

利拉鲁肽对脓毒症诱导急性呼吸窘迫综合征小鼠的保护作用研究

周 锋¹,李志锋²,王志力²,靳 风²,张 颖^{2△}

(武汉大学中南医院:1. 内分泌科;2. 重症医学科,武汉 430071)

[摘要] **目的** 观察利拉鲁肽对脓毒症诱导产生急性呼吸窘迫综合征(ARDS)小鼠的保护作用。**方法** 将 30 只雄性 BALB/c 小鼠分为 3 组:对照组、ARDS 组、利拉鲁肽干预组。对照组及 ARDS 组小鼠先给予生理盐水皮下注射,利拉鲁肽干预组小鼠给予利拉鲁肽皮下注射。利拉鲁肽干预 6 h 后,ARDS 组及利拉鲁肽干预组小鼠给予 10 mg/kg 脂多糖腹腔注射,对照组小鼠腹腔注射等体积生理盐水;脂多糖注射 4 h 后,取左肺上叶组织做病理学检测,左肺下叶检测肺组织湿/干重(W/D)比值,测定肺泡灌洗液(BALF)中蛋白水平、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及白细胞介素-18(IL-18)水平,检测肺组织 NLRP3、ASC 及 caspase-1 mRNA 表达。**结果** 腹腔注射脂多糖 4 h 后,ARDS 组小鼠肺组织病理切片提示肺组织内出现大量炎性细胞浸润及蛋白渗出,利拉鲁肽干预组小鼠肺组织病理学改变明显减轻。ARDS 组小鼠肺 W/D 比值[(6.01 \pm 0.32) vs. (3.37 \pm 0.25)],BALF 中蛋白水平[(0.79 \pm 0.08)g/L vs. (0.22 \pm 0.01)g/L]、IL-1 β [(582.70 \pm 65.21)pg/mL vs. (167.20 \pm 25.56)pg/mL]、IL-18[(179.50 \pm 22.25)pg/mL vs. (68.50 \pm 11.15)pg/mL]均明显高于对照组($P<0.05$),而利拉鲁肽干预组小鼠肺组织 W/D 比值(4.72 \pm 0.12)、BALF 中蛋白水平[0.51 \pm 0.05)g/L]、IL-1 β 水平[(399.70 \pm 38.56)pg/mL]、IL-18 水平[(122.80 \pm 14.28)pg/mL]均明显低于 ARDS 组($P<0.05$);ARDS 组小鼠肺组织 NLRP3、ASC 及 caspase-1 mRNA 表达量[(4.97 \pm 0.35) vs. (1.06 \pm 0.11)]、[(3.62 \pm 0.21) vs. (1.08 \pm 0.09)]、[(2.37 \pm 0.25) vs. (0.96 \pm 0.07)]均明显高于对照组,而利拉鲁肽干预组小鼠肺组织 NLRP3、ASC 及 caspase-1 mRNA 表达量[(3.21 \pm 0.28)、(1.91 \pm 0.18)、(1.63 \pm 0.12)]均明显低于 ARDS 组($P<0.05$)。**结论** 利拉鲁肽干预对脓毒症诱导的急性呼吸窘迫综合征小鼠具有保护作用。

[关键词] 呼吸窘迫综合征,成人;脓毒症;利拉鲁肽;炎症反应**[中图法分类号]** R826.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)04-0569-04

Research progress in protective effects of liraglutide on sepsis induced acute respiratory distress syndrome in mice

ZHOU Feng¹, LI Zhifeng², WANG Zhili², JIN Feng², ZHANG Ying^{2△}

(1. Department of Endocrinology; 2. Department of ICU, Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan, Hubei 430071, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of liraglutide on sepsis induced acute respiratory distress syndrome (ARDS) in mice. **Methods** Thirty Balb/c female mice were randomly divided into the three groups: control group, ARDS group and liraglutide intervention group. The control group and ARDS group were given normal saline by subcutaneous injection, and liraglutide intervention group was given liraglutide by subcutaneous injection. After liraglutide intervention for 6 h, the ARDS group and liraglutide group were given 10 mg/kg LPS by peritoneal injection, while the control group was peritoneal injected by the same volume of normal saline. After 4 h of LPS injection, the left upper and lower lung tissues were taken for conducting the pathological examination and detecting the wet/dry (W/D) ratio respectively. The protein levels, interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-18(IL-18) levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected. Moreover, the expressions of nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein (ASC) and caspase-1 were detected. **Results** The lung tissue pathological section at 4 h after LPS peritoneal injection indicated that a large number of inflammatory cells infiltration and protein exudation in the ARDS group, and the pathology changes were significantly alleviated in the liraglutide group.

The level of W/D ratio $[(6.01 \pm 0.32) \text{ vs. } (3.37 \pm 0.25)]$, protein level in BALF $[(0.79 \pm 0.08) \text{ g/L vs. } (0.22 \pm 0.01) \text{ g/L}]$, IL-1 β $[(582.70 \pm 65.21) \text{ pg/mL vs. } (167.20 \pm 25.56) \text{ pg/mL}]$, IL-18 $[(179.50 \pm 22.25) \text{ pg/mL vs. } (68.50 \pm 11.15) \text{ pg/mL}]$ in the ARDS group were significantly higher than those in the control group ($P < 0.05$), while the level of W/D ratio (4.72 ± 0.12) , protein level in BALF $(0.51 \pm 0.05) \text{ g/L}$, IL-1 β level $(399.70 \pm 38.56) \text{ pg/mL}$ and IL-18 level $(122.80 \pm 14.28) \text{ pg/mL}$ in the liraglutide intervention group were significantly lower than those in the ARDS group ($P < 0.05$). The expression levels of NLRP3, ASC and caspase-1 mRNA in lung tissue $[(4.97 \pm 0.35) \text{ vs. } (1.06 \pm 0.11)]$, $[(3.62 \pm 0.21) \text{ vs. } (1.08 \pm 0.09)]$, $[(2.37 \pm 0.25) \text{ vs. } (0.96 \pm 0.07)]$ in the ARDS group were significantly higher than those in the control group, while the expression of NLRP3, ASC and caspase-1 mRNA in the liraglutide intervention group were (3.21 ± 0.28) , (1.91 ± 0.18) and (1.63 ± 0.12) respectively, which were significantly lower than those in the ARDS group ($P < 0.05$). **Conclusion** the liraglutide intervention has the protective effect on the mice with sepsis induced ARDS.

[Key words] respiratory distress syndrome, adult; sepsis; liraglutide; inflammation

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是一种常见的临床危重症, 它可以由多种原因, 如脓毒症、严重创伤、急性胰腺炎等引起。脓毒症是引起急性肺损伤的最常见原因。脂多糖被认为是引起 ARDS 的主要原因^[1]。脂多糖通过激活中性粒细胞及巨噬细胞等炎症细胞, 如释放白细胞介素-1 β (IL-1 β) 及白细胞介素-18 (IL-18) 等。这些炎症介质可以加重机体的炎性反应, 严重影响机体的肺换气功能, 导致低氧血症。而 IL-1 β 及 IL-18 的成熟及释放主要受炎症小体的调节^[2]。NLRP3 炎症小体在 ARDS 的发病机制中扮演重要角色^[3]。胰高糖素样肽-1 (GLP-1) 是肠道 L 细胞分泌的一种肽类激素, 是体内调节血糖的重要激素。研究发现 GLP-1 不仅对机体血糖稳定有调节作用, 还具有抗炎作用^[4-5]。利拉鲁肽是 GLP-1 类似物, 被广泛用于肥胖及 2 型糖尿病的治疗。VIBY 等^[6] 研究发现, 利拉鲁肽可以抑制慢性阻塞性肺疾病的炎性反应, 缓解慢性阻塞性肺疾病的急性发作。而利拉鲁肽对急性肺损伤是否具有保护作用, 目前鲜有报道。本研究主要观察利拉鲁肽对脂多糖诱导的脓毒症小鼠 ARDS 的保护作用及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型制备 将 6~8 周健康雄性 Balb/c 30 只 (湖北省疾病预防控制中心提供), 分为 3 组, 每组 10 只: 对照组、ARDS 组、利拉鲁肽干预组。对照组及 ARDS 组小鼠先给予无菌生理盐水皮下注射, 利拉鲁肽干预组给予利拉鲁肽 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 皮下注射。利拉鲁肽皮下注射 6 h 后, 对照组小鼠腹腔注射无菌生理盐水, ARDS 组及利拉鲁肽干预组小鼠腹腔注射 10 mg/kg 脂多糖^[7]。脂多糖注射 4 h 后, 取材做以下指标检测。

1.2 试剂 利拉鲁肽 (丹麦 Novo Nordisk 公司), 脂

多糖 (Sigma 公司), NLRP3 抗体 (R&D 公司), ASC 及 caspase-1 抗体 (Protein Tech 公司); IL-1 β 及 IL-18 酶联免疫试剂盒 (武汉依莱瑞特生物科技公司) 等。

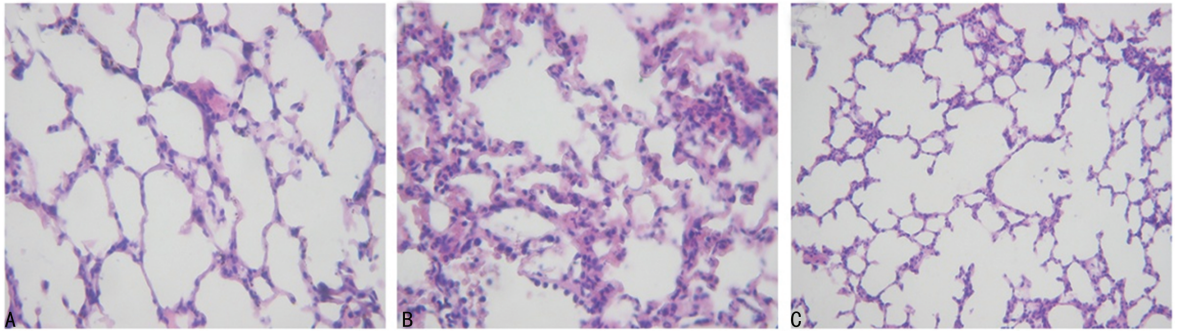
1.3 方法

1.3.1 病理学检测 处死小鼠后, 用 10% 甲醛溶液固定小鼠左上肺组织, 石蜡包埋后用苏木精-伊红 (HE) 染色。根据 Murakami 评分方法^[8], 按照 0~4 级 (0 级, 无; 1 级, 轻; 2 级, 中; 3 级, 强; 4 级, 重) 评分对肺损伤程度进行病理评分。

1.3.2 肺组织湿/干重 (W/D) 比值 取左下肺, 用滤纸吸干肺表面水分, 称取各组小鼠肺组织湿重后, 将肺组织放入烤箱 (80 $^{\circ}\text{C}$), 48 h, 称干重, 计算 W/D 比值。

1.3.3 支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中蛋白及炎症因子水平 采用 BCA 法检测 BALF 的蛋白水平, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测 BALF 中 IL-1 β 及 IL-18 水平。

1.3.4 肺组织 NLRP3、ASC 及 caspase-1 mRNA 表达 用 RT 聚合酶链反应 (PCR) 法检测 NLRP3、ASC 及 caspase-1 的 mRNA 表达。用 Trizol 法提取总 RNA, 光谱扫描多功能仪测定 RNA 的纯度和浓度。RNA 样本 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 值在 1.8~2.0 范围内。反转录合成 cDNA: 取 2 μg RNA, 将 RNA 反转录成 cDNA。RT-PCR 扩增 cDNA: NLRP3 上游引物 5'-CTC GCA TTG GTT CTG AGC TC -3'; 下游引物 5'-AGT AAG GCC GGA ATT CAC CA-3'; ASC 上游引物 5'-CTA TCT GGA GTC GTA TGG CTT GG-3'; 下游引物 5'-ATG AGT GCT TGC CTG TGC TGG TC-3'; caspase-1 上游引物 5'-GGC AAG CCA AAT CTT TAT CAC-3'; 下游引物 5'-GCC ATC TTC TTT GTT CTG TTC-3'; β -actin 上游引物 5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3'; 下游



A: 对照组; B: ARDS 组; C: 利拉鲁肽干预组

图 1 各组肺组织病理学改变

引物 5'-TAA AGA CCT CTA TGC CAA CAC AGT-3'。反应体系为 20 μL, 扩增条件: 95 °C 热启动 5 min 后; 95 °C 30 s, 58 °C 退火延伸 30 s, 共 40 循环。每份样本重复检测 3 次, 取平均 Ct 值, 用相对定量法 (2^{-ΔΔCt}) 计算各组小鼠目的基因表达。

1.4 统计学处理 用 SPSS17.0 软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差 (ANOVA) 统计分析, 组间比较采用 SNK 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺组织病理学改变 对照组小鼠肺组织病理结构正常, 腹腔注射 LPS 4 h 后, ARDS 组小鼠肺组织结构出现明显破坏, 肺内出现较多炎症细胞浸润, 并伴有出血、水肿及透明膜形成。利拉鲁肽干预小鼠上述病理学改变明显减轻 (图 1)。

2.2 肺组织 W/D 比值 同对照组比较, ARDS 组小鼠肺 W/D 明显升高 ($P < 0.05$), 利拉鲁肽干预组小鼠肺 W/D 较 ARDS 组小鼠明显降低 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组小鼠肺组织 W/D 比值 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	n	肺组织 W/D 比值
对照组	10	3.37 ± 0.25
ARDS 组	10	6.01 ± 0.32 ^a
利拉鲁肽干预组	10	4.72 ± 0.12 ^b

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ARDS 组比较

表 2 各组小鼠 BALF 中蛋白、IL-1β 及 IL-18 水平 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	n	蛋白 (g/L)	IL-1β (pg/mL)	IL-18 (pg/mL)
对照组	10	0.22 ± 0.01	167.20 ± 25.56	68.50 ± 11.15
ARDS 组	10	0.79 ± 0.08 ^a	582.70 ± 65.21 ^a	179.50 ± 22.25 ^a
利拉鲁肽干预组	10	0.51 ± 0.05 ^b	399.70 ± 38.56 ^b	122.80 ± 14.28 ^b
F		138.2	76.8	56.2
P		< 0.05	< 0.05	< 0.05

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ARDS 组比较

2.3 BALF 中的蛋白、IL-1β 及 IL-18 水平 同对照组比较, ARDS 组小鼠 BALF 中蛋白、IL-1β 及 IL-18 水平明显升高 ($P < 0.01$), 利拉鲁肽干预组小鼠 BALF 中蛋白、IL-1β 及 IL-18 水平明显降低 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.4 肺组织 NLRP3、ASC 及 caspase-1 mRNA 表达 同对照组比较, ARDS 组小鼠肺组织中 NLRP3、ASC 及 caspase-1 的 mRNA 表达明显升高, 利拉鲁肽干预组小鼠肺组织中 NLRP3、ASC 及 caspase-1 的 mRNA 表达较 ARDS 组明显降低 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 各组小鼠 NLRP3、ASC 及 caspase-1 的 mRNA 表达比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	n	NLRP3	ASC	caspase-1
对照组	10	1.06 ± 0.11	1.08 ± 0.09	0.96 ± 0.07
ARDS 组	10	4.97 ± 0.35 ^a	3.62 ± 0.21 ^a	2.37 ± 0.25 ^a
利拉鲁肽干预组	10	3.21 ± 0.28 ^b	1.91 ± 0.18 ^b	1.63 ± 0.12 ^b
F		127.9	85.3	105.2
P		< 0.05	< 0.05	< 0.05

^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 ARDS 组比较

3 讨 论

ARDS 的特征主要表现为肺间质水肿、炎症细胞浸润、肺上皮通透性增加及蛋白向肺泡腔中渗透, 最终导致严重的肺换气功能障碍^[9]。本研究显示, 利拉鲁肽干预能改善 ARDS 小鼠肺组织病理学改变, 降低 ARDS 小鼠肺 W/D 及蛋白渗出, 说明利拉鲁肽早期干预可以改善脓毒症诱导的小鼠肺组织损伤。

炎症细胞因子介导的炎性反应在 ARDS 的发病机制中扮演重要角色^[10]。IL-1β 是引起肺内炎性反应的重要炎症介质, ARDS 患者肺泡液内 IL-1β 水平明显增高^[11]。过量的 IL-1β 损伤血管内皮细胞的完整性, 加重肺泡上皮细胞的通透性, 引起肺水肿^[12]。研究发现, IL-18 水平升高可以增加急性肺损伤患者的病死率^[13]。本研究表明, 脓毒症诱导的 ARDS 小鼠 BALF 中炎症介质 IL-1β 及 IL-18 水平显著升高, 利

拉鲁肽预处理可以显著降低 BALF 中 IL-1 β 及 IL-18 水平,提示利拉鲁肽干预可能是通过抑制 IL-1 β 及 IL-18 来减轻脓毒症诱导的小鼠 ARDS。

NLRP3 炎症小体由 NLRP3、ASC 及 caspase-1 前体组成,内源性或外源性的刺激引起 NLRP3 炎症小体活化^[14]。NLRP3 炎症小体的活化调节着炎症因子 IL-1 β 及 IL-18 的成熟及分泌^[15]。在 NLRP3 敲除的小鼠中,脂多糖诱导的急性肺损伤改变明显减轻^[16]。NLRP3 基因敲除可以降低 caspase-1 的活化及体内 IL-1 β 的水平^[17]。在 IL-18 基因敲除小鼠,急性肺损伤也明显好转^[3]。本实验中,LPS 注射后 4 h,ARDS 组小鼠肺组织 NLRP3、ASC、caspase-1 mRNA 表达显著升高,给予利拉鲁肽后 ARDS 小鼠上述指标 mRNA 表达明显降低,说明利拉鲁肽可能是通过抑制 NLRP3 炎症小体活化,进而抑制促炎细胞因子 IL-1 β 及 IL-18 的合成及释放,从而改善脓毒症诱导的小鼠肺损伤。

综上所述,利拉鲁肽作为一种常用的糖尿病治疗药物,其不良反应少、安全性高。本研究采用利拉鲁肽对 ARDS 小鼠进行干预,小鼠肺组织损伤明显改善,说明利拉鲁肽通过抑制炎症小体的活化,拮抗炎性反应对 ARDS 小鼠发挥保护作用。

参考文献

- [1] BRIGHAM K L, MEYRICK B. Endotoxin and lung injury [J]. *Am Rev Res Dis*, 1986, 133(5): 913-927.
- [2] SCHRODER K, TSCHOPP J. The inflammasomes [J]. *Cell*, 2010, 140(6): 821-832.
- [3] DOLINAY T, KIM Y S, HOWRYLAK J, et al. Inflammasome-regulated cytokines are critical mediators of acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2012, 185(11): 1225-1234.
- [4] ANBAZHAGAN A N, THAQI M, PRIYAMVADA S, et al. GLP-1 nanomedicine alleviates gut inflammation [J]. *Nanomedicine*, 2017, 13(2): 659-665.
- [5] BARRETO-VIANNA A R, AGUILA M B, MANDARIM-DE-LACERDA C A, et al. Beneficial effects of liraglutide (GLP1 analog) in the hippocampal inflammation Metabolic brain disease [J]. *Metab Brain Dis*, 2017, 32(5): 1735-1745.
- [6] VIBY N E, ISIDOR M S, BUGGESKOV K B, et al. Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) reduces mortality and improves lung function in a model of experimental obstructive lung disease in female mice [J]. *Endocrinology*, 2013, 154(12): 4503-4511.
- [7] TANG M, TIAN Y, LI D, et al. TNF-alpha mediated increase of HIF-1alpha inhibits VASP expression, which reduces alveolar-capillary barrier function during acute lung injury (ALI) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(7): e102967.
- [8] MURAKAMI K, MCGURINE R, COX R A, et al. Heparin nebulization attenuates acute lung injury in sepsis following smoke inhalation in sheep [J]. *Shock*, 2002, 18(3): 236-241.
- [9] MATUTE-BELLO G, DOWNEY G, MOORE B B, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2011, 44(5): 725-738.
- [10] GOODMAN R B, PUGIN J, LEE J S, et al. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, 14(6): 523-535.
- [11] DINARELLO C A. Biologic basis for interleukin-1 in disease [J]. *Blood*, 1996(87): 2095-2147.
- [12] GANTER M T, ROUX J, MIYAZAWA B, et al. Interleukin-1beta causes acute lung injury via alphavbeta5 and alphavbeta6 integrin-dependent mechanisms [J]. *Circulation Res*, 2008, 102(7): 804-812.
- [13] MAKABE H, KOJIKI M, TAKAHASHI G, et al. Interleukin-18 levels reflect the long-term prognosis of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [J]. *J Anesth*, 2012, 26(5): 658-663.
- [14] FAUSTIN B, LARTIGUE L, BRUEY J M, et al. Reconstituted NALP1 inflammasome reveals two-step mechanism of caspase-1 activation [J]. *Mol Cell*, 2007, 25(5): 713-724.
- [15] KOLLIPUTI N, GALAM L, PARTHASARATHY P T, et al. NALP-3 inflammasome silencing attenuates ceramide-induced transepithelial permeability [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(9): 3310-3316.
- [16] GRAILER J, CANNING B, KALBITZ M, et al. Critical role for the NLRP3 inflammasome during acute lung injury [J]. *J Immunol*, 2014, 192(12): 5974-5983.
- [17] FUKUMOTO J, FUKUMOTO I, PARTHASARATHY P T, et al. NLRP3 deletion protects from hyperoxia-induced acute lung injury [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2013, 305(2): 182-189.

(收稿日期:2018-08-25 修回日期:2018-11-15)