

甜牛大力和苦牛大力总黄酮对小鼠急性肺损伤的影响

杜顺霞¹, 黄慧学², 蒙雪芳¹, 谢婵¹, 梁秋云^{1*}, 刘华刚¹

(1. 广西医科大学药学院, 南宁 530021; 2. 广西中医药大学药学院, 南宁 530020)

[摘要] **目的:**探讨甜牛大力总黄酮(TFRMS)和苦牛大力总黄酮(TFRMC)对小鼠急性肺损伤(ALI)模型的作用,并观察TFRMS和TFRMC抗炎作用的差异。**方法:**采用脂多糖(LPS)致小鼠ALI模型,观察TFRMS和TFRMC对小鼠ALI模型的抗炎作用,测定小鼠肺泡灌洗液(BALF液)中白细胞数(WBC)和总蛋白量(Pro),免疫组化法测定小鼠肺组织中核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)的表达,酶联免疫吸附试验(ELISA)测定肺组织中白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)含量,实时荧光定量PCR法测定IL-6, TNF- α mRNA的表达量,苏木素-伊红(HE)染色观察肺组织病理形态的改变。**结果:**与正常组比较,模型组WBC数,Pro,IL-6和TNF- α 水平显著增加($P < 0.01$),肺组织有炎症改变;与模型组比较,TFRMS和TFRMC可明显减少小鼠急性肺炎BALF液的WBC数量,Pro渗出量($P < 0.05, P < 0.01$),显著降低肺组织NF- κ B p65蛋白水平($P < 0.01$),抑制IL-6, TNF- α mRNA表达($P < 0.05, P < 0.01$),减少肺组织中IL-6和TNF- α 水平($P < 0.05, P < 0.01$);从组织病理学的角度上观察到,TFRMS和TFRMC各剂量组均可减轻LPS引起的急性肺损伤。**结论:**TFRMS和TFRMC均具有明显的抗炎作用,TFRMC和TFRMS作用效果相似,其抗炎作用机制可能是通过干扰NF- κ B p65途径,减少IL-6, TNF- α mRNA表达,从而抑制IL-6和TNF- α 炎症介质的生成。

[关键词] 甜牛大力; 苦牛大力; 总黄酮; 抗炎作用; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α ; 核转录因子- κ B

[中图分类号] R99; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)08-0160-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017080160

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170210.0912.018.html>

[网络出版时间] 2017-02-10 9:12

Effect of Total Flavonoids from *Millettia Speciosa* and *Millettia Championi Radix* on Acute Lung Injury in Mice

DU Shun-xia¹, HUANG Hui-xue², MENG Xue-fang¹, XIE Chan¹, LIANG Qiu-yun^{1*}, LIU Hua-gang¹

(1. College of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;

2. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530020, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of total flavonoids from *Millettia Speciosa Radix* (TFRMS) and *Millettia Championi Radix* (TFRMC) on acute lung injury (ALI) in mice models and observe the differences in anti-inflammatory effect between TFRMS and TFRMC. **Method:** ALI mice models were induced by lipopolysaccharide (LPS), and then the anti-inflammation effect of TFRMS and TFRMC was observed in ALI mice models. The numbers of white blood cell (WBC) and the content of protein were determined in Bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Then the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) in the lung tissues were detected by enzymelinked immunosorbent assay (ELISA), the expression levels of nuclear factor- κ B (NF- κ B) p65 in lung tissues were determined by immunohistochemistry, the mRNA expression levels of IL-6 and TNF- α were detected by Real-time PCR method, and the pathological changes of lung tissues were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. **Result:** As compared with normal group, the count of WBC, protein

[收稿日期] 20161104(007)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(2015GXNSFAA139196)

[第一作者] 杜顺霞,在读硕士,从事中药抗炎作用及机制研究,Tel:18648943050,E-mail:dushunxia27@yahoo.com

[通讯作者] *梁秋云,博士,副教授,从事中药药理作用及机制研究,Tel:0771-5304163,E-mail:qiu-liang@163.com

content, levels of IL-6 and TNF- α were significantly increased in model group ($P < 0.01$), with inflammatory changes in lung tissues. As compared with the model group, the count of WBC and content of protein were decreased in BALF of TFRMS and TFRMC groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$); the NF- κ B p65 protein expression in lung tissues was significantly decreased ($P < 0.01$); IL-6 and TNF- α mRNA expression levels and contents in the lung tissue were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). From the perspective of histopathology, various dose groups of TFRMS and TFRMC can reduce the acute lung injury induced by LPS. **Conclusion:** Both TFRMS and TFRMC had significant similar anti-inflammation effect, and their mechanism may be associated with interfering the NF- κ B pathway, reducing the mRNA expression levels of IL-6 and TNF- α , and inhibiting IL-6 and TNF- α inflammatory mediators.

[**Key words**] Millettiae Speciosae Radix; Millettia Championi Radix; total flavonoids; anti-inflammatory effect; interleukin-6 (IL-6); tumor necrosis factor-alpha (TNF- α); nuclear factor- κ B (NF- κ B)

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是以中性粒细胞浸润的炎症反应、肺水肿及肺间质纤维化等为病理特征的临床综合征,严重者可以发展为急性呼吸窘迫综合征(acuterespiratory distress syndrome, ARDS),可由严重感染、创伤、中毒、休克等肺内外疾病引起^[1-2]。近期调查研究表明轻度 ARDS 患者死亡率为 34.9%,中度 ARDS 患者死亡率为 40.3%,重度 ARDS 患者死亡率为 46.1%^[3],死亡率仍然居高不下。尽管经过多年研究,ARDS 的治疗方法仍是以肺保护性机械通气为主^[4],尚缺乏有效的治疗药物,因此寻找有效的防治药物具有非常重要的临床指导意义。

牛大力是豆科美丽崖豆藤的干燥根,习称甜牛大力^[5],商品中常混有一种苦味牛大力,属绿花崖豆藤,习称苦牛大力^[5],民间常将两者混用。甜牛大力传统用于肺结核、慢性支气管炎、风湿性关节炎等^[6]的治疗。现研究表明甜牛大力多糖可通过核转录因子(NF)- κ B 通路抑制脂多糖(LPS)引起 RAW 246.7 细胞的炎症反应^[7],甜牛大力总黄酮可通过抑制环氧合酶途径起到抗肝炎作用^[8],但甜牛大力总黄酮(TFRMS)和苦牛大力总黄酮(TFRMC)对于急性肺损伤引起肺炎的影响尚未见文献报道。LPS 是革兰阴性菌细胞壁的主要成分,可通过信号转导通路激活 NF- κ B 促进肺部合成并释放炎症介质,如白细胞介素(IL)-6,肿瘤坏死因子(TNF)- α ,引起肺组织的弥漫性炎症损伤^[9]。本实验采用 LPS 致小鼠 ALI 炎症模型,对 TFRMS 和 TFRMC 的抗炎作用及其机制进行探讨,并观察两者作用的差异,为甜牛大力用于治疗急性肺损伤及进一步开发应用提供理论依据,并为苦牛大力的药用开发提供价值导向。

1 材料

1.1 药物与试剂 甜牛大力,苦牛大力均由广西

南宁市嘉元中药材专业合作社提供,经广西中医药研究所赖茂祥研究员鉴定甜牛大力为豆科蝶型花亚科崖豆藤属植物美丽崖豆藤 *Millettia speciosa* 的干燥根,苦牛大力为豆科蝶型花亚科崖豆藤属植物绿花崖豆藤 *M. championi* 的干燥根;醋酸地塞米松片(浙江仙琚制药股份有限公司,批号 140518);LPS (Sigma 公司,批号 93572-42-1);考马斯亮蓝试剂盒(南京建成生物研究所,批号 20160323);TNF- α , IL-6 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海源叶有限公司,批号分别为 201620160101A, 20160101A);RNA 提取试剂盒,聚合酶链式反应(PCR)试剂盒[TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司,批号分别为 KA2401, AK7706];兔抗小鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体(Thermo Scientific 公司,批号 PA5-16545);山羊抗兔二抗(Supervision 公司,批号 D3002),DAB 显色试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司,批号 1610110031)。

1.2 仪器 EL204 型电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司],Spectra MarPlus384 型连续光谱扫描酶标仪(香港分子仪器公司),ABI 7300 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

1.3 动物 SPF 级昆明小鼠,雌雄各半,体重 18 ~ 22 g。动物及颗粒饲料均由广西医科大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(桂)2014-0002。由广西医科大学实验动物伦理委员会批准,符合实验动物伦理学等规定。

2 方法

2.1 TFRMS 和 TFRMC 制备 分别取甜牛大力和苦牛大力药材适量,粉碎至 40 目。均以 75% 乙醇为提取溶剂,按料液比 1:8 回流提取 3 次,过滤,合并滤液,滤液减压浓缩成含生药 2 g·L⁻¹ 的提取液;

提取液再经 AB-8 型大孔树脂分离纯化后得 TFRMS 和 TFRMC 提取液,浓缩成总黄酮质量浓度 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 备用。

2.2 肺泡灌洗液 (BALF 液) 中白细胞 (WBC) 计数,总蛋白 (Pro),肺组织病理检查及免疫组化测定 参考 ALI 造模方法^[10],取 90 只小鼠,雌雄各半,随机分为 9 组:正常组,模型组,地塞米松组 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),TFRMS 和 TFRMC 高、中、低剂量 ($40, 20, 10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 组,灌胃 (*ig*),连续 7 d,末次给药 30 min 后 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉;鼻腔给药,各组予以 LPS ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}, 50 \mu\text{L}/\text{只}$) 造模 (正常组予以等剂量生理盐水),24 h 后处死。结扎左肺,右侧肺行支气管肺泡灌洗,每次 0.5 mL,共 3 次,BALF 液置冰浴中。置冰浴中的 BALF 液充分混匀后,取 0.1 mL 加入白细胞计数稀释液 0.1 mL,混匀后进行 WBC 计数。余 BALF 液 $4 \text{ }^\circ\text{C}, 3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液按考马斯亮蓝试剂盒说明测定 Pro 含量。

取左肺,用 10% 甲醛固定,石蜡包埋切片,作苏木素-伊红 (HE) 染色,观察肺组织的病理改变及炎症细胞浸润等情况。采用免疫组化二步法测定 NF-

$\kappa\text{B p65}$ 蛋白表达,将石蜡切片脱蜡,由 3% 过氧化氢阻断内源性过氧化物酶,兔抗小鼠 NF- $\kappa\text{B p65}$ 多克隆抗体, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜,洗涤后,用山羊抗兔二抗孵育 1 h。DAB 显色。NF- $\kappa\text{B p65}$ 蛋白阳性反应产物呈棕黄色颗粒,免疫组化切片用光学显微镜拍照,每片随机选取 5 个视野,图片使用 IPWIN 60 软件分析,计算 NF- $\kappa\text{B p65}$ 阳性细胞率。

2.3 肺组织炎症因子测定 取另一批小鼠,给药及造模同 2.2 项。取右肺于冰浴制成 10% 匀浆液, $4 \text{ }^\circ\text{C} 3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清按 ELISA 试剂盒说明检测炎症细胞因子 IL-6, TNF- α 含量;左肺存于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 备用。

2.4 实时荧光定量 PCR 测定肺组织中 IL-6, TNF- α mRNA 表达 取各组适量肺组织,用 Trizal 提取总 RNA,测定纯度后逆转入成 cDNA 后,以 β -肌动蛋白 (β -actin) 为内参,采用实时荧光定量 PCR 分析 IL-6, TNF- α mRNA 表达量。PCR 扩增的条件:预变性 $95 \text{ }^\circ\text{C} 30 \text{ s}, 95 \text{ }^\circ\text{C} 5 \text{ s}, 60 \text{ }^\circ\text{C} 31 \text{ s}$,共 40 个循环。引物序列均由 TaKaRa 宝生物工程 (大连) 有限公司合成。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 IL-6, TNF- α mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	上游	下游	长度/bp
β -actin	5'-CATCCGTAAGACCTCTATGCCAAC-3'	5'-ATGGAGCCACCGATCCACA-3'	1 889
IL-6	5'-GGAGCCCACCAAGAACGATA-3'	5'-TCACCAGCATCAGTCCCAAG-3'	1 083
TNF- α	5'-GCCAGGAGGGAGAACAGAACTC-3'	5'-GGCCAGTGAGTGAAAGGGACA-3'	1 653

2.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间的均数比较采用 *t* 检验,多组之间的均数比较用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TFRMS 和 TFRMC 对 ALI 小鼠 BALF 液 WBC 和 Pro 的影响 与正常组比较,模型组中的 WBC 数,Pro 显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,TFRMS 和 TFRMC 各剂量组均能显著减少小鼠 BALF 液的 WBC ($P < 0.01$),并呈一定的剂量依赖性;TFRMS 和 TFRMC 各剂量组均可明显降低 Pro 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$),TFRMS 对 Pro 的作用呈一定的剂量依赖性;TFRMS 和 TFRMC 相应剂量组间作用效果相似,差别无统计学意义。见表 2。

3.2 TFRMS 和 TFRMC 对 ALI 小鼠肺组织中炎症因子的影响 与正常组比较,模型组中 IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较,TFRMS

表 2 TFRMS 和 TFRMC 对 ALI 小鼠 BALF 液中 WBC 数和 Pro 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of TFRMS and TFRMC on WBC count and Pro content in BALF of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	WBC/ $\times 10^8$ 个/L	Pro/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	1.09 ± 0.47	0.68 ± 0.05
模型	-	$4.58 \pm 0.98^{1)}$	$0.98 \pm 0.09^{1)}$
地塞米松	5	$1.12 \pm 0.56^{3)}$	$0.56 \pm 0.14^{3)}$
TFRMS	10	$1.95 \pm 0.79^{3)}$	$0.85 \pm 0.10^{2)}$
	20	$1.74 \pm 0.73^{3)}$	$0.82 \pm 0.09^{2)}$
	40	$1.62 \pm 0.73^{3)}$	$0.69 \pm 0.15^{3)}$
TFRMC	10	$1.67 \pm 0.63^{3)}$	$0.80 \pm 0.14^{2)}$
	20	$1.63 \pm 0.90^{3)}$	$0.81 \pm 0.07^{2)}$
	40	$1.13 \pm 0.50^{3)}$	$0.83 \pm 0.10^{2)}$

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$;与 TFRMS 同剂量组比较⁴⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

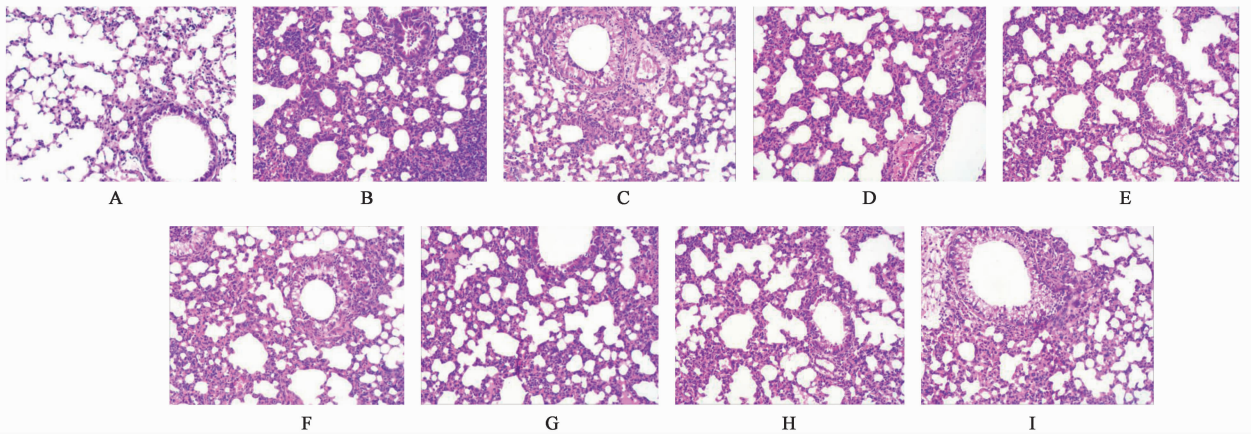
各剂量组均可明显降低小鼠肺组织 IL-6 和 TNF- α 的水平 ($P < 0.05, P < 0.01$), 以中剂量效果较好; TFRMC 各剂量组均可明显降低小鼠肺组织 IL-6 和 TNF- α 的水平 ($P < 0.05, P < 0.01$), 并呈一定的剂量依赖性; TFRMS 和 TFRMC 相应剂量组间作用效果相似, 差别无统计学意义。见表 3。

3.3 TFRMS 和 TFRMC 对 ALI 小鼠肺组织病理学的影响 正常组肺泡结构完整, 肺泡腔干净, 肺泡壁无明显增厚, 肺泡间质无明显中性粒细胞浸润; 模型组肺组织大量炎症细胞浸润, 肺泡壁水肿、增厚, 肺泡完整性被破坏。TFRMS 和 TFRMC 各剂量组可见有部分炎性细胞浸润, 肺泡结构完整性较好, 充血水肿较轻, 肺泡壁轻度增厚, 病理损伤情况较模型组有所改善, 其中以高剂量组较为明显。见图 1。

表 3 TFRMS 和 TFRMC 对 ALI 小鼠肺组织中 TNF- α 和 IL-6 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of TFRMS and TFRMC on TNF- α and IL-6 levels in lung tissue of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TNF- α /ng·L ⁻¹	IL-6/ng·L ⁻¹
正常	-	394.26 ± 27.42	123.82 ± 16.13
模型	-	564.18 ± 30.42 ¹⁾	180.45 ± 29.11 ¹⁾
地塞米松	5	412.17 ± 29.13 ³⁾	136.45 ± 22.70 ³⁾
TFRMS	10	450.92 ± 34.03 ³⁾	152.57 ± 12.41 ²⁾
	20	418.43 ± 43.87 ³⁾	136.82 ± 22.70 ³⁾
	40	463.60 ± 33.02 ³⁾	149.81 ± 4.55 ²⁾
TFRMC	10	433.38 ± 53.67 ³⁾	151.42 ± 18.78 ²⁾
	20	430.97 ± 32.91 ³⁾	149.78 ± 7.48 ²⁾
	40	412.17 ± 29.13 ³⁾	135.16 ± 13.99 ³⁾



A. 正常组; B. 模型组; C. 地塞米松组; D ~ F. TFRMS 低、中、高剂量组; G ~ I. TFRMC 低、中、高剂量组 (图 2 同)

图 1 TFRMS 和 TFRMC 对 ALI 小鼠肺组织病理学变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of TFRMS and TFRMC on pathological changes of lung tissues in ALI mice (HE, ×100)

3.4 TFRMS 和 TFRMC 对 ALI 小鼠肺组织的 NF- κ B p65 蛋白表达的影响 正常组呈阴性或弱阳性免疫表达, 阳性表达主要分布在胞浆中; 模型组 NF- κ B p65 表达增加, 肺组织细胞浆中分布棕黄色颗粒, 部分已经进入细胞核中, 表明肺组织中 NF- κ B p65 已活化, 阳性细胞百分率显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, TFRMS 和 TFRMC 各剂量组 NF- κ B p65 蛋白表达明显降低, 阳性细胞百分率明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$); TFRMC 低剂量组作用强于 TFRMS 低剂量组 ($P < 0.01$)。见图 2, 表 4。

3.5 TFRMS 和 TFRMC 对 ALI 小鼠肺组织中 IL-6, TNF- α mRNA 表达的影响 与正常组比较, 模型组中 IL-6, TNF- α mRNA 表达显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, TFRMS 和 TFRMC 各剂量组均可明显降低 IL-6, TNF- α mRNA 表达 ($P < 0.05, P < 0.01$);

表 4 TFRMS 和 TFRMC 对 ALI 小鼠肺组织的 NF- κ B p65 阳性细胞率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of TFRMS and TFRMC on percentages of NF- κ B p65 positive cells of lung tissues in ALI mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	NF- κ B p65 阳性细胞/%
正常	-	13.14 ± 4.02
模型	-	65.64 ± 9.44 ¹⁾
地塞米松	5	21.53 ± 4.48 ³⁾
TFRMS	10	50.95 ± 10.90 ²⁾
	20	41.08 ± 13.08 ³⁾
	40	25.32 ± 6.75 ³⁾
TFRMC	10	22.14 ± 6.65 ^{3,4)}
	20	26.51 ± 5.65 ³⁾
	40	21.61 ± 5.86 ³⁾

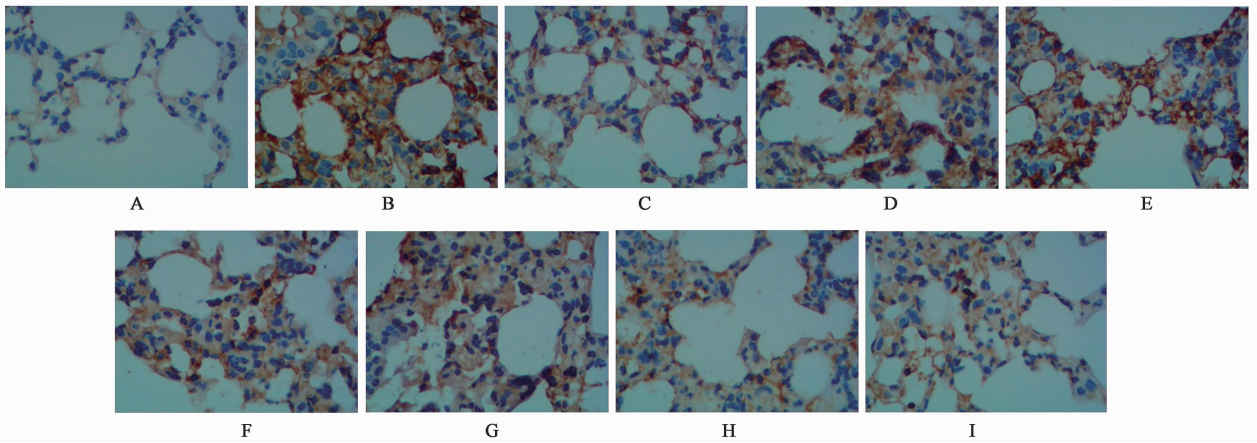


图2 TFRMS和TFRMC对ALI小鼠肺组织NF-κB p65蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Effect of TFRMS and TFRMC on expression of NF-κB p65 protein in lung tissues of ALI mice (immunohistochemical, ×400)

TFRMS和TFRMC相应各剂量组间作用效果相似, 差别无统计学意义。见表5。

表5 TFRMS和TFRMC对小鼠肺组织中IL-6, TNF-α mRNA相对表达量的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 Effect of TFRMS and TFRMC on IL-6 and TNF-α mRNA in lung tissues of ALI mice ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IL-6	TNF-α
正常	-	-	-
模型	-	6.620 ± 1.836 ¹⁾	4.450 ± 0.884 ¹⁾
地塞米松	5	1.062 ± 0.379 ³⁾	1.535 ± 0.528 ³⁾
TFRMS	10	2.642 ± 0.687 ²⁾	3.215 ± 0.704 ²⁾
	20	1.955 ± 0.737 ³⁾	2.279 ± 0.518 ³⁾
	40	2.623 ± 0.346 ²⁾	2.882 ± 0.901 ²⁾
TFRMC	10	3.220 ± 0.952 ²⁾	2.949 ± 0.481 ²⁾
	20	2.333 ± 0.511 ²⁾	2.824 ± 0.912 ²⁾
	40	1.064 ± 0.396 ³⁾	2.225 ± 0.469 ³⁾

4 讨论

ALI属于ARDS的早期阶段, ARDS在临床中是急性呼吸衰竭的主要因素, 而LPS是革兰阴性菌细胞壁中的一种成分, 是造成ALI的主要因素之一, LPS侵入机体可促使中性粒细胞、巨噬细胞等大量释放的细胞因子, 诱导炎症反应, 引起ALI^[11]。LPS经鼻腔直接滴入小鼠肺部可诱导免疫细胞介导的炎症反应网络, 引起一系列的前炎因子释放, 最终导致肺部急性炎症反应^[12], 是目前ALI常用的造模方法。

ALI发生和发展中产生过度炎症反应, 其病理改变常伴有中性粒细胞渗出、趋化、聚集等, 可释放大炎症介质和细胞因子, 引起微血管的通透性增加、肺水肿、及肺泡上皮广泛损伤, 同时滞留的

中性粒细胞活化及呼吸爆发脱颗粒可释放大氧自由基及其他损伤介质, 如弹力蛋白酶等损伤性因子可进一步导致肺组织损伤, 因此抑制肺组织中中性粒细胞的聚集可减轻肺组织的损伤^[13]。BALF液WBC可间接反映肺组织中中性粒细胞的浸润程度, Pro可反映肺组织微血管通透性的改变、肺水肿程度。实验结果表明模型组BALF液WBC, Pro明显增加, 肺泡壁明显水肿、增厚, 炎性细胞大量浸润, 提示造模成功。TFRMS和TFRMC各剂量组均可减少BALF液中的WBC和Pro, 其机制可能为TFRMS和TFRMC抑制炎症细胞在肺组织中的聚集反应, 降低微血管通透性, 减少炎症蛋白的渗出, 从而减弱炎症细胞和炎症蛋白对肺组织的损害。光镜下观察可见, 经TFRMS和TFRMC预处理后, 肺泡壁增厚情况以及炎性细胞渗出程度、肺组织损伤情况较模型组有所改善, 提示TFRMS和TFRMC对ALI具有一定保护作用。

在ALI的发生发展过程中, 肺组织局部产生了大量促炎因子, 形成复杂的细胞因子网络。其中NF-κB p65是具有多向性转录调节的蛋白因子, 其活性的上调可以激活TNF-α, IL-6等与细胞免疫反应有关的物质生成^[14]。TNF-α, IL-6是强促炎细胞因子, 可促进中性粒细胞、巨噬细胞、单核细胞及淋巴细胞等炎症细胞趋化、黏附、聚集、激活及脱颗粒, 释放炎症介质, 从而引起肺泡壁、肺实质和肺血管损伤^[15-17]。实验结果表明TFRMS和TFRMC可明显减少小鼠肺组织中NF-κB p65蛋白表达水平, 减少IL-6, TNF-α mRNA表达量, 抑制TNF-α, IL-6的分泌, 从而减轻炎症因子对机体的攻击损伤。同时, TFRMS和TFRMC各剂量组中IL-6和TNF-α的变化与NF-κB p65蛋白表达水平基本一致, 提示

TFRMS 和 TFRMC 抑制炎症反应的机制可能是通过降低 NF- κ B p65 蛋白水平,抑制促炎细胞因子,而减少炎性细胞趋化、黏附、聚集及炎症介质生成释放等多种途径来发挥抗炎作用。TFRMC 对 IL-6, TNF- α 作用具有一定的剂量依赖性,而 TFRMS 对 IL-6, TNF- α 作用以中剂量组作用效果较好,提示 TFRMS 和 TFRMC 的抗炎作用机制可能不完全一致, TFRMS 的抗炎作用可能具有双向性,可对其做进一步研究。结合实验测定的各项指标结果提示 TFRMC 和 TFRMS 抗炎作用总体上作用效果相似。

综上所述, TFRMS 和 TFRMC 对于 LPS 诱导的 ALI 均具有一定的治疗作用,阻止 ALI 的进一步发展,减少 ARDS 发生的机率,其机制可能通过干扰 NF- κ B p65 途径,减少 IL-6, TNF- α mRNA 表达,抑制 IL-6 和 TNF- α 炎症介质的生成, TFRMC 与 TFRMS 抗炎作用相当。本文对 TFRMS 和 TFRMC 在 ALI 的抗炎作用做了研究,具体抗炎机制仍有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Grommes J, Soehnlein O. Contribution of neutrophils to acute lung injury [J]. Mol Med, 2011, 17 (3/4): 293-307.

[2] Williams A E, Chambers R C. The mercurial nature of neutrophils: Still an enigma in ARDS? [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014, 306 (3): 217-230.

[3] Bellani G, Laffey J G, Pham T, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries [J]. JAMA, 2016, 315 (8): 788-800.

[4] XU X F, DAI H P, LI Y M, et al. Mass spectrometry-based proteomics in acute respiratory distress syndrome: a powerful modality for pulmonary precision medicine [J]. Chin Med J; Engl, 2016, 129 (19): 2357-2364.

[5] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药材标准. 第一册 [M]. 广州: 广东科技出版社, 2004: 40-41.

[6] 黄泰康, 丁志遵, 赵守训. 现代本草纲目. 上册 [M].

北京: 中国医药科技出版社, 2001: 253.

[7] 齐耀群, 刘若轩, 李常青, 等. 牛大力多糖对 LPS 诱导的 RAW264. 7 细胞炎性因子释放的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27 (4): 493-497.

[8] 曹芳. 牛大力多糖和总黄酮抗炎作用及机制研究 [D]. 海口: 海南大学, 2016.

[9] 任倩倩, 汪雨佩, 赵炜, 等. 甘草查尔酮 A 抑制 ERK1/2/NF- κ B 途径减轻吸烟诱导的小鼠急性肺损伤 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32 (5): 643-651.

[10] 郭玲, 李文静, 徐明江, 等. 吸入脂多糖诱导小鼠急性肺炎模型的建立 [J]. 北京大学学报: 医学版, 2009, 41 (2): 226-229.

[11] 周晓霞, 张建情, 刘春晓, 等. 白花前胡有效成分 Pd-Ia 对急性肺损伤的作用及机制研究 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32 (8): 1165-1170.

[12] 聂颖兰, 范斌, 闫寒, 等. 喜炎平注射液对 LPS 致急性肺损伤大鼠肺泡灌洗液中细胞因子含量的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2012, 18 (9): 976-978.

[13] 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.

[14] 赵喜兰, 刘秋鹤. 鬼针草总黄酮对大鼠内毒素性急性肺损伤的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18 (24): 266-268.

[15] 严伟民, 姜虹, 陈万涛. 大鼠 LPS 吸入性肺损伤模型制备的研究 [J]. 组织工程与重建外科杂志, 2010, 6 (2): 96-100.

[16] Rennard S I. The role of free radical oxidation and endothelial dysfunction in the onset and progression of chronic obstructive pulmonary disease [J]. Ter Arkh, 2011, 83 (3): 74-77.

[17] 李佳曦, 汪受传, 徐建亚, 等. 白藜芦醇对 RSV 感染 BALB/c 小鼠肺泡灌洗液 TNF- α , IL-1 β , IL-6 表达的调控趋势 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37 (10): 1451-1453.

[责任编辑 张丰丰]