

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.007

番茄红素对脓毒症大鼠免疫及炎症因子的影响*

王 涵,伍志超

(四川省南充市中心医院麻醉科,四川 南充 637000)

摘要:目的 探讨番茄红素对脓毒症大鼠免疫及炎症细胞因子的影响。方法 将30只SD大鼠随机分为对照组、模型组、处理组,每组10只。处理组大鼠以番茄红素预处理2h后腹腔注射内毒素,模型组大鼠腹腔注射内毒素制备脓毒症模型后给予等量生理盐水,对照组大鼠给予等量生理盐水。6h后采血,检测各组大鼠外周血中 CD_3^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+ T细胞百分比及白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)水平,采血后将其处死,并取肺组织行苏木精-伊红(HE)染色。结果 与对照组相比,模型组大鼠外周血中 CD_4^+ T细胞百分比及IL-6、TNF- α 、MDA水平均显著升高($P < 0.05$), CD_3^+ 、 CD_8^+ T细胞百分比及SOD水平显著降低($P < 0.05$);与模型组相比,处理组大鼠外周血中 CD_4^+ T细胞百分比及IL-6、TNF- α 、MDA水平均显著降低($P < 0.05$), CD_3^+ 、 CD_8^+ T细胞百分比及SOD水平均显著升高($P < 0.05$);与对照组相比,处理组大鼠外周血中 CD_3^+ 、 CD_8^+ 、 CD_4^+ T细胞百分比及SOD、MDA、IL-6、TNF- α 水平均有显著差异($P < 0.05$);HE染色显示,处理组大鼠肺泡结构、肺泡间隔、肺间质充血水肿、中性粒细胞浸润较模型组均有明显改善。结论 番茄红素能有效降低脓毒症大鼠氧化应激反应,抑制炎症细胞因子产生,减轻肺组织损伤,但对脓毒症发病机体免疫功能异常改变的作用不明显。

关键词:番茄红素;脓毒症;氧化应激;免疫细胞;炎症细胞因子;肺损伤;大鼠

中图分类号:R932;R285.5

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)11-0026-04

Effect of Lycopene on Immunity and Inflammatory Cytokines in Sepsis Rats

WANG Han, WU Zhichao

(Department of Anesthesiology, Nanchong Central Hospital, Nanchong, Sichuan, China 637000)

Abstract: Objective To investigate the effect of lycopene on immunity and inflammatory cytokines in sepsis rats. **Methods** A total of 30 SD rats were randomly divided into the control group, model group and treatment group, 10 rats in each group. The treatment group was pretreated with lycopene for 2 h, and then injected with endotoxin. The model group was injected with endotoxin to prepare a sepsis model, and then injected with equal amount of normal saline. The control group was given the same amount of normal saline. After 6 h, the percentage of CD_3^+ , CD_8^+ , CD_4^+ T cells and interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), malondialdehyde (MDA) and superoxide dismutase (SOD) levels in peripheral blood of each group were detected. Pathological changes of lung tissue in each group were observed by Hematoxylin Eosin (HE) staining after execution. **Results** Compared with the control group, the percentage of CD_4^+ T cells and IL-6, TNF- α , and MDA levels in the peripheral blood of the model group were significantly increased ($P < 0.05$), and the percentages of CD_3^+ , CD_8^+ T cell and the level of SOD were significantly reduced ($P < 0.05$); compared with the model group, the percentage of CD_4^+ T cells and IL-6, TNF- α , MDA levels in the peripheral blood of the treatment group were significantly reduced ($P < 0.05$), and the percentages of CD_3^+ , CD_8^+ T cells and the level of SOD were significantly increased ($P < 0.05$); compared with the control group, the percentages of CD_3^+ , CD_8^+ , CD_4^+ T cells and the level of SOD, MDA, IL-6, and TNF- α were significantly different ($P < 0.05$); HE staining showed that the alveolar structure, alveolar interval, pulmonary interstitial congestion and edema, and neutrophil infiltration in the treatment group had significantly improved compared with the model group. **Conclusion** Lycopene can effectively reduce the oxidative stress response of septic rats, inhibit the production of inflammatory cytokines, and alleviate lung tissue damage; but it has no obvious effect on the abnormal changes of immune function in the body with sepsis.

Key words: lycopene; sepsis; oxidative stress; immune cells; inflammatory cytokines; lung injury; rats

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征(SIRS),发病率高,病死率高,进一步发展可导致多器官功能不全综合征(MODS),进而危及生命^[1-2]。免疫细胞功能紊乱和炎症细胞因子失衡在脓毒血症器官损伤中扮演重要角色,并影响预后^[3]。番茄红素具有清除自由基、抗氧化、调节免疫细胞活化和细胞因子分泌等多种药理活性^[4],可减轻脓毒血症大鼠心肌纤维损伤,维持内皮系统平衡^[5]。本研究中探讨了番茄红素对脓毒症大

鼠免疫及炎症细胞因子的影响,为临床治疗脓毒症提供实验依据。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

仪器:T12MM型离心机(湖南赫西仪器装备有限公司);Gallios型流式细胞仪(中国贝克曼库尔特商贸有限公司);乙醇(北京华阜康生物科技股份有限公司);二甲苯(湖北广奥生物科技有限公司);苏木素、伊红(上海源

*基金项目:2017年四川省南充市市级应用技术与开发资金项目[17YFZJ0051]。

第一作者:王涵,女,硕士研究生,副主任医师,研究方向为器官保护,(电子信箱)45107137@qq.com。

叶生物科技有限公司);中性树胶封片剂(美国 National Diagnostics 公司);Ni Ci E100 E200 型显微镜(上海千欣仪器有限公司);IL-6 测定试剂盒(北京冬歌生物科技有限公司);TNF- α 测定试剂盒(深圳市科润达生物工程有限公司);MDA 测定试剂盒(上海创赛科技有限公司);SOD 测定试剂盒(上海仁捷生物科技有限公司)。

试药:戊巴比妥钠(天津兴隆化学制药厂);生理盐水(江苏鹏鹞药业有限公司);内毒素(上海甄准生物科技有限公司)。

动物:SD 大鼠 30 只,SPF 级,健康,雄性,周龄 8~10 周,体质量(280 ± 20)g,购于上海灵畅生物科技有限公司,生产许可证号 SCXK(沪)2018-0003。饲养于动物实验独立通气笼中(每笼 5 只),室温维持在 $22 \sim 25^\circ\text{C}$,相对湿度维持在 50%~60%,所有大鼠每天接受 12 h 光照,采用同种无菌饲料投喂,不限制饮水,适应性喂养 7 d。

1.2 分组、造模及处理

将 30 只 SD 大鼠分为对照组、模型组、处理组,每组 10 只。各组大鼠腹腔注射 45 mg/kg 戊巴比妥钠予以麻醉,处理组尾静脉注射 50 mg/kg 番茄红素^[5],对照组及模型组大鼠尾静脉注射等量生理盐水,2 h 后模型组及处理组大鼠腹腔注射 20 mg/kg 内毒素(上海甄准生物科技有限公司),对照组大鼠腹腔注射等量生理盐水。造模成功标准参照文献^[5]。

1.3 观察指标

白细胞介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平:注射 6 h 后采集各组大鼠外周静脉血 4 mL,置 T12MM 型离心机(湖南赫西仪器装备有限公司),3 000 r/min 离心 20 min,分离血清,采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测各

组大鼠血清中的 IL-6 和 TNF- α 含量,采用硫代巴比妥酸法检测血清 MDA 水平,采用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 水平。

免疫细胞数量:采集 3 组大鼠外周血各 2 mL,用肝素抗凝,采用流式细胞仪检测外周血中 CD_3^+ , CD_8^+ , CD_4^+ T 细胞百分比。

肺组织病理变化:3 组大鼠采血后,将其处死,取肺组织,10% 甲醛溶液固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋成块,切成 5 μm 连续切片,脱蜡水化,苏木素染色,流水冲洗,伊红染色,流水冲洗,烤片,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片剂封片,显微镜观察苏木精-伊红(HE)染色结果。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析。各组大鼠外周血中 CD_3^+ , CD_8^+ , CD_4^+ T 细胞百分比及 IL-6, TNF- α , SOD, MDA 水平比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

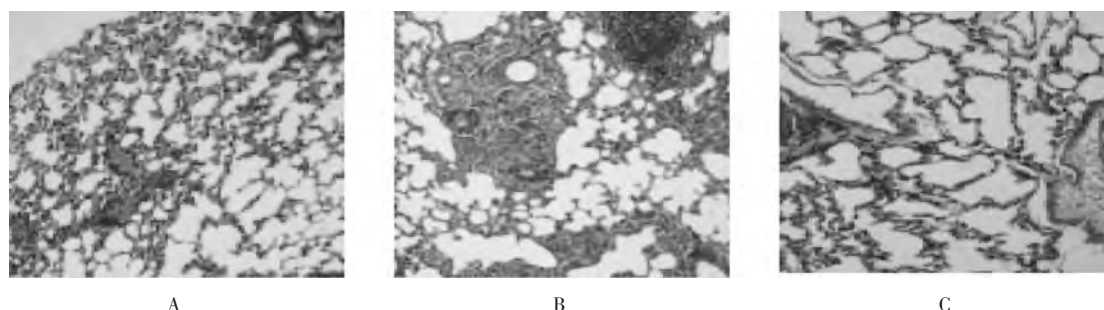
2 结果

2.1 肺组织病理变化

对照组大鼠肺泡结构清晰完整,肺泡间隔正常,肺间质无充血水肿,无中性粒细胞浸润;模型组大鼠肺泡结构紊乱,肺泡间隔明显增宽,肺间质有明显充血水肿,部分肺不张,有大量中性粒细胞浸润;处理组大鼠肺泡结构基本完整,肺泡间隔增宽,肺间质充血水肿明显改善,中性粒细胞浸润明显减少。模型组较对照组肺组织病理损伤明显,处理组较模型组肺组织病理改善明显。详见图 1。

2.2 外周血检测指标

结果见表 1。



A. 对照组 B. 模型组 C. 处理组
图 1 3 组大鼠肺组织病理变化(HE 染色, $\times 200$)

表 1 3 组大鼠外周血中免疫细胞数量、炎症因子含量、SOD 及 MDA 水平比较($\bar{X} \pm s$, $n = 10$)

组别	CD_3^+ T 细胞(%)	CD_4^+ T 细胞(%)	CD_8^+ T 细胞(%)	IL-6(ng/mL)	TNF- α (ng/mL)	SOD(U/mL)	MDA(nmol/mL)
对照组	37.25 ± 6.98	19.88 ± 1.45	16.77 ± 6.65	26.38 ± 2.31	195.70 ± 10.97	183.55 ± 13.57	4.11 ± 0.70
模型组	27.09 ± 6.02 ^①	25.32 ± 2.05 ^①	10.23 ± 4.86 ^①	33.02 ± 3.05 ^①	230.89 ± 18.45 ^①	132.19 ± 10.23 ^①	10.83 ± 1.68 ^①
处理组	34.12 ± 6.13 ^{①②}	22.11 ± 1.87 ^{①②}	14.46 ± 5.56 ^{①②}	28.11 ± 2.52 ^{①②}	201.32 ± 11.09 ^{①②}	168.12 ± 12.41 ^{①②}	7.22 ± 1.31 ^{①②}

注:与对照组相比, ^① $P < 0.05$;与模型组相比, ^② $P < 0.05$ 。

3 讨论

脓毒症为重症监护病房常见危重症,常见于多发伤、严重烧伤、重症肺炎、外科手术等患者,也可见于再生障碍性贫血、白血病、糖尿病、慢性阻塞性支气管炎、尿路结石等慢性疾病患者^[6]。70%的脓毒症患者早期表现为意识状态改变、低血压、组织灌注不良等休克症状,随着病情进展可导致 MODS^[2]。全身炎症反应与代偿性抗炎反应协调失衡是发病的核心机制^[3],故寻找一种能有效调节免疫细胞和炎症细胞因子失衡的物质对于控制脓毒症病情具有重要意义。

番茄红素是一种天然的红色开链烃类胡萝卜素,由11个共轭双键和2个非共轭双键组成,目前主要通过植物提取、化学合成和微生物发酵获得,具有抗肿瘤、抗氧化、调节血脂、提高免疫力、保护心脑血管等作用^[4]。番茄红素与急性心肌梗死及心源性猝死相关^[7];能修复受损衰老的胰岛细胞,促使胰岛素正常分泌^[8];能增强小鼠单核巨噬细胞作用及体液免疫和细胞免疫功能^[9]。

T淋巴细胞亚群测定有助于了解机体免疫状况及病情监测,CD₃⁺反映总T细胞,通过盐桥与T细胞抗原受体相连,进而参与T细胞信号转导^[10];CD₄⁺主要表达于辅助T细胞,辅助T细胞免疫效应,诱导B淋巴细胞分化产生抗体,调节杀伤淋巴细胞、自然杀伤细胞等活性^[11];CD₈⁺主要为细胞毒T细胞亚群,主要分布于抑制性和杀伤性T淋巴细胞表面,抑制B淋巴细胞功能,还对细胞内寄生生物感染的靶细胞有杀伤作用^[12]。本研究表明,与模型组相比,处理组大鼠外周血中CD₄⁺T细胞百分比显著降低,CD₃⁺、CD₈⁺T细胞百分比显著升高,表明番茄红素在脓毒症发病过程中对机体免疫功能异常改变的作用不明显,这可能是由于番茄红素在大鼠体内作用时间较短,其作用尚未体现的原因。

IL-6和TNF- α 为诱导机体炎症反应的重要炎症因子,在炎症发生时,其在血液中的水平迅速发生改变。TNF- α 是一种单核因子,主要产生于巨噬细胞,具有参与局部炎症、杀伤靶细胞、调控内皮细胞活化、促进细胞凋亡的作用^[13]。IL-6是由活化的T细胞和成纤维细胞产生的淋巴因子,能增强NK细胞裂解功能,使B细胞前体成为产生抗体的细胞^[14-15]。本研究表明,处理组大鼠外周血中IL-6及TNF- α 水平均显著低于模型组;处理组大鼠肺泡结构、肺泡间隔、肺间质充血水肿、中性粒细胞浸润较模型组均有明显改善,表明番茄红素能有效降低炎症细胞因子水平,减轻脓毒症大鼠肺组织病理损伤。

脓毒血症释放的内毒素可增加活性氧及自由基产生,而活性氧及自由基产生是脓毒血症致肺损伤的重要环节。同时,内毒素引起的炎症反应可诱发氧化应激,可

进一步加强炎症反应,从而使免疫细胞比例紊乱和炎症细胞因子失衡得不到控制^[5]。因此,提高机体抗氧化能力有助于改善机体炎症。本研究表明,处理组大鼠外周血中MDA水平显著低于模型组,但SOD水平显著高于模型组,表明抗氧化作用最强的类胡萝卜素-番茄红素可有效降低内毒素引起的氧化应激反应,从而降低炎症反应,并减轻组织损伤。

综上所述,番茄红素能有效降低脓毒症大鼠氧化应激反应,抑制炎症细胞因子产生,减轻肺组织病理损伤,但其在脓毒症发病过程中对机体免疫功能异常改变的作用不明显,且番茄红素为预先注入大鼠体内,因此番茄红素在脓毒症发病过程中对机体免疫功能的作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 姚咏明,张艳敏. 脓毒症发病机制最新认识[J]. 医学研究生学报,2017,10(7):127-131.
- [2] 董丽华,吕娟,丁黎莉,等. 脓毒症免疫治疗的研究进展[J]. 中华危重病急救医学,2017,29(2):184-187.
- [3] 周洁,肖国辉. 辛伐他汀联合早期目标导向治疗对重症脓毒症患者免疫细胞及细胞因子的影响[J]. 湖南师范大学学报(医学版),2018,21(2):235-239.
- [4] 赵二劳,闫唯,郝丽琴,等. 番茄红素提取技术及其功能活性研究进展[J]. 食品研究与开发,2017,23(8):198-202.
- [5] 杨涛,姜玉新,李伟,等. 番茄红素对脓毒血症大鼠心肌损伤的影响[J]. 皖南医学院学报,2017,35(5):121-127.
- [6] 曾文美,毛璞,黄勇波,等. 脓毒症预后影响因素分析及预后价值评估[J]. 中国中西医结合急救杂志,2015,5(2):118-123.
- [7] 李依麦,张玮,王晓玲,等. 番茄红素对大鼠心肌梗死后心功能及心肌细胞凋亡的影响[J]. 武汉大学学报(医学版),2016,1(2):187-190.
- [8] 张海峰. 番茄红素对实验性糖尿病大鼠肾脏保护作用的研究[J]. 现代中西医结合杂志,2015,11(25):356-359.
- [9] PANG KY, WU JQ, WANG ZJ, et al. Optimization of extraction of Lycopene from fermentation by *Blakeslea trispora*[J]. Journal of East China University of Science & Technology, 2016, 20(3): 321-325.
- [10] JESINGHAUS M, STEIGER K, SLOTTAHUSPENINA J, et al. Increased intraepithelial CD₃⁺T-lymphocytes and high PD-L1 expression on tumor cells are associated with a favorable prognosis in esophageal squamous cell carcinoma and allow prognostic immunogenic subgrouping[J]. Oncotarget, 2017, 8(29): 46756-46768.
- [11] ARATA T, TAKASHI S. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD₄⁺T Cells, Their Differentiation and Function[J]. Frontiers in Immunology, 2017, 8(4):209-213.
- [12] RIVINO L, LIM MQ. CD₄⁺ and CD₈⁺T cell immunity to Dengue - lessons for the study of Zika virus[J]. Immunology, 2016, 30(6):