

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160545

## 褪黑素对脂多糖诱导的脓毒症大鼠肺损伤的保护作用

宋洁琼, 吴 威, 陈 嵩, 诸杜明, 钟 鸣\*

复旦大学附属中山医院重症医学科, 上海 200032

**[摘要]** **目的:**探讨褪黑素(MT)对脂多糖(LPS)诱导的脓毒症大鼠肺损伤组织的保护作用。**方法:**成年清洁级 SD 雄性大鼠 72 只,随机分为对照组(静脉注射 0.9%氯化钠溶液)、LPS 组(静脉注射 LPS 1 mg/kg)、LPS+MT1 组(静脉注射 MT 0.1 mg/kg+LPS 1 mg/kg)、LPS+MT2 组(静脉注射 MT 1 mg/kg+LPS 1 mg/kg),每组 18 只。给药后 6 h 取血,应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组大鼠血清肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白介素-6(IL-6)和 IL-10 的含量;取大鼠肺组织,匀浆,测定超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和髓过氧化物酶(MPO)含量。**结果:**LPS 组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-10 水平较对照组显著升高( $P<0.01$ );给予 MT 干预后,大鼠 TNF- $\alpha$ 、IL-6 水平下降而 IL-10 水平上升( $P<0.05$ ),且这一效应随 MT 剂量增加而增大。LPS 组大鼠肺组织 SOD 含量较对照组明显降低,而 MDA 和 MPO 含量显著升高( $P<0.01$ );给予 MT 干预后,大鼠 SOD 水平有显著升高,MDA 和 MPO 水平明显下降( $P<0.05$ ),且这一效应随 MT 剂量增加而增大。**结论:**MT 可降低 LPS 诱导的脓毒症大鼠的炎症反应,并能有效拮抗脂质过氧化造成的肺组织损伤,起到一定的肺保护作用;MT 对肺损伤组织的保护作用与其剂量正相关。

**[关键词]** 褪黑素;脂多糖;脓毒症;肿瘤坏死因子- $\alpha$ ;白介素

**[中图分类号]** R 453.9 **[文献标志码]** A

## Protective effects of melatonin on lung injury induced by lipopolysaccharide in rats with sepsis

SONG Jie-qiong, WU Wei, CHEN Song, ZHU Du-ming, ZHONG Ming\*

Department of Critical Care Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effects of melatonin (MT) on lung injury induced by lipopolysaccharide (LPS) in rats with sepsis. **Methods:** Seventy-two rats were randomly divided into four groups with 18 rats in each group: control group (0.9% NS, *i. v.*), LPS group (LPS 1 mg/kg, *i. v.*), LPS+MT1 group (MT 0.1 mg/kg+LPS 1 mg/kg, *i. v.*) and LPS+MT2 group (MT 1 mg/kg+LPS 1 mg/kg, *i. v.*). Carotid arterial blood of all rats was collected at 6 h after administration and serum levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6) and interleukin-10 (IL-10) were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The lung homogenate contents of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde(MDA) and myeloperoxidase (MPO) were also examined. **Results:** Compared with control group, the levels of serum TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-10 were significant higher in LPS group ( $P<0.01$ ). With the MT intervention, the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 were significantly decreased but the IL-10 level was remarkably increased ( $P<0.05$ ). This effect was more remarkable with the increase of the dose of MT. The level of SOD in LPS group was remarkably lower than in control group, but the levels of MDA and MPO were significantly higher ( $P<0.01$ ). Compared with LPS group, the level of SOD in LPS+MT1 group was significantly increased, however, the contents of MDA and MPO were decreased ( $P<0.05$ ). The same trend was more prominent in LPS+MT2 group. **Conclusions:** MT can decrease the lung injury by reducing the inflammatory response and lipid peroxidation induced by LPS in rats with sepsis. The protective effect was positively associated with the dose of MT.

**[Key Words]** melatonin; lipopolysaccharide; sepsis; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; interleukin

脓毒症是由感染引起的全身炎症反应综合征,病情凶险且病死率高,是重症监护病房患者最主要

的死亡原因之一。虽然近年来各脏器功能的支持治疗手段显著提高,但脓毒症患者的死亡率仍居高

**[收稿日期]** 2106-05-06

**[接受日期]** 2016-07-27

**[基金项目]** 复旦大学附属中山医院青年科学基金(2014ZSQN64)。Supported by Youth Science Found of Zhongshan Hospital, Fudan University(2014ZSQN64)。

**[作者简介]** 宋洁琼,硕士,主治医师。Email:song.jieqiong@zs-hospital.sh.cn

\*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-64041990, E-mail:zhong.ming@zs-hospital.sh.cn

不下,严重影响人们的生活质量。褪黑素(melatonin, MT)是松果体分泌的吲哚类神经内分泌激素,化学名为N-乙酰-5-甲氧色胺<sup>[1]</sup>。该物质由5-羟色胺经两步酶促反应生成,因其经提纯后可以使两栖类动物皮肤变白,因此又命名为褪黑素。多项基础<sup>[2-8]</sup>研究发现,其有调节生物钟、改善睡眠、抗焦虑、抗炎、抗氧化、清除氧自由基、调节免疫以及抗肿瘤等功能。其中,抗炎、抗氧化及免疫调节作用对脓毒症的治疗可能有重要意义。本研究拟通过静脉注射脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)制造大鼠脓毒症模型,并给予不同治疗剂量的MT,探讨MT对脓毒症大鼠肺损伤组织的保护作用。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 成年清洁级SD雄性大鼠72只,体质量(200±20)g,购自南京君科生物工程有限公司。MT、LPS均为Sigma公司产品;大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白介素-6(interleukin-6, IL-6)和IL-10酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自晶美生物工程(北京)有限公司;大鼠超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 动物模型制备与分组 所有大鼠实验前禁食12h,不禁水。将这些大鼠随机分为4组,每组18只。对照组:尾静脉注射0.9%氯化钠溶液;LPS组:尾静脉注射LPS 1 mg/kg;LPS+MT1组:先尾静脉注射MT 0.1 mg/kg,30 min后再注射LPS 1 mg/kg;LPS+MT2组:先尾静脉注射MT 1 mg/kg,30 min后再注射LPS 1 mg/kg。各组大鼠均在自然光照下饲养,MT给药均在9:00至10:00完成。

1.3 血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10含量检测 各组大鼠均在完成静脉注射后6h经戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉,经颈动脉取血后处死。将全血经离心机离心后取血清,-20℃冻存待用。采用ELISA法检测大鼠血清中TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10的含量,按ELISA试剂盒说明书操作。

1.4 肺组织SOD、MDA、MPO含量测定 取大鼠新鲜肺组织,加入0.9%氯化钠液,用电动匀浆器制备10%肺组织匀浆。制作匀浆过程于冰水中进行。按各自检测试剂盒说明书测定肺组织中SOD、

MDA和MPO含量。

1.5 统计学处理 采用SPSS 13.0软件分析。计数资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,对有差异的数据进一步用Newman-Kuels  $q$ 检验进行两两比较,检验水准( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 血清TNF- $\alpha$ 、IL-6和IL-10含量变化 结果(表1)表明:对照组大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10含量均处于正常范围的较低水平。LPS组大鼠在注射LPS后6h,上述指标均较对照组明显上升( $P<0.01$ )。LPS+MT1组大鼠TNF- $\alpha$ 、IL-6含量虽仍显著高于对照组,但较LPS组下降( $P<0.05$ );LPS+MT1组IL-10含量明显高于对照组,但与LPS组差异无统计学意义。LPS+MT2组大鼠TNF- $\alpha$ 、IL-6含量进一步下降,低于LPS+MT1组( $P<0.05$ );LPS+MT2组IL-10含量较LPS+MT1组升高,且显著高于LPS组( $P<0.05$ )。

表1 大鼠血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-10含量

组别	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-10
对照组	12.4±2.5	8.7±0.8	7.4±1.2
LPS组	56.1±7.3 <sup>a</sup>	13.0±2.2 <sup>a</sup>	16.9±2.8 <sup>a</sup>
LPS+MT1组	42.2±4.5 <sup>ab</sup>	12.2±2.0 <sup>ab</sup>	18.1±1.9 <sup>a</sup>
LPS+MT2组	24.3±3.8 <sup>ac</sup>	10.7±1.5 <sup>ac</sup>	20.5±1.6 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup> $P<0.01$ 与对照组相比;<sup>b</sup> $P<0.05$ 与LPS组相比;<sup>c</sup> $P<0.05$ 与LPS+MT1组相比

2.2 肺组织SOD、MDA、MPO含量变化 结果(表2)表明:LPS组大鼠SOD含量明显低于对照组,而MDA和MPO含量明显高于对照组( $P<0.01$ )。LPS+MT1组大鼠SOD含量仍显著低于对照组,但较LPS组升高( $P<0.05$ );LPS+MT1组MDA和MPO含量仍高于对照组,但较LPS组下降( $P<0.05$ )。LPS+MT2组大鼠SOD含量较LPS+MT1组升高,但仍低于对照组( $P<0.05$ );LPS+MT2组MDA和MPO含量较LPS+MT1组进一步降低,但仍高于对照组( $P<0.05$ )。

表2 大鼠肺组织SOD、MDA、MPO含量

组别	SOD (U/mg)	MDA (nmol/mg)	MPO (U/g)
对照组	122±23	3.42±0.52	8.2±1.0
LPS组	73±15 <sup>a</sup>	6.33±1.41 <sup>a</sup>	13.9±3.2 <sup>a</sup>
LPS+MT1组	98±17 <sup>ab</sup>	5.11±0.49 <sup>ab</sup>	11.2±2.6 <sup>ab</sup>
LPS+MT2组	110±20 <sup>ac</sup>	4.23±0.54 <sup>ac</sup>	9.8±1.7 <sup>ac</sup>

<sup>a</sup> $P<0.01$ 与对照组相比;<sup>b</sup> $P<0.05$ 与LPS组相比;<sup>c</sup> $P<0.05$ 与LPS+MT1组相比

### 3 讨论

LPS 诱导的脓毒症可导致组织细胞缺血、缺氧,而液体复苏和血管活性药物又造成组织缺血-再灌注损伤,并由此引起细胞氧超载,加重炎症反应,导致组织细胞坏死、凋亡,最终发生多器官功能衰竭。MT 作为一种神经内分泌激素,具有清除氧自由基、改善线粒体功能、调节细胞凋亡、抗炎及免疫调节等作用。

TNF- $\alpha$  和 IL-6 是重要的促炎及免疫调节因子,通过生成细胞因子和炎症趋化因子激活炎症级联反应,增加内皮黏附因子的表达,促进中性粒细胞对血管内皮细胞的黏附,导致靶器官损伤,从而引起各种临床症状<sup>[9]</sup>。而 IL-10 是巨噬细胞和单核细胞产生的抗炎因子,能够通过下调促炎症因子的表达来抑制炎症级联反应<sup>[10]</sup>,还可以降低巨噬细胞产生的自由基、氮氧化物等有害物质的水平。有研究<sup>[11]</sup>表明,给 LPS 诱导的脓毒症休克小鼠腹腔注射 MT 能降低 TNF- $\alpha$ 、IL-12 和 IFN- $\gamma$  等促炎因子水平,而增加抗炎因子 IL-10 的含量。本研究中,LPS 组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 IL-10 水平均明显高于对照组,可见 LPS 导致的脓毒症状态下促炎和抗炎反应均加强。给予小剂量 MT 的 LPS+MT1 组大鼠血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平虽仍显著高于对照组,但较 LPS 组有明显下降,而 IL-10 水平有上升趋势;而给予大剂量 MT 的 LPS+MT2 组大鼠血清 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平较 LPS+MT1 组进一步下降,IL-10 水平上升且显著高于 LPS 组。研究表明,MT 降低促炎因子 TNF- $\alpha$  和 IL-6 水平的同时能提高抗炎因子 IL-10 的浓度,起到维持促炎/抗炎平衡的作用,这与既往研究<sup>[11-12]</sup>结果相符,而且本研究进一步显示这一作用与 MT 剂量正相关。

MT 可从多个环节上防止自由基损伤,包括阻止自由基氧化的连锁反应,抑制脂质过氧化,并与其他抗氧化剂协同减少自由基的生成<sup>[13-16]</sup>。还原型谷胱甘肽可以还原脂质过氧化物,从而消除其对细胞膜的损伤;而 MT 可以通过增强组织中谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽还原酶的活性,促使氧化型谷胱甘肽还原,从而起到保护细胞膜的作用<sup>[17-18]</sup>。SOD 是机体清除氧自由基最重要的酶之一,其含量可以反映机体内抗氧化酶的活性及其清除氧自由基的能力。MT 可以提高 SOD、过氧化氢酶等有清除自由基及抗氧化作用酶的活性及其

mRNA 表达水平<sup>[14,19]</sup>。MDA 是氧自由基通过攻击生物膜中多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化而形成的产物,是反映氧化损伤程度的指标之一。MPO 是血红素过氧化物酶超家族成员之一,参与调节炎症反应,是中性粒细胞的功能和激活标志,其水平及活性代表嗜中性多形核白细胞的功能和活性状态。MPO 过度表达亦会引起氧化应激,导致氧化性组织损伤。本研究显示,LPS 组大鼠肺组织 SOD 水平较对照组明显下降,而 MDA 和 MPO 水平显著上升,提示脓毒症状态下,肺组织清除自由基的能力下降,发生严重氧化应激损伤;LPS+MT1 组大鼠 SOD 水平较 LPS 组上升,而 MDA 和 MPO 水平则下降,这一趋势在 LPS+MT2 组中更明显。可见 MT 可以减轻 LPS 导致的氧化损伤,并且这一作用随 MT 剂量的增加而增强。

综上所述,MT 可减轻 LPS 诱导的脓毒症大鼠的炎症反应,并有效拮抗脂质过氧化造成的肺组织损伤,起到一定的肺保护作用,而且这一效应与 MT 的剂量正相关。然而,MT 的抗炎、抗氧化及调节免疫的机制非常复杂,受多方面因素的影响,因此尚需要进一步的药理研究及临床试验来证明其有效性、安全性和远期效果。

### 参考文献

- [1] Simoneanx V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the complex regulation of melatonin synthesis by norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters[J]. *Pharmacol Rev*, 2003,55(2):325-395.
- [2] Maharaj DS, Anoopkumar-Dukie S, Glass BD, et al. The identification of the UV degradants of melatonin and their ability to scavenge radicals[J]. *J Pineal Res*, 2002,32(4):257-261.
- [3] Tocharus J, Chongthammakun S, Govitrapong P, et al. Melatonin inhibits amphetamine-induced nitric oxide synthase mRNA overexpression in microglial cell lines[J]. *Neurosci Lett*, 2008,439(2):134-137.
- [4] Brennan CP, Hendricks GL 3rd, El-Sheikh TM, et al. Melatonin and the enhancement of immune responses in immature male chickens [J]. *Poult Sci*, 2002, 81(3):371-375.
- [5] Trubiani O, Recchioni R, Moroni F, et al. Melatonin provokes cell death in human B-lymphoma cells by mitochondrial-dependent apoptotic pathway activation[J]. *J Pineal Res*, 2005,39(4):425-431.
- [6] Maestroni GJ. The immunotherapeutic potential of melatonin [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2001,10(3):467-476.

- [7] Negrette B, Bonilla E, Valero N, et al. Melatonin treatment enhances the efficiency of mice immunization with Venezuelan equine encephalomyelitis virus TC-83[J]. *Neurochem Res*, 2001,26(7):767-770.
- [8] Srinivasan V, Maestroni GJ, Cardinali DP, et al. Melatonin, immune function and aging[J]. *Immun Ageing*,2005,2:17.
- [9] Radogna F, Diederich M, Ghibelli L. Melatonin: A pleiotropic molecule regulating inflammation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010,80(12):1844-1852.
- [10] Pedreira PR, García-Prieto E, Parra D, et al. Effects of melatonin in an experimental model of ventilator-induced lung injury[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008,295(5):L820-L827.
- [11] Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Naji L, et al. Beneficial pleiotropic actions of melatonin in an experimental model of septic shock in mice: regulation of pro-/anti-inflammatory cytokine network, protection against oxidative damage and anti-apoptotic effects [J]. *J Pineal Res*, 2005, 39 (4): 400-408.
- [12] Escames G, Acuña-Castroviejo D, López LC, et al. Pharmacological utility of melatonin in the treatment of septic shock: experimental and clinical evidence [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2006,58(9):1153-1165.
- [13] Hardeland R. Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance[J]. *Endocrine*, 2005,27(2):119-130.
- [14] Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. A proposed mechanism to explain the stimulatory effect of melatonin on antioxidative enzymes[J]. *J Pineal Res*, 2005,39(2):99-104.
- [15] Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Cardinali DP. Melatonin [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006,38(3):313-316.
- [16] Suzen S, Bozkaya P, Coban T, et al. Investigation of the in vitro antioxidant behaviour of some 2-phenylindole derivatives: discussion on possible antioxidant mechanisms and comparison with melatonin [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2006,21(4):405-411.
- [17] Ozdemir D, Uysal N, Tugyan K, et al. The effect of melatonin on endotoxemia induced intestinal apoptosis and oxidative stress in infant rats[J]. *Intensive Care Med*, 2007, 33(3):511-516.
- [18] Wang H, Wei W, Zhang SY, et al. Melatonin-selenium nanoparticles inhibit oxidative stress and protect against hepatic injury induced by Bacillus Calmette-Guérin/lipopolysaccharide in mice[J]. *J Pineal Res*, 2005, 39 (2): 156-163.
- [19] Kedziora-Kornatowska K, Szewczyk-Golec K, Czuczejko J, et al. Effect of melatonin on the oxidative stress in erythrocytes of healthy young and elderly subjects [J]. *J Pineal Res*, 2007,42(2):153-158.

[本文编辑] 姬静芳