

吡咯烷二硫代氨基甲酸酯对 ALI 小鼠肺组织氧化应激及线粒体功能的影响

杨宏富 晁珂 梁明 孙荣青

450052 河南郑州, 郑州大学第一附属医院重症医学科

通讯作者: 孙荣青, Email: rongqing.sun@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.05.007

【摘要】 目的 探讨吡咯烷二硫代氨基甲酸酯(PDTC)对脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤(ALI)小鼠肺组织氧化应激及线粒体功能的影响。**方法** 按随机数字表法将 40 只雌性 Balb/c 小鼠分为生理盐水(NS)对照组、LPS 模型组、PDTC 组和 PDTC+LPS 组, 每组 10 只。腹腔注射 LPS 15 mg/kg 诱导 ALI 小鼠模型; PDTC+LPS 组于注射 LPS 前 1 h 腹腔注射 PDTC 50 mg/kg 进行预处理; NS 对照组仅腹腔注射 NS 0.1 mL, PDTC 组仅腹腔注射 PDTC 50 mg/kg。制模 24 h 后处死小鼠取肺组织, 应用光谱光度测量工具测定肺组织总抗氧化能力(T-AOC), 采用硫代巴比妥酸法测定肺组织丙二醛(MDA)含量, 采用蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织超氧化物歧化酶(SOD1、SOD2)和过氧化氢酶(CAT)的蛋白表达。分离肺组织线粒体, 采用荧光素酶/荧光素测量方法测定线粒体三磷酸腺苷(ATP)含量, 采用罗丹明法测定线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$), 采用反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测线粒体解耦联蛋白(UCPs)的 mRNA 表达。**结果** LPS 刺激可明显加剧小鼠肺组织氧化应激水平, 导致线粒体功能障碍, 表现为肺组织 T-AOC 和 SOD1 蛋白表达降低, MDA 水平升高, 线粒体 ATP 合成减少, $\Delta\Psi_m$ 下降, UCP2 mRNA 表达降低; 而肺组织 SOD2、CAT 和线粒体 UCP1、UCP3 表达无明显变化。给予 PDTC 预处理可明显缓解 LPS 诱导的肺组织氧化应激水平升高, 减轻线粒体功能障碍, 与 LPS 模型组比较, 肺组织 T-AOC 明显升高(U/g: 0.35 ± 0.08 比 0.31 ± 0.07), MDA 水平明显下降($\mu\text{mol}/\text{mg}$: 13.29 ± 1.13 比 17.54 ± 1.72), SOD1 蛋白表达明显升高(SOD1 蛋白: 1.13 ± 0.11 比 0.71 ± 0.09), 线粒体 ATP 合成明显增加($\mu\text{mol}/\text{mg}$: 49.23 ± 5.42 比 36.92 ± 2.21), $\Delta\Psi_m$ 明显升高(mV: 226.03 ± 11.69 比 194.86 ± 7.79), UCP2 mRNA 表达明显升高($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.88 ± 0.06 比 0.73 ± 0.04), 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。此外, PDTC 单独处理对正常小鼠肺组织也有抗氧化、减轻氧化应激、促进线粒体 ATP 合成的作用, 与 NS 对照组比较, 肺组织 T-AOC 明显升高(U/g: 0.49 ± 0.09 比 0.43 ± 0.06), MDA 明显下降($\mu\text{mol}/\text{mg}$: 10.27 ± 1.25 比 12.17 ± 1.36), SOD2 和 CAT 蛋白表达明显升高(SOD2 蛋白: 1.33 ± 0.08 比 1.00 ± 0.11 , CAT 蛋白: 1.39 ± 0.08 比 1.00 ± 0.11), 线粒体 ATP 合成明显增加($\mu\text{mol}/\text{mg}$: 61.53 ± 4.92 比 53.33 ± 3.20), 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$); 但对肺组织 SOD1 蛋白表达及线粒体 $\Delta\Psi_m$ 和 UCPs mRNA 表达无明显影响。**结论** LPS 可诱导 ALI 小鼠肺组织氧化应激, 并通过抑制 ATP 合成导致线粒体功能障碍; PDTC 预处理对 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织有抗氧化作用, 可减轻线粒体功能障碍。

【关键词】 急性肺损伤; 氧化应激; 线粒体功能障碍; 抗氧化能力; 丙二醛; 超氧化物歧化酶

基金项目: 国家临床重点专科建设项目(2011-873)

Effect of pyrrolidine dithiocarbamate on oxidative stress and mitochondrial function of lung tissue in mice with acute lung injury Yang Hongfu, Chao Ke, Liang Ming, Sun Rongqing

Department of Intensive Care Unit, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan, China

Corresponding author: Sun Rongqing, Email: rongqing.sun@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) on oxidative stress and mitochondrial function of lung tissue in mice with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** Forty female Balb/c mice were randomly divided into normal saline (NS) control group, LPS model group, PDTC group, and PDTC+LPS group, with 10 mice in each group. The model of mice with ALI was reproduced by intraperitoneal injection of 15 mg/kg LPS. PDTC was administered intraperitoneally with 50 mg/kg PDTC 1 hour before LPS treatment in the PDTC+LPS group. The mice in NS control group was given intraperitoneal injection of 0.1 mL NS only, and those in PDTC group was given intraperitoneal injection of 50 mg/kg PDTC only. The mice were sacrificed at 24 hours after model reproduction, and the lung tissues were harvested. The total antioxidant capacity (T-AOC) of lung tissue was measured by spectrophotometric kits. The content of malondialdehyde (MDA) was determined by thiobarbituric acid reactive substances assay. The protein expressions of superoxide dismutases (SOD1, SOD2) and catalase (CAT) in lung tissue were determined by Western Blot. Mitochondria from mouse lungs were isolated, and adenosine triphosphate (ATP) synthesis was measured with a luciferase/luciferin-based approach. The mitochondrial

membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was estimated by using Rhodamine. The mRNA expressions of mitochondrial uncoupling proteins (UCPs) were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results** LPS stimulation could significantly increase oxidative stress in lung tissue of mice and lead to mitochondrial dysfunction. The results showed that the protein expressions of T-AOC and SOD1 were decreased, the level of MDA was increased, the ATP synthesis was decreased in the mitochondria, the $\Delta\Psi_m$ was decreased, and the mRNA expression of UCP2 was decreased. However, there was no significant change in the expressions of SOD2, CAT in lung tissue and UCP1, UCP3 in the mitochondria. Pretreatment with PDTC could obviously alleviate the increase in LPS-induced oxidative stress in lung tissue and mitigate mitochondrial dysfunction. Compared with the LPS model group, T-AOC in lung tissue of PDTC+LPS group was significantly increased (U/g: 0.35 ± 0.08 vs. 0.31 ± 0.07), the level of MDA was significantly decreased ($\mu\text{mol/mg}$: 13.29 ± 1.13 vs. 17.54 ± 1.72), the protein expression of SOD1 was significantly upregulated (SOD1 protein: 1.13 ± 0.11 vs. 0.71 ± 0.09), ATP synthesis was significantly increased in the mitochondria ($\mu\text{mol/mg}$: 49.23 ± 5.42 vs. 36.92 ± 2.21), $\Delta\Psi_m$ was significantly increased (mV: 226.03 ± 11.69 vs. 194.86 ± 7.79), and the mRNA expression of UCP2 was significantly increased ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.88 ± 0.06 vs. 0.73 ± 0.04). The differences were statistically significant (all $P < 0.05$). In lung tissue of normal mice, PDTC treatment also had the effect of anti-oxidizing, reducing oxidative stress and promoting ATP synthesis in the mitochondria. Compared with the NS control group, the level of T-AOC (U/g: 0.49 ± 0.09 vs. 0.43 ± 0.06) and the protein expressions of SOD2 and CAT (SOD2 protein: 1.33 ± 0.08 vs. 1.00 ± 0.11 , CAT protein: 1.39 ± 0.08 vs. 1.00 ± 0.11), and ATP synthesis in the mitochondria of PDTC group was significantly increased ($\mu\text{mol/mg}$: 61.53 ± 4.92 vs. 53.33 ± 3.20), MDA was significantly decreased ($\mu\text{mol/mg}$: 10.27 ± 1.25 vs. 12.27 ± 1.36), with statistical differences, but had no effect on the protein expression of SOD1 in lung tissue and $\Delta\Psi_m$ and UCPs mRNA expressions in mitochondria. **Conclusions** LPS can induce ALI in mice, increased oxidative stress in lung tissue, and induce mitochondrial dysfunction by inhibiting ATP synthesis. PDTC pretreatment has anti-oxidative effect on LPS-induced ALI, and can mitigate mitochondrial dysfunction.

【Key words】 Acute lung injury; Oxidative stress; Mitochondrial dysfunction; Antioxidant capacity; Malondialdehyde; Superoxide dismutase

Fund program: National Clinical Key Specialist Construction Project (2011-873)

急性肺损伤 (ALI) 是由感染、创伤、中毒、急性胰腺炎 (AP)、休克等心源性因素以外的各种肺内外致病因素导致的急性、进行性、顽固性低氧血症和呼吸衰竭 (呼衰)。脓毒症致 ALI 的发生率为 7%, 病死率高达 40%。ALI 的特征是氧化应激、炎症反应、中性粒细胞聚集、弥漫性内皮和上皮损伤、通气血流屏障破坏, 随后周围炎性细胞渗透到肺组织^[1-2]。ALI/ 急性呼吸窘迫综合征 (ARDS) 的发病机制十分复杂, 目前尚无有效手段能够逆转或者延缓肺损伤的进展。

吡咯烷二硫代氨基甲酸酯 (PDTC) 是硫醇化合物, 它是一种有效的核转录因子 κB (NF- κB) 抑制剂^[3-5]。有研究显示, 阻止 NF- κB 活化可以减轻肺部炎症及单肺通气造成的肺损伤^[6], 但目前有关 PDTC 对 ALI 的保护作用尚未明确。因此, 本研究通过建立脂多糖 (LPS) 诱导 ALI 小鼠模型, 评价 PDTC 对 ALI 小鼠肺组织氧化应激和线粒体功能的影响, 以了解 PDTC 对 ALI 的保护作用及其机制。

1 材料及方法

1.1 实验动物: 雌性 Balb/c 小鼠 40 只, 10~12 周龄, 体重 20~25 g, 由郑州大学实验中心提供, 动物生产许可证号: SCXK (豫) 2015-0005。动物饲养于温度和光亮可控的室内, 室温 (23 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 以 12 h 白昼/黑夜交替循环, 自由进食和饮水。

1.2 动物分组和模型制备: 将 40 只小鼠按照随机数字表法分为生理盐水 (NS) 对照组、LPS 模型组、PDTC 组和 PDTC+LPS 组, 每组 10 只。采用腹腔注射 LPS 15 mg/kg (美国 Sigma 公司) 的方法诱导 ALI 小鼠模型; PDTC+LPS 组于腹腔注射 LPS 前 1 h 腹腔注射 PDTC 50 mg/kg (将 PDTC 溶解在蒸馏水中, 美国 Sigma 公司) 进行预处理; NS 对照组仅腹腔注射 NS 0.1 mL, PDTC 组仅腹腔注射 PDTC 50 mg/kg。制模 24 h 后处死小鼠, 并留取肺组织标本, 进行指标检测。

本实验动物使用和处理方案参照美国国立卫生署《实验动物关怀和使用指南》, 经郑州大学第一附属医院科研和临床试验伦理委员会审核通过并实施 (审批号: 2016-LW-128)。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 肺组织氧化应激水平检测: 取左肺组织 1 g, 加入 9 mL NS 制备匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min 取上清液, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。应用光谱光度测量工具 (南京生生物技术有限公司) 检测肺总抗氧化能力 (T-AOC); 采用硫代巴比妥酸法测定丙二醛 (MDA) 含量, 操作按试剂盒 (南京建成生物技术研究) 说明书进行。以 T-AOC 和 MDA 评价肺组织氧化应激水平。

1.3.2 线粒体功能检测: 从小鼠肺组织分离出线粒体, 采用荧光素酶/荧光素测量方法测定三磷酸腺

苷(ATP)含量;采用罗丹明法测定线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$),操作按试剂盒(美国Sigma公司)说明书进行。按照常规方法提取染色体,测定蛋白质含量后,制备线粒体溶液,加入罗丹明染液,应用荧光光度计检测并连续记录荧光强度。以ATP合成情况和 $\Delta\Psi_m$ 评估线粒体功能。

1.3.3 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测肺组织超氧化物歧化酶(SOD1、SOD2)及过氧化氢酶(CAT)的蛋白表达:应用蛋白质提取试剂(美国Thermo公司)提取肺组织蛋白质,用BCA法测定蛋白浓度。经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白质(30 μ g),然后将蛋白转移到聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。封膜后与一抗孵育[抗SOD1抗体(ab20926)、抗SOD2抗体(ab13533)、抗CAT抗体];洗膜后,与二抗孵育(碱性磷酸酶结合的抗小鼠或抗兔IgG抗体)。以 β -肌动蛋白(β -actin)作为内参照,应用图像J程序(NIH)进行定量分析,以目的蛋白灰度值与内参照灰度值的比值代表目的蛋白表达量。

1.3.4 反转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定肺组织解耦联蛋白(UCPs)的mRNA表达:使用TRIzol试剂分离肺组织总RNA,反转录入第一链(cDNA)。根据小鼠的基因序列设计引物5.0,以产生扩增产物。选择 β -actin作为管家基因,使靶基因水平标准化。PCR反应条件:94 $^{\circ}$ C 40 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 35 s;36个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算肺组织UCPs的mRNA表达量。

1.4 统计学方法:应用SPSS 17.0软件进行统计学分析。采用Kolmogorov-Smirnov法对计量资料进行正态性检验,正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用Duncan多重检验,进一步两两比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

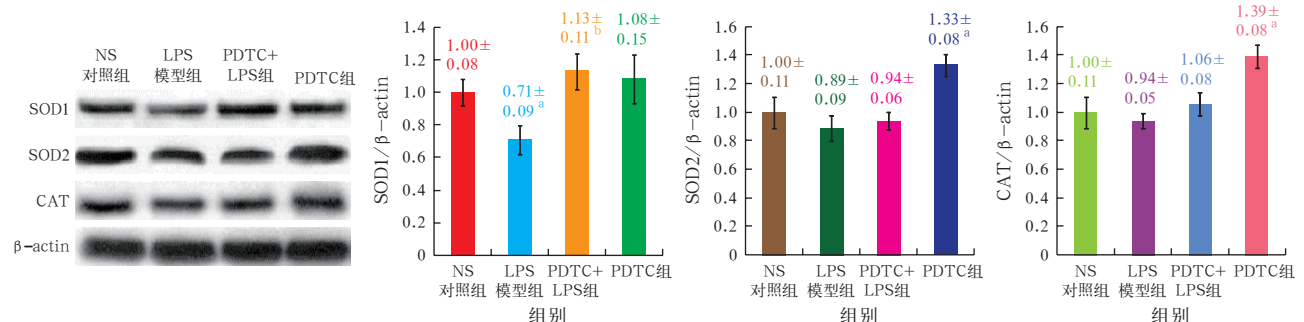
2.1 肺组织氧化应激水平(表1):LPS刺激后,小鼠肺组织氧化应激水平明显加剧,表现为T-AOC明显降低,MDA水平明显升高,与NS对照组比较差异有统计学意义(均 $P<0.01$);给予PDTC预处理后,肺组织T-AOC较LPS模型组明显升高,MDA水平较LPS模型组明显下降(均 $P<0.01$)。说明PDTC对LPS诱导的ALI小鼠肺组织具有抗氧化作用。此外,PDTC组肺组织T-AOC较NS对照组明显升高,MDA水平较NS对照组明显下降(均 $P<0.05$),说明PDTC对正常小鼠肺组织也具有抗氧化作用。

表1 PDTC预处理对LPS诱导ALI小鼠肺组织氧化应激水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	T-AOC(U/g)	MDA(μ mol/mg)
NS对照组	10	0.43 $\pm$ 0.06	12.17 $\pm$ 1.36
LPS模型组	10	0.31 $\pm$ 0.07 ^a	17.54 $\pm$ 1.72 ^a
PDTC+LPS组	10	0.35 $\pm$ 0.08 ^{bc}	13.29 $\pm$ 1.13 ^{bc}
PDTC组	10	0.49 $\pm$ 0.09 ^a	10.27 $\pm$ 1.25 ^a

注:PDTC为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯,LPS为脂多糖,ALI为急性肺损伤,NS为生理盐水,T-AOC为总抗氧化能力,MDA为丙二醛;与NS对照组比较,^a $P<0.01$,^b $P<0.05$;与LPS模型组比较,^c $P<0.01$

2.2 肺组织SOD1、SOD2、CAT的蛋白表达(图1):LPS刺激后,小鼠肺组织SOD1蛋白表达较NS对照组明显降低($P<0.05$);SOD2、CAT蛋白表达较NS对照组略有下降,差异无统计学意义(均 $P>0.05$)。给予PDTC预处理后,肺组织SOD1蛋白表达较LPS模型组明显升高($P<0.05$);虽然PDTC倾向于上调SOD2和CAT蛋白表达,但差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。说明PDTC能增加SOD1表达,对LPS诱导的ALI小鼠肺组织氧化应激具有抑制作用。此外,PDTC组肺组织SOD2和CAT蛋白表达较NS对照组明显升高(均 $P<0.05$),说明PDTC有增强正常肺组织抗氧化应激能力的作用。



SOD1、SOD2为超氧化物歧化酶1、2,CAT为过氧化氢酶,NS为生理盐水,LPS为脂多糖,PDTC为吡咯烷二硫代氨基甲酸酯, β -actin为 β -肌动蛋白;与NS对照组比较,^a $P<0.05$;与LPS模型组比较,^b $P<0.05$

图1 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组小鼠肺组织SOD1、SOD2和CAT的蛋白表达

2.3 肺组织线粒体功能(表2): LPS 刺激后,小鼠肺组织线粒体功能障碍,表现为 ATP 合成明显减少, $\Delta\Psi_m$ 明显下降,与 NS 对照组比较差异有统计学意义(均 $P<0.05$); 给予 PDTC 预处理后,线粒体 ATP 合成较 LPS 模型组明显增加, $\Delta\Psi_m$ 较 LPS 模型组明显升高(均 $P<0.05$)。说明 PDTC 预处理可以减轻 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织线粒体功能障碍。此外, PDTC 组线粒体 ATP 合成较 NS 对照组明显增加($P<0.05$), $\Delta\Psi_m$ 较 NS 对照组略有下降($P>0.05$),说明 PDTC 能够增加正常肺组织线粒体 ATP 的合成,但并不能影响 $\Delta\Psi_m$ 。

表2 PDTC 预处理对 LPS 诱导 ALI 小鼠肺组织线粒体功能的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	ATP 含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$)	膜电位(mV)
NS 对照组	10	53.33 ± 3.20	233.83 ± 23.39
LPS 模型组	10	36.92 ± 2.21^a	194.86 ± 7.79^b
PDTC+LPS 组	10	49.23 ± 5.42^c	226.03 ± 11.69^d
PDTC 组	10	61.53 ± 4.92^a	229.93 ± 15.58

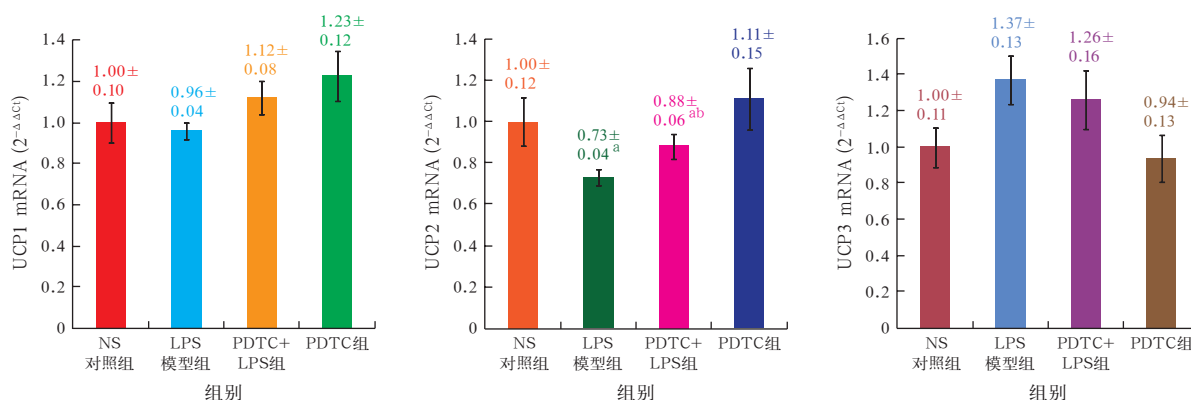
注: PDTC 为吡咯烷二硫代氨基酸酯, LPS 为脂多糖, ALI 为急性肺损伤, NS 为生理盐水, ATP 为三磷酸腺苷; 与 NS 对照组比较, $^aP<0.05$, $^bP<0.01$; 与 LPS 模型组比较, $^cP<0.05$, $^dP<0.01$

2.4 肺组织 UCPs 的 mRNA 表达(图2): LPS 刺激后,小鼠肺组织 UCP2 mRNA 表达较 NS 对照组明显下降($P<0.05$); UCP1 和 UCP3 的 mRNA 表达略有波动,但差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。给予 PDTC 预处理后,肺组织 UCP2 mRNA 表达较 LPS 模型组明显升高($P<0.05$); PDTC 对 UCP1、UCP3 的 mRNA 表达有一定逆转趋势,但差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。说明 PDTC 可上调 ALI 小鼠肺组织 UCP2 表达。PDTC 组 UCPs mRNA 表达与 NS 对照组比较差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),说明 PDTC 对正常肺组织 UCPs 表达无明显影响。

3 讨论

已有研究证实,氧化应激在 ALI 的进展中具有重要作用^[7-11]。机体发生氧化应激时,氧化平衡被过多的氧化产物(如 MDA 等)影响^[12]。戴成等^[13]研究显示, ALI 时中性粒细胞参与肺损伤过程。肝脏缺血/再灌注(I/R)损伤也可以导致远隔器官,特别是肺组织发生氧化应激反应^[14]。NF- κ B 是一种氧化还原敏感因子,氧化应激在 NF- κ B 信号激活中发挥着重要作用^[15-16],与炎症反应的发生密切相关^[17]。孙谋等^[18]研究显示,脂肪干细胞能显著抑制 LPS 诱导 ALI 大鼠 NF- κ B 的活化,减少炎性细胞因子释放,减轻肺组织炎症反应。本研究显示,在 LPS 诱导的小鼠 ALI 模型中,肺组织氧化应激水平加剧,表现为 T-AOC 明显降低,MDA 水平明显升高。耿广琴等^[19]的研究也证实, LPS 诱导的 ALI 小鼠 T-AOC 明显下降,MDA 水平升高。本研究还显示,在 LPS 诱导的小鼠 ALI 模型中,肺组织氧化还原的清除能力明显降低,表现为 SOD1 表达明显降低,与王中华等^[20]的研究结果一致,该研究显示,血清及支气管肺泡灌洗液(BALF)中肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和白细胞介素(IL-1 β 、IL-6)水平均明显升高,而血清 SOD 水平显著降低。在本研究中, ALI 小鼠肺组织 SOD2 表达下降无统计学意义,可能与小鼠体内 SOD1 主要分布在细胞质(占 91%),而 SOD2 主要分布在线粒体基质,且数量相对较少等因素有关。张曙等^[21]研究显示,吸入性肺损伤时 CAT 明显下降。而本研究中 CAT 表达在 LPS 诱导的 ALI 小鼠肺组织中有下降趋势,但差异无统计学意义,仍需进一步研究证实。

以往研究已经证实了 PDTC 作为抗氧化剂的功能^[22]。Pinho-Ribeiro 等^[23]研究表明, PDTC 可抑制



注: PDTC 为吡咯烷二硫代氨基酸酯, LPS 为脂多糖, ALI 为急性肺损伤, NS 为生理盐水; 与 NS 对照组比较, $^bP<0.05$; 与 LPS 模型组比较, $^aP<0.05$

图2 PDTC 预处理对 LPS 诱导 ALI 小鼠肺组织线粒体解耦联蛋白(UCPs) mRNA 表达的影响

动物爪子和脊髓中超氧化物阴离子引起的 NF- κ B 激活,从而抑制炎症和氧化应激,进一步减轻神经末梢病灶的机械痛觉过敏、热痛觉过敏和炎症反应。在本研究中我们也注意到,PDTC 预处理可提高 ALI 小鼠肺组织 T-AOC,降低 MDA 水平,表明 PDTC 对 LPS 诱导的 ALI 具有抗氧化作用。同时,PDTC 可以增强 ALI 小鼠肺组织 SOD1 表达,表明 PDTC 可改善 LPS 诱导的 ALI 小鼠抗氧化平衡。虽然 PDTC 倾向于上调 SOD2 和 CAT 表达,但差异无统计学意义,可能与本研究的样本量较小,SOD2 含量较少、分布与 SOD1 不同,以及测量方法等因素有关,需要进一步证实其调节作用。

有研究表明,LPS 可诱导 ALI 大鼠发生线粒体结构异常和功能障碍^[24]。G 蛋白耦联受体家族促使 TNF- α 、IL-6 及 IL-8 等大量释放,导致线粒体功能损害^[25]。UCP2 是一种线粒体阴离子的载体蛋白,在氧化磷酸化过程中,对 ATP 合成和线粒体质子漏均发挥重要作用^[7, 26]。本研究结果显示,LPS 刺激后,小鼠肺组织线粒体 ATP 合成明显减少, $\Delta\Psi_m$ 明显下降,UCP2 mRNA 表达明显下调,证实 LPS 暴露导致线粒体功能障碍。殷颖杰等^[27]研究结果显示,刺激内皮细胞后,线粒体 $\Delta\Psi_m$ 降低,Rho 相关蛋白激酶表达上调,NF- κ B p65 表达上调并核内移。Varela 等^[28]报道,在大脑皮质和海马中,缺氧诱导突触重塑,UCP2 在线粒体中发挥重要作用。UCP2 也可通过运输 C4 出线粒体,调节线粒体葡萄糖代谢^[29]。本研究中,LPS 刺激后小鼠肺组织 UCP1、UCP3 mRNA 表达与 NS 对照组差异均无统计学意义,可能与 UCP1 和 UCP3 均不参与线粒体的功能,而主要参与能量代谢及肥胖的调节有关^[30]。

线粒体功能障碍可能是 ALI 的主要原因,因此,改善线粒体功能可以作为一项潜在的 ALI 治疗方案。韩进旺等^[31]认为,通过线粒体转移甚至通过补充干细胞等外源性线粒体可以改善肺损伤。在本研究中,我们采用 PDTC 预处理抑制 NF- κ B 活化,减轻了 LPS 诱导的线粒体功能障碍,说明 PDTC 在 LPS 诱导的 ALI 中具有保护作用。

综上所述,LPS 可诱导 ALI 小鼠肺组织氧化应激加剧,并通过抑制 ATP 合成导致线粒体功能障碍;而 PDTC 预处理对 LPS 诱导的 ALI 有抗氧化作用,可以明显减轻线粒体功能障碍。本课题组将在后续研究中进行 NF- κ B 基因敲除,以进一步证实 NF- κ B 在 ALI 中的作用及 PDTC 对 ALI 的保护机制。

参考文献

- [1] Butt Y, Kurdowska A, Allen TC. Acute lung injury: a clinical and molecular review [J]. Arch Pathol Lab Med, 2016, 140 (4): 345-350. DOI: 10.5858/arpa.2015-0519-RA.
- [2] Mokra D, Kosutova P. Biomarkers in acute lung injury [J]. Respir Physiol Neurobiol, 2015, 209: 52-58. DOI: 10.1016/j.resp.2014.10.006.
- [3] Zhai JX, Zhang ZX, Feng YJ, et al. PDTC attenuate LPS-induced kidney injury in systemic lupus erythematosus-prone MRL/lpr mice [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39 (6): 6763-6771. DOI: 10.1007/s11033-012-1501-7.
- [4] Yucel M, Kucuk A, Bayraktar AC, et al. Protective effects of the nuclear factor kappa B inhibitor pyrrolidine dithiocarbamate in bladder ischemia-reperfusion injury in rats [J]. Mol Biol Rep, 2013, 40 (10): 5733-5740. DOI: 10.1007/s11033-013-2676-2.
- [5] 曹明争,毛伟征,马贵亮,等.吡咯烷二硫代氨基甲酸盐增强肿瘤坏死因子 α 诱导人胃癌细胞株 SGC-7901 凋亡作用的研究 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2013, 16 (6): 578-582. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2013.06.020.
Cao MZ, Mao WZ, Ma GL, et al. NF- κ B inhibitor PDTC enhances tumor necrosis factor α -induced apoptosis of gastric cancer cell SGC-7901 [J]. Chin J Gastrointest Surg, 2013, 16 (6): 578-582. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0274.2013.06.020.
- [6] 吴明,张谦,周霞.银杏达莫注射液对机械通气所致肺损伤大鼠蛋白激酶受体-2 表达的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2016, 23 (1): 42-46. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.011.
Wu M, Zhang Q, Zhou X. Influence of ginkgo leaf extract and dipyrindamole injection on expression of protease-activated receptor-2 in rats with ventilator induced lung injury [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2016, 23 (1): 42-46. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.011.
- [7] Wang L, Yuan R, Yao C, et al. Effects of resolvin D1 on inflammatory responses and oxidative stress of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. Chin Med J (Engl), 2014, 127 (5): 803-809. DOI:10.3760/cma.j.issn.0366-6999.20131044.
- [8] 龚艳杰,魏明,涂玲,等.输血相关性急性肺损伤对大鼠血浆和肺组织血管生成素-2 表达的影响 [J]. 实用检验医师杂志, 2016, 8 (3): 175-180. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.03.015.
Gong YJ, Wei M, Tu L, et al. Expression of angiopoietin-2 in plasma and lung tissue of rats with transfusion-related acute lung injury [J]. Chin J Clin Pathol, 2016, 8 (3): 175-180. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2016.03.015.
- [9] Shalaby SM, El-Shal AS, Abd-Allah SH, et al. Mesenchymal stromal cell injection protects against oxidative stress in *Escherichia coli*-induced acute lung injury in mice [J]. Cytotherapy, 2014, 16 (6): 764-775. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.12.006.
- [10] Rashti Z, Koohsari H. Antibacterial effects of supernatant of lactic acid bacteria isolated from different Dough's in Gorgan city in north of Iran [J]. Integr Food Nutr Metab, 2015, 2 (3): 193-196. DOI: 10.15761/IFNM.1000129.
- [11] Zhu LJ, Sun YW, Zhang GX, et al. Radical-scavenging and anti-oxidative activities of TBN in cell-free system and murine H9c2 cardiomyoblast cells [J]. J Antiox Activ, 2015, 1 (1): 55-68. DOI: 10.14302/issn.2471-2140.jaa-15-765.
- [12] Rodrigo S, Rodríguez L, Otero P, et al. Fructose during pregnancy provokes fetal oxidative stress: the key role of the placental heme oxygenase-1 [J]. Molec Nutr Food Res, 2016, 60 (12): 2700-2711. DOI: 10.1002/mnfr.201600193.
- [13] 戴成,王毅,于湘友.亚甲基蓝治疗对脓毒症大鼠肺脏诱导型一氧化氮合酶变化的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (2): 134-139. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.010.
Dai C, Wang Y, Yu XY. Effect of methylene blue on changes in inducible nitric oxide synthase in lung of rats with sepsis [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (2): 134-139. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.02.010.
- [14] 王菲,徐如彬,贾莉莉,等.肝缺血/再灌注所致远隔脏器损伤机制及麻醉药物的保护作用 [J/CD]. 实用器官移植电子杂志, 2015, 3 (6): 373-376. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2015.06.015.
Wang F, Xu RB, Jia LL, et al. The mechanism of remote septum injury and the protective effect of narcotic drugs on hepatic ischemia/reperfusion [J/CD]. Pract J Organ Transplant (Electronic Version), 2015, 3 (6): 373-376. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2015.06.015.
- [15] Liu X, Lin R, Zhao B, et al. Correlation between oxidative stress

- and the NF- κ B signaling pathway in the pulmonary tissues of obese asthmatic mice [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13 (2): 1127–1134. DOI: 10.3892/mmr.2015.4663.
- [16] Eastep J, Chen G. The relationships of high-fat diet and metabolism of lipophilic vitamins [J]. *Integr Food Nutr Metab*, 2015, 2 (3): 174–179. DOI: 10.15761/IFNM.1000125.
- [17] 蔡晓霞, 卢中秋. 核转录因子- κ B 和核转录因子 E2 相关因子 2 的激活机制及两者间的交互作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2015, 22 (4): 438–441. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.04.031.
- Cai XX, Lu ZQ. The activation mechanism of nuclear factor- κ B and nuclear factor E2 related factor 2 and the interaction between them [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2015, 22 (4): 438–441. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.04.031.
- [18] 孙谋, 孙同文, 余言午, 等. 脂肪干细胞对脂多糖诱导急性肺损伤大鼠炎症因子表达的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2016, 28 (10): 911–915. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.10.010.
- Sun M, Sun TW, Yu YW, et al. Effect of adipose-derived stem cells on inflammatory factors expression in rats with lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2016, 28 (10): 911–915. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.10.010.
- [19] 耿广琴, 谢晓蓉, 王雅莉, 等. 红芪总多糖对急性肺损伤小鼠细胞因子及抗氧化功能的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33 (15): 1443–1446. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2017.15.019.
- Geng GQ, Xie XR, Wang YL, et al. Influence of total Hedysaripolysaccharide on the level of cytokine and anti-oxidative function in acute lung injury of mice [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2017, 33 (15): 1443–1446. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2017.15.019.
- [20] 王中华, 王首红, 郭伟新, 等. 中药四磨汤在急性呼吸窘迫综合征中的作用研究 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2017, 24 (6): 565–569. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.06.002.
- Wang ZH, Wang SH, Guo WX, et al. A study on effect of traditional Chinese medicine Simo decoction on acute respiratory distress syndrome [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2017, 24 (6): 565–569. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2017.06.002.
- [21] 张曙, 齐菲, 左振华, 等. 谷胱甘肽乙酰酯对烟雾吸入性肺损伤的作用 [J]. *中华危重病急救医学*, 2012, 24 (10): 624–627. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.10.015.
- Zhang S, Qi F, Zuo ZH, et al. Effects of glutathione ethyl ester on smoke inhalation lung injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2012, 24 (10): 624–627. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2012.10.015.
- [22] Ivan AL, Campanini MZ, Martinez RM, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits UVB-induced skin inflammation and oxidative stress in hairless mice and exhibits antioxidant activity *in vitro* [J]. *J Photochem Photobiol B*, 2014, 138: 124–133. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2014.05.010.
- [23] Pinho-Ribeiro FA, Fattori V, Zarpelon AC, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits superoxide anion-induced pain and inflammation in the paw skin and spinal cord by targeting NF- κ B and oxidative stress [J]. *Inflammopharmacology*, 2016, 24 (2–3): 97–107. DOI: 10.1007/s10787-016-0266-3.
- [24] Du Q, Wang C, Zhang N, et al. *In vivo* study of the effects of exogenous hydrogen sulfide on lung mitochondria in acute lung injury in rats [J]. *BMC Anesthesiol*, 2014, 14: 117. DOI: 10.1186/1471-2253-14-117.
- [25] Toda C, Diano S. Mitochondrial UCP2 in the central regulation of metabolism [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2014, 28 (5): 757–764. DOI: 10.1016/j.beem.2014.02.006.
- [26] Donadelli M, Dando I, Fiorini C, et al. UCP2, a mitochondrial protein regulated at multiple levels [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2014, 71 (7): 1171–1190. DOI: 10.1007/s00018-013-1407-0.
- [27] 殷颖杰, 章守琴, 王三强, 等. VILI 小鼠血清内皮细胞微粒变化 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30 (1): 8–12. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.01.002.
- Yin YJ, Zhang SQ, Wang SQ, et al. Changes in circulating microparticles in mice with ventilator-induced lung injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2018, 30 (1): 8–12. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.01.002.
- [28] Varela L, Schwartz ML, Horvath TL. Mitochondria controlled by UCP2 determine hypoxia-induced synaptic remodeling in the cortex and hippocampus [J]. *Neurobiol Dis*, 2016, 90: 68–74. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.01.004.
- [29] Voza A, Parisi G, De Leonardi F, et al. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111 (3): 960–965. DOI: 10.1073/pnas.1317400111.
- [30] Giatromanolaki A, Balaska K, Kalamida D, et al. Thermogenic protein UCP1 and UCP3 expression in non-small cell lung cancer: relation with glycolysis and anaerobic metabolism [J]. *Cancer Biol Med*, 2017, 14 (4): 396–404. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2017.0089.
- [31] 韩进旺, 宋艳玲, 朱峰. 干细胞治疗肺损伤的线粒体转移机制 [J]. *中华危重病急救医学*, 2018, 30 (1): 88–90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.01.017.
- Han JW, Song YL, Zhu F. Mitochondrial transfer mechanism of stem cells for therapy of lung injury [J]. *Chin Crit Care Med*, 2018, 30 (1): 88–90. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2018.01.017.

(收稿日期: 2018-01-13)

• 科研新闻速递 •

加大 5 倍剂量吸入型糖皮质激素治疗并不能降低 儿童哮喘急性加重发生风险

哮喘控制治疗(例如用吸入型糖皮质激素治疗)已成为常规治疗手段,但哮喘急性加重仍然频繁发生。临床上通常在患者出现早期哮喘失控症状时就会增加吸入型糖皮质激素剂量,但这种策略在儿童患者中的安全性和有效性尚未明确。为此,有学者进行了相关研究。研究对象为 254 例 5~11 岁具有轻度至中度持续性哮喘,并且 1 年内接受系统糖皮质激素治疗中出现过至少 1 次哮喘急性加重的患儿。患儿接受 48 周持续低剂量吸入型糖皮质激素治疗(氟替卡松丙酸酯 44 μ g 吸入,每日 2 次),并在出现早期哮喘失控症状时被随机分配到持续相同剂量组(低剂量组)或 5 倍剂量组(高剂量组,氟替卡松丙酸酯每次吸入 220 μ g,每日 2 次),共 7 d。主要评价指标是患儿严重哮喘急性加重发生率。结果显示:高剂量组哮喘患儿每年有 0.48 例次发生急性加重,低剂量组每年有 0.37 例次发生急性加重,两组急性加重发生率比较差异无统计学意义[相对危险度(RR)=1.3, 95% 可信区间(95% CI)=0.8~2.1, $P=0.30$]。两组患儿间第 1 次急性加重发生时间、治疗失败率、症状评分和急性加重发作期间沙丁胺醇的使用情况比较差异无统计学意义。高剂量组糖皮质激素使用总量较低剂量组高出 16%。研究人员据此得出结论:在应用吸入型糖皮质激素治疗轻度至中度持续性哮喘儿童过程中,早期哮喘失控症状出现时使用 5 倍剂量的糖皮质激素并不能降低患儿严重哮喘急性加重的发生率,也不能改善其他哮喘结局。

罗红敏, 编译自《N Engl J Med》, 2018, 378 (10): 891–901