

米屈肼对小鼠内毒素性急性肺损伤的影响

魏云伟, 邵东华, 葛家希, 濮健峰, 王 洪

(江苏大学附属人民医院麻醉科, 江苏 镇江 212000)

[摘要] 目的:探讨米屈肼(mildronate, MIL)对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)致小鼠急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的影响及机制。方法:将 50 只小鼠按随机数字表法分为 5 组。其中 4 组为脂多糖诱导的急性肺损伤模型组(气管内滴注 0.1ml LPS 2 mg/kg),分别为单纯模型组(LPS 组)、低剂量米屈肼干预组(MIL 50 mg/kg 组)、中剂量米屈肼干预组(MIL 100 mg/kg 组)和高剂量米屈肼干预组(MIL 200 mg/kg 组),每组 10 只;造模前 6 d,后 3 组小鼠分别腹腔注射 2%的米屈肼 50、100、200 mg/kg, LPS 组腹腔注射等体积的生理盐水,每天 1 次,连续 6 d。另一组为正常对照组(NS 组, 10 只),同时间按同样方法注射等体积生理盐水。各组于气道内滴注 LPS 后 4 h 时,处死小鼠,取肺组织,测量肺组织湿干重比(W/D);采用免疫组织化学方法,测定肺组织细胞中 NF-κBp65 的表达;采用 ELISA 方法测定肺组织中 IL-1β、IL-6 的水平;光镜下观察肺组织病理变化。结果:模型组的肺组织湿干重比、肺组织细胞中 NF-κBp65 表达和肺组织中 IL-1β、IL-6 的水平高于对照组($P < 0.01$);各干预组的上述指标均高于对照组($P < 0.01$),但是低于模型组($P < 0.05$),3 个干预组间差异无统计学意义。模型组肺泡充血水肿、炎性细胞浸润明显;3 个干预组,上述现象减轻。结论:米屈肼能减轻小鼠内毒素性急性肺损伤。可能与下调 NF-κBp65 的表达,减少炎性细胞因子 IL-1β、IL-6 的生成有关。

[关键词] 急性肺损伤; 米屈肼; 脂多糖

[中图分类号] Q26

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)04-468-05

Effect of LPS-induced acute lung injury in mice by mildronate

WEI Yun-wei, SHAO Dong-hua, GE Jia-xi, PU Jian-feng, WANG Hong

(Department of Anesthesiology, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of mildronate (MIL) on the acute lung injury (ALI) induced by LPS in mice. **Methods:** According to the random number table, all 50 ICR mice were randomly divided into 5 groups, of which four groups was induced ALI and were respectively divided into LPS group, MIL 50 mg/kg group, MIL 100 mg/kg group, MIL 200 mg/kg group, each contains 10 mice. ICR mice was induced ALI by instilling intratracheally with 0.1ml LPS (2 mg/kg). Saline and mildronate (50, 100 and 200 mg/kg) were injected intraperitoneally daily in mice for 6 days before challenge with LPS. In addition, 10 mice in the normal saline group (NS group) were administered saline also by intraperitoneal injection at the same time in the same way. Ten animals in each group were killed at 4 h after LPS administration respectively. Wet /dry weight ratios of lung, the expression of NF-κBp65 was observed by immunohistochemistry, the levels of IL-1β and IL-6 in lung tissue were measured by ELISA, and lungs histopathology was also performed. **Results:** Compared with NS group, wet /dry weight ratios of lung, the expression levels of NF-κBp65, IL-1β and IL-6 in lung tissue were significantly higher in the LPS group ($P < 0.01$). Alveolar edema and neutrophils infiltration were observed in LPS group. Mildronate pretreatment significantly attenuated LPS-induced pulmonary histological changes in MIL 50 mg/kg group, MIL 100 mg/kg group and MIL 200 mg/kg group ($P < 0.05$), and there was no significance in pulmonary histological changes among the three mildronate therapeutic groups. **Conclusion:** Mildronate can protect the lungs against LPS-induced acute injury by down-regulating the expression of NF-κBp65 and inhibiting inflammatory response at all doses.

[Key words] acute lung injury; mildronate; lipopolysaccharide

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(4): 468-472]

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是指由于各种原因(弥漫性严重的肺部感染、脓毒症、失血性休

克、有害物质吸入等)所致的肺组织结构发生特征性病理改变而出现的临床综合征^[1]。目前认为 ALI

是由多种炎性介质及效应细胞共同参与,并呈级联放大的瀑布样炎症继发性损伤与继发性弥漫性肺实质损伤^[2]。在各种原因导致的 ALI 中,前炎性因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素(IL)-1 β 处于炎症因子网络的中心,对 ALI 发生起着重要作用^[3]。核因子(NF)- κ B 是一类具有多向性转录调节作用的蛋白因子,被激活为 NF- κ Bp65 后可通过影响细胞因子网络中的多种细胞因子(IL-1 β 、IL-6、IL-8 等)的基因转录而对该网络产生广泛影响,在机体的炎症发展过程中发挥重要作用^[4]。有研究表明,受损组织细胞中的线粒体是氧自由基生成的主要场所^[5],而细胞内过多的氧自由基可以激活炎症级联反应^[6]。肉毒碱合成抑制剂米屈肼(mildronate, MIL)是一种作用于线粒体的心脏保护药^[7],近年来研究发现其有抗炎作用^[8-9]。本研究旨在探讨米屈肼对小鼠内毒素性 ALI 是否有保护作用及其在体内的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性 ICR 小鼠(体重 18~22 g)50 只,由江苏大学实验动物中心提供;MIL (南京康满林化工实业有限公司);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, *E.coli* O111:B4, Sigma 公司, 美国);全蛋白提取试剂盒(南京凯基生物发展有限公司);BCA 蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所);小鼠 IL-1 β 、IL-6 ELISA 试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司);NF- κ Bp65 抗体 (Cell Signaling 公司, 美国);BENCH-MAR 酶标仪 (Bio-Rad 公司, 美国);Beckman J-301 高速冷冻离心机(Heraeus 公司, 美国)。

健康雄性 ICR 小鼠 50 只(江苏大学实验动物中心提供),随机分为 5 组:对照组(NS 组, $n=10$)、模型组^[10](LPS 组, $n=10$)、低剂量 MIL 干预组(MIL 50 mg/kg 组, $n=10$)、中剂量 MIL 干预组(MIL 100 mg/kg 组, $n=10$) 和高剂量 MIL 干预组 (MIL 200

mg/kg 组, $n=10$)。造模前 6 d,各干预组,分别腹腔注射 2%的 MIL 50、100、200 mg/kg,每天 1 次,连续 6 d。对照组和模型组,同时间按同样方法注射等体积生理盐水。给药第 6 天时,各小鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠(60 mg/kg)后,常规消毒,行颈部正中切口,钝性分离暴露气管,模型组和各干预组气管内滴注 0.1 ml LPS(2 mg/kg),对照组同前方法滴注等体积的生理盐水,缝合伤口^[10]。

1.2 方法

每组动物于滴注 LPS 或生理盐水后 4 h 时,处死小鼠,分离右肺上叶,匀浆,采用 ELISA 方法测定肺组织中 IL-1 β 、IL-6 的水平。取右肺中叶,采用免疫组织化学方法测定肺组织细胞核中 NF- κ Bp65 的表达,取 5 个高倍视野,计算阳性细胞占总细胞的百分比,即肺组织 NF- κ Bp65 的核表达阳性率。取右肺下叶组织,10%中性甲醛固定 4 h、脱水、脱蜡、包埋后,切片行 HE 染色,光镜下观察肺组织病理学结果。分离左侧肺组织,用吸水纸吸干表面水分后用电子天平称肺湿重,置于 70℃烤箱烤至肺重量不再减少,称肺干重,计算肺湿干重比值(W/D)。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对各组数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)和组间比较(方差齐用 LSD 检验,不齐则用 Games-Howell 检验), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺湿/干重比值的变化

与 NS 组比较,LPS 组和干预组的肺组织 W/D 明显升高($P < 0.01$);与 LPS 组比较,不同浓度 MIL 干预组的肺 W/D 均有不同程度的下降,中高剂量下降更为显著($P < 0.01$),但是 3 个干预组间差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

表 1 小鼠肺组织 W/D、肺组织细胞中 NF- κ Bp65 表达

Table 1 Wet/dry weight ratio of lung and expression of NF- κ Bp65 in lung tissue cells of mice in each group

| 组别 | n | 肺组织 W/D | NF- κ Bp65 表达阳性率 ($\bar{x} \pm s$) |
|---------------|-----|--------------------------------|--|
| NS | 10 | 3.97 \pm 0.07 | 0.08 \pm 0.02 |
| LPS | 10 | 5.51 \pm 0.14 [#] | 0.52 \pm 0.10 [#] |
| MIL 50 mg/kg | 10 | 5.32 \pm 0.16 ^{#*} | 0.33 \pm 0.10 ^{#*} |
| MIL 100 mg/kg | 10 | 5.27 \pm 0.16 ^{#**} | 0.32 \pm 0.09 ^{#*} |
| MIL 200 mg/kg | 10 | 5.22 \pm 0.19 ^{#**} | 0.30 \pm 0.10 ^{#**} |

与 NS 组比较,[#] $P < 0.01$;与 LPS 组比较,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

2.2 肺组织中 IL-1β、IL-6 水平的变化

与 NS 组比较, LPS 组和各干预组肺组织中 IL-1β、IL-6 的水平明显升高($P < 0.01$); 与 LPS 组比

较, 3 个干预组肺组织中 IL-1β、IL-6 的水平明显降低($P < 0.01$), 但是干预组之间 IL-1β、IL-6 水平差异不明显($P > 0.05$, 表 2)。

表 2 小鼠肺组织均浆中 IL-1β、IL-6 浓度

Table 2 Concentration of IL-1β and IL-6 in lung tissue of mice in each group (pg/ml, $\bar{x} \pm s$)

| 组 别 | n | 肺组织 IL-1β | 肺组织 IL-6 |
|---------------|----|---------------------------------|-------------------------------|
| NS | 10 | 495.89 ± 55.35 | 290.47 ± 40.09 |
| LPS | 10 | 1 416.65 ± 66.70 [#] | 587.12 ± 55.57 [#] |
| MIL 50 mg/kg | 10 | 1 298.80 ± 73.97 ^{***} | 501.42 ± 48.79 ^{***} |
| MIL 100 mg/kg | 10 | 1 280.18 ± 73.74 ^{***} | 489.51 ± 47.39 ^{***} |
| MIL 200 mg/kg | 10 | 1 261.87 ± 73.82 ^{***} | 478.32 ± 48.43 ^{***} |

与 NS 组比较, [#] $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ 。

2.3 肺组织病理改变

光镜检查小鼠肺部病理学改变 (图 1), NS 组小鼠肺泡结构清晰, 肺泡内无渗液; LPS 组肺泡壁充血、

增厚, 肺间质及肺泡水肿, 大量炎性细胞浸润, 肺泡腔可见中性粒细胞及渗液; 各干预组肺损伤及肺水肿程度较 LPS 组减轻, 但以高剂量组减轻的更为明显。

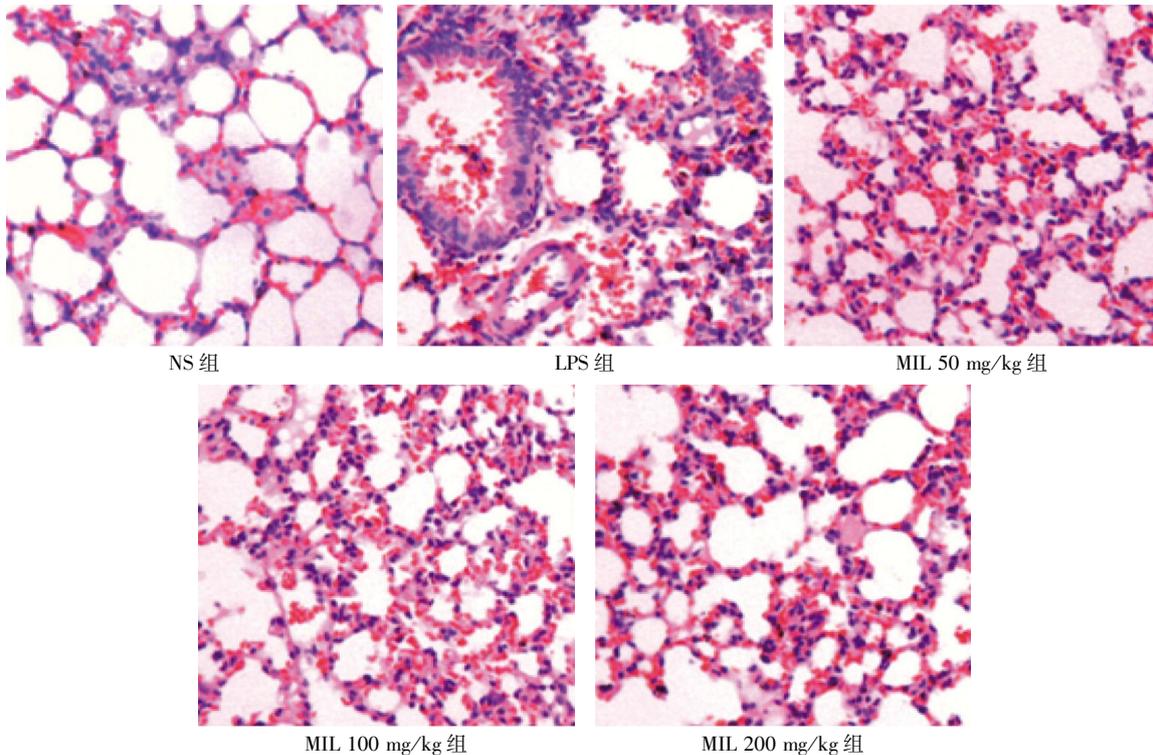


图 1 各组小鼠肺组织病理结果(HE, × 200)

Figure 1 Result of microscopic examination in lung of mice in each group(HE staining, × 200)

2.4 肺组织细胞中 NF-κBp65 表达的变化

肺组织行免疫组化染色 (图 2), NS 组肺泡细胞的细胞质内有 NF-κBp65 表达, 核表达阳性细胞较少; LPS 组除肺泡细胞胞质内有表达外, 核表达阳性细胞明显增多; 3 个干预组核表达阳性细胞较 LPS 组减少, 以高剂量组减少最为显著($P < 0.01$), 但是 3 个干预组间 NF-κBp65 表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

3 讨论

本研究中 LPS 组参照文献[10]气管内缓慢滴注 0.1 ml LPS(2 mg/kg)后, 光镜下可见肺间质及肺泡壁大量炎性细胞浸润, 肺泡腔可见中性粒细胞及渗液, 肺 W/D 升高, 说明小鼠内毒素性 ALI 模型制备成功。

IL-1β 和 TNF-α 被认为是 ALI 早期产生的、重

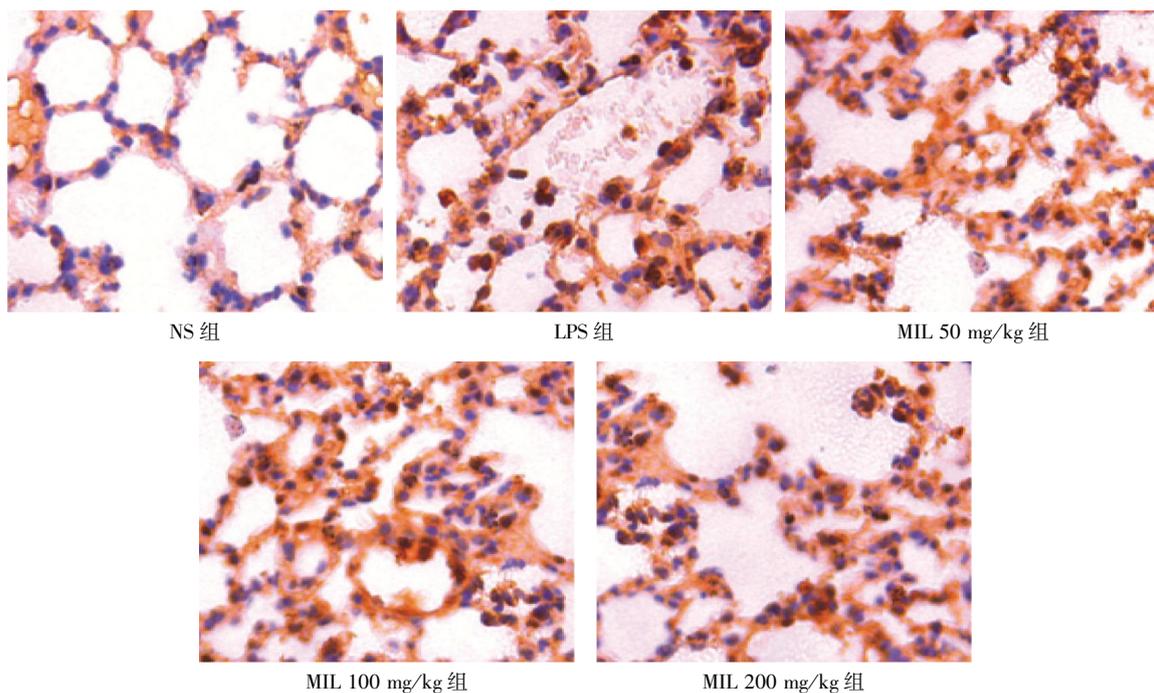


图 2 各组小鼠肺组织细胞中 NF-κBp65 的表达(SP,× 400)

Figure 2 Expression of NF-κBp65 in Lung tissue cells of mice in each group(SP staining,× 400)

要的炎症因子^[11-12]。它们主要由单核巨噬细胞识别信号后产生,产生后可激活肺的免疫细胞和非免疫细胞中的 NF-κB,产生细胞因子,启动和维持炎症级联反应^[13]。哺乳动物有 5 种转录因子 NF-κB 家族成员:p50(Rel A)、p50/105、c-Rel、p52/100 和 Rel B,它们均以二聚体形式存在,其中 p50、p65 是分布最广泛的异源二聚体。细胞处于静息状态时,p50、p65 通过与抑制蛋白 IκB 结合形成无活性的复合物存留于细胞质,当受各种信号刺激时,激活一系列酶,致使 IκB 降解,活化的 NF-κB 二聚体进入细胞核,与核内 DNA 上特定靶基因的结合域结合,从而调控相应基因的表达^[14]。研究表明 NF-κB 在炎症因子网络调控中起重要作用^[15-16]。NF-κB 被激活后可使 IL-1β、IL-6 生成增加^[4]。本研究结果表明,与 NS 组相比,LPS 组肺组织细胞核中 NF-κBp65 的表达和肺组织中 IL-1β、IL-6 的水平明显升高,说明内毒素性肺损伤时,级联放大的瀑布样炎症反应被激活,使肺微血管通透性增加,从而加重肺损伤;与 LPS 组相比,各干预组肺组织细胞核中 NF-κBp65 的表达和肺组织中 IL-1β、IL-6 的水平明显降低,提示 MIL 能抑制 NF-κBp65 的表达,减少 IL-1β、IL-6 产生,从而减轻内毒素性急性肺损伤。

MIL 是肉毒碱结构类似物,其作用部位在线粒体,它能竞争性抑制丁酰甜菜碱羟化酶,从而抑制肉毒碱的生物合成以及肉毒碱依赖的脂肪酸在线粒体

的转运,促使缺氧细胞的能量代谢从脂肪酸氧化转化为需氧量更少的葡萄糖氧化,即参与糖酵解过程^[17]。糖酵解产生的丙酮酸可以减少鼠体内氧自由基的生成^[18]。而细胞内过多的氧自由基,是细胞内许多有害信号通路如 ROS→MAPKs→IκB-NF-κB→NF-κB 的激活剂^[6]。NF-κB 被激活后,可转移到细胞核内,使前炎症因子和炎症因子如 IL-1β、IL-6 产生增多,产生的前炎症因子(IL-1β、TNF-α)又可以激活 NF-κB,从而产生更多的炎症因子,形成级联放大的炎症反应。而 MIL 可能通过减少细胞内氧自由基的产生,阻断 NF-κB 的激活,从而减少前炎症因子和炎症因子的生成,使炎症反应保持在一个较低水平。

为什么干预组间肺 W/D,肺组织细胞中 NF-κB p65 表达和肺组织中 IL-1β、IL-6 的水平差异无统计学意义,而病理切片结果显示高剂量组肺组织损伤明显减轻,这可能与 MIL 的膜保护作用有关^[19]。MIL 在低、中、高各剂量都有同等效力的抗炎症作用,但在高剂量时其膜保护作用可能表现得更显著。

综上所述,MIL 可减轻内毒素性急性肺损伤,可能与其下调 NF-κBp65 的表达,减少炎症细胞因子 IL-1β、IL-6 的生成有关。

[参考文献]

- [1] 叶任高,陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2005:143-147
- [2] 张秋金,沈洪,张维,等. 纳洛酮与甲基泼尼松龙联

用对急性肺损伤大鼠肺组织核转录因子-κB表达的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(6): 370-372

[3] Goodman RB, Pugin J, Lee JS, et al. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2003, 14(6): 523-535

[4] Rahman I, MacNee W. Oxidative stress and regulation of glutathione in lung inflammation [J]. Eur Respir J, 2000, 16(3): 534-554

[5] Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1987, 84(5): 1404-1407

[6] Zhao ZQ. Oxidative stress-elicited myocardial apoptosis during reperfusion [J]. Curr Opin Pharmacol, 2004, 4(2): 159-165

[7] Nedoshivin AO, Kutuzova AE, Perepech NB. Mildronate in combined treatment of chronic cardiac insufficiency [J]. Klin Med(Mosk), 1999, 77(3): 41-43

[8] Klusa V, Pupure J, Isajevs S, et al. Protection of azidothymidine-induced cardiopathology in mice by mildronate, a mitochondria-targeted drug [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2006, 99(4): 323-328

[9] Pupure J, Isajevs S, Skapare E, et al. Neuroprotective properties of mildronate, a mitochondria-targeted small molecule [J]. Neurosci Lett, 2010, 470(2): 100-105

[10] Wang F, Xia ZF, Chen XL, et al. Angiotensin II type-1 receptor antagonist attenuates LPS-induced acute lung injury [J]. Cytokine, 2009, 48(3): 246-253

[11] Hales CA, Elsasser TH, Ocampo P, et al. TNF-alpha in smoke inhalation lung injury [J]. J Appl Physiol, 1997, 82(5): 1433-1437

[12] Chen XL, Xia ZF, Ben DF, et al. Role of p38 mitogen-activated protein kinase in lung injury after burn trauma [J]. Shock, 2003, 19(5): 475-479

[13] Strieter RM, Kunkel SL, Keane MP, et al. Chemokines in lung injury [J]. Chest, 1999, 116(1): 103S-110S

[14] Chadwick CC, Chippari S, Matelan E, et al. Identification of pathwayselective estrogen receptor ligands that inhibit NF-κB transcriptional activity [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(7): 2543-2548

[15] Liu Y, Wu H, Nie YC, et al. Naringin attenuates acute lung injury in LPS-treated mice by inhibiting NF-κB pathway [J]. Int Immunopharmacol, 2011, 11(10): 1606-1612

[16] Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases [J]. N Engl J Med, 1997, 336(15): 1066-1071

[17] Kirimoto T, Nobori K, Asaka N, et al. Beneficial effect of MET-88, a gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor, on energy metabolism in ischemic dog hearts [J]. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1996, 331(2): 163-178

[18] Varma SD, Hegde K, Henein M. Oxidative damage to mouse lens in culture. Protective effect of pyruvate [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1621(3): 246-252

[19] Georges B, Le Borgne F, Galland S, et al. Carnitine transport into muscular cells. Inhibition of transport and cell growth by mildronate [J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59(11): 1357-1363

[收稿日期] 2011-11-07

喜 讯

本刊再次入编《中文核心期刊要目总览》2011 年版(第 6 版)之综合医药卫生类核心期刊,这是本刊连续 4 届被确定为中文核心期刊。