

超短波对大鼠急性肺损伤炎症反应的影响

<https://doi.org/j.issn.2095-4344.2953>

2095-4344.2953

投稿日期: 2020-04-01

送审日期: 2020-04-09

采用日期: 2020-05-13

在线日期:

中图分类号:

R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2020)00-00000-07

文献标识码: A

廖源^{1, 2, 3}, 屈萌根^{2, 3, 4}, 刘静^{2, 3}, 钟培瑞^{2, 3}, 曾亚华^{2, 3}, 王婷^{2, 3}, 肖豪^{2, 3}, 李兰^{2, 3}, 刘丹妮^{2, 3}, 杨璐^{2, 3}, 周君^{2, 5, 6}

文章快速阅读:

文章特点一

观察超短波对大鼠急性肺损伤炎症反应的影响及炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 表达的影响。

分组:

(1) 对照组
(2) 急性肺损伤组;
(3) 超短波组 (急性肺损伤 + 超短波治疗)。

检测:

(1) 肺组织病理学半定量评分;
(2) 肺组织湿/干质量比值;
(3) 血清炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 水平;
(4) 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 的 mRNA 和蛋白表达水平。

文题释义:

急性肺损伤: 心源性以外的各种肺内、外致病因素导致的急性、进行性、缺氧性呼吸衰竭。急性肺损伤主要为肺泡上皮和毛细血管内皮细胞损伤, 表现为弥漫性肺间质及肺泡水肿, 发病时可导致急性呼吸功能障碍。急性肺损伤最严重的情况就是急性呼吸窘迫综合征。

超短波治疗: 是一种临床常用的物理因子治疗, 具有扩张血管、使血管壁通透性增高、改善血液循环、促进炎症吸收、减轻水肿、增强组织营养及加强局部组织代谢的生理效应。超短波常用于治疗感染性疾病, 有一定的抗炎作用。

摘要

背景: 超短波常用于肺部感染的对症治疗, 有一定抗炎作用。炎症反应失控是急性肺损伤的重要发病机制, 抑制炎症反应是控制急性肺损伤的重要策略。

目的: 观察超短波对大鼠急性肺损伤炎症反应的影响及炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 表达的影响。

方法: 24 只 3 月龄雄性 SD 大鼠随机分为对照组、急性肺损伤组、超短波组, 每组 8 只。急性肺损伤组与超短波组大鼠通过气管内滴注脂多糖复制急性肺损伤模型, 对照组大鼠气管内滴注等量生理盐水。超短波组在大鼠滴注脂多糖即刻及滴注后 4, 8 h 给予超短波干预, 每次 15 min。24 h 后取材, 对大鼠肺组织进行苏木精-伊红染色, 肺组织病理学半定量评分和肺组织湿/干质量比值比较; ELISA 检测血清炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 水平, RT-PCR、Western-blot 分别检测肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 的 mRNA 和蛋白表达水平。实验方案经南华大学附属第一医院医学伦理委员会批准(批准号为 202002100009)。

结果与结论: ①肺组织湿/干质量比: 急性肺损伤组较对照组明显升高($P < 0.01$), 超短波组比急性肺损伤组降低, 但差异无显著性意义; ②病理表现: 急性肺损伤组大鼠肺组织结构破坏明显、肺泡隔大小不一, 肺泡壁不完整、变厚断裂, 肺间质可见大量中性粒细胞浸润和部分红细胞渗出; 超短波组肺泡结构相对完整清晰, 肺间质炎症细胞浸润及红细胞渗出减少; ③肺组织病理学半定量评分: 急性肺损伤组较对照组明显升高($P < 0.01$); 超短波组较急性肺损伤组明显降低($P < 0.01$); ④急性肺损伤组的血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 较对照组明显升高(均 $P < 0.01$), 超短波组较急性肺损伤组明显降低(均 $P < 0.05$); ⑤超短波组肺组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β mRNA 和蛋白较急性肺损伤组明显降低(均 $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); ⑥结果说明, 超短波可能通过下调炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 的表达, 抑制急性肺损伤大鼠肺组织的炎症反应。

关键词: 急性肺损伤; 超短波; 炎症反应; 因子; 模型; 鼠; 实验

Effects of ultrashort wave on inflammatory response in rats with acute lung injury

Liao Yuan^{1, 2, 3}, Qu Mengjian^{2, 3, 4}, Liu Jing^{2, 3}, Zhong Peirui^{2, 3}, Zeng Yahua^{2, 3}, Wang Ting^{2, 3}, Xiao Hao^{2, 3}, Li Lan^{2, 3}, Liu Danni^{2, 3}, Yang Lu^{2, 3}, Zhou Jun^{2, 5, 6}

¹ 广州中医药大学针灸康复临床医学院, 广东省广州市 510006; 南华大学附属第一医院, ² 康复医学科, ³ 康复医学实验室, 湖南省衡阳市 421001; ⁴ 美国克瑞顿大学, 美国奥马哈 68178; ⁵ 四川大学华西医院康复医学科, 四川省成都市 610041; ⁶ 康复医学四川省重点实验室, 四川省成都市 610041

第一作者: 廖源, 女, 1984 年生, 湖南省衡阳市人, 汉族, 广州中医药大学同等学力申请博士学位人员, 主治医师, 主要从事骨与关节康复、呼吸康复的临床与科研。

通讯作者: 周君, 博士, 副教授, 硕士生导师, 南华大学附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001

<https://orcid.org/0000-0002-1580-5747> (廖源)

基金资助: 湖南省自然科学基金项目 (2019JJ50544), 项目负责人: 刘静; 衡阳市科技局项目 (HKF201947209), 项目负责人: 曾亚华; 南华大学附属第一医院亚专科重点项目 (2017ZD007), 项目负责人: 周君

引用本文: 廖源, 屈萌根, 刘静, 钟培瑞, 曾亚华, 王婷, 肖豪, 李兰, 刘丹妮, 杨璐, 周君. 超短波对大鼠急性肺损伤炎症反应的影响 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(00):0000-0000.



¹Acupuncture and Rehabilitation College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China; ²Department of Rehabilitation Medicine, ³Laboratory of Rehabilitation Medicine, First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China; ⁴Creighton University, Omaha, NE 68178, USA; ⁵Department of Rehabilitation Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China; ⁶Sichuan Provincial Key Laboratory of Rehabilitation Medicine, Chengdu 610041, Sichuan Province, China

Liao Yuan, Attending physician, Acupuncture and Rehabilitation College of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zhou Jun, MD, Associate professor, Master's supervisor, Department of Rehabilitation Medicine, First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421001, Hunan Province, China

Abstract

BACKGROUND: Ultrashort wave can inhibit the inflammatory response and is often used in symptomatic treatment of pulmonary infection. Uncontrolled inflammatory response is an important pathogenesis of acute lung injury. Inhibiting inflammation is an important strategy for controlling acute lung injury. **OBJECTIVE:** To observe the effects of ultrashort wave on inflammatory response and the expression of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) in rats with acute lung injury.

METHODS: Twenty-four 3-month-old male Sprague-Dawley rats were randomly divided into control group, acute lung injury group (model group) and ultrashort wave group ($n=8$ per group). Rats in the acute lung injury group and the ultrashort wave group were given intratracheal lipopolysaccharide to replicate the acute lung injury model. Rats in the control group were given intratracheal infusion of the same amount of normal saline. In the ultrashort wave group, rats were given ultrashort wave intervention immediately, 4 and 8 hours after lipopolysaccharide infusion, once for 15 minutes. Experimental animals were sacrificed 24 hours after intratracheal infusion of lipopolysaccharide or normal saline. The lung tissues of rats were compared by hematoxylin-eosin staining, lung histopathological semi-quantitative score and lung wet/dry weight ratio (W/D). Serum levels of inflammatory factors TNF- α and IL-1 β were detected by ELISA, and mRNA and protein expressions of TNF- α and IL-1 β were detected by RT-PCR and western blot, respectively.

RESULTS AND CONCLUSION: Lung W/D ratio in the acute lung injury group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$), whereas the ratio in the ultrashort wave group was lower than that in the acute lung injury group, but there was no significant difference between the two groups. Pathological manifestations: In the model group, the lung tissue structure was obviously damaged, with different sizes of alveolar septa, the alveolar wall was incomplete, thickened and fractured, a large number of neutrophils were seen in the lung interstitium, and some red blood cells were exudated. In the ultrashort wave group, compared with the model group, the alveolar structure was relatively complete and clear, and the infiltration of inflammatory cells and red blood cell exudation from the lung interstitium were reduced. Semi-quantitative histopathological score of the lung was significantly higher in the model group than the control group ($P < 0.01$), but significantly reduced in the ultrashort wave group compared with the model group ($P < 0.01$). Serum TNF- α and IL-1 β levels in the model group were significantly higher than those in the control group (both $P < 0.01$). After ultrashort wave exposure, the levels of serum TNF- α and IL-1 β significantly decreased compared to the model group (both $P < 0.05$). After ultrashort wave exposure, the mRNA and protein expressions of TNF- α and IL-1 β significantly decreased compared to the model group ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). To conclude, ultrashort wave may inhibit the inflammatory response of the lung tissue in rats with acute lung injury by down-regulating the expression of inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β .

Key words: acute lung injury; ultrashort wave; inflammatory response; factor; model; rat; experiment

Funding: the Natural Science Foundation of Hunan Province, No. 2019JJ50544 (to LJ); the Project of Hengyang Science and Technology Bureau, No. HKF201947209 (to ZYH); Key Sub-Specialty Project of the First Affiliated Hospital of South China University, No. 2017ZD007 (to ZJ)

How to cite this article: LIAO Y, QU MJ, LIU J, ZHONG PR, ZENG YH, WANG T, XIAO H, LI L, LIU DN, YANG L, ZHOU J. Effects of ultrashort wave on inflammatory response in rats with acute lung injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(00):0000-0000.

0 引言 Introduction

急性肺损伤是临床上的常见急重症，是指心源性以外的各种肺内、外致病因素导致的急性、进行性、缺氧性呼吸衰竭。急性肺损伤主要为肺泡上皮和毛细血管内皮细胞损伤，表现为弥漫性肺间质及肺泡水肿，发病时可导致急性呼吸功能障碍。急性肺损伤最严重的情况就是急性呼吸窘迫综合征^[1]。急性肺损伤发病机制较为复杂，与各种临床疾病有关，能引起急性肺损伤的直接或间接病因达 100 多种^[2-3]，急性肺损伤起病急、病情重，多数患者病程较长，其标志性病理特征为肺部炎症和肺组织结构破坏，主要临床表现为低氧合和低肺顺应性。急性肺损伤的发病机制尚不明确，目前已知氧化应激及炎症反应失控是其发生、进展的重要机制^[4]。急性肺损伤的病死率高，虽然治疗措施较多，如机械通气疗法、舒血管药（一氧化氮、前列腺素）、表面活性剂、抗氧化剂、糖皮质激素、抗炎药等，但目前尚无特效药。

超短波治疗是一种简便、无创、无痛的物理疗法，具有扩张血管、使血管壁通透性增高、改善血液循环、促进炎症吸收、减轻水肿、增强组织营养及加强局部组织代谢的生理效应^[5]。超短波常用于炎症疾病的对症治疗，尤其在坠积性肺炎、小儿肺炎、慢性阻塞性肺疾病、骨关节炎等方面^[6-12]，其抗炎效果明显、治疗时间短，后续作用时间长，但其作用机制尚未明确。

此次研究拟探讨超短波对大鼠急性肺损伤炎症反应及炎症因子肿瘤坏死因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 表达的影响。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 时间及地点 实验于 2020-02-01/03-20 在南华大学动物实验部及南华大学附属第一医院中心实验室完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物 24 只 3 月龄体质量为 333-505 g 的清洁级雄性 SD 大鼠，从湖南省斯莱克景达实验动物有限公司购买，实验动物合格证号：SCXK(湘)2019-0004。实验大鼠饲养于湖南省衡阳市南华大学动物实验部，分笼饲养，予以自由摄食和饮水，饲养在温度 20-25℃，湿度 50%-60%，12 h 间隔照明的环境中，适应性饲养 1 周。在整个动物实验过程中，严格遵循中华人民共和国颁布的《实验动物管理条例》。

1.3.2 实验用主要试剂 脂多糖 (LPS, 北京 Solarbio 公司); 肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β ELISA 试剂盒 (Proteintech 公司); 1 mol/L Tris.HCl 溶液、1.5 mol/L Tris.HCl(pH 8.8) 溶液 (美国 Sigmagon 公司), 1.74 g/L PMSF 溶液、10%SDS 溶液 (中国大连美伦公司)、10% 过硫酸铵溶液 (中国上海国药公司)、30% Acr/Bic 液 (中国北京金泰宏达公司、美国 Sigma), 还原型 5% 上样缓冲液、电泳液缓冲液、转膜缓冲液 (美国 Sigma 公司), 10% 丽春红染液 (中国上海国药公司), TBS 缓冲液、PBST 缓冲液、封闭液 (中国盐城赛宝公司)。

1.3.3 主要仪器和设备 CDB-1 超短波电疗机 (上海医疗器械高技术公司生产); 台式冷冻离心机 (中国湖南湘仪公司); 全自动酶标洗板机 (深圳市汇松科技发展有限公司); 多功能酶标分析仪 (深圳市汇松科技发展有限公司); 电热恒温

培养箱 (北京市永光明医疗仪器有限公司); 奥林巴斯光学显微镜 (日本奥林巴斯株式会社); 切片机 (德国 LEICA 公司); 电泳仪、电泳槽、转膜仪 (中国北京六一公司); 旋涡混合器 (中国江苏其林贝尔公司); 磁力搅拌器 (中国雷磁公司); 生物样品均质仪 (中国杭州奥盛)。

1.4 实验方法

1.4.1 实验动物分组 由 SPSS 软件产生的随机数字表将 24 只大鼠随机分为 3 组, 每组 8 只: 对照组、急性肺损伤组、超短波组。各组大鼠体质量的比较见表 1。

表 1 | 各组大鼠体质量的比较 (x±s, g)
Table 1 | Body mass of rats

组别	体质量
对照组	413.00±55.19
急性肺损伤组	432.00±40.98
超短波组	437.14±30.13

表注: 各组大鼠之间体质量差异无显著性意义

1.4.2 实验动物造模 (参照文献方法^[13-17]) 实验大鼠称质量后, 取体积分数 10% 水合氯醛, 按 3 mL/kg 剂量腹腔注射麻醉大鼠, 大鼠仰卧位被固定在实验操作台上, 颈部备皮。消毒后沿颈部正中中线切开皮肤 0.5 cm 剥离皮下组织, 暴露气管, 用 1 mL 注射器刺入气管内按 5 mg/kg 缓慢滴注脂多糖 (质量浓度为 5 g/L), 滴注完毕将动物直立 5 s, 逐层缝合伤口, 再次络合碘消毒。对照组同样方法暴露气管, 滴注等体积生理盐水。

实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	观察超短波对大鼠急性肺损伤炎症反应的影响及炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 表达的影响
借鉴已有标准	参考文献方法复制急性肺损伤模型 ^[13-17]
施动物造模:	
动物来源及品系:	雄性 SD 大鼠, 购自湖南省斯莱克景达实验动物有限公司
造模技术描述:	麻醉大鼠, 消毒后沿颈部正中中线切开皮肤 0.5 cm 剥离皮下组织, 暴露气管, 用 1 mL 注射器刺入气管内按 5 mg/kg 缓慢滴注脂多糖 (质量浓度为 5 g/L), 滴注完毕将动物直立 5 s, 逐层缝合伤口, 再次络合碘消毒
造模主要诱导用药:	脂多糖 (5 g/L)
动物数量及分组方法:	24 只大鼠随机分为 3 组, 每组 8 只: 对照组、急性肺损伤组、超短波组
造模后实验观察指标:	①大鼠肺组织湿 / 干质量比 (W/D); ②大鼠肺组织苏木精 - 伊红染色及肺组织病理学半定量评分; ③大鼠血清炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 水平; ④大鼠肺组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 的 mRNA 及蛋白表达
造模后动物处理:	在气管内滴注脂多糖或生理盐水 24 h 后, 麻醉大鼠, 眼眶取血 4 mL 后, 处死实验动物, 取左下肺组织, 待检测
伦理委员会批准:	实验方案经南华大学附属第一医院医学伦理委员会批准 (批准号为 202002100009)

1.4.3 实验干预 对照组、急性肺损伤组不干预; 超短波组在大鼠滴注脂多糖即刻、4, 8 h 给予采用 CDB-1 超短波电疗机干预, 共干预 3 次。刺激强度为 50 mA, 电极板面积为 290 mm×200 mm, 工作频率为 40.68 MHz, 胸背对置, 2 个电极板之间距离为 11 cm, 预热 5 min, 干预 15 min/ 次。

1.4.4 标本采集及处理 (参照文献方法^[13-17]) 在气管内滴注脂多糖或生理盐水 24 h 后, 麻醉实验动物, 眼眶取血 4 mL 后, 处死实验动物。全血标本于室温放置 2 h, 于 4 °C 2 000×g 离心 15 min, 取上清, -80 °C 保存, 以备 ELISA 检测。病理标本: 取左下肺组织进行苏木精 - 伊红染色、病理评估; 取右上肺组织检测肺组织湿 / 干质量比值; 右下肺组织放入冻存管, 迅速转移至液氮罐中低温保存, 用于 RT-PCR 和 Western blot 检测。

1.4.5 肺组织湿 / 干质量比值测定 取出肺组织置于干净锡箔纸上, 马上用干净滤纸吸干肺组织表面水分, 然后将肺组织连同锡箔纸一起置于玻璃瓶中精确称质量后 (湿质量, W), 在将肺组织连同锡箔纸置于 60 °C 恒温箱中烘烤 48 h 后测定肺组织干质量 (D), 计算出肺组织湿 / 干质量比值评估肺组织水肿程度。

1.4.6 用苏木精 - 伊红染色进行病理学观察和肺组织病理半定量评分

(1) 苏木精 - 伊红染色: 将肺组织用石蜡进行包埋、切片, 脱蜡、复水; 滴加苏木精染色液染色, 清洗后返蓝, 再冲洗, 取伊红试剂染色, 晾干固定好, 通过实用光学显微镜观察各组肺组织病理学改变, 阅片结束后根据肺组织病理变化进行肺组织病理学评分进行分析。

(2) 肺组织病理学半定量评分标准^[18]: 4 项指标, ①肺泡充血; ②出血; ③肺泡腔或血管壁中性粒细胞浸润或聚集; ④肺泡壁增厚和 (或) 透明膜形成。分别依病变轻重评为 0-4 分: 0 分指无病变或非常轻微病变; 1 分为轻度病变; 2 分为中度病变; 3 分为重度病变; 4 分为极重度病变。总分 16 分, 4 项评定分数总和为肺组织病理半定量的总评分。

1.4.7 ELISA 法检测血清炎症因子的表达 采用酶联免疫法 (ELISA), 严格按照试剂说明书操作, 测定血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 水平。

1.4.8 RT-PCR 检测肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β mRNA 表达 Trizol 提取肺组织总 RNA, 以肺组织样品总 mRNA 为模板, 进行反转录 cDNA, 以 cDNA 为模板加入靶基因上下游引物, 进行扩增, 以 β -actin 为内参, 引物序列见表 2。实验之后记录 PCR 仪测定的 Ct 值, 按 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (目的基因的相对表达量) 方法进行实验数据处理。

表 2 | 引物信息

Table 2 | Primer sequences and product lengths

基因名称	序列	长度 (bp)
肿瘤坏死因子 α	上游: CCC CTC TAT TTA TAA TTG CAC CT 下游: CTG GTA GTT TAG CTC CGT TT	167
白细胞介素 1 β	上游: CAG CAG CAT CTC GAC AAG AG 下游: AAA GAA GGT GCT TGG GTC CT	123
β -actin	上游: ACA TCC GTAAAGACCTCTATGCC 下游: TAC TCC TGC TTG CTG ATC CAC	223

1.4.9 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1 β 蛋白的表达 称取肺组织样品, 清洗、裂解、研磨均匀, 将已裂解的肺组织置于 4 °C 冷冻离心机中, 调至 12 000 r/min, 充分离心 15 min, 取上清液转移到 1.5 mL 的离心管中, 多余部分存放于 -20 °C 冰箱备用; 经电泳, 转膜, 封闭, 一抗、二抗孵育, 显色 / 曝光, 将曝光后的底片扫描, 并用 quantity one 专业灰度分析软件进行分析。

1.5 主要观察指标 ①大鼠肺组织湿/干质量比;②大鼠肺组织苏木精-伊红染色及肺组织病理学半定量评分;③大鼠血清炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 水平;④大鼠肺组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 的mRNA及蛋白表达。

1.6 统计学分析 应用SPSS 23.0软件对实验中所有数据进行统计分析,其中计量资料均使用 $\bar{x}\pm s$ 表示。当组间数据比较方差齐时,采用单因素方差分析检验;组间数据比较方差不齐时,采用Tamhan`T2检验, $P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠24只,分为3组,实验过程无脱失,全部进入结果分析。

2.2 肺组织湿/干质量比测定 急性肺损伤组较对照组明显升高(4.77 ± 1.19 , 1.84 ± 0.62 , $P<0.01$),超短波组(3.97 ± 1.30)与急性肺损伤组相比,比值有减低,但差异无显著性意义。

2.3 肺组织苏木精-伊红染色及肺组织病理学半定量评分

(1)苏木精-伊红染色结果:对照组大鼠肺泡无明显充血、出血,肺泡腔或血管壁未见明显中性粒细胞浸润或聚集,肺泡壁结构完整清晰,无透明膜形成。急性肺损伤组大鼠肺泡壁变厚断裂,肺间质可见大量中性粒细胞浸润和部分红细胞渗出。超短波组肺泡结构相对完整清晰,肺泡壁厚度较急性肺损伤组变薄,肺间质中性粒细胞浸润及红细胞渗出减少。见图1。

(2)肺组织病理学半定量评分:急性肺损伤组较对照组明显升高(14.2 ± 1.79 , 1.80 ± 0.87 , $P<0.01$);超短波组(6.80 ± 0.87)较急性肺损伤组明显减低($P<0.01$)。

2.4 ELISA法检测血清炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 水平 急性肺损伤组肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 较对照组明显升高($P<0.01$),超短波组较急性肺损伤组明显降低($P<0.05$)。见表3。

表3 | 各组大鼠血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 水平 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$, ng/L)

组别	肿瘤坏死因子 α	白细胞介素 1β
对照组	16.12 $\pm$ 4.53	21.41 $\pm$ 5.33
急性肺损伤组	38.51 $\pm$ 10.02 ^a	41.14 $\pm$ 10.33 ^a
超短波组	27.77 $\pm$ 10.87 ^b	31.13 $\pm$ 9.67 ^b

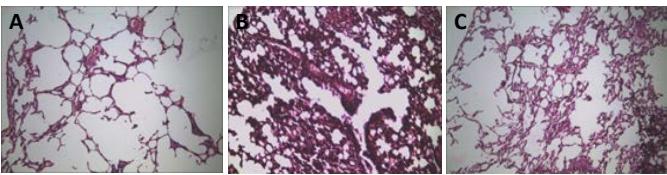
表注:与对照组比较, ^a $P<0.01$;与急性肺损伤组比较, ^b $P<0.05$

2.5 RT-PCR法检测肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 的mRNA表达水平 急性肺损伤组肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β mRNA较对照组显著升高($P<0.01$),超短波组较急性肺损伤组明显减低($P<0.01$)。见表4。

2.6 Western blot法检测肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 的蛋白表达水平 急性肺损伤组肿瘤坏死因子 α 及白细胞介素 1β 蛋白较对照组明显升高($P<0.01$),超短波组较急性肺损伤组明显减低($P<0.01$, 0.05)。见图2。

3 讨论 Discussion

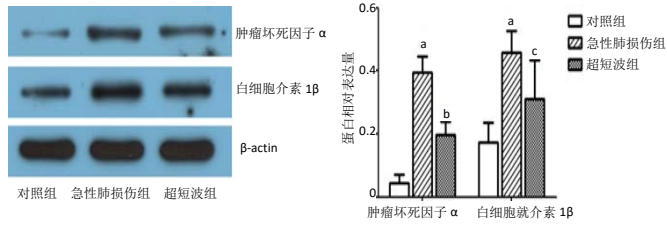
急性肺损伤发病机制较为复杂,在组织学上的特点是严



图注:图A为对照组;B为急性肺损伤组;C为超短波组。与急性肺损伤组比较,超短波组肺泡结构相对完整清晰,肺泡壁厚度变薄,肺间质中性粒细胞浸润及红细胞渗出减少

图1 | 各组大鼠肺组织病理切片(苏木精-伊红染色, $\times 100$)

Figure 1 | Pathological sections of the rat lung tissue (hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)



图注:与对照组比较, ^a $P<0.01$;与急性肺损伤组比较, ^b $P<0.01$, ^c $P<0.05$

图2 | 各组大鼠肺组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 蛋白的表达

Figure 2 | Expression of tumor necrosis factor α and interleukin 1β proteins in rat lung tissue

表4 | 各组大鼠肺组织肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β mRNA相对表达量 ($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

组别	肿瘤坏死因子 α	白细胞介素 1β
对照组	0.68 $\pm$ 0.17	0.94 $\pm$ 0.23
急性肺损伤组	7.71 $\pm$ 2.79 ^a	12.65 $\pm$ 5.58 ^a
超短波组	2.04 $\pm$ 1.07 ^b	1.45 $\pm$ 1.05 ^b

表注:与对照组比较, ^a $P<0.01$;与急性肺损伤组比较, ^b $P<0.01$

重的急性炎症反应、肺泡上皮细胞的大量凋亡、肺泡-毛细血管通透性的增加和随后的纤维化形成^[19];在细胞病理学上包括肺泡-毛细血管膜完整性的破坏、中性粒细胞的聚集、促炎因子的产生和分泌^[20-22]。由此可见,急性肺损伤的核心理论是炎症反应的失衡加重了上皮或内皮的损伤^[23-24],从而导致富含蛋白质的水肿液进入肺泡^[25]。目前比较公认的机制是各种病因诱导肺内促炎因子生成增加,由多种炎症递质及效应细胞共同参与的,并呈瀑布样炎症继发性损伤与弥漫性肺实质(肺毛细血管内皮细胞及肺泡上皮细胞)损伤,进而增加了肺内皮细胞的通透性,大量富蛋白质物质进入支气管和肺泡腔内,导致肺水肿,从而降低肺换气的效能,甚至机体出现较难纠正的呼吸衰竭^[26]。

既然急性肺损伤的核心是炎症反应,超短波又是一种具有良好抗炎作用的物理因子治疗,此次研究将超短波治疗应用于急性肺损伤大鼠是一种探索性的尝试。研究结果显示急性肺损伤大鼠肺组织结构破坏明显、肺泡隔大小不一,肺泡壁不完整、变厚断裂,肺间质可见大量中性粒细胞浸润和部分红细胞渗出;超短波干预后,肺泡充血、肺组织出血、中性粒细胞在肺组织的浸润和聚集及肺泡壁的增厚均有减轻,能明显看出超短波抑制了急性肺损伤大鼠的炎症反应。从湿/干质量比值上看,尽管超短波组湿/干质量比值与急性肺损伤组比较,差异无统计学意义,但数据提示超短波有减轻肺水

肿的趋势,这可能一方面与超短波扩张血管以减低肺动脉压有关^[27],另一方面与超短波抑制炎症进而减轻肺水肿有关;同时该结果与 PCR、Western blot 检测的结果是一致的。

有研究发现,肿瘤坏死因子 α 是急性肺损伤时最先出现的细胞因子,在急性肺损伤模型复制成功前,肿瘤坏死因子 α 就已升高,而白细胞介素 1β 在 6 h 后才见显著增多^[28]。肿瘤坏死因子 α 作为一种经典的炎症标志物在多种炎症反应中广为表达^[29-31],其可以刺激巨噬细胞和内皮细胞分泌白细胞介素 1β 、白细胞介素 8、血小板活化因子和前列腺素等细胞因子和炎性递质,进一步加重炎症反应^[32];白细胞介素 1β 可以增强组织细胞对肿瘤坏死因子 α 的敏感性,并刺激释放肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 8 等细胞因子;白细胞介素 6 可诱导急性炎症反应,促进中性粒细胞的活化和聚集,引起肺水肿,并导致全身炎症反应^[32-34]。可见肿瘤坏死因子 α 起着始动作用,白细胞介素 1β 具有协同作用,两者共同作用促使机体产生剧烈的炎症反应。在此次研究中,ELISA 检测显示超短波组的血清肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 较急性肺损伤组低,提示超短波有抑制炎症因子释放的作用;RT-PCR 和 Western blot 检测提示急性肺损伤组大鼠的肺组织中肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 的 mRNA 和蛋白表达增高,而超短波可以抑制其表达,这也进一步证实了超短波抑制肺组织中的肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 的表达与分泌,降低了肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 这些炎症因子分泌入血的量;同时随着炎症反应被抑制,从湿/干质量比值上也体现了炎症反应与肺水肿的正相关的关系。综上所述,超短波可能通过下调炎症因子肿瘤坏死因子 α 、白细胞介素 1β 的表达,发挥抑制急性肺损伤大鼠肺组织的炎症反应,并进一步减轻了肺水肿。

该研究结果可为超短波治疗急性肺损伤提供参考,但超短波的最佳治疗参数、安全性、不良反应需要进一步研究^[35]。

作者贡献: 方案设计:周君、屈萌琅、廖源、刘静、曾亚华,动物造模取材:廖源、钟培瑞、曾亚华、王婷、肖豪、李兰、刘丹妮、杨璐,统计分析:屈萌琅、廖源、刘静。

经费支持: 该文章接受了“湖南省自然科学基金项目(2019JJ50544)”“衡阳市科技局项目(HKF201947209)”“南华大学附属第一医院亚专科重点项目(2017ZD007)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突: 文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题: 实验方案经南华大学附属第一医院医学伦理委员会批准(批准号为 202002100009)。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在麻醉下进行所有的手术,并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。

文章查重: 文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审: 文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

文章版权: 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明: 这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 4.0”条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

[1] 陈灏珠,林果为,王吉耀,等.实用内科学[M].14版,北京:人民卫生出版社,2013:182-182.

- [2] 马李杰,李王平,金发光.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征发病机制的研究进展[J].中华肺部疾病杂志(电子版),2013,6(1):65-68.
- [3] 刘涛,任成山.炎症介质在急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征发病机制中的作用[J].中华肺部疾病杂志(电子版),2013,6(3):265-269.
- [4] MACA J, IOR O, HOLUB M, et al. Past and present ARDS mortality rates: a systematic review. *Respir Care*. 2017; 62(1): 113-122.
- [5] GOATS GC. Continuous short-wave (radio-frequency) diathermy. *Br J Sports Med*. 1989;23(2):123-127.
- [6] 刘靖.短波联合紫外线照射辅助治疗小儿肺炎临床观察[J].实用中医药杂志,2017,33(07):801-802.
- [7] 袁显文,张慧娟,曲宝迪,等.超短波治疗仪辅助治疗儿童支原体肺炎中血清 C 反应蛋白表达水平的研究[J].山西医药杂志,2018,47(24):2947-2948.
- [8] 斯琴高娃,王玲.抗生素联合超短波治疗坠积性肺炎的临床观察[J].中国冶金工业医学杂志,2018,35(4):444-445.
- [9] 蒋建伟,王波兰,冯文斌.振动排痰联合超短波治疗在脑卒中患者并发坠积性肺炎中的应用[J].按摩与康复医学,2018,9(3):27-28.
- [10] 周博.超短波治疗小儿肺炎疗效评价[J].中国中医药现代远程教育,2012,10(4):151.
- [11] 裴璠,沈姗姗,刘保红.超短波治疗膝骨性关节炎作用机制研究进展[J].中国慢性病预防与控制,2018,26(7):542-545.
- [12] 卞向荣,胡恒,魏玮.超短波联合药物治疗小儿肺炎的临床效果[J].检验医学与临床,2017,14(14):2007-2008.
- [13] ROCCO PR, ZINWA. Pulmonary and extrapulmonary acute respiratory distress syndrome: are they different. *Curr Opin Crit Care*. 2002;11(1):10-17.
- [14] 王婷,梁华平,柴鉴深,等.三种大鼠急性肺损伤模型的比较[J].成都医学院学报,2016,11(1):5-9.
- [15] 焦光宇,葛志伟,刘春利,等.小剂量脂多糖气管内滴注制备急性肺损伤动物模型的探究[J].中国实验动物学报,2007,15(4):292-295+231.
- [16] 陈娇,钱晓明,聂时南.急性肺损伤动物模型的研究现状[J].医学研究生学报,2013,26(8):851-854.
- [17] 韩枫,凌心.吡非尼酮及盐酸氨溴索对百草枯诱导的大鼠急性肺损伤保护作用比较[J].成都医学院学报,2014,9(01):15-17+73.
- [18] WANG Q, ZHENG X, CHENG Y, et al. Resolvin D1 stimulates alveolar fluid clearance through alveolar epithelial sodium channel, Na,K-ATPase via ALX/cAMP/P13K pathway in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Immunol*. 2014;192(8):3765-3777.
- [19] WARD PA, GRAILER JJ. Acute lung injury and the role of histones. *Transl Respir Med*. 2014;2:1.
- [20] BAO H, GAO F, XIE G, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2 Inhibits Apoptosis of Pulmonary Endothelial Cells During Acute Lung Injury Through Suppressing MIR-4262. *Cell Physiol Biochem*. 2015;37(2):759-767.
- [21] LIU S, TANG J, HUANG L, et al. Cordyceps Militaris Alleviates Severity of Murine Acute Lung Injury Through miRNAs-Mediated CXCR2 Inhibition. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(5):2003-2011.
- [22] DENG X, JIN K, LI Y, et al. Platelet-derived growth factor and transforming growth factor beta1 regulate ARDS-associated lung fibrosis through distinct signaling pathways. *Cell Physiol Biochem*. 2015;36(3):937-946.
- [23] SEKI H, TASAKA S, FUKUNAGA K, et al. Effect of Toll-like receptor 4 inhibitor on LPS-induced lung injury. *Inflamm Res*. 2010;59(10):837-845.
- [24] PATEL B V, WILSON M R, O'DEA K P, et al. TNF-induced death signaling triggers alveolar epithelial dysfunction in acute lung injury. *J Immunol*. 2013; 190(8): 4274-4282.
- [25] PIERRAKOS C, KARANIKOLAS M, SCOLLETTA S, et al. Acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and therapeutic options. *J Clin Med Res*. 2012;4(1): 7-16.
- [26] KELLNER M, NOONEPALLE S, LU Q, et al. ROS signaling in the pathogenesis of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Adv Exp Med Biol*. 2017;967: 105-137.
- [27] 南登昆,缪鸿石.康复医学[M].北京:人民卫生出版社,1993:106-109.
- [28] SUFFREDINI AF, REDA D, BANDS SM, et al. Effects of recombinant dimeric TNF receptor on inflammatory responses following intravenous endotoxin administration. *J Immunol*. 1995;155(10):5038-5045.
- [29] AKGÜN B, ÖZTÜRK S, ARTAS G, et al. Effects of intrathecal caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on IL-6 and TNF- α levels and local inflammatory responses in spinal cord injuries. *Turk Neurosurg*. 2018;28(4):625-629.
- [30] BEATTIE MS. Inflammation and apoptosis: linked therapeutic targets in spinal cord injury. *Trends Mol Med*. 2004; 10(12): 580-583.
- [31] PENG RJ, JIANG B, DING XP, et al. Effect of TNF- α inhibition on bone marrow-derived mesenchymal stem cells in neurologic function recovery after spinal cord injury via the Wnt signaling pathway in a rat model. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42(2): 743-752.
- [32] ANTTILA JE, WHITAKER KW, WIRES ES, et al. Role of microglia in ischemic focal stroke and recovery focus on Toll-like receptors. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017;79(Pt A):3-14.
- [33] ZHANG Z, CHEN N, LIU JB, et al. Protective effect of resveratrol against acute lung injury induced by popolysaccharide via inhibiting the myd88-dependent Toll-like receptor 4 signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2014; 10(1): 101-106.
- [34] 葛均波,徐永健,王辰.内科学[M].9版,北京:人民卫生出版社,2018:41-61.
- [35] LEITGEB N, OMERSPAHIC A, NIEDERMAYER F. Exposure of non-target tissues in medical diathermy. *Bioelectromagnetics*. 2010;31(1):12-19.