

• 基础研究 •

脓毒症小鼠肺组织瘦素水平及其它相关酶活性的研究

颜光涛 薛辉 林季 郝秀华 张凯 王录煊

【摘要】 目的 研究脓毒症对肺组织瘦素水平及相关酶活性的影响,探讨瘦素在急性炎症反应中的作用。方法 建立小鼠盲肠结扎致脓毒症模型,采用放射免疫分析法和分光光度分析法分别检测肺组织匀浆液中瘦素及髓过氧化物酶(MPO)、谷胱甘肽-S转移酶(GST)、黄嘌呤氧化酶(XOD)、超氧化物歧化酶(SOD)等4种与自由基合成、解毒和嘌呤生成代谢相关的酶的水平,同时以HE染色方法观察肺组织病理组织学改变。结果 肺组织匀浆液中瘦素水平(19.58 ± 7.73) $\mu\text{g/L}$ 明显低于假手术对照组(29.07 ± 8.27) $\mu\text{g/L}$,腹腔内注射瘦素(0.1mg/ml)后6h可见脓毒症小鼠肺内瘦素水平上升(33.62 ± 11.54) $\mu\text{g/L}$,而吲哚美辛给药(2mg/kg)却无效。同时,还发现瘦素保护组可恢复肺组织MPO活性(17.74 ± 8.96) vs 脓毒症组(30.70 ± 4.37) U/g、降低肺GST活性(26.50 ± 8.73) vs 假手术组(70.11 ± 20.44) kU/g、升高肺XOD活性(0.14 ± 0.03) vs 假手术组(0.12 ± 0.04) U/g,但对肺SOD无显著影响。肺组织病理切片HE染色显示,与假手术组相比,瘦素保护组肺水肿减轻、炎性分泌物减少,吲哚美辛对肺组织的影响与瘦素相比并不一致。结论 脓毒症发生后6h肺组织瘦素水平显著下降,伴随MPO、GST、XOD的显著改变。经腹腔内注射瘦素后可恢复肺组织瘦素水平,同时改善和调节上述酶活性于正常或接近正常水平,而吲哚美辛的保护作用与瘦素水平无关。

【关键词】 瘦素;脓毒症;肺脏;髓过氧化物酶

Leptin level in lungs of septic mice and its relationship with other related enzymes

YAN Guangtao, XUE Hui, LIN Ji, et al

Research Laboratory of Biochemistry, Basic Medical Institute, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

【Abstract】 Objectives To study the effect of sepsis on leptin levels and related enzymes in lungs of mice, and to explore the role of leptin in acute inflammation. Methods Sepsis model of mice was established by cecum ligation and perforation. Radioimmunoassay was used for determining leptin and spectrophotometry assay was used for measuring levels of four enzymes related to synthesis of free radicals, detoxication and metabolism of purine, including myeloperoxidase (MPO), glutathion-S-transferase (GST), xanthine oxidase (XOD) and superoxide dismutase (SOD), in lungs homogeniate. Hematoxylin-eosin stain was used to observe the histopathologic changes of lungs. Results Compared with sham operation group (29.07 ± 8.27 $\mu\text{g/L}$), leptin levels in lungs of sepsis mice were significantly lower (19.58 ± 7.73 $\mu\text{g/L}$). Six hours after leptin injection (0.1mg/ml , ip), leptin levels in lungs of sepsis mice significantly increased (33.62 ± 11.54 ng/ml), while indomethacin injection (2mg/kg , ip) had no such effect. Moreover, leptin injection could recover MPO activity (17.74 ± 8.96 vs sepsis mice 30.70 ± 4.37 U/g), decrease GST activity (26.50 ± 8.73 vs sham operation 70.11 ± 20.44 kU/g) and increase XOD activity (0.14 ± 0.03 vs sham operation 0.12 ± 0.04 U/g) in lungs, but it could not influence SOD activity. Histopathologic investigation of lungs slices found that pulmonary edema was relieved and inflammatory secretion decreased in leptin injection group (vs sham operation group), but indomethacin injection had different influence from it. Conclusions Six hours after

收稿日期:2005-11-16

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970717)

作者单位:100853 北京市,解放军总医院基础医学研究所生化研究室

作者简介:颜光涛,男,1960年9月生,四川省宜宾市人,医学硕士,研究员,基础所副所长兼生化室主任。Tel:010-66937072, E-mail:yan301@263.net

sepsis, leptin levels in lungs decreased significantly, accompanied by significant increase in MPO, GST and XOD activities. Leptin injected intraperitoneally could recover leptin level in lungs, improve and modulate levels of aforementioned enzymes to normal or nearly normal levels, while indomethacin protection had no relation with leptin.

【Key words】 leptin; sepsis; lung; myeloperoxidase

瘦素(leptin)是一种重要的前细胞因子,表达量约占脂肪细胞表达蛋白的一半,发挥中枢和外周的多功能调节作用,主要涉及到机体摄食、能量代谢、体重平衡的调节,可抑制进食和促进能量消耗^[1]。近来瘦素在创伤、感染和修复过程的作用越来越引人重视,被认为是一种有重要功能的体内环境的平衡因素,发挥其促进免疫应答、增强血细胞分化成熟、促进血管生成、对抗休克和感染导致的多脏器功能损害^[2]。我们前期也发现肠缺血/再灌注损伤造成瘦素早期一过性的显著下降又很快恢复并高于对照水平^[3];同样,烧伤病人血浆中也发现瘦素水平显著下降并伴皮质激素、胰岛素和血糖的上升^[4],提示瘦素在创伤感染后变化规律很复杂,因受神经内分泌和其它体内因素的影响而不同。一般情况下,脓毒症发生后肺组织中髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、谷胱甘肽-S 转移酶(glutathione-S-transferase, GST)活性下降,而黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性上升,随时间不同而此消彼长,显示自由基形成和清除之间的动态平衡状态。

因此,我们在本实验中,拟继续观察瘦素在脓毒症休克不同期的改变,特别是同肺组织中相关的酶活性的变化,证明瘦素在感染性休克中发挥作用的可能机制,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 近交系昆明小鼠(雄性、25 g)购自军事医学科学院实验动物中心。实验前禁食 12 h、不禁水。随机分为假手术组、脓毒症组、瘦素保护组、吡啶美辛保护组,每组包含 6 h 和 12 h 各一组,其中 6 h 各组为 10 只小鼠,12 h 各组为 11 只小鼠。

1.2 实验试剂 MPO、GST、XOD、SOD 均购自南京建成生物工程研究所;瘦素购自英国 Peprotech 公司,吡啶美辛购自美国 Sigma 公司;小鼠瘦素放射免疫分析法为本室自建。其他试剂均为国产分析纯。

1.3 脓毒症模型的建立 实验前禁食 12 h,1%戊巴比妥钠 0.2 ml 腹腔内注射麻醉小鼠,无菌条件下切开小鼠下腹部正中约 1.5 cm,找出盲肠阑尾部结

扎,用 5 号针头穿孔 2 个,将肠放回原位置后缝合。假手术组麻醉后切腹,并寻找到盲肠阑尾末端但不结扎和穿孔。瘦素保护组和吡啶美辛保护组于缝合后腹腔内各注射 2 $\mu\text{g}/0.2\text{ ml}$,200 $\mu\text{g}/0.2\text{ ml}$ 瘦素和吡啶美辛生理盐水溶液,12 h 组于 6 h 后再注射同量上述药物。脓毒症组和假手术组均在相应时间点注射不含药物的同体积生理盐水。在相应 6 h 和 12 h 后处死小鼠并收集各组血液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下收集并冻存部分脏器组织,另一部分贮存于 4% 甲醛,分别作组织匀浆和病理切片 HE 染色。

1.4 肺组织匀浆液的制备 取冻于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 的肺组织块称重放入盛有冰冷生理盐水的玻璃匀浆器中,调整其浓度为 0.2 g/ml,在冰浴中上下转动研磨数十次,充分研碎,使组织匀浆化。根据组织湿重补充生理盐水使匀浆液浓度为 10%。将匀浆液倒出少部分用于 MPO 的测定,剩余部分用 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3500 r/min 离心 20 min,取上清,用于测定其他指标。

1.5 匀浆液上清 MPO 的测定 按试剂盒要求配制各试剂,采用 96 孔板代替玻璃试管,改变各种试剂的体积后加样如下:取未离心的组织匀浆液 10 μl 、缓冲液 10 μl 、显色剂 150 μl ,加入 96 孔板中混匀,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min 后加入终止液 2.5 μl ,混匀后于 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,取出后立即用酶标仪读取各孔 OD 值,测量波长为 460 nm。

1.6 匀浆液上清 GST 的测定 按试剂盒要求配制各试剂。取基质液 30 μl 、组织匀浆上清液 10 μl ,加入 96 孔板中,混匀后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min,再加缓冲液、无水乙醇各 100 μl ,混匀后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、3500 r/min 离心 10 min,取上清做显色反应。取 20 $\mu\text{mol/L}$ 谷胱甘肽标准品/上清液 100 μl 、缓冲液 100 μl 、显色剂 25 μl ,加入 96 孔板中混匀,室温放置 15 min,用酶标仪读取各孔 OD 值,测量波长为 412 nm。

1.7 匀浆液上清 XOD 的测定 按试剂盒要求配置各试剂。取匀浆上清液 5 μl 、缓冲液 127 μl ,于 96 孔板中混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,加入显色剂 100 μl ,混匀后用酶标仪读取各孔 OD 值,测量波长为 530 nm。

1.8 匀浆液上清 SOD 的测定 按试剂盒要求配置各试剂。取组织匀浆上清液 5 μl 、缓冲液 130 μl ,加入 96 孔板中混匀,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 40 min,加入显色剂

200 μl , 混匀后于室温放置 10 min, 用酶标仪读取各孔 OD 值, 测量波长为 550 nm。本实验中样品需要稀释, 稀释后浓度为 0.67%。

1.9 瘦素浓度的测定 组织匀浆上清液样品测量标准点为 1.1、3.3、11、33、100、300 $\mu\text{g/L}$, 测量时加样 100 μl , 标准品及样品同瘦素抗体 100 μl 及 ^{125}I -瘦素 100 μl (计数约为 20 000 cpm) 充分混匀后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置 24 h。再加免疫分离剂 500 μl , 混匀后室温反应 15 min, 再按 4 $^{\circ}\text{C}$ 、2830 r/min 离心 20 min, 弃上清, 测量沉淀的计数值并绘制标准曲线。

1.10 肺组织切片病理染色 肺组织经常规石蜡包埋后切片, HE 染色后观察组织结构变化。

1.11 数据统计分析方法 采用 STATA 7.0 统计分析软件处理。对于正态分布、样本之间方差齐的数据, 采用参数统计分析(t 检验或单因素方差分析); 不符合正态分布、样本之间方差不齐的数据, 则采用非参数统计(秩和检验)。检测结果以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 以 $P<0.05$ 为差异显著标准。

2 结果

2.1 脓毒症后肺 MPO 的变化及瘦素对其的影响 如表 1 所示, 脓毒症后 6 h 肺组织中 MPO 活性即有下降, 12 h 后同假手术组差异非常显著。采用瘦素和吡啶美辛保护后, 肺组织中 MPO 在 12 h 时已提高, 并与脓毒症组有显著差异。结果提示, 瘦素和吡啶美辛对脓毒症肺组织 MPO 有一定的恢复效应。

表 1 脓毒症小鼠肺组织 MPO 活性(U/g)的改变

分 组	6 h(n=10)	12 h(n=11)
假手术组	37.63 $\pm$ 6.78	40.62 $\pm$ 12.80
脓毒症组	29.53 $\pm$ 5.90	17.74 $\pm$ 8.96 *
瘦素保护组	30.48 $\pm$ 8.32	30.70 $\pm$ 4.37 #
吡啶美辛保护组	31.63 $\pm$ 4.86	32.49 $\pm$ 8.08 #

注:与假手术组相比,* $P<0.01$;与脓毒症组相比,# $P<0.05$

2.2 脓毒症后肺 GST 的变化及瘦素对其的影响 如表 2 所示, 脓毒症后 6 h 肺组织 GST 活性比假手术组明显下降, 而到 12 h 即基本恢复于对照水平。瘦素和吡啶美辛保护对 GST 活性基本没有影响。

表 2 脓毒症小鼠肺组织 GST 活性(kU/g)的改变

分 组	6 h(n=10)	12 h(n=11)
假手术组	70.11 $\pm$ 20.44	76.31 $\pm$ 28.26
脓毒症组	36.28 $\pm$ 15.49*	72.47 $\pm$ 21.71
瘦素保护组	26.50 $\pm$ 8.73*	64.88 $\pm$ 32.76
吡啶美辛保护组	50.62 $\pm$ 5.71	77.51 $\pm$ 18.58

注:与假手术组相比,* $P<0.05$

2.3 脓毒症后肺 XOD 的变化及瘦素对其的影响 如表 3 所示, 脓毒症后 6 h 肺组织 XOD 活性明显提高, 一直持续到 12 h。瘦素和吡啶美辛保护能降低 XOD 活性, 以脓毒症 6 h 时最为明显。

表 3 脓毒症小鼠肺组织 XOD 活性(U/g)的改变

分 组	6 h(n=10)	12 h(n=11)
假手术组	0.12 $\pm$ 0.04	0.12 $\pm$ 0.03
脓毒症组	0.17 $\pm$ 0.01*	0.18 $\pm$ 0.03*
瘦素保护组	0.14 $\pm$ 0.03#	0.15 $\pm$ 0.03
吡啶美辛保护组	0.18 $\pm$ 0.06	0.14 $\pm$ 0.03

注:与假手术组相比,* $P<0.05$;与脓毒症组相比,# $P<0.05$

2.4 脓毒症后肺 SOD 的变化及瘦素对其的影响 如表 4 所示, 脓毒症后 12 h 肺组织 SOD 活性较假手术组显著上升, 采用瘦素和吡啶美辛保护对肺 SOD 活性基本没有影响。

表 4 脓毒症小鼠肺组织 SOD 活性(U/mg)的改变

分 组	6 h(n=10)	12 h(n=11)
假手术组	6.89 $\pm$ 1.04	6.80 $\pm$ 0.94
脓毒症组	6.90 $\pm$ 0.81	7.80 $\pm$ 0.93*
瘦素保护组	7.35 $\pm$ 0.61	7.66 $\pm$ 1.36
吡啶美辛保护组	7.87 $\pm$ 0.46	7.66 $\pm$ 1.09

注:与假手术组相比,* $P<0.05$

2.5 脓毒症后肺瘦素水平的变化 瘦素放射免疫分析法的标准曲线如图 1 所示。

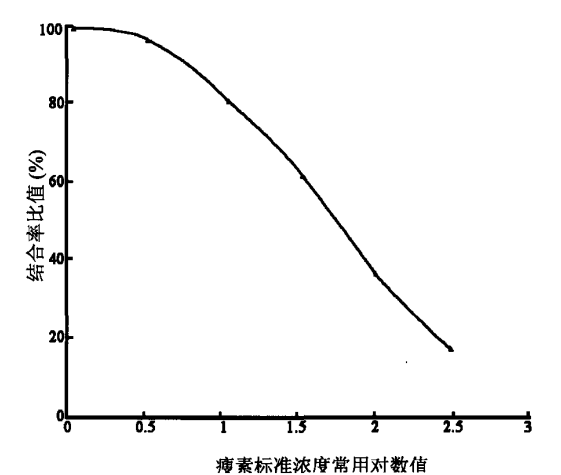


图 1 瘦素放射免疫分析法标准曲线

如表 5 所示, 脓毒症后 6 h 肺内瘦素水平显著下降, 而 12 h 后又明显高于 6 h 水平。瘦素保护对瘦素下降有抑制作用, 吡啶美辛保护组对肺瘦素水平无明显影响。

表 5 脓毒症小鼠肺组织瘦素水平($\mu\text{g/g}$)的改变

分 组	6 h($n=10$)	12 h($n=11$)
假手术组	29.07 $\pm$ 8.27	29.05 $\pm$ 6.27
脓毒症组	19.58 $\pm$ 7.73*	37.72 $\pm$ 11.8
瘦素保护组	33.62 $\pm$ 11.5*	35.03 $\pm$ 16.9
吡啶美辛保护组	21.87 $\pm$ 6.84	39.37 $\pm$ 13.8

注:与假手术组相比,* $P<0.05$;与脓毒症组相比,* $P<0.05$

2.6 脓毒症后肺组织切片病理染色的变化 如图 2 所示,脓毒症后 6 h 肺部即出现充血、水肿,炎性细胞浸润增加,12 h 后病理改变加重。经瘦素和吡啶美辛保护后,肺组织切片 HE 染色显示肺水肿减轻、炎性细胞浸润减少。

3 讨 论

盲肠结扎穿孔导致的急性化脓性腹膜炎脓毒症是一种经典的脓毒症模型,能模拟和重复人类脓毒症时以内毒素为主要致病因素的病理状态。小鼠脓毒症模型易操作,稳定性、可重复性高,取材方便,是一种常见的内毒素休克的动物模型。在此模型中,肠和肺的损伤是首要的脏器损伤。肠道通透性增加后,内毒素大量入血,直接攻击敏感的肺脏,造成内皮细胞水肿、氧交换能力下降、细菌和炎性细胞浸润等。因此,肺的功能和内毒素攻击有密切的关系。我们选择肺组织作为瘦素功能研究的靶标,就是基于上述考虑。另外,肺组织中富含 MPO、GST、XOD 和 SOD 等有关细胞氧化还原反应和自由基清除、巯基转移及核酸嘌呤代谢的生化酶类。通过比较瘦素和环氧化酶抑制剂吡啶美辛对脓毒症保护后

肺组织不同酶的改变,我们可以获得瘦素参与肺功能调节的不同机制。

对研究结果分析后有如下印象:(1)脓毒症后 6 h 肺组织瘦素水平有下降,但在 12 h 即完全恢复,可以看成为一过性下降;(2)瘦素(0.1 mg/kg)腹腔内注射能缓解这种瘦素的一过性下降,而吡啶美辛则无此效应;(3)瘦素保护作用主要表现为恢复和维持肺组织内 MPO、GST 和 XOD 的正常水平;(4)吡啶美辛在脓毒症中的作用似乎同瘦素水平的改变无关。瘦素在抗炎和促进修复的作用以往有一些报道,如瘦素注射($10\sim 50 \mu\text{g ip, tid}$)持续 1、3、5、10、21d,可以显著减少胰腺炎的发生和病损程度^[5]。另外,瘦素是一种自分泌/旁分泌的调节因子,在创伤愈合过程中通过促进角质细胞、血管壁细胞、纤维母细胞等的分化成熟,促进内外切割伤的愈合^[6]。在脓毒症中出现肺组织瘦素水平在 6 h 显著下降是第一次报道,不仅如此,腹腔给药在很大程度上可以恢复肺瘦素水平而改善其它相关酶如 MPO、GST 和 XOD 的紊乱,我们可以理解为瘦素在肺部遭受内毒素攻击后,作为机体防御因子大量消耗。补充后肺作为一种瘦素的作用靶器官,能迅速恢复瘦素水平,伴随其它几种与自由基代谢、巯基转移和嘌呤代谢相关的酶活性恢复于正常假手术对照水平。从肺病理切片染色结果可以看出肺组织在瘦素保护组有明显的水肿减轻和炎性浸润下降。至于吡啶美辛,它是一种环氧化酶抑制剂,已知通过减少前列腺类炎症递质合成而具备抗炎作用,在本实验中对瘦素水平影响不明显。

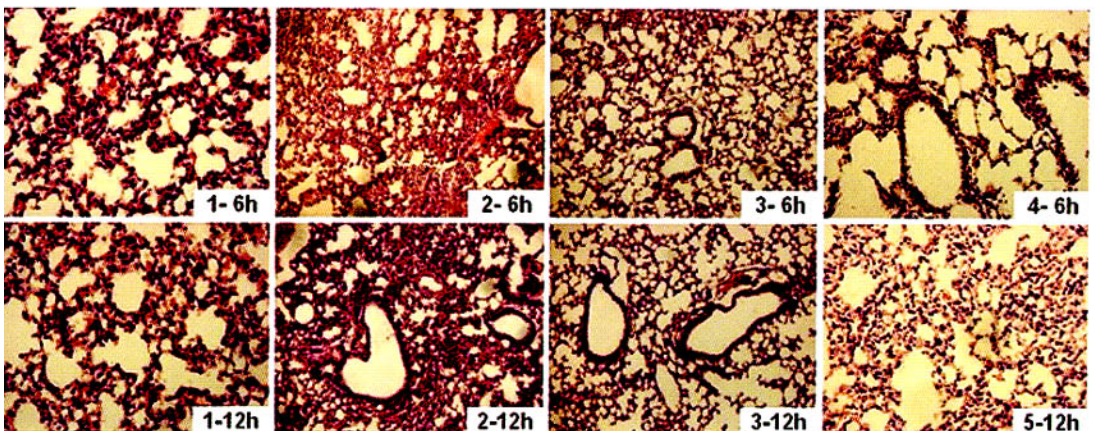


图 2 脓毒症后各组肺组织病理改变(HE, $\times 200$)

1:假手术组;2:脓毒症组;3:瘦素保护组;4:吡啶美辛保护组;6h:脓毒症后 6h;12h:脓毒症后 12h

脓毒症后肺组织内瘦素水平下降的结果同我们前面发现的内毒素诱导内皮细胞瘦素释放减少相同。也同林季等^[7]发表的肠缺血/再灌注损伤早期血循环中瘦素水平下降一致。因此,我们推论创伤感染过程中早期应答可能造成瘦素的暂时下降。而这种下降可能不宜于创伤早期机体内环境平衡。从我们的初步结果分析,体内适量补充瘦素可以至少维持肺内瘦素水平,对肺功能维持有一定帮助。这种作用可能同瘦素发挥间接作用,减少肺氧自由基有关系。

总之,创伤感染后瘦素可作为一种重要的应答因子参与肺功能活动,通过调节上述与氧自由基形成和清除有关的酶活性,发挥脓毒症后瘦素的保护作用。深入的机制研究将有助于理解瘦素的保护作用实现途径,为开发一种新型的生物药物提供证据。

参考文献

- 1 Lin J, Yan GT, Hao XH, et al. Effect of intestinal ischemia-reperfusion injury on protein levels of leptin and orexin-A in peripheral blood and central secretory tissues. *World J Gastroenterol*, 2005, 11:1000-1004.
- 2 Cakir B, Cevik H, Contuk G, et al. Leptin ameliorates burn-induced multiple organ damage and modulates post-burn immune response in rats. *Regul Pept*, 2005, 125: 135-144.
- 3 Lin J, Yan GT, Wang LH, et al. Leptin fluctuates in intestinal ischemia-reperfusion injury as inflammatory cytokine. *Peptides*, 2004, 25:2187-2193.
- 4 Hobson KG, Havel PJ, McMurtry AL, et al. Circulating leptin and cortisol after burn injury; loss of diurnal pattern. *J Burn Care Rehabil*, 2004, 25:491-499.
- 5 Ceranowicz P, Warzecha Z, Dembinski A, et al. Protective and therapeutic effect of leptin in acute pancreatitis evoked by ischemia/reperfusion. *Folia Med Cracov*, 2003, 44:93-108.
- 6 Murad A, Nath AK, Cha ST, et al. Leptin is an autocrine/paracrine regulator of wound healing. *FASEB J*, 2003, 17:1895-1897.
- 7 林季, 颜光涛, 王录焕, 等. 肠缺血-再灌注损伤对瘦素蛋白质及 mRNA 水平的影响. *中国危重病急救医学*, 2004, 16: 651-655.
- 8 晏建军, 严以群, 周非国, 等. 糖尿病合并肝脓肿的外科诊治. *肝胆外科杂志*, 2002, 2: 96-98.
- 9 Cheng DL, Liu YC, Yen MY, et al. Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess; their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. *Arch Intern Med*, 1991, 151: 1557-1559.
- 10 Yang CC, Chen CY, Lin XZ, et al. Pyogenic liver abscess in Taiwan; emphasis on gas-forming liver abscess in diabetics. *Am J Gastroenterol*, 1993, 88: 1911-1915.
- 11 皮执民, 主编. 消化外科学. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 727-733.
- 12 Saad F, Ach K, Dallel-Youssef N, et al. Hepatic abscess in diabetics; 2 case reports. *Presse Med*, 2004, 33: 98-100.
- 13 侍立志. 细菌性肝脓肿的诊断与治疗. *中国实用外科杂志*, 2000, 20: 413-414.
- 14 Tazawa J, Sakai Y, Maekawa S, et al. Solitary and multiple pyogenic liver abscesses; characteristics of the patients and efficacy of percutaneous drainage. *Am J Gastroenterol*, 1997, 92: 271-274.
- 15 王孝, 屠金夫, 朱冠保. 细菌性肝脓肿 189 例诊治分析. *肝胆胰外科杂志*, 2002, 14: 197-199.
- 16 Okano H, Shiraki K, Inoue H, et al. Clinicopathological analysis of liver abscess in Japan. *Int J Mol Med*, 2002, 10: 627-630.

(上接第 200 页)