

葛根素对大鼠急性肺损伤的影响

何科

(玉林市中西医结合骨科医院, 广西 玉林 537000)

[摘要] **目的:**探讨葛根素对大鼠急性肺损伤的作用机制。**方法:**将60只Wistar大鼠随机分成正常组,模型组,地塞米松组($3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),葛根素高、中、低剂量组($10, 5, 2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),每组10只。*ig*给药,连续给药7 d。正常组和模型组给予等体积的生理盐水。末次给药30 min后,*ip* 20%酵母混悬液($5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)1次,注射12 h后再次*ip* 1次20%酵母混悬液($5\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)诱发大鼠急性肺损伤模型。末次给药24 h后,切取肺组织,HE染色后进行病理学观察。测定肺组织的湿干比重。检测大鼠肺组织中超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和丙二醛(MDA)的水平。ELISA法检测血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)的含量。Western blot法测定肺组织中核转录因子- κ B(NF- κ B)的蛋白表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠肺组织湿干比重明显升高,MDA, TNF- α , IL-6以及NF- κ B的含量明显升高,SOD, GSH-Px的水平明显降低($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,葛根素组的大鼠肺组织湿干比重降低,MDA, TNF- α , IL-6以及NF- κ B的含量下降,SOD, GSH-Px的水平明显增加($P < 0.05$)。肺组织出血、细胞浸润减轻。**结论:**预先给予葛根素可明显减轻急性肺损伤大鼠肺组织炎症反应及肺水肿程度,其机制可能是通过降低TNF- α , IL-6, NF- κ B的含量,发挥其抗氧化应激的作用,达到保护作用。

[关键词] 葛根素; 急性肺损伤; 核转录因子- κ B; 抗氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0178-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050178

Effect of Puerarin on Rats with Acute Lung Injury

HE Ke

(Yulin Orthopedics Hospital of Chinese and Western Medicine, Yulin 537000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the protective effect of puerarin on acute lung injury in rats. **Method:** Sixty Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, dexamethasone group ($3\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), high-, medium-, low-dose ($10, 5, 2.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) puerarin groups, with 10 rats in each group. Rats were intragastrically gavaged with drugs for 7 days. Normal group and model group were given normal saline. Thirty minutes after last gavage, the acute lung injury rat model was induced through intraperitoneal injection with 20% yeast suspension every 12 h for twice. After 24 h, lung tissues were removed and stained with HE for pathological observation. The wet and dry proportion, superoxide dismutase (SOD), glutathione-peroxidase (GSH-Px) and malonaldehyde (MDA) in lung tissue were determined. Serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) contents were detected with ELISA method. The protein expression of nuclear factor- κ B (NF- κ B) was measured using Western blot. **Result:** Compared with model group, model group showed significant increases in wet and dry proportion of lung tissues, MDA, TNF- α , IL-6, NF- κ B contents and decreases in SOD and GSH-Px levels ($P < 0.05, P < 0.01$). Compared with model group, puerarin groups showed significant decreases in wet and dry proportion of lung tissues, MDA, TNF- α , IL-6, NF- κ B contents and increases in GSH-Px levels ($P < 0.05$), with alleviations in lung hemorrhage and cellular infiltration. **Conclusion:** The inflammatory response and pulmonary edema in lung tissues can be relieved in acute lung injury rats by puerarin intervention,

[收稿日期] 20150209(027)

[基金项目] 广西高校科学技术研究项目(LX2014085); 广西研究生教育创新计划项目(20111105981002M173)

[第一作者] 何科,副主任中药师,从事生化药理研究,E-mail:heke201307@163.com

and its protective mechanism is associated with antioxidative stress by lowering TNF- α , IL-6, NF- κ B levels.

[Key words] puerarin; acute lung injury; nuclear factor- κ B; antioxidative stress

急性肺损伤(ALI)是由于肺部感染或创伤所造成肺泡上皮细胞及毛细血管内皮细胞损伤而形成的弥漫性肺间质及肺泡水肿的炎症反应,随病情的发展可导致的急性低氧性呼吸功能不全^[1]。临床上多表现为进行性低氧血症、非心源性肺水肿和呼吸窘迫等症状^[2]。ALI发病机制错综复杂,其机制迄今也尚未完全阐明。目前ALI的治疗方案为药物治疗或机械通气2种方案^[3]。葛根为豆科植物野葛干燥的根,性凉,味甘、辛、归脾、胃经,主治解肌退热、生津、透疹、升阳止泻。葛根素为葛根中提取分离出来的有效成分,具有提高免疫,增强心肌收缩力,保护心肌细胞,降低血压,抗炎抗氧化等作用^[4-5]。本实验采用ALI大鼠模型,探讨葛根素对ALI的治疗作用及机制。

1 材料

1.1 动物 Wistar大鼠,SPF级,雌雄各半,体重(200±20)g,由广西医科大学实验动物中心提供,动物合格证号SCXK(桂)2009-0005。

1.2 药物及试剂 葛根素注射液(扬子江药业有限公司,批号YH20140208Y03),地塞米松磷酸钠注射液(天津药业集团新郑股份有限公司,批号140126),核因子- κ B(NF- κ B)兔抗大鼠单抗(美国Thermo Scientific公司,批号PA5-16758),超氧化物歧化酶(SOD),脂质过氧化代谢产物丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号140827),肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-6(IL-6)ELISA检测试剂盒(晶美生物工程有限公司,批号20140810)。

1.3 仪器 Gel doc 2000型低温高速离心机(德国西门子公司),722S型紫外分光光度计(上海精密科学仪器有限公司),9602A型酶标仪(北京艾普生物设备有限公司),Mini Protean 3 Cell型垂直电泳仪/转膜及显影设备(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 分组、给药及造模^[6] 将60只Wistar大鼠随机分成正常组,模型组,地塞米松组(3 mg·kg⁻¹),葛根素高、中、低剂量组(10,5,2.5 mg·kg⁻¹),每组10只。ig给药,每日1次,连续给药7 d。正常组和模型组给予等体积的生理盐水。末次给药30 min后,ip 20%酵母混悬液(5 mL·kg⁻¹)1次,注射12 h后再次 ip 1次 20%酵母混悬液(5 mL·kg⁻¹)

诱发大鼠急性肺损伤模型。正常组注射同等体积的生理盐水。末次注射2 h后,颈椎脱臼处死大鼠。

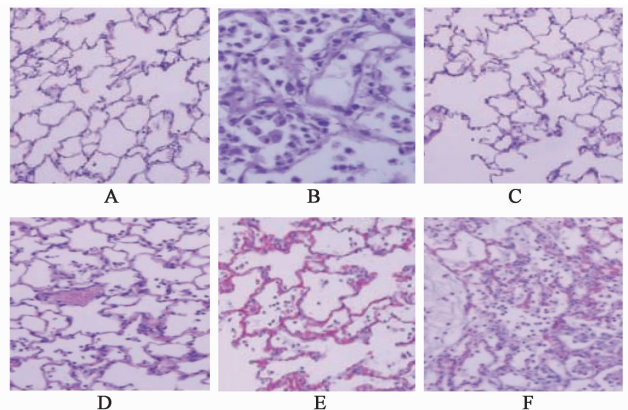
2.2 肺组织湿干重比测定 剥离大鼠左肺部,用滤纸吸干肺组织表面的水分和血液后称湿重(W)。置70℃烘烤箱内烘干72 h至恒重,称量得干重(D),计算肺组织湿干重比(W/D)。

2.3 观察指标 切取肺组织,10%甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木素伊红(HE)染色进行病理学观察。测定肺组织的W/D。检测大鼠肺组织中SOD,GSH-Px,MDA的水平。ELISA法检测血清中TNF- α ,IL-6的含量。Western blot法测定肺组织中NF- κ B的蛋白表达。

2.4 统计学分析 采用SPSS 15.0软件进行统计分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,经方差齐性检验,方差齐者采用t检验,方差不齐者采用校正t检验进行处理,以P<0.05为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠肺组织病理学的影响 正常组大鼠肺组织内肺泡腔完整清晰,隔无水肿、细胞浸润等情况出现。模型组大鼠肺泡腔有破损程度严重,肺泡壁增厚,泡腔内有大量中性粒细胞浸润和淋巴细胞存在。地塞米松组和葛根素组肺泡破损程度随剂量的增大而减小,肺水肿情况减轻,肺泡壁增厚不明显,泡腔内炎症细胞数量随剂量的增加而减少。见图1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 地塞米松组;D. 葛根素 10 mg·kg⁻¹组;E. 葛根素 5 mg·kg⁻¹组;F. 葛根素 2.5 mg·kg⁻¹组(图2同)

图1 葛根素对急性肺损伤大鼠肺部病理变化的影响(HE,×400)
Fig.1 Effect of puerarin on pathological changes of lung in acute lung injury of rats (HE,×400)

3.2 对大鼠肺组织的 W/D 的影响 与正常组比较,模型组大鼠肺组织 W/D 重明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,地塞米松组、葛根素组的大鼠肺组织 W/D 重降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 对大鼠肺组织中 SOD, GSH-Px, MDA 水平的影响 与正常组比较,模型组肺组织中 SOD 和 GSH-Px 的水平下降,MDA 含量上升 ($P < 0.05$)。与模型组比较,地塞米松组和葛根素组的大鼠肺组织中 SOD, GSH-Px 的水平增加,MDA 的含量降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 葛根素对大鼠肺组织中 SOD, GSH-Px, MDA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effects of puerarin on SOD, GSH-Px, MDA levels in rat lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	SOD/U·mg ⁻¹	GSH-Px/U·mg ⁻¹	MDA/U·mg ⁻¹
正常	-	34.26 ± 5.17	49.78 ± 6.83	1.96 ± 0.42
模型	-	13.07 ± 3.43 ¹⁾	24.65 ± 4.24 ¹⁾	3.82 ± 1.25 ¹⁾
地塞米松	3	31.85 ± 5.60 ³⁾	44.29 ± 5.87 ³⁾	2.24 ± 0.68 ³⁾
葛根素	10	30.43 ± 4.81 ³⁾	42.83 ± 5.06 ³⁾	2.32 ± 1.37 ³⁾
	5	26.59 ± 5.09 ³⁾	37.21 ± 4.91 ³⁾	2.57 ± 0.81 ³⁾
	2.5	22.14 ± 5.37 ³⁾	32.48 ± 4.82 ³⁾	2.94 ± 1.31 ³⁾

表 1 葛根素对大鼠肺组织的 W/D 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of puerarin on proportion of wet to dry in rat lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	W/D
正常	-	3.81 ± 0.25
模型	-	5.24 ± 0.37 ¹⁾
地塞米松	3	4.15 ± 0.21 ³⁾
葛根素	10	4.26 ± 0.30 ³⁾
	5	4.52 ± 0.29 ³⁾
	2.5	4.78 ± 0.22

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

3.4 对急性肺大鼠血清中 TNF- α , IL-6 含量的影响 正常组大鼠肺组织中 TNF- α , IL-6 的含量比模型组大鼠低 ($P < 0.01$)。与模型组相比,葛根素组的大鼠肺组织 TNF- α , IL-6 的含量下降 ($P < 0.01$)。见表 3。

表 3 葛根素对急性肺大鼠血清中 TNF- α , IL-6 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of puerarin on rats with acute lung serum TNF- α , IL-6 content ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-6 /ng·L ⁻¹
正常	-	30.23 ± 6.25	93.44 ± 11.19
模型	-	409.56 ± 35.75 ²⁾	897.21 ± 26.72 ²⁾
地塞米松	3	92.76 ± 24.08 ⁴⁾	115.37 ± 29.25 ⁴⁾
葛根素	10	136.42 ± 25.52 ⁴⁾	128.22 ± 34.19 ⁴⁾
	5	167.69 ± 38.12 ⁴⁾	173.51 ± 39.63 ⁴⁾
	2.5	209.37 ± 42.77 ⁴⁾	238.83 ± 47.26 ⁴⁾

3.5 对肺组织中 NF- κ B 的蛋白含量的影响 与正常组比较,模型组肺组织中 NF- κ B 蛋白含量升高。与模型组比较,地塞米松组和葛根素组的大鼠肺组织 NF- κ B 的含量下降 ($P < 0.05$)。见表 4, 图 2。

表 4 葛根素对肺组织中 NF- κ B 的蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of puerarin on protein expression of NF- κ B in rat lung tissue ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NF- κ B
正常	-	0.15 ± 0.02
模型	-	0.79 ± 0.14 ²⁾
地塞米松	3	0.24 ± 0.05 ⁴⁾
葛根素	10	0.32 ± 0.08 ⁴⁾
	5	0.49 ± 0.06 ³⁾
	2.5	0.58 ± 0.08 ³⁾

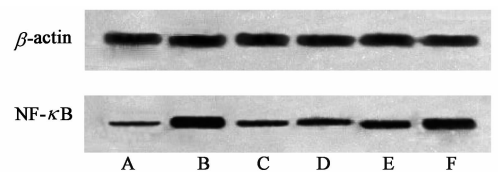


图 2 葛根素对肺组织中 NF- κ B 的蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of puerarin on protein expression of NF- κ B in rat lung tissue

4 讨论

心源性以外的各种致病因素所导致的急性、进行性缺氧性呼吸衰竭或肺损伤称为 ALI, 临床表现主要为呼吸窘迫、顽固性低氧血症和非心源性肺水肿为特征^[7]。ALI 的发病和病情发展的病理表现以

肺组织中嗜中性粒细胞渗出、趋化、聚集并与血管内皮细胞黏附,释放大量炎症介质和多种细胞因子等炎症反应为主^[8]。嗜中性粒细胞大量聚集滞留于肺组织中将导致肺微血管通透性增加、肺水肿^[9]。从实验结果也可看出,模型组大鼠肺泡腔破损程度严重,泡腔内有大量中性粒细胞浸润和淋巴细胞存在,肺组织湿干比重较正常组明显升高。说明肺损伤大鼠模型成功。

嗜中性粒细胞大量存在可使呼吸爆发脱颗粒释放大量的氧自由基。大量的氧自由基会造成机体内脂质过氧化,导致细胞膜失去功能或死亡而破坏机体内的细胞。SOD 和 GSH-Px 均是机体内重要的过氧化物分解酶,均可催化体内超氧自由基发生歧化反应,使其反应生成过氧化氢,从而对机体内氧自由基进行消除^[10]。MDA 是脂质过氧化的主要中间产物,可被 GSH-Px 还原,其含量降低对机体氧化损伤有一定防御作用^[11]。给予葛根素后,大鼠肺组织中 SOD, GSH-Px 的含量较模型组明显增加,MDA 的含量显著降低。提示葛根素有一定抗自由基对肺组织细胞的损伤和抑制肺组织中脂质过氧化的现象。

ALI 发病机制主要以炎症反应为主,表现为促炎因子的过度激活、抗炎因子释放不足、细胞因子失衡等方面。促炎细胞因子主要包含 TNF- α , IL-1, IL-6 等因子^[12]。在肺损伤模型中, TNF- α 和 IL-6 血清含量显著升高,说明这两种促炎因子的活性被过度激活。给予葛根素后, TNF- α 和 IL-6 的含量明显回落。NF- κ B 是一种转录因子, NF- κ B 的活化是炎症反应的一个中心环节^[13]。许多 TNF- α , IL-1, IL-6 等促炎症细胞因子的基因中均有与 NF- κ B 的结合位点。NF- κ B 通过结合位点与促炎细胞因子和细胞间黏附分子的结合,从而调节多种炎症介质的基因表达。实验结果显示,葛根素组的大鼠肺组织 NF- κ B 的蛋白含量下降。提示葛根素对促炎因子有一定的抑制作用,并下调急性肺损伤大鼠中肺部 NF- κ B 的蛋白含量,使 ALI 所引发的炎症反应得到缓解而达

到治疗的效果。

[参考文献]

- [1] 钱桂生. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征的诊断与治疗[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(4): 371-373.
- [2] 张骅, 张民, 徐鹏. 急性肺损伤的治疗进展[J]. 临床肺科杂志, 2008, 13(9): 1181-1184.
- [3] 帅维正, 李琦, 王长征, 等. 71 例急性呼吸窘迫综合征的预后指标分析[J]. 解放军医学杂志, 2009, 34(4): 377-380.
- [4] 伟唯, 江培. 葛根素药理作用研究进展[J]. 黑龙江医药, 2014, 27(1): 51-55.
- [5] 宋卉, 李银花, 郑晖, 等. 葛根素的药理作用与临床研究进展[J]. 现代医药卫生, 2011, 27(19): 2936-2937.
- [6] 黄媛恒, 李映新, 谭宏棣, 等. 玉郎伞提取物对大鼠急性肺损伤的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(7): 174-177.
- [7] 王占海, 沈凌涛, 陈向东, 等. 水飞蓟素对脂多糖性大鼠急性肺损伤的拮抗作用[J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(2): 280-283.
- [8] 刘韧, 肖南, 田昆仑, 等. 兔胸部撞击伤时中性粒细胞凋亡与肺损伤的关系[J]. 中国烧伤创疡杂志, 2000(4): 14-18.
- [9] 高振秋, 张巧, 徐彤, 等. 嗜中性粒细胞是人抵抗素表达的主要细胞[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2011, 27(1): 48-54.
- [10] 陈鸿鹏, 谭晓风. 超氧化物歧化酶(SOD)研究综述[J]. 经济林研究, 2007, 25(1): 59-60.
- [11] 陈菁菁, 方垂, 李芳序, 等. 丙二醛对大鼠空间学习、记忆能力及海马 CA1 区超微结构的影响[J]. 动物学报, 2007, 53(6): 1041-1047.
- [12] 冯龙华, 王导新, 何婧, 等. 芦丁对脂多糖致小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 南方医科大学学报, 2014, 34(9): 1282-1285.
- [13] 张继峰, 雒晓甜, 侯林义, 等. 骨髓间充质干细胞对脓毒症急性肺损伤大鼠肺内 NF- κ B 影响的研究[J]. 中国当代医药, 2014, 21(13): 4-8.

[责任编辑 周冰冰]