

·基础研究·

Ghrelin对脓毒症大鼠肺泡巨噬细胞炎症信号通路Akt、NF- κ B和iNOS的影响

郑海崇, 曾勉, 何婉媚, 陈钦桂, 黄春容
(中山大学附属第一医院MICU, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】观察生长激素释放肽(ghrelin)对脓毒症大鼠肺泡巨噬细胞(AM)炎症信号通路蛋白激酶B(Akt)、核因子- κ B(NF- κ B)及诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)的影响。【方法】24只SD雄性大鼠随机分为假手术(Sham)组、脓毒症(CLP)组、ghrelin干预(CLP+ghrelin)组与ghrelin对照(Sham+ghrelin)组。盲肠结扎穿孔(CLP)构建大鼠脓毒症模型,分别于术后3h与5h腹腔注射20nmol/kg ghrelin进行干预。观察各组肺组织病理改变并评分;从支气管肺泡灌洗液(BALF)中提取AM,ELISA测定BALF中炎症因子白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)的水平,qPCR测定AM的IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 mRNA的表达水平,免疫荧光、免疫印迹检测AM的NF- κ B p65、I κ B α 、p-I κ B α 等NF- κ B信号蛋白、Akt、p-Akt等Akt信号蛋白和iNOS蛋白水平。【结果】Ghrelin干预组肺组织病理学评分[(6.7 \pm 0.8)分]、BALF中IL-1 β [(146 \pm 12)pg/mL]和IL-6 [(182 \pm 10)pg/mL]分别较脓毒症组[(10.3 \pm 0.7)分、(263 \pm 17)pg/mL和(273 \pm 5)pg/mL]降低了35.4%、44.5%和33.3%,组间差异有统计学意义(P <0.05),ghrelin干预组BALF中TNF- α 与脓毒症组差异无统计学意义。Ghrelin干预组AM的IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA的表达水平分别较脓毒症组下调54.38%、53.6%和46.42%(P <0.05),且ghrelin干预组AM胞核NF- κ B p65与胞浆p-I κ B α 、p-Akt、iNOS表达较脓毒症组减少,分别减少32.58%、45.42%、27.6%和48.33%,组间差异有统计学意义(P <0.05)。假手术组与ghrelin对照组上述指标差异无统计学意义。【结论】Ghrelin可降低脓毒症大鼠AM炎症调控信号通路蛋白Akt、NF- κ B和iNOS的活性,进而下调AM促炎因子IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的表达,减轻脓毒症急性肺损伤。

关键词: ghrelin;脓毒症;急性肺损伤;肺泡巨噬细胞;细胞因子;NF- κ B;Akt;iNOS

中图分类号: R56 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2018)01-0001-08

Effects of Ghrelin on Inflammatory Signaling Akt, NF- κ B and iNOS in Alveolar Macrophages from Septic Rats

ZHENG Hai-chong, ZENG Mian, HE Wan-mei, CHEN Qin-gui, HUANG Chun-rong
(Medical Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)
Corresponding to: ZENG Mian, E-mail: zengmian2004@163.com

Abstract: 【Objective】To investigate the effects of ghrelin on inflammatory signaling protein kinase B(Akt), nuclear factor- κ B(NF- κ B) and inducible nitric oxide synthase(iNOS) in alveolar macrophage(AM). 【Methods】24 Male SD rats were randomly divided into Sham, CLP, CLP+ghrelin, and Sham+ghrelin groups. Cecal ligation and puncture(CLP) was used to induce sepsis. Ghrelin(20 nmol/kg) was administered by intraperitoneal injection at 3 h and 15 h post-operation. Histopathological changes of lungs were observed and scored. AM were extracted from bronchoalveolar lavage fluid(BALF). Interleukin-1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6) in BALF were detected by ELISA. IL-1 β , TNF- α , and IL-6 mRNA in AM were detected by qPCR. NF- κ B p65, I κ B α , p-I κ B α , Akt, p-Akt and iNOS in AM were detected by immunofluorescence(IF) and Western blotting. 【Results】The histologic score(6.7 \pm 0.8), BALF IL-

收稿日期:2017-10-30

基金项目:国家自然科学基金(81670066);广东省科技计划项目(2014A020212151,2016A020216009);广州市科技计划项目(2014Y2-00136)

作者简介:郑海崇,在读研究生,研究方向:呼吸与危重症医学,E-mail:1139zheng@163.com;曾勉,通信作者,博士研究生导师,教授,主任医师,研究方向:呼吸与危重症医学,E-mail:zengmian2004@163.com

1 β [(146 \pm 12) pg/mL] and IL-6 [(182 \pm 10) pg/mL] from CLP+ghrelin group were respectively 35.4%, 44.5% and 46.42% lower than those from CLP group [(10.3 \pm 0.7), (263 \pm 17) pg/mL, and (273 \pm 5) pg/mL], $P<0.05$. No significant difference was found in BALF TNF- α between CLP group and CLP+ghrelin group. The IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNA in AM from CLP+ghrelin group were respectively 54.38%, 53.6% and 46.42% lower than those from CLP group, $P<0.05$. The nuclear NF- κ B p65 and cytoplasmic p-I κ B α , p-Akt and iNOS from CLP+ghrelin group were respectively 32.58%, 45.42%, 27.6% and 48.33% lower than those from CLP group, $P<0.05$. There was no significant difference in all data between Sham group and Sham+ghrelin group. 【Conclusion】 Ghrelin can decrease the activity of inflammatory signaling proteins Akt, NF- κ B and iNOS in AM, therefore restricts AM expressing pro-inflammatory cytokines IL-1 β , TNF- α , and IL-6, thus alleviates sepsis-induced acute lung injury (ALI).

Key words: ghrelin; sepsis; acute lung injury (ALI); alveolar macrophage (AM); cytokine; NF- κ B; Akt; iNOS

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2018, 39(1):01-08]

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是在短时间内由严重感染、创伤、休克等各种肺内或肺外致病因素所导致的急性弥漫性肺损伤和进而发展的急性呼吸衰竭^[1]。尽管对其病理生理机制有了较多的认识, 治疗手段不断更新进步, 但 ARDS 的死亡率一直居高不下 (约 30%~50%)^[2], 目前认为 ARDS 的本质是多种炎症细胞及其释放的炎性介质间接介导的肺脏过度的炎症反应, 以往认为 ARDS 主要是由中性粒细胞介导, 现在认为肺泡巨噬细胞 (alveolar macrophage, AM) 也参与该过程, 并起到重要作用^[3], 但相对于中性粒细胞, AM 的研究显然相对不足。作为内源性的生长激素释放激素受体的配体, 已有较多证据显示生长激素释放肽 (ghrelin) 具有免疫调节功能, 对 ARDS 等多种炎症性疾病具有一定的保护作用^[4-6], 以往研究表明, ghrelin 可减轻脓毒症大鼠肺组织肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 与白介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平^[4,7], 我们前期研显示 ghrelin 可以减轻脓毒症大鼠急性肺损伤程度, 其机制或许与减少肺组织诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 表达、下调肺组织亚硝酸化应激程度^[5], 减少 AM 凋亡相关^[6]。但 ghrelin 是否可在动物整体水平上调控 AM 的炎症反应, 其机制又是如何, 目前国内外尚未见报道。为此, 本研究在前期研究基础上进一步在动物水平上探讨 ghrelin 是否通过调控 AM 炎症信号通路发挥对脓毒症大鼠肺保护作用, 为寻求 ARDS 新的有效治疗方法提供一定的实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 (体质量 280~320g, 由中山大学动物实验中心提供), 胎牛血清、DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司), 戊巴比妥 (美国 sigma 公司), ghrelin (美国 ENZO 公司), Trizol、Alexa Fluor 594、DAPI (美国 Invitrogen 公司), Prime-Script RT Master Mix、SYBR Premix Ex Taq II (日本 TaKaRa 公司), 白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、TNF- α 、IL-6 ELISA 试剂盒 (美国 eBioscience 公司), 细胞核蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒 (中国碧云天公司), 核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65、核因子 κ B 抑制蛋白 α (inhibitor of NF- κ B, I κ B α)、p-I κ B α 、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、p-Akt、 β -Actin、TATA 盒结合蛋白 (TATA-box binding protein, TBP)、GAPDH 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司), PVDF 膜、化学发光液 (美国 Merck Millipore 公司), 其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 动物和实验分组

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 (体质量 280~320 g) 来自中山大学动物实验中心 (北校园)。实验动物生产和使用许可证分别为: SCXK (粤) 2016-0029 和 SYXK (粤) 2017-0081。24 只大鼠随机分为为假手术 (Sham) 组、脓毒症 (CLP) 组、ghrelin 干预 (CLP+ghrelin) 组与 ghrelin 对照 (Sham+ghrelin) 组, 每组 6 只。本实验方案经中山大学实验动物伦理委员会批准, 批准编号为 IACUC-DB-16-0101。

1.3 脓毒症急性肺损伤动物模型的构建

以盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture, CLP)构建大鼠脓毒症模型,具体操作详见作者前期研究^[8]。

1.4 药物干预

分别于术后3 h、15 h分别对ghrelin干预组与ghrelin对照组腹腔注射ghrelin 20 nmol/kg,总给药量40 nmol/kg;对假手术组、脓毒症组则相应地腹腔注射等体积生理盐水。

1.5 肺组织病理检查

术后20 h,处死各组大鼠,结扎右肺下叶支气管并切取右下肺,经固定、脱水、石蜡包埋、切片后行苏木素、伊红染色,中性树脂封片后在光学显微镜下观察并按文献^[9]行组织学评分。

1.6 肺泡灌洗液与巨噬细胞采集

右下肺取材后,切开大鼠气管,插入气管导管,缓慢注入5 mL 4℃无菌生理盐水,按摩肺部并回收支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),反复冲洗4次。将BALF离心(4℃, 300 \times g, 15 min),上清-80℃保存。沉淀物4℃无菌PBS洗涤2次,加入含100 mL/L的胎牛血清DMEM培养基重悬细胞,并培养于含体积分数5% CO₂, 37℃培养箱中,待2 h后,获得贴壁纯化AM。

1.7 BALF炎症因子IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平检测

按照ELISA试剂盒说明书检测BALF中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平。

1.8 AM的IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA的检测

按Trizol试剂说明书提取细胞RNA,按Prime-Script RT Master Mix试剂盒说明合成cDNA,荧光定量PCR(qPCR)检测促炎因子IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的mRNA。IL-1 β 上游引物:AAT-GAC-CTG-TTC-TTT-GAG-GCT-GAC,下游引物:CGA-GAT-GCT-GCT-GTG-AGA-TTT-GAA-G; IL-6上游引物:AGG-AAC-GAA-AGT-CAA-CTC-CAT-CTG,下游引物:GGC-AGT-GGC-TGT-CAA-CAA-CAT-C; TNF- α 上游引物:AGT-CCG-GGC-AGG-TCT-ACT-TT,下游引物:TTC-AGC-GTC-TCG-TGT-GTT-TC; β -Actin上游引物:GAG-AGG-GAA-ATC-GTG-CGT,下游引物:GGA-GGA-AGA-GGA-TGC-GG。qPCR按照SYBR Premix Ex Taq II试剂盒说明,于Applied Biosystems

StepOnePlus qPCR仪(美国Life Technologies公司)上完成。

1.9 免疫荧光检测AM的核因子- κ B p65核转位

AM种植于含16 mm盖玻片的12孔板中,待细胞贴壁,去除培养基,经多聚甲醛溶液(40 g/L)固定20 min, Triton透化20 min,牛血清白蛋白(50 g/L)室温封闭1 h,核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65一抗溶液4℃孵育过夜,荧光二抗溶液室温避光孵育1 h, DAPI室温孵育15 min,防荧光淬灭剂封片后,于荧光显微镜下观察, NF- κ B p65被染成红色,细胞核被染成蓝色。

1.10 免疫印迹检测AM的NF- κ B p65、I κ B α 、p-I κ B α 、Akt、p-Akt和iNOS的表达

按照说明书分别提取AM的核蛋白与浆蛋白。蛋白定量后,以30 μ g每孔上样于聚丙烯酰胺SDS凝胶,电泳后电转移至PVDF膜上。5%脱脂牛奶封闭1 h,将膜孵育于一抗溶液中,4℃过夜。TBST缓冲液洗脱3次,每次5 min,将膜置于二抗溶液中,摇床上室温孵育1 h。TBST缓冲液洗脱3次,每次5 min,膜上覆盖化学发光液,于Image Quant LAS 4000 mini system(美国GE公司)中曝光。 β -Actin和GAPDH作为胞质内参,TBP作为核内参。

1.11 统计分析均由SPSS 20软件完成

计量资料使用均数 \pm 标准误描述。计量资料方差齐者采用单因素方差分析比较不同组间的差异,采用Bonferroni法进一步作组间两两比较;方差不齐者采用Kruskal Wallis检验比较,采用Mann-Whitney *U*检验进一步作组间两两比较。双侧检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 脓毒症模型与AM的鉴定

脓毒症组大鼠术后10 h随机行血培养,可见大肠埃希氏菌菌落形成,证实脓毒症造模成功。

经瑞氏-姬姆萨染色鉴定,获得的AM呈圆形或椭圆形,核大,偏蓝,呈肾形或椭圆形,多偏一侧;胞质呈灰蓝色,部分胞质可见吞噬颗粒,如箭头所示,纯度>90%(图1)。

2.2 肺组织病理学检查

假手术组与ghrelin对照组肺组织表面光洁呈粉红色,未见出血点,无胸腔积液。光学显微镜下

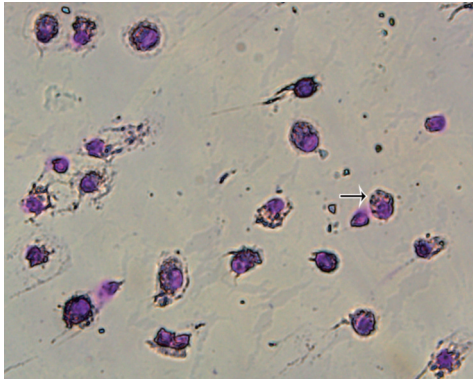


图1 大鼠肺泡巨噬细胞(瑞氏-姬姆萨染色, ×400)
Fig.1 Rat alveolar macrophages (Wright-Giemsa Stain, ×400)

观察肺组织HE染色切片,可见肺组织结构完整,间质无水肿,无出血,无炎症细胞浸润,肺泡腔内无水肿液、无透明膜(图2A、D)。脓毒症组大鼠大体可见肺组织肿胀,个别有少量血性胸腔积液,镜下可见组肺组织损伤显著,肺泡结构受到破坏,上皮细胞排列不整齐,部分上皮细胞变形脱落,间质水肿明显,有大量炎症细胞浸润,部分可见充血、血栓、肺透明膜形成(图2B),提示已形成ALI病理改变。与脓毒症组相比,ghrelin干预组肺组织

结构相对完整,间质水肿减轻,炎症细胞较少,出血较轻,透明膜形成较少(图2C)。计算各组组织学评分总分,假手术组为(2.7±0.5)分,脓毒症组为(10.3±0.7)分,ghrelin干预组为(6.7±0.8)分,ghrelin对照组为(2.8±0.5)。可见脓毒症组与ghrelin干预组评分均较假手术组升高,组间差异有统计学意义($P<0.05$),而ghrelin干预组总分较脓毒症组减少35.4%,组间差异有统计学意义($P<0.05$)(图2E)。

2.3 BALF中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的水平

如表1所示,ELISA提示脓毒症组大鼠BALF中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6为(263±17)pg/mL、(395±40)pg/mL和(273±5)pg/mL,较假手术组上升,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。Ghrelin可减少ALI大鼠BALF中IL-1 β 与IL-6的含量,其水平分别为(146±12)pg/mL和(182±10)pg/mL,较脓毒症组分别下降44.5%和33.3%,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。ghrelin干预组中BALF的TNF- α 浓度为(453±38)pg/mL,较脓毒症组稍高,但组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 大鼠AM的IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA的表达水平

如表2所示,qPCR提示,脓毒症组大鼠AM的

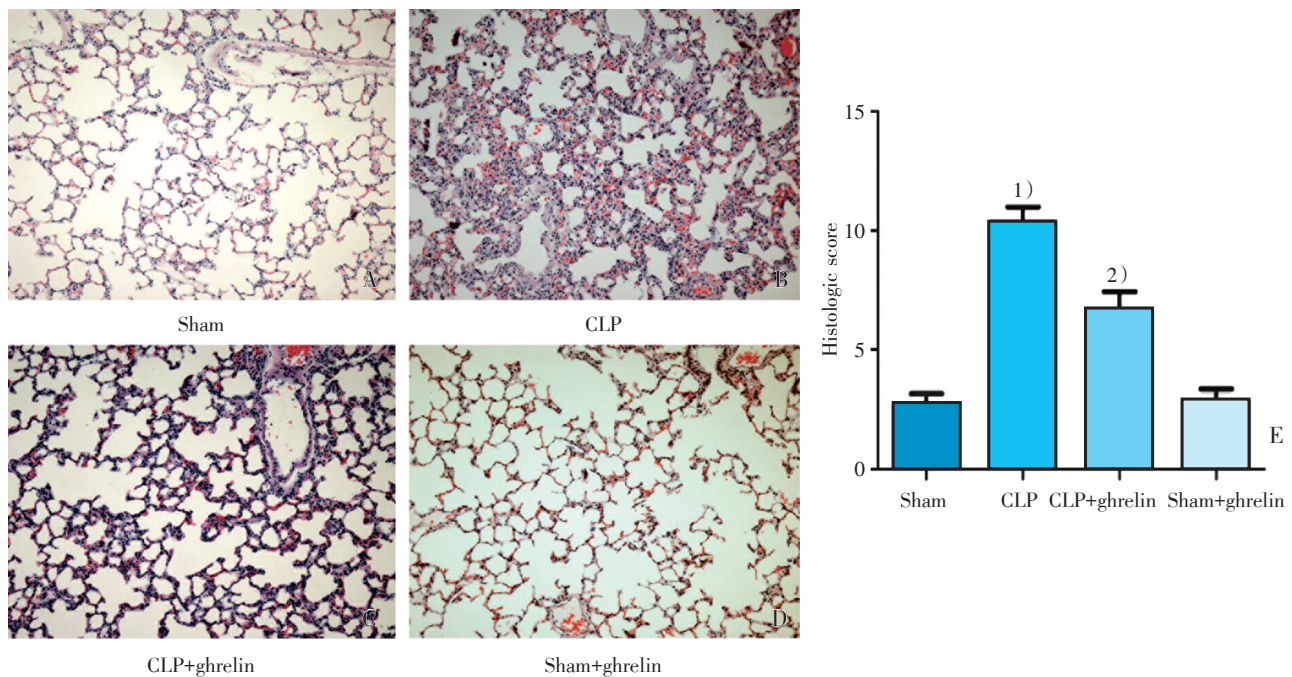


图2 右下肺组织HE染色
Fig.2 HE staining of right lower lobe of lung

表1 ELISA分析BALF中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的水平
Table 1 The concentrations of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in BALF detected by ELISA ($\bar{x} \pm s$)

Group	IL-1 β (pg/mg)	TNF- α (pg/mg)	IL-6 (pg/mg)
Sham	32 \pm 4	47 \pm 12	21 \pm 4
CLP	263 \pm 17 ³⁾	395 \pm 40 ³⁾	273 \pm 5 ³⁾
CLP+ghrelin	146 \pm 12 ¹⁾	453 \pm 39 ¹⁾	182 \pm 10 ⁴⁾
Sham+ghrelin	38 \pm 4	64 \pm 8	21 \pm 4
F/χ^2	19.767	17.847	409.827
P	<0.001 ¹⁾	<0.001 ¹⁾	<0.001 ²⁾

$n=6$, 1)Kruskal-Wallis test, 2)one-way ANOVA, 3) $P<0.05$ vs sham; 4) $P<0.05$ vs CLP

表2 qPCR分析大鼠肺泡巨噬细胞中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA的表达水平

Table 2 The mRNA expression of IL-1 β , TNF- α , and IL-6 in AMs from detected by qPCR ($\bar{x} \pm s$)

Group	IL-1 β	TNF- α	IL-6
Sham	3.09 \pm 0.69	10.06 \pm 2.24	0.40 \pm 0.09
CLP	119.02 \pm 5.86 ¹⁾	107.51 \pm 8.01 ¹⁾	102.59 \pm 7.40 ¹⁾
CLP+ghrelin	54.30 \pm 9.16 ²⁾	49.88 \pm 6.67 ²⁾	54.97 \pm 8.86 ²⁾
Sham+ghrelin	3.08 \pm 0.69	7.38 \pm 2.07	0.37 \pm 0.09
χ^2	19.467	19.45	19.607
P	<0.001	<0.001	<0.001

$n=6$, 1) $P<0.05$ vs sham; 2) $P<0.05$ vs CLP

IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA的表达水平分别较假手术组升高37.57、9.69和252.94倍,组间差异有统计学意义($P<0.05$),而ghrelin干预组的IL-1 β 、TNF- α 和IL-6 mRNA的表达水平分别较脓毒症组下调54.38%、53.6%和46.42%,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。ghrelin对照组与假手术组相比,促炎因子mRNA表达水平组间差异无统计学意义。

2.5 免疫荧光检测大鼠AM通路蛋白的NF- κ B p65表达水平

如图3A所示,免疫荧光提示假手术组与ghrelin对照组大鼠AM的核内NF- κ B p65荧光亮度低,脓毒症组大鼠的AM的核内NF- κ B p65荧光亮度显著增强,形成以核膜为边界红色亮斑,而ghrelin干预组大鼠的AM的核内NF- κ B p65荧光较脓毒症组减弱。对各组细胞核荧光强度进行统计(图3B),可见脓毒症组细胞核荧光较假手术组增加,ghrelin干预组细胞核荧光较脓毒症组减少,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。

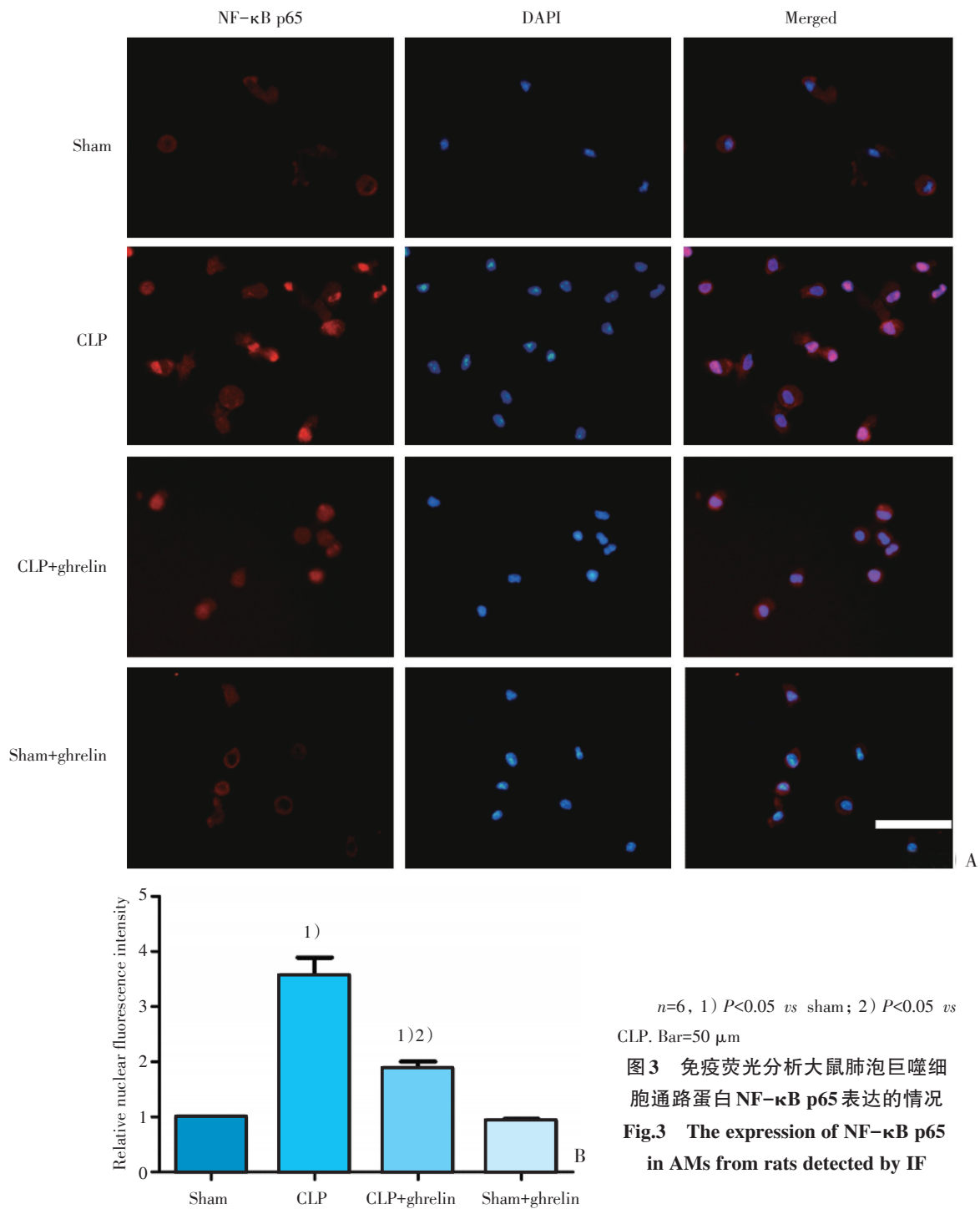
2.6 免疫印迹检测AM信号通路蛋白NF- κ B p65、I κ B α 、p-I κ B α 、Akt、p-Akt和iNOS表达情况

如图4所示,脓毒症组大鼠AM的胞核NF κ B p65与胞浆p-I κ B α 、p-Akt表达较假手术组增加,分别增加78%、162%、121%,脓毒症大鼠AM高表达iNOS,而假手术组不表达,组间差异有统计学意义($P<0.05$);ghrelin干预组胞核NF κ B p65与胞浆p-I κ B α 、p-Akt、iNOS表达较脓毒症组减少,分别减少32.58%、45.42%、27.6%和48.33%,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

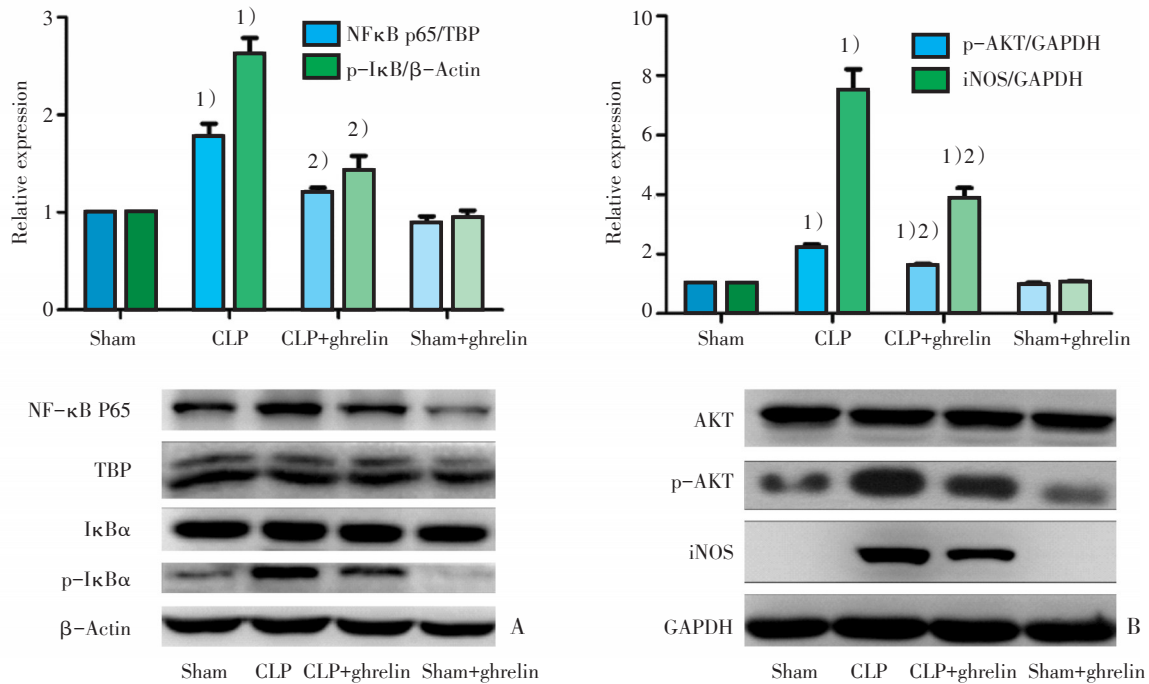
ARDS是脓毒症导致的多器官衰竭的常见表现之一,表现为显著的肺部炎症反应^[2]。有研究显示肺部细胞因子含量变化比血浆中的变化更为显著^[10]。其中,IL-1 β 、TNF- α 与IL-6具有显著促炎作用^[2]。为此,本研究从BALF入手,初步探索ghrelin对ARDS这三个炎症因子的影响。结果显示,CLP术后20 h,大鼠的肺部出现显著病理损伤,BALF中IL-1 β 、TNF- α 和IL-6水平较假手术组显著升高;ghrelin可减轻脓毒症大鼠肺部病理损伤,下调BALF中IL-1 β 和IL-6水平,这与ghrelin在其他炎症性疾病中的作用相似^[4, 11-12]。BALF中细胞因子主要来自于肺内常驻细胞,如AM、上皮细胞、内皮细胞等,其中,AM在分泌炎症因子方面起到核心调控作用^[3]。因此我们着重研究了ghrelin对AM分泌相关炎症因子的影响,结果显示,脓毒症大鼠AM的IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的转录显著提高,应用ghrelin后,上述细胞因子的转录减少,提示ghrelin或通过下调AM表达促炎因子IL-1 β 、TNF- α 和IL-6,继而减轻肺部炎症反应。但ghrelin未能降低BALF中TNF- α 水平,这是否与CLP模型中肺内其他常驻细胞亦高表达TNF- α 而不能都被ghrelin抑制有关,仍需进一步实验证实。

已有研究证实信号通路NF- κ B对于调控炎症介质的表达有重要作用,在NF- κ B的经典激活过程中,I κ B α 被磷酸化、继而降解,促使NF- κ B二聚体(多为p65:p50二聚体)从胞质中转移至胞



核,进而调控多种促炎因子的转录,包括IL-1 β 、TNF- α 和IL-6^[13]。在大多数情况下,ghrelin可降低NF- κ B活性,改善炎症疾病,如神经病理性疼痛^[14]和急性胰腺炎^[15]。本研究也发现,脓毒症大鼠AM的NF- κ B活性升高,ghrelin干预后,AM的NF- κ B活性下降。提示ghrelin或许通过降低脓毒症大鼠AM的信号通路NF- κ B活性而降低促炎因子的表达。

Akt可通过磷酸化被激活,是调节NF- κ B活性的上游通路信号之一,对调节炎症具有重要的作用^[16]。有研究显示,Akt激活后可能通过上调TLR4通路活性,增加巨噬细胞促炎因子的表达^[17];同时ghrelin可通过下调脓毒症大鼠Akt活性改善脑损伤^[18],但ghrelin是否可以调节巨噬细胞信号通路Akt的活性而改善脓毒症急性肺损伤,未见相关报道。本研究显示,脓毒症大鼠AM的



TBP is selected as nuclear loading control, β -Actin and GAPDH are selected as cytoplasmic loading controls. $n=6$, 1) $P<0.05$ vs sham; 2) $P<0.05$ vs CLP

图4 免疫印迹分析大鼠肺泡巨噬细胞信号通路蛋白NF- κ B p65、I κ B α 、p-I κ B α 、Akt、p-Akt和iNOS的表达情况
Fig.4 The expression of NF- κ B p65, I κ B α , p-I κ B α , Akt, p-Akt and iNOS in AMs from rats detected by Western blotting

Akt活性增强,给予ghrelin后Akt活性减弱,因此,ghrelin或可通过降低Akt活性,下调AM的NF- κ B活性,最终减少促炎因子的分泌。

iNOS具有显著的促炎作用,激活后可产生大量NO,增强机体氧化应激的程度,促进炎症因子表达促炎因子,促炎因子也可反过来激活iNOS^[19]。我们前期研究提示ghrelin可减少脓毒症大鼠肺组织iNOS的表达,减轻肺部氧化应激,减缓肺内局部炎症^[5]。本次研究再次证实脓毒症大鼠AM的iNOS表达较假手术组显著增加,ghrelin干预后

脓毒症大鼠AM的iNOS表达显著减少;同时进一步的研究提示,巨噬细胞内NF- κ B或Akt的激活可增加iNOS的表达^[20-21]。由此推断,在脓毒症大鼠体内,ghrelin通过降低AM中Akt与NF- κ B的活性,下调iNOS的表达,进而抑制AM促炎因子的分泌。

综上,ghrelin可降低脓毒症大鼠AM炎症调控的信号通路Akt、NF- κ B及iNOS的活性,进而下调AM促炎因子IL-1 β 、TNF- α 和IL-6的表达,减轻肺内局部炎症,对脓毒症肺损伤发挥保护作用。

参考文献

- [1] Thompson BT, Chambers RC, and Liu KD, Acute Respiratory Distress Syndrome [J]. NEJM, 2017, 377(6): p. 562-572.
- [2] Bellani G, Laffey JG, Pham T, et al. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries [J]. JAMA, 2016, 315(8): 788-800.
- [3] Han S, Mallampalli RK. The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation [J]. J Immunol, 2015, 194(3): 855-860.
- [4] Wu R, Dong W, Zhou M, et al. Ghrelin attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2007, 176(8): 805-813.
- [5] Zeng M, He W, Li L, et al. Ghrelin attenuates sep-

- sis-associated acute lung injury oxidative stress in rats[J]. *Inflammation*, 2015, 38(2): 683-690.
- [6] Li B, Zeng M, He W, et al. Ghrelin protects alveolar macrophages against lipopolysaccharide-induced apoptosis through growth hormone secretagogue receptor 1a-dependent c-Jun N-terminal kinase and Wnt/beta-catenin signaling and suppresses lung inflammation [J]. *Endocrinology*, 2015, 156(1): 203-217.
- [7] Peng Z, Zhu Y, Zhang Y, et al. Effects of ghrelin on pulmonary NOD2 mRNA expression and NF-kappaB activation when protects against acute lung injury in rats challenged with cecal ligation and puncture[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 13(4): 440-445.
- [8] 何婉媚, 曾勉, 易慧, et al. Ghrelin对脓毒症肺损伤大鼠肺泡巨噬细胞及肺组织iNOS表达的影响. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(5): 895-899.
He W, Zeng M, Yi H, et al. Effect of ghrelin on iNOS expression in alveolar macrophages and lung tissues in rats with sepsis-associated lung injury [J]. *Chin J Pathol*, 2013, 29(5): 895-899.
- [9] Zhou X and Xue C, Ghrelin attenuates acute pancreatitis-induced lung injury and inhibits substance P expression [J]. *Am J Med Sci*, 2010, 339(1): 49-54.
- [10] Lin WC, Lin CF, Chen CL, et al. Prediction of outcome in patients with acute respiratory distress syndrome by bronchoalveolar lavage inflammatory mediators[J]. *Exp Biol Med*, 2010, 235(1): 57-64.
- [11] Wu R, Dong W, Cui X, et al. Ghrelin down-regulates proinflammatory cytokines in sepsis through activation of the vagus nerve [J]. *Ann Surg*, 2007, 245(3): 480-486.
- [12] Wei H, Cao X, Zeng Q, et al. Ghrelin inhibits proinflammatory responses and prevents cognitive impairment in septic rats [J]. *Crit Care Med*, 2015, 43(5): e143-150.
- [13] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system [J]. *Annu Rev Immunol*, 2009, 27(9): 693-733.
- [14] Zhou CH, Li X, Zhu YZ, et al. Ghrelin alleviates neuropathic pain through GHSR-1a-mediated suppression of the p38 MAPK/NF-kappaB pathway in a rat chronic constriction injury model [J]. *Reg Anesth Pain Med*, 2014, 39(2): 137-148.
- [15] Zhou X, Xue C. Ghrelin inhibits the development of acute pancreatitis and nuclear factor kappaB activation in pancreas and liver [J]. *Pancreas*, 2009, 38(7): 752-757.
- [16] Sizemore N, Leung S, Stark GR. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(7): 4798-4800.
- [17] 王静, 徐萍, 杨志文, et al. PI3K/AKT激动剂和抑制剂对巨噬细胞炎症反应的影响 [J]. *胃肠病学*, 2017, 22(2): 82-86.
Wang J, Xu P, Yang Z, et al. Effect of Agonist and Inhibitor of PI3K/AKT on Inflammatory Response in Macrophages [J]. *Chin J Gastroenterol*, 2017, 22(2): 82-86.
- [18] Sun N, Wang H, Ma L, et al. Ghrelin attenuates brain injury in septic mice via PI3K/Akt signaling activation [J]. *Brain Res Bulletin*, 2016, 124(Supplement C): 278-285.
- [19] Kooguchi K, Kobayashi A, Kitamura Y, et al. Elevated expression of inducible nitric oxide synthase and inflammatory cytokines in the alveolar macrophages after esophagectomy [J]. *Crit Care Med*, 2002, 30(1): 71-76.
- [20] Martins J, Ferracini M, Ravanelli N, et al. Insulin suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 expression and NF-kappaB activation in alveolar macrophages [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2008, 22(1-4): 279-286.
- [21] Oh JH, Lee TJ, Park JW, et al. Withaferin A inhibits iNOS expression and nitric oxide production by Akt inactivation and down-regulating LPS-induced activity of NF-kappaB in RAW 264.7 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 599(1): 11-17.

(编辑 孙慧兰)