

• 基础研究 •

脂多糖对大鼠肺泡巨噬细胞分泌一氧化氮和氧化应激的影响

杨学东 张新勇 赵怀兵 尹明 钱小顺 王士雯

【摘要】 目的 探讨细菌内毒素脂多糖(LPS)对SD大鼠肺泡巨噬细胞产生一氧化氮(NO)和氧化应激的影响。方法 采用支气管肺泡灌洗和细胞差速贴壁的方法分离大鼠肺泡巨噬细胞(AM),分别测定AM培养上清液NO含量、一氧化氮合酶(NOS)活性、丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性。结果 在5,10,20,50mg/L LPS分别干预下,大鼠AM培养上清液NO含量、NOS活性和MDA含量均显著升高,SOD活性显著降低,并且具有浓度依赖性。结论 LPS促进大鼠AM分泌NO,并诱导AM脂质过氧化损伤,这可能是内毒素诱发肺部炎症反应不易控制和急性肺损伤的机制之一。

【关键词】 脂多糖类;巨噬细胞,肺泡;一氧化氮;氧化性应激

Effects of lipopolysaccharide on nitric oxide production and oxidative stress of rat alveolar macrophages

YANG Xuedong, ZHANG Xinyong, ZHAO Huaibing, et al

Institute of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objective To determine the effects of lipopolysaccharide (LPS) on the production of nitric oxide (NO) and oxidative stress of rat alveolar macrophages (AM). Methods Rat AM were isolated from the bronchial-alveolar lavage fluid of adult Sprague-Dawley rats and harvested by selective plating technique. Rat AM were stimulated in the absence or presence of LPS (5, 10, 25 and 50 mg/L). Nitric oxide (NO) content and nitric oxide synthase (NOS) activity in the supernatant of AM culture medium were measured using NO and NOS assay kits. Oxidative stress was evaluated by measuring malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity in the supernatant. Results LPS increased NO content, NOS activity and MDA content and reduced SOD activity in a concentration-dependent manner. Conclusion LPS promoted NO production and oxidative stress of rat AM, which might contribute to the uncontrollable inflammatory response to lung infection and ultimately acute lung injury.

【Key words】 lipopolysaccharides; macrophage, alveolar; nitric oxide; oxidative stress

随着对脓毒症发病机制研究的日益深入,人们逐步认识到细菌内毒素是引起脓毒症乃至多器官功能不全综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的重要因素之一,而机体天然免疫系统则是一柄双刃剑^[1]。一方面,在细菌内毒素侵袭下,机体天然免疫系统被激活,吞噬、消化并产生炎症反应消灭病原体;另一方面,当机体天然免疫系统被过度激活,局部炎症反应失控甚至扩散至全身,可能导致全

身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS),全身多个脏器受损。

文献报道,肺脏是脓毒症最常见的首发衰竭器官^[2,3]。肺泡巨噬细胞(alveolar macrophage, AM)是匍行于肺泡表面的游离细胞,也是肺泡腔内的常驻吞噬细胞,是肺组织天然免疫系统的第一道防线,在肺部炎症反应中发挥重要作用^[4]。本试验研究脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)对大鼠AM产生一氧化氮(nitric oxide, NO)和氧化应激的影响,以探讨AM在内毒素性脓毒症发生与肺损伤中的作用。

1 材料和方法

1.1 材料 成年SD大鼠,由解放军总医院实验动物中心提供,体重140~160g,雌雄不拘,正常饮食。LPS和RPMI1640培养基均购自Sigma公司,胎牛血清购自Hyclone公司,6孔细胞培养板为Corning

收稿日期:2006-03-29

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(G2000057004)

作者单位:100853北京市,解放军总医院老年心血管病研究所

作者简介:杨学东,男,1971年10月生,河北省保定市人,医学博士,主治医师。Tel: 010-66936756, E-mail: yangxdfmmu@yahoo.com.cn

通讯作者:王士雯, Tel: 010-66936761

公司产品, NO、一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒均购自南京建成生物公司。

1.2 大鼠 AM 分离 将大鼠以 2% 戊巴比妥腹腔注射麻醉, 麻醉剂量为 40mg/kg。待麻醉起效后, 将大鼠固定于操作台上, 在距胸骨约 1cm 处纵行剪开颈正中皮肤, 钝性分离皮下组织直至气管, 结扎气管。快速打开胸腔, 顺序分离气管、支气管和肺脏, 用 4℃ 无菌磷酸盐缓冲液进行支气管肺泡灌洗, 经气管注入磷酸盐缓冲液 5ml, 轻柔按摩肺脏, 保留 1min 回吸收, 共 6 次。将收集的支气管肺泡灌洗液在低温离心机上以 1 000rpm 离心 10min, 用 RPMI1640 培养液洗涤细胞 2 次, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液重悬细胞, 调节细胞密度为 2×10^5 /L。采用差速贴壁法分离 AM^[5]。以台盼蓝染色法评价 AM 的活力, AM 活力在 95% 以上。倒置显微镜下, AM 直径较大, 大小不一, 形态具多形性, 细胞可呈圆形、椭圆形或不规则形。

1.3 AM 分泌 NO 和 NOS 活力的测定 将含 10% 胎牛血清的 AM 细胞悬液调整为 2×10^5 /L, 加入 6 孔平底细胞培养板, 每孔 2ml, 37℃ 孵育 2h 后更换细胞培养液, 继续培养, 待细胞贴壁伸展后, 每孔加入条件培养液, 置于 37℃ 孵箱内培养、干预 6h。收集细胞培养上清。根据 NO 试剂盒说明书测定 NO 含量, 其原理为: NO 与分子氧反应生成 NO₂, 并进一步转化为硝酸盐(NO₃⁻)和亚硝酸盐(NO₂⁻), 用硝酸还原酶法测定大鼠 AM 培养上清液 NO₃⁻/NO₂⁻ 的含量作为 NO 生成的指标。采用 NOS 试剂盒测定 NOS 活力, 其原理为: NOS 催化 L-精氨酸和分子氧反应生成 NO, NO 与亲核性物质生成有色化合物, 在 530nm 波长下测定光密度(OD)值, 根据 OD 值的大小计算 NOS 活力。

1.4 MDA 含量的测定 AM 培养上清收集方法同步骤 1.3。根据 MDA 试剂盒说明书, 以硫代巴比妥酸(thiobarbituric acid, TBA)法测定 MDA 含量。计算公式: MDA 含量(μmol/L) = (测定管吸光度 - 标准空白管吸光度) / (标准管吸光度 - 标准空白管吸光度) × 标准品浓度(10μmol/L)。

1.5 SOD 活力的测定 AM 培养上清收集方法同步骤 1.3。参照 SOD 试剂盒说明书进行测定。

1.6 实验分组 实验分为 5 组, 分别为空白对照组, 5, 10, 20, 50 mg/L LPS 组。

1.7 统计学处理 试验数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 两试验组均数比较采用 *t* 检验, 多组

间均数比较采用单因素方差分析。采用 Origin 软件进行统计分析, $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度 LPS 对大鼠 AM 的 NO 含量和 NOS 活性的影响 在 5, 10, 20, 50 mg/L LPS 分别干预下, 大鼠 AM 的 NO 含量和 NOS 活性均呈递增趋势, 并且均显著高于空白对照组(表 1)。

表 1 不同浓度 LPS 组大鼠 AM 的 NO 含量和 NOS 活性变化($n=4$)

LPS(mg/L)	NO (μmol/L)	NOS (kU/L)
0	0.85 ± 0.12	0.60 ± 0.04
5	4.71 ± 0.27*	1.05 ± 0.08*
10	8.64 ± 0.62*	1.90 ± 0.12*
20	11.71 ± 0.82*	2.43 ± 0.23*
50	15.35 ± 1.52*	2.71 ± 0.14*

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$

2.2 不同浓度 LPS 对大鼠 AM 的 MDA 和 SOD 活力的影响 在 5, 10, 20, 50 mg/L LPS 分别干预下, 大鼠 AM 的 MDA 含量呈递增趋势, 并且均显著高于空白对照组; 在 5, 10, 20, 50 mg/L LPS 分别干预下, 大鼠 AM 的 SOD 活性呈递减趋势, 并且均显著低于空白对照组(表 2)。

表 2 不同浓度 LPS 组大鼠 AM 的 MDA 含量和 SOD 活性变化($n=4$)

LPS(mg/L)	MDA (μmol/L)	SOD (kU/L)
0	0.71 ± 0.06	21.96 ± 1.22
5	1.15 ± 0.08*	17.47 ± 1.41*
10	1.37 ± 0.08*	15.44 ± 0.47*
20	1.86 ± 0.15*	10.64 ± 0.95*
50	2.16 ± 0.12*	8.30 ± 0.53*

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.01$

3 讨论

研究资料表明, NO 在脓毒症和脓毒性休克的发病机制中扮演着重要角色^[6]。NO 具有致炎和抗炎双重效应, 既是氧化剂又是抗氧化剂, 被认为是免疫和炎症网络的重要因子。大剂量 NO 可引起低血压、细胞内缺氧、凋亡、乳酸酸中毒, 最终导致多器官衰竭。因此, NO 是诱导机体微循环障碍和多器官损伤的重要炎性介质。文献报道, 脓毒症和脓毒性休克患者的血浆 NO 水平显著升高^[7], 感染性 SIRS 患者的血浆 NO 水平显著高于非感染性 SIRS 患者和健康人, 并且血浆 NO 水平随着 SIRS 和 MODS 的病情加重而升高^[8], 因此血浆 NO 水平也是反映脓毒症患者

病情变化的指标之一。本试验结果表明,LPS可刺激大鼠AM的NOS活性增强,分泌NO增多,提示在严重肺部细菌感染时,作为肺第一道天然免疫屏障,AM可分泌大量NO从而参与SIRS和肺炎损伤的病理生理机制,而AM的NOS活性升高可能与LPS诱导型NOS基因表达上调有关^[9]。

正常情况下,体内代谢产生少量自由基,可被机体清除自由基的抗氧化酶类系统如SOD等和非酶类系统如维生素C等抗氧化营养素迅速清除,不至于因堆积过多而引起组织的损伤。在某些病理情况下,体内自由基清除系统功能下降,过多的自由基可氧化生物膜的多不饱和脂肪酸,产生脂质过氧化,使细胞膜结构受到损伤,从而引起细胞的破坏、老化和功能障碍。尽管人们对脓毒症的病理生理过程的认识尚待不断深化,但已有大量研究表明,氧化应激可能是关键因素之一。脓毒症患者SIRS失控,氧化应激增加,引起炎症细胞过度释放氧自由基,而机体内源性的抗氧化剂及自由基清除剂在脓毒症时被大量消耗,自由基与其他炎症介质协同,对各组织器官造成严重损伤^[10]。并且危重患者氧化应激越高,临床预后越差^[11]。文献报道,肺脏氧化应激增强是脓毒症急性肺损伤的主要病理生理特征。肺氧化应激主要是由肺炎细胞如AM和中性粒细胞介导的,而与肺实质细胞如上皮细胞、内皮细胞无关^[12]。本实验选用MDA、SOD作为脂质过氧化反应的指标。MDA是脂质过氧化的终产物,能改变膜的流动性、交联、结构和功能,增加膜的脆性,最终导致膜的损坏。SOD是一种重要的抗氧化酶,具有清除自由基、抑制脂质过氧化反应的作用。本试验结果表明,LPS可刺激大鼠AM产生MDA增多,而SOD减少,提示LPS可直接诱导大鼠AM氧化损伤,这可能是AM在内毒素攻击下免疫防御反应失衡的原因之一^[13],而抗氧化剂可能在重症感染或脓毒症时保护机体免疫系统,防止免疫反应失衡引起的肺损伤。

在LPS作用下,大鼠AM产生MDA和NO均呈增多趋势,大鼠AM氧化应激增强可能与其合成、分泌NO增加有关。NO可激活可溶性鸟苷酸环化酶,引起蛋白巯基的亚硝基化,并且在蛋白活性位点与金属离子形成亚硝酰基复合物;NO可与超氧化物反应,产生强烈的氧化剂如超氧化氮和羟自由基,这可能是NO导致组织氧化应激损伤的最重要的机制之一。NO和超氧化氮可通过多种途径诱导肺脏氧化应激,如(1)直接导致细胞氧化损伤;(2)

抑制线粒体酶(如细胞色素酶);(3)诱导细胞DNA断裂损伤,激活细胞内多聚-腺苷5'二磷酸-核糖聚合酶,引起细胞能量损耗等。

参考文献

- [1] Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res*, 2005,11:5-11.
- [2] Davis KA, Santaniello JM, He LK, et al. Burn injury and pulmonary sepsis: development of a clinically relevant model. *J Trauma*, 2004,56:272-278.
- [3] 王士雯,韩亚玲,钱小顺,等. 1605例老年多器官功能衰竭的临床分析. *中华老年多器官疾病杂志*, 2002,1:7-10.
- [4] Delclaux C, Azoulay E. Inflammatory response to infectious pulmonary injury. *Eur Respir J Suppl*, 2003, 42: 10s-14s.
- [5] Hofstetter C, Flondor M, Hoegl S, et al. Interleukin-10 aerosol reduces proinflammatory mediators in bronchoalveolar fluid of endotoxemic rat. *Crit Care Med*, 2005,33:2317-2322.
- [6] Hauser B, Bracht H, Matejovic M, et al. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg*, 2005,101:488-498.
- [7] Evans T, Carpenter A, Kinderman H, et al. Evidence of increased nitric oxide production in patients with sepsis syndrome. *Circ Shock*, 1993,41:77-81.
- [8] Mitaka C, Hirata Y, Yokoyama K, et al. Relationships of circulating nitrite/nitrate levels to severity and multiple organ dysfunction syndrome in systemic inflammatory response syndrome. *Shock*, 2003,19:305-309.
- [9] Taylor BS, Geller DA. Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock*, 2000,13:413-424.
- [10] Sener G, Toklu H, Ercan F, et al. Protective effect of beta-glucan against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Int Immunopharmacol*, 2005, 5: 1387-1396.
- [11] Alonso-de-Vega JM, Diaz J, Serrano E, et al. Oxidative stress in critically ill patients with systemic inflammatory response syndrome. *Crit Care Med*, 2002,30:1782-1786.
- [12] Razavi HM, Wang L, Weicker S, et al. Pulmonary oxidant stress in murine sepsis is due to inflammatory cell nitric oxide. *Crit Care Med*, 2005,33:1333-1339.
- [13] Forman HJ, Torres M. Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med*, 2001,22:189-216.