

· 论著 ·

烟酰胺单核苷酸对内毒素休克小鼠死亡率的影响

汪东昇, 郑斯莉, 程明和, 缪朝玉 (海军军医大学药理学教研室, 上海 200433)

[摘要] 目的 探究烟酰胺单核苷酸(NMN)对脂多糖(LPS)诱导的内毒素休克小鼠死亡率的影响。方法 将10周龄C57BL/6J雄性小鼠随机分组,均腹腔注射LPS(10 mg/kg)造模。NMN腹腔注射给药,分为3种方式:①造模后0.5 h给药,剂量为10、30、100、300 mg/kg;②造模前0.5 h给药,剂量为30、100、300、600 mg/kg;③造模后0.5 h和12 h两次给药,每次300 mg/kg。观察记录每组小鼠的死亡情况,并绘制生存曲线。结果 与溶剂对照组相比,造模后0.5 h或造模前0.5 h给予不同剂量NMN,均不能改善小鼠死亡率或延缓死亡时间;造模后0.5 h和12 h两次给予NMN会加速小鼠死亡,增加小鼠死亡率。两个厂家的NMN产品效果类似。结论 NMN对LPS诱导的内毒素休克小鼠不具有治疗作用,小鼠内毒素休克发生后进行NMN多次给药会增加死亡率。

[关键词] 烟酰胺单核苷酸;脂多糖;内毒素休克;死亡率

[中图分类号] R965

[文献标志码] A

[文章编号] 1006-0111(2021)02-0134-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202102006

Effect of nicotinamide mononucleotide on mortality of mice with endotoxic shock

WANG Dongsheng, ZHENG Sili, CHENG Minghe, MIAO Chaoyu (Department of Pharmacology, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of nicotinamide mononucleotide (NMN) on the mortality of the lipopolysaccharide (LPS)-induced endotoxic shock mouse model. **Methods** 10-week-old C57BL/6J male mice were randomly divided into groups, and were injected intraperitoneally (i.p.) with LPS (10 mg/kg) to induce endotoxic shock models. NMN was i.p. injected in three ways: (1) 0.5 h after modeling, doses of 10, 30, 100 and 300 mg/kg; (2) 0.5 h before modeling, doses of 30, 100, 300 and 600 mg/kg; or (3) 0.5 and 12 h after modeling, dose of 300 mg/kg each time. The death times of each group were recorded, and the survival curves were drawn. **Results** Compared with the solvent control group, NMN at different doses given 0.5 h after or before modeling didn't improve the survival rate or delay the death time of endotoxic shock mice; But when given at 0.5 and 12 h 300 mg/kg after modeling, NMN accelerated the death of mice and increased the mortality of mice. NMN products by two manufacturers showed similar effects. **Conclusion** NMN has no therapeutic effect on LPS-induced endotoxic shock, and repeated administration of NMN after endotoxic shock will increase the mortality.

[Key words] nicotinamide mononucleotide; lipopolysaccharide; endotoxic shock; mortality

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)是一种经典辅酶,对线粒体电子转移反应至关重要,在许多生物学功能中起着关键作用^[1]。烟酰胺单核苷酸(NMN)是NAD生物合成的关键中间体。NMN在心脑血管疾病、肝肾功能、血管和内皮功能,以及免疫和炎症、衰老等各类疾病治疗方面都具有相当

强的潜力^[2],常被人称为“万能药”。NMN能够通过口服、静脉注射、腹腔注射(小鼠)等多种给药途径进入体内,通常具有较高的安全性。在急性毒性实验中,小鼠连续7 d给予最大灌胃剂量和饱和浓度的NMN,每天1次,耐受性良好,除血清丙氨酸氨基转移酶略有升高外,其余生物标志物基本保持不变,而相同处理条件下的比格犬,会有轻度的肌酐和尿酸升高^[3];在长期给药实验中,小鼠连续12个月给予100和300 mg/kg的NMN,均未出现不良反应^[4]。在出血性休克治疗方面,对出血性休克大鼠模型,术前连续5 d的NMN饮水给药和术后静脉推注NMN均能缩短休克复苏时间和提高

[基金项目] 上海市科委生物医药领域科技支撑项目(16431901400);国家自然科学基金重点项目(81730098)

[作者简介] 汪东昇,硕士研究生,Email: wangdongsheng126@126.com

[通信作者] 缪朝玉,教授,博士生导师,研究方向:心脑血管药理学,Email: cymiao@smmu.edu.cn

复苏后的存活率^[5]。据报道^[6-9],在炎症治疗方面,NMN及相关代谢产物烟酰胺核糖、烟酰胺都具有一定抗炎作用。

内毒素休克是由感染引起的全身炎症反应综合征,会导致各系统衰竭,包括循环系统、呼吸系统、血液系统,损害肝脏和肾脏功能^[10]。相关研究显示,最佳的治疗时间在发病6 h内,能够提高患者的生存率,降低病死率^[11]。目前临床内毒素休克以药物治疗为主(如血管活性药物、激素、抗菌素等)^[12],同时辅以液体复苏、脑神经保护、吸氧等常规治疗。为便于对内毒素休克开展研究治疗,通常使用LPS进行内毒素休克动物造模,LPS是G-菌细胞壁外膜上的主要成分,也叫内毒素,能引起严重的炎症级联反应,是G-菌的主要致病成分之一^[13]。

目前,NMN对内毒素休克的治疗作用尚未知。本研究旨在探究NMN对LPS诱导的内毒素休克小鼠模型的死亡率影响,为阐明NMN在内毒素休克治疗方面的作用提供线索。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂与仪器

烟酰胺单核苷酸 [NMN, 纯度 $\geq 95\%$, $-25 \sim -15^\circ\text{C}$ 保存,邦泰生物工程(深圳)有限公司];烟酰胺单核苷酸 [NMN~, 纯度 $\geq 95\%$, $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 保存,尚科生物医药(上海)有限公司];脂多糖(LPS,美国Sigma公司);BT25S精密电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司];独立通风系统(上海鸣励实验室科技发展有限公司)。

1.2 实验动物

SPF级8周龄雄性C57BL/6J小鼠(西普尔-必凯实验动物有限公司)。实验前在相对洁净的环境下使用独立通风系统,将动物适应性饲养2周。期间动物自由饮水、进食。笼具内温度 $22 \sim 26^\circ\text{C}$ 、湿度 $40\% \sim 70\%$,笼内维持正压 $20 \sim 25\text{ Pa}$,每小时换气次数 $60 \sim 70$ 次,室内明暗交替12 h(8:00~20:00照明)。

1.3 动物分组、模型制备与给药处理

根据不同实验目的,将C57BL/6J小鼠随机分为给药组和对照组。腹腔注射LPS(10 mg/kg)进行内毒素休克造模,在造模前或者造模后进行NMN腹腔注射给药,给药方式分为单次给药和两次给药方式。具体分成5个实验:①造模后0.5 h给药,剂量为10、30、100、300 mg/kg;②造模前0.5 h给药,剂量为30、100、300、600 mg/kg;③造模后0.5 h和12 h两次给药,每次300 mg/kg;④造模后

0.5 h和12 h分别用2种不同厂家的NMN给药,剂量为300 mg/kg;⑤造模前0.5 h用不同厂家的NMN给药,剂量为300 mg/kg。

1.4 统计方法

使用Log-rank检验,对给药组和溶剂对照组的生存曲线进行比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,使用GraphPad Prism8软件对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 LPS造模后0.5 h单次给予NMN无明显治疗作用

如图1所示,LPS造模后0.5 h给予300 mg/kg NMN组小鼠首次出现死亡的时间比生理盐水组更早,整个观察期间给药组小鼠死亡的总体趋势要稍快于生理盐水组,且在观察末期存活的动物数量略少。但两组生存曲线之间比较无统计学差异($P = 0.2161$)。因此,LPS造模后0.5 h给予300 mg/kg NMN不具有治疗内毒素休克的作用,甚至有轻微增加内毒素休克死亡率趋势。

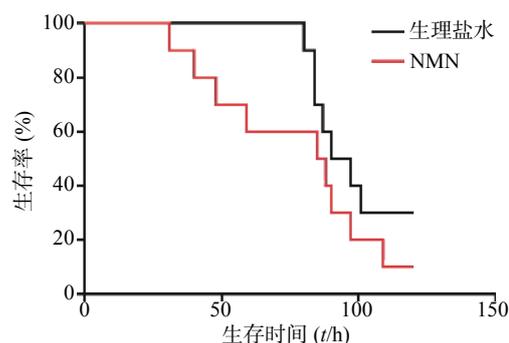


图1 LPS造模后300 mg/kg NMN单次给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响($n=10$)

实验进一步考察了LPS造模后0.5 h给予多个不同剂量NMN对内毒素休克死亡率的影响,如图2所示,与生理盐水组相比,10、30、100、300 mg/kg NMN给药组的小鼠首次出现死亡的时间均接近,各组中位生存时间:300、100、30、10 mg/kg给药组分别为51、55、41和38 h,生理盐水组为37 h。整个观察期间NMN给药各组死亡速度较生理盐水组稍缓,其中放缓趋势最明显的是100 mg/kg剂量组,但均不具有统计学意义($P=0.4334$),表明小鼠在LPS造模后0.5 h单次给予NMN不能改善内毒素休克死亡率或减缓死亡速度。

2.2 LPS造模前0.5 h单次给予NMN无明显治疗作用

在LPS造模前0.5 h进行NMN给药。如图3所示,300 mg/kg NMN预防给药组小鼠首次出现死

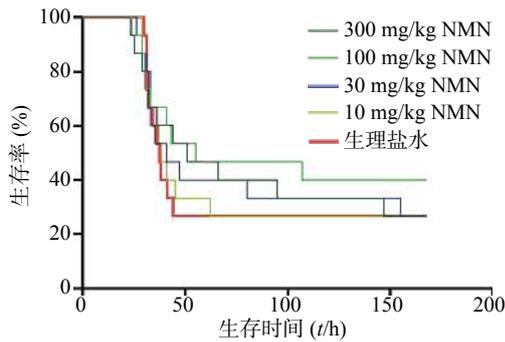


图2 LPS造模后不同剂量NMN单次给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响 ($n=14$)

亡的时间稍早于生理盐水组,而2组死亡的总体趋势相近,前者的中位生存时间为83 h,后者为91 h,生存曲线比较无统计学差异($P=0.5946$),故LPS造模前0.5 h给予300 mg/kg NMN不能改善内毒素休克小鼠的死亡率,不具有防治作用。

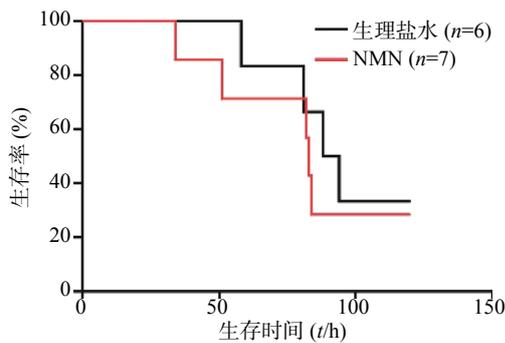
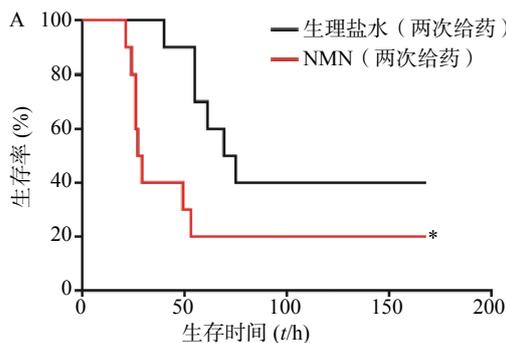


图3 LPS造模前300 mg/kg NMN单次给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响

随后又进行多个不同剂量NMN单次预给药实验。如图4所示,NMN 30、100、300、600 mg/kg组与生理盐水组小鼠首次出现死亡的时间均相近,之后各组死亡趋势也类似,各组中位生存时间分别是:NMN给药组30 mg/kg为34 h、100 mg/kg为43 h、300 mg/kg为40 h、600 mg/kg为55 h,生理盐水组为37 h,各组生存曲线也无统计学意义。结果表



明,在造模前进行NMN单次预给药对于LPS构建的内毒素休克模型无明显改善生存率的作用。

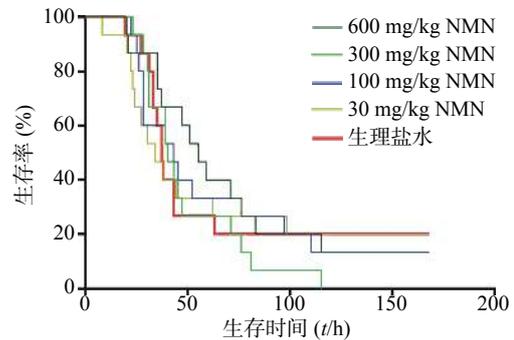


图4 LPS造模前不同剂量NMN单次给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响 ($n=15$)

2.3 LPS造模后0.5 h和12 h两次给予NMN增加内毒素休克死亡率

考虑到NMN在体内的代谢速度较快,能够迅速入血进入各个组织器官并代谢为活性分子NAD,而NAD被证明在多种炎症性疾病中具有保护作用,因此,观察NMN的2次给药是否对内毒素休克有治疗效果。

如图5所示,2次重复实验结果均表明,LPS造模后0.5 h和12 h,给予2次NMN(每次300 mg/kg)治疗组小鼠其首次出现死亡的时间早于生理盐水组;之后,NMN治疗组小鼠死亡速度明显快于对照组,且观察末期NMN治疗组小鼠存活率不及对照组一半,2次重复实验的生存曲线间均具有统计学差异($P=0.0404$; $P=0.0038$)。因此,该结果表明,LPS造模后2次NMN给药明显增加小鼠内毒素休克死亡率。

2.4 不同厂家NMN对LPS引起的内毒素休克的作用基本相同

不同厂家生产的NMN因药物纯度、杂质成分不同等,可能导致治疗效果有差别。为排除非药物分子本身因素如厂家生产工艺因素,进一步明确上

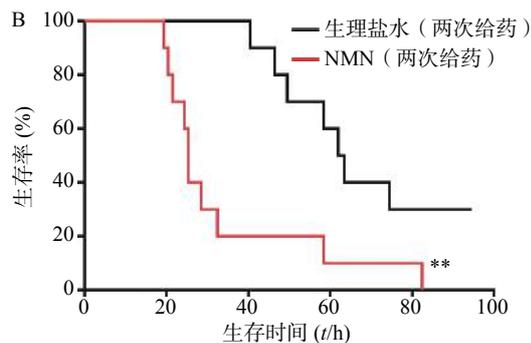


图5 LPS造模后两次NMN给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响 ($n=10$)

* $P<0.05$ 、** $P<0.01$,与生理盐水组比较。

述 NMN 治疗内毒素休克的作用,接着引入另一厂家生产的 NMN(以下均简称 NMN~),并同时测试比较两家 NMN 产品治疗内毒素休克的效果。

实验首先对 LPS 造模后 0.5 h 和 12 h 的 2 次给予 NMN(每次 300 mg/kg)增加内毒素休克死亡率的作用进行了验证。如图 6 所示, NMN 给药组和 NMN~给药组这 2 组小鼠首次出现死亡的时间和观察末期小鼠存活数都接近,整个观察期小鼠死亡趋势非常相似,与生理盐水对照组相比,两组都明显加重内毒素休克小鼠的死亡率,与对照组的生存曲线间均有统计学差异($P=0.0499$; $P=0.0260$)。3 组中位生存时间分别是: NMN 给药组 57.5 h、NMN~给药组 51.5 h、生理盐水组 106.5 h。此外,该结果与上述单个 NMN 产品连续 2 次给药效果类似(图 5)。因此,两家 NMN 产品效果基本相同,也进一步证明了 LPS 造模后 0.5 h 和 12 h 的 2 次给予 NMN(每次 300 mg/kg)确实可加重内毒素休克病情,加速小鼠的死亡。

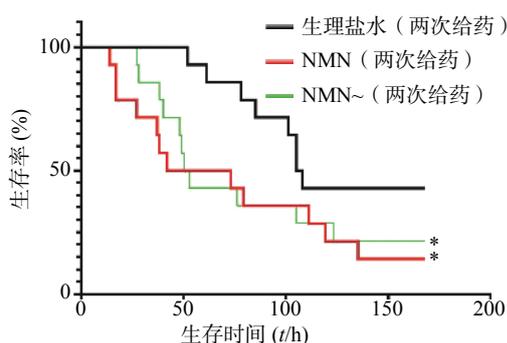


图 6 不同厂家 NMN 两次给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响 ($n=14$)
* $P<0.05$,与生理盐水组比较。

最后,实验又考察了两家 NMN 产品预防给药效果,即在 LPS 造模前 0.5 h 进行 NMN 或 NMN~给药。如图 7 所示, NMN 组、NMN~组、生理盐水组 3 组小鼠首次出现死亡的时间及之后每组小鼠死亡的速度都相近,直至每组均剩 20% 小鼠存活(第 71 小时)。之后,生理盐水组小鼠不再死亡,而 NMN 组、NMN~组小鼠陆续死亡殆尽。3 组中位生存时间分别是: NMN 给药组 40 h、NMN~给药组 45 h、生理盐水组 37 h。可见,两家 NMN 产品作用相似,对 LPS 所致的内毒素休克无治疗效果,且与生理盐水组比较时均有加重内毒素休克死亡率的趋势,但是均无统计学意义($P=0.6447$; $P=0.9725$)。该结果与上述 NMN 单次预防给药的实验结果相一致(图 3 和图 4)。

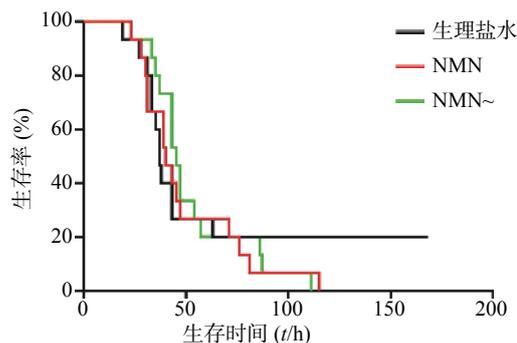


图 7 不同厂家 NMN 预防给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响 ($n=15$)

3 讨论和总结

目前 NMN 是保健品领域的开发热点,以抗衰老以及各类疾病治疗作用为目的,在国内外已有不少人开始服用 NMN^[14]。但是 NMN 对内毒素休克的作用尚未知,对患有这种疾病的患者能否服用 NMN 亦不清楚。

根据现有的研究报道, NMN 在小鼠疾病模型其腹腔注射给药的有效剂量为 10 ~ 600 mg/kg^[2,4]。本实验中,我们测试了不同 NMN 剂量尤其是 300 mg/kg 时小鼠内毒素休克的治疗效果,结果显示,小鼠在 LPS 造模后 0.5 h 或造模前 0.5 h 单次给予不同剂量 NMN 均无明显改善生存率的作用,不具有治疗效果;甚至在 LPS 造模后两次 NMN 给药明显增加小鼠内毒素休克死亡率。为排除厂家生产工艺等因素,我们又同时用两个厂家生产的 NMN 产品进行实验,以重复上述结果,最终再次证明 LPS 造模后两次给予 NMN 确实可加速小鼠的死亡,增加死亡率。

因此,本次实验结果表明, NMN 在某些疾病尚未证明其安全性的情况下,应谨慎推广,尤其是内毒素休克的患者,应慎用甚至是禁用 NMN 治疗。

【参考文献】

- [1] YOSHINO J, BAUR J A, IMAI S I. NAD⁺ intermediates: the biology and therapeutic potential of NMN and NR[J]. *Cell Metab*, 2018, 27(3): 513-528.
- [2] HONG W Q, MO F, ZHANG Z Q, et al. Nicotinamide mononucleotide: a promising molecule for therapy of diverse diseases by targeting NAD⁺ metabolism[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 246.
- [3] YOU Y N, GAO Y, WANG H, et al. Subacute toxicity study of nicotinamide mononucleotide via oral administration[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 604404.

(下转第 142 页)