6 700 bp,表明重组质粒是由pMAL-p2和EB病毒DNA多聚酶基因组成(图2)。

3 讨论

3.1 PCR扩增长片段DNA方法的探讨

传统PCR技术只能扩增2~3 kb以内短片段,更长者则难以有效扩增。关于EB病毒DNA多聚酶基因的完整扩增国内尚未见报道。我们通过多次试验,反复摸索,终于扩增出了长达3 044 bp的完整EB病毒DNA多聚酶基因。以下几点是关键:①模板DNA必须高度纯化;②应在缓冲液中加入一定量的甘油以提高聚合酶的稳定性;③选用错配率较低的耐热DNA聚合酶,本试验选用具有3'~5'外切酶活性的Pfu酶和5'~3'外切酶活性的rTth酶,两种酶混合使用,有效地纠正了复制过程中的错配;④热循环参数的设置亦很重要,本实验采用较高退火温度,延伸时间也较长,且从第10个循环开始每个循环延伸时间逐次延长5 s,从而有效地防止了非特异性扩增。

3.2 如何选择高效表达载体

本试验选用的pMAL-P2质粒为M13和PBR322组装,含有一个可调控的强启动子,有指导高效翻译的S-D序列和抗插入移码的AUG序列,能在原核细胞中高效表达外源基因。它的另一个特点是含有Plac-lacZ组件(多聚接头),通过选用相应的LacZ基因型的TB1菌,就可利用蓝-白斑筛选阳性菌落。pMAL-p2的一个最显著的特点是虽然表达蛋白率仅占细菌总蛋白量的5%~10%,但它能将融合蛋白分泌到细胞外,使其免遭宿主细胞蛋白酶的降解,亦使蛋白纯化操作变得简单易行。

3.3 构建EB病毒DNA多聚酶基因表达载体的意义

鼻咽癌为中国南方高发恶性肿瘤,其发生、发

展及转归与EB病毒密切相关。有关EB病毒的各种抗原抗体反应在鼻咽癌患者与正常人群之间差别很大,而且出现早于病理确诊。本试验成功地构建了EB病毒DNA多聚酶基因表达载体,为进一步在体外大批量生产高纯度的EB病毒DNA多聚酶蛋白,进而以该酶蛋白作为抗原,建立更敏感和特异的EB病毒血清学诊断方法奠定了基础。

参考文献:

- [1] Old L J, Boyse A E, Dettgen H F, *et al.* Precipitation antibody in human serum to an antigen present in cultured Burkitts lymphoma cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 56: 1699.
- [2] Stolzenberg M G, Debouze S, Ng M, *et al.* Purified recombinant EBV deoxyribonuclease in serological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 1996, 66(3): 337.
- [3] Vokes E E, Liebowitz D N, Weichselbaum R R. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 1997, 350(9084): 1087.
- [4] Bear R, Bankier A T, Biggin M, *et al.* DNA sequence and expression of the B95.8 Epstein-Barr virus genome [J]. *Nature*, 1984, 310: 207.
- [5] Feinmesser R, Miyazaki I, Cheung R, *et al.* Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification of tissue obtained by fine needle aspiration [J]. *Engl J Med*, 1992, 326(1): 17.
- [6] Smith-Vaughan H C, Sriprakash K S, Mathews J D, *et al.* Long PCR-Ribotyping of nontypeable haemophilus influenzae [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33: 1192-1195.
- [7] Banes W M. PCR amplification of up to 35kb DNA with fidelity and high yield from λ bacteriophage templates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(3): 2216.
- [8] 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆(实验指南)[M]. 金冬雁, 黎孟枫, 候云德, 等主译. 第2版. 北京: 科学技术出版社, 1992. 1~1062.
- [9] 彭秀玲, 袁汉英, 谢毅, 等. 基因工程实验技术[M]. 第2版. 湖南: 科学技术出版社, 1998. 1~213.

(编辑 刘清海)

(上接第444页)

- [8] Boekstegers P, Kainz I, Giehl W, *et al.* Subchronic exposure of cardiomyocytes to low concentrations of TNF attenuates the positive inotropic response not only to catecholamines but also to cardiac glycosides and high calcium concentrations [J]. *Mol Cell Biochem*, 1996, 156(2): 135.
- [9] Barber A E, Coyle S M, Marano M A, *et al.* Glucocor-

ticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man [J]. *J Immunol*, 1993, 150(5): 1999.

- [10] Chang C K, Llanes S, Schurer W. Effect of dexamethasone on NF KB activation tumor necrosis factor formation and glucose dyshomeostasis in septic rats [J]. *J Surg Res*, 1997, 72(2): 141.

(编辑 张敏瑞)