

胍丁胺对内毒素诱导的大鼠急性肺损伤的治疗效果

孙惠萍 徐惠娟 戴加乐[△]

(浙江省荣军医院药剂科, 嘉兴 314000)

摘要 目的: 研究胍丁胺对内毒素(LPS)诱导的急性肺损伤治疗效果及其机制。**方法:** 采用LPS诱导大鼠急性肺损伤模型并予以胍丁胺治疗, 分为对照组, 单纯模型组, 低、高剂量胍丁胺治疗组。绘制Kaplan-Meier生存曲线观察胍丁胺治疗后大鼠生存率差异, 并检测肺组织湿干比及组织炎症情况; 检测肺组织中抗氧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量; 收集肺泡灌洗液并提取肺组织总蛋白, 检测肺组织及肺泡灌洗液中炎症因子白细胞介素6(IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量。**结果:** 胍丁胺可提高LPS诱导的大鼠急性肺损伤模型的生存率、显著降低肺组织的湿重/干重比。H-E染色结果显示胍丁胺可改善肺组织炎症状况。与单纯模型组相比, 低、高剂量胍丁胺治疗组的肺组织MDA含量下降、SOD活性上调, 差异具有统计学意义。ELISA结果表明, 低、高剂量胍丁胺治疗组的肺组织及肺泡灌洗液中IL-6、TNF- α 分泌降低。**结论:** 胍丁胺可抑制肺部过度氧化应激及炎症反应, 发挥对急性肺损伤的保护作用。

关键词 胍丁胺; 急性肺损伤; 脂多糖; 大鼠

Therapeutic effects of agmatine on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats

Sun Huiping, Xu Huijuan, Dai Jiale[△]

(Department of Pharmacy, Rongjun Hospital of Zhejiang Province, Jiaxing, 314000, China)

Abstract Objective: To investigate the therapeutic effects of agmatine on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury in rats. **Methods:** The acute lung injury in rats was induced by LPS. The rats were divided into control group, simple model (LPS) group, low-dose agmatine group and high-dose agmatine group. Firstly, the Kaplan-Meier survival curve was drawn to observe the difference in survival rate among these groups. Besides, the wet-to-dry ratio and pathological changes of lung tissues was detected. Subsequently, the content of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in lung tissues was detected. Finally, alveolar lavage fluid and total protein of lung tissues were collected to measure inflammatory factor content (IL-6, TNF- α). **Results:** Agmatine could improve the survival rate of LPS-induced acute lung injury in rats and significantly reduce the wet-to-dry (W/D) ratio of lung tissues. H-E staining results showed that agmatine could extenuate the inflammation in lung tissues. Moreover, compared with the simple model group, there was a higher level of SOD and a lower level of MDA both in the low and high-dose agmatine treatment group. The results of ELISA showed that the secretion of IL-6 and TNF- α in lung tissues and alveolar lavage fluid of low- and high-dose agmatine treatment group was decreased compared with that of simple model group. **Conclusion:** Agmatine can play a protective role in acute lung injury in rats by inhibiting excessive oxidative stress and inflammatory response.

Key words agmatine; acute lung injury; lipopolysaccharide; rat

各种原因导致的肺部毛细血管通透性增加及肺泡上皮细胞受损可导致急性肺损伤(acute lung injury, ALI)发生, 若不及时处理可导致死亡^[1]。由于发生机制不明, 急性肺损伤死亡率一直居高不下。在急性肺损伤的发生过程中, 严重的氧化应激及炎症损伤是导致肺组织发生过度炎症重要因素之

一^[2]。因此, 开发可控制肺组织氧化应激及炎症损伤的药物是治疗急性肺损伤的研发方向。胍丁胺是一种具有抗炎及抗氧化作用的内源性生物酶类物质, 主要分布于脑、肺等器官中^[3]。新近研究表明, 胍丁胺可通过抑制大脑中胶质细胞的氧化应激反应而保护神经系统; 同时, 也可通过降低炎症细胞因子白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)等物质的表达, 对酵母多糖诱导的大鼠全身炎症反应发挥治疗作用^[4-5]。胍丁胺作为一种潜在的抗氧化应激及炎症反应的药物, 尚不清楚其是否也可应用于急性肺

第1作者 E-mail: sunhuiping011@163.com

[△]通信作者, E-mail: 940092578@qq.com

收稿日期: 2019-10-29; 修回日期: 2020-02-01

损伤的治疗过程中。因此,本研究构建大鼠脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的急性肺损伤模型并予以不同剂量胍丁胺治疗,评估其治疗效果并初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂

6周龄雄性SD大鼠,体质量(200±20)g,购自南京模式动物研究中心;LPS(L2800)、胍丁胺硫酸盐(A7127)购自美国Sigma;大鼠IL-6试剂盒(PI328)、大鼠肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒(PT516)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(S0101)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)检测试剂盒(S0131)购自碧云天上海有限公司。

1.2 急性肺损伤模型建立及实验动物分组

将60只大鼠随机分为4组,每组15只:对照组(Control组)、单纯模型组(LPS组)、低剂量胍丁胺治疗组(低剂量胍丁胺组)和高剂量胍丁胺治疗组(高剂量胍丁胺组)。LPS组、低剂量胍丁胺组和高剂量胍丁胺组大鼠采用腹腔注射100 μ L的LPS(3 mg/kg),建立急性肺损伤模型,对照组注射等量PBS;低剂量胍丁胺组和高剂量胍丁胺组于LPS注射前40 min,分别腹腔注射6 mg/kg 胍丁胺和12 mg/kg 胍丁胺。

注射后每组随机抽取10只大鼠饲养7 d,用于观察生存情况。在注射24 h后,采集每组剩余5只大鼠的肺组织标本进行相应的处理。

1.3 药物治疗大鼠生存率评估、肺部组织病理学观察及湿重、干重测定

1.3.1 湿重/干重比测定及肺部组织病理学观察 收集大鼠肺部右上叶组织用于湿重/干重比值:用PBS冲洗肺组织2次以去除表面残血,用滤纸吸干水分后称重,作为湿重(W);随后,将其置于70 $^{\circ}$ C烤箱中蒸发水分至恒定重量,记为干重(D),计算W/D比值并记录。收集肺部右中叶于4%多聚甲醛中进行固定,随后行H-E染色,评估肺组织炎症情况。

1.3.2 肺组织中SOD活性和MDA含量测定 称取100 mg大鼠右下肺组织,使用PBS冲洗后,加入预冷的1 mL RIPA裂解液。使用Auto HG-24 plus全自动匀浆机研磨成组织匀浆。4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min离心收集上清液用于SOD、MDA试剂盒检测,操作步骤依照说明书进行。

1.3.3 ELISA法检测肺组织及肺泡灌洗液中

TNF- α 、IL-6水平 在大鼠左肺支气管插入灌洗针并结扎固定,分3次将4.5 mL PBS注入气管中,停留2 min后,回抽3.5 mL作为肺泡灌洗液。4 $^{\circ}$ C, 3 000 r/min离心收集上清液,分装后用于检测细胞因子。称取100 mg大鼠右下肺组织100 mg,研磨为组织匀浆,操作同1.3.2。匀浆后4 $^{\circ}$ C, 10 000 r/min离心收集上清。使用商业试剂盒检测组织液及肺泡灌洗液中细胞因子IL-6、TNF- α 含量,依照说明书流程处理。

1.4 统计学处理

采用SPSS 20.0进行统计学分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示;绘制Kaplan-Meier生存曲线,并采用Log Rank分析各组生存率;组间比较采用one-way ANOVA进行分析,组间两两比较采用LSD法。

2 结果

2.1 大鼠生存率、肺部组织病理学观察及W/D

LPS组大鼠的生存率明显低于低剂量及高剂量胍丁胺组($P<0.05$),而低剂量和高剂量胍丁胺组之间的成活率差异无统计学意义(图1)。H-E染色显示,与对照组比较,LPS组有肺泡间隔增厚,并伴随大量炎症细胞浸润。经过低剂量及高剂量胍丁胺治疗后,炎症有所缓解(图2)。与对照组比较,LPS组肺组织W/D明显升高,差异具有统计学意义($P<0.01$);与LPS组比较,低剂量及高剂量胍丁胺组的W/D下降,差异具有统计学意义($P<0.05$,图3)。

2.2 肺组织中SOD活性和MDA含量

与对照组比较,LPS组的肺组织存在MDA含量上升、SOD活性下降的现象,差异具有统计学意义($P<0.05$,表1)。经不同剂量胍丁胺治疗后,可显著抑制MDA含量上升、SOD活性下降的现象,与LPS组比较,差异具有统计学意义($P<0.05$)。

表1 肺组织中SOD活性和MDA含量($\bar{x}\pm s$)
Tab 1 The activities of SOD and the contents of MDA in lung tissue($\bar{x}\pm s$)

Group	MDA (nmol/mgprot)	SOD (U/mgprot)
Control group	9.53±0.79	429.78±40.24
LPS group	20.14±1.02*	300.23±43.08*
Low-dose agmatine group	15.53±2.09* Δ	389.46±51.92* Δ
High-dose agmatine group	14.86±1.36* Δ	396.36±35.21* Δ

* $P<0.05$ vs control group; $\Delta P<0.05$ vs LPS group

2.3 肺组织及肺泡灌洗液中TNF- α 、IL-6水平测定

肺组织结果显示,与对照组比较,LPS组TNF- α 、IL-6水平明显升高;而与LPS组比较,

低、高剂量胍丁胺治疗组的TNF- α 、IL-6水平下降，且具有剂量依赖效应，以上差异均具有统计学意义 ($P<0.01$) (图4)。肺泡灌洗液结果显示，与对照组相比，LPS组的TNF- α 、IL-6水平明显升高；而与LPS组相比，低及高剂量胍丁胺治疗组的TNF- α 、IL-6水平下降，以上差异均具有统计学意义 ($P<0.01$) (图5)。

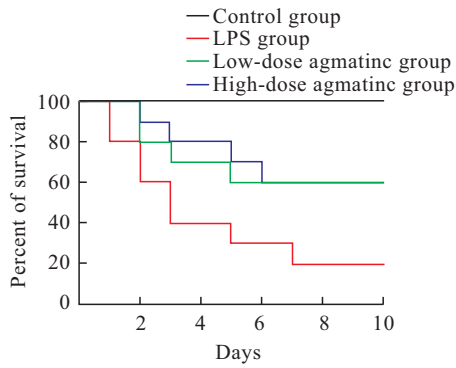


图1 各组生存率比较

Fig 1 Survival rate of each group

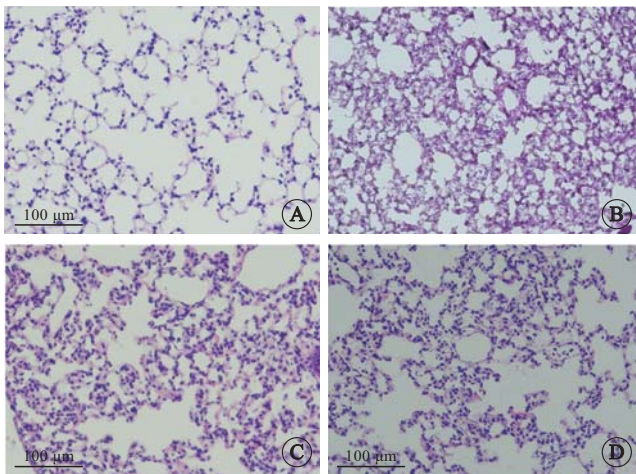


图2 各组肺组织H-E染色，标尺=100 μm

Fig 2 HE staining in lung tissues of each group, bar=100 μm

A : Control group ; B : LPS group ; C : Low-dose agmatinc group ; D : High-dose agmatinc group

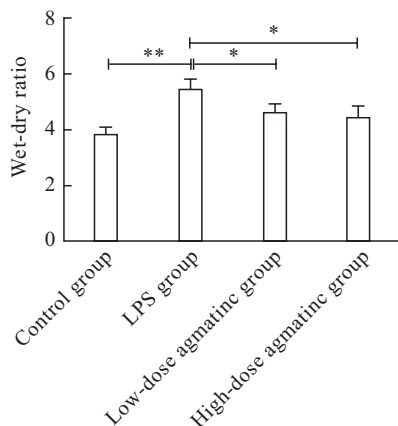


图3 各组肺组织湿干比

Fig 3 Wet-dry ratio of lung tissues in each group

* $P<0.05$; ** $P<0.01$

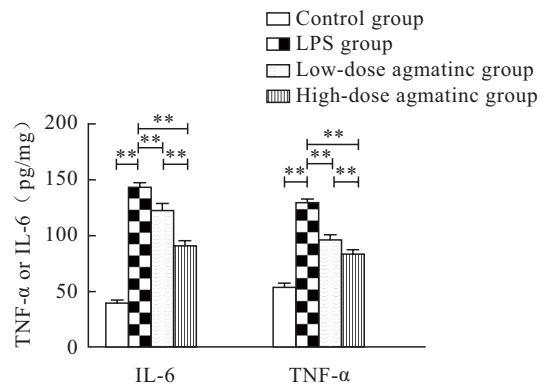


图4 肺组织炎症因子表达水平

Fig 4 Expression level of inflammatory factor in lung tissues

** $P<0.01$

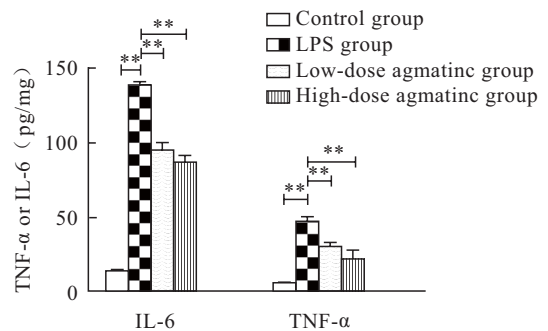


图5 肺泡灌洗液中炎症因子表达水平

Fig 5 Expression levels of inflammatory factors in alveolar lavage fluid

** $P<0.01$

3 讨论

过度的氧化应激与炎症反应可加重并导致急性肺损伤，故而采用相应治疗药物控制此类患者体内失衡的氧化应激和炎症反应是治疗的关键。常规的激素类药物虽可较好缓解患者病情，但存在较大的副作用，因此需开发其他潜在药物对其进行治疗。本研究探讨胍丁胺对LPS诱导急性肺损伤的治疗效果，并评估肺组织中的反应氧化应激及炎症反应水平，旨在为胍丁胺的应用奠定前期研究基础。

生理条件下，左旋精氨酸在体内相关酶的催化下脱羧基形成胍丁胺，广泛分布于脑部及肺部等重要组织器官中^[6]。胍丁胺不仅可通过与不同受体及离子通道结合来发挥抗焦虑作用，同时它也可通过抑制脑部的胶质细胞发生过度氧化应激反应发挥脑保护功能^[7]。进一步研究表明，在酵母多糖建立的全身炎症模型中，胍丁胺可通过抑制小鼠体内NO水平的升高，来发挥治疗作用^[5]。因此，胍丁胺是一种潜在的抗炎及抗氧化药物，有希望用于急性肺损伤的治疗过程中。本研究证实，在予以胍丁胺治疗后，LPS诱导的大鼠肺损伤模型的死亡率明显降低，具有治疗效果。肺组织H-E染色等结果也显示

胍丁胺可抑制炎症细胞浸润来改善肺部炎症。急性肺损伤导致肺水肿也是加重病情的重要因素, 本研究结果显示胍丁胺治疗后肺组织W/D减少, 这表明胍丁胺可降低肺部血管通透性, 减轻病理损伤。考虑到常规急性肺损伤模型中的治疗药物以激素为主, 过量使用时, 具有较大副作用, 而胍丁胺作为一种生理条件下的正常产物, 其在安全性上具有更多优势, 更具临床推广优势。

过度的氧化应激损伤会影响包括肺组织在内的多种器官的正常功能, 并加重炎症反应^[8-9]。存在于细胞内的SOD酶是细胞内氧化剂清除剂, 可反映体内清除氧自由基的能力; 而MDA是脂质氧化的产物, 可反映患者体内氧自由基的产生水平, 并间接反映细胞受到氧化损伤的程度^[10-11]。结果显示急性肺损伤大鼠模型经过胍丁胺治疗后, 会出现MDA含量下调、SOD酶活性上升的表现, 提示其可通过促进抗氧化物(如SOD酶等)的生成来减轻肺部氧化应激反应, 进而导致MDA生成减少, 从而发挥治疗效果。同时, 检测肺组织及肺泡灌洗液中的TNF- α 、IL-6水平显示, 经过治疗后的肺组织中的细胞因子表达下调, 同样表明胍丁胺具有抑制炎症作用, 与既往研究相符。以上研究均表明, 肺部局部给药后, 会提高肺组织抗氧化水平, 那么在临床应用中可通过药物雾化吸入方式来辅助急性肺损伤的治疗, 来改善患者病情。

本研究同样存在不足, 如未深入探究胍丁胺抑制肺部氧化应激反应的分子机制, 同时, 其对于肺部包括巨噬细胞等炎症细胞的影响也尚待评估。本研究设置的剂量梯度仅仅在肺组织的细胞因子中, 而没有在W/D及肺泡灌洗液细胞因子中产生差异, 这有可能是检测对象存在差异而产生的结果。但是与LPS组比较, 低及高剂量胍丁胺组的肺损伤指标

均有改善。尚需要后续进一步进行实验, 扩大浓度梯度, 来筛选最适合的用药剂量。

综上, 胍丁胺可抑制肺部过度氧化应激及炎症反应, 发挥对急性肺损伤的保护作用。

参考文献

- [1] Störmann P, Lustenberger T, Relja B, et al. Role of biomarkers in acute traumatic lung injury[J]. *Injury*, 2017, 48 (11): 2400-2406.
- [2] Hughes K T, Beasley M B. Pulmonary manifestations of acute lung injury: more than just diffuse alveolar damage[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2016, 141 (7): 916-922.
- [3] Li X, Liu Z, Jin H, et al. Agmatine protects against zymosan-induced acute lung injury in mice by inhibiting NF- κ B-mediated inflammatory response[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014 (4): 583736.
- [4] Xu W, Gao L, Li T, et al. Neuroprotective role of agmatine in neurological diseases[J]. *Curr Neuropharmacol*, 2018, 16 (9): 1296-1305.
- [5] 柴鉴深. 胍丁胺在内毒素性肺损伤中的治疗作用和抗氧化机制研究[D]. 重庆: 第三军医大学, 2016.
- [6] Salvi M, Battaglia V, Mancon M, et al. Agmatine is transported in liver mitochondria by a specific electrophoretic mechanism[J]. *Biochem J*, 2006, 396 (2): 337-345.
- [7] Lee W T, Hong S, Yoon S H, et al. Neuroprotective effects of agmatine on oxygen-glucose deprived primary-cultured astrocytes and nuclear translocation of nuclear factor-kappa B[J]. *Brain Res*, 2009, 1281 (6): 64-70.
- [8] 王全玉, 王切, 李易明, 等. 莱菔硫烷对大鼠肾缺血再灌注损伤模型氧化应激的影响[J]. *解剖学杂志*, 2019, 42 (5): 448-452.
- [9] 解东兴, 史妍, 李萍, 等. 姜黄素对急性肺损伤大鼠肺组织诱导型一氧化氮合酶和内皮型一氧化氮合酶表达的影响[J]. *解剖学杂志*, 2016, 39 (6): 678-681.
- [10] 谢敏崇, 杜剑文, 张海天, 等. 脓毒症继发急性肺损伤患者肺组织和血清细胞因子变化及临床意义[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2018, 32 (4): 344-346.
- [11] 张杰, 叶慧芳, 单艳华. 硫化氢对脂多糖诱发的大鼠急性肺损伤肺组织中细胞凋亡及SOD、MDA水平的影响[J]. *实用预防医学*, 2018, 25 (6): 753-756.