

N-乙酰半胱氨酸对硫酸葡聚糖钠诱导的 实验性结肠炎的预防及治疗作用[#]

韩英,张静,纪欣,王志红

(北京军区总院消化内科,北京 100700)

【摘要】目的:探讨还原型巨噬细胞诱导剂 N-乙酰半胱氨酸(N-Acetylcysteine, NAC)对硫酸葡聚糖钠(Dextran Sodium Sulphate, DSS)诱导的小鼠实验性结肠炎的预防及治疗作用。**方法:**建立 DSS 实验性小鼠肠炎模型, NAC 及氧化型巨噬细胞诱导剂 N,N'-联乙酰-L-胱氨酸(N,N'-diacetyl-L-cystine, (NACOMe)₂)在致模前后腹腔注射;检测腹腔巨噬细胞中还原型谷胱甘肽(GSH)与氧化型谷胱甘肽(GSSG)的变化;对结肠进行病理学评价,并检测结肠 IL-4、IFN- γ 的表达。**结果:**NAC 预处理组;结肠长度和病理学指标均优于其他预处理组,腹腔巨噬细胞内 GSH 及 GSH/GSSG 升高;结肠分泌的 IL-4、IFN- γ 明显降低。NAC 治疗组;体重增加程度明显高于其它治疗组,结肠炎症及黏膜损伤较轻,腹腔巨噬细胞内 GSSG 明显减低,GSH 和 GSH/GSSG 升高,病变结肠分泌的 IL-4、IFN- γ 明显降低。**结论:**还原型巨噬细胞诱导剂 NAC 可以通过诱导巨噬细胞内 GSH 产生增多从而减轻实验性结肠炎的黏膜损伤及临床症状,对 DSS 诱导的实验性结肠炎有一定的预防及治疗作用。

【关键词】N-乙酰半胱氨酸; N,N'-联乙酰-L-胱氨酸;硫酸葡聚糖钠;实验性结肠炎;巨噬细胞;谷胱甘肽

【中图分类号】R574.62;R967 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1009-0959(2008)01-0130-04

N-Acetylcysteine Alleviate the DSS Induced Experimental Colitis in Mice through Replenishment of Glutathione Level

Han Ying, Zhang Jing, Ji Xin, et al.

Department of Gastroenterology, Beijing Army General Hospital, Beijing 100700, China

【ABSTRACT】Objective: To evaluate the preventive and therapeutic effect of N-Acetylcysteine(NAC), an inductor of reductive macrophages (RMp) on DSS-induced experimental colitis of mice. **Methods:** The experimental colitis of mice was established by drinking with 5% DSS. NAC or N,N'-diacetyl-L-cystine ((NACOMe)₂), an inductor of oxidative macrophages, was administered before or after the model being established. The mice were killed at the 22nd day, the level of reductive glutathione (GSH), oxidative glutathione(GSSG) and the ratio of GSH/GSSG of macrophages in abdominal cavity was determined. The expression of IL-4 and IFN- γ in colon was detected. **Results:** NAC pre-treated group scores better in terms of pathological parameters and the GSH & GSH/GSSG are significantly higher, the IL-4 produced by colonic mucosa is significantly lower compared with the other pre-treated groups. After the colitis model was established, the colonic inflammation in NAC treated group was significantly improved and the GSSG within macrophage was significantly reduced paralleling with the increase of GSH & GSH/GSSG, meanwhile IFN- γ & IL-4 remarkably decreased compared with other groups. **Conclusion:** NAC, an inductor of reductive macrophages (RMp) can alleviate experimental colitis in mice through replenishment of GSH and might be used in prevention and treatment of DSS-induced experimental colitis.

【KEY WORDS】NAC; (NACOMe)₂;DSS; Experimental colitis; Macrophages; Glutathione

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)是一组病因不明的慢性肠道炎症性疾病(IBD),包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD)。其病因学机制与包括免疫异常,遗传影响,和环境因素的相互作用有关。巨噬细胞(M ϕ)在 IBD 的免疫机制中发挥重要作用。近年来的研究发现,反应性氧簇(reactive oxygen species,

ROS)大量生成对 IBD 的发生、发展起着重要作用。胃肠道黏膜自身有抗氧化防御系统,通过中和不断生成的 ROS 从而抵消其损害的影响。在这些防御网络中,内生巯基团,主要是还原型谷胱甘肽(GSH),在一些动物模型中对胃肠道黏膜细胞保护抵抗氧化应激起着重要的作用。之前对抗氧化剂作用的大量研究中,已经报道了在 IBD 病人和实验性结肠炎中包括

[#] 基金项目:北京市自然科学基金项目(7042064)。

GSH 在内的抗氧化剂水平的降低^[1~4]。

N-乙酰半胱氨酸(N-Acetylcysteine, NAC)是一种被广泛研究的 GSH 的抗氧化前体物质,对于因自由基导致的各种疾病状态均起到有益的作用。Ardite 等^[1]研究了 NAC 对 TNBS+乙醇诱导的大鼠实验性肠炎的治疗作用,发现 NAC 可以通过提高黏膜 GSH 水平起到减轻急性肠炎的作用。然而 NAC 对 DSS 诱导的实验性肠炎是否有预防及治疗作用目前还不清楚。本试验通过对 DSS 诱导的 BALB/C 小鼠实验性肠炎在致模前后腹腔内给予还原型 M ϕ 诱导剂 NAC 及氧化型 M ϕ 诱导剂(NACOMe)₂ 以探讨这两种 M ϕ 诱导剂对硫酸葡聚糖钠(Dextran Sodium Sulphate, DSS)诱导的小鼠肠炎模型中 M ϕ 内 GSH 及 GSH/GSSG 比值的影响,以及 NAC 是否对 DSS 实验性肠炎有预防及治疗作用。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性 BALB/C 小鼠,5~6 周龄,体重 18~22g。

1.2 试剂

DSS (Sodium Dextran Sulfate 5000): (Wako Pure Chemical Industries Ltd. 大阪,日本); NAC (Sigma 公司);谷胱甘肽检测试剂盒(Cayman 公司),小鼠 IL-4、IFN- γ 检测试剂盒(Sigma 公司)。

1.3 实验性肠炎模型的建立

将 DSS 加入蒸馏水中配成 5% 的 DSS 溶液,给小鼠自由饮用 7 天。

1.4 分组及给药方法

正常对照组:10 只,给予正常饮食。

生理盐水预处理 DSS 肠炎组:10 只,给予生理盐水 0.5ml/次腹腔注射 3 次/周连续 3 周,从第 3 周开始同时给予 5% 的 DSS 溶液自由饮用 7 天。

生理盐水治疗 DSS 肠炎组:10 只,第 1 周给予 5% 的 DSS 溶液自由饮用 7 天,从第 2 周开始给予生理盐水 0.5ml 腹腔注射 3 次/周连续 2 周。

还原型 M ϕ 诱导剂预处理组:10 只,给予还原型 M ϕ 诱导剂 0.8% 的 NAC 0.5ml/次 [200mg/(kg·次)]腹腔注射 3 次/周连续 3 周,从第 3 周开始同时给予 5% 的 DSS 溶液自由饮用 7 天。

还原型 M ϕ 诱导剂治疗组:10 只,第 1 周开始给予 5% 的 DSS 溶液自由饮用 7 天,从第 2 周开始给予还原型 M ϕ 诱导剂 0.8% 的 NAC 0.5ml/次 [(200mg/(kg·次))]腹腔注射 3 次/周连续 2 周。

氧化型 M ϕ 诱导剂预处理组:10 只,给予氧化型 M ϕ 诱导剂 0.004% 的 (NACOMe)₂ 0.5ml/次 (20mg/次)腹

腔注射 3 次/周连续 3 周,从第 3 周开始同时给予 5% 的 DSS 溶液自由饮用 7 天。

氧化型 M ϕ 诱导剂治疗组:10 只,第 1 周开始给予 5% 的 DSS 溶液自由饮用 7 天。从第 2 周开始给予氧化型 M ϕ 诱导剂 0.004% 的 (NACOMe)₂ 0.5ml/次 (20mg/次)腹腔注射 3 次/周连续 2 周。

1.5 腹腔 M ϕ 采集

实验第 3 周末,将小鼠处死,向腹腔内注入冰镇无酚红、无抗生素的 RPMI1640 5ml,翻转小鼠使液体在腹腔内充分流动,之后将 RPMI1640 从腹腔内吸出,反复 3 次。在 4℃、1500rpm 条件下离心 15 分钟,取 2×10⁶/2ml 的量置于微皿中,在 37℃ CO₂ 孵箱培养 3 小时后,RPMI 1640 洗脱,用橡胶棒将附壁细胞剥离收集。

1.6 肠炎的评估

1.6.1 各组小鼠处死后,先将整段结肠取下,测量结肠长度,肉眼观察结肠的形态,充血、溃疡、糜烂程度和范围。

1.6.2 结肠标本病理评分:炎症细胞的渗出评分标准:0 分—黏膜固有层内有极少量炎症细胞,1 分—黏膜固有层内有较多的炎症细胞或黏膜固有层内的炎症细胞增多,2 分—炎症细胞扩散至黏膜下层,3 分—全层均有炎症细胞渗出;组织损坏评分标准:0 分—无黏膜损伤,1 分—非连续的黏膜上皮损坏,2 分—表层黏膜糜烂,3 分—广泛的黏膜破损并向肠壁深层扩展。

1.7 腹腔 M ϕ 内 GSH, GSSG 的测定

应用谷胱甘肽检测试剂盒检测 M ϕ 中的总谷胱甘肽和 GSH,并计算 GSSG 及 GSH/GSSG 比值。

1.8 病变局部产生细胞因子的测定

应用小鼠 IL-4、IFN- γ 检测试剂盒(ELISA 法)测定 IL-4、IFN- γ 。

1.9 统计学处理

应用 STATA 7.0 软件进行统计学处理,先用 F 检验,验证方差齐性,再进行 t 检验, P0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 临床症状及病理学评价

BALB/C 小鼠给予 5% 的 DSS 溶液 7 天后均出现不同程度的急性肠炎,表现为体重增长较正常组缓慢,便血,腹泻等;病理显示各实验组小鼠结肠均有不同程度的结肠黏膜腺体结构紊乱,单核细胞和多核细胞浸润。

2.1.1 体重变化:对照组体重增加(6.9±0.8)g, NAC、生理盐水及 (NACOMe)₂ 预处理组体重变化

分别为(5.3±1.2)g, (3.9±0.9)g, (5.5±1.3)g, $P > 0.05$ 。NAC、生理盐水、(NACOMe)2 治疗组分别为(6.5±2.0)g, (5.0±1.7)g, (5.7±1.9)g, $P > 0.05$ 。

2.1.2 结肠长度: 对照组结肠长度(10.36±0.8)cm。NAC、生理盐水及(NACOMe)2 预处理组分别为(9.76±0.4)、(9.02±0.4)、(8.45±0.5), $P < 0.05$ 。NAC、生理盐水及(NACOMe)2 治疗组分别为(9.89±0.9), (9.65±0.6), (9.55±0.7), $P > 0.05$ 。

2.1.3 结肠病理评分: NAC、生理盐水、(NACOMe)2 预处理组分别为(1.6±0.5)、(3.0±0.5), (4.4±0.7), $P < 0.001$ 。NAC、生理盐水、(NACOMe)2 治疗组分别为(1.3±1.2), (1.5±0.9), (2.1±0.7), $P > 0.05$ 。

2.2 小鼠腹腔 M ϕ 内总谷胱苷肽及 GSH、GSH/GSSG

2.2.1 总谷胱苷肽: 对照组(4.1±1.1) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$; NAC、生理盐水、(NACOMe)2 预处理组分别为(6.1±0.3) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, (3.1±0.2) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, (2.7±0.5) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, $P < 0.05$ 。NAC、生理盐水、(NACOMe)2 治疗组分别为(5.3±1.1) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, (3.3±0.7) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, (3.6±0.9) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, $P > 0.05$ 。

2.2.2 GSH: 对照组(3.2±0.9) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$; NAC、生理盐水、(NACOMe)2 预处理组分别为(3.5±0.2) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, (2.0±0.3) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, (1.4±0.3) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, $P < 0.05$; NAC、生理盐水、(NACOMe)2 治疗组分别为(4.4±0.5) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, (2.0±0.3) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, (2.1±0.3) $\mu\text{M}/2 \times 10^6$, $P < 0.05$ 。

2.2.3 GSH/GSSG 比值: 对照组 3.55; NAC、生理盐水、(NACOMe)2 预处理组分别为 1.35, 1.82, 1.08。NAC、生理盐水、(NACOMe)2 治疗组分别为 4.89, 1.54, 1.4。

2.3 病变结肠 IL-4 及 IFN- γ 表达

2.3.1 IL-4: 对照组(28.4±2.9)pg/ml; NAC、生理盐水、(NACOMe)2 预处理组分别为(40.4±4.9)pg/ml, (38.7±4.7)pg/ml, (88.2±7.2)pg/ml, $P < 0.001$ 。NAC、生理盐水、(NACOMe)2 治疗组分别为(11.7±5.2)pg/ml, (59.5±4.5)pg/ml, (66.0±6.6)pg/ml, $P < 0.001$ 。

2.3.2 IFN- γ : 对照组(19.4±3.9)pg/ml; NAC、生理盐水、(NACOMe)2 预处理组分别为(9.2±4.7)pg/ml, (20.6±5.7)pg/ml, (19.6±5.2)pg/ml, $P < 0.01$ 。NAC、生理盐水、(NACOMe)2 治疗组分别为(2.7±1.4)pg/ml, (10.7±3.8)pg/ml, (36.5±7.3)

pg/ml, $P < 0.01$ 。

3 讨论

NAC 是一种 GSH 的抗氧化前体物质, 可以刺激代谢, 中和反应性氧簇^[5], 抑制 DNA 相关的自发突变^[6], 并可以抑制恶性细胞的趋化和浸润^[7]。另外, NAC 在体内及体外均表现出对吞噬细胞吞噬过程的刺激作用^[8,9] 并可刺激某些淋巴细胞的功能^[10]。近年来由于其具有抑制致炎分子合成的能力而受到广泛关注。

Ardite 等^[1]曾报告 NAC 对 TNBS+乙醇诱导的大鼠实验性肠炎有治疗作用。本实验证实, NAC 预处理的 DSS 肠炎小鼠, 腹腔 M ϕ 内 GSH 及 GSH/GSSG 升高, 病理学指标均优于(NACOMe)2 及生理盐水预处理组, 提示 NAC 预防性应用可以减轻 DSS 诱导的小鼠肠炎。此外, 致模后应用 NAC 治疗可以明显减低 M ϕ 内 GSSG, 提高 GSH 和 GSH/GSSG 比值, 并明显降低病变结肠 IL-4 和 IFN- γ , 小鼠体重明显增加, 结肠炎症及黏膜损坏减轻等均提示: 应用 NAC 治疗可使 DSS 诱导的小鼠肠炎得到缓解。

(NACOMe)2 是一种氧化型 M ϕ 诱导剂。Murata 等^[11~15]研究发现, 其可能是通过非直接的方式诱导氧化型 M ϕ , 从而使 Th1/Th2 失衡并向 Th2 倾斜。Yamada J 等^[6]实验发现, 给予(NACOMe)2 处理的移植小鼠 Th1 反应减弱, 但没有发现 Th2 型反应升高。本实验研究发现, (NACOMe)2 预处理致使腹腔 M ϕ 内 GSH 和 GSH/GSSG 比值降低、GSSG 升高, 小鼠肠炎临床症状及结肠黏膜病理损伤程度加剧, 且伴随病变结肠分泌的 Th2 型细胞因子 IL-4 亢进, 但对 IFN- γ 无明显影响。

巨噬细胞在宿主抵御有害因素入侵的防御机制中发挥重要作用。根据细胞内 GSH 的含量可将巨噬细胞分为两种类型: GSH 含量高的还原型 M ϕ (reductive macrophages, RMp)和含少量 GSH 的氧化型 M ϕ (oxidative macrophages, OMp)。两者之间的平衡可以通过 RMp 产生的 NO、IL-12、IL-18、IFN- γ 和 OMp 产生的 IL-6、IL-10 和 PGE2 等来调节^[13]。谷胱苷肽是细胞防御氧化损伤的第一道防线。巨噬细胞内的 GSH 可以通过调节 MAPK p38 的活性成为 IL-12 分泌的必需物质, 说明细胞内的 GSH 水平对于决定 Th1/Th2 反应孰占优势起着关键性作用。将 M ϕ 暴露于 IFN- γ 可以增加细胞内 GSH/GSSG 的比值, 而暴露于 IL-4 则结果相反^[11~14]。Hamuro 和 Peterson 等^[17,18]报道了鼠的抗原提呈细胞(APC)或腹腔定居的 M ϕ 中 GSH 的损耗可使 IL-12 的分泌减

少并导致典型的 Th1 反应向 Th2 反应模式转化。Peterson 等^[18]的研究还显示外源性损耗或补充 GSH 物质致 M ϕ 内 GSH 水平变化可以影响 Th1/Th2 失衡。将 GSH 损耗小鼠的 T 细胞与正常 GSH 小鼠的 M ϕ 一起培养可产生正常量的 IFN- γ 。另外 Jeannin 等^[19]在易于产生 IL-4 的培养细胞系统中提高 GSH 浓度可使 IL-4 生成降低,且呈量效依赖关系。上述研究结果充分表明 M ϕ 内的 GSH 水平在调节免疫反应向 Th1 或 Th2 细胞因子转化的发展趋势具有重要作用。

我们以往的研究亦发现^[3,4]DSS 诱导的实验性小鼠肠炎局部及脾脏分泌的 IL-4 增高、IFN- γ 降低且 M ϕ 内 GSH 降低、GSSG 增高,提示该肠炎模型是 Th2 细胞因子和氧化型 M ϕ (OM ϕ)占优势的类型,而且 M ϕ 内 GSH 的降低与 DSS 诱导的实验性肠炎中黏膜损坏、IL-4 增高、IFN- γ 降低相关。本实验进一步证实:DSS 诱导的小鼠肠炎模型中腹腔 M ϕ 经过 NAC 处理后,其 M ϕ 内 GSH 明显增多,使其从氧化型 M ϕ (OM ϕ)优势向还原型 M ϕ (RM ϕ)优势转化,从而使 IL-4 的生成降低。

总之,本实验的研究结果提示还原型巨噬细胞诱导剂 NAC 通过诱导 M ϕ 内 GSH 产生增多从而预防性减轻以及治疗 DSS 诱导的实验性小鼠肠炎。该研究结果为 IBD 的药物拓展了新的思路。

参考文献

- Ardite E, Sans M, Panes J, et al. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental acute colitis. *Lab Invest*, 2000; 80(5): 735~744
- Sido B, Hack V, Hochlehnert A, et al. Impairment of intestinal glutathione synthesis in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*, 1998; 42(4): 485~492
- 张静, 韩英, 纪欣, 等. GSH 在 DSS 诱导的小鼠实验性肠炎中的作用. *世界华人消化杂志* 2005; 13(12): 1400~1403
- 张静, 韩英, 纪欣, 等. DSS 诱导的急性实验性肠炎免疫细胞内 GSH/GSSG 与炎症损伤及细胞因子的关系. *中国医学工程*, 2005; 13(6): 561~566
- De Flora S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*, 1998; 402(1~2): 151~158
- De Flora S, Bennicelli C, Rovida Camoirano A, et al. Inhibition of the 'spontaneous' mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA102 and TA104. *Mutat Res*, 1994; 307(1): 157~167
- Albini A, D'Agostini F, Giunciuglio D, et al. Inhibition of invasion, gelatinase activity, tumor take and metastasis of malignant cells by N-acetylcysteine. *Int J Cancer*, 1995; 61(1): 121~129
- Del Rio M, Ruedas G, Medina S, et al. Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. *Life Sci*, 1998; 63(10): 871~81
- Victor VM, De la Fuente M. N-acetylcysteine improves in vitro the function of macrophages from mice with endotoxin-induced oxidative stress. *Free Radic Res*, 2002; 36(1): 33~45
- De la Fuente M, Victor VM. Anti-oxidants as modulators of immune function. *Immunol Cell Biol*, 2000; 78(1): 49~54
- Murata Y, Yamashita A, Saito T, et al. The conversion of redox status of peritoneal macrophages during pathological progression of spontaneous inflammatory bowel disease in Janus family tyrosine kinase 3(-/-) and IL-2 receptor gamma(-/-) mice. *Int Immunol*, 2002; 14(6): 627~36
- Murata Y, Amao M, Yoneda J, et al. Intracellular thiol redox status of macrophages directs the Th1 skewing in thioresoxin transgenic mice during aging. *Mol Immunol*, 2002; 38(10): 747~757
- Murata Y, Shimamura T, Hamuro J. The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol*, 2002; 14(2): 201~212
- Murata Y, Amao M, Hamuro J. Sequential conversion of the redox status of macrophages dictates the pathological progression of autoimmune diabetes. *Eur J Immunol*, 2003; 33(4): 1001~11
- Murata Y, Ohteki T, Koyasu S, et al. IFN-gamma and pro-inflammatory cytokine production by antigen-presenting cells is dictated by intracellular thiol redox status regulated by oxygen tension. *Eur J Immunol*, 2002; 32(10): 2866~2873
- Yamada J, Maruyama K, Sano Y, et al. Promotion of corneal allograft survival by the induction of oxidative macrophages. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004; 45(2): 448~454
- Hamuro J, Murata Y, Suzuki M. The triggering and healing of tumor stromal inflammation reactions regulated by oxidative and reductive macrophages. *Gann Monograph Cancer Res*, 1999; 48: 153~164
- Peterson JD, Herzenberg LA, Vasquez K, et al. Glutathione levels in antigen-presenting cells modulate Th1 versus Th2 response patterns. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998; 95(6): 3071~3076
- Jeannin P, Delneste Y, Lecoanet-Henchoz S, et al. Thiols decrease human interleukin (IL) 4 production and IL-4-induced immunoglobulin synthesis. *J Exp Med*, 1995; 182(6): 1785~1792