

• 论 著 •

PUFA 对 LPS 致 ALI 大鼠的氧化应激及 TLR4、TNF- α 的影响*芦 玲, 白 琳[△], 武 猛, 丛沛然, 郝 鑫, 吴玉荣

(黑龙江省医院重症医学科, 哈尔滨 150036)

摘要:目的 探究并分析 ω -3 多不饱和脂肪酸(PUFA)对内毒素脂多糖(LPS)致急性肺损伤(ALI)大鼠的氧化应激及 Toll 样受体-4(TLR4)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的影响。方法 选取健康成年 Wistar 大鼠 120 只(清洁级, 体质量 180~240 g), 按照随机数字表法将其分为对照组和观察组, 每组 60 只, 对照组大鼠又随机分为未处理组、处理后 6 h 组(LPS 注射)、处理后 24 h 组(LPS 注射), 每组 20 只。观察组大鼠又随机分为未处理组、处理后 6 h 组(PUFA+LPS 注射)、处理后 24 h 组(PUFA+LPS 注射), 每组 20 只。观察 2 组大鼠处理前、处理后 6 h、处理后 24 h 超氧化物歧化酶活性(SOD)、丙二醛(MDA)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、TNF- α 、TLR4 相对表达量。结果 观察组和对照组大鼠处理前后 SOD 水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 观察组和对照组大鼠处理前 SOD 水平比较差异无统计学意义($P > 0.05$); 随着处理时间的推移, 2 组大鼠 SOD 水平均有所降低, 但观察组大鼠降低程度低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 2 组大鼠处理前后 MDA 水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 随着处理时间的推移, 2 组大鼠 MDA 水平均有所升高, 但观察组大鼠升高程度明显低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 2 组大鼠处理前后 ICAM-1 水平比较差异有统计学意义($P < 0.05$); 随着处理时间的推移, 2 组大鼠 ICAM-1、TNF- α 水平有所升高, 但观察组大鼠升高程度明显低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 观察组大鼠肺组织 TLR4 相对表达量低于对照组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 PUFA 能有效降低 LPS 致 ALI 大鼠的氧化应激反应及炎症水平, 可能有助于 ALI 的治疗。

关键词: 多不饱和脂肪酸; 内毒素脂多糖; 急性肺损伤; 氧化应激

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.24.009

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)24-3383-03

Effects of PUFA on oxidative stress and TLR4, TNF- α in ALI rats induced by LPS*LU Lin, BAI Lin[△], WU Meng, CONG Peiran, HAO Jin, WU Yurong

(Department of Intensive Medicine, Hospital of Heilongjiang Province, Harbin, Heilongjiang 150036, China)

Abstract: **Objective** To explore and analyze the effects of ω -3 polyunsaturated fatty acid(PUFA) on oxidative stress and Toll like receptor-4(TLR4) and tumor necrosis factor alpha(TNF- α) in rats with acute lung injury(ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Methods** 120 healthy adult Wistar rats(clean grade; weight, 180-240 g) were randomly divided into control group and observation group, 60 rats in each group, rats in the control group were randomly divided into untreated group, 6 h group(LPS injection), and 24 h group(LPS injection), 20 rats in each group. The rats in the observation group were randomly divided into untreated group, 6h group(PUFA+LPS injection), and 24 h group(PUFA+LPS injection), 20 rats in each group. The relative expression of Superoxide Dismutase(SOD) before treatment, 6 h after treatment and 24 h after treatment, Malondialdehyde(MDA), intercellular cell adhesion molecule-1(ICAM-1), TNF- α , and TLR4 in two groups were observed. **Results** The difference of SOD levels before and after treatment in the two groups of rats was statistically significant($P < 0.05$), the difference of SOD levels before treatment in the two groups of rats was not statistically significant($P > 0.05$). As the processing time went on, the level of SOD in the two groups of rats decreased, but the decrease of the rats in the observation group was lower than that of the control group, and the difference was statistically significant($P < 0.05$), the difference of MDA level before and after treatment in two groups of rats was statistically significant($P < 0.05$). As the processing time went on, The level of MDA in the two groups of rats increased, but the increase of the rats in the observation group was significantly lower than that of the control group, and the difference was statistically significant($P < 0.05$). The difference of ICAM-1 level before and after treatment in the two groups of rats was statistically significant($P < 0.05$). As the processing time went on, the levels of ICAM-1 and TNF-alpha in the two groups increased, but the increase of the rats in the observation group was significantly lower than that in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The relative expression of TLR4 in the lung tissue of the observation group was significantly lower than that of the control group($P < 0.05$). **Conclusion** PUFA could effectively reduce the oxidative stress and inflammation in ALI rats induced by LPS, which may contribute to the treatment of ALI.

Key words: polyunsaturated fatty acids; lipopolysaccharide; acute lung injury; oxidative stress

急性肺损伤(ALI)是各种直接和间接致伤因素导致的肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤,严重的 ALI 可影响患

者呼吸功能,甚至发展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)^[1-2]。因此,及时发现并处理急性肺损伤在 ALI 的治疗中具有重要

* 基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(QC2016127)。

作者简介:芦玲,女,主治医师,主要从事肺损伤方向研究。△ 通信作者, E-mail: lulin198502@163.com。

的价值。研究表明,氧化应激及炎症是 ALI 发生发展过程中重要的影响因素,包括各种炎症因子和炎症细胞的释放和渗出^[3-4]。目前,对于 ALI 的治疗主要以呼吸机支持等对症治疗以及抗炎治疗为主。有学者发现,ALI 患者多不饱和脂肪酸水平显著降低^[5],这可能与 ALI 的发生发展有关。动物实验发现,PUFA 能有效降低 ALI 大鼠肺组织炎性渗出及肺组织损伤^[6]。为此,本研究选取 120 只 Wistar 大鼠,探究 PUFA 对 ALI 大鼠氧化应激的影响,现报道如下。

1 材料与方

1.1 材料来源 选取健康成年 Wistar 大鼠 120 只(清洁级,体质量 180~240 g),按照随机数字表法将其分为对照组和观察组,每组 60 只,对照组大鼠又随机分为未处理组、处理后 6 h 组(LPS 注射)、处理后 24 h 组(LPS 注射),每组 20 只;观察组大鼠随机分为未处理组、处理后 6 h 组(PUFA+LPS 注射)、处理后 24 h 组(PUFA+LPS 注射),每组 20 只。由本院实验动物中心提供。使用 C060 灭菌的商品化大鼠饲料,自由饮水采食,自然光照,饲养温度 18~25 ℃,饲养湿度 60%~70%,术前 12 h 禁食。本研究经伦理委员会批准。

1.2 方法 实验开始前确保所有大鼠在造模前均为健康大鼠。造模方法:于造模前 7 d 开始,观察组大鼠(未处理组仅给予生理盐水)给予生理盐水 1 mL+PUFA(ω -3 多不饱和脂肪酸)灌胃(0.5 g/kg),1 次/d,连续 7 d。末次给药后 24 h,其余大鼠尾静脉注射 LPS 6 mg/kg(1.2 mg/只),建立 ALI 模型。对照组大鼠给予生理盐水 1 mL 灌胃(0.5 g/kg),1 次/d,连续 7 d,末次给药后 24 h,大鼠(未处理组大鼠除外)尾静脉注射 LPS 6 mg/kg(1.2 mg/只),建立 ALI 模型。以上 ω -3 多不饱和脂肪酸购于北京百慧生化制药公司,LPS 购自美国 Sigma 公司。2 组大鼠中的未处理组均在造模前予以处死,并检测大鼠的肺组织氧化应激指标超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及 Toll 样受体 4(TLR4)及肿瘤坏死因子(TNF- α)水平。SOD、MDA 水平采用 Western Blot 检测、TNF- α 采用酶联免疫吸附法测定,TLR4 采用 Western 印迹法测定。ICAM-1 将肺组织常规石蜡切片脱蜡水化,一抗采用兔抗 ICMA-1 多克隆抗体,DAB 显色,苏木素复染。采用 PBS 代替一抗作为阴性对照。ICMA-1 阳性颗粒表达于胞浆中,呈棕黄色,以平均吸光度(OD 值)代表该切片 ICAM-1 的表达水平。以上操作均由本院检验科人员严格按照说明书进行,检测所用试剂及试剂盒均购自上海岚派生物科技有限公司。

1.3 观察指标及评价标准 观察 2 组患者处理前、处理后 6 h、处理后 24 h SOD、MDA、ICAM-1、TNF- α 、TLR4 相对表达量。ALI 大鼠评价标准参考 Yamasawa 等^[7]在研究中的判定标准。

1.4 统计学处理 以 SPSS21.0 进行数据统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,TLR4 相对表达量比较采用 *t* 检验,以 *P*<0.0 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 2 组患者 SOD 水平比较 经重复方差分析,2 组大鼠处理前后 SOD 水平差异有统计学意义(*P*<0.05)。2 组大鼠处理前 SOD 水平比较差异无统计学意义(*P*>0.05),随着处理时间的进行,2 组大鼠 SOD 水平有所降低,但观察组患者降低程度明显低于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 2 组患者不同时期 SOD 水平比较($\bar{x} \pm s, U/mg$)

组别	<i>n</i>	未处理	处理 6 h	处理 24 h
对照组	60	106.20±9.82	87.65±9.64 [#]	79.21±8.54 [#]
观察组	60	107.52±9.65	105.25±8.96* [#]	98.18±8.41* [#]

注:与未处理比较,[#]*P*<0.05;与对照组比较,**P*<0.05。

2.2 2 组患者 MDA 水平比较 经重复方差分析,2 组大鼠处理前后 MDA 水平差异有统计学意义(*P*<0.05)。2 组大鼠处理前 MDA 水平比较差异无统计学意义(*P*>0.05),随着处理时间的进行,2 组大鼠 MDA 水平有所升高,但观察组患者升高程度明显低于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。详见表 2。

表 2 2 组患者不同时期 MDA 水平比较($\bar{x} \pm s, nmol/mg$)

组别	<i>n</i>	未处理	处理 6 h	处理 24 h
对照组	60	3.12±0.49	7.85±0.89 [#]	12.01±1.34 [#]
观察组	60	3.20±0.51	5.21±0.43* [#]	7.79±0.85* [#]

注:与未处理比较,[#]*P*<0.05;与对照组比较,**P*<0.05。

2.3 2 组患者 ICAM-1 水平比较 经重复方差分析,2 组大鼠处理前后 ICAM-1 水平差异有统计学意义(*P*<0.05)。2 组大鼠处理前 ICAM-1 水平比较差异无统计学意义(*P*>0.05),随着处理时间的进行,2 组大鼠 ICAM-1 水平有所升高,但观察组患者升高程度明显低于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。详见表 3。

表 3 2 组不同时期患者 ICAM-1 水平(OD 值)比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	未处理	处理 6 h	处理 24 h
对照组	60	0.12±0.04	0.21±0.06 [#]	0.36±0.12 [#]
观察组	60	0.13±0.10	0.15±0.07* [#]	0.21±0.05* [#]

注:与未处理比较,[#]*P*<0.05;与对照组比较,**P*<0.05。

2.4 2 组患者 TNF- α 水平比较 经重复方差分析,2 组大鼠处理前后 TNF- α 水平差异有统计学意义(*P*<0.05)。2 组大鼠处理前 TNF- α 水平比较差异无统计学意义(*P*>0.05),随着处理时间的进行,2 组大鼠 TNF- α 水平有所升高,但观察组患者升高程度明显低于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。详见表 4。

表 4 2 组患者不同时期 TNF- α 水平比较($\bar{x} \pm s, pg/mL$)

组别	<i>n</i>	未处理	处理 6 h	处理 24 h
对照组	60	197±6	2 012±9 [#]	2 662±23 [#]
观察组	60	198±6	1 024±8* [#]	1 659±13* [#]

注:与未处理比较,[#]*P*<0.05;与对照组比较,**P*<0.05。

2.5 2 组大鼠相对肺组织 TLR4 相对表达量比较 对照组大鼠肺组织 TLR4 相对表达量为 2.96±0.75,观察组大鼠肺组织 TLR4 相对表达量为 0.79±0.12,明显低于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.05)。

3 讨 论

级联放大的炎性反应是急性肺损伤常见的病理生理,炎症介质的释放能显著增加血管肺毛细血管通透性,进而增加患者肺水肿症状,而过度的氧化应激造成了弥漫性肺组织损伤^[8-9]。

LPS 是常见的抗原,也是引起 ALI 常见的原因之一。本研究采用 LPS 对大鼠进行尾部静脉注射,以完成 ALI 的造模。脂肪酸在机体内环境的维持中具有重要的作用,研究表明,脂肪酸可调节细胞膜的流动性,并对细胞间信号的传导产生影响^[10]。SOD 是一种新型酶制剂,能有效清除人体代谢过程中产生的有毒物质,其中包括氧自由基,因此被称为人体清道夫^[11-12]。MDA 是常用的膜脂过氧化指标,同时也能有效反映组织损伤程度。ICAM-1 是常见的细胞间黏附分子之一,具有刺激中性粒细胞与内皮细胞黏附的作用,同时减少中性粒细胞的聚集。TLR4 蛋白是炎性激活过程中重要通路,具有刺激炎症因子释放,加重急性肺损伤的作用。TNF- α 是常见的炎症因子,在炎症的发生发展中具有重要的作用,体外实验表明其具有刺激 IL-1 表达的作用^[13]。LPS 对于 TNF- α 具有极强的刺激作用,为此,本研究将 TNF- α 作为观察指标,以探究 PUFA 对 ALI 患者炎症反应的影响。

本研究中,随着处理时间的进行,但观察组大鼠 SOD 水平降低程度、MDA、ICAM-1 水平升高程度明显低于对照组,此结果表明,PUFA 能有效降低 ALI 大鼠氧化应激水平,Endo 等^[14]也在研究中发现,多不饱和脂肪酸具有稳定细胞膜稳定性的作用,同时减少氧化应激对组织的损伤作用,可能与其调节膜的流动性有关。2 组大鼠处理前后 TNF- α 水平和 TLR4 相对表达量变化表明,PUFA 能有效抑制 TLR4 蛋白及 TNF- α 的表达,从而降低炎症反应程度, Tokarik 等^[15]也在研究中发现,PUFA 能有效降低大鼠肺部炎症反应,可能与 PUFA 阻碍信号通路的活化有关。

综上所述,PUFA 能有效降低 LPS 致 ALI 大鼠的氧化应激反应及炎症水平,可能有助于 ALI 的治疗。

参考文献

- [1] 谷志龙,姜华茂,胡占升,等. LPS 诱导小鼠急性肺损伤 TLR4 及 TNF- α 表达[J]. 中国医学创新,2015,12(24):16-19.
- [2] 文秀芳,陈霞,邹海桥,等. 姜黄素通过抑制 TLR4 信号通路下调脂多糖诱导的肺巨噬细胞分泌 TNF- α 、IL-6 和 IL-8[J]. 云南中医学院学报,2013,14(6):22-25.
- [3] 陈文,王沛明,张祎,等. 基于 TLR4 通路初探黄芩对内毒素血症大鼠肝肺组织中细胞因子 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 以及氧化应激因子 MDA、SOD 水平的影响[J]. 中药药理与临床,2016,15(3):87-92.
- [4] 杜西翠,刘佳龙,杨柳,等. LPS 介导小鼠子宫内皮细胞中 TLR4/NF- κ B 信号通路的研究及槲皮素的影响[A]. 中国畜牧兽医学中兽医学分会 2013 年学术年会论文集[C]. 2013.
- [5] 黄继义,刘才文,林建东,等. 内毒素急性肺损伤 TLR4-LPS 信号传导对 NF- κ B 活性的影响[J]. 临床肺科杂志,2014,19(2):223-226.
- [6] 赵艳,柳欣欣,郭丹,等. ω -3 多不饱和脂肪酸对内毒素致大鼠急性肺损伤的影响[J]. 中华临床营养杂志,2013,21(2):83-89.
- [7] Yamasawa H, Ishii Y, Kitamura S. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant in a rat model of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. [J]. Inflammation,1999,23(3):263-274.
- [8] 谢慧,张京臣,陈莹,等. ω -3 多不饱和脂肪酸对兔急性肺损伤的保护作用[J]. 中华临床营养杂志,2014,22(5):297-301.
- [9] 王蓉,高德伟,唐云,等. ω -3 脂肪酸对于老年急性肺损伤机械通气患者的肺保护作用[A]. 第六届全国“老年疾病营养支持的循证应用”学术研讨会论文集[C]. 2013.
- [10] Li Li, Weijing W, Wenjie H, et al. NF- κ B RNAi decreases the Bax/Bcl-2 ratio and inhibits TNF- α -induced apoptosis in human alveolar epithelial cells[J]. Inflamm Res,2013,62(4):387-397.
- [11] 孙威,武庆平. 多不饱和脂肪酸衍生物对急性肺损伤的保护作用研究进展[J]. 国际麻醉学与复苏杂志,2013,34(11):1038-1042.
- [12] 王亿胜. ω -3 多不饱和脂肪酸对 ALI/ARDS 的治疗作用及其机制[D]. 郑州:郑州大学,2014.
- [13] 叶家欣,葛敏. ω -3 多不饱和脂肪酸在主动脉夹层术后急性肺损伤治疗中的应用[J]. 中国临床研究,2016,29(6):756-759.
- [14] Endo S, Shibata S, Sato N, et al. A prospective cohort study of ALI/ARDS in the Tohoku district of Japan(second report)[J]. J Anesth,2010,24(3):351-358.
- [15] Tokarik M, Sjöberg F, Vajtr D, et al. Natriuretic peptide proANP(1-98), a biomarker of ALI/ARDS in burns[J]. Burns,2013,39(2):243-248.

(收稿日期:2017-05-18 修回日期:2017-08-07)

(上接第 3382 页)

- [13] 江梅. qPCR 技术检测白血病融合基因及其临床应用[J]. 实验与检验医学,2010,28(5):469-472.
- [14] 黄晓军. 构建移植后复发防治的综合体系[J]. 中华内科杂志,2014,53(2):81-83.
- [15] Neumann F, Herold C, Hildebrandt B, et al. Quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction for diagnosis of BCR-ABL positive leukemias and molecular monitoring following allogeneic stem cell transplantation[J]. Eur J Haematol,2003,70(1):1-10.
- [16] Elmaagacli AH, Beelen DW, Opalka B, et al. The amount of BCR-ABL fusion transcripts detected by the real-time quantitative polymerase chain reaction method in patients with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia correlates with the disease stage[J]. Ann Hematol,2000,79(8):424-431.

(收稿日期:2017-05-12 修回日期:2017-08-01)