

• 论著 •

褪黑素抑制大鼠急性肺损伤时核转录因子- κ B 的表达

张俊毅 丁春华 凌亦凌 董彩凤 谭家庆 姜晓辉

【摘要】 目的 探讨褪黑素(MT)对大鼠急性肺损伤(ALI)时肺脏的保护作用及其可能机制。方法 将 96 只 SD 大鼠随机分为 4 组:对照组、脂多糖(LPS)组、地塞米松(DEX)和 MT 组,每组 24 只。采用气道内滴注 LPS 制备 ALI 大鼠模型;DEX 和 MT 干预采用腹腔注射。分别于给药后 3、6 和 12 h 活杀各组大鼠取肺组织标本,检测肺组织中髓过氧化物酶(MPO)和超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量;用免疫组化方法检测核转录因子- κ B(NF- κ B)在肺组织的表达。结果 LPS 组各时间点 SOD 活性较对照明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),而 MPO 活性与 MDA 含量以及 NF- κ B 的表达则显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);应用 MT 及 DEX 均能显著缓解上述变化($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);上述各指标以 6 h 变化最为显著,分别达到峰值或谷底。结论 MT 对 ALI 时肺脏的保护作用可能与 MT 清除自由基及抑制 NF- κ B 的激活有关。

【关键词】 褪黑素; 自由基; 核转录因子- κ B

Inhibitory effect of melatonin on the expression of nuclear factor- κ B during acute lung injury in rats

ZHANG Jun-yi*, DING Chun-hua, LING Yi-ling, DONG Cai-feng, TAN Jia-qing, XIAN Xiao-hui.

*Department of pathophysiology, The School of Basic Medical Science, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, Hebei, China

Corresponding author: DING Chun-hua (Email: dch54@sina.com)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of melatonin (MT) on lung tissue during acute lung injury (ALI) in rats and its possible mechanism. Methods Ninety-six Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: control group, lipopolysaccharide (LPS) group, dexamethasone (DEX) and MT treatment group, with 24 rats in each group. Rat model of ALI was established by instilling LPS intratracheally, and DEX and MT were injected intraperitoneally. All rats in each group were sacrificed at 3, 6 and 12 hours after intratracheal instillation of LPS, and lung tissue samples were harvested. Myeloperoxidase (MPO) activity, superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) contents in lung tissue samples were detected in each group. In addition, the expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) was assessed with immunohistochemistry staining in lung tissues. Results Compared with control group, SOD activity in LPS group decreased at different time points significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but MPO activity, MDA content and the expression of NF- κ B increased obviously ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); the administration of MT and DEX could mitigate above values significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The changes in above each indexes were most obvious at 6 hours, either reaching the peak or the trough, respectively. Conclusion MT possesses protective effect on lung tissues during ALI through scavenging free radicals and inhibiting the activation of NF- κ B.

【Key words】 melatonin; free radical; nuclear factor- κ B

急性肺损伤(ALI)的发病机制至今尚未完全阐明,多数学者认为肺部氧化/抗氧化失衡在 ALI 病程中起主要作用^[1];核转录因子- κ B(NF- κ B)的激活在 ALI 的发生发展中也扮演着重要角色^[2]。如能有效控制 NF- κ B 的活化及维持肺脏氧化/抗氧化的平衡,对 ALI 的治疗具有重要意义。已有研究表明,褪黑素(MT)具有抗氧化作用^[3],但对 MT 在抗 ALI

方面的报道甚少。本实验中拟探讨 MT 能否缓解大鼠 ALI 时肺组织的损伤及可能机制,以期为其临床应用提供理论基础和实验依据。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及模型制备:雄性 SD 大鼠 96 只,由河北省实验动物中心提供,体重 190~220 g,按随机数字表法分 4 组,每组 24 只。对照组:气管滴注无热源的生理盐水,每只 200 μ l,于给药前后 30 min,分别经腹腔注射溶媒(体积分数为 1%的乙醇生理盐水)1 ml/kg;脂多糖(LPS)组、地塞米松(DEX)组和 MT 组均经气管滴注等量 LPS(100 μ g/200 μ l),于给药前后 30 min 分别经腹腔注射溶媒 1 ml/kg、DEX 2 mg/kg 和 MT 10 mg/kg(MT 先被无水乙醇

基金项目:河北省科技基金资助项目(04276101D-65)

作者单位:050017 河北石家庄,河北医科大学基础医学院病理生理学教研室(张俊毅,于春华,凌亦凌,谭家庆,姜晓辉);024000 内蒙古赤峰,赤峰学院附属医院肿瘤外科(董彩凤)

通信作者:丁春华,硕士生导师,Email:dch54@sina.com

作者简介:张俊毅(1977-),男(汉族),内蒙古自治区人,硕士研究生,Email:dch54@sina.com。

溶解,再用生理盐水稀释,使乙醇的体积分数最终为 1%)^[4]。各组分别于给药后 3、6 和 12 h 处死动物,留取右肺下叶组织备检相应指标。

1.2 观察指标及方法:放血处死大鼠后,迅速摘取部分右肺下叶,于 4℃ 下进行组织匀浆,离心取上清液,分装后于 -70℃ 储存。

1.2.1 肺组织髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)活性与丙二醛(MDA)含量的测定:按试剂盒说明书要求进行操作。

1.2.2 肺组织病理学变化:常规制片,苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。

1.2.3 肺组织 NF-κB 表达和分布:采用免疫组化染色观察。一抗采用兔抗大鼠 NF-κB(p65)多克隆抗体,用生物素标记的二抗(羊抗兔)及辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素(SP)试剂盒检测;阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。光镜下观察以胞核中出现棕黄色颗粒为阳性信号,由 JEDA 801D 形态学图像分析系统对阳性染色进行定量分析。每组随机选取 5 张切片,每张又选取 5 个不重叠的视野(×400),测定免疫组化反应阳性颗粒的 A 值,并计算 5 个视野 A 值的均值以代表该切片的 NF-κB 表达量。

1.3 统计学处理:使用 SPSS 11.5 统计软件包,检测数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数比较用单因素方差分析,差异有统计学意义者用 SNK 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 MPO、SOD 活性与 MDA 含量的变化(表 1):LPS 组各时间点肺组织 MPO 活性及 MDA 含量均较对照组显著升高,且给药后 6 h 达到高峰(P 均 < 0.01);而 SOD 活性则明显降低,且 6 h 时活性最低(P 均 < 0.01)。应用 MT 及 DEX 均能显

著缓解上述变化($P < 0.05$ 或 < 0.01)。

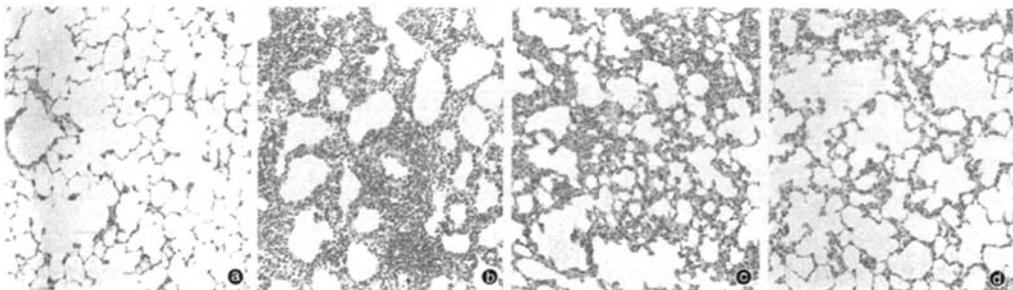
表 1 各组大鼠肺组织 MPO、SOD 活性与 MDA 含量及 NF-κB 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	MPO (U/g)	SOD (kU/g)	MDA (μmol/g)	NF-κB (A 值)
对照	3 h 组	8 2.2±0.2	115.6±5.8	2.4±0.2	0.27±0.04
	6 h 组	8 2.4±0.2	117.4±8.7	2.5±0.3	0.32±0.08
	12 h 组	8 2.3±0.3	114.3±5.1	2.5±0.2	0.26±0.06
LPS	3 h 组	8 3.5±0.2 ^b	89.2±5.6 ^b	6.8±1.4 ^b	0.85±0.21 ^b
	6 h 组	8 4.5±0.3 ^b	76.4±3.0 ^b	14.7±1.3 ^b	0.57±0.10 ^a
	12 h 组	8 4.0±0.1 ^b	88.4±3.2 ^b	10.4±2.7 ^b	0.58±0.11 ^b
DEX	3 h 组	8 2.6±0.4 ^c	99.5±3.3 ^c	4.6±1.1 ^c	0.29±0.09 ^d
	6 h 组	8 3.3±0.2 ^d	86.9±4.9 ^c	7.5±0.4 ^d	0.26±0.12 ^d
	12 h 组	8 3.2±0.3 ^c	100.1±5.9 ^d	7.5±1.8 ^c	0.33±0.13 ^c
MT	3 h 组	8 2.7±0.4 ^c	104.9±9.1 ^d	4.9±1.2 ^c	0.34±0.12 ^d
	6 h 组	8 3.3±0.3 ^d	89.1±6.6 ^c	6.7±0.9 ^d	0.27±0.09 ^d
	12 h 组	8 3.1±0.4 ^d	99.9±3.7 ^d	5.5±0.5 ^d	0.29±0.05 ^d

注:与对照组同期比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 LPS 组同期比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

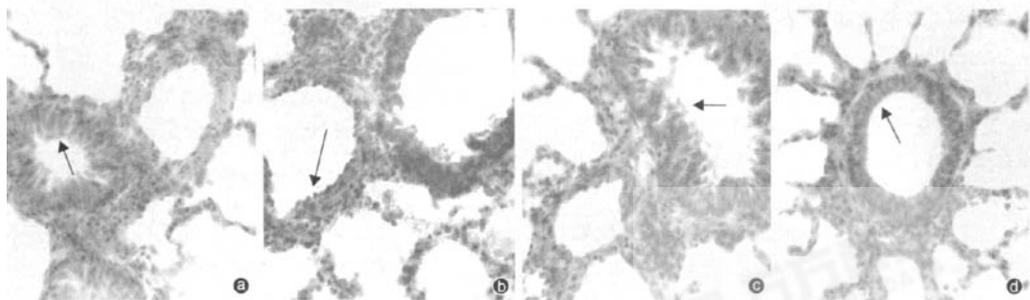
2.2 肺组织病理学观察(图 1):对照组大鼠肺泡结构清晰,肺泡壁薄。LPS 组各时间点均为肺泡间隔增宽,炎性细胞浸润,尤以 6 h 时炎症改变最明显。DEX 组和 MT 组的炎症改变较 LPS 组明显减轻,肺泡腔内渗出不明显,但个别区域炎症改变较突出。

2.3 肺组织 NF-κB 表达变化(表 1;图 2):对照组肺组织 NF-κB 表达的棕黄色阳性信号仅存在于气道黏膜上皮细胞,均为胞质阳性,且阳性信号较弱。LPS 组各时间点的阳性信号较对照组明显增强,3 h 时表达最强($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),主要分布在气道黏膜上皮细胞、浸润的炎性细胞和血管内皮细胞,很多细胞胞质与胞核均呈阳性。DEX 组和 MT 组 NF-κB 阳性细胞分布与 LPS 组类似,但胞核阳性的细胞显著减少,且阳性信号明显减弱($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),与对照组相比差异无统计学意义。



Ⓐ:对照组; Ⓑ:LPS 组; Ⓒ:DEX 组; Ⓓ:MT 组

图 1 光镜下观察各组大鼠给药 6 h 时肺组织病理学改变(HE, ×100)



①:对照组; ②:LPS组; ③:DEX组; ④:MT组;箭头示胞质和(或)胞核阳性
图 2 光镜下观察各组大鼠给药 3 h 时肺组织 NF-κB 表达(免疫组化, ×400)

3 讨论

中性粒细胞 (PMN) 于肺内大量聚集是 ALI 的重要发病环节^[5-6], 聚集的 PMN 一方面因机械阻塞导致肺循环障碍, 另一方面被激活的 PMN 通过“呼吸爆发”(respiratory burst) 释放出大量自由基, 进而导致 ALI 的发生。本实验结果也证实气管内滴注 LPS 后肺部存在大量聚集的 PMN, 且在 6 h 达高峰, 该时间点肺脏病理改变也最显著, 故推测病变早期 PMN 释放的自由基参与了 ALI 病情的发展。随时间推移, PMN 的浸润逐渐减轻, 随之而来的其他炎性细胞便成为损伤局部的重要效应细胞。MT 可显著减轻 ALI 时 PMN 的聚集, 其机制可能与 MT 作为抗氧化剂以抑制 NF-κB 的活化有关^[7]。本实验还通过检测 SOD 活性与 MDA 含量综合反映肺部的氧化应激状况。结果提示 ALI 时过量自由基可引发肺部明显的脂质过氧化反应, SOD 在清除自由基时不仅自身消耗严重, 而且结构也被自由基破坏, 故 SOD 活性在给药 6 h 时显著降低, 随后 SOD 活性又有一定程度升高, 这可能是机体的一种代偿性反应, 通过 SOD 的代偿性增加使氧自由基清除增多, 使后者对膜脂质的攻击减少, 进而使 MDA 含量在 12 h 时也呈下降趋势。MT 可通过清除自由基明显缓解 SOD 活性的下降与 MDA 含量的升高。有文献显示 MT 可能具有直接或通过调节抗氧化酶基因表达而间接清除氧自由基的能力^[8]。

LPS 组各时间点 NF-κB 表达较对照组显著增强, 且 3 h 时表达最强, 推测可能与 LPS 能快速而强烈地激活 NF-κB 有关, NF-κB 激活促进了大量促炎因子合成与释放, 引起炎症级联反应 (inflammatory cascade); MT 组各时间点 NF-κB 的表达显著低于 LPS 组, 尤其是胞核阳性的细胞明显减少, 说明 MT 还可通过抑制 NF-κB 的激活而参与对 ALI 时肺脏的保护。NF-κB 在细胞中的活性主要由其抑

制蛋白 (IκB) 控制, 当细胞处于静息状态时, NF-κB 与 IκB 结合在一起, 以无活性的形式存在于胞质中; 当有胞外信号 (如 LPS) 刺激时, NF-κB 即与 IκB 分离并进入胞核而发挥其生物学功能。MT 作为抗氧化剂已被证实具有抑制 NF-κB 活化的作用^[7], 且在一些炎症性疾病中取得了一定的保护效果。本研究中使用阳性药物对照 (DEX) 来进一步证明 MT 对肺组织的保护作用, 通过对比 MT 组和 DEX 组相应指标的变化, 提示本实验条件下 MT 与 DEX 对肺组织的保护效应无明显差异, 进一步说明了 MT 对 ALI 肺脏具有明显的保护作用。

参考文献

- [1] 金婧, 董苏红, 苏力, 等. 新生大鼠内毒素急性肺损伤肺组织 MDA、SOD 和 IL-10、IL-18 的改变[J]. 中国新生儿科杂志, 2004, 19(2): 69-72.
- [2] 郭振辉, 洪新, 毛宝龄, 等. 核转录因子-κB 活化在脓毒症急性肺损伤发病中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(6): 334-337.
- [3] 任清华, 胡森, 编译. 褪黑素对大鼠脓毒症时氧自由基引起的器官损伤具有保护作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(2): 75.
- [4] 张君岚, 刘艳梅, 王殿华, 等. IL-10 抗内毒素气管内滴注致急性肺损伤作用的实验研究[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(4): 324-326.
- [5] Calkins CM, Barsness K, Bensard DD, et al. Toll-like receptor-4 signaling mediates pulmonary neutrophil sequestration in response to gram-positive bacterial enterotoxin [J]. J Surg Res, 2002, 104(2): 124-130.
- [6] 季宪飞, 黄亮. 细胞黏附分子与急性肺损伤[J]. 中国危重病急救医学, 2004, 16(7): 444-446.
- [7] Surh YJ, Chun KS, Cha HH, et al. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals; down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF-kappaB activation [J]. Mutat Res, 2001, 480-481: 243-268.
- [8] Mayo JC, Sainz RM, Antoli I, et al. Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression [J]. Cell Mol Life Sci, 2002, 59(10): 1706-1713.

(收稿日期: 2007-12-31 修回日期: 2008-05-20)

(本文编辑: 李银平)