

Ghrelin 对脓毒症大鼠肺组织亚硝酸化应激的影响

何婉媚, 李 斌, 曾 勉*, 蒋玉洁, 常敏婵
(中山大学附属第一医院 MICU, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】观察 ghrelin 对脓毒症大鼠肺亚硝酸化应激的影响。【方法】采用盲肠结扎穿孔(CLP)方法制备脓毒症模型,24 只雄性 SD 大鼠按随机区组设计方法随机分为 3 组:假手术组、脓毒症组(以 CLP 表示)和 ghrelin 组。ghrelin 组于术后 3 h 及 15 h 腹腔注射 ghrelin,各组于术后 20 h 采集标本。我们检测血清超氧化物歧化酶(SOD)活性、肺湿/干重、肺组织诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)和硝基酪氨酸的表达水平。【结果】与假手术组[(93.17 ± 0.54)%]对比,脓毒症组[(85.62 ± 1.09)%]及 ghrelin 组[(88.71 ± 0.86)%]的血清 SOD 活性显著降低, $P < 0.05$ 。ghrelin 组血清 SOD 活性较脓毒症组升高,但 $P > 0.05$;两组间的肺湿/干重比无明显统计学差异。术后 20 h,与脓毒症组(1.08 ± 0.05)比较,CLP 术后 20 h ghrelin 组 iNOS 蛋白表达水平(0.87 ± 0.03)下降, $P < 0.05$ 。免疫组化结果显示 ghrelin 组硝基酪氨酸表达水平较脓毒症组低, $P < 0.05$ 。【结论】ghrelin 能下调肺组织 iNOS 蛋白的表达,减轻脓毒症大鼠肺组织亚硝酸化应激程度,并有提高血清 SOD 活性的趋势,但 ghrelin 没有改善肺湿/干重比。

关键词: 生长激素释放肽;脓毒症;肺损伤;诱导型一氧化氮合成酶;亚硝酸化应激

中图分类号: R631+.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-3554(2013)02-0220-05

Effect of Ghrelin on Lung Nitrosative Stress in Septic Rats

HE Wan-mei¹, LI Bin¹, ZENG Mian^{1*}, JIANG Yu-jie¹, CHANG Min-chan¹

(Medical Intensive Care Unit, The First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: 【Objective】 To investigate the effect of ghrelin on lung nitrosative stress in septic rats. 【Methods】 Sepsis model was induced by cecal ligation and puncture (CLP). Twenty-four male SD rats were randomly divided into 3 groups according to randomized block design: sham-operated controls, sepsis (CLP) group, and ghrelin group. In ghrelin group, ghrelin was administered by intraperitoneal injection at 3 h and 15 h post-operation. Samples among each group were harvested at 20 h post-operation. We detected the activity of serum SOD, lung wet/dry weight, pulmonary iNOS and nitrotyrosine levels. 【Results】 The activity of serum SOD in sepsis group [(85.62 ± 1.09)%] and ghrelin group [(88.71 ± 0.86)%] was significantly decreased when compared with sham-operated controls [(93.17 ± 0.54)%], $P < 0.05$. In ghrelin group, SOD activity was higher than that in sepsis group, but $P > 0.05$. There was no significant difference in lung wet/dry weight ratio between ghrelin group and sepsis group. Compared with sepsis group (1.08 ± 0.05), pulmonary iNOS protein level in ghrelin group (0.87 ± 0.03) was reduced at 20 h post-operation. The result of immunohistochemistry revealed that the expression of nitrotyrosine in ghrelin group was lower than that in sepsis group, $P < 0.05$. 【Conclusion】 Ghrelin can down-regulate pulmonary iNOS protein expression and decrease nitrosative stress in CLP-induced septic rats. Besides, it tended to increase serum SOD activity. However, lung wet/dry weight ratio did not show any improvement by ghrelin administration.

Key words: growth hormone releasing peptide; sepsis; lung injury; inducible nitric oxide synthase; nitrosative stress

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2013, 34(2):220-224]

氧化与抗氧化失衡是急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 发生和发展的主要病理生理机制之一,并可促进炎症反应的发展^[1]。过氧化亚硝酸盐

是氧化应激活性氮族中的强氧化物质^[2],亚硝酸化应激就是以其为首的一系列活性氮所致。Kooy^[3]的研究显示,人急性肺损伤肺组织中过氧化亚硝酸

收稿日期:2012-11-16

基金项目:广东省科技计划项目(2008B030301057)

作者简介:何婉媚,在读硕士研究生, E-mail: little_mayhe@hotmail.com; *通信作者:曾勉, 硕士生导师, 教授, 主任医师, E-mail: zengmian2004@163.com

盐的表达强度与肺损伤的程度相关,提示过氧亚硝酸盐在急性肺损伤氧化应激中的重要性。ghrelin 是 1999 年 Kojima 等^[4]从大鼠胃粘膜的 X/A 样细胞中分离出来的、由 21 个氨基酸组成的一种生长激素释放肽 (growth hormone releasing peptide)。研究发现接受外源性 ghrelin 的 ALI 动物肺损伤程度减轻,生存率增加^[5-6],许多研究认为 ghrelin 减轻肺损伤程度的原因是它有抑制炎症介质产生^[7-8]、改善肺循环^[8-9]及抑制细菌负荷^[8]的作用。然而,未见 ghrelin 对 ALI 氧化应激影响的研究报道。本实验通过盲肠结扎穿孔 (cecal ligation and puncture, CLP) 制作大鼠脓毒症急性肺损伤模型,观察 ghrelin 对亚硝化应激的影响,为 ghrelin 应用于临床提供实验室理论依据。

1 材料与方 法

1.1 动物和实验分组

动物来自中山大学北校区动物实验中心提供的雄性健康 SPF 级 SD 大鼠,体质量 280 ~ 330 g。实验动物生产和使用许可证分别为:SCXK (粤)2009-0011 和 SYXK (粤)2007-0081。24 只大鼠按随机区组设计方案分为 3 组,分别为假手术组 (Sham)、脓毒症组 (CLP) 和 ghrelin 组,每组 8 只大鼠。各组于术后 20 h 行右心室采血,取左肺称量干湿重,右上肺叶存于 -80℃ 备用,40 g/L 多聚甲醛固定右下肺叶。

1.2 脓毒症模型制作

按作者先前研究^[10-11]方法制备 CLP 大鼠脓毒症模型,术前不禁食、水。实验过程中动物处置方法符合动物伦理学标准。1%戊巴比妥 50 mg/kg 腹腔注射麻醉,常规消毒,沿腹正中线作 2 cm 切口,予 3/0 缝合线在距离回盲瓣 0.5 cm 的部位环形结扎盲肠,用 18 号注射器针头贯通穿刺盲肠 2 次,轻轻挤压肠管使肠道内容物自穿刺孔溢出,原位回纳盲肠,逐层缝合关腹。术后立即皮下注射无菌生理盐水 3 mL/100 g,以补充术中体液丢失及抗休克。假手术组则在找到盲肠后,将其外置于腹外 2 min 后按原位回纳腹腔,余步骤同手术组。

1.3 药物干预

ghrelin 组于 CLP 术后 3 h 及 15 h 腹腔内注射 ghrelin。ghrelin 购于美国 Enzo 公司,参照文献资料^[6, 12]注射 ghrelin 药物总剂量为 40 nmol/kg,

按时间点每次给予 20 nmol/kg,溶解于 1 mL 生理盐水后注射;其余各组术后 3 h 及 15 h 注射 1 mL 生理盐水作为对照。

1.4 标本采集及处理

1.4.1 血清超氧化物歧化酶活性检测 术后 20 h,大鼠腹腔注射 1%戊巴比妥 60 mg/kg,剪开胸壁,行右心室穿刺采血,注入含促凝剂采血管内,静置 30 min 后进行离心 (1600 \times g) 10 min,取上层血清置于 -80℃ 保存待检。比色法 (试剂盒由日本同仁化学研究所提供) 检测超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 抑制率以评估 SOD 的活性。

1.4.2 肺水含量测定 取大鼠左肺,迅速用吸水纸吸干肺表面水分和血液,电子天平称湿重,置于 65.3℃ 烘箱内烘干 48 h 至恒重,称干重并计算湿重/干重比值,以评估肺水含量。

1.4.3 免疫印迹法测定肺组织诱导型一氧化氮合成酶 研磨、裂解右上肺叶提取组织总蛋白,取 20 μ g 变性后蛋白提取液进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,封闭,一抗 (英国 Abcam 公司提供的抗 iNOS 多克隆抗体 1 : 500 或 β -actin 单克隆抗体 1 : 1 000) 4℃ 孵育过夜,兔二抗 (1 : 2 000; 广州昂科公司提供) 室温孵育 1 h,洗膜;应用增强的化学放射发光法 (ECL) 标记结合信号, X 线曝光,以上操作每一样品重复两次。采用 Quantity One 软件进行图像分析,以诱导型一氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 蛋白条带光密度值与对应 β -actin 蛋白条带光密度值间的比值对蛋白表达量进行半定量分析。

1.4.4 肺组织免疫组化检测硝基酪氨酸的肺内表达 40 g/L 多聚甲醛固定右下肺叶 48 h,石蜡包埋,依次进行脱蜡、阻断内源性过氧化物酶、0.1% 胰蛋白酶抗原修复、封闭。然后滴加 1 : 100 硝基酪氨酸一抗 (英国 Abcam 公司), 37℃ 孵育 2 h 后,二抗 (北京中杉金桥生物技术有限公司) 37℃ 孵育 30 min,最后依次行显色、脱水、透明及中性树脂封片。阴性对照采用 PBS 代替一抗。免疫组化图像判读标准:以细胞质出现棕黄色染色为阳性。按 DAB 染色强度分为:0 级,无棕黄色颗粒出现;1 级,可辨认的淡黄色;2 级,亮黄色;3 级,棕黄色。

1.5 统计学处理

统计分析用 SPSS 13.0 for windows 软件处理,各组数据均以均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$ 表示),方差齐者,

表 1 肺湿/干重比、iNOS 蛋白表达和血清 SOD 活性

Table 1 The lung wet/dry weight ratio, iNOS protein expression and serum SOD activity

($\bar{x} \pm s$)

	Sham group (n = 8)	CLP group (n = 8)	Ghrelin group (n = 8)	F_{treat}	P_{treat}	F_{block}	P_{block}
Wet/dry weight ratio	4.32 ± 0.05	4.62 ± 0.04 ¹⁾	4.65 ± 0.04 ¹⁾	19.097	0.001	1.366	0.327
SOD activity (%)	93.17 ± 0.54	85.62 ± 1.09 ²⁾	88.71 ± 0.86 ²⁾	14.583	0.002	0.240	0.908
Lung iNOS protein expression	0.53 ± 0.03	1.08 ± 0.05 ³⁾	0.87 ± 0.03 ³⁾⁴⁾	74.02	< 0.001	2.53	0.123

1), 2), 3) $P < 0.05$ vs Sham group; 4) $P < 0.05$ vs CLP group

采用方差分析进行分析; 各组间两两比较采用 SNK-q 法进行分析, 以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 SOD 活性水平

脓毒症组及 ghrelin 组的血清 SOD 活性 ($85.62 \pm 1.09, 88.71 \pm 0.86$) 均低于假手术组 (93.17 ± 0.54), 具有统计学差异 ($P < 0.05$); ghrelin 组 SOD 活性高于脓毒症组, $P > 0.05$ (表 1, 图 1)。

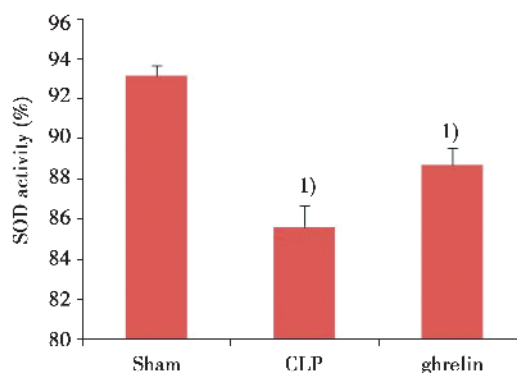


图 1 各组血清 SOD 活性比较柱状图

Fig.1 Comparison of serum SOD activity among each group

1) $P < 0.05$ vs Sham group.

2.2 肺湿/干重比值评估肺水含量

与假手术组比较, 脓毒症组与 ghrelin 组的肺湿/干重比值显著升高, 具有统计学差异 ($P < 0.05$); 而脓毒症组与 ghrelin 组之间无统计学差异 ($P > 0.05$, 见表 1, 图 2)。

2.3 ghrelin 对 CLP 大鼠肺组织 iNOS 蛋白表达水平的影响

术后 20 h, 脓毒症组与 ghrelin 组的肺组织 iNOS 蛋白表达水平较假手术组升高, 差异有统计

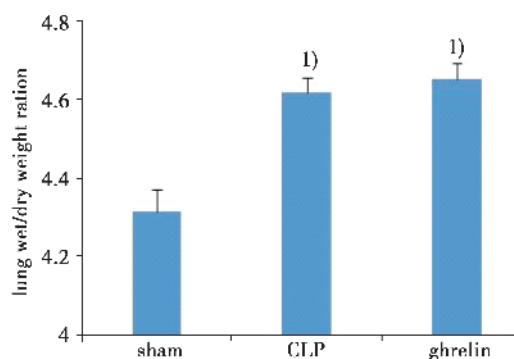


图 2 各组左肺湿/干重比柱状图

Fig.2 Comparison of left lung wet/dry weight ratio among each group

1) $P < 0.05$ vs Sham group.

学意义 ($P < 0.05$); 而 ghrelin 组 iNOS 蛋白表达水平较脓毒症组低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1, 图 3)。

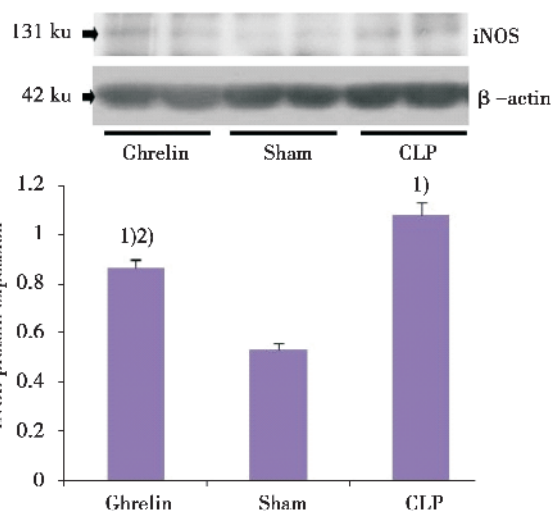


图 3 各组 iNOS 蛋白表达条带及柱状图

Fig.3 Comparison of lung iNOS protein level among each group

1) $P < 0.05$ vs Sham group; 2) $P < 0.05$ vs CLP group.

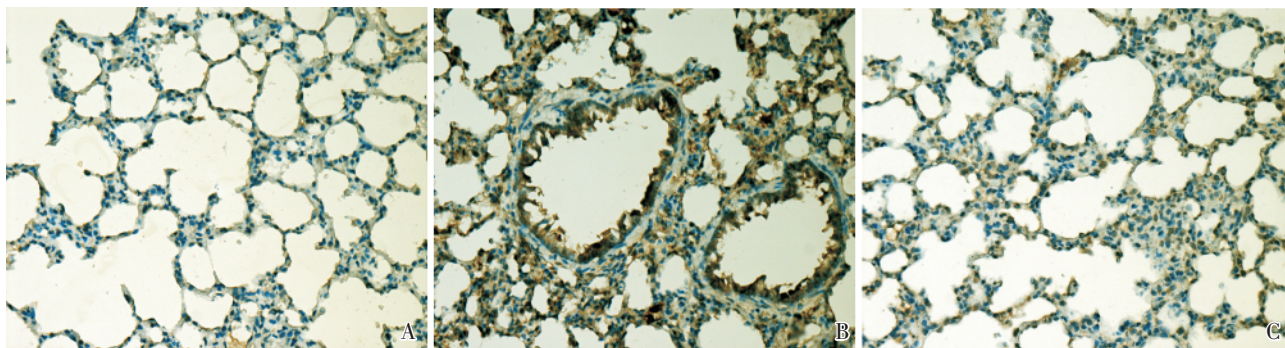


图 4 免疫组化检测右下肺组织硝基酪氨酸表达图

Fig.4 Immunohistochemistry for pulmonary nitrotyrosine expression

A: Tan staining was present in a few interstitial cells and vascular endothelial cells from sham-operated rat; B: Brownish-yellow color was seen in capillary vascular endothelium, tracheal mucous membrane and pulmonary alveolar epithelium from a septic rat 20 hours after CLP; C: Part of alveolar epithelium and pulmonary interstitial cells showed medium yellow color staining from ghrelin group. 400 ×

2.4 ghrelin 对 CLP 介导大鼠 ALI 肺组织硝基酪氨酸表达的影响

假手术组中可见少量间质细胞及血管内皮细胞呈浅棕黄色阳染(图 4A), 脓毒症组的肺组织微血管内皮、气管粘膜上皮及肺泡可见明显的棕黄色阳染(图 4B)。ghrelin 组的部分肺泡上皮细胞及肺间质细胞可见中等强度的棕黄色阳染, 强于假手术组, 但较脓毒症组弱(图 4C)。

3 讨论

ALI/ARDS 时存在显著的氧化与抗氧化失衡, 此时超氧阴离子、过氧化亚硝酸阴离子等活性氧族或活性氮族类氧化物质急剧增加, 而抗氧化酶的活性受抑制, 这种失衡的结果即为氧化应激。氧化应激可增加血管内皮细胞及肺泡上皮细胞的通透性, 损害肺泡上皮细胞液体转运功能^[13], 并可促进炎症反应的发展^[1]。

SOD 是重要的抗氧化酶, 其参与清除超氧阴离子、减少还原型亚硝酸盐的形成及所致的损伤, 对肺具有保护作用^[14]。胞外 SOD 的表达活性水平与肺损伤的程度呈明显负相关^[15-16], 而氧化应激产物可降低该酶活性^[13]。我们的研究结果显示在 CLP 术后 20 h, 脓毒症组大鼠血清 SOD 活性水平显著下降, 这与文献报道相似, 即脓毒症时机体存在抗氧化能力减弱的情况。应用 ghrelin 后, 血清 SOD 活性较 CLP 组升高, 提示外源性给予 ghrelin 有提高血清抗氧化酶活性趋势(尽管 $P > 0.05$)。此外, 本研究结果还发现 CLP 术后 20 h, 脓毒症组肺

组织 iNOS 蛋白表达水平增高, 而在 ghrelin 的干预下 iNOS 蛋白的表达减弱, 这提示 ghrelin 可下调脓毒症急性肺损伤肺组织 iNOS 的表达。在炎症病理状态下, 在细胞内 iNOS 催化作用下生成的大量一氧化氮(NO)。过氧化亚硝酸盐的产生与 NO 及 SOD 有关。高浓度的 NO 与 SOD 竞争结合超氧阴离子, 生成过氧化亚硝酸阴离子^[17]。该物质硝基化组织细胞的酪氨酸残基, 其产物硝基酪氨酸可作为评价亚硝酸化应激程度的标志物。本实验脓毒症组大鼠的肺组织血管内皮细胞、气管粘膜上皮细胞及肺泡硝基酪氨酸表达均显著增加, 提示严重炎症感染状态下, 硝基酪氨酸生成增加。ghrelin 组的部分肺泡上皮细胞及肺间质细胞尽管也可见中等强度的表达, 但较 CLP 组有所减弱, 提示 ghrelin 可以减少硝基酪氨酸的生成, 考虑与肺 iNOS 生成减少有关。

肺水含量是评价肺损伤程度的指征之一。我们的研究结果显示脓毒症模型大鼠在术后 20 h 肺水含量增多, 即使在 ghrelin 干预下也未见明显减少。然而, 有文献显示应用 ghrelin 能减轻炎症刺激状态下微血管渗漏^[9], 急性肺损伤肺水含量^[6]减少。我们分析可能与模型建立的细节有关。有文献指出盲肠结扎的部位会影响脓毒症的严重程度^[18], 我们在进行 CLP 术时, 对结扎盲肠的部位较高, 所建立的模型属于重度脓毒症模型。ghrelin 对不同严重程度脓毒症相关肺损伤模型肺水含量的影响可能存在差异。由于急性肺损伤患者不仅存在肺水生成增多, 也存在肺水清除能力减低^[19], 严重脓毒症可以影响酶活性, 导致肺水的清除效率减低。因此

除了关注肺水生成的因素外,还要考虑肺水的清除能力。

综上所述,ghrelin 可以减轻脓毒症大鼠肺组织亚硝酸化应激的程度,可能与 ghrelin 减弱肺组织 iNOS 蛋白表达致过氧化亚硝酸盐的产生减少有关。此外,我们认为有必要进一步探讨 ghrelin 对其他氧化应激类型及抗氧化酶的影响,从而全面分析 ghrelin 对氧化应激的作用。

参考文献:

- [1] Crapo J D. Oxidative stress as an initiator of cytokine release and cell damage[J]. *Eur Respir J Suppl*, 2003, 44(9): 4s-6s.
- [2] Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, et al. Reactive oxygen species in acute lung injury [J]. *Eur Respir J*, 1998, 11(3): 745-757.
- [3] Kooy NW, Royall JA, Ye YZ, et al. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995, 151 (4): 1250-1254.
- [4] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402(6762): 656-660.
- [5] Zhou X, Xue C. Ghrelin attenuates acute pancreatitis-induced lung injury and inhibits substance P expression [J]. *Am J Med Sci*, 2010, 339(1): 49-54.
- [6] 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.
- [7] Dixit VD, Schaffer EM, Pyle RS, et al. Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells [J]. *J Clin Invest*, 2004, 114(1): 57-66.
- [8] 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.
- [9] Kwan RO, Cureton E, Dozier K, et al. Ghrelin decreases microvascular leak during inflammation [J]. *J Trauma*, 2010, 68(5): 1186-1191.
- [10] 曾勉,贺云鹏,黄晓梅,等. 脓毒症大鼠有核细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 活性与白细胞介素-6 的关系 [J]. *中国危重病急救医学*, 2011, 23(5): 302-304.
- Zeng M, He Y, Huang X, et al. The relationship of peroxisome proliferator activated receptor γ ligands activity in nucleated cell and interleukin-6 level in septic rats [J]. *Chin Crit Care Med*, 2011, 23(5): 302-304.
- [11] 黄晓梅,曾勉,卢桂芳,等. 脓毒症大鼠有核细胞 PPAR γ 活性变化对 TNF- α 及 IL-4 的影响 [J]. *中山大学学报:医学科学版*, 2010(5): 630-634.
- Huang X, Zeng M, Lu G, et al. Relationship of Nucleated Cells PPAR γ Activity and TNF- α ,IL-4in Sepsis Rats [J]. *J Sun Yat-sen University (Med Sci)*, 2010(5): 630-634.
- [12] 谢树梨,肖正伦,黎毅敏,等. 生长素释放肽对急性肺损伤小鼠核因子 κ B 和纤溶系统的干预作用 [J]. *国际呼吸杂志*, 2010, 30(06): 123-128.
- Xie C, Xiao Z, Li H. et al. Intervention effect of ghrelin on nuclear factor- κ B and fibrinolytic system of acute lung injury mice [J]. *Inter J Res*, 2010, 30(06): 123-128.
- [13] Ware LB. Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2006, 27(4): 337-349.
- [14] Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in the lung and human lung diseases [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(12): 1600-1619.
- [15] Yen CC, Lai YW, Chen HL, et al. Aerosolized human extracellular superoxide dismutase prevents hyperoxia-induced lung injury [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26870.
- [16] Hassett P, Curley GF, Contreras M, et al. Overexpression of pulmonary extracellular superoxide dismutase attenuates endotoxin-induced acute lung injury [J]. *Intensive Care Med*, 2011, 37(10): 1680-1687.
- [17] Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease [J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 315-424.
- [18] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 31-36.
- [19] Ware LB, Matthay MA. Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 163(6): 1376-1383.

(编辑 孙慧兰)