

TGF-β、IL-1β 及 GDF-15 在急性肺血栓
栓塞兔模型中的变化及其意义*

张 黎¹,陈剑飞^{2△},宋明宝³,陈 桐²,王 洁²,康华丽⁴

(1. 陆军军医大学第一附属医院病理科,重庆 400038;2. 重庆市巴南区人民医院心内科 400051;
3. 重庆市康华众联心血管医院心内科 400030;4. 陆军军医大学第二附属医院心内科,重庆 400037)

[摘要] **目的** 探究转化生长因子-β(TGF-β)、白细胞介素-1β(IL-1β)、生长分化因子-15(GDF-15)在急性肺血栓栓塞(APTE)兔模型中的变化及其意义。**方法** 20 只大耳白兔自体血栓回输法制作 APTE 模型(APTE 组),另 20 只大耳白兔作为对照组,采集栓塞前(T₀)、栓塞 1 h(T₁)、栓塞 3 h(T₂)、栓塞 6 h(T₃)及溶栓 2 h(T₄)动脉血,采用 ELISA 法检测 TGF-β、IL-1β、GDF-15 水平,采用多道生理记录仪测定平均动脉压(MAP)、右心室收缩压(RVSP)。**结果** APTE 组 RVSP、IL-1β 水平在 T₁、T₂、T₃ 时明显高于对照组($P<0.05$),MAP 在 T₁、T₂、T₃ 时明显低于对照组($P<0.05$);APTE 组 TGF-β、GDF-15 水平在 T₂、T₃ 时明显高于对照组($P<0.05$)。相关性分析显示,TGF-β、IL-1β、GDF-15 水平与 MAP 呈负相关($r=-0.674$ 、 -0.672 、 -0.436 , $P<0.001$),与 RVSP 呈正相关($r=0.857$ 、 0.816 、 0.626 , $P<0.001$)。**结论** APTE 兔 TGF-β、IL-1β、GDF-15 水平升高,且与 MAP 和 RVSP 相关。

[关键词] 肺血栓栓塞症;转化生长因子-β;白细胞介素-1β;生长分化因子-15;肺功能;相关性分析

[中图法分类号] R-332;R563.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)16-2707-05

Changes and significance of TGF-β, IL-1β and GDF-15 in rabbit model
of acute pulmonary thromboembolism*

ZHANG Li¹,CHEN Jianfei^{2△},SONG Mingbao³,CHEN Tong²,WANG Jie²,KANG Huali⁴

(1. Department of Pathology, First Affiliated Hospital of Army Military Medical

University, Chongqing 400038, China; 2. Department of Cardiology, Banan District People's Hospital,

Chongqing 400051, China; 3. Department of Cardiology, Chongqing Kanghua Zhonglian

Cardiovascular Hospital, Chongqing 400030, China; 4. Department of

Cardiology, Second Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400037, China)

[Abstract] **Objective** To explore the changes and significances of TGF-β, IL-1β, GDF-15 in acute pulmonary thromboembolism (APTE) rabbit model. **Methods** Twenty big ear rabbit were prepared the APTE model by autologous blood clots refusion (APTE group), the other 20 big ear rabbits served as the control group. The arterial blood was collected before embolism, at 1 h (T₁), 3 h (T₂) and 6 h (T₃) after embolism and 2 h after thromblysis (T₄). ELISA was used to detect the levels of TGF-β, IL-1β and GDF-15. MAP and RVSP were detected by multichannel physiological records. **Results** The RVSP and IL-1 levels at T₁, T₂ and T₃ in the APTE group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$), and MAP at T₁, T₂ and T₃ was significantly lower than those in the control group ($P<0.05$); the levels of TGF-β and GDF-15 at T₂ and T₃ in the APTE group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). The correlation analysis results showed that TGF-β, IL-1β and GDF-15 levels were negatively correlated with MAP ($r=-0.674$, -0.672 , -0.436 , $P<0.001$), and were positively correlated with RVSP ($r=0.857$, 0.816 , 0.626 , $P<0.001$). **Conclusion** The levels of TGF-β, IL-1β and GDF-15 in APTE rabbit are increased, moreover are correlated with MAP and RVSP.

[Key words] pulmonary thromboembolism; transforming growth factor-β; interleukin-1β; growth and differentiation factor-15; pulmonary function; correlation analysis

* 基金项目:重庆市社会事业与民生保障科技创新专项项目(cstc2017shmsA130002)。 作者简介:张黎(1981—),住院医师,本科,主要从事肺高压机制研究。△ 通信作者,E-mail:chenjf0822@163.com。

急性肺血栓栓塞(acute pulmonary thromboembolism,APTE)是自静脉系统或右心血栓阻塞肺动脉(分支)且以肺功能、呼吸功能障碍为临床特征的一组疾病^[1],全球病死率都较高^[2-4]。受限于目前对 APTE 的早期诊断不足,发生机制不清晰^[5-6],其临床治疗效果有限。因此,学术界仍在积极探索 APTE 的发生机制,以辅助早期诊断,提供治疗新途径。国外多项研究显示,多种细胞因子可能参与了 APTE 的发生、发展过程^[7-9]。基于此,本研究构建 APTE 兔模型,以探讨转化生长因子- β (TGF- β)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、生长分化因子-15(GDF-15)的变化及其意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

中国大耳白兔(陆军军医大学实验动物中心提供)40 只,雌雄不限,体重 2.5~3.0 kg,兔龄 4~6 个月。

1.1.2 仪器与试剂

兔 TGF- β ELISA 试剂盒、兔 IL-1 β ELISA 试剂盒、兔 GDF-15 ELISA 试剂盒均购自上海继和生物科技有限公司,美国 P3 Plus 多道生理记录仪、HBS-1096A 酶标分析仪、Hermle Z 206A 台式小型离心机、20G 静脉留置针。

1.2 方法

1.2.1 分组

实验兔于安静、通风条件下自由进食饮水饲养,温度 20~25℃,相对湿度 40%~60%。实验兔编号后按随机数字表法分成对照组和 APTE 组,各 20 只。

1.2.2 造模

自体血栓回输法构建动物模型,于无菌条件下制作栓子,1 mL 无菌针管沿兔耳缘取静脉血 1 mL,加 20 U 凝血酶,室温静置过夜,制取血栓,并加 2 mL 生理盐水混匀于注射器内备用;所有实验兔行麻醉后颈部剪毛并局部消毒,气管插管后分离右侧颈静脉、左侧颈静脉并留置导管,右股动脉固定且留置套管针以采血,制备栓子经右颈静脉分 2 次注入 APTE 组实验兔(每次 0.5 mL,间隔 3 min,且注入栓子后快速推注 5 mL 生理盐水),对照组实验兔则注入等量生理盐水。

1.2.3 指标检测

取栓塞前(T_0)、栓塞 1 h(T_1)、栓塞 3 h(T_2)、栓塞 6 h(T_3)动脉血 2 mL,按各试剂盒说明书操作测定血清 TGF- β 、IL-1 β 、GDF-15 水平;同时于左颈总动脉、右侧颈静脉植入导管并采用多道生理记录仪测定平均动脉压(MAP)、右心室收缩压(RVSP)。采集血栓期间指标后采用 2.2 MHz 超声+3 mg/kg 尿激酶溶栓

2 h(T_4),再次测定血清 TGF- β 、IL-1 β 、GDF-15 水平。

1.3 统计学处理

采用 SPSS22.0 统计软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,行重复测量方差分析,相关性分析采用 Pearson 分析,以 $P<0.05$ 为差异统计学意义。

2 结果

2.1 两组各时间点 MAP 与 RVSP 比较

APTE 组 RVSP 在 T_1 、 T_2 、 T_3 时明显高于对照组($P<0.05$),MAP 在 T_1 、 T_2 、 T_3 时明显低于对照组($P<0.05$)。APTE 组 RVSP 在 T_4 时明显高于对照组,但低于组内 T_1 、 T_2 、 T_3 时($P<0.05$),MAP 在 T_4 时明显低于对照组,但高于组内 T_1 、 T_2 、 T_3 时($P<0.05$),见表 1。

表 1 两组各时间点 MAP 与 RVSP 比较
($n=20,\bar{x}\pm s$,mm Hg)

组别	时间	MAP	RVSP
对照组	T_0	97.41 $\pm$ 3.38	23.59 $\pm$ 3.40
	T_1	97.61 $\pm$ 1.91	23.56 $\pm$ 2.95
	T_2	97.82 $\pm$ 1.83	22.96 $\pm$ 2.51
	T_3	97.09 $\pm$ 2.28	23.35 $\pm$ 2.61
	T_4	97.66 $\pm$ 2.31	23.77 $\pm$ 2.25
APTE 组	T_0	97.57 $\pm$ 3.61	23.61 $\pm$ 3.32
	T_1	82.42 $\pm$ 4.62 ^{ab}	37.16 $\pm$ 4.33 ^{ab}
	T_2	72.72 $\pm$ 5.99 ^{abc}	51.44 $\pm$ 6.97 ^{abc}
	T_3	66.75 $\pm$ 7.33 ^{abcd}	57.52 $\pm$ 6.82 ^{abcd}
	T_4	83.67 $\pm$ 3.95 ^{abcde}	31.24 $\pm$ 2.87 ^{abcde}
$F_{\text{组间}}$		244.245	287.517
$P_{\text{组间}}$		<0.001	<0.001
$F_{\text{交互}}$		477.124	1012.243
$P_{\text{交互}}$		<0.001	<0.001
$F_{\text{时间}}$		511.721	989.127
$P_{\text{时间}}$		<0.001	<0.001

^a: $P<0.05$,与相同时间点对照组比较;^b: $P<0.05$,与同组 T_0 时比较;^c: $P<0.05$,与同组 T_1 时比较;^d: $P<0.05$,与同组 T_2 时比较;^e: $P<0.05$,与同组 T_3 时比较。

2.2 两组各时间点 TGF- β 、IL-1 β 及 GDF-15 水平比较

APTE 组 IL-1 β 水平在 T_1 、 T_2 、 T_3 时明显高于对照组($P<0.05$),TGF- β 、GDF-15 水平在 T_2 、 T_3 时明显高于对照组($P<0.05$)。APTE 组 IL-1 β 、GDF-15 水平在 T_4 时明显高于对照组,但明显低于组内 T_1 、 T_2 、 T_3 时($P<0.05$),TGF- β 水平在 T_4 时明显低于对照组及组内 T_1 、 T_2 、 T_3 时($P<0.05$),见表 2。

2.3 相关性分析

TGF- β 、IL-1 β 、GDF-15 水平与 MAP 呈负相关($r=-0.674$ 、 -0.672 、 -0.436 , $P<0.001$),与

RVSP 呈正相关 ($r = 0.857$ 、 0.861 、 0.626 , $P < 0.001$), 见图 1、2。

表 2 两组各时间点 TGF-β、IL-1β 及 GDF-15 水平比较 (n=20, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	TGF-β(pg/mL)	IL-1β(pg/mL)	GDF-15(ng/L)
对照组	T ₀	1 398.46±20.87	85.74±7.81	12.65±3.99
	T ₁	1 408.06±14.64	85.29±7.12	12.74±4.28
	T ₂	1 409.07±13.82	86.74±8.58	12.36±5.64
	T ₃	1 413.07±7.71	88.74±8.19	12.64±4.79
	T ₄	1 411.12±7.55	86.87±8.01	12.54±4.65
APTE 组	T ₀	1 399.10±20.92	86.19±7.67	12.56±4.07
	T ₁	1 415.04±18.24	91.49±11.08 ^{ab}	13.86±4.39
	T ₂	1 468.09±42.24 ^{abc}	145.32±30.45 ^{abc}	18.96±5.64 ^{abc}
	T ₃	1 598.07±61.03 ^{abcd}	189.72±43.6 ^{abcd}	24.57±7.64 ^{abcd}
	T ₄	1 405.12±21.57 ^{acde}	89.66±10.24 ^{acde}	13.24±4.54 ^{acde}
F _{组间}		68.544	80.982	15.127
P _{组间}		<0.001	<0.001	<0.001
F _{交互}		164.244	144.983	48.018
P _{交互}		<0.001	<0.001	<0.001
F _{时间}		188.346	177.254	45.276
P _{时间}		<0.001	<0.001	<0.001

^a: $P < 0.05$, 与相同时间点对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与同组 T₀ 时比较; ^c: $P < 0.05$, 与同组 T₁ 时比较; ^d: $P < 0.05$, 与同组 T₂ 时比较; ^e: $P < 0.05$, 与同组 T₃ 时比较。

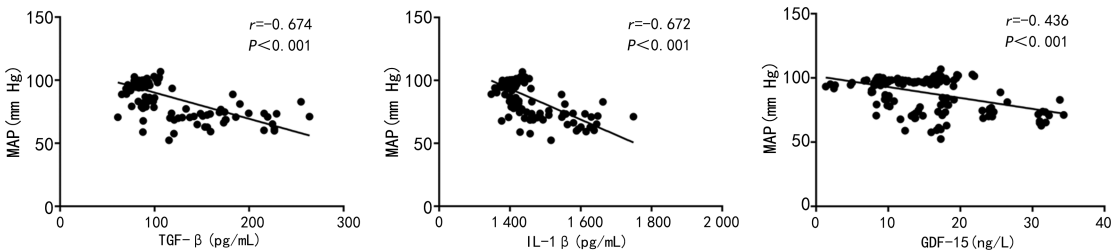


图 1 TGF-β、IL-1β 及 GDF-15 与 MAP 的相关性分析

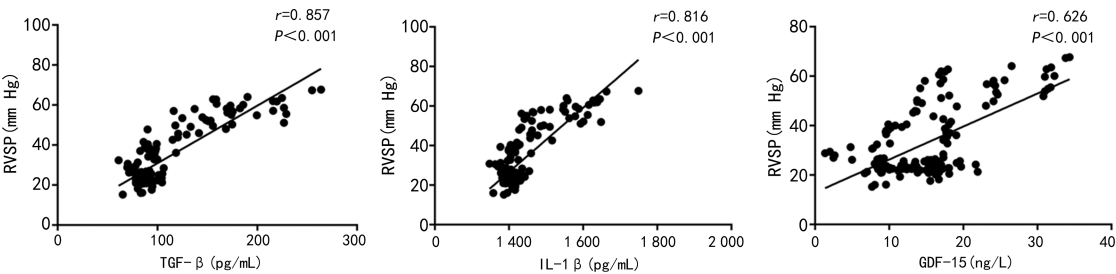


图 2 TGF-β、IL-1β 及 GDF-15 与 RVSP 的相关性分析

3 讨 论

APTE 的发病率仅次于冠心病和高血压^[10], 其临床症状可表现为呼吸困难、胸痛、心悸、咳嗽等, 但因与急性心肌梗死、急性心绞痛等症状类似而易误诊^[11-12]; 即便是借助心电图、超声、CT 肺动脉造影 (CTPA)、数字减影血管造影 (DSA) 等影像学手段^[13-15], 或结合 PESI 评分量表^[16], 也不能完全筛查高危人群。虽然血气分析异常可高度支持肺动脉栓

塞 (PE) 诊断, 但血气分析结果正常并不完全排除 PE 的可能性^[17-18]。另外, 随着对溶栓药物剂量及治疗时机研究的进展, 当前溶栓对于 PE 患者生存率的提高、心功能的改善有了很大的发展, 但对急性期患者的治疗手段有限。既往已有转化生长因子和白细胞介素的相关报道, 且研究数量呈现上升趋势, 说明越来越多学者尝试寻找新的生物学标志物, 以辅助诊断并为治疗提供新途径。本研究以最具代表性的 TGF-β、

IL-1 β 、GDF-15 为切入点,采集模型最具特征性的栓塞前、栓塞 1 h、栓塞 3 h、栓塞 6 h 4 个时间点数据,分析上述指标对病情发展的诊断意义。

兔纤溶系统、肺组织、血管形态与人相近^[19],且兔体型适中、性格温和,易建立静脉通道,因此选为研究对象。结果显示,相较于对照组,APTE 组 T₁、T₂、T₃ 时 TGF- β 、IL-1 β 、GDF-15 水平均出现不同程度的升高,提示 TGF- β 、IL-1 β 、GDF-15 可能参与了 APTE 的发生过程。溶栓处理后,APTE 组 TGF- β 、IL-1 β 、GDF-15 水平均逐渐向溶栓前回归,但受血栓影响无法完全恢复,这也侧面反映了上述指标在临床诊疗中的指导意义。

既往认为,APTE 后出现的肺动脉压升高是由于血栓阻塞肺血管后阻力增加所引起的,但随着研究的深入,目前认为 PE 的发生、发展是多个信号通路、多种细胞因子共同参与的病理生理过程^[20-21],包括炎症因子、转化生长因子、生长分化因子等细胞因子^[22]。TGF- β 是由单核细胞、巨噬细胞及肺细胞分泌的多效能因子,可调控细胞增殖、分化,且与高血压、心肌肥厚、动脉粥样硬化等多种心血管疾病密切相关,且 TGF- β 可能参与了肺动脉组织重建,这是因为 TGF- β 被激活后可传导 Smad 蛋白^[23],后者可将 TGF- β 信号从细胞表面受体传导至细胞核,调节细胞生长、分化及凋亡;APTE 患者体内的血栓会激活巨噬细胞并释放 IL-1 β ,IL-1 β 可使内皮细胞巨噬细胞样改变、血小板/白细胞聚集活化^[24],加重凝血、纤溶失衡而促进血栓形成。GLASGOW 等^[25]报道 IL-1 β 水平在肺损伤小鼠中明显升高,KRAUSE 等^[26]研究也表明 IL-1 β 水平在噬血细胞综合征(HPS)患者中显著升高。GDF-15 是生长分化因子家族成员,在组织缺氧、压力负荷、损伤及肿瘤等影响下会被诱导表达^[27-28]。以上 3 种因子同 APTE 的肺动脉重建相关。当肺动脉在受到力的作用和缺氧的刺激下,会释放一系列细胞因子通过血液循环到达损伤部位,共同导致肺动脉外膜纤维性增厚、硬化^[29],而血管扩张将减少肺血管容积,增加肺循环阻力,诱使 APTE 发生并促进其发展。因此,结合分析 3 种因子水平可能有助于 APTE 的诊断,同时也可能从相关通路发掘新的治疗途径。

综上所述,TGF- β 、IL-1 β 、GDF-15 在兔 APTE 中异常升高。但受限于实验对象及样本量,可能导致本实验结果存在偏差;此外,本实验也未探究 TGF- β 、IL-1 β 、GDF-15 对辅助判断病情程度的价值,有待于后续更为严谨的研究。

参考文献

[1] MAESTRE PEIRÓ A,GONZÁLVES GASCH A,

MONREAL BOSCH M. Update on the risk stratification of acute symptomatic pulmonary thromboembolism[J]. Rev Clin Esp (Barc),2017,217(6):342-350.

- [2] NAGAMALESH U M,PRAKASH V S,NAIDU K C K,et al. Acute pulmonary thromboembolism: epidemiology, predictors, and long-term outcome: a single center experience[J]. Indian Heart J,2017,69(2):160-164.
- [3] BAKEBE A,KASHONGWE I,MULENGA C, et al. Pulmonary embolism: epidemiological data and diagnosis in Kinshasa hospitals[J]. Int J Tuberc Lung Dis,2017,21(8):875-879.
- [4] 顾晴,熊长明,柳志红,等. 结缔组织病合并肺栓塞的临床特征及误诊原因分析[J]. 中华医学杂志,2015,95(2):120-122.
- [5] ÖZSU S S,DURMUS Z G,COSKUNER M B, et al. Does the incidence and mortality of pulmonary thromboembolism change over the years? [J]. Turk Thorac J,2017,18(3):78-81.
- [6] RUOHONIEMI D M,SISTA A K,DOANY C F, et al. Perioperative pulmonary thromboembolism: current concepts and treatment options[J]. Curr Opin Anaesthesiol,2018,31(1):75-82.
- [7] 缪冉,张萌,陶新曹,等. 急性肺血栓栓塞症的生物学标志物[J]. 中华医学杂志,2017,97(36):2815-2817.
- [8] HELD M,JOA F,HOLL R. Pulmonary embolism[J]. Wien Klin Mag,2017,20:212-219.
- [9] TURAN O,TURGUT D,GUNAY T, et al. The contribution of clinical assessments to the diagnostic algorithm of pulmonary embolism[J]. Adv Clin Exp Med,2017,26(2):303-309.
- [10] PRABHU W,SOUKAS P A. Pulmonary embolism in 2017: increasing options for increasing incidence[J]. R I Med J,2017,100(5):27-32.
- [11] LU Y W, TSAI Y L, CHANG C C, et al. A potential diagnostic pitfall in acute chest pain: Massive pulmonary embolism mimicking acute ST elevation myocardial infarction[J]. Am J Emerg Med,2018,36(3):461-463.
- [12] MAHAJAN K, NEGI P C. Freely moving right ventricular thrombus in a patient with acute pulmonary embolism[J]. Indian J Med Res, 2017,145(4):575.
- [13] DUTTA T,FRISHMAN W H,ARONOW W

- S. Echocardiography in the evaluation of pulmonary embolism[J]. *Cardiol Rev*, 2017, 25(6):309-314.
- [14] HENDRIKS B M F, EIJSVOOGEL N G, KOK M, et al. Optimizing pulmonary embolism computed tomography in the age of individualized medicine: a prospective clinical study[J]. *Invest Radiol*, 2018, 53(5):306-312.
- [15] DEBLOIS S, CHARTRAND-LEFEBVRE C, TOPOROWICZ K, et al. Interventions to reduce the overuse of imaging for pulmonary embolism: a systematic review[J]. *J Hosp Med*, 2018, 13(1):52-61.
- [16] BRUNET S, WANG D, LANG E. MP32: the pulmonary embolism severity index (PESI) score and disposition decisions in calgary emergency departments[J]. *Can J Emerg Med*, 2017, 19(Suppl1):S76.
- [17] ALKINJ B, PANNU B S, APALA D R, et al. Saddle vs Nonsaddle pulmonary embolism: clinical presentation, hemodynamics, management, and outcomes[J]. *Mayo Clin Proc*, 2017, 92(10):1511-1518.
- [18] WANG L, XU Y, ZHANG W, et al. Early interventional therapy for acute massive pulmonary embolism guided by minimally invasive hemodynamic monitoring[J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(8):14011-14017.
- [19] LI X, ZHANG R, LI Z, et al. Contrast-enhanced ultrasound imaging quantification of adventitial vasa vasorum in a rabbit model of varying degrees of atherosclerosis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):7032.
- [20] NAITO A, TANABE N, JUJO T, et al. Pentraxin3 in chronic thromboembolic pulmonary hypertension: a new biomarker for screening from remitted pulmonary thromboembolism[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e113086.
- [21] ALEXANDER M, WOLFE R, BALL D, et al. OC-05-D-dimer, fibrinogen and TEG-MA predict thromboembolism in non-small cell lung cancer: interim results from a prospective cohort study[J]. *Thromb Res*, 2016, 140(Suppl 1):S170.
- [22] HASANOGLU C, ARGÜDER E, KILIÇ H, et al. Atrial fibrillation, an obscured cause of pulmonary embolism can be revealed by adding to Wells criteria[J]. *J Investig Med*, 2019, 67(7):1042-1047.
- [23] YEO S K, WEN J, CHEN S, et al. Autophagy differentially regulates distinct breast cancer stem-like cells in murine models via EGFR/Stat3 and TGF- β /Smad signaling[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(11):3397.
- [24] LIN X, FAN Y, WANG X. Correlation between tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β in exhaled breath condensate and pulmonary function[J]. *Am J Med Sci*, 2017, 354(4):388-394.
- [25] GLASGOW S C, RAMACHANDRAN S, BLACKWELL T S, et al. Interleukin-1 β is the primary initiator of pulmonary inflammation following liver injury in mice[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2017, 293(2):L491-496.
- [26] KRAUSE M F, ANKERMANN T, BISMARCK P, et al. Compartmentalized interleukin-1 β in pulmonary secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Pediatr Crit Care Med*, 2015, 16(1):94-95.
- [27] CODÓ P, WELLER M, KAULICH K, et al. Control of glioma cell migration and invasiveness by GDF-15[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(7):7732-7746.
- [28] AGO T, SADOSHIMA J. GDF15, a cardioprotective TGF- β superfamily protein[J]. *Circ Res*, 2016, 98(3):294-297.
- [29] KÉBÉ K, SAGE E, MARCOS E, et al. Pulmonary vascular smooth muscle cells remodeling and dysfunction in cystic fibrosis[J]. *Rev Mal Respir*, 2015, 32(3):327.