

· 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($8:00 \sim 20:00$ 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。

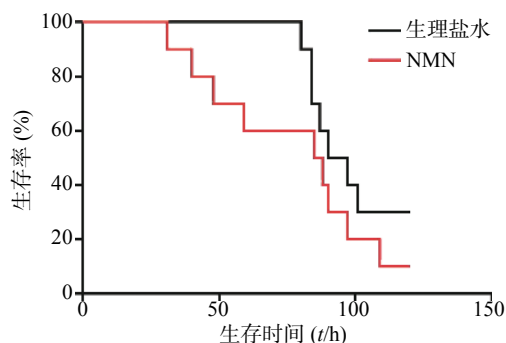


图 1 LPS 造模后 300 mg/kg NMN 单次给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响 ($n=10$)

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

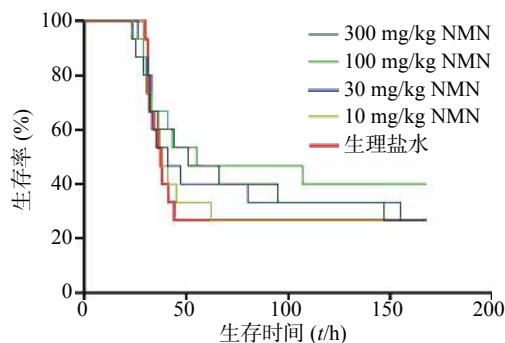


图2 LPS造模后不同剂量NMN单次给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响 ($n=14$)

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。

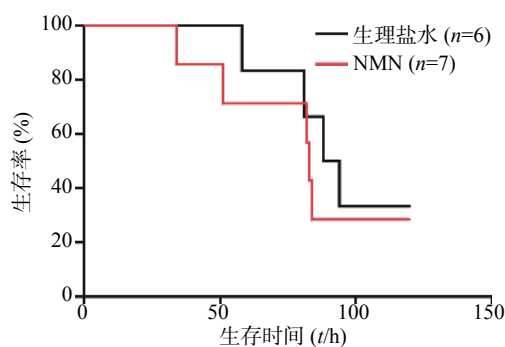


图3 LPS造模前300 mg/kg NMN单次给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响

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。

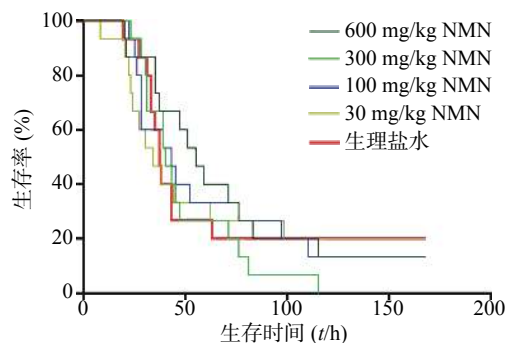


图4 LPS造模前不同剂量NMN单次给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响 ($n=15$)

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

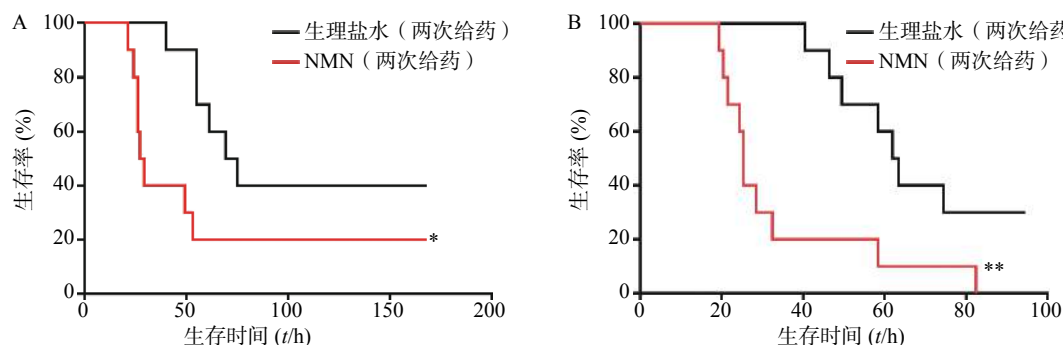


图5 LPS造模后两次NMN给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响 ($n=10$)

* $P<0.05$, ** $P<0.01$,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。

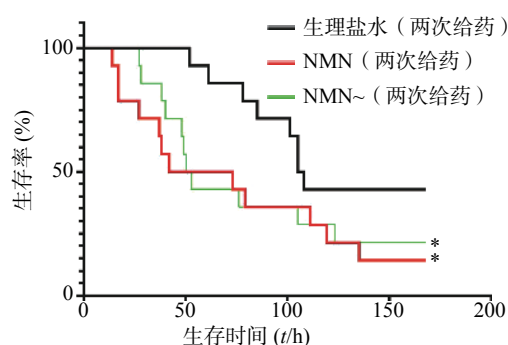


图 6 不同厂家 NMN 两次给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响 ($n=14$)
* $P<0.05$,与生理盐水组比较。

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)。

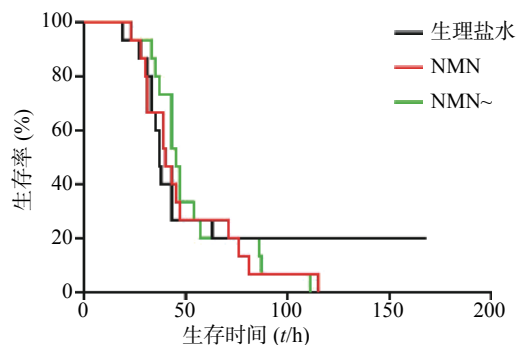


图 7 不同厂家 NMN 预防给药对内毒素休克小鼠生存时间的影响 ($n=15$)

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)

- [2] BODNAR R J, KELLY D D, STEINER S S, et al. Stress-produced analgesia and morphine-produced analgesia: lack of cross-tolerance[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1978, 8(6): 661-666.
- [3] BODNAR R J, KELLY D D, SPIAGGIA A, et al. Dose-dependent reductions by naloxone of analgesia induced by cold-water stress[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1978, 8(6): 667-672.
- [4] OSSENKOPP K P, RABI Y J, ECKEL L A, et al. Reductions in body temperature and spontaneous activity in rats exposed to horizontal rotation: abolition following chemical labyrinthectomy[J]. *Physiol Behav*, 1994, 56(2): 319-324.
- [5] FOX R A, LAUBER A H, DAUNTON N G, et al. Off-vertical rotation produces conditioned taste aversion and suppressed drinking in mice[J]. *Aviat Space Environ Med*, 1984, 55(7): 632-635.
- [6] LI Z Y, ZHANG X D, ZHENG J M, et al. *Pica* behavior induced by body rotation in mice[J]. *ORL*, 2008, 70(3): 162-167.
- [7] OSSENKOPP K P, MACRAE L K, BETTIN M A, et al. Body-rotation induced analgesia in male mice: effects of duration and type of rotation procedure[J]. *Brain Res Bull*, 1988, 21(6): 967-972.
- [8] OSSENKOPP K P, BETTIN M A, KAVALIERS M. The effects of naloxone on body rotation-induced analgesia and anorexia in male mice[J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1989, 34(2): 317-320.
- [9] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 882-887.
- [10] KIM M S, KIM J H, JIN Y Z, et al. Temporal changes of cFos-like protein expression in medial vestibular nuclei following arsanilate-induced unilateral labyrinthectomy in rats[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 319(1): 9-12.
- [11] OSSENKOPP K P, PARKER L A, LIMBEER C L, et al. Vestibular lesions selectively abolish body rotation-induced, but not lithium-induced, conditioned taste aversions (oral rejection responses) in rats[J]. *Behav Neurosci*, 2003, 117(1): 105-112.
- [12] KHAN Z, CAREY J, PARK H J, et al. Abnormal motor behavior and vestibular dysfunction in the stargazer mouse mutant[J]. *Neuroscience*, 2004, 127(3): 785-796.
- [13] WU W J, SHA S H, MCLAREN J D, et al. Aminoglycoside ototoxicity in adult CBA, C57BL and BALB mice and the Sprague-Dawley rat[J]. *Hear Res*, 2001, 158(1-2): 165-178.
- [收稿日期] 2020-12-02 [修回日期] 2021-02-26
[本文编辑] 陈盛新

(上接第 137 页)

- [4] MILLS K F, YOSHIDA S, STEIN L R, et al. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(6): 795-806.
- [5] SIMS C A, GUAN Y X, MUKHERJEE S, et al. Nicotinamide mononucleotide preserves mitochondrial function and increases survival in hemorrhagic shock[J]. *JCI Insight*, 2018, 3(17): 120182.
- [6] MÉNDEZ-LARA K A, LETELIER N, FARRE N, et al. Nicotinamide prevents apolipoprotein B-containing lipoprotein oxidation, inflammation and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(11): 1162.
- [7] MEHMEI M, JOVANOVIĆ N, SPITZ U. Nicotinamide riboside-the current state of research and therapeutic uses[J]. *Nutrients*, 2020, 12(6): 1616.
- [8] KISS T, NYÚL-TÓTH Á, BALASUBRAMANIAN P, et al. Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation promotes neurovascular rejuvenation in aged mice: transcriptional footprint of SIRT1 activation, mitochondrial protection, anti-inflammatory, and anti-apoptotic effects[J]. *Geroscience*, 2020, 42(2): 527-546.
- [9] HONG G L, ZHENG D, ZHANG L L, et al. Administration of nicotinamide riboside prevents oxidative stress and organ injury in Sepsis[J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 123: 125-137.
- [10] 盛杰, 张福琴, 魏萍, 等. 抗菌药物诱导内毒素释放及抗内毒素药物研究进展[J]. *医药导报*, 2004, 23(4): 252-253.
- [11] 金泓, 赖旭东, 关信民, 等. 血必净注射液在脓毒症治疗中的疗效观察[J]. *中医临床研究*, 2017, 9(36): 71-73.
- [12] 王洪亮, 章志丹, 黄伟. 拯救脓毒症运动: 脓毒症与感染性休克治疗国际指南(2016)的解读与展望[J]. *中华重症医学电子杂志*, 2017, 3(1): 26-32.
- [13] 张含飞, 张金龙, 王振华. 抗内毒素药物的研究进展[J]. *畜牧与饲料科学*, 2008, 29(1): 57-60.
- [14] IRIE J, INAGAKI E, FUJITA M, et al. Effect of oral administration of nicotinamide mononucleotide on clinical parameters and nicotinamide metabolite levels in healthy Japanese men[J]. *Endocr J*, 2020, 67(2): 153-160.
- [收稿日期] 2021-02-05 [修回日期] 2021-03-10
[本文编辑] 陈盛新