

基础研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.002448

SAM对大鼠自身免疫性肺气肿氧化应激的干预

张 野,张 程,李 夏,李本雪,李佳艺,张湘燕,林洁如

(贵州省人民医院呼吸与危重症医学科、国家卫生健康委员会肺脏免疫性疾病重点实验室,贵阳 550002)

【摘要】目的:探讨 S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl-L-methionine, SAM)对大鼠自身免疫性肺气肿氧化应激的干预作用。**方法:**将 30 只 10 周龄雄性清洁级 SD 大鼠随机分为 3 组:健康对照组($n=10$)、肺气肿组($n=10$)、SAM 组($n=10$)。参照文献将原代培养人脐静脉内皮细胞及完全弗氏佐剂注入肺气肿组及 SAM 组大鼠腹腔,健康对照组只给予完全弗氏佐剂注射。SAM 组大鼠还腹腔注射 SAM 15 mg/(kg·d)。21 d 后,3 组大鼠均取右肺组织切片行 HE 染色观察病理学改变,并定量测定肺平均内衬间隔(mean linear intercept, MLI)、平均肺泡数(mean alveolar number, MAN)。以分光光度剂分别检测血清中的丙二醛(malondialdehyde content, MDA)浓度,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活力及谷胱甘肽(glutathione, GSH)浓度。以 ELISA 法检测血清中抗内皮细胞抗体(anti-endothelial cell antibody, AECA)浓度。**结果:**肺气肿组 MLI 较健康对照组增加,其 MAN 较佐剂组减少,而 SAM 组 MLI、MAN 均介于 2 组之间,差异具有统计学意义(均 $P=0.000$)。肺气肿组 GSH 浓度、GSH-Px 活力、SOD 活力较健康对照组均降低(均 $P=0.000$),SAM 组上述指标均介于 2 组之间($P=0.000$)。肺气肿组 MDA 浓度较健康对照组升高($P=0.000$),SAM 组 MDA 浓度介于 2 组之间($P=0.000$)。**结论:**SAM 可能通过提高血清中 GSH 含量及 GSH-Px、SOD 活力,降低 MDA 浓度水平抑制大鼠自身免疫性肺气肿的形成。

【关键词】氧化应激;自身免疫性肺气肿;S-腺苷甲硫氨酸;抗内皮细胞抗体;大鼠

【中图分类号】R563.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2019-06-01

Intervention of S-adenosyl-L-methionine on oxidative stress in rats with autoimmune emphysema

Zhang Ye, Zhang Cheng, Li Xia, Li Benxue, Li Jiayi, Zhang Xiangyan, Lin Jieru

(Department of Respiratory and Critical Medicine, Guizhou Provincial People's Hospital,

NHC Key Laboratory of Pulmonary Immunological Diseases)

【Abstract】Objective: To study the intervention effect of S-adenosyl-L-methionine (SAM) on oxidative stress in rats with autoimmune emphysema. **Methods:** Thirty SD male rats with age of ten weeks were randomly divided into three groups; the normal control group ($n=10$), the emphysema group ($n=10$) and the SAM group ($n=10$). Rats in the emphysema group and the SAM group were treated with intraperitoneal injection of human umbilical vein endothelial cells plus complete Freund's adjuvant to establish autoimmune emphysema models, while in the normal control group were treated with intraperitoneal injection of the same dosage complete Freund's adjuvant. In addition, rats in the SAM group were also treated with intraperitoneal injection of SAM of 15 mg/(kg·d). After 21 days, tissue sections of right lung were stained by hematoxylin eosin (HE), pathological changes were observed, and mean linear intercept (MLI) and mean alveolar number (MAN) were measured. At the same time, malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), activities of glutathione peroxidase (GSH-Px), and the glutathione (GSH) in serum were detected by the spectrophotometry. Levels of anti-endothelial cell antibody (AECA) in serum were detected by using ELISA. **Results:** MLI in the emphysema group was higher than

作者介绍:张 野, Email: 562463149@qq.com,
研究方向:慢阻肺的临床与基础研究。

通信作者:张 程, Email: 315861985@qq.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81560012);贵州省科技计划资助项目(编号:黔科合[2016]支撑 2907、黔科合基础[2017]1100);筑科合同([20151001]社 78 号、[20161001]09 号)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20200420.1703.002.html>
(2020-04-21)

that in the normal control group, MAN in the emphysema group was lower than that in the normal control group, while MLI and MAN in the SAM group were both in the middle when compared with those two groups, with statistically significant differences ($P=0.000$; $P=0.000$). GSH concentration, SOD activity, and GSH-Px activity in the emphysema group were decreased than those in the normal control group ($P=0.000$; $P=0.000$; $P=0.000$), while in the the SAM group were in the middle when compared

with those two groups ($P=0.000$). MDA concentration in the emphysema group was higher than that in the normal control group, while in the SAM group were in the middle when compared with those two groups ($P=0.000$). **Conclusion:** SAM may inhibit the formation of autoimmune emphysema in rats by increasing the production of GSH concentration, SOD activity, and GSH-Px activity, and decreasing the level of MDA.

[Key words] oxidative stress; autoimmune emphysema; S-adenosyl-L-methionine; anti-endothelial cell antibody; rat

慢性阻塞性肺疾病 (chronic obstructive pulmonary disease, COPD) 简称慢阻肺, 是临床上常见的一种慢性气道疾病, 主要包括慢性支气管炎和肺气肿 2 种病理类型。其发病率高, 病死率高, 严重影响广大患者的身体健康。

近年来, 越来越多的研究提示自身免疫反应、氧化应激可参与肺气肿甚至慢阻肺形成^[1-4]。其中, 前者被认为是推动该病持续进展的重要机制^[5], 因此引起人们高度关注。氧化应激是否参与单纯自身免疫性肺气肿的形成尚无文献报道, 值得进一步探讨。另有研究表明, S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 具有抗氧化、抗自身免疫等作用^[6-8]。该药是否可通过上述机制抑制自身免疫性肺气肿形成也值得研究。本实验通过复制自身免疫性肺气肿模型, 检测血清中丙二醛 (malondialdehyde content, MDA)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 浓度和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 活力, 抗内皮细胞抗体 (anti-endothelial cell antibody, AECA) 含量及肺组织病理形态学改变等, 评估 SAM 的干预效果, 为临床上探讨慢阻肺的免疫学发病机制及寻求新的治疗方法提供线索。

1 材料与方法

1.1 实验材料

GSH 测试盒、SOD 测试盒、MDA 测试盒、GSH-Px 测试盒购于南京建成生物工程研究所。AECA 试剂盒购于默沙克有限公司。SAM 为注射用丁二磺腺苷蛋氨酸 (意大利 AB-BOTTIS.R.L)。脐带来源于贵州省人民医院足月妊娠且经阴道分娩的健康产妇。

1.2 人脐静脉内皮细胞原代培养及鉴定

参照路苹^[9]介绍的方法完成。

1.3 实验动物及相关处理

健康清洁级雄性 SD 大鼠 (由重庆市腾鑫科技公司提

供) 30 只, 雄性, 10 周龄, 体质量 180~200 g。实验室按正常昼夜节律, 室温约 25 ℃, 给予腾鑫科技公司提供的无菌全营养饲料喂养, 饮水为饮用水。大鼠随机分为 3 组: 健康对照组、肺气肿组、SAM 组, 每组各 10 只。参考国外文献及课题组前期报导建立肺气肿模型^[2,9]。各组处理同李夏^[10]报道, SAM 干预剂量为 15 mg/(kg·d)。

1.4 血清制备

将大鼠称重后予以 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g) 腹腔内注射麻醉。待麻醉起效后打开腹腔, 找到腹主动脉, 于腹主动脉处采血离心分装, -80 ℃ 冻存。

1.5 血清 MDA 浓度、SOD 活力、GSH-Px 活力及 GSH 浓度、AECA 含量测定

参照试剂盒说明书进行检测。MDA、GSH 浓度及 SOD、GSH-Px 活力检测均按说明书提前配置液体及加样后, 予分光光度计读数, 读数后按公式进行计算。AECA 含量测定按试剂说明书及 ELISA 方法进行。

1.6 制备肺组织病理切片及分析

将组织固定液注入右肺, 并取下右肺放入组织固定液大于 24 h。取右肺经漂洗脱水等处理后石蜡包埋、切片后行 HE 染色。在光镜下计数。参照相关文献^[11], 计算肺平均内衬间隔 (mean linear intercept, MLI)、平均肺泡数 (mean alveolar number, MAN)。病理组织切片均采用双盲法读片。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 22.0 对所有数据进行统计分析。数据结果经 K-S 检验符合正态分布, 3 组间差异采用单因方差分析, 组间比较用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 病理学变化

健康对照组气管壁结构清楚, 肺泡间隔完整, 肺组织结构正常。肺气肿组肺组织切片可见局部区域肺泡扩张, 部分肺泡间隔变窄, 肺泡间隔断裂导致相邻肺泡融合成较大的囊腔, 符合肺气肿镜下改变。SAM 组切片肺泡扩张程度介于肺气肿组及健康组之间 (图 1、图 2、图 3)。3 组 MLI 比较: 肺气肿组较健康对照组增加, SAM 组介于两者之间 ($P=0.000$); 3 组 SAM 比较: 肺气肿组较健康对照组减少, SAM 组介于两者之间 ($P=0.000$) (表 1)。

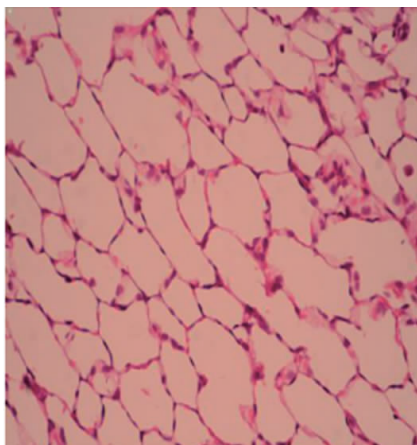


图1 健康对照组 (HE, 400×)

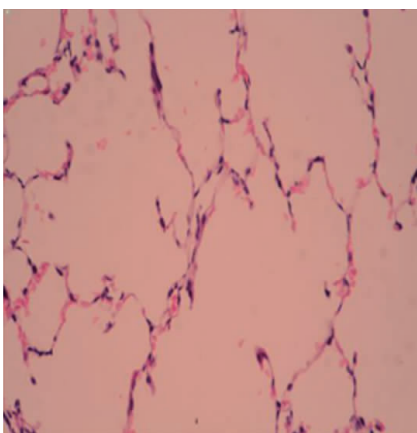


图2 肺气肿组 (HE, 400×)

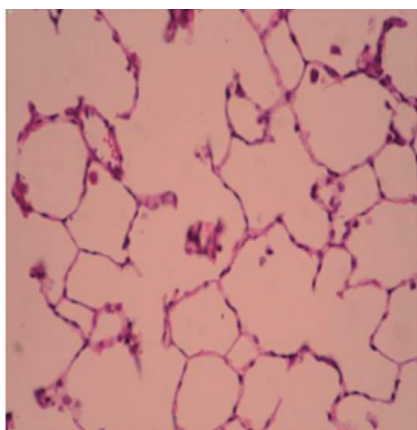


图3 SAM组 (HE, 400×)

表1 3组大鼠 MLI 及 MAN 比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	MLI/ $10^{-6} \text{ m} \cdot \text{个}^{-1}$	MAN/ $10^6 \text{ 个} \cdot \text{m}^{-2}$
健康对照组($n=10$)	91.120 ± 4.643	231.770 ± 17.556
肺气肿组($n=10$)	266.730 ± 27.197^{ab}	74.430 ± 11.852^{ab}
SAM 干预组($n=10$)	174.060 ± 12.966^a	149.110 ± 9.912^a
F 值	249.129	339.795
P 值	0.000	0.000

注:a,与健康对照组比较, $P=0.000$;b:与干预组比较, $P=0.000$

2.2 3组氧化应激相关指标及 AECA 比较

肺气肿组 GSH 浓度、GSH-Px 活力、SOD 活力较健康对照组均降低(均 $P=0.000$),SAM 组上述指标均介于 2 组之间(均 $P=0.000$);肺气肿组 MDA 浓度较健康对照组升高($P=0.000$),SAM 组 MDA 介于 2 组之间($P=0.000$)。肺气肿组 AECA 较健康对照组均升高(均 $P=0.000$),SAM 组上述指标均介于 2 组之间(均 $P=0.000$)(表 2)。

3 讨论

慢阻肺是一种对人类健康有严重危害的常见病,不但病死率高,还对社会经济带来沉重负担^[12];而家庭经济状况又与慢阻肺的患病风险增加有关^[13],形成一个恶性循环,因此引起人们的高度关注。但其发病机制不是十分明确,治疗效果不尽如人意,亟待进一步探讨。

氧化应激是目前公认的慢阻肺三大发病机制之一,其对机体的损害和机体氧化系统及抗氧化系统比例失衡相关:一旦氧化产物(如 MDA 等)作用超过抗氧化系统(GSH、GSH-Px、SOD)作用,就可能促使体内产生过多的自由基,损伤正常组织,从而诱发慢阻肺形成^[14]。越来越多的研究证明,慢阻肺的进展还与自身免疫有关^[15,16]。但目前尚无研究表明其氧化应激与自身免疫有关,故氧化应激在自身免疫性肺气肿中的作用值得研究。

本研究参照 Taraseviciene-Stewart 实验方法,向

表2 3组大鼠血清中 GSH、MDA 浓度、SOD、GSH-Px 活力及 AECA 浓度比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	GSH/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MDA/ $\text{nmol} \cdot \text{mL}^{-1}$	GSH-Px活力	SOD活力	AECA/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
健康对照组($n=10$)	12.97 ± 2.78	201.57 ± 15.25	263.03 ± 13.89	538.20 ± 18.23	0.50 ± 0.15
肺气肿组($n=10$)	2.59 ± 0.62^{ab}	263.22 ± 13.28^{ab}	198.63 ± 16.26^{ab}	394.48 ± 21.11^{ab}	1.18 ± 0.15^{ab}
SAM 组($n=10$)	6.72 ± 1.82^a	232.44 ± 6.46^a	233.22 ± 8.43^a	462.12 ± 11.86^a	0.84 ± 0.08^a
F 值	71.763	63.229	57.608	168.882	68.374
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注:a,与健康对照组比较, $P=0.000$;b:与干预组比较, $P=0.000$

健康大鼠腹腔注射一定量的人脐静脉内皮细胞,21 d 后取大鼠右肺做病理切片及 HE 染色^[2]。通过对肺气肿组及健康对照组病理观察可见:肺气肿组肺组织呈现肺气肿样改变,其 MLI、血清 AECA 较健康组增加,而 MAN 较健康对照组降低,和上述文献及本课题组前期报道相似^[2,4,9],说明本次实验成功建立了自身免疫性肺气肿模型。

上述方法可以建模的可能机制如下:大鼠被注入异种(人)脐静脉内皮细胞以后,诱发机体产生 AECA;后者引起肺血管内皮细胞凋亡,从而导致肺气肿形成^[2]。

本实验发现,肺气肿组血清中的 MDA 浓度高于健康对照组,而 GSH 浓度、SOD 及 GSH-Px 活力较正常对照组降低;由此可认为血清中 GSH 浓度、SOD 和 GSH-Px 活力降低及 MDA 升高均参与大鼠自身免疫性肺气肿形成,从而提示氧化应激对自身免疫性肺气肿的形成有重要作用。SAM 广泛存在于自然界生物体中,对于细胞的功能和细胞存活有着重要意义。目前认为其主要作用为抗氧化及抑制自身免疫反应^[6-8],故本实验选用 SAM 干预自身免疫肺气肿大鼠。结果表明,SAM 组血清中 GSH 含量、GSH-Px 和 SOD 活力、AECA 含量较肺气肿组增高,而 MDA 浓度相应降低,提示 SAM 可能通过抗氧化应激及免疫机制抑制自身免疫性肺气肿形成。

目前长期治疗慢阻肺的药物副作用相对较大,而 SAM 副作用小、耐受好且价格低廉,可望在临床上大力推广应用。由于本实验研究对象为小鼠,至于 SAM 对慢阻肺的治疗效果,还需临床试验进一步证实。

参 考 文 献

- [1] Barnes PJ. Oxidative stress in COPD[M]. New York:Springer, 2014:115-129.
- [2] Taraseviciene-Stewart L, Scerbavicius R, Choe KH, et al. An animal model of autoimmune emphysema[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 171(7):734-742.
- [3] Motz GT, Eppert BL, Wesselkamper SC, et al. Chronic cigarette smoke exposure generates pathogenic T cells capable of driving COPD-like disease in Rag2^{-/-} mice[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(11):1223-1233.
- [4] Zhang C, Yan MY, Lu P, et al. Hypomethylation of perforin regulatory element in CD4⁺ cells from rat spleens contributes to the development of autoimmune emphysema[J]. Respirology, 2014, 19(3):376-381.
- [5] Taraseviciene-Stewart L, Douglas IS, Nana-Sinkam PS, et al. Is alveolar destruction and emphysema in chronic obstructive pulmonary disease an immune disease[J]. Proc Am Thorac Soc, 2006, 3(8):687-690.
- [6] Purohit V, Abdelmalek MF, Barve S, et al. Role of SAM, folate and betadine in treatment of alcoholic liver disease: summary of a symposium[J]. Am J Clin Nutr, 2007, 86(1):14-24.
- [7] Ara AI, Xia M, Ramani K, et al. S-adenosylmethionine inhibits lipopolysaccharide-induced gene expression via modulation of histone methylation[J]. Hepatology, 2008, 47(5):1655-1666.
- [8] Czaja AJ. Challenges in the diagnosis and management of autoimmune hepatitis[J]. Can J Gastroenterol, 2013, 27(9):531-539.
- [9] 路 苹. 穿孔素基因在自身免疫性肺气肿大鼠脾脏 CD4⁺T 淋巴细胞中的表达[D]. 遵义:遵义医学院, 2012.
- [10] 李 夏. BALF 中常见炎症因子、AECA 在大鼠自身免疫肺气肿发病中的作用及 SAM 的干预[D]. 遵义:遵义医学院, 2018.
- [11] 张金梅, 孙丽华, 谷 伟, 等. 噻托溴铵对慢性阻塞性肺疾病大鼠血清、肺泡灌洗液及肺组织中 IL-8、TNF- α 、PLA2 的影响[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2014, 13(5):469-473.
- [12] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)(一)[J]. 全科医学临床与教育, 2013, 11(5):484-491.
- [13] 陈亚红. 2019 年 GOLD 慢性阻塞性肺疾病诊断、治疗及预防全球策略解读[J]. 中国医学前沿杂志, 2019, 11(1):1-14.
- [14] Can U, Yerlikaya FH, Yosunkaya S. Role of oxidative stress and serum lipid levels in stable chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Chin Med Assoc, 2015, 78(12):702-708.
- [15] Sullivan AK, Simonian PL, Falta MT, et al. Oligoclonal CD4⁺ T cells in the lungs of patients with severe emphysema[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(5):590-596.

(责任编辑:冉明会)