

褪黑素对衰老小鼠肺炎时心肌的保护作用

薛桥 卢才义 李泱 马路 徐斌 施伟伟

【摘要】 目的 了解褪黑素(MT)对衰老小鼠肺炎时心肌的保护作用。方法 将雄性 NIH 小鼠 100 只随机分为两组: 一组以 D-半乳糖制作人工老化模型(D-gal 组), 另一组以生理盐水作对照(NS 组)。每组分别分为 4 个亚组(12 只)进行实验: 生理盐水对照组(NSN, D-galN)、肺部感染组(NSP, D-galP)、褪黑素 + 肺部感染组(NSM, D-galM)、溶媒 + 肺部感染组(NSV, D-galV)。制模后 72 h 观察心肌线粒体形态改变, 检测血浆中 TNF- α 、心肌组织中丙二醛(MDA)、TNF- α 、ATP 含量、总超氧化物歧化酶(T-SOD)和铜、锌超氧化物歧化酶(Cu, Zn-SOD)活性。结果 肺部感染后小鼠心肌组织中 MDA、TNF- α 含量增加(NSN vs NSP, D-galN vs D-galP; $P < 0.05$) T-SOD 和 Cu, Zn-SOD 活性、ATP 含量降低($P < 0.05$), 心肌组织线粒体损伤较多。MT 干预可部分抑制上述改变、减少线粒体变性(NSM vs NSP, D-galM vs D-galP; $P < 0.05$)。结论 MT 通过改善心脏抗氧化功能、降低心肌脂质过氧化、降低血浆和心肌炎性因子含量等作用保护肺炎对人工老化小鼠心脏功能的损害。

【关键词】 肺炎; 心肌; 脂质过氧化; 半乳糖

The heart protection of melatonin in aging mouse with pneumonia

XUE Qiao, LU Caiyi, LI Yang, et al

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

【Abstract】 Objective To study the influence of melatonin (MT) on the heart of the artificially accelerated aging mouse with pneumonia. Methods One hundred male NIH mice were randomly divided into 2 groups and were pretreated with D-galactose(D-gal) or normal saline(NS) respectively. Then, each group was divided into 4 subgroups: the normal group (injected with normal saline directly through trachea) (N), pneumonia group (*Pseudomonas aeruginosa* saline suspension was injected directly through trachea to induce pneumonia) (P), MT + pneumonia group and vehicle + pneumonia group (MT or vehicle was given once a day by intraperitoneal injection throughout the induced pneumonia experiment). Results The value of plasma TNF- α (NSN vs NSP, D-galN vs D-galP, $P < 0.05$), and the contents of TNF- α and MDA($P < 0.05$) in cardiac tissue were increased, whereas the content of ATP, the activities of T-SOD and Cu, Zn-SOD($P < 0.05$) were reduced in mice of pneumonia or vehicle + pneumonia groups. The damage of myocardial mitochondria was prevalent in pneumonia groups. The changes of above parameters and myocardial mitochondria in MT + pneumonia group were partially reduced($P < 0.05$). Conclusion MT may partially reduce the myocardial lipid peroxidation and myocardial mitochondria impairment, and recover the ability of energy metabolism after occurrence of pneumonia in aging mouce.

【Key words】 pneumonia; myocardium; lipid peroxidation; D-galactose

已有研究表明 D-gal 处理鼠心肌组织脂质过氧化和抗氧化能力的变化, 改变了心肌组织在肺部感染时对损伤因素的敏感性^[1]。应用自由基清除剂是否可以影响 D-gal 鼠心脏功能改变的特性还不清楚。本组实验用自由基的强清除剂^[2]—褪黑素(melatonin, MT)干预, 观察 MT 对肺部感染后心肌中一些物质(如

MDA 含量、SOD 活性、TNF- α 含量)以及心肌细胞线粒体形态的影响, 以探讨在老化动物肺部感染时应用自由基清除剂对肺外器官的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组 成年雄性 NIH 小鼠 100 只(体重 25 ~ 30 g, 购于解放军总医院实验动物中心)随机分为两组。一组经背部皮下注射 D-gal(D-半乳糖, 每日 150 mg/kg 体重, 6 周)制作人工老化动物模型(D-gal 组), 另一组注射等量生理盐水作对照(NS 组)。造模后动物表现反应迟钝、血浆或组织中脂质过氧化产物增加, 表示模型制作成功。上述两组分

收稿日期: 2004-04-19

基金项目: 本课题受国家重点基础研究发展规划基金资助(编号 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: 薛桥, 男, 1966 年 4 月生, 山西省晋城市人, 医学博士, 主治医师。Tel: 010-66936762

别分为4个亚组进行实验:生理盐水对照组(经气管注入生理盐水, NSN、D-galN组)、肺部感染组(经气管注入绿脓杆菌悬液, NSP、D-galP组)、褪黑素(melatonin, MT) + 肺部感染组(制作肺部感染模型前开始, 经腹腔注入褪黑素溶液, 1次/d; NSM、D-galM组)、溶媒 + 肺部感染组(制作肺部感染模型前开始, 经腹腔注入无褪黑素溶媒, 1次/d; NSV、D-galV组)。所有动物观察3d后处死留取标本。

1.2 制作小鼠肺炎模型 经腹腔注射乌拉坦(1g/kg体重)麻醉小鼠, 用7#钝头针在直视下经气管内注入新鲜配制的绿脓杆菌(ATCC27853)生理盐水悬液(1.5×10^8 菌落/ml, 0.005 ml/10g体重)。

1.3 留取标本及检测 在预定时间留取肺组织光镜、心肌电镜标本; 剩余心肌组织制备组织匀浆检测丙二醛(MDA, 硫代巴比妥酸法)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 放射免疫法)、ATP含量(生物发光法)、总超氧化物歧化酶(T-SOD, 黄嘌呤氧化酶法)、铜锌-超氧化物歧化酶(Cu, Zn-SOD, 黄嘌呤氧化酶法); 留取血浆检测 TNF- α 含量(方法同前)。每一心肌电镜标本随机选取3个视野拍摄电镜照片(5000倍), 计算每一照片中变性线粒体(MIT)数, 求平均值(取整数)进行统计分析。

1.4 数据处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对所有数据进行方差齐性检验, 方差不齐者用非参数方法进行统计处理; 方差齐者用“方差分析和两两比较”对多组计量资料进行统计处理; 计数资料和率的比较用卡方检验进行统计处理。用相关系数及其显著性检验评价两个指标间的相关性。统计分析软件为 SPSS10.0 For Windows。P < 0.05 时为有显著性差异。

2 结果

在本组实验中, 部分小鼠死于气管内注入细菌

悬液操作, 另有部分死于肺部感染, 完成实验全过程的动物数列表1中。肺部感染后小鼠的病死率增加无显著性意义(P = 0.176)。MT干预小鼠病死率无明显影响(P > 0.05)。D-gal组和NS组小鼠病死率无显著性差异(P > 0.05)。

肺部感染后小鼠心肌组织中MDA、TNF- α 含量增加, T-SOD、Cu, Zn-SOD、ATP含量降低。组间比较结果还显示MT干预对肺部感染后心肌中T-SOD、Cu, Zn-SOD活性有显著影响(方差分析, P < 0.05); D-gal组与NS组小鼠相比, MDA增加更明显, T-SOD、Cu, Zn-SOD的活性及ATP含量降低更显著(方差分析, P < 0.05); 在D-gal组与NS组之间组织TNF- α 含量也无显著性差异(P > 0.05)。肺部感染小鼠血浆TNF- α 含量增高; MT干预可降低小鼠肺部感染后血浆和心肌组织中TNF- α 含量(P < 0.05)。相关分析的结果表明, 心肌组织ATP含量与T-SOD活性呈正相关($r = 0.61, P < 0.05$)、与MDA含量呈负相关($r = -0.50, P < 0.05$)。

肺组织光镜病理检查提示, NSN、D-galN小鼠肺组织结构清晰, 无炎性细胞浸润; 肺炎组小鼠均有肺炎形成(NSN组、NSM组、D-galN组、D-galM组), 表现为炎性细胞浸润、肺泡内有大量渗出物、部分标本有出血等(图1, 2)。

心肌组织电镜检查结果: NSN、D-galN小鼠心肌线粒体排列有序, 无变性; NSP、NSV、D-galP、D-galV小鼠心肌线粒体均有增多和变性; NSM、D-galM小鼠心肌线粒体变性数量相对较少, 其中D-galM小鼠心肌线粒体变性减少更明显(D-galM组较D-galP组减少41.5%; NSM组较NSP组减少34.2%;)。见图3~5。

表1 组织及血浆中部分物质的含量改变($\bar{x} \pm s$)

组别	动物只数	MDA* (nmol/mg pro)	T-SOD* (NU/mg pro)	Gu-SOD* (NU/mg pro)	TNF- α (ng/mg pro)	ATP ($\times 10^6$)* (mmol/mg pro)	MIT* (Number)	sTNF- α * (ng/mg pro)
NSN	12	4.02 \pm 1.05	152.16 \pm 27.4	30.50 \pm 6.96	0.30 \pm 0.12	14.97 \pm 3.61	0	1.41 \pm 0.34
NSP	9	5.62 \pm 1.13*	110.3 \pm 27.4*	22.89 \pm 4.17*	0.63 \pm 0.11*	8.65 \pm 2.89*	35 \pm 8*	2.36 \pm 0.28*
NSM	9	4.63 \pm 1.54	145.37 \pm 46.9	27.95 \pm 6.39	0.42 \pm 0.14	9.59 \pm 1.83*	23 \pm 10*	1.66 \pm 0.45
NSV	8	5.37 \pm 1.73*	100.2 \pm 14.5*	18.95 \pm 2.42*	0.56 \pm 0.16*	10.07 \pm 2.65*	33 \pm 7*	2.29 \pm 0.47*
D-galN	12	5.21 \pm 1.69	109.4 \pm 25.0	23.49 \pm 3.66	0.34 \pm 0.11	12.74 \pm 3.97	0	1.59 \pm 0.38
D-galP	8	6.78 \pm 1.34*	90.6 \pm 14.9*	20.59 \pm 3.35*	0.58 \pm 0.11*	5.76 \pm 2.12*	53 \pm 10*	2.25 \pm 0.42*
D-galM	9	5.34 \pm 1.85	110.6 \pm 16.3	22.61 \pm 3.40	0.39 \pm 0.10	9.79 \pm 2.95*	31 \pm 12*	1.69 \pm 0.40
D-galV	8	5.93 \pm 1.69*	100.1 \pm 17.9*	21.20 \pm 3.55*	0.58 \pm 0.10*	5.10 \pm 1.63*	57 \pm 9*	1.99 \pm 0.38*

注: * 感染与非感染组间比较有显著性差异, P < 0.05; * NS 与 D-gal 组比较有显著性差异, P < 0.05

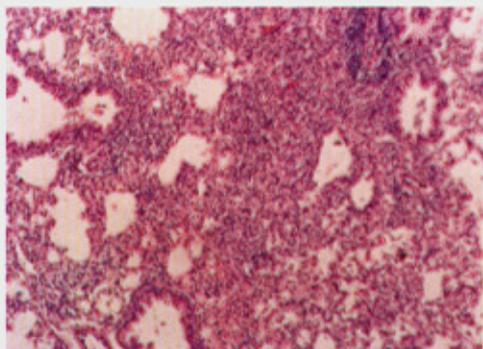


图1 D-galP小鼠肺组织(HE染色, ×50)
肺泡壁有炎性细胞浸润,肺泡腔有渗出实变

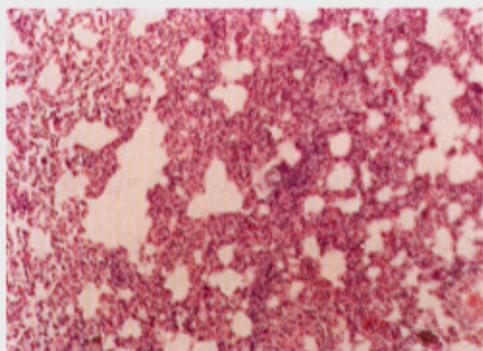


图2 D-galM小鼠肺组织(HE染色, ×50)
肺泡壁有炎性细胞浸润,部分肺泡腔有渗出实变

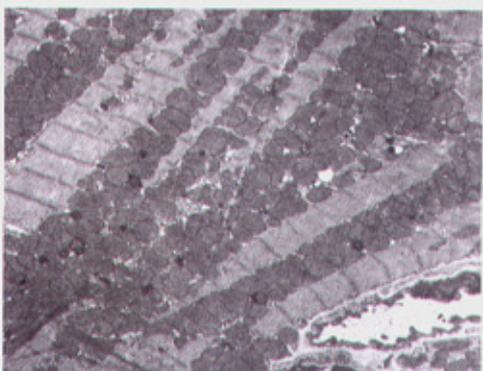


图3 D-galP小鼠心肌电镜图(×5000)
线粒体变性,伴数量增多,排列紊乱

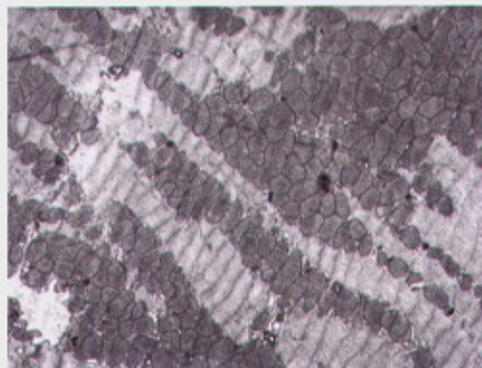


图4 D-galM小鼠心肌电镜图(×5000)
线粒体数增多,排列紊乱,变性较少

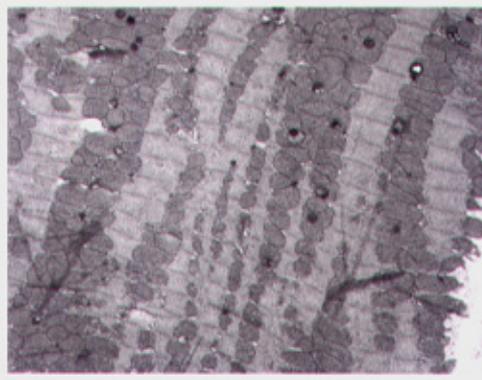


图5 D-galV小鼠心肌电镜图(×5000)
线粒体增多,排列紊乱,变性较多

3 讨论

在本组实验中我们观察到:MT处理鼠在肺部感染时心肌组织的膜脂质过氧化水平相对降低,抗氧化能力相对提高。主要表现为心肌组织的MDA含量降低、SOD活性相对增高,并伴有血浆及心肌组织中TNF- α 含量的相对降低和心肌线粒体损伤减轻,提示肺部感染可引起心肌组织损伤,而以MT干预可明显减轻上述损伤。

D-gal在动物体内有促进自由基损伤作用^[3]。生物膜的脂质过氧化是自由基对动物肌体损伤的标志之一,MDA是其最终产物^[4]。D-gal小鼠心肌中MDA的积聚、组织中抗氧化酶如SOD活性的降低都是自由基损伤的结果,这与以往资料相符。

脂质过氧化和抗氧化系统损伤加剧了肺炎发生

时自由基对心肌的损伤作用。肺炎时参与心肌损伤的自由基可能有两个来源:其一来源于肺炎的局部,通过血液循环到达心肌^[5];其二来源于肺炎后心肌组织局部。肺组织释放入血的细胞趋化因子、细胞粘附因子、内毒素以及血管内皮细胞在炎性反应过程中产生的细胞间粘附分子可以引起血液中白细胞在心肌组织中的“扣押”^[6]。Durot等^[7]观察到心肌细胞的氧化损伤依赖自由基的攻击,损伤形式可以表现为膜结构的脂质过氧化、对膜蛋白的氧化修饰、诱发细胞凋亡等,这可造成多种离子通道特性的改变、膜受体的改变等。同时自由基还可造成心肌细胞线粒体钙超载、膜通透性增加、线粒体DNA损伤,使线粒体出现变性和坏死。

心肌组织抗氧化能力的降低促进了多种炎症因子和介质的损伤作用。已有研究表明,在血浆中内毒素、TNF- α 、IL-1等刺激下,多种细胞可表现出NF- κ B被激活进而促进TNF- α 等炎症介质的转录和表达,心肌细胞有类似的反应。TNF- α 等可诱发心肌细胞线粒体的结构和功能改变,促使线粒体释放活性氧、内源性氧化剂生成增多^[8],在整体上则可诱发心脏功能不全等。当D-gal鼠心肌的抗氧化能力降低时,TNF- α 等对心肌组织的损伤即会加重。实验中心肌组织TNF- α 含量增加,参与了肺炎小鼠心肌功能障碍的形成。其他多种细胞因子如IL-1有类似作用。

MT抗自由基损伤作用机制有两种方式:一方面,MT可直接清除多种自由基,包括最具危害的羟自由基(OH \cdot);另一方面,MT可通过增强机体内自由基清除系统的能力发挥抗自由基作用。同时,MT还可作为抗炎剂发挥局部或全身性的抗炎作用。由于其分子量小、脂溶性高,可自由进入细胞核,从而能够为机体提供多系统、多层次的保护作用^[9]。实验中MT干预对心肌中SOD活性的保护作用,符合以往实验中观察到的MT对自由基清除作用。MT干预引起的心肌中TNF- α 含量的相对降低,可能反映了MT对肺部炎症的清除作用使心肌的损害相对减轻;或通过抑制心肌细胞中NF- κ B的活性参与调控TNF- α 在心肌中的合成^[10]。

在以往实验中观察到,心肌功能改变受多重因素影响。如肺部感染造成的动脉血气分析指标的改变、炎症因子的作用、自由基和心肌组织的抗氧化反应对心肌功能改变的影响等,都可能参与了对肺部感染后心肌功能改变。MT干预对病原菌无直接影响,对肺部感染造成的局部炎性损伤只能起到减弱

和钝化作用,不能从根本上逆转肺部感染以及由肺部感染对全身各系统、器官的影响,但其清除自由基、保护组织抗氧化能力、调理炎性反应等作用仍对心肌组织产生了一定保护作用。由此我们认为,作为一种辅助性的干预肺炎过程中肺外器官损伤的手段,MT的保护作用还应引起重视。尤其在实验中观察到MT对人工老化小鼠线粒体损伤保护作用相对明显,提示在抗氧化能力显著降低的老化动物中,MT对抗自由基损伤的能力更强。

综上所述,肺炎时心肌细胞发生了一系列改变,自由基、炎症因子和介质在此过程中发挥了重要作用。D-gal预处理可引起小鼠心肌组织的脂质过氧化和抗氧化能力减低,这些改变对肺感染时自由基、炎症因子和介质引起的心肌损伤有“易化”作用。褪黑素对老化小鼠肺炎时心肌组织有一定保护作用。

参考文献

- 1 薛桥,马路,朱庆磊,等. 抗氧化能力降低增加小鼠心肌在肺炎时的易损性. 解放军医学杂志,2003,11: 79-81.
- 2 Reiter RJ, Tan DX. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc Res*,2003,58: 10-19.
- 3 朱庆磊,杨洁,薛桥,等. D-半乳糖催老大鼠重要脏器氧化水平和抗氧化能力的变化. 中华老年多器官疾病杂志,2002,1: 122.
- 4 Takahashi M, Suzuki K, Taniguchi N, et al. Aldehyde reductase gene expression by lipid peroxidation end products, MDA and HNE. *Free Radic Res*,2000,33: 739-746.
- 5 Fox DR, Alberts MK, Kajikawa O, et al. Pulmonary and systemic inflammatory responses in rabbits with gram-negative pneumonia. *Am J Resp Crit Care Med*,1997,155: 2030-2040.
- 6 Goldman G, Welbourn R, Kobzik L, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates acid aspiration-induced systemic organ injury. *Ann Surg*,1990,212: 513-519.
- 7 Durot I, Maupoil V, Ponsard B, et al. Oxidative injury of isolated cardiomyocytes: dependence on free radical species. *Free Radic Biol Med*,2000,29: 846-857.
- 8 Venditti P, Masullo P, Di MS. Effects of myocardial ischemia and reperfusion on mitochondrial function and susceptibility to oxidative stress. *Cell Mol Life Sci*,2001,58: 1528-1537.
- 9 Guerrero JM, Reiter RJ. Melatonin-immune system relationships. *Curr Top Med Chem*,2002,2: 167-179.
- 10 Reiter RJ, Calvo JR, Karbownik M, et al. Melatonin and its relation to the immune system and inflammation. *Ann NY Acad Sci*,2000,917: 376-386.