

## 玉郎伞提取物对大鼠急性肺损伤的影响

黄媛恒<sup>1,2</sup>, 李映新<sup>1</sup>, 谭宏棣<sup>3</sup>, 覃斐章<sup>1</sup>, 黄仁彬<sup>1\*</sup>

(1. 广西医科大学药理学教研室, 南宁 530021; 2. 广西医科大学实验生理科学实验中心, 南宁 530021;  
3. 右江民族医学院附属医院, 广西 百色 533000)

**[摘要]** 目的: 探讨玉郎伞(YLS)提取物对大鼠急性肺损伤(ALI)的影响。方法: 将Wistar大鼠随机分为7组, 分别为正常组, 模型组, 阳性对照组(地塞米松,  $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 玉郎伞水提物(TYLS)高、低剂量组(按生药量计  $60, 30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), YLS总黄酮(FYLS)高、低剂量组( $0.1, 0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), 每组动物连续灌胃给药7 d, 于末次给药后30 min, 采用腹腔注射20%酵母混悬液  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  2次诱发大鼠急性肺损伤模型。最后测定肺组织的湿干比重(W/D)和肺组织髓过氧化物酶(MPO)的活性, 免疫组化测定大鼠肺组织中核因子- $\kappa\text{B}$  p65(NF- $\kappa\text{B}$  p65)的表达、ELISA法测定肺组织白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )的含量, 并HE染色观察肺组织病理形态改变。结果: 与正常组比较, 模型组肺W/D和MPO活性增大、肺组织IL-1 $\beta$ 含量增加、NF- $\kappa\text{B}$  p65表达升高(均  $P < 0.01$ ), 肺组织有炎性病理改变。与模型组比较, TYLS高、低剂量组( $4.31 \pm 0.15$ ), ( $4.72 \pm 0.35$ )及FYLS高剂量组( $4.74 \pm 0.23$ )肺W/D低于模型组( $5.01 \pm 0.33$ ) ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); TYLS高剂量组及FYLS高剂量组的肺MPO活性为( $1.000 \pm 0.304$ ), ( $0.956 \pm 0.139$ )  $\text{U} \cdot \text{g}$  湿片<sup>-1</sup>, 肺IL-1 $\beta$ 含量为( $265.58 \pm 47.05$ ), ( $222.31 \pm 53.99$ )  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ , 肺组织细胞NF- $\kappa\text{B}$  p65阳性率为( $51.00 \pm 8.62$ )%, ( $48.88 \pm 11.80$ )%, 均比模型组明显降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 另外, 从组织病理学角度上看, TYLS及FYLS组肺损伤程度也有所减轻, 以高剂量组较为明显。结论: 预先给予TYLS或FYLS可明显减轻ALI大鼠肺组织炎症反应及肺水肿程度, 其机制可能是通过干扰NF- $\kappa\text{B}$ 途径从而抑制IL-1 $\beta$ 生成。

**[关键词]** 玉郎伞; 急性肺损伤; 核因子- $\kappa\text{B}$ ; 白介素-1 $\beta$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)07-0174-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014070174

## Effects of Yulangsan Extracts on Acute Lung Injury in Rats

HUANG Yuan-heng<sup>1,2</sup>, LI Ying-xin<sup>1</sup>, TAN Hong-di<sup>3</sup>, QIN Fei-zhang<sup>1</sup>, HUANG Ren-bin<sup>1\*</sup>

(1. Department of Pharmacology of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;  
2. Experimental Physiology Experimental Center of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China;  
3. Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Yulangsan (YLS) extracts on acute lung injury in rats.

**Method:** The Wistar rats were randomly divided into control group, model group, dexamethasone group ( $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ), high and low dose groups of total YLS water extract (TYLS) ( $60, 30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) and flavonoids extracted from the roots of YLS (FYLS) ( $0.1, 0.05 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). The animals were intragastrically treated with drugs for 7 days. The ALI model was set up by intraabdominal injection of 20% yeast suspension  $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ , two time 30 minutes after the last medication. The lung wet/dry weight ratio (W/D) and the activity of myeloperoxidase (MPO) in the lung tissues were determined to assess lung injury. The expression of nuclear factor  $\kappa\text{B}$  (NF- $\kappa\text{B}$ ) p65 was analyzed by immunohistochemistry. The content of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) in the lung tissue was detected by ELISA. Meanwhile, the pathological change of lung was also observed by HE dyeing.

**[收稿日期]** 20130820(010)

**[基金项目]** 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科攻0630002-2A); 广西自然科学基金重点项目(2011GXNSFD018030); 南宁市科学技术局科技攻关与新产品试制(201102084C)

**[第一作者]** 黄媛恒, 硕士, 讲师, 从事生化药理学研究, Tel: 0771-5358074, E-mail: huangyuanheng@163.com

**[通讯作者]** \* 黄仁彬, 博士, 教授, 从事生化药理学研究, Tel: 0771-5339805, E-mail: huangrenbin518@163.com

**Result:** As compared with the control group, the lung W/D, MPO activity, IL-1 $\beta$  content and expression of NF- $\kappa$ B p65 were higher in the model group ( $P < 0.01$ ). HE dying showed inflammatory changes in lung in the model group. In TYLS high-and low-dose groups and FYLS high dose group, the lung W/D was ( $4.31 \pm 0.15$ ), ( $4.72 \pm 0.35$ ), ( $4.74 \pm 0.23$ ) respectively, was significantly lower compared with model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The MPO activity was ( $1.000 \pm 0.304$ ), ( $0.956 \pm 0.139$ )  $U \cdot g^{-1}$ , IL-1 $\beta$  content was ( $265.58 \pm 47.05$ ), ( $222.31 \pm 53.99$ )  $ng \cdot L^{-1}$ , NF- $\kappa$ B p65 expression level was ( $51.00 \pm 8.62$ )%, ( $48.88 \pm 11.80$ )%, in the high dose group of TYLS and FYLS respectively. The MPO activity and IL-1 $\beta$  content and NF- $\kappa$ B p65 expression level in lung were significantly reduced compared with model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). On the other hand, histopathological examination confirmed that the degree of lung injury in TYLS and FYLS groups was lessened. And high-dose groups showed the best effect. **Conclusion:** Preliminary administration of YLS extracts can alleviate the degree of pulmonary edema and pulmonary inflammation. The effects may be related to inhibiting the production of IL-1 $\beta$  by interfering the NF- $\kappa$ B path.

[ **Key words** ] Yulangsans; ALI; NF- $\kappa$ B; IL-1 $\beta$

急性肺损伤(ALI)是以肺血管内皮细胞及肺泡上皮细胞广泛损伤为病理特征的一种失控的炎症反应,ALI发病机制错综复杂,迄今尚未完全阐明。核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)对许多参与免疫与炎症反应的基因表达起调控作用,白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )是重要的促炎因子之一,研究表明ALI炎症反应调控失衡与它们有关<sup>[1-2]</sup>。玉郎伞是一种尚未开发利用的民间草药,为蝶形花科植物疏叶岩豆 *Millettia pulchra* Kurz var. *laxior*(Dunn)Z Wei的块根<sup>[3]</sup>,是广西壮族的特色药材,其含有多种成分,作用广泛,本课题组前期工作中也表明玉郎伞(YLS)具有一定的抗炎作用<sup>[4-5]</sup>,本实验采用ALI模型,检测大鼠肺组织NF- $\kappa$ B p65的表达和IL-1 $\beta$ 的含量,探讨玉郎伞提取物对ALI的治疗作用及机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康Wistar大鼠,体重( $200 \pm 20$ )g,雄性,由广西医科大学实验动物中心提供;许可证号SYXK(桂)2003-0005。

**1.2 药品及试剂** YLS水提物(TYLS,每1 mL药液相当于3 g生药)、YLS总黄酮(FYLS,含量74.3%,2%吐温-80溶解),由本实验室自行提取;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110921);髓过氧化物酶(MPO)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号20080425);IL-1 $\beta$ 试剂盒(晶美生物工程有限公司,批号20071015);NF- $\kappa$ B/p65兔抗大鼠单抗(Thermo Scientific公司,批号PA5-16758);DAB显色试剂盒(福州迈新公司,批号130704412c)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 将大鼠随机分为7组,每组8只:正

常组,模型组,阳性对照组(地塞米松, $3 mg \cdot kg^{-1}$ ),TYLS高、低剂量组(按生药量计 $60,30 g \cdot kg^{-1}$ ),FYLS高、低剂量组( $0.1,0.05 g \cdot kg^{-1}$ )。每组动物连续灌胃给药7 d,每天1次,正常组和模型组给予等体积生理盐水。

**2.2 造模**<sup>[6]</sup> 于末次给药后30 min,模型组及TYLS,FYLS组动物按 $5 mL \cdot kg^{-1}$ 体重的剂量ip 20%酵母混悬液。正常组注入等体积生理盐水代替酵母混悬液,12 h各组动物再注射1次酵母混悬液或生理盐水,并灌胃给予相应药物或生理盐水,24 h成模,然后处死动物,开胸采集肺组织标本。

### 2.3 指标与检测

**2.3.1 肺的湿重/干重测定** 取出肺脏后,剥离左肺,迅速用滤纸吸干表面水分和血液,电子天平称湿重(W)。置 $70^\circ C$ 烘烤箱内烘干72 h至恒重,称干重(D),计算肺湿重/干重(W/D)。

**2.3.2 肺组织匀浆MPO活性及IL-1 $\beta$ 含量测定** 取右肺上叶称重后按试剂说明书做样本前处理,加样,水浴,460 nm测定各管吸光度(A),计算MPO活力( $U \cdot g^{-1}$ 湿片)。取右肺中叶按10%用生理盐水匀浆,匀浆液 $3\ 000 r \cdot min^{-1}$ 离心10 min,取上清液按试剂盒说明操作,在酶标仪上450 nm测各孔A。根据标准曲线,查出每1 mL组织匀浆中相应IL-1 $\beta$ 的含量。

**2.3.3 肺组织病理组织学检查和NF- $\kappa$ B p65免疫组化检测** 取右肺下叶,10%甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木素伊红(HE)染色,光镜下观察肺组织的肺泡出血、水肿及炎症细胞浸润等情况。免疫组化染色法测定NF- $\kappa$ B p65,方法采用两步法。

**2.4 统计学方法** 应用SPSS 13.0软件进行统计

学处理,计量资料均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,多组均数比较采用单因素方差分析,继以 LSD 法检验,  $P < 0.05$  为有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对急性肺损伤大鼠肺 W/D、肺组织 MPO 活性和 IL-1 $\beta$  含量的影响** 模型组大鼠肺 W/D,肺组织匀浆 MPO 活性,IL-1 $\beta$  含量均显著高于正常组 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,经地塞米松、TYLS 和 FYLS 预处理,能降低大鼠肺 W/D,减轻肺水肿程度,降低肺组织匀浆 MPO 活性及 IL-1 $\beta$  含量 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 YLS 提取物对急性肺损伤大鼠肺 W/D、肺组织 MPO 活性以及 IL-1 $\beta$  含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	W/D	MPO /U·g <sup>-1</sup>	IL-1 $\beta$ /ng·L <sup>-1</sup>
正常	-	3.94 ± 0.28	0.69 ± 0.23	59.33 ± 19.04
模型	-	5.01 ± 0.33 <sup>3)</sup>	1.39 ± 0.42 <sup>3)</sup>	332.16 ± 76.00 <sup>3)</sup>
TYLS	60	4.31 ± 0.15 <sup>2)</sup>	1.00 ± 0.30 <sup>1)</sup>	265.58 ± 47.05 <sup>1)</sup>
	30	4.72 ± 0.35 <sup>1)</sup>	1.13 ± 0.37	289.38 ± 54.52
FYLS	0.1	4.74 ± 0.23 <sup>1)</sup>	0.96 ± 0.14 <sup>2)</sup>	222.31 ± 53.99 <sup>2)</sup>
	0.05	4.89 ± 0.24	1.22 ± 0.26	308.73 ± 63.79
地塞米松	0.003	4.19 ± 0.16 <sup>2)</sup>	0.90 ± 0.30 <sup>2)</sup>	177.72 ± 67.59 <sup>2)</sup>

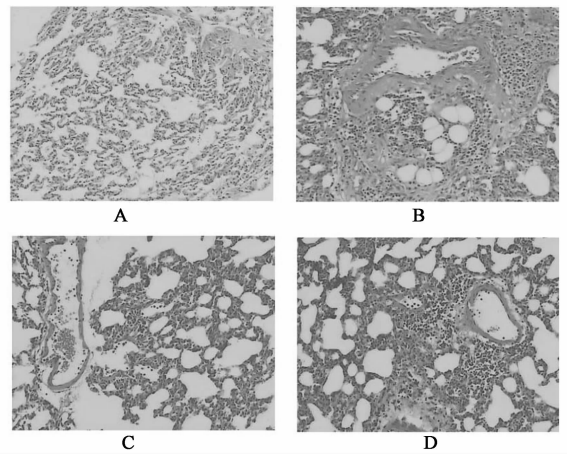
注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ,与正常组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2 同)。

**3.2 对急性肺损伤大鼠肺组织的病理学变化的影响** 光镜(10×10)观察:正常组大鼠肺组织结构完整,肺泡腔清晰,肺泡隔无水肿、细胞浸润等特殊改变。急性肺损伤模型组大鼠肺泡间隔明显增宽,肺泡壁完整性破坏,肺间质见大量炎症细胞浸润,如单核巨噬细胞、中性粒细胞等。TYLS 及 FYLS 组病变轻于模型组,出血、细胞浸润减轻,以高剂量组较为明显。光镜观察结果,见图 1。

**3.3 对急性肺损伤大鼠肺组织的 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响** 实验结果显示,显微镜观察 NF- $\kappa$ B p65 蛋白阳性反应产物呈棕黄色,随机选取 5 个视野(40×10),计数 NF- $\kappa$ B p65 阳性细胞所占的百分比。正常组呈弱阳性免疫反应或阴性,阳性反应产物多分布在胞浆中,呈浅棕色。ALI 模型组 NF- $\kappa$ B p65 蛋白的表达增高,大量肺组织细胞浆及胞核内见分布均匀的棕黄色颗粒,且大多数已进入细胞核,表明 NF- $\kappa$ B p65 已活化,阳性细胞百分率较正常组明显升高 ( $P < 0.01$ )。与之相比,TYLS 和 FYLS 高剂量组 NF- $\kappa$ B p65 表达降低,阳性细胞百分率下降 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 2,图 2。

### 4 讨论

ALI 发生和发展存在过度失控的炎症反应,其



A. 正常组;B. 模型组;C. TYLS 60 g·kg<sup>-1</sup>组;  
D. DYLS 0.1 g·kg<sup>-1</sup>组(图 2 同)

图 1 YLS 对急性肺损伤大鼠肺组织的病理学变化的影响(HE 染色,×100)

表 2 YLS 提取物对急性肺损伤大鼠肺组织的 NF- $\kappa$ B p65 阳性细胞率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	细胞 NF- $\kappa$ B p65 阳性率/%
正常	-	37.25 ± 8.89
模型	-	64.13 ± 9.13 <sup>3)</sup>
TYLS	60	51.00 ± 8.62 <sup>1)</sup>
	30	55.25 ± 11.97
FYLS	0.1	48.88 ± 11.80 <sup>2)</sup>
	0.05	57.00 ± 8.72
地塞米松	0.003	43.00 ± 13.76 <sup>2)</sup>

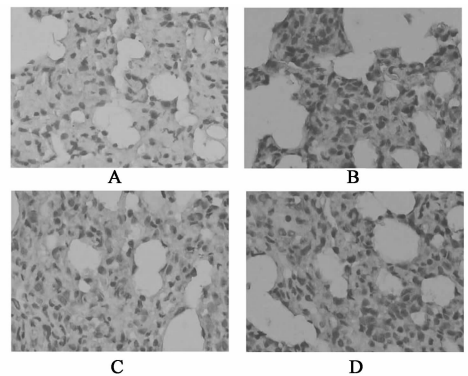


图 2 YLS 对急性肺损伤大鼠肺组织的 NF- $\kappa$ B p65 蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

病理改变伴有嗜中性粒细胞(PMN)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,导致肺微血管通透性增加、肺水肿、微血栓形成及肺泡上皮广泛损伤,同时滞留的 PMN 活化及呼吸爆发脱颗粒释放大量氧自由基及其他损伤介质如弹力蛋白酶等损伤性因子也可导致肺组织损伤,故抑制肺组织对 PMN 的募集可减轻肺组织的炎性损伤。MPO 主要存在于 PMN 中,可催化过氧化

氢和超氧阴离子生成羟自由基,对细胞造成严重的损伤,参与炎症反应,MPO的水平 and 活性直接反映了PMN的功能和活化状态<sup>[7]</sup>。本实验中,模型组大鼠肺W/D以及肺MPO活性明显高于正常组,结合HE染色观察结果,表明ALI大鼠出现严重的肺水肿,肺部产生强烈的炎症反应和PMN浸润,提示模型复制成功。YLS水提物和总黄酮能降低肺组织MPO活性,光镜下观察,肺泡及肺间质的炎性细胞浸润较急性肺损伤模型组减轻,提示其能减轻ALI。

ALI发病机制错综复杂,目前研究发现,促炎因子过度激活、抗炎因子释放不足、细胞因子失衡,是ALI发生、发展的重要原因。参与ALI的细胞因子和炎症介质有促炎细胞因子(如TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, PAF, PLA<sub>2</sub>等)和抗炎细胞因子(如IL-4, IL-10, IL-13, IL-17等),若两者失衡则容易诱发ALI的发生。其中IL-1本身既具有明显的致炎作用,又是炎症放大的启动因子,在炎症反应中起主要作用。IL-1主要由单核/巨噬细胞、中性粒细胞合成和释放,经气管注入IL-1可出现肺水肿并发ALI、急性呼吸窘迫综合征(ARDS),内毒素导致ALI模型中IL-1 $\beta$ 在早期即明显升高,6 h达到高峰<sup>[8-9]</sup>。大量的研究表明,促炎细胞因子产生受到抑制后,可在一定程度上减轻ALI<sup>[10]</sup>。

在炎症反应复杂的细胞因子网络中,NF- $\kappa$ B的活化可能是一个中心环节,研究发现,在支气管哮喘、ARDS、类风湿性关节炎等炎症性疾病时NF- $\kappa$ B活性都增强<sup>[11]</sup>。许多与炎症相关的细胞因子如TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8,单核细胞趋化蛋白1,细胞间黏附分子等的基因都含有NF- $\kappa$ B的结合位点。NF- $\kappa$ B是一种转录核因子,一般表达于胞浆,主要以p50/p65二聚体的形式与抑制蛋白I $\kappa$ B(Inhibitor of  $\kappa$ B, I $\kappa$ B)结合,形成三聚体而呈非活性状态。在细胞因子、细菌、病毒、内毒素等内外源性激活剂的刺激下,使I $\kappa$ B蛋白磷酸化,而降解于蛋白酶小体中。p50/p65二聚体在与I $\kappa$ B分离后,导致NF- $\kappa$ B上的核定位信号区暴露,并经核孔进入核内与相应靶基因特定序列结合,从而调节多种炎症介质的基因表达<sup>[12]</sup>,使TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 等促炎细胞因子,以及黏附分子、趋化分子和生物活性酶等炎性介质产生过多,导致炎症反应的放大,造成肺组织损伤和结构破坏,并最终发展成ALI<sup>[13]</sup>。研究显示,许多中药复方可通过降低NF- $\kappa$ B水平,减少促炎细胞因子或增加抗炎细胞因子等作用达到抑制炎症反应,从而发挥防治急性肺损伤的作用<sup>[14]</sup>。

本实验表明,YLS水提物和总黄酮能下调急性肺损伤大鼠肺组织中NF- $\kappa$ B p65的表达,降低IL-1 $\beta$ 的水平,提示YLS提取物可能通过干扰NF- $\kappa$ B途径,从而阻止或减少炎症介质的产生,最终减缓ALI的进程。

## [参考文献]

- [1] 贺兼斌,杨凯,向志,等. NF- $\kappa$ B p65在实验性大鼠ALI肺组织中的表达及清开灵的干预研究[J]. 南华大学学报:医学版,2007,35(3):359.
- [2] Ganter M T, Roux J, Miyazawa B, et al. Interleukin-1beta causes acute lung injury via alphavbeta5 and alphavbeta6 integrin-dependent mechanisms [J]. Circ Res, 2008, 102(7):804.
- [3] 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准[S]. 南宁:广西科学技术出版社,1992:35.
- [4] 黄媛恒,陈健,黄仁彬,等. 玉郎伞提取物对大鼠胸膜炎TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub>、NO的影响[J]. 中国药房,2010,12(3):200.
- [5] 黄媛恒,陈健,黄仁彬,等. 玉郎伞提取物抗炎作用及机制实验研究[J]. 中国新药杂志,2008,17(20):1764.
- [6] 蓝东. 沐舒坦对急性肺损伤防治作用的实验研究[D]. 南京:广西医科大学,2004.
- [7] 潘永利. 黄芩苷对急性肺损伤大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(3):238.
- [8] Lee Y M, Hybertson B M, Cho H G, et al. Platelet-activating factor contributes to acute lung leak in rats given interleukin-1 intratracheally [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2000, 279(1):L75.
- [9] 王海云,尹小燕,朱健,等. 法舒地尔对脂多糖诱导的急性肺损伤大鼠的保护作用[J]. 中国临床保健杂志,2012,15(3):282.
- [10] 王占海,沈凌鸿,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.
- [11] 吴亚楠,赵鹏翔,马雪梅. NF- $\kappa$ B研究进展及其与炎症的关系[J]. 安徽农业科学,2012,40(34):16533.
- [12] De las Heras B, Hortelano S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids [J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2009, 8(1):28.
- [13] Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF- $\kappa$ B transcription factors in the immune system [J]. Annu Rev Immunol, 2009, 27(4):693.
- [14] 庄先飞,俞苏岚,樊梦霖,等. 中药复方防治急性肺损伤的作用机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(17):326.

[责任编辑 聂淑琴]