

外源性 Leptin 减轻大鼠肺缺血再灌注损伤及其保护作用机制

龚文辉^{1,2}, 张成鑫³, 华天凤², 汪裕琪², 黄大可⁴, 赵强¹

摘要 目的 研究大鼠肺缺血再灌注损伤后血清炎症因子及肺组织相关酶活性的变化,并探讨外源性瘦素(Leptin)在肺缺血损伤中的作用及可能机制。方法 建立大鼠肺缺血再灌注损伤模型,并用外源性 Leptin 干预治疗,对各组术后肺组织匀浆中丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)的活性、血清 C 反应蛋白(CRP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和核因子- κ B(NF- κ B)浓度进行分析和比较,并观察各组肺组织病理学改变。结果 缺血再灌注组血清炎症指标 CRP、TNF- α 、NF- κ B 浓度较假手术组明显升高,用外源性 Leptin 预处理后的炎症指标浓度较缺血再灌注组有显著下降($P < 0.05$)。肺组织匀浆 MPO、MDA 水平测定结果同样显示 Leptin 预处理组的肺组织匀浆酶学指标较缺血再灌注组有显著下降($P < 0.05$)。组织学病理显示缺血再灌注组肺损伤严重;Leptin 预处理组肺泡结构较完整,炎症改变相对较轻,水肿及出血较再灌注组明显减少。结论 运用外源性 Leptin 后肺缺血再灌注损伤明显减轻;外源性 Leptin 对肺缺血再灌注损伤有保护作用,可能与减轻脂质过氧化反应及炎性细胞浸润有关。

关键词 瘦素;肺损伤;肺保护;缺血再灌注

中图分类号 R 655.3; R 332.2; R 452

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)05-0603-04

肺缺血再灌注损伤可见于体外循环、肺移植、休克以及心肺复苏等多种临床情况,具有高发生率和高死亡率,严重影响患者远期生存率。近来研究^[1]显示,瘦素(Leptin)参与了多种急慢性肺损伤的发展过程,对呼吸系统具有重要的免疫调节作用。该实验通过建立大鼠肺缺血再灌注损伤模型,探讨外源性 Leptin 对肺缺血再灌注损伤的影响及其作用

机制。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 将 30 只健康成年清洁级大鼠随机均分成假手术组、缺血再灌注组及 Leptin 预处理组。实验动物均购自安徽医科大学实验动物中心,动物实验报安徽医科大学动物伦理委员会审批同意。

1.2 主要试剂及仪器 戊巴比妥钠购自美国 Sigma 公司;10% 多聚甲醛缓冲液、2.5% 戊二醛溶液购自上海谱振生物科技有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)、髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B) ELISA 试剂盒购自上海信裕生物科技有限公司;大鼠 Leptin 购自美国 PeproTech 中国公司。HX-300S 小动物呼吸机购自成都泰盟科技有限公司。

1.3 实验过程 参照相关文献^[2]及之前建立模型的经验^[3],建立大鼠肺再灌注损伤模型。术前 12 h 禁食不禁水,1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉后,尾静脉注射肝素(100 U/kg);手术过程中适量追加戊巴比妥钠,每次 5 mg。仰卧位固定,气管切开插管,接动物呼吸机行机械通气(吸入室内空气,呼吸频率 60 次/min,潮气量单侧肺通气 8~10 ml/kg,双侧肺通气 15~20 ml/kg,吸呼比为 1:2)。沿胸骨左缘切断第 3、4、5 肋骨进胸。显露肺门,游离左肺动脉、左主支气管和左肺静脉。在肺充气状态下以无损伤微血管夹依次阻断左肺动脉、左主支气管和左肺静脉。阻断 1 h 后去血管夹,依次开放左肺动脉、左主支气管和左肺静脉,再灌注 2 h 后切除左肺。假手术组:无缺血过程,余同缺血再灌注组。Leptin 预处理组:参照有关文献^[4]使用剂量,取 Leptin 20 μ g/kg 溶解于 0.5 ml 盐水于大鼠制模式前 6 h 行腹腔注射,余同缺血再灌注组。

1.4 指标测量

1.4.1 血清 CRP、TNF- α 、NF- κ B 浓度 取血清样

2013-12-20 接收

基金项目:安徽省教育厅高校省级自然科学基金项目(编号:KJ2012Z161)

作者单位:¹上海交通大学医学院附属瑞金医院心脏外科,上海 200025

²安徽医科大学第二附属医院心胸外科,合肥 230601

³安徽医科大学第一附属医院心脏外科,合肥 230022

⁴安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

作者简介:龚文辉,男,博士研究生,主治医师;

赵强,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,

E-mail: zq11607@rjh.com.cn

品,ELISA 法检测 CRP、TNF-α、NF-κB 浓度。按照试剂盒说明书步骤进行测定,计算样品浓度。

1.4.2 肺组织 MPO、MDA、SOD 水平测定 取冻存于 -70 ℃ 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。离心后取 0.5 ml 肺组织匀浆液用于 MPO 的测定;取 0.5 ml 肺组织匀浆上清液用于 MDA、SOD 检测,按照试剂盒说明书(比色法)步骤测定 MPO、SOD 活性和 MDA 含量。

1.4.3 肺组织病理观察 在左肺上叶相同部位取小块肺组织 10% 甲醛固定,石蜡包埋切片,进行 HE 染色观察肺组织形态学变化。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用完全随机设计的单因素方差分析及 SNK-q 检验法进行两两比较。

2 结果

2.1 血清炎症因子及肺组织酶活性检测 缺血再灌注组血清炎症指标 CRP、TNF-α、NF-κB 浓度较假手术组明显升高,见表 1。Leptin 预处理组的炎症指标较缺血再灌注组有显著下降($P < 0.05$)。缺血再灌注组肺组织匀浆 MPO、MDA 较假手术组明显升高,缺血再灌注组 SOD 较假手术组有所上升,但差异无统计学意义;肺组织 MPO、MDA、SOD 水平测定结果显示 Leptin 预处理组的酶学指标较缺血再灌注组有显著下降($P < 0.05$)。

表 1 3 组大鼠血清 CRP、TNF-α、NF-κB 浓度及肺组织 MPO、MDA、SOD 水平比较($n = 10 \bar{x} \pm s$)

项目	假手术组	缺血再灌注组	Leptin 预处理组	F 值
CRP(μg/ml)	103.8 ± 18.9	260.3 ± 53.6 [*]	162.7 ± 66.4 [#]	47.947
TNF-α(ng/ml)	1.67 ± 0.12	16.29 ± 0.19 [*]	9.63 ± 1.35 [#]	100.651
NF-κB(ng/ml)	0.236 ± 0.10	6.780 ± 0.24 [*]	4.360 ± 1.38 [#]	95.701
MPO(U/ml)	0.166 ± 0.08	0.736 ± 0.31 [*]	0.436 ± 0.25 [#]	65.376
MDA(nmol/ml)	2.36 ± 0.67	4.51 ± 0.80 [*]	2.78 ± 0.51 [#]	63.969
SOD(U/ml)	109 ± 19	118 ± 31	68 ± 28 [#]	32.779

与假手术组比较:^{*} $P < 0.05$;与缺血再灌注组比较:[#] $P < 0.05$

2.2 组织学改变比较 光镜检查显示假手术组肺泡结构完整,肺泡腔清晰,少量细胞浸润及水肿出血;缺血再灌注组肺泡壁弥漫性渗出水肿,毛细血管扩张充血,肺泡壁和肺间质内可见大量白细胞浸润以及肺泡结构的破坏;Leptin 预处理组肺泡结构较完整,肺泡腔清晰,炎症改变相对较轻,水肿、出血及白细胞浸润较假手术组重但较缺血再灌注组轻。

见图 1。

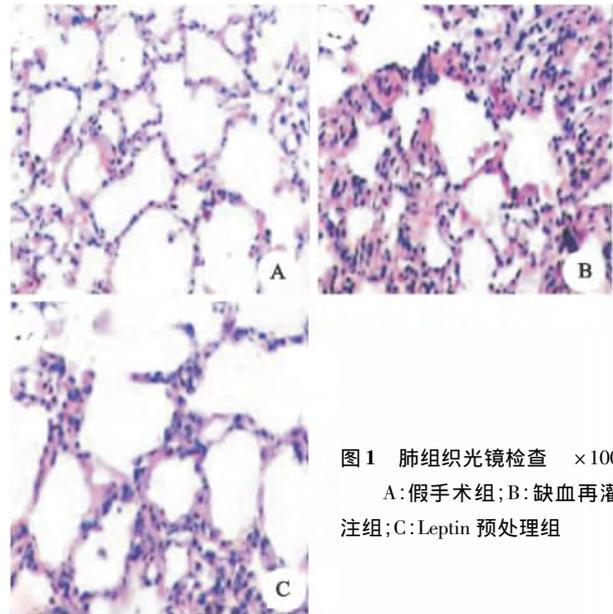


图 1 肺组织光镜检查 ×100
A:假手术组;B:缺血再灌注组;C:Leptin 预处理组

3 讨论

肺缺血再灌注损伤可见于心脏体外循环手术、肺移植、休克以及心肺复苏等临床情况,并可造成急性呼吸窘迫综合征,严重影响患者长期生存率。其发生机制目前尚未完全明确,可能与全身炎症反应的激活、细菌感染、免疫反应、免疫介质等有关^[5]:氧自由基的释放及脂质过氧化反应;细胞内的钙稳态失调;炎性细胞大量浸润及炎性介质的释放引起过度的炎症反应;细胞凋亡等^[6]。

MDA 是脂质过氧化物中的一种,MDA 含量不仅反映机体内脂质氧化的程度,也可以作为判断氧自由基产生和组织氧化应激损伤严重程度的重要标志。MPO 是中性粒细胞特异性酶,组织内 MPO 活性高低可作为中性粒细胞浸润和激活程度的定量指标^[7]。此外,肺缺血再灌注还可激活 NF-κB,其表达水平与缺血再灌注损伤程度呈正相关。同样,本实验中显示缺血再灌注损伤组的术后 MPO、MDA、NF-κB 浓度水平明显增高,可见其可以作为肺损伤炎症反应及肺损伤程度的指标。而实验中缺血再灌注组 SOD 较假手术组有所上升,但差异无统计学意义,可能与实验误差有关。

近年来研究^[1]表明 Leptin 参与了急慢性肺损伤的发展过程,并显示肺损伤后,血浆中 Leptin 的浓度明显增加。Leptin 是一种主要由脂肪细胞分泌的具有广泛生物学活性的蛋白质,首先是作为一种参

与能量代谢、促进脂肪消耗、降低体重的蛋白质而被人们所认识。后发现 Leptin 在炎症反应、造血过程、血管生成以及生殖中发挥重要作用^[8], 并发现 Leptin 参与机体应激状态下内环境的恢复, 对机体有一定保护作用^[9]。急性感染、炎性刺激时血浆 CRP、TNF- α 增高, 刺激脂肪组织释放储存的 Leptin, 使血浆 Leptin 水平增加^[10]。Leptin 同时也是一种应激激素, 在应激时对机体有保护作用, 促进免疫应答、增强血细胞分化成熟、对抗休克和感染导致的多脏器功能损害, 在炎症反应和免疫应答中起着重要的调节作用^[11]。

综上所述, 运用外源性 Leptin 后肺缺血再灌注损伤明显减轻, 其作用机制可能与减轻脂质过氧化反应及炎性细胞浸润有关。本实验为临床治疗肺缺血再灌注损伤提供一定的理论支持。本研究不足之处是仅设计了一个药物剂量组, 如果同时设置一阴性药对照组或生理盐水组可能使研究结果更合理。

参考文献

- [1] Tian Z, Sun R, Wei H, et al. Impaired natural killer (NK) cell activity in Leptin receptor deficient mice: Leptin as a central regulator in NK cell development and activation [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 298(3): 297-302.
- [2] Forgiarini L A Jr, Grun G, Kretzmann N A, et al. When is injury potentially reversible in a lung ischemia-reperfusion model? [J]. *J Surg Res*, 2013, 179(1): 168-74.
- [3] 时应路, 葛圣林, 张成鑫. 尼可地尔后处理对大鼠肺缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(7): 775-9.
- [4] Gultekin F A, Kerem M, Tatlicioglu E, et al. Leptin treatment ameliorates acute lung injury in rats with cerulein-induced acute pancreatitis [J]. *World J Gastroenterol* 2007, 13(21): 2932-8.
- [5] Takhtfooladi M A, Jahanshahi A, Sotoudeh A, et al. Effect of tramadol on lung injury induced by skeletal muscle ischemia-reperfusion: an experimental study [J]. *J Bras Pneumol*, 2013, 39(4): 434-9.
- [6] Krommidas G, Kostikas K, Papatheodorou G, et al. Plasma Leptin and adiponectin in COPD exacerbations: associations with inflammatory biomarkers [J]. *Respir Med* 2010, 104(1): 40-6.
- [7] Haegens A, Heeringa P, van Suylen R J, et al. Myeloperoxidase deficiency attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation and subsequent cytokine and chemokine production [J]. *J Immunol*, 2009, 182(12): 7990-6.
- [8] 武琦, 徐彤彤, 覃决, 等. 血清脂联素、瘦素与心力衰竭程度关系的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(2): 182-4.
- [9] Ceranowicz P, Warzecha Z, Dembinski A, et al. Protective and therapeutic effect of Leptin in acute pancreatitis evoked by ischemia/reperfusion [J]. *Folia Med Cracov*, 2003, 44(1-2): 93-108.
- [10] Wieland C W, Stegenga M E, Florquin S, et al. Leptin and host defense against Gram-positive and Gram-negative pneumonia in mice [J]. *Shock* 2006, 25(4): 414-9.
- [11] Popa C, Netea M G, Radstake T R, et al. Markers of inflammation are negatively correlated with serum Leptin in rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2005, 64(8): 1195-8.

Effects and mechanisms of exogenous Leptin alleviating rat lung ischemia-reperfusion injury

Gong Wenhui^{1,2}, Zhang Chengxin³, Hua Tianfeng², et al

(¹ Dept of Cardiac Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200025; ² Dept of Cardiothoracic Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601; ³ Dept of Cardiac Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective Rats serum inflammatory factors and enzyme activities of lung tissue were measured to investigate the protective role and mechanisms of exogenous Leptin alleviating rat lung ischemia-reperfusion injury.

Methods Rats lung ischemia-reperfusion injury models were established and one group was treated with exogenous Leptin. Plasma concentrations of C-reactive protein (CRP), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and nuclear factor- κ B (NF- κ B) were measured by ELISA. The activity of malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), superoxide dismutase (SOD) of lung homogenates were measured using colorimetric assay, and the morphological changes were observed under a microscope. **Results** In ischemia-reperfusion group, CRP, TNF- α , NF- κ B concentration were significantly higher than that of the sham group, and the concentration of exogenous Leptin group was significantly decreased compared with the value of ischemia-reperfusion group ($P < 0.05$). The lung tissue

DNMT3A 和 Hyp 在 ISO 诱导大鼠心肌纤维化中的表达及相关性研究

汪裕琪^{1,2}, 石开虎^{1,2}, 吴君旭^{1,2}, 徐盛松^{1,2}, 陶辉^{1,2}, 宣海洋^{1,2}, 曹炜^{1,2}, 沙纪名^{1,2}, 占红英^{1,2}

摘要 目的 探讨 DNA 甲基转移酶 3A (DNMT3A) 和羟脯氨酸 (Hyp) 在盐酸异丙肾上腺素 (ISO) 诱导的大鼠心肌纤维化中的表达及相关性研究。方法 将 40 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组和模型组。模型组给予 ISO [5 mg/kg · d] 正常对照组皮下注射给予等量生理盐水, 连续 7 d 后处死大鼠获取血液标本, 并取心肌组织。同时, 测定心重指数 (HW/BW)、左心室质量指数 (LVW/BW); 采用 ELISA 法检测血清中 I 型胶原和 III 型胶原的含量; HE 染色和 Masson 染色法观察心肌纤维化程度; Western blot 法测定 DNMT3A 和 α 平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 的表达; 紫外分光光度法测定心肌组织中 Hyp 的含量。结果 与正常对照组比较, 模型组 HW/BW、LVW/BW 明显增加; 模型组血清标本中 I 型胶原和 III 型胶原的含量较正常对照组明显增加; HE 染色和 Masson 染色显示模型组心肌组织出现明显的胶原纤维增生; Western blot 法检测显示模型组 DNMT3A 和 α -SMA 的表达明显高于正常对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 同时, 紫外分光光度法检测显示模型组心肌组织中 Hyp 含量明显增高 ($P < 0.05$); DNMT3A 和 Hyp 在大鼠心肌纤维化组织中的表达呈正相关 ($r = 0.675$, $P < 0.05$)。结论 DNMT3A 表达上调在心肌纤维化的形成过程中起重要促进作用, 可能与 Hyp 升高有一定的相关性。

关键词 心肌纤维化; DNMT3A; Hyp; 胶原

中图分类号 R 542.23

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)05-0606-04

2013-12-12 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (编号: 1308085MH117); 安徽省高等学样省级自然科学研究重点项目 (编号: KJ2011A175)

作者单位: ¹安徽医科大学第二附属医院心胸外科, 合肥 230601

²安徽医科大学心血管病研究中心, 合肥 230032

作者简介: 汪裕琪, 男, 硕士研究生;

石开虎, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: shikaihu@gmail.com

心肌纤维化是指细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 过度增生, 主要表现为在心肌组织的间质中胶原纤维过量积聚, 胶原含量显著升高或者各型的胶原比例失调等。心肌纤维化广泛存在于多种心血管疾病中, 与心律失常、心脏重构、心功能衰竭以及心源性猝死等密切相关。特别是对于临床上最常见的心律失常 - 心房颤动, 心肌纤维化的研究具有重要意义。心肌纤维化作为心房颤动维持的重要基质之一, 对于心房颤动的发展产生了重要影响^[1]。但是心肌纤维化产生的确切机制以及相关通路尚不十分清楚。该课题通过对心房纤维化和 DNA 甲基转移酶 3A (DNA methyltransferase 3A, DNMT3A) 进行相关性分析探讨心房纤维化发生的分子生物学机制, 为心房颤动的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只, (180 ± 20) g, 6~8 周龄, 购自安徽医科大学实验动物中心。

1.2 动物分组及模型建立 40 只大鼠随机均分成两组: 正常对照组、模型组。模型组大鼠按 5 mg/kg 体重背部皮下注射盐酸异丙肾上腺素 (isoprenaline, ISO) (购自上海禾丰制药有限公司), 1 次/d。正常对照组大鼠背部皮下注射与模型组等剂量的生理盐水。

1.3 标本采集及处理 两组大鼠常规饲养 7 d 后颈椎脱臼处死。腹主动脉采血 5 ml 抗凝备用, 沿心脏冠状面最大横径剪开大鼠心脏, 取心房组织置于 10% 甲醛溶液中固定, 经石蜡包埋后, 沿切面连续切

enzymatic indicators examination also showed that the MPO, MDA levels of exogenous Leptin pretreatment had significantly decreased ($P < 0.05$) compared with ischemia-reperfusion group ($P < 0.05$). Histological study showed relatively mild inflammation, edema and bleeding in exogenous Leptin treatment group with alveolar structure intact compared with ischemia-reperfusion injury group. **Conclusion** Lung ischemia-reperfusion injury was significantly alleviated after application of exogenous Leptin. The exogenous Leptin may play a protective role in lung ischemia-reperfusion injury through reducing lipid peroxidation and inflammatory cell infiltration.

Key words Leptin; lung injury; lung protection; ischemia-reperfusion