

地骨皮水提液对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的保护作用机制

张天柱*, 张景龙, 郝彬彬, 徐江
(长春中医药大学, 长春 130117)

[摘要] **目的:**探讨地骨皮水提物对内毒素(lipopolysaccharide, LPS)诱导小鼠的急性肺损伤(acute lung injury, ALI)保护作用。**方法:**小鼠LPS($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ ip}$)复制ALI动物模型。将小鼠随机分为空白组、模型组、地塞米松组($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、地骨皮水提液高、低剂量组($20, 10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$),腹腔注射给药。观察各组肺组织病理学改变,测量肺湿质量/干质量,支气管肺泡灌洗液(BALF)中性粒细胞百分比、肺组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、炎症因子白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量及肺组织中SOD与MDA蛋白表达。**结果:**地骨皮水提液能降低肺泡灌洗液(BALF)中炎症细胞的数目,能显著降低肺湿质量/干质量,与空白组相比,模型组肺组织MDA含量升高($P < 0.01$),SOD活性降低($P < 0.05$),MDA蛋白水平显著升高,SOD蛋白水平显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,地骨皮水提液组BALF中SOD活性显著升高($P < 0.05$),MDA蛋白水平降低($P < 0.05$),并可有效减轻LPS所致肺组织病理学变化。**结论:**地骨皮水提液可减轻LPS所致急性肺组织损伤。

[关键词] 地骨皮水提液; 炎症; 内毒素诱导急性肺损伤; 超氧化物歧化酶; 丙二醛;

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0147-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220147

Lycium chinense Water Extract Attenuates Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice

ZHANG Tian-zhu*, ZHANG Jing-long, HAO Bin-bin, XU Jiang
(Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the protective effect of *Lycium chinense* water extract (LCM) on acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS). **Method:** The BALB/c mice were randomly allocated into control group, LPS model group, dexamethasone ($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) group, LCM ($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and LCM ($20\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) group by intraperitoneal injection. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) samples were analyzed for the concentration of numbers of neutrophilic, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and the lung samples were taken for histologic evaluation and for determination of wet-to-dry (W/D) lung weight, the protein levels of SOD and MDA were detected by Western blot analysis. **Result:** Pretreatment with LCM prior to the administration of intratracheal LPS significantly induced a decrease in lung wet weight/dry weight ratio, in total leukocyte number and neutrophil percent in the BALF, and in MDA activity of lung in dose-dependent manners, and in IL-6, the TNF- α in the BALF and MDA protein in lung and increased SOD protein in lung ($P < 0.01$), compared with model the group. At the same time, compared with the blank group, pretreatment with LCM also significantly improved the SOD activity ($P < 0.05$) and decreased the MDA activity in lung ($P < 0.05$). **Conclusion:** These results showed that anti-inflammatory effects of LCM against the LPS-induced ALI.

[Key words] *Lycium chinense* water extract; inflammation; lipopolysaccharide-induced acute lung injury; superoxide dismutase; malondialdehyde

[收稿日期] 20140513(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273883);吉林省中医药科技项目(2012-083)

[通讯作者] *张天柱,在读博士,讲师,从事中药资源与中药药理学研究,Tel:0431-86172690,E-mail:zhangtz452@126.com

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是指严重感染、创伤、休克等打击后, 出现以肺泡毛细血管损伤导致肺水肿和肺不张为病理特征的一种肺部炎症与通透性增加综合征。虽然对其治疗有一些新的突破, 但其发病机制尚未完全阐明, 发病率和病死率依然居高不下^[1]。大量临床资料分析发现, 革兰阴性杆菌脓毒症是引起 ALI, 并导致其死亡的主要原因之一^[2]。内毒素是革兰阴性杆菌细胞外膜成分之一, 主要致病物质是脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)。虽然抗生素可杀灭侵入机体的细菌, 对细菌释放的内毒素却无作用。有时应用抗生素, 使细菌裂解和死亡后, 可释放更多的 LPS^[3-4]。

氧化应激本质上是指机体在遭受各种有害刺激时体内高活性分子, 如活性氧自由基和活性氮自由基的产生过多, 氧化程度超出氧化物的清除, 使氧化系统和抗氧化系统失衡, 活性氧在体内堆积产生毒性, 引起多不饱和脂肪酸的脂质过氧化反应, 从而导致组织损伤, 有资料报道, ALI 发生肺组织活性氧大量生成, 进而导致肺泡表面活性物质系统受损及炎症反应调控失衡^[5-6]。

地骨皮为茄科落叶灌木枸杞的干燥根皮, 为《中国药典》收载品种, 其味甘、性寒, 具有凉血止血、清热退蒸、清泄肺热、清热滋阴、清热解毒的功效。对地骨皮的记载始见于《外台秘要》, 因其根的形状像细的骨头而得名。地骨皮主要含生物碱类、有机酸类、萜醌类、环肽类等生物活性成分^[7]。现代药理学研究表明, 地骨皮具有降血压、调血脂、降血糖、解热、抗菌及抗病毒等活性^[8-9]。本研究旨在探讨地骨皮通过调节肺部氧化应激抗肺损伤的作用机制。

1 材料

1.1 药物 地骨皮 *Lycium chinense* 购自吉林大药房药业股份有限公司, 经长春中医药大学王德友教授鉴定为地骨皮。

1.2 动物 BALB/c 小鼠, 雌性, 体重 18 ~ 22 g, 购自长春亿斯实验动物技术有限责任公司, 动物合格证号 SCXK(吉)2010-0001。

1.3 地骨皮水提取液制备 取干燥地骨皮 500 g, 加双蒸水 (1:10), 煮沸 2 次。每次 60 min, 合并滤液, 浓缩至浸膏, 浸膏得率为 17.8%, 置冰箱中备用, 用时采用蒸馏水溶解配置成质量浓度 1 g·mL⁻¹ 的液体。

1.4 试剂 LPS (L2880, 大肠埃希菌 055 类型; B5,

购自美国 Sigma 公司。由无菌水配制成储备液 1 g·L⁻¹, -20 °C 避光保存, 使用时用注射用生理盐水配成 0.5 g·L⁻¹ 备用)。丙二醛 (MDA), 超氧化物歧化酶 (SOD), 白介素-6 (IL-6), 肿瘤坏死因子- α (TNF- α), SOD 抗体、MDA 抗体等试剂盒购自南京建成生物有限公司。

1.5 仪器 KX-21 型细胞计数仪 (美国 Sysmex), SH1 型倒置显微镜 (Olympus)。

2 方法

2.1 小鼠急性肺损伤模型复制及分组 取小鼠 50 只, 以 25% 氨基甲酸乙酯 1 g·kg⁻¹ *ip* 麻醉, 随机分成 5 组: 空白组 (*ip* 生理盐水); 模型组 (*ip* LPS, 5 mg·kg⁻¹), 地骨皮水提液高、低剂量组 (20, 10 g·kg⁻¹) 于 *ip* LPS 前 1 h 给予地骨皮水提液, *ip* 每组 10 只小鼠。注射 LPS 或生理盐水后 6 h 结束实验, 取肺及肺泡灌洗液 (BALF) 测定各项指标。

2.2 指标检测

2.2.1 肺组织湿重/干重 取右上肺叶称湿重, 80 °C 恒温箱烤 48 h 至干重恒定, 称干重, 计算湿/干比。

2.2.2 BALF 中总细胞及中性粒细胞计数 取 BALF, 用破红细胞液破除红细胞, 在显微镜下计数总细胞及中性粒细胞数。

2.2.3 肺组织 SOD, MDA 测定 肺组织 SOD, MDA 测定按照试剂盒说明书进行测定。

2.2.4 肺病理学检查 切取右肺, 以 4% 的多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋, 切片, HE 染色, 光镜下观察肺组织病理学改变。

2.2.5 BALF 中 IL-6, TNF- α 检测 肺泡灌洗液中 IL-6, TNF- α 检测按照试剂盒方法进行。

2.2.6 SOD 和 MDA 蛋白表达水平 将肺组织置于冰冷的裂解液收集裂解物总蛋白, 组织蛋白行 SDS-PAGE 并转印至 PVDF 膜; 室温封闭 2 h, 分别与 SOD 和 MDA 一抗孵育, 膜经漂洗后再与辣根过氧化物酶偶联的二抗反应, 增强化学发光法 (ECL) 发光试剂显影, 灰度成像软件 (UVP, UK) 测定主带的吸光度 (A) 以计算 SOD 和 MDA 蛋白表达水平。

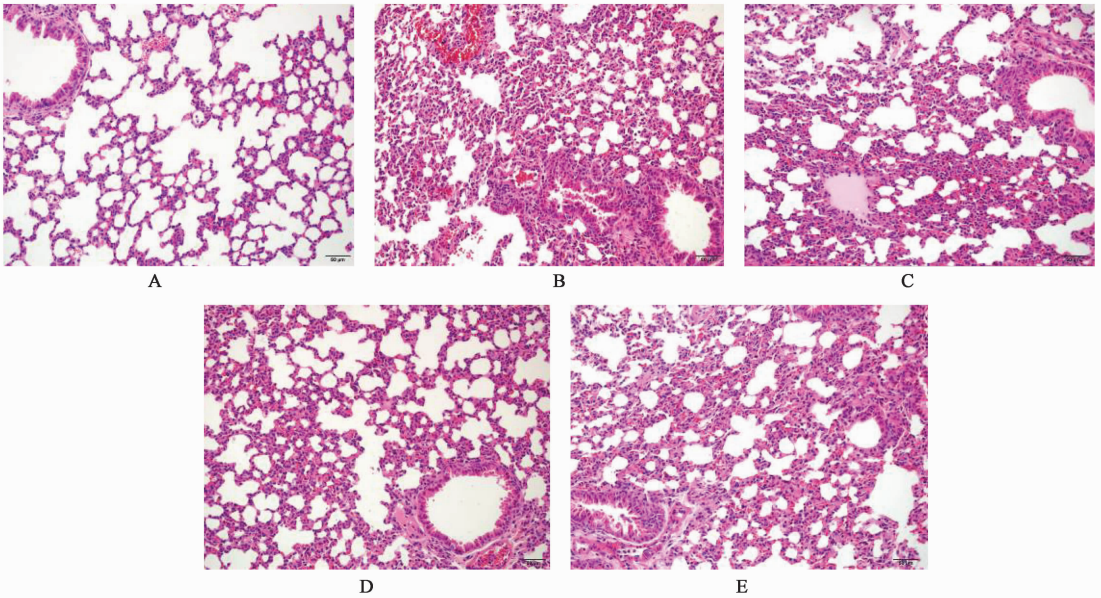
2.3 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示多组间比较采用方差分析, 两两比较用 *q* 检验, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 肺组织的病理学变化 光镜观察显示, 空白组肺组织形态基本正常; 模型组肺泡毛细血管充血

扩张,肺间质及肺泡间隔明显增宽,炎性水肿,大量炎性细胞浸润;地骨皮水提液组上述变化明显减

轻,仅见肺泡毛细血管轻度充血扩张,少量炎性细胞浸润和局灶性肺间隔增宽(图1)。



A. 空白组;B. 模型组;C. 地塞米松 $2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;D. 地骨皮水提液 $10 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组;E. 地骨皮水提液 $20 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组(图2同)

图1 骨皮水提液对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤肺组织病变的影响(HE, $\times 200$)

3.2 肺组织湿/干质量、肺组织中 SOD, MDA 模型 与空白组相比,模型组肺组织湿重/干重升高 ($P < 0.05$);地骨皮水提液可降低 LPS 所致肺组织湿质量/干质量的升高 ($P < 0.05$);与空白组相比,

模型组肺组织 MDA 含量升高 ($P < 0.01$);与空白组比较,模型组肺组织中 SOD 活性降低 ($P < 0.05$),地骨皮水提液组肺组织中 SOD 显著升高 ($P < 0.01$),见表1。

表1 地骨皮水提液对 LPS 所致小鼠 ALI 肺组织湿质量/干质量, SOD, MDA 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 $/\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	肺组织 湿重/干重	SOD $/\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	MDA $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	1.87 ± 0.12	44.21 ± 4.24	15.43 ± 2.48
模型	-	$5.92 \pm 0.18^{1)}$	$12.35 \pm 4.37^{1)}$	$58.41 \pm 3.1^{1)}$
地塞米松	2×10^{-3}	$2.89 \pm 0.11^{3)}$	$32.41 \pm 4.46^{3)}$	$21.35 \pm 2.67^{3)}$
地骨皮水提液	10	$4.11 \pm 0.12^{2)}$	$28.12 \pm 4.31^{2)}$	$35.25 \pm 2.17^{2)}$
	20	$3.82 \pm 0.16^{2)}$	$25.17 \pm 4.12^{3)}$	$31.14 \pm 2.43^{2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ (表2同)。

3.3 对肺泡灌洗液中总细胞及中性粒细胞计数, IL-6, TNF- α 含量的影响 与空白组相比, LPS 组肺泡灌洗液中总细胞及中性粒细胞计数升高 ($P < 0.05$),地骨皮水提液组肺泡灌洗液中总细胞数及中性粒细胞计数显著降低 ($P < 0.05$),见表2。与空白组相比, LPS 组肺泡灌洗液中 IL-6, TNF- α 含量显著升高 ($P < 0.05$),地骨皮水提液组肺泡灌洗液中 IL-6, TNF- α 含量降低 ($P < 0.05$),见表2。

3.4 肺组织中 SOD 和 MDA 蛋白水平 与空白组相比, LPS 组肺组织中 MDA 蛋白水平显著升高,

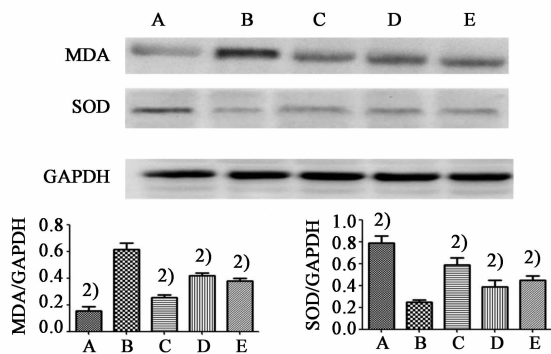
SOD 蛋白水平显著下降 ($P < 0.05$);地骨皮水提液组肺组织中 MDA 蛋白水平降低, SOD 显著上升 ($P < 0.05$),见图2。

4 讨论

ALI 和急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是由多种炎性介质及效应细胞共同参与,并呈级联放大的瀑布样炎症继发性损伤与继发性弥漫性肺实质损伤。目前除采用抗生素、肾上腺皮质激素、机械通气及吸氧等措施外,尚无有效的治疗药物与方法。这促使我们寻

表 2 地骨皮水提液对肺泡灌洗液中总细胞及中性粒细胞的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	总细胞数 /×10 ⁶ /L	中性粒细胞数 /×10 ⁶ /L	IL-6 /ng·L ⁻¹	TNF-α /ng·L ⁻¹
空白	-	62.43 ± 4.22	25.32 ± 3.15	46.32 ± 3.33	101.25 ± 4.22
模型	-	176.35 ± 4.27 ¹⁾	92.34 ± 3.25 ¹⁾	116.26 ± 3.41 ¹⁾	185.35 ± 4.59 ¹⁾
地塞米松	2 × 10 ⁻³	82.39 ± 4.21 ³⁾	38.36 ± 3.33 ³⁾	59.21 ± 3.25 ³⁾	131.25 ± 4.18 ³⁾
地骨皮水提液	10	124.36 ± 4.82 ²⁾	60.26 ± 3.26 ²⁾	80.47 ± 3.18 ²⁾	162.32 ± 4.29 ²⁾
	20	96.15 ± 4.26 ²⁾	53.15 ± 3.22 ²⁾	73.28 ± 3.55 ²⁾	135.33 ± 4.17 ²⁾



与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$

图 2 地骨皮水提液对 ALI 小鼠肺组织中 SOD 和 MDA 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

找新药物来治疗 ALI。

地骨皮主要含生物碱类、有机酸类、萜醌类、环肽类等生物活性成分。现代药理学研究表明,地骨皮具有降血压、调血脂、降血糖、解热、抗菌及抗病毒等活性。本文采用 LPS 建立急性肺损伤模型来评价地骨皮水提液的抗急性肺损伤作用机制,地骨皮水提物能显著减低模型小鼠肺泡灌洗液中的白细胞、炎症因子含量,提高 SOD 活性;降低 MDA 含量,改善模型小鼠肺组织病理改变,并能降低肺组织中 MDA 蛋白水平,提高 SOD 蛋白水平,提示地骨皮水提液可能是通过调节 SOD/MDA 氧化应激平衡来达到抗急性肺损伤的作用。

[参考文献]

- [1] Wheeler A P, Bernard G R. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review [J]. Lancet, 2007, 369 (9572):1553.
- [2] Suresh R, Kupfer Y, Tessler S, et al. Acute respiratory distress syndrome [J]. New Engl J Med, 2000, 343 (9):660.
- [3] Gutsmann T, Schromm A B, Brandenburg K. The physicochemistry of endotoxins in relation to bioactivity [J]. Intern J Med Microbiol, 2007, 297(5):341.
- [4] 张秋金,沈洪,张维,等. 纳洛酮与甲基泼尼松龙联用对急性肺损伤大鼠肺组织核转录因子-κB 表达的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(6):370.
- [5] He X, Han B, Mura M, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitor captopril prevents oleic acid-induced severe acute lung injury in rats [J]. Shock, 2007, 28 (1):106.
- [6] 李宏杰,孔小燕,景友玲,等. 黄芪抗缺血/再灌注后肺损伤机制的实验研究 [J]. 山东医药, 2005, 45 (12):17.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:化学工业出版社, 2005:82.
- [8] 国家中医药管理局中华本草编委会. 《中华本草》[M]. 上海:上海科学技术出版社, 1996:274.
- [9] 谢练武,李顺件,谢宇霞,等. 活性跟踪法研究地骨皮中抑制 NF-κB 的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(4):689.

[责任编辑 聂淑琴]