

胍丁胺对酵母多糖诱导急性肺损伤的器官保护作用

顾颖 范霞 张醇 杨雪 鲍依稀 梁华平

【摘要】 目的 探讨胍丁胺(AGM)对酵母多糖(ZYM)诱导小鼠全身炎症反应和急性肺损伤(ALI)时器官的保护作用。方法 将 32 只成年雄性 C57BL/6 小鼠按随机数字表法分为正常对照组[磷酸盐缓冲液(PBS)0.5 ml]、AGM 对照组(AGM 200 mg/kg)、模型组(ZYM 500 mg/kg+PBS 0.5 ml)、AGM 治疗组(ZYM 500 mg/kg+AGM 200 mg/kg)4 组,每组 8 只。AGM、ZYM、PBS 为腹腔注射。于给药 12 h 后采用酶联免疫吸附法(ELISA)测定血清和腹腔渗出液中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)及一氧化氮(NO)含量;同时测定肺组织中 TNF- α 、IL-6、髓过氧化物酶(MPO)活性和核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)的 DNA 结合活性,并观察肺组织病理改变。结果 ZYM 注射后 12 h 小鼠精神萎靡、活动减少、饮水减少;而 AGM 治疗组小鼠精神状况、活动、饮水均好转。AGM 治疗能降低 ZYM 诱导的血清及腹腔渗出液的 TNF- α (ng/L; 252.6 \pm 32.1 比 421.7 \pm 76.7, 295.7 \pm 78.6 比 592.0 \pm 84.3, 均 P <0.05)、IL-6 (ng/L; 2198.8 \pm 281.8 比 4725.3 \pm 615.4, 19829.3 \pm 3647.0 比 47751.3 \pm 5264.8, 均 P <0.05)和 NO (μ mol/L; 33.2 \pm 4.3 比 50.2 \pm 5.2, 14.0 \pm 3.6 比 45.4 \pm 5.2, 均 P <0.05)水平升高;AGM 治疗也能够抑制 ZYM 引起的肺组织 TNF- α (ng/L; 245.7 \pm 39.1 比 378.3 \pm 67.6, P <0.05)、IL-6 (ng/L; 810.3 \pm 175.6 比 1172.4 \pm 203.3, P <0.05)、MPO 活性 (ng/mg; 24.9 \pm 4.4 比 37.3 \pm 5.8, P <0.05)和 NF- κ B p65 (吸光度值; 0.272 \pm 0.029 比 0.347 \pm 0.037, P <0.05)升高。正常对照组和 AGM 对照组间各指标无明显差异。ZYM 可导致肺组织出现严重的炎症改变,包括血管扩张、中性粒细胞浸润;AGM 治疗后肺组织损伤明显减轻。结论 AGM 能够缓解 ZYM 诱导的小鼠全身炎症反应和 ALI 的严重程度。

【关键词】 胍丁胺; 酵母多糖; 肺损伤,急性; 炎症; 细胞因子

The protective effects of agmatine in zymosan induced acute lung injury in mice GU Ying*, FAN Xia, ZHANG Chun, YANG Xue, BAO Yi-xi, LIANG Hua-ping. * Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China
Corresponding author: BAO Yi-xi, Email: yixiba@163.com

【Abstract】 **Objective** To examine the protective effects of agmatine (AGM) administration on zymosan (ZYM)-induced inflammatory response and acute lung injury (ALI) in mice. **Methods** 32 adult male C57BL/6 mice were randomly divided into four groups ($n=8$ each) to receive i. p. administration of: ① phosphate buffer saline (PBS, 0.5 ml); ② AGM (200 mg/kg); ③ ZYM (500 mg/kg)+PBS (0.5 ml), and ④ AGM (200 mg/kg)+ZYM (500 mg/kg). Blood samples and peritoneal exudates were collected from the animals 12 hours after drug administration for concentration of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and nitric oxide (NO) by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Lung tissue samples were also collected at the same time for histological examination, and determination of tissue content of TNF- α , IL-6, myeloperoxidase (MPO) activity and nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65) DNA-binding activity. **Results** 12 hours after ZYM injection, the treated mice became lethargic, their activity and water consumption were both reduced, AGM greatly improved the general status, activity, and water consumption in treated mice, while attenuated the increase of TNF- α (ng/L; 252.6 \pm 32.1 vs. 421.7 \pm 76.7, 295.7 \pm 78.6 vs. 592.0 \pm 84.3, both P <0.05), IL-6 (ng/L; 2198.8 \pm 281.8 vs. 4725.3 \pm 615.4, 19829.3 \pm 3647.0 vs. 47751.3 \pm 5264.8, both P <0.05) and NO (μ mol/L; 33.2 \pm 4.3 vs. 50.2 \pm 5.2, 14.0 \pm 3.6 vs. 45.4 \pm 5.2, both P <0.05) in serum and peritoneal exudates caused by ZYM. AGM also attenuated the increase of TNF- α (ng/L; 245.7 \pm 39.1 vs. 378.3 \pm 67.6, P <0.05), IL-6 (ng/L; 810.3 \pm 175.6 vs. 1172.4 \pm 203.3, P <0.05), MPO activity (ng/mg; 24.9 \pm 4.4 vs. 37.3 \pm 5.8, P <0.05) and NF- κ B p65 optical density (absorbance value; 0.272 \pm 0.029 vs. 0.347 \pm 0.037, P <0.05) in the lung tissue seen in ZYM treated animals. There was no significant difference between normal PBS and AGM treated group in all the indexes examined. Histological examination demonstrated that ZYM treated animals had severe inflammatory reaction in lung tissues (manifested as vasodilatation and neutrophils infiltration) and AGM significantly reduced such injury. **Conclusion** AGM can attenuate the ALI and inflammation induced by ZYM in mice.

【Key words】 Agmatine; Zymosan; Acute lung injury; Inflammation; Cytokine

多器官功能障碍综合征(MODS)是重症监护病房(ICU)患者的主要死因。在 MODS 的发生发展过程中,肺组织常常是第一个受累的器官,全身炎症反应综合征(SIRS)是导致 MODS 发生发展的一个重要机制^[1]。在许多动物模型中,酵母多糖(ZYM)均作为诱导 SIRS/MODS 的工具^[2-4]。ZYM 通过诱导产生大量的炎症介质,导致急性腹膜炎和 MODS,具有代表性的是肝、肺、小肠、肾脏结构和功能改变^[5]。Cuzzocrea 等^[6]报道 ZYM 在 18 h 内便可诱导腹膜炎和 MODS,其诱导腹腔炎症应答的开始与全身低血压、腹腔腔和血浆一氧化氮(NO)高水平、大量白细胞浸润、渗出液形成、环氧合酶活化以及促炎因子产生相关。胍丁胺(AGM)对咪唑啉受体和 $\alpha 2$ 肾上腺素能受体有高度的亲和力^[7],是 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂^[8],具有多种生物学活性,其中非常重要的一项是它的抗炎作用。但是 AGM 在器官功能损伤时是否对器官具有保护作用尚不清楚。本研究旨在观察 AGM 对 ZYM 诱导小鼠的 SIRS 和急性肺损伤(ALI)的效果。

1 材料与方法

1.1 药物和试剂:胍丁胺硫酸盐(纯度 $\geq 97\%$)及 ZYM 均购自美国 Sigma 公司;总 NO 检测试剂盒为上海碧云天生物技术有限公司产品,小鼠白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,髓过氧化物酶(MPO)试剂盒购自美国 USCNK 公司,核转录因子- κ B(NF- κ B)p65 转录试剂盒购自美国 Active Motif 公司,核蛋白、胞质蛋白及全蛋白提取试剂盒均为南京凯基生物产品。

1.2 实验动物分组及 ALI 模型复制:清洁级雄性成年 C57BL/6 小鼠,体重 20~22 g,购自第三军医大学大坪医院实验动物中心,动物合格证号:SCXK(军)2007-018。按照随机数字表法将 32 只小鼠分为正常对照组、AGM 对照组、模型组、AGM 治疗组,每组 8 只。药物均采用腹腔注射,正常对照组给予磷酸盐缓冲液(PBS)0.5 ml;AGM 对照组给予 AGM 200 mg/kg(终体积 0.5 ml);模型组给予 ZYM 500 mg/kg(终体积 0.5 ml);AGM 治疗组

给予 ZYM 500 mg/kg+AGM 200 mg/kg(终体积 0.5 ml)。所有药物使用无菌 PBS 配制,术后动物自由饮水,采血前 6 h 禁食。实验过程中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 检测指标与方法:制模成功后 12 h 观察小鼠状态;采用摘眼球取血方法采血;拉颈处死小鼠,灌洗腹腔渗出液;取肺组织用多聚甲醛溶液固定,-70 °C 冰箱保存备检。

1.3.1 腹腔渗出液、血清及肺组织 TNF- α 、IL-6、NO、MPO 测定:采用 ELISA 法,严格按照试剂盒说明书操作。

1.3.2 NF- κ B p65 活性:使用胞质、胞核蛋白抽提试剂盒提取肺组织核蛋白,按 NF- κ B p65 转录试剂盒说明书操作。

1.3.3 肺组织病理学观察:将肺组织用多聚甲醛溶液固定 24 h,经梯度乙醇脱水后包埋,组织切片(厚 5 μ m),二甲苯脱蜡后苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察。

1.4 统计学分析:各实验至少重复 3 次,应用 SPSS 13.0 软件处理数据,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用单因素方差分析和 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况:正常对照组和 AGM 对照组小鼠精神状态正常,自由活动,饮食、饮水正常。模型组小鼠明显呈病态表现,呼吸困难、腹泻、昏睡、蜷缩成一团、眼部分泌物增多、食欲下降、饮水减少等。AGM 治疗组小鼠病态表现较模型组有所缓解。

2.2 腹腔渗出液 TNF- α 、IL-6、NO 含量(表 1):模型组和 AGM 治疗组腹腔渗出液 TNF- α 、IL-6、NO 均较正常对照组和 AGM 对照组升高(均 $P < 0.05$);AGM 治疗组 TNF- α 、IL-6、NO 均较模型组降低(均 $P < 0.05$);正常对照组与 AGM 对照组之间无明显差异。

表 1 各组小鼠腹腔渗出液中 TNF- α 、IL-6、NO 含量比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	TNF- α (ng/L)	IL-6(ng/L)	NO(μ mol/L)
正常对照组	8	12.3 \pm 4.1	790.4 \pm 604.3	1.9 \pm 0.4
AGM 对照组	8	6.9 \pm 3.6	1 043.9 \pm 667.2	1.2 \pm 0.4
模型组	8	592.0 \pm 84.3 ^a	47 751.3 \pm 5 264.8 ^a	45.4 \pm 5.2 ^a
AGM 治疗组	8	295.7 \pm 78.6 ^{ab}	19 829.3 \pm 3 647.0 ^{ab}	14.0 \pm 3.6 ^{ab}

注:TNF- α ,肿瘤坏死因子- α ,IL-6,白细胞介素-6,NO,一氧化氮,AGM,胍丁胺,与正常对照组和 AGM 对照组比较,^a $P < 0.05$;与模型组比较,^b $P < 0.05$

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.11.008

基金项目:创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室项目(SKLZZ200802)

作者单位:400010 重庆医科大学附属第二医院检验科(顾颖、鲍依希);第三军医大学大坪医院野战外科研究所一室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室(范霞、张醇、杨雪、梁华平)

通信作者:鲍依希,Email,yixibao@163.com

2.3 血清 TNF- α 、IL-6、NO 含量(表 2):与正常对照组和 AGM 对照组比较,模型组和 AGM 治疗组血清 IL-6、TNF- α 、NO 含量均显著升高(均 $P < 0.05$);AGM 治疗能明显缓解 ZYM 引起的 IL-6、TNF- α 、NO 升高(均 $P < 0.05$);正常对照组与 AGM 对照组之间无明显差异。

表 2 各组小鼠血清 TNF- α 、IL-6、NO 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TNF- α (pg/ml)	IL-6(ng/L)	NO(μ mol/L)
正常对照组	8	19.7 \pm 6.7	227.8 \pm 63.8	20.9 \pm 3.4
AGM 对照组	8	22.2 \pm 7.6	288.6 \pm 81.7	18.0 \pm 2.3
模型组	8	421.7 \pm 76.7 ^a	4 725.3 \pm 615.4 ^a	50.2 \pm 5.2 ^a
AGM 治疗组	8	252.6 \pm 32.1 ^{ab}	2 198.8 \pm 281.8 ^{ab}	33.2 \pm 4.3 ^{ab}

注:TNF- α ,肿瘤坏死因子- α ,IL-6,白细胞介素-6,NO,一氧化氮,AGM,胍丁胺;与正常对照组和 AGM 对照组比较,^a $P < 0.05$,与模型组比较,^b $P < 0.05$

2.4 肺组织 TNF- α 、IL-6、MPO 和 NF- κ B p65 活性(表 3):与两个对照组相比,模型组和 AGM 治疗组肺组织 TNF- α 、IL-6、MPO 和 NF- κ B p65 活性均明显升高(均 $P < 0.05$);AGM 治疗组各指标则均较模型组明显降低(均 $P < 0.05$);正常对照组与 AGM 治疗组之间无明显差异。

表 3 各组小鼠肺组织 TNF- α 、IL-6、MPO 及 NF- κ B 活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	TNF- α (ng/L)	IL-6(ng/L)	MPO(ng/mg)	NF- κ B p65 活性(A 值)
正常对照组	8	167.3 \pm 23.4	580.3 \pm 35.3	12.2 \pm 2.7	0.081 \pm 0.023
AGM 对照组	8	149.3 \pm 39.2	600.1 \pm 37.9	11.4 \pm 2.1	0.076 \pm 0.012
模型组	8	378.3 \pm 67.6 ^a	1 172.4 \pm 203.3 ^a	37.3 \pm 5.8 ^a	0.347 \pm 0.037 ^a
AGM 治疗组	8	245.7 \pm 39.1 ^{ab}	810.3 \pm 175.6 ^{ab}	24.9 \pm 4.4 ^{ab}	0.272 \pm 0.029 ^{ab}

注:TNF- α ,肿瘤坏死因子- α ,IL-6,白细胞介素-6,MPO,髓过氧化物酶,NF- κ B,核转录因子- κ B,AGM,胍丁胺;与正常对照组和 AGM 对照组比较,^a $P < 0.05$,与模型组比较,^b $P < 0.05$

2.5 肺组织病理学改变(图 1):模型组大鼠注射 ZYM 12 h 后,肺脏切片显示血管扩张、红细胞渗出

及中性粒细胞浸润;AGM 治疗后可明显减轻肺组织的损伤;正常对照组和 AGM 对照组肺组织无病理学改变。

3 讨论

之前的许多研究都表明 AGM 能够减低炎症应答,例如在不同动物模型中,AGM 能够减少炎症诱导的脊髓伤害反射^[9]、神经性疼痛^[10]。但是 AGM 对全身炎症及器官功能损害是否具有保护作用,至今未见有文献报道。

ZYM 是酵母菌细胞壁的多糖成分,它与巨噬细胞的 Toll 样受体 2 结合,导致 NF- κ B 的活化并诱导促炎因子的产生^[11]。TNF- α 、IL-6 是 NF- κ B 诱导的典型促炎因子^[12]。TNF- α 是 ALI 早期重要的促炎因子^[13]。有研究表明,TNF- α 过度分泌可导致机体过强的炎症反应,引起血管通透性增强、血流动力学紊乱及微循环障碍,最终导致 MODS^[14];同时引起肺泡毛细血管内皮细胞及上皮细胞损伤,导致肺泡水肿、出血,从而引起 ALI^[15]。本研究结果显示,注射 ZYM 后小鼠腹腔渗出液、血液和肺组织中 TNF- α 、IL-6 升高,表明 ZYM 引起了全身炎症和肺组织的炎症,而 AGM 抑制了 IL-6、TNF- α 等促炎因子的产生,从而抑制 ZYM 引起的全身炎症、腹腔渗出液形成和炎性细胞浸润等。说明 AGM 能够逆转 ZYM 引起的促炎因子释放,对全身炎症及肺组织损伤具有保护作用。

中性粒细胞在炎症和休克的发展中扮演重要角色,其中包括 ZYM 诱导的非感染性休克。MPO 特异地存在于粒细胞的溶酶体中,因此能够直接反映中性粒细胞的多少^[16]。本研究结果显示,ZYM 引起肺组织中 MPO 活性显著增加,导致 ALI;AGM 能够降低肺组织 MPO 活性,减轻 ZYM 引起的肺组织中性粒细胞浸润。这与庞庆丰等^[17]报道的组织中 MPO 可反映组织中炎症介质的释放及炎症反应的程度相一致。表明减少中性粒细胞的募集是 AGM

图 1 光镜下观察各组小鼠肺组织病理改变 正常对照组(a)和胍丁胺(AGM)对照组(b)肺组织结构基本正常,无病理改变;模型组(c)可见明显的血管扩张、充血,炎性细胞浸润;AGM 治疗组(d)病理改变较模型组(c)明显减轻 HE $\times 400$

发挥抗炎效果的另一个机制。

正常小鼠或单独使用 AGM 刺激的小鼠血清中 NO 含量是很低的, ZYM 刺激的小鼠血清中 NO 含量明显上升。NO 是一种活性氮族, 在发生严重疾病时可通过多种机制例如膜脂质过氧化反应, 直接或间接导致细胞和组织损伤^[16]。NO 由一氧化氮合酶 (NOS) 产生, 相对少量的 NO 即可引起有害的生理学过程。AGM 是 NOS 的抑制剂, 通过抑制 NOS 来达到抑制 NO 合成的目的^[19]。与我们期望的一样, ZYM 处理的小鼠血清和腹腔渗出液中 NO 水平明显升高, 而 AGM 治疗组则明显减少。说明 AGM 通过抑制 NOS 减少了 NO 的产生, 从而发挥其抗炎效应。

综上, 本研究中证实 ZYM 腹腔注射可导致全身炎症反应和 ALI; 而 AGM 在体内能够有效缓解 ZYM 诱导的实验性小鼠全身炎症反应和 ALI 的严重程度, 减少中性粒细胞在肺组织中的浸润以及促炎因子和活性氮族的产生等。AGM 抑制炎症过程可能是通过抑制 NF-κB 活化进而抑制局部和全身 TNF-α、IL-6 产生并且降低中性粒细胞浸润来实现的, AGM 抑制 NF-κB 活化的分子机制还不明确, 需要进一步实验来证实。

参考文献

[1] 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症研究的若干新动态. 中国危重病急救医学, 2000, 12, 323-325.

[2] Goris RJ, Boekholtz WK, van Bebber IP, et al. Multiple-organ failure and sepsis without bacteria, an experimental model. Arch Surg, 1986, 121, 897-901.

[3] Di Paola R, Galuppo M, Mazzon E, et al. PD98059, a specific MAP kinase inhibitor, attenuates multiple organ dysfunction syndrome/failure (MODS) induced by zymosan in mice. Pharmacol Res, 2010, 61, 175-187.

[4] Hung ND, Kim MR, Sok DE. Mechanisms for anti-inflammatory effects of 1-[15 (S)-hydroxyeicosapentaenoyl] lysophosphatidylcholine, administered intraperitoneally, in zymosan A-induced peritonitis. Br J Pharmacol, 2011, 162, 1119-1135.

[5] Volman TJ, Goris RJ, van der Jagt M, et al. Organ damage in zymosan-induced multiple organ dysfunction syndrome in mice is not mediated by inducible nitric oxide synthase. Crit Care Med, 2002, 30, 1553-1559.

[6] Cuzzocrea S, De Sarro G, Costantino G, et al. Role of interleukine-6 in a non-septic shock model induced by zymosan. Eur Cytokine Netw, 1999, 10, 191-203.

[7] Piletz JE, Chikkala DN, Ernberger P. Comparison of the properties of agmatine and endogenous clonidine-displacing substance at imidazoline and alpha-2 adrenergic receptors. J Pharmacol Exp Ther, 1995, 272, 581-587.

[8] Yang XC, Reis DJ. Agmatine selectively blocks the N-methyl-

D-aspartate subclass of glutamate receptor channels in rat hippocampal neurons. J Pharmacol Exp Ther, 1999, 288, 544-549.

[9] Bradley KJ, Headley PM. Effect of agmatine on spinal nociceptive reflexes, lack of interaction with alpha2-adrenoceptor or muopioid receptor mechanisms. Eur J Pharmacol, 1997, 331, 133-138.

[10] Onal A, Delen Y, Ulker S, et al. Agmatine attenuates neuropathic pain in rats, possible mediation of nitric oxide and noradrenergic activity in the brainstem and cerebellum. Life Sci, 2003, 73, 413-428.

[11] Frasnelli ME, Tarussio D, Chobaz-Péclat V, et al. TLR2 modulates inflammation in zymosan-induced arthritis in mice. Arthritis Res Ther, 2005, 7, R370-379.

[12] Tian B, Brasier AR. Identification of a nuclear factor kappa B-dependent gene network. Recent Prog Horm Res, 2003, 58, 95-130.

[13] 王进, 杨光田, 乔礼芬, 等. 醒脑静注射液对内毒素诱导大鼠肺泡巨噬细胞核转录因子-κB 激活和细胞因子产生的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15, 212-215.

[14] 吴洁莹, 杨皓庄, 张穗梅, 等. 氯胺酮对腹腔感染脓毒症小鼠死亡率和肿瘤坏死因子-α 的影响. 中国危重病急救医学, 2002, 14, 273-275.

[15] 施梦, 曹同瓦, 白春学. 急性肺损伤的药物疗法研究进展. 中国危重病急救医学, 2008, 20, 634-637.

[16] Cuzzocrea S, Rossi A, Pisano B, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates the development of organ failure induced by zymosan in mice. Intensive Care Med, 2003, 29, 2016-2025.

[17] 庞庆丰, 徐文莉, 何俊, 等. 谷氨酰胺对内毒素血症大鼠肠道损伤的保护作用及对血红素加氧酶-1 表达的影响. 中国危重病急救医学, 2011, 23, 95-98.

[18] Cuzzocrea S, Imperatore F, Costantino G, et al. Role of hyperbaric oxygen exposure in reduction of lipid peroxidation and in multiple organ failure induced by zymosan administration in the rat. Shock, 2000, 13, 197-203.

[19] Auguet M, Viossat I, Marin JG, et al. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase by agmatine. Jpn J Pharmacol, 1995, 69, 285-287.

(收稿日期, 2011-09-29)

(本文编辑, 李银平)

• 广告目次 •

- ①深圳迈瑞: 监护仪 (封二)
- ②天津生化制药: 琥珀氢可 (插页)
- ③德尔格: Smart Care™智能化自动脱机系统 (插页)
- ④恩华药业: 力月西 (插页)
- ⑤天津红日药业: 血必净注射液 (插页)
- ⑥广东天普药业: 天普洛安 (插页)
- ⑦珠海健帆: 血液灌流器 (插页)
- ⑧南京臣功药业有限公司 (插页)
- ⑨第一制药: 克倍宁 (封三)
- ⑩江苏新晨医药有限公司 (封底)