

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00250

瘦素对肠缺血再灌注损伤大鼠外周血 TNF- α 和 IL-10 表达及小肠局部病理损伤的影响

王晓辉,王录焕,薛 辉,邓子辉,颜光涛*

解放军总医院基础医学研究所生物化学研究室,北京 100853

[摘要] **目的:**探讨瘦素(leptin)对于大鼠肠缺血再灌注损伤的保护作用及其机制。**方法:**建立大鼠肠缺血再灌注损伤模型,99只Wistar大鼠随机分成11组:假手术组(sham)、肠缺血45 min再灌注15 min组(I45R15)、I45R30、I45R60、I45R180、I45R360、和相应时间点的leptin(0.2 mg/kg)治疗组,每组9只。检测再灌注不同时间点大鼠血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素10(IL-10)水平的动态变化,并观察小肠组织病理学的变化。**结果:**与假手术组相比,肠缺血再灌注组血清中TNF- α 随着时间变化显著升高,IL-10水平也高于假手术组($P<0.05$),病理显示肠道明显损伤;与肠缺血再灌注组相比,Leptin治疗后血清中的TNF- α 水平显著降低,IL-10水平显著升高,小肠组织损伤明显减轻($P<0.05$)。**结论:**Leptin可通过下调血清中TNF- α 、上调IL-10水平减轻肠缺血再灌注损伤对大鼠肠道的局部损伤。

[关键词] 再灌注损伤;瘦素;肠黏膜;细胞因子

[中图分类号] R 392.32 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)03-0250-04

Effect of leptin on serum TNF- α and IL-10 levels and small intestine damage in rats with intestine ischemia/reperfusion injury

WANG Xiao-hui, WANG Lu-huan, XUE Hui, DENG Zi-hui, YAN Guang-tao*

Laboratory of Biochemistry, Basic Medical Institute, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China

[ABSTRACT] **Objective:** To explore the protective effect of leptin against rats intestinal ischemia/reperfusion injury and the related mechanism. **Methods:** Ninety-nine rats were randomly divided into 11 groups ($n=9$), namely the sham-operation group, ischemia/reperfusion groups (45 min ischemia plus 15 reperfusion [I45R15], I45R30, I45R60, I45R180, I45R360) and the 5 corresponding leptin-treated ischemia-reperfusion groups. The serum levels of TNF- α and IL-10 were determined in all groups and the histopathological changes were observed in the small intestine. **Results:** Compared with the sham-operation group, the serum levels of TNF- α and IL-10 were significantly increased in the ischemia/reperfusion groups (both $P<0.05$), with obvious pathological damage observed in the ischemia/reperfusion groups. Leptin treatment significantly decreased TNF- α level, increased IL-10 level, and alleviated the damage of the small intestine (all $P<0.05$) of animals after ischemia/reperfusion injury. **Conclusion:** Leptin can alleviate the intestinal damage in rats after intestinal ischemia/reperfusion through down-regulating TNF- α level and up-regulating IL-10 levels.

[KEY WORDS] reperfusion injury; leptin; intestinal mucosa; cytokine

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(3):250-253]

肠缺血再灌注(intestinal ischemia/reperfusion, I/R)损伤是外科常见的组织器官损伤之一,不仅可以引起肠道局部的损伤,同时也可以造成多器官的损害^[1-4],是目前相关研究的热点。国外研究^[5-7]发现细胞因子(IL-1、IL-6、IL-10、TNF- α 等)

在肠缺血再灌注损伤所致器官功能障碍中发挥重要作用,通过各种途径调节相关因子表达可以发挥器官保护作用。Souza等^[8]研究认为,血清中TNF- α 与IL-10的比值可以作为肠缺血再灌注损伤所致器官功能障碍严重程度和致死率的判断标准。

[收稿日期] 2007-07-24 **[接受日期]** 2007-12-24

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(青年科学基金项目,30600563)。Supported by General Program (Project for Young Scientists Fund, No. 30600563) of National Natural Science Foundation of China.

[作者简介] 王晓辉,硕士,助理研究员。E-mail: xhui_wang@163.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:010-66937072, E-mail: yan301@263.net

瘦素(leptin)是由 *ob* 基因编码的活性蛋白分子,主要由脂肪细胞产生,在调节机体摄食和能量代谢中发挥着重要作用^[9]。我们前期研究^[10-13]发现,肠缺血再灌注损伤后不同时间大鼠外周血 leptin 蛋白及基因表达发生明显变化,其可能是急性重症炎症反应中重要的应答因素,具有抑制急性炎症中缺血再灌注损伤、保护器官作用,但其具体作用机制仍不清楚。

本研究在此基础上,进一步观察腹腔注射 leptin 对肠缺血再灌注大鼠外周血 IL-10、TNF- α 表达的影响,探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理 清洁级雄性 Wistar 大鼠,体质量 200~250 g,购自军事医学科学院实验动物研究所。动物随机分为 11 组:缺血 45 min 再灌注 15 min (I45R15)、30 min (I45R30)、60 min (I45R60)、180 min (I45R180)、360 min 组 (I45R360)、各自对应的 leptin 治疗组 (I45R15+leptin、I45R30+leptin、I45R60+leptin、I45R180+leptin、I45R360+leptin) 以及对照组(假手术组,sham),每组 9 只。各组动物适应性饲养 5 d,术前 12 h 禁食,自由饮水。除假手术组外,其他各组大鼠均以戊巴比妥钠(3%)腹腔注射麻醉,暴露肠系膜上动脉(SMA),夹闭 45 min 后松开形成缺血再灌注,I45R15、I45R30、I45R60、I45R180、I45R360 及对应的 leptin 治疗组分别于松夹后 15、30、60、180、360 min 各时间点心脏取血,处死后取小肠置

于液氮保存备用。Leptin 治疗组于再灌注同时(即夹闭 SMA 后 45 min)予腹腔注射 leptin(0.2 mg/kg, American Peptide 公司)。假手术组仅分离 SMA 但不夹闭,60 min 处死取血及相应组织,测定相应结果,其测得值作为本批大鼠血流阻断前的基础对照值。

1.2 小肠组织病理形态观察 取小肠回盲部 10 cm 以上肠管,经 10% 的中性甲醛固定,石蜡包埋、切片,常规 H-E 染色(苏木精染色 10 min,分化水洗后入伊红复染 15 s),行组织学检查,并按照小肠组织损伤评价标准^[14]进行评分。

1.3 放射免疫分析法测定血清 TNF- α 、IL-10 浓度 血液样品静止 30 min 后离心 10 min,2 000 \times g,收集上层血清,按照 TNF- α 、IL-10 放免试剂盒说明(北京北方生物技术公司)进行操作,自动 γ 计数器(上海核福光电仪器有限公司)测量放射性活度,间接测定大鼠外周血中 TNF- α 、IL-10 最终浓度。

1.4 统计学处理 采用 Stata 软件进行统计分析,数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠小肠组织形态学观察结果 肠缺血再灌注损伤后肉眼见肠壁明显充血,严重部分呈紫红色。H-E 染色后发现,随着缺血再灌注的发生,组织出现明显损伤,肠绒毛破坏、脱落,并伴有固有层弥漫出血,炎症细胞浸润,甚至出现大量出血(图 1)。

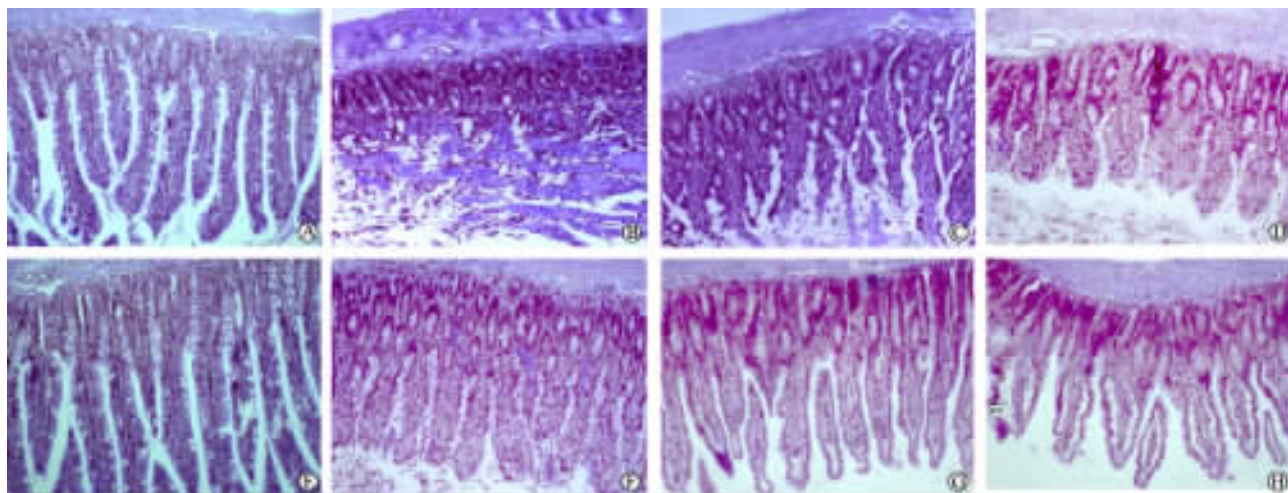


图 1 小肠组织 H-E 染色

Fig 1 H-E staining of the intestinal tissues from different groups

A and E are from the sham-operation group(grade 0); B, C, and D represent the damages of I45R15(grade 5), I45R60(grade 4) and I45R360(grade 3), respectively; F, G, and H represent the damages of leptin-treated groups of I45R15 (grade 5), I45R60(grade 4) and I45R360 (grade 3), respectively. Original magnification: $\times 100$

再灌注后,损伤组与假手术组的肠黏膜病理损伤评分有显著性差异($P < 0.05$);但 leptin 治疗组各时间点小肠损伤评分比损伤未治疗组明显减轻($P < 0.05$)。详见图 2。

2.2 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-10 的检测结果 如表 1 所示,随着再灌注时间延长,II/R 损伤组再灌注后血清中的 TNF- α 水平呈明显上升趋势($P < 0.05$),Leptin 治疗组于再灌注后 60 min 明显回落($P < 0.05$);II/R 损伤组 IL-10 水平呈波动性变化(先高后低),但均比假手术组高($P < 0.05$),Leptin 治疗组 IL-10 水平较损伤组增高,且于 180 min 处出现分泌高峰,与损伤组差异显著($P < 0.05$)。

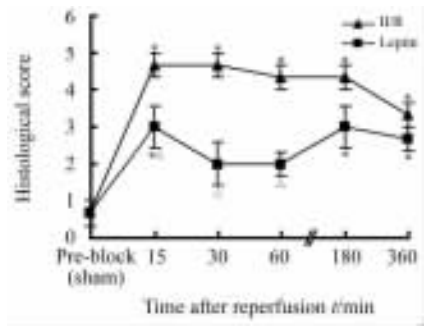


图 2 各组大鼠小肠组织病理损伤评分结果

Fig 2 Histological scores of intestine from II/R group and leptin-treated II/R group

* $P < 0.05$ vs sham-operation group; $\Delta P < 0.05$ vs I45R group at the same reperfusion time; $n=9, \bar{x} \pm s$

表 1 肠缺血再灌注损伤组及 leptin 治疗组大鼠血清 TNF- α 及 IL-10 水平的比较

Tab 1 Comparison of TNF- α and IL-10 levels between II/R groups and leptin-treated II/R groups

($n=9, \bar{x} \pm s$)

Content $\rho_B / (ng \cdot ml^{-1})$	Group	Sham-operation	I45R15	I45R30	I45R60	I45R180	I45R360
TNF- α	II/R	14.7 \pm 1.9	23.1 \pm 2.1*	22.1 \pm 2.5*	26.8 \pm 3*	23.6 \pm 1.7*	21.1 \pm 1.5*
	Leptin-treated	14.7 \pm 1.9	21.0 \pm 2.4*	23.4 \pm 1.4*	19.5 \pm 1.9 Δ	18.4 \pm 2.1 Δ	17.4 \pm 2.4
IL-10	II/R	12.9 \pm 1.0	22.8 \pm 3.1*	18.2 \pm 1.2*	17.8 \pm 2.0*	17.0 \pm 1.9	19.3 \pm 2.3*
	Leptin-treated	12.9 \pm 1.0	22.1 \pm 2.6*	20.5 \pm 2.0*	18.6 \pm 1.6*	24.3 \pm 3.3* Δ	22.5 \pm 3.4*

Values for sham-operation group indicate the basic levels before II/R injury. * $P < 0.05$ vs sham-operation group; $\Delta P < 0.05$ vs II/R injury group at the same time point

3 讨论

机体在遭受到严重的损伤(如缺血再灌注损伤)时,大量促炎细胞因子的释放可导致全身炎症反应综合征(SIRS)及多器官功能障碍综合征(MODS)。TNF- α 在此过程中出现较早,其通过刺激急性期的蛋白分泌,提高上皮细胞通透性,介导中性粒细胞黏附及其他细胞因子释放,所以 TNF- α 是 II/R 损伤中关键介质之一^[15]。在这一病理过程中,机体同时会产生代偿性抗炎反应,及通过生成内源性抗炎介质以对抗促炎介质的释放。IL-10 是一种具有明显抗炎作用的细胞因子,可以减轻系统性炎症反应并减少炎性细胞因子产生。因此,Souza 等^[8]认为,血清中 TNF- α 与 IL-10 的比值可以作为 II/R 损伤所致器官功能障碍严重程度的判断标准。

本实验通过检测再灌注不同时间点各项指标的动态变化,从细胞因子水平探讨了 leptin 的作用效果和方式。结果发现,损伤组缺血再灌注早期(15 min)即可观察到肠黏膜严重损害,3 h 后逐渐改善;外源性 leptin 治疗后小肠黏膜病变较损伤组显著减

轻,且评分稳定在低水平,未见明显的时间变化规律。这说明 leptin 治疗不能完全避免肠道的再灌注损伤,但可以防止再灌注损伤加剧(尤其针对于再灌注早期),可能是通过保护肠道黏膜的完整性,从而减轻坏死物质的产生和吸收,但具体作用机制仍有待进一步研究。结果还发现,II/R 损伤后大鼠血清中促炎因子 TNF- α 含量明显上升,而 leptin 治疗组再灌注 60 min 后血清 TNF- α 含量与 II/R 损伤组相比显著降低,提示 leptin 可明显抑制 TNF- α 的释放。IL-10 作为具有抗炎作用的细胞因子,于再灌注后 60 min 达到最低峰值;而 leptin 治疗组 180 min 达到最高值,两组虽呈现出不同的变化趋势。总体来讲,leptin 治疗后可以明显提高血清中 IL-10 水平。提示 leptin 可能通过降低 II/R 损伤时血清中 TNF- α 与 IL-10 的比值,发挥改善重要器官功能的作用。Hacioglu 等^[16]研究发现 leptin 可以在一定程度上改善 II/R 诱导的氧化损伤,而本研究结果表明 leptin 可以通过调节炎性细胞因子水平抵抗 II/R 损伤,这说明 leptin 可能通过多种途径、在不同水平上对抗 II/R 损伤。

综上所述,治疗性应用 leptin 可能对减轻大鼠 II/R 损伤造成的肠道损伤具有一定的效果,而这种保护作用可能与其能够纠正血清中 TNF- α 与 IL-10 的比值有关,但具体机制仍有待探讨。下一步实验拟从转录因子水平对其作用的分子机制进行探讨,进一步明确 leptin 的作用机制,为此类疾病的临床治疗提供新的线索。

[参考文献]

- [1] Tsuboi H, Naito Y, Katada K, Takagi T, Handa O, Kokura S, et al. Role of the thrombin/protease-activated receptor 1 pathway in intestinal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2007, 292:G678-G683.
- [2] Liu K X, Wu W K, He W, Liu C L. Ginkgo biloba extract (EGb 761) attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: roles of oxidative stress and nitric oxide[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13:299-305.
- [3] Tian X F, Zhang X S, Li Y H, Wang Z Z, Zhang F, Wang L M, et al. Proteasome inhibition attenuates lung injury induced by intestinal ischemia reperfusion in rats[J]. *Life Sci*, 2006, 79:2069-2076.
- [4] Lai I R, Ma M C, Chen C F, Chang K J. The effect of an intestinal ischemia-reperfusion injury on renal nerve activity among rats[J]. *Shock*, 2003, 19:480-485.
- [5] Yamaguchi M, Uchida M. Alpha-lactalbumin suppresses interleukin-6 release after intestinal ischemia/reperfusion *via* nitric oxide in rats[J]. *Inflammopharmacology*, 2007, 15:43-47.
- [6] Cavriani G, Domingos H V, Oliveira-Filho R M, Sudo-Hayashi L S, Vargaftig B B, de-Lima W T. Lymphatic thoracic duct ligation modulates the serum levels of IL-1 β and IL-10 after intestinal ischemia/reperfusion in rats with the involvement of tumor necrosis factor alpha and nitric oxide[J]. *Shock*, 2007, 27:209-213.
- [7] Souza D G, Vieira A T, Pinho V, Sousa L P, Andrade A A, Bonjardim C A, et al. NF-kappaB plays a major role during the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury[J]. *Br J Pharmacol*, 2005, 145:246-254.
- [8] Souza D G, Teixeira M M. The balance between the production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 determines tissue injury and lethality during intestinal ischemia and reperfusion[J]. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2005, 100(Suppl 1):59-66.
- [9] Hong S J, Kwon K W, Kim S G, Ko B M, Ryu C B, Kim Y S, et al. Variation in expression of gastric leptin according to differentiation and growth pattern in gastric adenocarcinoma[J]. *Cytokine*, 2006, 33:66-71.
- [10] Lin J, Yan G T, Hao X H, Zhang K, Wang L H, Xue H. [Primary research of the effect of intestinal ischemia/reperfusion injury on Leptin concentrations][J]. *Zhongguo Weizhongbing Jijiu Yixue*, 2003, 15:722-725.
- [11] Lin J, Yan G T, Wang L H, Hao X H, Zhang K, Xue H. Leptin fluctuates in intestinal ischemia-reperfusion injury as inflammatory cytokine[J]. *Peptides*, 2004, 25:2187-2193.
- [12] Lin J, Yan G T, Hao X H, Wang L H, Zhang K, Xue H. Effect of intestinal ischemia-reperfusion injury on protein levels of leptin and orexin-A in peripheral blood and central secretory tissues[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11:1000-1004.
- [13] Shi Y, Yan G T, Lin J. Intestinal ischemia-reperfusion injury made leptin decreased[J]. *Regul Pept*, 2006, 133(1-3):27-31.
- [14] Chiu C J, McArdle A H, Brown R, Scott H J, Gurd F N. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal[J]. *Arch Surg*, 1970, 101:478-483.
- [15] Payen D, Faivre V, Lukaszewicz A C, Losser M R. Assessment of immunological status in the critically ill[J]. *Minerva Anesthesiol*, 2000, 66:757-763.
- [16] Hacıoglu A, Algin C, Pasaoglu O, Pasaoglu E, Kanbak G. Protective effect of leptin against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine[J]. *BMC Gastroenterol*, 2005, 5:37.

[本文编辑] 尹 茶, 贾泽军

• 书 讯 •

《实验动物学(第三版)》已出版

本书由崔淑芳编著,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-8106-0474-1,310页,16开,定价:40.00元。

全书共11章,约51万字。在第二版的基础上对教材做了较大篇幅的修订,力求做到:①内容更加系统、全面,结构框架更加合理,能适合不同层次和不同专业学生的需要以及广大科技工作者的需求;②既有系统的理论阐述,又有详细的动物实验操作技术;③注重加强与生物医学相关学科的相互交融,尤其是在实验技术章节,力求突出分子水平、细胞水平和整体实验动物水平多层次实验技术的结合;④内容的先进性:对免疫缺陷动物、胚胎工程动物、基因工程动物、实验动物生物信息学等实验动物学科前沿领域的介绍力求做到细致、新颖。读者对象:高等医药院校的本科生,特别是研究生,也可供实验动物研究人员参考。

本书由第二军医大学出版社发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595

<http://www.smmup.com>