

脓毒症大鼠脂联素表达水平变化的实验研究

李莎 鲍红光

【摘要】 目的 探讨脓毒症大鼠脂联素的表达水平变化规律及其与肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的关系。**方法** 采用经尾静脉注射内毒素(LPS)方法制备大鼠脓毒症模型。48只健康Wistar雄性大鼠随机分为正常对照组(C组, $n=24$)和脓毒症组(LPS组, $n=24$)。分别于注射LPS或生理盐水后4h和24h,采用心脏放血法处死各组大鼠。留取附睾周围脂肪组织,用逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)技术检测附睾脂肪组织中脂联素mRNA及TNF- α mRNA的表达变化。用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血浆脂联素及TNF- α 水平。**结果** 脂联素mRNA和TNF- α mRNA在正常对照组大鼠脂肪组织中有轻度表达。注射LPS后4h,血浆TNF- α 水平及TNF- α mRNA表达显著增强($P<0.01$),直到24h时仍维持在较高水平($P<0.05$)。而脂肪组织脂联素mRNA的表达于4h时,与对照组相比无统计学差异;24h时,表达显著降低($P<0.05$)。血浆脂联素水平于注射LPS后4h开始下降($P<0.05$),直至24h时($P<0.05$)。**结论** 脓毒症大鼠血浆脂联素水平和附睾脂肪组织中脂联素的表达显著降低,并与TNF- α 表达水平的升高有关。脂联素参与了失控性炎症反应的发展过程。

【关键词】 脓毒症; 脂联素; 肿瘤坏死因子 α ; 脂肪组织

Changes in expression of adiponectin in septic rats Li Sha, BAO Hong-guang. Department of Anesthesiology, Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

Corresponding author: BAO Hong-guang, Email: hongguang_bao@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate changes in adiponectin expression in septic rats and to observe the relationship between adiponectin and tumor necrosis factor- α (TNF- α). **Methods** Sepsis model of rats was replicated by intravenous administration of LPS into the tail vein. Thirty-six male Wistar rats were randomly divided into two groups, respectively the normal control ($n=24$) group, and the LPS ($n=24$) group. At 4 hours and 24 hours after administration of LPS or NS, rats were sacrificed by heart phlebotomy. Epididymal adipose tissue were sampled. The expression of adiponectin mRNA and TNF- α mRNA in the adipose tissue were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) with GAPDH as an internal standard. The levels of adiponectin and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in plasma were determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Adiponectin mRNA and TNF- α mRNA were slightly expressed in adipose tissue of rats in normal control group. The expression of TNF- α mRNA and levels of TNF- α in plasma were increased until 24 hours after administration of LPS, peaking first at 4 hours. The adiponectin mRNA was decreased at 24 hours. The levels of adiponectin was decreased at 4 hours and last to 24 hours. **Conclusions** These data indicate that there is a marked decline in the adiponectin level both in plasma and epididymal adipose tissue, which corresponds to an increase of the levels of TNF- α . Adiponectin plays a role in the uncontrolled inflammatory reaction.

【Key words】 Sepsis; Adiponectin; Tumor necrosis factor-alpha; Adipose tissue

脓毒症及其所引起的多器官功能障碍综合征(MODS)是严重烧伤、感染、创伤及休克等危重病患者死亡的主要原因之一。据统计,脓毒症的发病率以每年1.5%~8%递增^[1],严重威胁着人类的健康。找寻脓毒症的有效治疗方法一直是医疗界关注的焦点。脂联素(adiponectin)是一种主要从脂肪细胞分泌的具有内源活性的多肽,具有调节脂质代谢、改善胰岛素抵抗、抑制动脉粥样硬化、保护心血管系统及抗炎等多种生物学功能。研究发现,糖尿病、动脉粥样硬化等患者体内均有明显的低脂联素血症,同时还伴有炎症因子表达升高^[2]。脓毒症是大量炎症介质释放导致的组织细胞及器官功能的损伤,其脂联素水平及其与炎症因子过多生成的关系,目前报道甚少。本实验采用经尾静脉注射内毒素(LPS)致大鼠脓毒症模型,观察大鼠生存率并测定大鼠血浆及脂肪组织中脂联素和TNF- α 水平变化,探讨脂联素水平与脓毒症的发生发

展之间的关系。

材料与方法

一、实验材料

健康雄性 Wistar 大鼠 48 只, 体重 200 ~ 300 g (由南京市第一医院动物实验中心提供), 随机分为 2 组: 脓毒血症组 (LPS 组, $n = 24$)、正常对照组 (C 组, $n = 24$)。

二、实验方法

1. 大鼠脓毒血症模型的制备^[3]: LPS 组和 C 组大鼠均给予 2% 七氟醚吸入麻醉。注射定位后, LPS 组大鼠按 7.5 $\mu\text{g/g}$ 的剂量经尾静脉注射 LPS (*Escherichia coli* O111:B4, Sigma-Aldrich)。C 组大鼠则经尾静脉注射等量生理盐水 (NS)。密切观察大鼠的临床症状直至注射后 4 h 和 24 h 时, 处死各组大鼠并留取标本。检测血浆脂联素及 TNF- α 水平的变化; 检测脂肪组织脂联素、TNF- α mRNA 的表达水平。观察期间出现死亡的动物被排除并重新制模补充。另取 20 只相同条件的大鼠随机分为 2 组, 以 LPS 组和 C 组两组同样的模型及处理方式, 计算并比较两组大鼠 24 h 内的生存率, 绘制两组大鼠的生存曲线。

2. 标本处理: 七氟醚吸入麻醉动物, 经心脏抽取全血 5 ml, 1200 r/min 离心 10 min, 收集血浆, 用乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝处理。留取附睾脂肪组织并立即用液氮冰冻, 保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 直至 RNA 被提取。

3. 脂肪组织 TNF- α 、脂联素 mRNA 表达水平测定: 取脂肪组织 80 ~ 100 mg, 制备匀浆后, 用 Trizol (美国 GIBCO 公司提供) 一步法提取总 RNA, 经电泳显示 28 S、18 S、5 S 清晰三条带后, 比色法测定 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 比值 > 1.8 。用 RT-PCR 试剂盒 (Invitrogen 公司, 11904-018 Super Script 1st AtrandSynthesis, 11615-010 Taq DNA Polymerase) 采用两步法进行 RT-PCR, 以 GAPDH 作为内参照, 以扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后照相, 采用 UVP 图像分析处理系统进行分析, mRNA 表达水平以目的基因与内参对照的积分光密度比值表示。大鼠脂联素基因序列 (扩增片段 109 bp): 5'-TCCTGGTCACAATGGGATACC-3' (上游); 5'-ATCTCCTGGGTCAC-CCTTAGG-3' (下游)。大鼠 TNF- α 序列 (扩增片段 415 bp): 5'-GTAGCCACGTCGTAGCAA-3' (上游); 5'-CCCTTCTCCAGCTGGAAGAC-3' (下游)。内参照 GAPDH 基因序列 (扩增片段 149 bp): 5'-CAAGTTC AACG-GCACAGTCAA-3' (上游); 5'-TGGTGAAGACGCCAGTAGACTC-3' (下游)。PCR 反应条件: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5 min 预变性, $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、40 s 变性, $53\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、45 s 退火, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、45 s 延伸, 共 32 个循环, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 min 延伸。RT-PCR 操作严格按照说明书进行, 所有实验用具均严格采用焦磷酸二乙酯 (DEPC) 浸泡灭酶并高温消毒。

4. 血浆脂联素及 TNF- α 水平检测: 采用酶联免疫吸附法 (ELISA, 试剂盒购自美国 Amersham 公司) 检测血浆中脂联素及 TNF- α 水平, 按试剂盒说明书步骤进行操作。

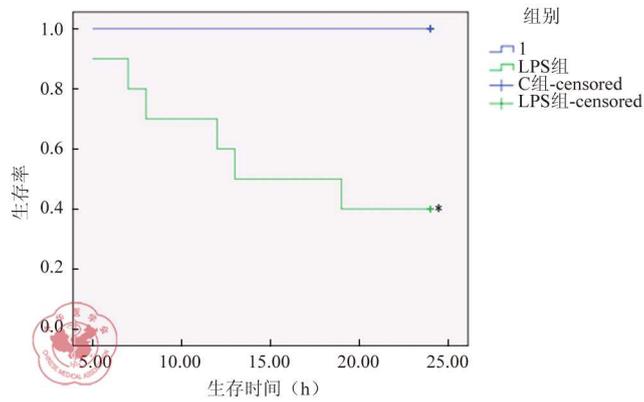
三、统计学分析

使用 SPSS 11.0 统计学软件, 数据均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。所有数据均经正态性检验, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA)。对脂肪组织中脂联素及 TNF- α mRNA 表达水平与血浆中相应指标水平进行相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. LPS 诱导的脓毒症大鼠的临床表现: 大鼠在注射 LPS 后 30 min 就开始出现厌食、竖毛、眼角分泌物增多及保护性反射减弱等中毒症状, 随即出现精神萎靡、血尿、腹泻等脓毒血症休克表现, 严重者死亡。两组大鼠死亡率的比较: 在 24 h 的观察期内, LPS 组大鼠死亡 6 只, 死亡率达 60%。C 组无大鼠死亡现象。两组大鼠的生存曲线见图 1。

2. 大鼠附睾脂肪组织脂联素和 TNF- α mRNA 的表达变化 (表 1): 注射 LPS 或 NS 4 h 后, LPS 组大鼠与 C 组相比, 其 TNF- α 的表达显著增高 ($P < 0.01$), 同时脂联素的表达无显著差异。然而, 注射 LPS 或 NS 24 h 后, LPS 组大鼠与 C 组相比, 其脂联素表达显著降低 ($P < 0.05$), 而 TNF- α 的表达仍增高 ($P < 0.05$)。



与C组相比, * $P < 0.05$

图1 大鼠生存曲线图

表1 两组大鼠不同时间点附睾脂肪组织脂联素和 TNF- α mRNA 的表达水平变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脂联素		TNF- α	
		4 h	24 h	4 h	24 h
C 组	24	0.79 \pm 0.36	0.76 \pm 0.35	0.72 \pm 0.28	0.78 \pm 0.37
LPS 组	24	0.80 \pm 0.43 ^a	0.17 \pm 0.21 ^b	14.97 \pm 1.12 ^c	9.98 \pm 1.58 ^b

注:与 C 组比较:^a $P > 0.05$,^b $P < 0.05$,^c $P < 0.01$

3. 大鼠血浆脂联素和 TNF- α 的水平变化(表2):LPS 组血浆 TNF- α 水平于注射 LPS 后 4 h 显著升高($P < 0.01$),24 h 已明显下降,但仍有统计学意义($P < 0.05$)。而脂联素水平于注射 LPS 后 4 h 开始下降($P < 0.05$),24 h 时降至约为正常对照组的 50% ($P < 0.05$)。

表2 两组大鼠不同时间点血浆脂联素和 TNF- α 水平变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	脂联素		TNF- α	
		4 h	24 h	4 h	24 h
C 组	24	2.30 \pm 0.29	2.25 \pm 0.28	6.19 \pm 0.32	6.16 \pm 0.43
LPS 组	24	1.85 \pm 0.36 ^a	1.19 \pm 0.21 ^a	37.42 \pm 3.07 ^b	10.69 \pm 2.18 ^a

注:与 C 组比较:^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

4. LPS 组脂肪组织中脂联素及 TNF- α mRNA 表达水平与血浆中相应指标水平的相关关系:脂肪组织中脂联素 mRNA 表达水平与血浆中脂联素水平呈高度相关($r = 0.923$),见图2;而脂肪组织中 TNF- α mRNA 表达水平与血浆中其水平也呈高度相关($r = 0.852$),见图3。

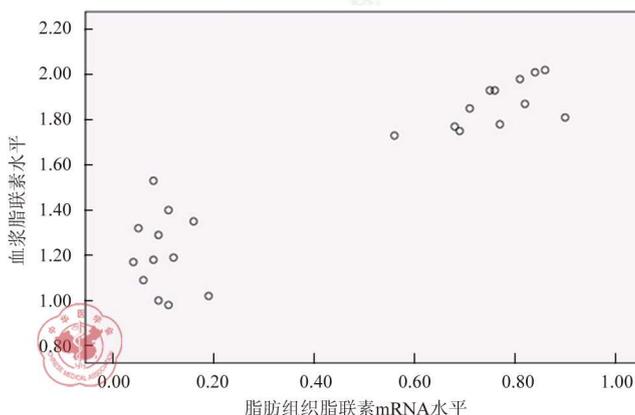


图2 血浆脂联素水平与脂肪组织脂联素mRNA水平的关系 ($r = 0.923$)

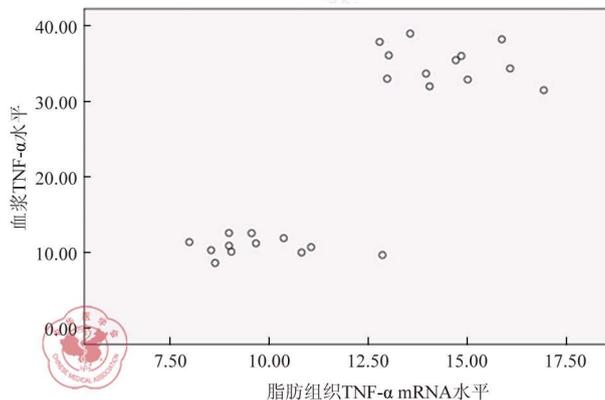


图3 血浆TNF- α 水平与脂肪组织TNF- α mRNA水平的关系 ($r=0.852$)

讨 论

采用静脉注射 LPS 法制备大鼠脓毒血症模型是目前最常用的制备该模型的方法之一。本研究参照文献[3]介绍的方法制备大鼠脓毒血症模型,结果显示,LPS 组大鼠在注射 LPS 后 30 min 就开始出现一系列的脓毒血症休克症状,严重者死亡。结合实验室检测结果,提示本研究大鼠脓毒血症模型制备成功。

脂联素是一种由已知 Acrp30、AdipQ、apM1 和 GBP28 基因决定、脂肪细胞分泌的内源性生物活性蛋白质,由 Scherer 等^[4]于 1995 年在小鼠 3T3-L1 前脂肪细胞系的分化过程中分离克隆发现。研究发现,与健康人群相比,肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化、冠心病患者均出现明显的低脂联素血症^[2],这说明脂联素水平的下降与上述代谢性疾病的发病有一定的相关性。本研究结果证实,在 LPS 诱发的大鼠脓毒血症模型中,血浆脂联素浓度在注射 LPS 后 4 h 就开始出现下降,到 24 h 时降至约为正常对照组的 50%。而脂肪组织中脂联素表达水平于注射 LPS 后 24 h 也显著降低。通过相关分析发现,脂肪组织中脂联素 mRNA 表达水平与血浆脂联素水平具有高度相关性。这说明在脓毒症等急性炎症反应中也会出现低脂联素血症,机体脂联素浓度的高低与脓毒症的发生与发展有关。

近年来研究表明,脂联素也是免疫反应的重要负性调节因子,可抑制 TNF- α 等致炎因子的表达,参与终止炎症反应。Wolf 等^[5]研究发现使用基因重组脂联素可通过提高抗炎因子 IL-10 水平对刀豆球蛋白 A 诱发的小鼠急性肝损伤发挥保护作用。将培养的巨噬细胞用脂联素处理后,可明显抑制由脂多糖诱导的 TNF- α 产生^[6]。Uji 等^[7]证实罗格列酮(rosiglitazone, PPAR- γ 激动剂)能提高脓毒血症大鼠血液中的脂联素浓度,从而提高大鼠生存率。脓毒症是指由感染引起的全身性炎症反应综合征,本质上是由于致炎因子的大量释放,形成炎症介质的瀑布级联反应,导致广泛的内皮受损、血流动力学紊乱,出现微血栓,弥散性血管内凝血(DIC)甚至 MODS。而关于脓毒症模型中脂联素水平及基因表达变化与炎症因子关系的研究甚少。本研究结果表明,在 LPS 诱发的脓毒血症模型中,脂联素浓度及其基因表达变化与 TNF- α 向相反方向变化。这种变化反映了在大鼠脓毒症中两种因子的相互拮抗。TNF- α 是由脂肪组织分泌的致炎因子,脂联素与其相互拮抗说明脂联素具有潜在的抗炎作用。

脂联素抑制炎症反应的机制尚不清楚,可能与以下因素有关:(1)脂联素属于蛋白质一族,拥有胶原结构域,可以同内皮下胶原结合(血管壁损伤后暴露),从而阻断并控制脓毒症中炎症级联反应;(2)脂联素能够直接中和脓毒血症的 LPS 而减轻脓毒血症症状^[8];(3)脂联素通过抑制 cAMP-PKA 介导 NF- κ B 的信号传导,阻止单核巨噬细胞黏附于血管内皮细胞,从而保护血管内皮细胞的完整^[9];(4)脂联素抑制 TNF- α 诱发单核细胞吸附和血管细胞黏附分子(VCAM-1)、细胞间黏附分子(ICAM-1)增殖^[10],另外脂联素还能够直接拮抗 TNF- α ,减少 TNF- α 等促炎介质的生成^[11]。

综上所述,本研究结果提示脂肪组织是一内分泌器官,可在 LPS 诱导下改变前炎性和抗炎性物质基因的表达,参与脓毒症有关的炎症反应。本研究中脂联素浓度和基因表达的变化提示其在脓毒症的发生与发展过程中发挥抗炎和生物调质的作用,其浓度的下降与扩大的炎症反应有关。因此,在脂肪组织或血浆中

增加脂联素浓度或增加脂联素受体的敏感性,可能对治疗脓毒症以及改善脓毒症预后有益,但这尚需要进一步的研究证明。

参 考 文 献

- [1] Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 2003, 348(16):1546-1554.
- [2] Lara-Castro C, Fu Y, Chung BH, et al. Adiponectin and the metabolic syndrome; mechanisms mediating risk for metabolic and cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol*, 2007, 18(3):263-270.
- [3] Hagiwara S, Iwasaka H, Hidaka S, et al. Antagonist of the Type-1 ANG II receptor prevents against LPS-induced septic shock in rats. *Intensive Care Med*, 2009, 35(8):1471-1478.
- [4] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 1995, 270(45):26746-26749.
- [5] Wolf AM, Wolf D, Avila MA, et al. Up-regulation of the anti-inflammatory adipokine adiponectin in acute liver failure in mice. *J Hepatol*, 2006, 44(3):537-543.
- [6] Yokota T, Oritani K, Takahashi I, et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defence collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. *Blood*, 2000, 96(5):1723-1732.
- [7] Uji Y, Yamamoto H, Tsuchihashi H, et al. Adiponectin deficiency is associated with severe polymicrobial sepsis, high inflammatory cytokine levels, and high mortality. *Surgery*, 2009, 145(5):550-557.
- [8] Tsuchihashi H, Yamamoto H, Maeda K, et al. Circulating concentrations of adiponectin, an endogenous lipopolysaccharide neutralizing protein, decrease in rats with polymicrobial sepsis. *J Surg Res*, 2006, 134(2):348-353.
- [9] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Adiponectin, an adipocyte-derived plasma protein, inhibits endothelial NF-kappaB signaling through a camp-dependent pathway. *Circulation*, 2000, 102(11):1296-1301.
- [10] Ouchi N, Kihara S, Arita Y, et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules; adipocyte-derived plasma protein adiponectin. *Circulation*, 1999, 100(25):2473-2476.
- [11] Matsuzawa Y. Adipocytokines and metabolic syndrome. *Semin Vasc Med*, 2005, 5(1):34-39.

(收稿日期:2010-06-30)

(本文编辑:戚红丹)

李莎,鲍红光. 脓毒症大鼠脂联素表达水平变化的实验研究[J/CD]. 中华临床医师杂志:电子版, 2011, 5(1):125-129.