

# 咪唑克生对内毒素攻击小鼠体内及体外活化巨噬细胞炎性介质释放的抗炎效应

李香琴 朱俊宇 马妮 罗莉 梁华平

610500 四川成都,成都医学院基础医学院(李香琴、梁华平);400042 重庆,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(朱俊宇、马妮、罗莉、梁华平)

通讯作者:梁华平,Email:13638356728@163.com

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.05.013

**【摘要】** 目的 观察咪唑克生(IDA)对内毒素脂多糖(LPS)攻击小鼠体内以及体外活化巨噬细胞的抗炎效应,探讨其可能的分子机制。方法 体内实验:将30只成年雄性C57BL/6小鼠按随机数字表法分为对照组、模型组及IDA低、中、高剂量组(IDA-L、IDA-M、IDA-H组),每组6只。采用腹腔注射LPS 10 mg/kg制备炎症模型,对照组注射等量生理盐水;IDA各组制模同时相应注射IDA 0.3、1.0、3.0 mg/kg进行干预。于制模后6 h取血备检。体外实验:收集20只成年雄性C57BL/6小鼠原代腹腔巨噬细胞,分为空白组、LPS组(10 mg/L)及LPS+IDA-L、IDA-M、IDA-H组(10 mg/L LPS + 5、25、100  $\mu$ mol/L IDA),于24 h收集培养上清备检。检测方法:采用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)及一氧化氮(NO)含量;采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)测定IDA对巨噬细胞核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)表达的影响。结果 ① 体内实验:模型组血清TNF- $\alpha$  (ng/L:403.96 $\pm$ 40.98比17.50 $\pm$ 8.68)、IL-6(ng/L:61400.31 $\pm$ 7826.61比2436.30 $\pm$ 448.89)均较对照组显著升高(均 $P<0.01$ );IDA能剂量依赖性抑制炎症因子的升高,以IDA-H组尤甚[TNF- $\alpha$  (ng/L):170.09 $\pm$ 28.53比403.96 $\pm$ 40.98,IL-6(ng/L):16570.81 $\pm$ 1083.65比61400.31 $\pm$ 7826.61,均 $P<0.01$ ]。② 体外实验:与空白组比较,LPS组巨噬细胞分泌炎症因子量明显增加[TNF- $\alpha$  (ng/L):7259.14 $\pm$ 320.70比28.50 $\pm$ 27.08,IL-6(ng/L):14809.60 $\pm$ 5852.73比1113.47 $\pm$ 465.53,MCP-1(ng/L):20847.37 $\pm$ 1788.33比447.37 $\pm$ 395.69,NO( $\mu$ mol/L):1900.00 $\pm$ 144.31比603.03 $\pm$ 102.18,均 $P<0.01$ ];IDA能剂量依赖性抑制上述因子的分泌,以LPS+IDA-H组作用尤甚[TNF- $\alpha$  (ng/L):784.40 $\pm$ 281.90比7259.14 $\pm$ 320.70,IL-6(ng/L):1802.96 $\pm$ 1534.18比14809.60 $\pm$ 5852.73,MCP-1(ng/L):2005.26 $\pm$ 1534.28比20847.37 $\pm$ 1788.33,NO( $\mu$ mol/L):654.54 $\pm$ 150.21比1900.00 $\pm$ 144.31,均 $P<0.05$ ]。100  $\mu$ mol/L IDA可使巨噬细胞NF- $\kappa$ Bp65入核提前至15 min且表达明显增加(灰度值:18.70 $\pm$ 2.29比1.09 $\pm$ 0.36, $P<0.05$ ),但可减少NF- $\kappa$ Bp50核内表达,45 min时差异显著(灰度值:1.99 $\pm$ 0.14比2.94 $\pm$ 0.54, $P<0.05$ )。结论 IDA能明显减轻LPS攻击小鼠的炎症反应并抑制巨噬细胞分泌炎症因子,且呈剂量依赖性,以100  $\mu$ mol/L高浓度的抗炎效应最明显,其抗炎作用可能与NF- $\kappa$ B信号途径有关。

**【关键词】** 咪唑克生; 内毒素; 巨噬细胞; 抗炎作用; 分子机制

**基金项目:** 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2012CB518102);国家重点实验室项目(BWS11J038)

**The anti-inflammatory effects of idazoxan on inflammatory mediator release in endotoxin-challenged mice *in vivo* and activated macrophages *in vitro*** Li Xiangqin, Zhu Junyu, Ma Wei, Luo Li, Liang Huaping

The Basic Medical College of Chengdu Medical College, Chengdu 610500, Sichuan, China (Li XQ, Liang HP); State Key Laboratory of Trauma, Burn and Combined Injury, Research Institute of Surgery and Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China (Zhu JY, Ma W, Luo L, Liang HP)

Corresponding author: Liang Huaping, Email: 13638356728@163.com

**【Abstract】 Objective** To study the anti-inflammatory effects of idazoxan (IDA) on endotoxin lipopolysaccharide (LPS) challenged mice *in vivo* and activated macrophages *in vitro*, and explore its potential molecular mechanisms. **Methods** To do the experiments *in vivo*, 30 adult male C57BL/6 mice were randomly divided into control group, model group, and low, medium and high doses IDA groups (IDA-L, IDA-M, and IDA-H groups),  $n = 6$  in each group. The inflammatory model was reproduced by intraperitoneal injection of LPS 10 mg/kg, and the control group was injected with the same amount of normal saline. The IDA groups received LPS (10 mg/kg) and IDA 0.3, 1.0 and 3.0 mg/kg, respectively. The blood samples of mice in each group were collected at 6 hours after the reproduction of the model.

For the *in vitro* experiments, primary peritoneal macrophages were collected from 20 adult male C57BL/6 mouse cells and they were divided into control group, LPS group (10 mg/L) and LPS+IDA-L, IDA-M, IDA-H groups (10 mg/L LPS + 5, 25, 100  $\mu$ mol/L IDA, respectively). Cell culture supernatants were collected at 24 hours after the reproduction of the model. Detection methods: enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to determine the levels of serum tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) and nitric oxide (NO). Western Blot was used to determine the effect of IDA on the expression levels of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) in macrophages. **Results** ① For the *in vivo* experiment, the serum levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly elevated in the model group as compared with those in the control group [TNF- $\alpha$  (ng/L): 403.96  $\pm$  40.98 vs. 17.50  $\pm$  8.68; IL-6 (ng/L): 61 400.31  $\pm$  7 826.61 vs. 2 436.30  $\pm$  448.89; both  $P < 0.01$ ]. IDA treatment could inhibit the elevation of inflammatory cytokines in a dose-dependent manner, with the most significant decrease in LPS+IDA-H group [TNF- $\alpha$  (ng/L): 170.09  $\pm$  28.53 vs. 403.96  $\pm$  40.98, IL-6 (ng/L): 16 570.81  $\pm$  1 083.65 vs. 61 400.31  $\pm$  7 826.61; both  $P < 0.01$ ]. ② For the *in vitro* experiment, the levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1, and NO secreted by LPS-stimulated macrophages were distinctly higher in the LPS group than those in the control group [TNF- $\alpha$  (ng/L): 7 259.14  $\pm$  320.70 vs. 28.50  $\pm$  27.08, IL-6 (ng/L): 14 809.60  $\pm$  5 852.73 vs. 1 113.47  $\pm$  465.53, MCP-1 (ng/L): 20 847.37  $\pm$  1 788.33 vs. 447.37  $\pm$  395.69, NO ( $\mu$ mol/L): 1 900.00  $\pm$  144.31 vs. 603.03  $\pm$  102.18; all  $P < 0.01$ ]. However, IDA intervention could lower the secretion of TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 and NO in a dose-dependent manner, with the most notable decrease in the LPS+IDA-H group [TNF- $\alpha$  (ng/L): 784.40  $\pm$  281.90 vs. 7 259.14  $\pm$  320.70, IL-6 (ng/L): 1 802.96  $\pm$  1 534.18 vs. 14 809.60  $\pm$  5 852.73, MCP-1 (ng/L): 2 005.26  $\pm$  1 534.28 vs. 20 847.37  $\pm$  1 788.33, NO ( $\mu$ mol/L): 654.54  $\pm$  150.21 vs. 1 900.00  $\pm$  144.31; all  $P < 0.05$ ]. In addition, IDA at the concentration of 100  $\mu$ mol/L could promote the translocation of NF- $\kappa$ Bp65 in macrophages into the nucleus 15 minutes early and lead to increased NF- $\kappa$ Bp65 expression (gray value: 18.70  $\pm$  2.29 vs. 1.09  $\pm$  0.36,  $P < 0.05$ ), but significantly reduce the expression levels of NF- $\kappa$ Bp50 in the nucleus at 45 minutes after treatment (gray value: 1.99  $\pm$  0.14 vs. 2.94  $\pm$  0.54,  $P < 0.05$ ). **Conclusions** IDA could significantly reduce inflammation of mice challenged with LPS and inhibit inflammatory cytokines and mediators secreted by macrophage in a dose-dependent manner. High concentration of IDA (100  $\mu$ mol/L) exhibited the greatest anti-inflammatory effects. The anti-inflammatory effect of IDA may be worked through NF- $\kappa$ B signaling pathway.

**【Key words】** Idazoxan; Endotoxin; Macrophage; Anti-inflammation; Molecular mechanism

**Fund program:** National Key Basic Research Program of China (973 Program) (2012CB518102); State Key Laboratory Project of Trauma, Burns and Combined Injury of China (BWS11J038)

炎症是机体对损伤因子产生的防御反应,在疾病的发生发展过程中发挥着重要作用,过度的炎症反应将导致机体免疫失衡、多器官功能障碍综合征(MODS),甚至威胁患者生命。如能有效抑制炎症细胞的激活,减少炎症介质的释放,就能避免过度的炎症反应带来的机体损伤。咪唑克生(IDA)被认为是非特异性的咪唑啉受体(IR)拮抗剂和 $\alpha_2$ -肾上腺素能受体拮抗剂<sup>[1]</sup>,还有人认为它是咪唑啉II受体(I<sub>2</sub>R)的配基和 $\alpha_2$ 受体拮抗剂<sup>[2]</sup>,也是非竞争性的天门冬氨酸(NMDA)受体拮抗剂<sup>[3]</sup>,IDA通过抑制NMDA受体介导的Ca<sup>2+</sup>内流从而发挥神经保护作用<sup>[4]</sup>。Rusu等<sup>[5]</sup>利用强迫游泳模型证实,IDA可以增强实验大鼠的运动功能和耐受力;也有学者发现IDA具有抗肿瘤活性<sup>[6]</sup>。Wang等<sup>[2]</sup>发现在实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)模型中,IDA可以调节促炎因子和抗炎因子的平衡,减轻脊髓炎症反应。然而,IDA对全身炎症反应和器官功能损伤是否具有保护作用仍不得而知。本研究以脂多糖(LPS)处理实验动物或细胞制备炎症模型,观察IDA的抗炎

作用,并探讨其可能的作用机制。

## 1 材料与方法

**1.1 主要实验材料:** 清洁级健康成年雄性C57BL/6小鼠50只,体质量18~22g,购自第三军医大学大坪医院实验动物中心,动物合格证号:SYXK(渝)2012-0010。原代巨噬细胞来自本实验的小鼠腹腔灌洗液。LPS、IDA均购自美国Sigma公司;小鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;一氧化氮(NO)测试盒购自南京建成生物有限公司;胎牛血清(FBS)和RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司。

**1.2 体内实验:** 将30只C57BL/6小鼠按照随机数字表法分为对照组、模型组及IDA低、中、高剂量组(IDA-L、IDA-M、IDA-H组),每组6只。腹腔注射LPS 10 mg/kg制备炎症动物模型;对照组注射等量生理盐水。IDA各组制模时注射IDA 0.3、1.0或3.0 mg/kg。

### 1.3 体外实验

**1.3.1 腹腔原代巨噬细胞提取:**取20只C57BL/6小鼠,脊髓离断法处死,腹腔注射5 mL冷磷酸盐缓冲液(PBS),收集灌洗液后 $300\times g$ 离心5 min,细胞沉淀用RPMI 1640培养基洗1遍,重悬铺板。

**1.3.2 实验分组及处理:**将获得的腹腔巨噬细胞以每孔 $5\times 10^5$ 个加入24孔板中,待细胞贴壁后更换培养基。将细胞随机分为5组,空白组不做任何处理,LPS组加入LPS 10 mg/L建立体外细胞炎症模型,LPS+IDA-L、LPS+IDA-M、LPS+IDA-H组加入LPS的同时加入5、25、100  $\mu\text{mol/L}$  IDA。将各组细胞置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中培养。

本实验中动物处理方法符合动物伦理学标准。

### 1.4 指标检测及方法

**1.4.1 血清及巨噬细胞炎症因子测定:**制模6 h后处死动物,内眦取血,离心取上清,用ELISA试验检测血清TNF- $\alpha$ 、IL-6水平。各组培养巨噬细胞加药刺激24 h后收集上清,用ELISA试验检测上清液TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1、NO水平。操作均严格按照ELISA试剂盒说明书进行。

**1.4.2 四甲基偶氮唑盐(MTT)检测细胞生长情况:**在96孔细胞培养板中每孔加入腹腔巨噬细胞悬液200  $\mu\text{L}$ , IDA组分别加入2 500、500、100、20、4、0.8、0.16、0.032  $\mu\text{mol/L}$ 的IDA, LPS+IDA各剂量组同时加入LPS 10 mg/L。药物刺激24 h后加入5 g/L MTT溶液10  $\mu\text{L}$ ,  $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养4 h后吸尽上清,加入二甲亚砜(DMSO)150  $\mu\text{L}$ ,待甲瓚充分溶解后于波长570 nm处测定吸光度(A)值。

**1.4.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组细胞核转录因子- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )表达:**将原代腹腔巨噬细胞单细胞悬液接种于10 cm培养皿中,分别加入10 mg/L LPS和100  $\mu\text{mol/L}$  IDA,作用15、30、45、60 min收集各组细胞,提取核蛋白,测定细胞核内p65、p50的灰度值。

**1.5 统计学分析:**各实验均重复3次以上,取均值。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 体内实验结果(表1):**腹腔注射LPS后小鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6水平均明显高于对照组,各剂量IDA组TNF- $\alpha$ 、IL-6水平均较模型组明显降低,且呈剂量依赖性(均 $P<0.01$ )。

表1 不同剂量IDA对LPS致炎症小鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6水平的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数(只)	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-6(ng/L)
对照组	6	17.50 $\pm$ 8.68	2436.30 $\pm$ 448.89
模型组	6	403.96 $\pm$ 40.98 <sup>a</sup>	61400.31 $\pm$ 7826.61 <sup>a</sup>
IDA-L组	6	379.67 $\pm$ 52.32 <sup>a</sup>	45516.55 $\pm$ 5422.18 <sup>ab</sup>
IDA-M组	6	273.17 $\pm$ 24.77 <sup>abc</sup>	30705.32 $\pm$ 1785.33 <sup>abc</sup>
IDA-H组	6	170.09 $\pm$ 28.53 <sup>abde</sup>	16570.81 $\pm$ 1083.65 <sup>abde</sup>

注:IDA-L、IDA-M、IDA-H为低、中、高剂量咪唑克生,LPS为脂多糖,TNF- $\alpha$ 为肿瘤坏死因子- $\alpha$ ,IL-6为白细胞介素-6;与对照组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P<0.01$ ;与IDA-L组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ ;与IDA-M组比较,<sup>e</sup> $P<0.01$

### 2.2 体外实验结果

**2.2.1 细胞形态观察:**药物刺激前镜下观察各组细胞呈圆球、椭圆形,有光泽,说明细胞生长状态较好;药物刺激后各组细胞形态并未明显改变。

**2.2.2 巨噬细胞活性:**100  $\mu\text{mol/L}$ 以内的IDA对巨噬细胞的生长均未造成显著影响,故本实验选择5、25、100  $\mu\text{mol/L}$  IDA进行后续实验。

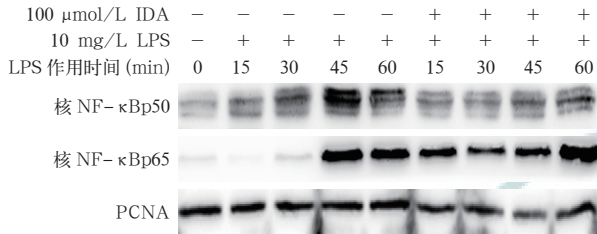
**2.2.3 巨噬细胞TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1及NO水平(表2):**LPS组和各剂量IDA处理组巨噬细胞TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1及NO均较空白组明显升高,而各剂量IDA处理组TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1、NO均较LPS组显著降低,且呈剂量依赖性(均 $P<0.01$ )。

表2 不同剂量IDA对LPS刺激小鼠腹腔巨噬细胞TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1、NO水平的影响( $\bar{x}\pm s$ )

组别	样本数	TNF- $\alpha$ (ng/L)	IL-6(ng/L)
空白组	3	28.50 $\pm$ 27.08	1113.47 $\pm$ 465.53
LPS组	3	7259.14 $\pm$ 320.70 <sup>a</sup>	14809.60 $\pm$ 5852.73 <sup>a</sup>
LPS+IDA-L组	3	4695.92 $\pm$ 435.51 <sup>ab</sup>	12400.64 $\pm$ 5270.22 <sup>a</sup>
LPS+IDA-M组	3	3999.66 $\pm$ 316.05 <sup>abc</sup>	5522.79 $\pm$ 2492.45 <sup>abc</sup>
LPS+IDA-H组	3	784.40 $\pm$ 281.90 <sup>abde</sup>	1802.96 $\pm$ 1534.18 <sup>abde</sup>
组别	样本数	MCP-1(ng/L)	NO( $\mu\text{mol/L}$ )
空白组	3	447.37 $\pm$ 395.69	603.03 $\pm$ 102.18
LPS组	3	20847.37 $\pm$ 1788.33 <sup>a</sup>	1900.00 $\pm$ 144.31 <sup>a</sup>
LPS+IDA-L组	3	19457.90 $\pm$ 1126.71 <sup>a</sup>	1739.40 $\pm$ 100.14 <sup>a</sup>
LPS+IDA-M组	3	11373.68 $\pm$ 1110.21 <sup>abc</sup>	1390.91 $\pm$ 181.60 <sup>abc</sup>
LPS+IDA-H组	3	2005.26 $\pm$ 1534.28 <sup>abde</sup>	654.54 $\pm$ 150.21 <sup>abde</sup>

注:LPS+IDA-L、LPS+IDA-M、LPS+IDA-H为低、中、高剂量咪唑克生处理组,LPS为脂多糖,TNF- $\alpha$ 为肿瘤坏死因子- $\alpha$ ,IL-6为白细胞介素-6,MCP-1为单核细胞趋化因子-1,NO为一氧化氮;与空白组比较,<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与LPS组比较,<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与LPS+IDA-L组比较,<sup>c</sup> $P<0.05$ ,<sup>d</sup> $P<0.01$ ;与LPS+IDA-M组比较,<sup>e</sup> $P<0.05$

**2.2.4 LPS 和 IDA 对巨噬细胞 NF-κBp65 表达的影响**(图 1; 表 3): LPS 活化的巨噬细胞 NF-κBp65 在 45 min、60 min 入核显著增加; IDA 干预可使核内 NF-κBp65 表达增加, 入核提前至 15 min。LPS 亦可使 NF-κBp50 入核增加; 但 IDA 干预可以减少核内 NF-κBp50 的表达, 且在 45 min 有明显差异。



IDA 为咪唑克生, LPS 为脂多糖, PCNA 为增殖细胞核抗原

**图 1** 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组小鼠体外培养腹腔巨噬细胞核转录因子-κB(NF-κB)的表达

**表 3** 各组小鼠体外培养巨噬细胞不同时间点核内 NF-κB 表达比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	样本数	p65 (灰度值)	p50 (灰度值)
空白组	3	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
LPS 15 min 组	3	1.09 ± 0.36	1.26 ± 0.23
LPS 30 min 组	3	1.89 ± 1.08	1.77 ± 0.26 <sup>a</sup>
LPS 45 min 组	3	26.90 ± 5.56 <sup>a</sup>	2.94 ± 0.54 <sup>a</sup>
LPS 60 min 组	3	23.83 ± 6.73 <sup>a</sup>	1.96 ± 0.20 <sup>a</sup>
IDA+LPS 15 min 组	3	18.70 ± 2.29 <sup>ab</sup>	1.19 ± 0.23
IDA+LPS 30 min 组	3	14.89 ± 2.59 <sup>ab</sup>	1.12 ± 0.09
IDA+LPS 45 min 组	3	29.55 ± 3.02 <sup>a</sup>	1.99 ± 0.14 <sup>ab</sup>
IDA+LPS 60 min 组	3	32.42 ± 7.60 <sup>ab</sup>	1.52 ± 0.21

注: NF-κB 为核转录因子-κB, LPS 为脂多糖, IDA 为咪唑克生; 与空白组比较, <sup>a</sup>*P* < 0.01; 与 LPS 组同期比较, <sup>b</sup>*P* < 0.05

### 3 讨论

咪唑啉类药物 IDA 主要与 I<sub>2</sub>R 结合, 它同时具有拮抗 α<sub>2</sub>-肾上腺素能受体的作用。研究发现 IDA 具有保护神经<sup>[7]</sup>、调节阿片功能<sup>[8]</sup>、改善运动功能<sup>[5]</sup>等药理作用。近年来, IDA 的抗炎作用也开始得到关注。Wang 等<sup>[2]</sup>在 EAE 模型中发现, IDA 可以活化星形胶质细胞而抑制小胶质细胞, 进而下调模型鼠脊髓促炎因子 IL-12p40、γ-干扰素(IFN-γ)及上调抗炎因子 IL-10、转化生长因子-β1(TGF-β1)表达; 另外, 在体外血脑屏障炎症模型中还发现, IDA 可以对抗血脑屏障损伤, 有效抑制 TNF-α 诱导的紧密连接蛋白 ZO-1 减少并改善其分布, 同时减少细胞外基质金属蛋白酶 9

(MMP-9) 的表达及其与组织抑制剂 TIMP-1 的比值, 从而逆转异常增高的通透性<sup>[9]</sup>。

巨噬细胞是机体重要的免疫细胞, 其免疫应答是机体发挥防御反应的基础, 在特异性和非特异性免疫反应中都发挥着重要作用。一方面, 巨噬细胞可以通过吞噬作用杀灭和清除病原体及异物; 另一方面, 巨噬细胞可以分泌炎性介质和趋化因子而介导和促进炎症反应。当机体受到感染时, 细菌内毒素入血活化巨噬细胞并释放大量的炎性因子, 打破机体免疫平衡, 进而引发全身炎症反应, 导致机体损伤甚至脓毒性休克<sup>[10]</sup>。TNF-α 是早期炎症反应最重要的炎性介质<sup>[11]</sup>, 其过度分泌会引起血管通透性增加、血流动力学改变、微循环紊乱, 最终导致 MODS<sup>[12]</sup>。IL-6 在炎症反应的急性期发挥着重要作用<sup>[13]</sup>, 可以诱导合成多种急性期蛋白, 增强中性粒细胞的活化和黏附能力<sup>[14]</sup>。MCP-1 是单核细胞重要的趋化因子, 可使单核细胞迁移到炎症部位并浸润到内皮细胞, 造成血管内皮损伤<sup>[15]</sup>。因此, 对巨噬细胞活化的适度调控或对促炎因子的抑制可能为炎症性疾病的治疗提供新的靶点。

致炎物质和炎性介质均可刺激或诱导 NO 的合成与释放。NO 除本身具有细胞毒性, 还能与游离基团反应生成自由基, 加剧炎症反应和组织损伤; 抑制一氧化氮合酶-2(NOS-2)活性能减少 NO 的合成与释放, 进而发挥抗炎作用。Feinstein 等<sup>[16]</sup>发现 IDA 能抑制神经胶质细胞和 RAW 细胞 NOS-2 的活性及蛋白表达水平。本研究发现, 在体外炎症模型中, IDA 能减少腹腔巨噬细胞 NO 的分泌。

NF-κB 信号通路在调节炎症和免疫应答中发挥重要作用<sup>[17]</sup>, 参与多种疾病的发生发展<sup>[18-19]</sup>。静息状态下, NF-κB 与其抑制剂 IκB 结合以复合物的形式存在于胞质中, 当细胞受到 LPS 或其他炎性介质刺激时, IκB 被 IKKs(IκB 激酶)磷酸化进而降解, NF-κB 亚基 p65、p50 从复合物中解离出来入核形成二聚体并启动下游的靶基因(如 TNF-α、IL-6、IL-1β)转录, 诱导促炎因子的大量生成。本研究发现, LPS 可使巨噬细胞 p65、p50 转位入核增多; 而 IDA 处理后可使 p65 入核提前并增加, 使 p50 入核减少, p65-p50 二聚体形成减少, 进而影响下游炎性介质的转录表达。因此, IDA 的抗炎作用可能涉及 NF-κB 信号途径, 但其分子机制仍需进一步研究。

综上, 本研究利用 LPS 建立了体内外炎症模型, 证实了 IDA 具有良好的抗炎作用, 表现为降低血清

TNF- $\alpha$ 、IL-6水平,减轻全身炎症反应;在细胞水平可以降低巨噬细胞TNF- $\alpha$ 、IL-6、MCP-1的分泌及抑制巨噬细胞NO的释放,且呈剂量依赖性。但有关其抗炎分子机制及对器官功能的保护作用有待进一步探讨。

### 参考文献

- [1] 潘伟男, 邓水秀. 咪唑啉受体及其激动剂和拮抗剂的研究进展[J]. 实用药物与临床, 2015, 18 (5): 603-606. DOI: 10.14053/j.cnki.pper.201505027.  
Pan WN, Deng SX. Research progress on imidazoline receptor and its agonists and antagonists [J]. Pract Pharm Clin Rem, 2015, 18 (5): 603-606. DOI: 10.14053/j.cnki.pper.201505027.
- [2] Wang XS, Chen YY, Shang XF, et al. Idazoxan attenuates spinal cord injury by enhanced astrocytic activation and reduced microglial activation in rat experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Brain Res, 2009, 1253: 198-209. DOI: 10.1016/j.brainres.2008.11.059.
- [3] Wang XS, Fang HL, Chen Y, et al. Idazoxan reduces blood-brain barrier damage during experimental autoimmune encephalomyelitis in mouse [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 736 : 70-76. DOI: 10.1016/j.ejphar.2014.04.034.
- [4] Jiang SX, Zheng RY, Zeng JQ, et al. Reversible inhibition of intracellular calcium influx through NMDA receptors by imidazoline I<sub>2</sub> receptor antagonists [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 629 (1-3): 12-19. DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.11.063.
- [5] Rusu G, Mititelu-Tartau L, Lupusoru CE, et al. Imidazoline receptor antagonists idazoxan and efaroxan enhance locomotor functions in rats [J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2015, 119 (1): 193-200.
- [6] Eilon GF, Weisenthal L, Stupecky M, et al. Antineoplastic activity of idazoxan hydrochloride [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2009, 64 (6): 1157-1163. DOI: 10.1007/s00280-009-0978-9.
- [7] Sampson C, Zhang Y, Del BF, et al. Effects of imidazoline I<sub>2</sub> receptor ligands on acute nociception in rats [J]. Neuroreport, 2012, 23 (2): 73-77. DOI: 10.1097/WNR.0b013e32834e7db3.
- [8] Herrero JF, Solano RE. The antinociceptive effect of the  $\mu$ -opioid fentanyl is reduced in presence of the  $\alpha$ 2-adrenergic antagonist idazoxan in inflammation [J]. Brain Res, 1999, 840 (1-2): 106-114. DOI: 10.1016/S0006-8993(99)01780-1.
- [9] 王新施, 朱攀, 朱振国, 等. 咪唑啉受体对体外血脑屏障炎症模型通透性的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31 (4): 669-674. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2015.04.017.  
Wang XS, Zhu P, Zhu ZG, et al. Effect of idazoxan on permeability of inflammatory blood-brain barrier model in vitro [J]. Chin J Pathophysiol, 2015, 31 (4): 669-674. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2015.04.017.
- [10] 刘艳存, 柴艳芬, 姚咏明. 巨噬细胞在脓毒症发病机制中的作用研究进展[J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (4): 247-250. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.04.020.  
Liu YC, Chai YF, Yao YM. Update on the role of macrophages in the pathogenesis of sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2013, 25 (4): 247-250. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2013.04.020.
- [11] Maskrey BH, Megson IL, Whitfield PD, et al. Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011, 31 (5): 1001-1006. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.213850.
- [12] 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- $\alpha$ 的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2002, 14 (5): 273-275. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2002.05.005.  
Wu JY, Yang HZ, Zhang HM, et al. Effects of ketamine on mortality and plasma tumor necrosis factor- $\alpha$  concentration in septic mice [J]. Chin Crit Care Med, 2002, 14 (5): 273-275. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2002.05.005.
- [13] Romano M, Sironi M, Toniatti C, et al. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment [J]. Immunity, 1997, 6 (3): 315-325. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80334-9.
- [14] 李昕, 刘佳佳. IL-6对中性粒细胞在炎症中作用的影响[J]. 国外医学免疫学分册, 2005, 28 (5): 277-280. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4394.2005.05.007.  
Li X, Liu JJ. Effect of IL-6 on the role of neutrophils in inflammation [J]. Foreign Med Sci Sect Immunol, 2005, 28 (5): 277-280. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4394.2005.05.007.
- [15] Hori M, Nobe H, Horiguchi K, et al. MCP-1 targeting inhibits muscularis macrophage recruitment and intestinal smooth muscle dysfunction in colonic inflammation [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294 (2): C391-401. DOI: 10.1152/ajpcell.00056.2007.
- [16] Feinstein DL, Reis DJ, Regunathan S. Inhibition of astroglial nitric oxide synthase type 2 expression by idazoxan [J]. Mol Pharmacol, 1999, 55 (2): 304-308. DOI: 10.1124/mol.55.2.304.
- [17] 左祥荣, 曹权, 阙军, 等. 白藜芦醇对内毒素性急性肺损伤小鼠核转录因子- $\kappa$ B及炎症反应的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20 (1): 16-19. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.01.006.  
Zuo XR, Cao Q, Que J, et al. Effects of resveratrol on changes of nuclear factor- $\kappa$ B and inflammatory reaction in mice with acute lung injury induced by lipopolysaccharide [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2013, 20 (1): 16-19. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2013.01.006.
- [18] 孙艺铸, 王静, 于鲁欣, 等. 过氧化物酶体增殖物激活受体- $\gamma$ /核转录因子- $\kappa$ B传导通路在脓毒症所致凝血功能障碍中的作用[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (6): 520-524. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.020.  
Sun YZ, Wang J, Yu LX, et al. The role of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ /nuclear factor- $\kappa$ B transduction pathway on coagulation disorders induced by sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2015, 27 (6): 520-524. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2015.06.020.
- [19] 张丽娜, 岳子勇. 核转录因子- $\kappa$ B信号通路与失血性休克致急性肺损伤[J]. 中华危重病急救医学, 2014, 26 (8): 599-602. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.08.019.  
Zhang LN, Yue ZY. Nuclear factor- $\kappa$ B pathway and acute lung injury in hemorrhagic shock [J]. Chin Crit Care Med, 2014, 26 (8): 599-602. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2014.08.019.

(收稿日期: 2015-10-23)

(本文编辑: 保健媛, 李银平)

欢迎订阅 2016 年《中国中西医结合急救杂志》 CN 12-1312/R

中国中西医结合学会主办 中文核心期刊 中国科技论文统计源期刊

全国各地邮局订阅, 邮发代号: 6-93 定价: 每期 26 元 全年 156 元

杂志社网址: <http://www.cccm-em120.com> 投稿邮箱: [cccm@em120.com](mailto:cccm@em120.com)

本刊社地址: 天津市和平区睦南道 122 号 电话: 022-23306917 / 23197150