

辣椒素在脓毒症肺损伤保护机制中的作用

徐子琴 陈新国 张雪良 卢中秋 徐丽艳 南 超

摘 要 **目的** 探讨 TRPV1 受体激动剂辣椒素在脓毒症肺损伤保护机制中的作用。**方法** 选取 ICR 雄性小鼠共 108 只,随机分成 6 组(各 18 只):正常对照组(CON 组)、辣椒素对照组(CAP + CON 组)、辣椒素受体拮抗剂对照组(CAPZ + CON 组)、脓毒症组(LPS 组)、辣椒素 + 脓毒症组(CAP 组)、辣椒素受体拮抗剂 + 脓毒症组(CAPZ 组)。LPS 组、CAP 组、CAPZ 组均腹腔注射 LPS 10mg/kg 以制备脓毒症急性肺损伤模型,CON 组、CAP + CON 组、CAPZ + CON 组经腹腔注射等量生理盐水。在造模前 0.5hCAP 组、CAP + CON 组等两组小鼠预先腹腔注射辣椒素,CAPZ 组、CAPZ + CON 组等两组小鼠预先腹腔注射辣椒素受体拮抗剂。每组取注射后 3、8、16h 等各点检测血清 TNF- α 、IL-6 变化(6 只),并测定肺组织湿/干重(W/D)比值和评价其病理学改变,进行统计分析。**结果** 与 CON 组比较,LPS 组、CAP 组、CAPZ 组血清 IL-6 和 TNF- α 在 3、8、16h 各点上升。与 LPS 组比较,CAP 组 IL-6 和 TNF- α 在 3、8、16h 各点下降。与 LPS 组比较,CAPZ 组 IL-6 在 3、8、16h 各点上升,TNF- α 在 3、8h 各点上升。与 CON 组比较,LPS 组、CAP 组、CAPZ 组肺组织 W/D 值在 8、16h 时升高。与 LPS 组比较,CAP 组肺组织 W/D 在 8、16h 时降低。与 LPS 组比较,CAP 组肺病理改变程度减弱,CAPZ 组病理改变不明显。**结论** TRPV1 受体抑制可能是脓毒症肺损伤的机制之一,激活 TRPV1 受体能减轻脓毒症肺损伤。

关键词 肺损伤 脓毒症 脂多糖

Protective Effect of Capsaicine for LPS - induced Acute Lung Injury in Mice. Xu Ziqin, Chen Xinguo, Zhang Xueliang, Lu Zhongqiu, Xu Liyan, Nan Chao. Intensive Care Unit of Wenzhou People's Hospital, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the effect of TRPV1 receptor agonist, capsaicine for LPS - induced acute lung injury in mice. **Methods** Totally 108 ICR male mice were randomly divided into six groups ($n = 18$ for each): control group (CON group), capsaicine + control group (CAP + CON group), capsazepine + control group (CAPZ + CON group), Lipopolysaccharide group (LPS group), capsaicine group (CAP group) and capsazepine group (CAPZ group). Mice in LPS group, CAP group and CAPZ group were injected intraperitoneally with LPS (10mg/kg) to induce acute lung injury. Capsaicine in CAP group and CAP + CON group while capsazepine in CAPZ group and CAPZ + CON group were injected intraperitoneally 0.5h before LPS, respectively. Values of serum TNF- α , IL-6, pathomorphologic changes of lung, W/D ratio were detected after 3, 8, 16h. **Results** Compared with CON group, values of TNF- α , IL-6 in LPS group, CAP group and CAPZ group were upregulated at 3h, 8h and 16h. Compared with LPS group, values of TNF- α and IL-6 in CAP group were decreased at 3, 8 and 16h while values of IL-6 were upregulated at 3, 8 and 16h and values of TNF- α were upregulated at 3 and 8h in CAPZ group. Compared with CON group, W/D ratio were upregulated in LPS group, CAP group and CAPZ group. Compared with LPS group, W/D ratio of lung tissues were decreased in CAP group at 8 and 16h. The pathological changes in lung tissue of CAP group were milder than those in LPS group. **Conclusion** Pretreated with capsaicine (TRPV1 receptor agonist) can improve the lung injury of sepsis while pretreated with Capsazepine (TRPV1 receptor antagonist) maybe worsen it. So we think blocking TRPV1 receptor is a reason for lung injury of sepsis and activating TRPV1 receptor may be a protective factor for it.

Key words Lung injury; Sepsis; Lipopolysaccharide

脓毒症发病过程中,肺损伤发生较早,也最为突出,是导致脓毒症死亡的重要原因。研究表明辣椒素,TRPV1 受体的一种激动剂,能改善脓毒症大鼠的低血压,降低其病死率,能减轻肺损伤的氧化应激反

应,且感染患者中发现 TRPV1 受体表达 TLR4,后者可激活核因子(NF)- κ B,介导包括肿瘤坏死因子(TNF)- α 、白细胞介素(IL)-6 等众多炎症因子的基因表达而导致炎症因子过度释放;这些过度释放的炎症因子反过来又可以进一步激活 NF- κ B,从而形成正反馈的级联放大效应,产生过度的炎症反应,引起肺脏组织和细胞损害的发生^[1~6]。因此,本实验通过构建脓毒症肺损伤模型,采用辣椒素激活或拮抗剂阻断辣椒素受体 TPRV1,通过检测血清炎症因子 TNF

基金项目:温州市科技局基金资助项目(Y20100302)

作者单位:325000 温州市人民医院 ICU(徐子琴、张雪良),急诊科(陈新国);温州医学院附属第一医院急诊科(卢中秋、徐丽艳、南超)

通讯作者:卢中秋,博士生导师,电子信箱:lzq640815@163.com

-α、IL-6 表达的变化,并观察肺组织的病理改变、检测肺组织湿/干重比,探讨 TRPV1 受体在脓毒症肺损伤治疗中的作用机制。

材料与方法

1. 材料:108 只 ICR 雄性小鼠(温州医学院实验动物中心提供),体重 18~22g,随机分成 6 组,每组 18 只:正常对照组(CON 组)、辣椒素对照组(CAP+CON 组)、辣椒素受体拮抗剂对照组(CAPZ+CON 组)、脓毒症组(LPS 组)、辣椒素+脓毒症组(CAP 组)、辣椒素受体拮抗剂+脓毒症组(CAPZ 组)。

2. 方法:(1)模型建立:脓毒症组(LPS 组)、辣椒素+脓毒症组(CAP 组)、辣椒素受体拮抗剂+脓毒症组(CAPZ 组)采用腹腔注射 LPS 10mg/kg 复制脓毒症肺损伤模型;正常对照组(CON 组)、辣椒素对照组(CAP+CON 组)、辣椒素受体拮抗剂对照组(CAPZ+CON 组)经腹腔注射等量生理盐水。辣椒素对照组(CAP+CON 组)、辣椒素+脓毒症组(CAP 组)、在建模前 0.5h 腹腔注射辣椒素(1mg/kg);辣椒素受体拮抗剂对照组(CAPZ+CON 组)、辣椒素受体拮抗剂+脓毒症组(CAPZ 组)在建模前 0.5h 腹腔注射辣椒素受体拮抗剂(15mg/kg),LPS、辣椒素、辣椒素受体拮抗剂 Capsazepine 均购自美国 Sigma 公司。(2)检测指标和方法:每组分别在制模后 3、8、16h 各取 6 只小鼠,腹腔注射 4% 水合氯醛 6~10ml/kg,麻醉后球后取血,离心 3000r/min、20min,取上清,置于-20℃ 低温冰箱保存。采用酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒(购自上海西唐生物科技有限公司,进口分装美国 R&D Systems 公司)检测 IL-6 和 TNF-α,操作严格按说明书步骤进行。(3)肺组织处理:取血完毕后,开胸取左肺吸干表面液体,称重湿,然后放入 80℃ 烤箱烘至恒重,称干重,计算湿/干重比(W/D);取右肺下叶,10% 甲醛固定,石蜡包埋,每例切片 3 张,HE 染色,光镜下观察肺组织病理变化。

3. 统计学方法:使用 SPSS 10.0 统计软件进行数据处理,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多个样本均数间两两比较采用 *t* 检验,各组间样本均数比较用单因素方差分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 血清 IL-6 的变化:与 CON 组比较,CAP+CON 组、CAPZ+CON 组血清 IL-6 在 3、8、16h 各点无统计学差异(*P*>0.05);LPS 组、CAP 组、CAPZ 组血清 IL-6 在 3、8、16h 各点均明显上升(*P*<0.05);与 LPS 组比较,CAP 组 IL-6 在 3、8、16h 均下降,CAPZ 组在 3、8、16h 各点均上升(*P*<0.05)(表 1)。

2. 血清 TNF-α 的变化:与 CON 组比较,CAP+CON 组、CAPZ+CON 组血清 TNF-α 在 3、8、16h 各点无统计学差异(*P*>0.05),LPS 组、CAP 组、CAPZ 组血清 TNF-α 在 3、8、16h 各点均明显上升(*P*<0.05);与 LPS 组比较,CAP 组在 8、16h 均下降,CAPZ 组在 3、8、16h 各点均上升(*P*<0.05)(表 2)。

表 1 各组血清 IL-6 含量的变化($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/ml}$)

组别	3h	8h	16h
CON 组	7.51 ± 0.54	8.90 ± 0.32	35.65 ± 4.63
CAP + CON 组	7.10 ± 0.46	8.64 ± 0.47	35.51 ± 4.27
CAPZ + CON 组	6.98 ± 0.33	8.85 ± 0.43	36.66 ± 3.31
LPS 组	312.97 ± 17.78 ^a	446.88 ± 23.60 ^a	559.80 ± 9.51 ^a
CAP 组	259.12 ± 18.65 ^{ab}	283.25 ± 54.41 ^{ab}	280.03 ± 18.82 ^{ab}
CAPZ 组	501.13 ± 59.77 ^{ab}	548.03 ± 23.36 ^{ab}	593.17 ± 40.30 ^{ab}

与 CON 组比较,^a*P*<0.05;与 LPS 组比较,^b*P*<0.05

表 2 各组血清 TNF-α 含量的变化($\bar{x} \pm s, n=6, \text{pg/ml}$)

组别	3h	8h	16h
CON 组	6.16 ± 0.42	6.82 ± 0.39	6.87 ± 0.49
CAP + CON 组	6.75 ± 0.34	6.75 ± 0.34	6.77 ± 0.43
CAPZ + CON 组	6.06 ± 0.36	6.92 ± 0.32	6.87 ± 0.44
LPS 组	26.06 ± 0.94 ^a	82.36 ± 7.97 ^a	125.78 ± 4.31 ^a
CAP 组	6.74 ± 1.31 ^{ab}	63.98 ± 12.69 ^{ab}	107.74 ± 6.57 ^{ab}
CAPZ 组	64.73 ± 8.18 ^{ab}	101.44 ± 3.29 ^{ab}	132.56 ± 8.07 ^a

与 CON 组比较,^a*P*<0.05;与 LPS 组比较,^b*P*<0.05

3. 肺组织病理学改变:(1)光镜下观察:CON 组、CAP+CON 组、CAPZ+CON 组肺组织结构完整,肺泡间隔无水肿、炎症,肺泡腔清晰;LPS 组 8、16h 可见肺泡大小不等,部分肺泡壁断裂呈气肿状,部分肺泡萎陷,肺泡壁增宽,肺泡毛细血管扩张,肺间质见多行核炎症细胞浸润;CAP 组较 LPS 组渗出明显减轻;CAPZ 组和 LPS 组相比无明显加重。(2)各组小鼠肺组织 W/D 比值(表 3):与 CON 组比较,CAP+CON 组、CAPZ+CON 组肺组织 W/D 值在 3、8、16h 各点无统计学差异(*P*>0.05),LPS 组、CAP 组、CAPZ 组肺组织 W/D 值在 8、16h 时均显著性升高(*P*<0.05);与 LPS 组比较,CAP 组肺组织 W/D 值在 8、16h 时降低(*P*<0.05);与 LPS 组比较,CAPZ 组肺组织 W/D 值无明显升高。

表 3 各组肺组织 W/D 比值的变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	3h	8h	16h
CON 组	3.78 ± 0.03	3.77 ± 0.04	3.77 ± 0.02
CAP + CON 组	3.81 ± 0.06	3.77 ± 0.05	3.76 ± 0.05
CAPZ + CON 组	3.78 ± 0.03	3.80 ± 0.02	3.77 ± 0.04
LPS 组	3.75 ± 0.04	6.34 ± 0.06 ^a	6.54 ± 0.09 ^a
CAP 组	3.76 ± 0.06	5.24 ± 0.08 ^{ab}	5.41 ± 0.62 ^{ab}
CAPZ 组	3.80 ± 0.04	6.32 ± 0.06 ^a	6.51 ± 0.09 ^a

与 CON 组比较,^a*P*<0.05;与 LPS 组比较,^b*P*<0.05

讨 论

TRPV1 属于瞬时感受器电位(TRP)通道家族成员,为一种非选择性阳离子通道,可被辣椒素激活,也

能被恶性体温 ($>43^{\circ}\text{C}$) 和低 pH ($\text{pH} < 6.0$) 活化。TRPV1 受体主要分布在背根神经节和三叉神经节中的小到中型神经元,如小直径无髓鞘 C 纤维。也在其他非神经细胞,以往的观点认为,TRPV1 受体是促炎受体,特别是在神经性疼痛、关节炎、炎症性肠病等方面,且在正常生理条件下对膀胱功能、温度调节和神经形成等有重要作用^[7]。但近年研究发现,TRPV1 受体的表达对减轻神经痛有重要意义,且值得关注的是,TRPV1 受体还对脓毒症有保护效应,能改善脓毒症大鼠的低血压和降低病死率^[8,9]。

目前 TRPV1 常见的激动剂辣椒素临床应用广泛。它是一种香草酰胺衍生物,化学结构为 8-甲基-N-香草基-6-壬烯基酰胺 ($\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{NO}_3$),呈单斜长方形片状无色结晶,可调节外周血管的舒缩、影响血压;对缺血心肌起保护作用;参与哮喘的发生;调节胃酸的分泌,促进胃肠蠕动;介导肿瘤细胞的凋亡,且在过敏的非传染性患者鼻内使用辣椒素喷雾,发现辣椒素能长期和显著降低感冒症状^[10,11]。辣椒素在体外对细菌有很好的抑菌活性,对金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌有明显的抑菌效果,对大肠杆菌抑菌作用较弱,对酵母菌的抑菌活性次之,对真菌抑菌性较弱,且在较宽的温度和 pH 值变化范围内仍能保持良好的抑菌活性^[12,13]。研究认为小剂量 (1mg/kg) 辣椒素干预治疗能够有效降低脓毒症大鼠血浆 IL-6、TNF- α 、NOx 及丙二醛 (MDA) 的水平,同时辣椒素治疗还能显著提高抗炎因子 IL-10 的水平。TNF- α 主要由单核-吞噬细胞、淋巴细胞等分泌,是炎症的最初启动者,主要是通过促进细胞产生 IL-1、IL-6 等细胞因子,刺激花生四烯酸的代谢和脂类介质的产生,发挥促炎作用;而 IL-6 是使炎症因子放大的重要因子,是脓毒症肺损伤的重要因素,可用于脓毒症的早期诊断评估^[6]。本研究通过激动或拮抗 TRPV1 受体发现,CAP 组(激动组)血 TNF- α 、IL-6 均较 LPS 组下降,提示有保护效应,而肺组织光镜的病理改变也较 LPS 组减轻,W/D 比下降,提示对脓毒症引起的肺损伤有一定保护作用,CAPZ 组(拮抗组)则血 TNF- α 、IL-6 均较 LPS 组下降,提示有脓毒症恶化可能,虽然肺组织光镜的病理改变较 LPS 组无明显加重,但 16h 时肺组织 W/D 上升,提示预先使用辣椒素受体拮抗剂可能加重脓毒症肺损伤的程度。另外,CON 组、CAP+CON 组、CAPZ+CON 组的 TNF- α 、IL-6、W/D 值、肺病理变化等均无明显差异,提示脓毒症时可通过辣椒素激动或辣椒素受体拮抗剂抑

制 TRPV1 受体,而在非脓毒症状态时 TRPV1 受体并不易被激活或抑制,这与脓毒症状态下可出现炎症因子过度释放的变化不谋而合。

综上所述,TRPV1 受体抑制可能是脓毒症肺损伤的机制之一,使用辣椒素激活 TRPV1 受体能减轻脓毒症肺损伤。

参考文献

- 1 Wang Y, Novotny M, Quaiserová - Mocko V, *et al.* TRPV1 - mediated protection against endotoxin induced hypotension and mortality in rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2008, 294 (5): 1517 - 1523
- 2 Clark N, Keeble J, Fernandes ES, *et al.* The transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor protects against the onset of sepsis after endotoxin[J]. *FASEB J*, 2007, 21 (13): 3747 - 3755
- 3 Abdel - Salam OM, Abdel - Rahman RF, Sleem AA, *et al.* Modulation of lipopolysaccharide - induced oxidative stress by capsaicin[J]. *Inflammopharmacology*, 2012, 20 (4): 207 - 217
- 4 Diogenes A, Ferraz CC, Akopian AN, *et al.* LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons [J]. *J Dent Res*, 2011, 90 (6): 759 - 764
- 5 Baumgarten G, Knuefermann P, Wrigge H, *et al.* Role of Toll - like receptor 4 for the pathogenesis of acute lung injury in Gram - negative sepsis[J]. *Eur J Anaesthesiol*, 2006, 23 (12): 1041 - 1048
- 6 陈晓彤,王寿平,邹子俊,等. Toll 样受体 4 单克隆抗体预处理对脂多糖诱发小鼠急性肺损伤的影响[J]. *中华急诊医学杂志*, 2011, 20 (10): 1052 - 1055
- 7 Khadija A, Julie K. The paradoxical role of the transient receptor potential vanilloid 1 receptor in inflammation[J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 125 (2): 181 - 195
- 8 Zakir HM, Mostafaezur RM, Suzuki A, *et al.* Expression of TRPV1 channels after nerve injury provides an essential delivery tool for neuropathic pain attenuation[J]. *PLoS One*, 2012, 7 (9): e 44023
- 9 Bates BD, Mitchell K, Keller JM, *et al.* Prolonged analgesic response of cornea to topical resiniferatoxin, a potent TRPV1 agonist[J]. *Pain*, 2010, 149 (3): 522 - 528
- 10 Chow J, Norng M, Zhang J, *et al.* TRPV6 mediates capsaicin - induced apoptosis in gastric cancer cells - Mechanisms behind a possible new "hot" cancer treatment[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1773 (4): 565 - 576
- 11 Van Rijswijk JB, Boeke EL, Keizer JM, *et al.* Intranasal capsaicin reduces nasal hyperreactivity in idiopathic rhinitis; a double - blind randomized application regimen study[J]. *Allergy*, 2003, 58 (8): 754 - 761
- 12 郭丽,王巧珍,朱林. 辣椒碱抗病原菌活性及其在番茄酱防腐中的应用[J]. *合肥工业大学学报:自然科学版*, 2006, 29 (1): 117 - 121
- 13 张继红,陶能国,李俊丽,等. 辣椒素的提取及抑菌活性研究[J]. *广西植物*, 2010, 30 (1): 137 - 140

(收稿日期:2012-12-01)

(修回日期:2012-12-10)