

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.014.002  
文章编号: 1005-8982 (2018) 014-0007-06

## 烟碱对腹腔感染败血症小鼠的保护作用及其机制研究\*

贾宝辉<sup>1</sup>, 刘宁<sup>1</sup>, 陈奕<sup>2</sup>, 黄敏<sup>2</sup>, 尚明升<sup>2</sup>, 杜玉明<sup>3</sup>

(1. 郑州铁路职业技术学院, 河南 郑州 451460; 2. 南昌大学第四附属医院 重症医学科, 江西 南昌 330003; 3. 郑州大学第一附属医院 重症医学科, 河南 郑州 450052)

**摘要: 目的** 探讨烟碱激活胆碱能抗炎通路对败血症的保护作用及其机制。**方法** 采用盲肠结扎并穿孔 (CLP) 法复制败血症模型。65 只健康昆明小鼠分为对照组、CLP 组和烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组, 记录 CLP 后 24、36 和 48 h 的生存率。另取 18 只小鼠分组同上, CLP 后 20 h 计算肺湿干重比、败血症严重程度评分, 行肝、肺组织病理学检查。另取 120 只小鼠随机分为对照组、CLP 组, 以及烟碱 400、200 和 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组, 酶联免疫吸附法检测 CLP 后 1、2、4 和 6 h 血浆 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  的浓度。**结果** 术后 24、36 和 48 h, 烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组生存率较 CLP 组升高 ( $P < 0.05$ ); 术后 20 h 烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组肺湿干重比和败血症严重程度评分较 CLP 组降低 ( $P < 0.05$ ), 肝、肺组织病理改变较 CLP 组减轻。术后 2、4 和 6 h, 烟碱 400、200 和 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组血浆 TNF- $\alpha$  浓度较 CLP 组降低 ( $P < 0.05$ ); 术后 1 和 6 h, 烟碱 400、200 和 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组血浆 IL-1 $\beta$  浓度较 CLP 组降低 ( $P < 0.05$ )。烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组血浆 TNF- $\alpha$  浓度在术后 2 h 低于 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组 ( $P < 0.05$ ), 术后 6 h 低于 200 和 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组 ( $P < 0.05$ )。并术后 2 和 4 h 烟碱 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组血浆 TNF- $\alpha$  浓度较 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组降低 ( $P < 0.05$ )。术后 4 h 烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组血浆 IL-1 $\beta$  浓度低于 200 和 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 烟碱减轻腹腔严重感染小鼠败血症严重程度, 改善肝、肺的病理组织学变化, 降低机体促炎症细胞因子水平, 提高生存率。

**关键词:** 烟碱; 胆碱能抗炎通路; 败血症; 肿瘤坏死因子; 白细胞介素 1 $\beta$

**中图分类号:** R631.3

**文献标识码:** A

## Protective effect of nicotine against septicemia in mice after cecal ligation and puncture\*

Bao-hui Jia<sup>1</sup>, Ning Liu<sup>1</sup>, Yi Chen<sup>2</sup>, Min Huang<sup>2</sup>, Ming-sheng Shang<sup>2</sup>, Yu-ming Du<sup>3</sup>

(1. Zhengzhou Railway Vocational & Technical College, Zhengzhou, Henan 451460, China; 2. Intensive Care Unit, the Fourth Hospital Affiliated to Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330003, China;

3. Intensive Care Unit, the First Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China)

**Abstract: Objective** To investigate whether nicotine, a nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonist, has protective effect on septicemia. **Methods** A septicemia model was induced by cecal ligation and puncture (CLP). Totally 65 female mice were randomly divided into 3 groups. The control group (15 mice) received sham operation, the CLP group (20 mice) received cecal ligation and puncture (CLP), and the mice in nicotine group (30 mice) were intraperitoneally injected with 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  nicotine 30 min before CLP. The survival rates were recorded 24, 36 and 48 h after CLP. Additional 18 female mice were grouped according to the same method as above; at the 20th h after operation, the septicemia severity score and the lung wet/dry weight ratio were evaluated and the liver and the lungs

收稿日期: 2016-03-23

\* 基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (No: 16A320065); 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (No: 13B320290); 河南省郑州市科技局普通科技攻关项目 (No: 20131009)

were histopathologically examined. Still 120 more female mice were randomly divided into 5 groups, i.e. control group, CLP group, nicotine 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group, nicotine 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group and nicotine 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group. The mice were sacrificed at the 1st, 2nd, 4th and 6th h after CLP. The plasma concentrations of proinflammatory cytokines including tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) and interleukine 1 beta (IL-1 $\beta$ ) were measured using ELISA. **Results** At the 24th, 36th and 48th h after CLP, the survival rate of the nicotine 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group was significantly higher than that of the CLP group ( $P < 0.05$ ). At the 20th h after CLP, the septicemia severity score and the lung wet/dry weight ratio significantly decreased in the nicotine 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group compared with the CLP group ( $P < 0.05$ ), the pathological changes of the liver and the lungs were ameliorated compared to the CLP group. At the 2nd, 4th and 6th h after CLP, the plasma levels of TNF- $\alpha$  in the the nicotine 400, 200 and 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  groups were lower than those of the CLP group ( $P < 0.05$ ). The plasma level of TNF- $\alpha$  in the the nicotine 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group was lower than that of the nicotine 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group 2 h after CLP ( $P < 0.05$ ), and lower than those of the nicotine 200 and 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  groups 6 h after CLP ( $P < 0.05$ ). The plasma level of TNF- $\alpha$  in the the nicotine 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group was lower than that of the nicotine 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group 2 and 4 h after CLP ( $P < 0.05$ ). At the 1st and 6th h after CLP, the plasma IL-1 $\beta$  levels of the nicotine 400, 200 and 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  groups were lower than that of the CLP group ( $P < 0.05$ ). At the 4th h after CLP, the plasma IL-1 $\beta$  level of the nicotine 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  group was lower than those of the nicotine 200 and 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Nicotine has protective effects against septicemia in mice through activation of the cholinergic anti-inflammatory pathway to inhibit production of inflammatory cytokines.

**Keywords:** nicotine; cholinergic anti-inflammatory pathway; septicemia; tumor necrosis factor alpha; IL-1 $\beta$

致病菌入侵机体时,体内的迷走神经释放递质乙酰胆碱与免疫系统相互作用参与抗炎,即胆碱能抗炎通路<sup>[1]</sup>。烟碱是烟碱型乙酰胆碱受体  $\alpha-7$  亚基 ( $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor,  $\alpha 7\text{AChR}$ ) 特异性激动剂,通过与  $\alpha 7\text{AChR}$  结合,比乙酰胆碱抗炎效应更强<sup>[2]</sup>。本研究应用烟碱激活胆碱能抗炎通路,观察其对败血症小鼠生存率、败血症严重程度,以及肝、肺组织病理学、血浆促炎症细胞因子水平的影响,探讨烟碱对败血症的保护作用及其机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

健康昆明小鼠,雌性,体重 20 ~ 25 g (南昌大学医学院实验动物中心提供)。采用盲肠结扎并穿孔 (cecal ligation and puncture, CLP) 法复制败血症动物模型。65 只小鼠随机分为对照组 (15 只)、CLP 组 (20 只) 和烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组 (30 只),用于观察生存率和记录平均生存时间。另取 18 只小鼠分组同上,每组 6 只,用于观察一般状况,20 h 处死动物记录大体形态学,计算肺湿干重比、败血症严重程度评分,取肝、肺组织行病理学检查。另取 120 只小鼠随机分为对照组、CLP 组,以及烟碱 400、200 和 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组,每组 24 只,用于测定血浆促炎症细胞因子肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-1 $\beta$  (interleukine-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 水平。模型复制成功后,立即腹腔注射不同浓度烟碱或等量生理盐水,

之后每隔 8 h 追加注入,连续 3 d 共 9 次。

### 1.2 小鼠败血症模型的复制

参考文献 [3] 复制败血症小鼠模型。术前禁食 12 h,腹腔注射 7% 水合氯醛 (350 mg/kg) 麻醉。于左下腹做长约 1.5 cm 切口,游离肠系膜和盲肠,以 4 号丝线环行结扎盲肠根部,用 12 号针头于距盲端 1 cm 处贯通穿刺,挤出粪便少许,还纳肠系膜和肠管。逐层缝合关腹,碘伏消毒伤口。术毕皮下注射生理盐水 3 ml/100 g,并肌肉注射青霉素 2 万 u 预防切口感染。对照组除开腹、游离并还纳肠系膜及盲肠、缝合关腹外,不行 CLP,其余处理同 CLP 组。

### 1.3 观察指标及检测方法

**1.3.1 生存率** 记录对照组、CLP 组和烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组小鼠 24、36 和 48 h 存活例数及生存率。共观察 7 d。

**1.3.2 肺湿干重比** CLP 后 20 h 处死动物,分离双侧肺组织,取右侧肺组织于纱布上吸净血液,称湿重后于 65 $^{\circ}\text{C}$  烤箱中 24 h 至恒重,称干重,计算肺湿干重比。

**1.3.3 败血症严重程度评分** 小鼠 CLP 后败血症严重程度评分采用改良的评定标准<sup>[4]</sup>进行。从一般情况、肠管情况、腹水情况、结扎盲肠情况、病灶包裹情况、肝脏体积及肺湿干重比 7 个方面进行评定。见表 1。

**1.3.4 病理学检查** CLP 后 20 h 取肝、肺组织经 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋切片,HE 染色后普通光学显

表 1 小鼠 CLP 后败血症严重程度评分标准

观察指标及评分标准	分值	观察指标及评分标准	分值
一般情况		结扎盲肠情况	
正常进食, 正常活动	1	发白, 坏疽	3
进食少, 疲倦, 少活动	2	坏疽, 周围大量脓液	4
不进食, 嗜睡, 不活动	3	病灶包裹情况	
昏睡, 对刺激反应低	4	未包裹, 周围无坏死, 渗出	1
肠管情况		被大网膜 / 肠管包裹良好	2
红润, 蠕动良好	1	未包裹, 周围有明显坏死, 渗出	3
充血, 轻度扩张, 蠕动良好	2	脓液扩散, 包裹不佳	4
发乌, 中度扩张, 蠕动欠佳	3	肝脏体积 (与对照组相比)	
发紫, 高度扩张, 蠕动消失	4	>0%~20%	1
腹水情况		>20%~40%	2
<3 ml, 腹水清, 无臭味	1	>40%~60%	3
3~6 ml, 腹水浊, 无臭味	2	>60%	4
>6 ml, 血性腹水, 微臭	3	肺湿干重比	
>6 ml, 脓性腹水, 恶臭	4	<4.5	1
结扎盲肠情况		4.5~5.0	2
水肿, 缺血	1	>5.0~5.5	3
乌黑, 坏死	2	>5.5	4

显微镜下观察。

**1.3.5 酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)** 采用 ELISA 测定血浆 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  的浓度。于 CLP 术后 1、2、4 和 6 h 处死动物, 摘眼球取血, 经离心后获得血浆。TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒购自武汉博士德生物公司。操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。使用 CurveExpert 1.3 软件绘制标准曲线并计算出待测样品浓度值, 以 pg/ml 表示。每个待测样品及标准品均作复孔。

## 1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 方差分析的两两比较用 SNK- $q$  检验, 用 Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, 生存率比较用 Log-rank  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 生存率比较

实验观察 7 d 对照组 15 只小鼠无一例死亡; CLP

组 20 只小鼠术后 24、36 和 48 h 分别存活 8、5 和 4 只, 生存率分别为 40.0%、25.0% 和 20.0%; 烟碱 400  $\mu$ g/kg 组 30 只小鼠术后 24、36 和 48 h 分别存活 24、19 和 17 只, 生存率分别为 80.0%、63.3% 和 56.7%。烟碱 400  $\mu$ g/kg 组与 CLP 组的生存率比较, 经 Log-rank  $\chi^2$  检验, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=8.599$ ,  $P=0.003$ ), 烟碱 400  $\mu$ g/kg 组生存率高于 CLP 组 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

### 2.2 肺湿干重比

对照组、CLP 组、烟碱 400  $\mu$ g/kg 组小鼠肺湿干重比分别为 ( $2.71 \pm 1.58$ )、( $5.10 \pm 0.39$ ) 和 ( $2.30 \pm$

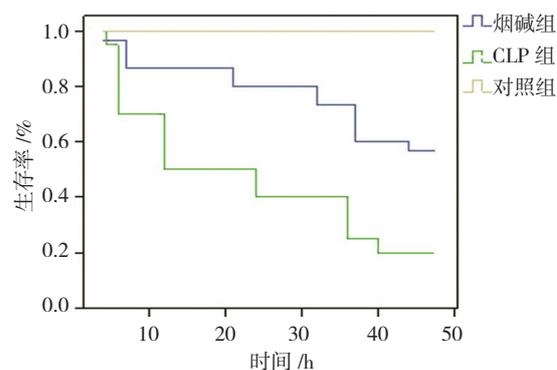


图 1 3 组小鼠生存率曲线

1.03), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=25.867, P=0.000$ )。进一步两两比较经 SNK- $q$  检验, CLP 组 20 h 肺湿干重比高于对照组 ( $P<0.05$ ); 烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组 20 h 肺湿干重比低于 CLP 组 ( $P<0.05$ )。

### 2.3 败血症严重程度评分

对照组、CLP 组、烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组小鼠败血症严重程度评分分别为 ( $6.47 \pm 0.74$ )、( $21.00 \pm 2.37$ ) 和 ( $15.00 \pm 3.58$ ) 分, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=28.760, P=0.000$ )。进一步两两比较经 SNK- $q$  检验, 烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组 20 h 败血症严重程度评分低于 CLP 组 ( $P<0.05$ )。

### 2.4 病理学变化

**2.4.1 肝组织** 对照组肝细胞结构完整, 肝小叶形态正常, 肝血窦无扩张和炎症细胞浸润。CLP 组肝细胞浊肿、脂肪变性, 可见灶性坏死, 中性粒细胞浸润明显(见图 2A)。烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组肝细胞未见明显浊肿, 有轻度脂肪变性, 未见有坏死灶。中性粒细胞浸润程度较轻(见图 2B)。

**2.4.2 肺组织** 对照组肺泡上皮细胞形态正常, 肺间隔未见增宽, 毛细血管无充血和淤血, 肺间质未见出血、水肿及炎症细胞浸润, 肺泡大小均匀, 结构完整。CLP 组肺泡结构改变, 间隔疏松增宽, 肺泡内毛细血管明显充血, 可见微血栓形成, 肺间质水肿, 炎症细胞浸润明显(见图 3A)。烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组肺泡结构改变不明显, 未见毛细血管充血, 肺间质轻度水肿, 炎症细胞浸润较轻(见图 3B)。

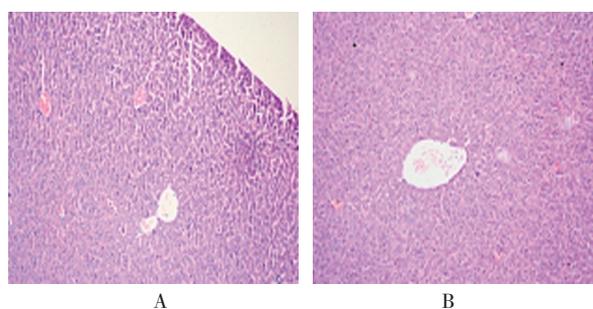
### 2.5 血浆 TNF- $\alpha$ 浓度

术后 1、2、4 和 6 h 对照组、CLP 组, 以及烟碱 400、200 和 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组血浆 TNF- $\alpha$  浓度比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的血浆 TNF- $\alpha$  浓度有差别 ( $F=41.439, P=0.000$ )。

②5 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度有差别 ( $F=79.356, P=0.000$ )。术后 2、4 和 6 h 时, CLP 组较对照组血浆 TNF- $\alpha$  浓度升高 ( $P<0.05$ ), 烟碱 400、200 和 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组较 CLP 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度降低 ( $P<0.05$ ); 6 h 时烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组较 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组 TNF- $\alpha$  浓度降低 ( $P<0.05$ ); 2 和 6 h 时, 烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组较 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组血浆 TNF- $\alpha$  浓度降低 ( $P<0.05$ ); 2 和 4 h 时, 烟碱 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  较 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组血浆 TNF- $\alpha$  浓度降低 ( $P<0.05$ )。③5 组间血浆 TNF- $\alpha$  浓度变化趋势有差异 ( $F=44.172, P=0.000$ )。见表 2 和图 4。

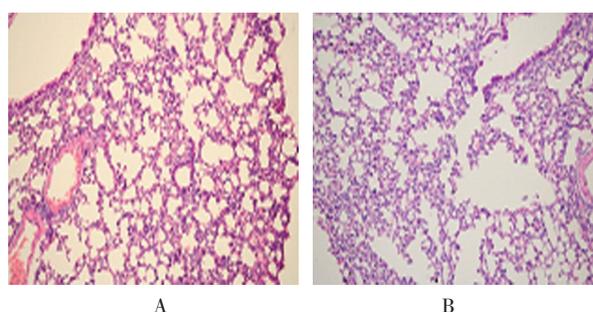
### 2.6 血浆 IL-1 $\beta$ 浓度

术后 1、2、4 和 6 h 对照组、CLP 组, 以及烟碱 400、200 和 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组血浆 IL-1 $\beta$  浓度比较, 采用



A: CLP 组; B: 烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组

图 2 两组肝组织病理结果 (HE  $\times 200$ )



A: CLP 组; B: 烟碱 400  $\mu\text{g}/\text{kg}$  组

图 3 两组肺组织病理结果 (HE  $\times 200$ )

表 2 各组小鼠不同时间点血浆 TNF- $\alpha$  浓度比较 ( $n=24, \text{pg}/\text{ml}, \bar{x} \pm s$ )

组别	1 h	2 h	4 h	6 h
对照组	242.06 $\pm$ 9.64	260.02 $\pm$ 19.75	245.74 $\pm$ 12.60	256.53 $\pm$ 14.82
CLP 组	248.89 $\pm$ 10.76	435.26 $\pm$ 20.91	869.76 $\pm$ 24.61	731.11 $\pm$ 42.56
烟碱 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组	252.66 $\pm$ 11.61	351.24 $\pm$ 25.63	680.94 $\pm$ 29.09	531.79 $\pm$ 8.14
烟碱 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组	237.90 $\pm$ 10.49	360.77 $\pm$ 31.96	646.80 $\pm$ 18.78	561.63 $\pm$ 20.53
烟碱 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 组	236.75 $\pm$ 14.44	389.13 $\pm$ 11.21	709.53 $\pm$ 50.33	589.54 $\pm$ 24.27

重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的血浆 IL-1 $\beta$  浓度有差别 ( $F=53.692, P=0.000$ )。② 5 组血浆 IL-1 $\beta$  浓度有差别 ( $F=78.062, P=0.000$ )。术

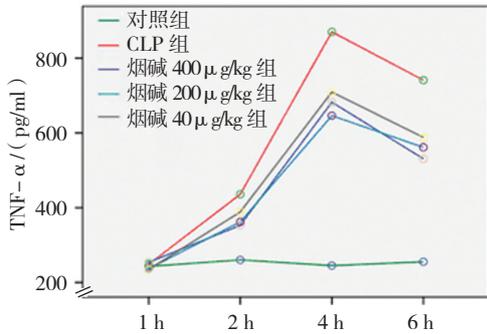


图 4 各组小鼠不同时间点血浆 TNF- $\alpha$  浓度变化趋势

后 1、2、4 和 6 h 时, CLP 组较对照组血浆 TNF- $\alpha$  浓度升高 ( $P < 0.05$ ); 术后 1、2、4 和 6 h 时, 烟碱 400  $\mu$ g/kg 组较 CLP 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度降低 ( $P < 0.05$ ); 术后 1、4 和 6 h 时, 烟碱 200  $\mu$ g/kg 组较 CLP 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度降低 ( $P < 0.05$ ); 术后 1 和 6 h 时, 烟碱 40  $\mu$ g/kg 组较 CLP 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度降低 ( $P < 0.05$ ); 4 h 时烟碱 400  $\mu$ g/kg 组较 200  $\mu$ g/kg 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度降低 ( $P < 0.05$ ); 2 和 6 h 时, 烟碱 400  $\mu$ g/kg 组较 40  $\mu$ g/kg 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度降低 ( $P < 0.05$ ); 4 h 时, 烟碱 200  $\mu$ g/kg 较 40  $\mu$ g/kg 组血浆 TNF- $\alpha$  浓度降低 ( $P < 0.05$ )。③ 5 组间血浆 TNF- $\alpha$  浓度变化趋势有差异 ( $F=11.758, P=0.000$ )。见表 3 和图 5。

表 3 各组小鼠不同时间点血浆 IL-1 $\beta$  浓度比较 ( $n=24, \text{pg/ml}, \bar{x} \pm s$ )

组别	1 h	2 h	4 h	6 h
对照组	267.34 $\pm$ 27.10	261.23 $\pm$ 29.13	221.95 $\pm$ 30.45	245.19 $\pm$ 35.03
CLP 组	327.63 $\pm$ 21.27	337.63 $\pm$ 19.50	456.17 $\pm$ 7.08	556.12 $\pm$ 7.08
烟碱 400 $\mu$ g/kg 组	272.60 $\pm$ 13.94	305.99 $\pm$ 14.44	384.75 $\pm$ 20.81	245.19 $\pm$ 35.03
烟碱 200 $\mu$ g/kg 组	278.75 $\pm$ 12.86	311.68 $\pm$ 4.22	421.27 $\pm$ 15.64	263.93 $\pm$ 17.11
烟碱 40 $\mu$ g/kg 组	290.06 $\pm$ 5.23	314.66 $\pm$ 6.27	432.92 $\pm$ 16.67	254.92 $\pm$ 16.36

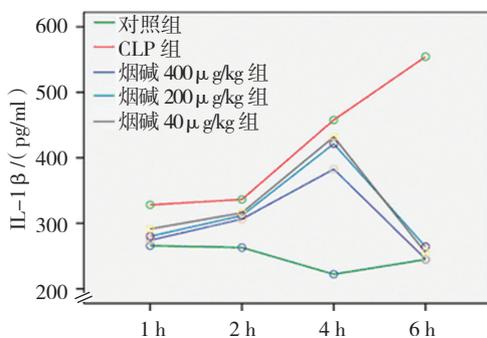


图 5 各组小鼠不同时间点血浆 IL-1 $\beta$  浓度变化趋势

### 3 讨论

神经-免疫调节通路在针对机体感染、创伤或缺血、缺氧等损害性刺激, 而产生保护性防御反应方面, 起非常重要的作用。中枢神经系统通过激活传出迷走神经纤维, 释放神经递质乙酰胆碱, 与各种免疫细胞上的  $\alpha 7\text{AChR}$  结合, 抑制炎症细胞因子的合成, 增加抗炎细胞因子的合成, 调节外周炎症反应, 从而维持免疫稳定。

体外培养的人巨噬细胞中加入乙酰胆碱, 能够明显抑制 TNF- $\alpha$  的合成, 并且电刺激小鼠迷走神经能

减轻内毒素血症时全身性炎症反应。已知外周血单核细胞上存在的 M 和 N 2 种乙酰胆碱受体中, N 受体与乙酰胆碱结合后, 可抑制 TNF- $\alpha$  的合成, 即胆碱能抗炎通路主要是通过 N 受体的激活来实现<sup>[6]</sup>。共聚焦显微镜技术和逆转录 PCR 发现, 胆碱能神经系统与天然免疫系统密切联系的分子基础在于巨噬细胞等免疫细胞上的 N 型  $\alpha$ -银环蛇毒素敏感的乙酰胆碱受体 ( $\alpha 7$  亚基)。把人巨噬细胞暴露于烟碱或乙酰胆碱后, 可抑制 TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-18 的释放。迷走神经的感觉神经元上存在 IL-1 受体, IL-1 与其结合后, 刺激传出迷走神经释放乙酰胆碱, 乙酰胆碱与巨噬细胞上的  $\alpha 7$  亚基结合, 从而抑制炎症细胞因子产生<sup>[7]</sup>。

学者通过对胆碱能抗炎通路结构基础的研究, 陆续发现激活该通路的各种手段或物质。在经左冠状动脉前降支结扎-开放法复制的大鼠心肌缺血再灌注损伤模型上, 笔者观察到应用烟碱可减轻心肌细胞损伤, 减少缺血面积, 保护心肌组织。其机制在于烟碱激活胆碱能抗炎通路, 降低体内炎症细胞因子水平<sup>[8]</sup>。

烟碱激活胆碱能抗炎通路对感染性休克保护作用的研究较少。已证实刺激内毒素休克大鼠传出迷走神经, 可以减缓低血压性休克的发生时相, 阻止血压

进行性下降, 增加体内抗炎症细胞因子的释放, 降低主要脏器组织和血浆中 TNF- $\alpha$  含量。若迷走神经切断则明显加重 TNF- $\alpha$  对炎症刺激的反应, 使动物对内毒素的致死效应更加敏感。CLP 法更接近于临床上急性肠穿孔或弥漫性腹膜炎所导致的败血症 / 感染性休克的病理生理过程。本实验前期采用 CLP 法复制败血症动物模型, 观察到腹腔感染败血症小鼠肝、肺组织病理损伤严重<sup>[9]</sup>。本研究探讨烟碱对 CLP 败血症动物生存率、一般状况、败血症严重程度、重要脏器组织病理学的影响, 证实烟碱能提高腹腔感染败血症小鼠的存活率, 延长其生存时间, 降低败血症严重程度的评分, 减轻组织器官的病理损害。因此, 烟碱对败血症动物具有保护作用。

本研究结果进一步表明, 败血症小鼠血浆中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 浓度升高, 肝、肺组织炎症病理改变明显。而给予烟碱后, 血浆中 TNF- $\alpha$  和 IL-1 含量降低, 肝、肺组织炎症病理改变减轻, 表明烟碱可减轻败血症时的全身性炎症反应, 并具有保护肝、肺功能的作用。其机制可能是烟碱激活迷走神经后, 释放大乙酰胆碱, 与存在于肝 Kupffer 细胞、单核细胞上的乙酰胆碱受体  $\alpha 7$  亚基结合, 通过一系列途径阻止 Kupffer 细胞和单核细胞释放 TNF- $\alpha$  和 IL-1, 从而拮抗肝脏组织乃至全身性的炎症反应, 与 ZABRODSKII 等<sup>[10]</sup> 的研究结果一致。

因此, 烟碱对败血症动物保护作用的机制在于抑制炎症细胞因子 TNF- $\alpha$  和 IL-1 的释放, 即烟碱具有抗炎效应。并且, 这种保护作用及其拮抗炎症介质的效应, 可能与其剂量有一定的相关性。

胆碱能性抗炎通路的发现, 使烟碱这一存在于烟草中, 长期以来一直被人们认为有毒的物质得以重新评价。适量应用烟碱可能有助于临床上积极防治败血症 / 感染性休克。未来应当进一步研究烟碱对调控炎症介质的上游信号分子, 如核因子- $\kappa$ B、Toll 样受体等的影响, 从分子水平上阐述受体与药物分子相互作用的机制, 开发出激活胆碱能抗炎通路, 特别是针对  $\alpha 7$ AchR 的新药。

#### 参 考 文 献:

- [1] BONAZ B, SINNIGER V, PELLISSIE S. Anti-inflammatory properties of the vagus nerve: potential therapeutic implications of vagus nerve stimulation[J]. *J Physiol*, 2016, 594(20): 5781-5790.
- [2] DI G M, BOSMANS G, MERONI E, et al. Vagotomy affects the development of oral tolerance and increases susceptibility to develop colitis independently of the alpha-7 nicotinic receptor[J]. *Molecular Medicine*, 2016, 22: 464-476.
- [3] WILLENBERG I, RUND K, SONG R, et al. Characterization of changes in plasma and tissue oxylipin levels in LPS and CLP induced murine sepsis[J]. *Inflammation Research*, 2016, 65(2): 133-142.
- [4] JING F, LI M, REN H, et al. Effects of atorvastatin combined with low-molecular-weight heparin on plasma inflammatory cytokine level and pulmonary pathophysiology of rats with sepsis[J]. *Experimental Therapeutic Medicine*, 2016, 12(2): 1048-1054.
- [5] SUN Y, LI Q, GUI H, et al. MicroRNA-124 mediates the cholinergic anti-inflammatory action through inhibiting the production of pro-inflammatory cytokines[J]. *Cell Res*, 2013, 23(11): 1270-1283.
- [6] KAWASHIMA K, FUJII T, MORIWAKI Y, et al. Critical roles of acetylcholine and the muscarinic and nicotinic acetylcholine receptors in the regulation of immune function[J]. *Life Sciences*, 2012, 91(21/22): 1027-1032.
- [7] MALDIFASSI M C, ATIENZA G, ARNALICH F, et al. A new IRAK-M-mediated mechanism implicated in the anti-inflammatory effect of nicotine via  $\alpha 7$  nicotinic receptors in human macrophages[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): DOI: 10.1016/S0014-5793.e108397.
- [8] 贾宝辉, 徐宏平, 张瑞星, 等. 烟碱激活胆碱能抗炎通路对大鼠心肌缺血 - 再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国急救医学*, 2013, 33(2): 168-171.
- [9] 贾宝辉, 付莉, 陈军喜, 等. 败血症小鼠肝肺组织 MDA 和 SOD 及诱导型一氧化氮合酶表达的研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2012, 22(7): 17-21.
- [10] ZABRODSKII P F, GROMOV M S, MASLYAKOV V V. Effect of  $\alpha 7$ n-acetylcholine receptor activation and antibodies to TNF- $\alpha$  on mortality of mice and concentration of proinflammatory cytokines during early stage of sepsis[J]. *Bulletin of Experimental Biology Medicine*, 2015, 159(6): 740-742.

(童颖丹 编辑)