

文章编号:1673-1689(2010)01-0040-04

褪黑素对脂多糖刺激小鼠体内炎症反应

代国杰, 朱建津*, 高琳琳, 单立娟

(江南大学 食品学院,江苏 无锡 214122)

摘 要: 研究脂多糖(LPS)刺激时,褪黑素对小鼠炎症反应的影响。用脂多糖建立炎症反应模型,检测肝脏中白介素-1(IL-1)、白介素-10(IL-10)水平,血清中一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)以及小肠髓过氧化物酶(MPO)的活性变化。在LPS刺激后4h时,灌胃褪黑素的小鼠IL-1和小肠MPO明显低于灌胃生理盐水组和正常组,而IL-10高于灌胃生理盐水组和正常组,刺激后16h时,IL-1、IL-10和MPO均较刺激后4h有所降低。褪黑素对LPS所诱导的炎症反应有明显的抑制作用,有助于维持机体炎症/抗炎平衡,保护机体免受炎症损伤。

关键词: 褪黑素;LPS;IL-1;IL-10;MPO

中图分类号: Q 463; R 363.2

文献标识码: A

Effect of Melatonin on Inflammation and Anti-Inflammatory Balance of Mice

DAI Guo-jie, ZHU Jian-jin*, GAO Lin-lin, SHAN Li-juan

(School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, the physiological parameters of melatonin live, including inflammatory cytokine IL-1, IL-10 of spleen, intestinal myeloperoxidase (MPO) were determined after LPS treat. It was found that content of IL-1 and MPO activity decreased but IL-10 increased after 4 h stimulation by LPS. For the case of 16 h, the values of IL-1, IL-10 and MPO activity were lower than that of 4 h. The results indicated melatonin can depress inflammation induced by LPS, maintain inflammatory and anti-inflammatory balance and protect animals from injury.

Key words: melatonin, lipopolysaccharide, interleukin 1, interleukin 10, myeloperoxidase (MPO)

褪黑素(Melatonin, MT)是主要由哺乳动物和人类的松果体在夜间分泌的一种吲哚胺类激素,化学名称为N-乙酰基-5-甲氧基色胺^[1]。1958年Lerner首先从牛的松果体中分离得到该物质,经提纯后可以使两栖类动物的皮肤变白,因此命名为褪黑素。它有着调节昼夜节律、睡眠、内分泌等多种重要生理功能的作用。人们在发现其强大的抗氧

化作用后,逐渐发现褪黑素尚具有显著抗炎能力。Martins等^[2]证实褪黑素具有明显的抑制炎症细胞向肺部迁移浸润和减少肺泡灌洗液中炎症细胞数量等抗炎作用。Carrilb等^[3]报道,在感染性休克大鼠模型中,通过腹腔注射MT可以提高抗炎因子IL-10的释放,降低TNF- α ,IL-12浓度,增加其生存率。近来发现MT尚具有抑制炎症因子释放的抗

收稿日期:2009-05-25

基金项目:国家自然科学基金项目(30671525)。

*通讯作者:朱建津(1966-),男,浙江丽水人,工学博士,副教授。主要从分子营养学研究。Email:zhujianjin179@sina.com

炎作用^[4]。本研究以脂多糖构建炎症模型,观察褪黑素对炎症因子的影响,以及对一氧化氮和一氧化氮合酶的调节作用,来探讨其抗炎机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

清洁级三周龄雄性昆明小鼠:体重(18~20) g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,许可证号:SOXK(沪)2007-0005;脂多糖:西安沃尔森生物技术有限公司产品;褪黑素:武汉远城科技发展有限公司,纯度 99%;MPFB 型多参数化学发光检测仪:西安瑞迈分析仪器有限公司产品;MuLtiskan MK3 酶标仪:美国 Thermo 公司产品;UV1100 型紫外可见分光光度计:北京瑞利科学仪器有限公司产品。

1.2 实验动物与设计

采用 3 周龄昆明种断奶小鼠 70 只,按体重随机平均分成 4 组:对照组、生理盐水组(简称 S 组,又分成 LPS 4 h 组和 LPS 16 h 组)、低褪黑素组(简称 LMT 组,又分为 LPS 4h 组和 LPS 16 h 组)、高褪黑素组(简称 HMT 组,又分为 LPS 4 h 组和 LPS 16 h 组),生理盐水组每天灌胃生理盐水 0.2 mL;低褪黑素组每天灌胃 1 mg/kg 体重的褪黑素 0.2 mL;高褪黑素组每天灌胃 2 mg/kg 体重的褪黑素 0.2 mL。灌胃 3 周后,S 组、LMT 组、HMT 组灌胃 LPS,对照组灌胃同剂量的无菌生理盐水,灌胃后 4、16 h,取血液、肝脏、脾、小肠组织样,液氮保存,待测。

1.3 指标检测

采血,离心取上清;小肠、肝脏按重量体积比用冷的生理盐水制成组织匀浆(10%),待测;肝脏 IL-1,IL-10,小肠 MPO 用南京建成试剂盒测定;一氧化氮(NO)的测定用硝酸还原酶法测定;一氧化氮合酶(NOS)的测定用化学比色法测定;蛋白含量用考马斯亮蓝法测定。

1.4 数据分析

实验结果采用 SPSS 统计软件进行方差分析的多重比较。

2 结果与分析

2.1 褪黑素对 LPS 刺激小鼠肝脏 IL-1 和 IL-10 的影响

IL-1 是前炎症细胞因子,为炎症反应启动物质,它作用于多种细胞,作为诱导细胞反应中的最初物质,在细胞和亚细胞水平激发一系列级联反应或“瀑布反应”,诱导 IL-6 等多种炎症因子的产生及

发挥作用。IL-10 作为抗炎介质对炎症免疫应答有抑制作用,有助于全身炎症反应的控制。它通过 T 辅助细胞下调宿主的反应,抑制促炎细胞因子 TNF- α 、IL-6 等的过度表达,并且能控制由促炎因子引发的过度的炎症反应所造成的对机体的损害^[5],并且对抗炎症物质如 IL-1 具有正向调节作用。

表 1 褪黑素对小鼠肝脏 IL-1 和 IL-10 的影响($\bar{x} \pm SD$)

Tab.1 Effect of Melatonin on serum NO under LPS stimulation($\bar{x} \pm SD$)

组别	IL-1 (pg/ mL)	IL-10 (pg/ mL)
Control	46.19 $\pm$ 7.18 ^a	56.68 $\pm$ 7.91 ^a
S(4 h)	68.34 $\pm$ 9.16 ^c	68.02 $\pm$ 9.54 ^{bc}
S(16 h)	57.02 $\pm$ 7.26 ^{ab}	62.83 $\pm$ 6.10 ^{ab}
LMT(4 h)	59.59 $\pm$ 5.71 ^{bc}	71.74 $\pm$ 7.65 ^{bc}
LMT(16 h)	52.79 $\pm$ 3.93 ^{ab}	66.47 $\pm$ 8.79 ^{bc}
HMT(4 h)	54.72 $\pm$ 6.46 ^{ab}	75.16 $\pm$ 7.71 ^c
HMT(16 h)	49.35 $\pm$ 7.88 ^{ab}	70.18 $\pm$ 7.63 ^{bc}

注:同一列数据上标,不同字母表示差异显著($P < 0.05$),相同字母表示差异性不显著($P > 0.05$),以下各表同($n = 8$)。

表 1 显示,小鼠在 LPS 刺激后 4 h 时,炎症细胞因子 IL-1 和抗炎性细胞因子 IL-10 的分泌显著增加($P < 0.01$);而灌胃褪黑素组的小鼠 IL-1($P < 0.05$)的分泌受到明显抑制,IL-10($P > 0.05$)的分泌增加。LPS 刺激后 16 h 时,IL-1 和 IL-10 的分泌相对于 4 h 时有所降低($P > 0.05$),灌胃高褪黑素组的要比低褪黑素组的效果好。以上结果表明,在 LPS 刺激后的第 4、16 h,褪黑素均可使炎症细胞因子 IL-1 的分泌降低,抗炎性细胞因子 IL-10 的分泌增加,在刺激后 4 h 时表现更为明显。本实验结果显示,MT 可以显著抑制炎症细胞因子 IL-1 的分泌,促进抗炎性细胞因子 IL-10 的分泌,这可能是由于 MT 从抑制 NF- κ B 激活水平而下调炎症细胞因子的表达。

2.2 褪黑素对 LPS 刺激小鼠血清中 NO 含量和 NOS 活性的影响

NO 是一种活性氮自由基,参与机体多种生理和病理过程,起着生理和毒理的双重作用,少量 NO 发挥调节心血管、神经传导及提高免疫的作用;大量的 NO 则会导致 DNA 损伤、抑制线粒体呼吸,并可与超氧阴离子作用,造成神经毒性、自身免疫性疾病等^[6]。NOS 是产生自由基的酶之一,可促进 NO 的合成,NO 与过氧化硝酸盐结合产生自由基。目前认为,褪黑素影响 NO 的机制之一是抑制细胞膜上电压依赖性 Ca^{2+} 通道,使细胞内 Ca^{2+} 浓度减少,从而减少 Ca^{2+} / CaM 复合物生成,抑制 NOS,进而降低细胞内 NO 的合成^[7]。实验结果见图 1 和表 2。

图 1 显示, LPS 刺激 4 h,灌胃生理盐水的小鼠血清中 NO 含量 ($P < 0.05$) 显著升高,而灌胃低褪黑素和高褪黑素的小鼠血清中 NO 含量 ($P < 0.05$) 显著降低,并且后者将低得多。 ($P < 0.05$); 16 h 时,血清中 NO 含量相对第 4 h 时有所下降 ($P > 0.05$),灌胃褪黑素组的小鼠血清中 NO 含量均低于同时灌胃生理盐水小鼠血液中的含量,并且灌胃高剂量褪黑素组小鼠血液中 NO 含量 ($P < 0.05$) 基本上能达到正常组小鼠水平。

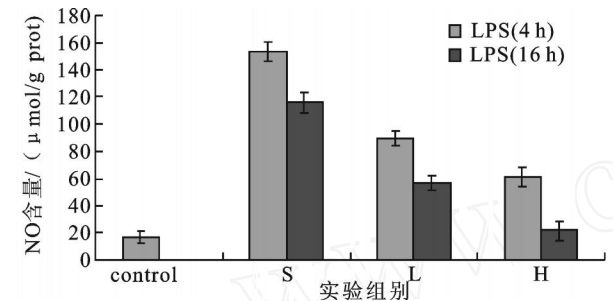


图 1 褪黑素对 LPS 刺激小鼠血清中 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm SD$)

Fig.1 Effect of Melatonin on NO of serum under LPS stimulation($\bar{x} \pm SD$)

表 2 褪黑素对 LPS 刺激小鼠血清中 NOS 活性的影响($\bar{x} \pm SD$)

Tab.2 Effect of Melatonin on serum NOS activity under LPS stimulation($\bar{x} \pm SD$)

组别	NOS/ (U/ mgprot)
control	27.93 ±0.38 ^a
S(4 h)	38.27 ±0.59 ^c
S(16 h)	35.62 ±1.46 ^{bc}
LMT(4 h)	35.77 ±0.33 ^{bc}
LMT(16 h)	31.18 ±0.41 ^{ab}
HMT(4 h)	30.97 ±0.19 ^{ab}
HMT(16 h)	28.09 ±0.19 ^a

表 2 显示,小鼠在 LPS 刺激 4 h 时,灌胃生理盐水的小鼠血清中 NOS 活性显著升高 ($P < 0.05$),而灌胃褪黑素组的小鼠血清中 NOS 活性有所降低(低褪黑素组 $P > 0.05$,高褪黑素组 $P < 0.05$);LPS 刺激 16 h 时,NOS 活性相对于 4 h 均有所降低,高褪黑素组 ($P < 0.05$) 仍低于低褪黑素组 ($P > 0.05$)。

2.3 褪黑素对 LPS 刺激小鼠小肠 MPO 的影响

中性粒细胞是炎性反应可溶性介质的来源,在炎症的发生过程中,一般都伴随着中性粒细胞的浸润。MPO 是中性粒细胞嗜天青颗粒产生的一种重要的过氧化物酶,其含量的增高可以反映中性粒细胞在某一组织中的增高,间接反映炎症在组织中的存在。

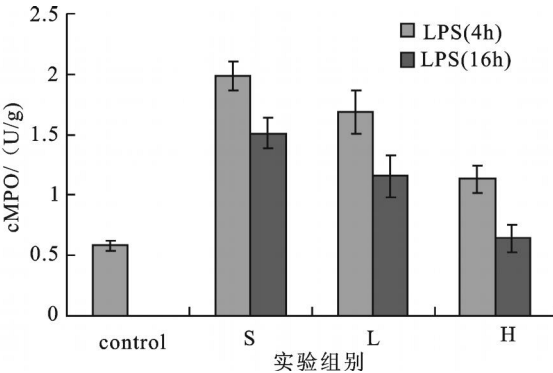


图 2 褪黑素对 LPS 刺激小鼠小肠 MPO 含量的影响 ($\bar{x} \pm SD$)

Fig.2 Effect of Melatonin on duodenum MPO under LPS stimulation($\bar{x} \pm SD$)

图 2 显示,小鼠在受到 LPS 刺激第 4 h 时,小肠 MPO 活性显著升高 ($P < 0.05$),而灌胃褪黑素可以显著抑制小肠 MPO 活性升高 ($P < 0.05$)。第 16 h 时,MPO 活性相对于 4 h 时显著降低 ($P < 0.05$),高褪黑素组要优于低褪黑素组。

3 结 语

炎症是一种常见的病理过程,许多疾病与此有关。机体在正常情况下,由于不断地和少量的病原体遭遇,经常有炎性细胞和补体的活化以及炎症介质的生成,与此同时,机体不断地动员抗炎机制抑制这种活化,维持机体炎症/ 抗炎症平衡及其在体内自稳中的作用^[8]。病原体以及其他致炎因子诱导炎症反应或者某些原因抑制了抗炎机制将使这一平衡失调,发生炎症。本研究以腹腔注射脂多糖构建炎症模型,探讨褪黑素的抗炎作用及其机制。

IL-1 是影响炎症进程的主要细胞因子,是体内作用最强的炎症介质之一^[9]。IL-10 是对免疫应答起抑制作用的一种细胞因子,它能限制炎症过程的发展,且在内源性自身稳定上有作用,其机制可能是改变细胞内信号传导途径而选择性抑制有关细胞因子的合成^[10]。本实验结果显示,LPS 刺激后,诱导了炎性细胞因子 IL-1 的分泌,刺激了机体的炎症反应,灌胃褪黑素组小鼠的 IL-1 的分泌降低,而 IL-10 的分泌明显增加,这表明褪黑素有助于降低机体的炎症反应。LPS 刺激 16 h 时,由于机体自身的调节作用,IL-1 和 IL-10 的分泌比刺激后 4 h 时降低,褪黑素的抗炎性作用也没有 4 h 时明显。褪黑素对炎性细胞因子的调控作用目前还不清楚,有研究认为^[11],褪黑素可以通过防止 NF-κB 转移核内与 DNA 结合,降低前炎症细胞因子水平。

实验结果显示,在 LPS 刺激下,褪黑素能够降

低 NOS 的活性,从而减少毒性 NO 的生成,减轻了细胞的损害,对细胞具有保护作用,其机制可能是褪黑素通过减少氧自由基和细胞因子的释放,从而抑制 NF- κ B 活化,后者则是。McCann 等^[12]发现 NO 可以激起松果体分泌 MT 增加,消除 NO,减少 NO 神经毒性,MT 尚能显著抑制 NOS 基因相关表达。亦有研究表明,褪黑素还可直接清除 NO^[13]。NOS 是产生自由基的酶之一,可促进 NO 的合成,NO 与过氧化硝酸盐结合产生自由基。有研究发现 MT 能通过钙调蛋白抑制体内 NO 合成的关键酶——一氧化氮合酶的活性,从而抑制体内 NO 的过度生成及其他活性氮(reactive nitrogen species,RNS)分子的产生,对损伤和炎症有拮抗作用。这与上述研究结果是相符合的。

MPO 是中性粒细胞中的一种酶,其含量的增高可以反应中性粒细胞在某一组织中的增高,间接反映炎症在组织中的存在。本实验结果表明,LPS 刺激后,灌胃褪黑素能明显的降低小肠 MPO 的含量,保护小肠的正常机能。

综上所述,机体在应激或受到外来刺激时,会打破自身炎症/抗炎的动态平衡,而炎症反应的失控将对机体产生不利影响^[14]。LPS 刺激小鼠后,引起小鼠体内炎症反应,而灌胃褪黑素可以降低炎性细胞因子 IL-1 的分泌,促进抗炎性细胞因子 IL-10 的分泌,降低 NOS 的活性,从而减少毒性 NO 的生成,降低小肠 MPO 的含量,从而减轻机体的炎症损伤,证实了褪黑素具有一定的抗炎作用,利于机体稳定的维持,从而表现出对机体的保护作用。

参考文献(References):

- [1] Simonneaux V, Ribelayga C. Generation of the melatonin endocrine message in mammals: a review of the melatonin regulation of melatonin synthesis, norepinephrine, peptides, and other pineal transmitters[J]. *Pharmacol Rev*, 2003, 55(2): 325 - 395.
- [2] Martins E Jr, Ligeiro de Oliveira AP, Fialho de Araujo AM, et al. Melatonin modulates allergic lung inflammation[J]. *J Pineal Res*, 2001, 31: 363 - 369.
- [3] Carrillo VA, Lardone PT, 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.
- [4] Lee MY, Kuan YH, Chen HY, et al. Intravenous administration of melatonin reduces the intracerebral cellular inflammatory response following transient focal cerebral ischemia in rats[J]. *J Pineal Res*, 2007, 42(3): 297 - 309.
- [5] Spittler A, Razenberger M, Kupper H, et al. Relationship between interleukin-6 plasma concentration in patients with sepsis, monocyte phenotype, monocyte phagocytic properties and cytokine production[J]. *Clin Infect Dis*, 2000, 31: 1338 - 1420.
- [6] Nguyen T, Brunson D, Crespi CL. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro[J]. *Proc Acad Sci USA*, 1992, 89: 303 - 310.
- [7] Zemkova H, Vanecek J, H J, Vanecek I. Inhibitory effect of melatonin on gonadotropin-releasing hormone-induced Ca^{2+} oscillations in pituitary cells of newborn rats[J]. *Neuroendocrinology*, 1997, 65(4): 276 - 283.
- [8] 徐仁宝. 体内的抗炎机制及其意义[J]. *生理科学进展*, 1994, 25(4): 305 - 308.
XU Bai-ren. The mechanism of anti-inflammatory and its meaning in vivo[J]. *Physiological Science Progress*, 1994, 25(4): 305 - 308. (in Chinese)
- [9] Rothwell NJ. Functions and mechanisms of interleukin-1 in the brain[J]. *TRPS*, 1991, 12: 430 - 436.
- [10] Asadullah K, Sterry W, Volk HD. Interleukin-21 therapy: 241 - 269.
- [11] Li JH, Yu JP, Yu HG, Xu XM, Yu LL, Liu J, et al. Melatonin reduces inflammatory injury through inhibiting NF- κ B activation in rats with colitis[J]. *Mediators Inflamm*, 2005, 31(4): 185 - 193.
- [12] McCann SM, Licinio J, Wong ML, et al. The nitric oxide hypothesis of aging[J]. *J Exp Gerontol*, 1998, 33(7/8): 813 - 826.
- [13] 熊加祥, 黎海蒂. 褪黑素抗自由基作用[J]. *四川生理科学杂志*, 2000, 22(1): 3 - 6.
XIONG Jia-xiang, LI Hai-di. Effect of melatonin on anti-free radical[J]. *Sichuan Physiological Science*, 2000, 22(1): 3 - 6. (in Chinese)
- [14] Tsujinaka T, Kishibuchi M, Iijima S, et al. Role of supplementation of a nucleic acid solution in the intestinal mucosa under total parenteral nutrition[J]. *Nutrition*, 1997, 13: 369 - 371.

(责任编辑:杨萌)