

卫气营血辨证肺损伤肺表面活性蛋白 mRNA 表达的动态变化

邓时贵¹, 叶莹仪¹, 彭珍香^{2*}

(1. 广东省中医院, 广州 510120; 2. 广州花海药业股份有限公司, 广州 510370)

[摘要] 目的:探讨卫气营血辨证肺损伤时肺表面活性蛋白 SP-A, SP-B, SP-C mRNA 表达随时间变化的规律。方法:30只新西兰兔随机分为正常对照组和卫气营血辨证肺损伤组(2 h 代表卫分组, 6 h 代表气分组, 12 h 代表营分组, 24 h 代表血分组, 各1组), 每组6只采用耳缘静脉推注脂多糖(LPS)建立卫气营血辨证肺损伤模型, 注射LPS后处死各组动物, 采用RT-PCR法检测肺组织 SP-A, SP-B, SP-C mRNA 表达变化。正常对照组麻醉后取肺组织标本待测。结果:与正常对照组相比, 卫气营血辨证肺损伤卫分、气分、营分、血分各亚组 SP-A, SP-B, SP-C mRNA 表达显著下降($P < 0.05$)。SP-C 气分组与卫分组相比 mRNA 表达无显著性差异, 其余卫气营血辨证肺损伤各亚组间 SP-A, SP-B, SP-C mRNA 表达均具有显著性差异($P < 0.05$), 并随注射LPS时间延长, SP mRNA 表达明显降低, 其表达与肺损伤程度呈负相关。结论:卫气营血辨证肺损伤兔肺表面活性蛋白 SP-A, SP-B, SP-C mRNA 表达呈时间依赖性降低, 是卫气营血辨证肺损伤的重要物质基础之一。

[关键词] 卫气营血辨证; 肺损伤; 肺表面活性蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)06-0279-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20130124.0928.004.html>

[网络出版时间] 2013-01-24 9:28

[收稿日期] 20120813(491)

[基金项目] 广东省科技厅项目(2009B060300025);广东省中医药管理局项目(2009189)

[第一作者] 邓时贵, 研究员, 硕士, 从事药理研究工作, E-mail: dengshigui@yahoo.com.cn

[通讯作者] * 彭珍香, 硕士, 实习研究员, 从事药学工作, E-mail: xzhpeng@yahoo.cn

- [6] Marsboom G, Pokreisz P, Vermeersch P, et al. Functional impairment of endothelial progenitor cells in hypoxic pulmonary hypertension [J]. Euro Heart J, 2006, 27: 832.
- [7] Luke T, Maylor J, Udem C, et al. Kinase-dependent activation of voltage-gated Ca^{2+} channels by ET-1 in pulmonary arterial myocytes during chronic hypoxia [J]. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(10): L1128.
- [8] Olave N, Nicola T, Zhang W, et al. Transforming growth factor-beta regulates endothelin-1 signaling in the newborn mouse lung during hypoxia exposure [J]. Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol, 2012, 302(9): L857.
- [9] Chuang I C, Dong H P, Yang R C, et al. Effect of carbon dioxide on pulmonary vascular tone at various pulmonary arterial pressure levels induced by endothelin-1 [J]. Lung, 2010, 188(3): 199.
- [10] Kirsch M, Kemp-Harper B, Weissmann N, et al. Sildenafil in hypoxic pulmonary hypertension potentiates a compensatory up-regulation of NO-cGMP signaling [J]. Faseb Journal, 2008, 22(1): 30.
- [11] Diao Y G, Jin Q, Zhou, J, et al. Transplantation of endothelial progenitor cells transfected with the eNOS gene for the therapy of hypoxic pulmonary hypertension in the rat [J]. Br J Anaesth, 2012, 108(3): 548.
- [12] 张凌云, 欧敏, 黄友章, 等. 益肺活血颗粒对缺氧培养大鼠肺动脉平滑肌细胞 NO, iNOS 的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 117.
- [13] Zong F, Zuo X R, Wang Q, et al. Iptakalim rescues human pulmonary artery endothelial cells from hypoxia-induced nitric oxide system dysfunction [J]. Experimental and Therapeutic Medicine, 2012, 3(3): 535.

[责任编辑 何伟]

Dynamic Changes of SP mRNAs in Lung Tissues of Rabbits Models with Differentiated Syndromes of Weifen, Qifen, Yingfen, and Xuefen

DENG Shi-gui¹, YE Yin-yi¹, PENG Zhen-xiang^{2*}

(1. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;

2. Guangzhou Flowers Pharmaceutical Ltd, Guangzhou 510370, China)

[Abstract] Objective: To study the dynamic changes of SP mRNAs in lung tissue of animal models with differentiated syndromes of Weifen, Qifen, Yingfen, and Xuefen. **Method:** Thirty rabbits were randomly divided into normal control group and Weifen, Qifen, Yingfen, and Xuefen groups (2, 6, 12, 24 h four subgroups, corresponding to Weifen, Qifen, Yingfen and Xuefen, $n = 6$ each), Lipopolysaccharides (LPS, $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) was given by intravenous injection through auricular vein in the groups. Rabbits in each subgroup were killed after injection, lung tissue specimens were collected and tested. Expressions of SP-A, SP-B, SP-C mRNA at different points of time were measured by using real-time PCR. The control group was received no treatment, lung tissue specimen was tested as in the treatment group. **Result:** Compared with the control group, levels of transcription of SP-A, SP-B, SP-C mRNA were decreased significantly in Weifen, Qifen, Yingfen and Xuefen groups ($P < 0.05$). Levels of transcription of SP-C mRNA showed no significant changes in Weifen and Qifen groups, besides, levels of transcription of SP-A, SP-B, SP-C mRNA among every two subgroups in Weifen, Qifen, Yingfen and Xuefen groups were decreased significantly ($P < 0.05$). In addition, the expression of SP mRNAs was decreased significantly as time passed after the injection of LPS, and the expression was negatively correlated with the degree of lung injury. **Conclusion:** The changes of the SP-A, SP-B, SP-C mRNA in rabbits following acute lung injury are decreased in a time-dependent manner, which maybe one of the important material basis of acute lung injury induced by syndromes of Weifen, Qifen, Yingfen, and Xuefen.

[Key words] Weifen Qifen Yingfen and Xuefen Syndromes; lung injury; pulmonary surfactant protein

祖国医学认为：“温邪上受，首先犯肺”，因此，温病引起肺卫失宣所致不同程度的肺损伤贯穿于温病卫气营血的传变过程^[1]。肺表面活性物质(PS)是由肺泡Ⅱ型上皮细胞分泌合成的一种由磷脂和肺表面活性蛋白(pulmonary surfactant protein, SP)组成的复合物，两者同时存在才能有效发挥PS降低肺表面张力的生理功能^[2]。本研究在既往探讨中医肺卫失宣物质基础的基础上^[3-5]，继续观察卫气营血辨证肺损伤模型^[6]肺组织 SP-A, SP-B, SP-C mRNA 的表达变化，旨在探讨卫气营血辨证肺损伤 SP 的动态变化及其物质基础。

1 材料

1.1 动物 新西兰兔 30 只，雌雄各半，体重 2.2 ~ 2.5 kg，合格证号 0048754, 0075109, 0080201, 0080243, 广东省医学实验动物中心提供。

1.2 试剂 大肠杆菌内毒素(LPS, 血清型 LPS O111B4, 批号 030M4114, 011M4008V, Sigma 公司), 总 RNA 提取试剂 TRIZOL Reagent (批号 D9108A

Invitrogen 公司), PrimeScript™ RT reagent Kit (批号 DRR037A, TaKaRa Bio 公司), SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒 (批号 DRR081A, TaKaRa Bio 公司), 氯仿、异丙醇、乙醇等常用试剂均为国产分析纯。

1.3 仪器 7892509 微量推注泵 (Stoelting CO, USA), UV-2450 紫外-可见分光光度计 (日本岛津), Prism7500 RT-PCR 仪 (ABI)。

1.4 引物 SP 及 β -actin 引物由 Invitrogen 公司设计合成: SP-A: 5'-AATGCTATGCCTCCCATTTG-3'; 5'-GACCTTTTTCCCAGGTCTCC-3'; SP-B: 5'-CTGT GC-CAACCCGGGTCACC-3'; 5'-GACAGATCCTGCGT GT-GGGGC-3'; SP-C: 5'-TGGAGGCTCTGGCTAGAA AA-3'; 5'-CCAGGAAGGCCAGCTCTC-3'; β -actin: 5'-CCCATCTATGAGGTTACGC-3', 5'-TTAATGTCAC GCACGATTTTC-3'。

2 方法

2.1 卫气营血辨证肺损伤动物模型的建立^[6] 30 只新西兰兔随机分为正常对照组和卫气营血辨证肺

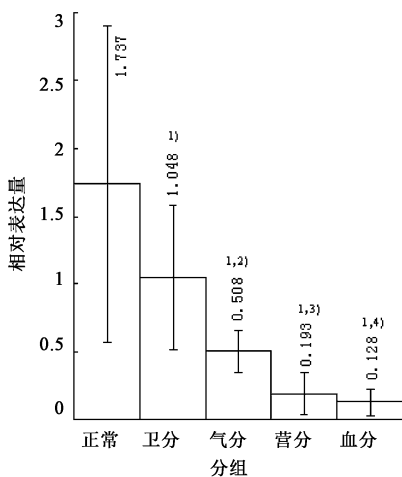
损伤组(2 h 代表卫分组,6 h 代表气分组,12 h 代表营分组,24 h 代表血分组),每组 6 只。在无菌操作下,卫气营血辨证肺损伤各组于耳缘 iv LPS 1 mg·kg⁻¹,推注速度为 10 mL·h⁻¹,推注 LPS 后分别于 2,6,12,24 h 用 2% 戊巴比妥钠 ip 将兔麻醉处死取肺。正常对照组麻醉后取肺组织标本待测。

2.2 肺组织 SP-A, SP-B, SP-C mRNA 表达检测 按试剂盒说明书采用 RT-PCR 法检测肺组织 SP-A, SP-B, SP-C mRNA 表达,每份样品做复孔检测。mRNA 相对表达量用比较 Ct 值法计算,即应用看家基因和靶基因 Ct 值差(ΔCt)计算靶基因相对看家基因 β-actin 表达量 $T[1/(2^{\Delta Ct})]$,T 以对照组平均值作为比较基准,计算实验组 mRNA 的相对表达量。

2.3 统计学处理 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验;SP mRNA 表达与肺损伤病理评分相关性检验采用线性回归分析。P < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 卫气营血辨证肺损伤肺组织 SP mRNA 表达 与正常对照组相比,卫分、气分、营分、血分各阶段肺组织 SP-A, SP-B mRNA 表达呈明显下降趋势,有显著性差异(P < 0.05);卫分、气分、营分、血分各亚组之间进行组间比较亦均有显著性差异(P < 0.05)。SP-C mRNA 表达也类似的结果。表明,卫气营血辨证肺损伤肺表面活性蛋白 SP-A, SP-B, SP-C mRNA 表达呈时间依赖性降低,是卫气营血辨证肺损伤的重要物质基础之一。见图 1~3。



与正常对照组比较¹⁾ P < 0.05;与卫分组比较²⁾ P < 0.05;

与气分组比较³⁾ P < 0.05;与营分组比较⁴⁾ P < 0.05(图 2~3,表 1 同)

图 1 卫气营血辨证肺损伤肺组织 SP-A mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n = 6$)

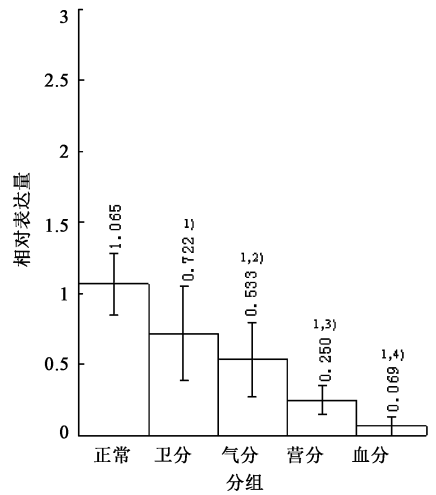


图 2 卫气营血辨证肺损伤肺组织 SP-B mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n = 6$)

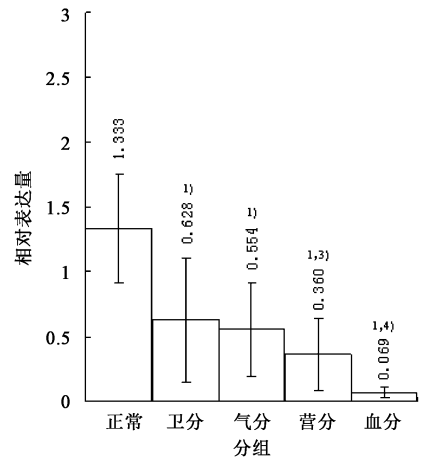


图 3 卫气营血辨证肺损伤肺组织 SP-C mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 卫气营血辨证肺损伤 SP mRNA 表达与肺损伤病理评分的相关性分析 SP mRNA 表达与肺损伤病理评分^[6]相关性检验采用 SPSS 12.0 统计软件进行线性回归分析。结果提示,卫气营血辨证肺损伤 SP-A, SP-B, SP-C mRNA 表达与肺损伤病理评分呈负相关,相关系数依次如下: $r_A = -0.979, P < 0.01$; $r_B = -0.982, P < 0.01$; $r_C = -0.955, P < 0.05$,表明卫气营血辨证肺损伤时肺内 SP mRNA 表达与肺损伤程度密切相关。见表 1。

表 1 各组肺损伤病理评分比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	肺损伤病理评分
正常对照	0.00 ± 0.00
卫分	3.16 ± 1.16 ¹⁾
气分	6.75 ± 1.94 ^{1,2)}
营分	7.66 ± 1.36 ^{1,3)}
血分	10.17 ± 1.17 ^{1,2,3,4)}

4 讨论

肺表面活性蛋白是 PS 的有效活性成分,具有降低肺气-液面张力、维持肺表面活性物质更新和内稳态等作用。其中 SP-A 约占 SP 总量的 50%,可以特异性地与双棕榈酰卵磷脂结合促进肺表面活性膜的形成,增强对气-液面磷脂的吸收,改善肺表面张力,并维持肺泡形态以防止塌陷^[2]。SP-A 具有先天性防御和免疫调节作用,该作用与 NF- κ B 通路有关^[7]。SP-B 则可以增加磷脂层侧面的稳定性,参与管状髓磷脂的形成。SP-C 是特异性的 II 型细胞分泌蛋白,参与 PS 分子膜结构的合成与稳定。研究肺内 SP 的变化可能比 PS 总量的变化在肺损伤发病中更有意义^[8]。

本实验提示,随着 LPS 作用时间的延长,SP mRNA 表达量持续下降,并与肺损害程度呈显著负相关,表明 SP mRNA 表达水平的减弱在肺损伤早期就已出现,并随病情的发展而越加明显,且与肺损伤的严重程度密切相关。该结果与蔡氏^[9]、王氏^[10]等研究大鼠急性肺损伤 SP mRNA 低表达趋势结果相似,但与 Ingenito^[11]等研究结果有所不同。Ingenito 等发现只有 SP-B mRNA 表达在 LPS 作用后有所下降,而 SP-A, SP-C mRNA 表达水平没有下降,可能是由于两者造模方式、LPS 剂量以及观察时间不同所致。SP mRNA 表达减弱,SP 含量减少,导致肺局部免疫功能降低可能是产生 ALI 的主要机制之一。在实验中我们发现肺内 PMN 聚集的增加^[6]与肺内早期 SP mRNA 表达的减弱一致,因此我们推测 LPS 致肺损伤时肺内 PMN 聚集,蛋白酶、活性氧的大量产生和释放等可能是 SP mRNA 表达减弱的重要原因。有研究表明细胞骨架能稳定 SP-A mRNA^[12],而病理结果显示卫气营血辨证肺损伤肺泡结构已严重破坏,因此,肺损伤引起 II 型肺泡上皮细胞骨架结构的破坏也可能是 SP mRNA 表达减弱的重要因素。此外,也有报道 TNF- α 可以调节 SP-A, SP-B 及其 mRNA 的表达及转录水平^[13],使 II 型肺泡上皮细胞合成 SP 减少,但在本研究中并未发现 TNF- α 与 SP mRNA 存在明显的关联性^[6]。

[参考文献]

[1] 巫莉萍,黄海定,邓时贵. 肺卫失宣(肺卫证)的物质基础研究[J]. 中医杂志,2009,50(8):677.

- [2] Kishore U, Bernal A L, Kamran M F, et al. Surfactant proteins SP-A and SP-D in human health and disease [J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2005, 53(5):399.
- [3] 黄海定,巫莉萍,邓时贵. 大黄对肺卫失宣大鼠肺泡 II 型上皮细胞超微结构及肺组织 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(8):190.
- [4] 巫莉萍,邓时贵,黄海定. 大黄对 LPS 损伤肺泡 II 型上皮细胞水通道蛋白 AQP₁ 及 AQP₅ mRNA 表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(16):213.
- [5] 邓时贵,巫莉萍,黄海定. 水通道蛋白 mRNA 表达与肺卫失宣大鼠肺损伤的相关性及大黄的调节作用 [J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(3):177.
- [6] 彭珍香,邓时贵,黄海定,等. 中医卫气营血辨证动物模型生物学参数数据化表达及特征性指标群筛选 [J]. 新中医,2012,44(4):123.
- [7] McCormack F X, Whitsett J A. The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung [J]. J Clin Invest,2002,109(6):707.
- [8] Glasser S W, Detmer E A, Ikegami M, et al. Pneumonitis and emphysema in SP-C gene targeted mice [J]. J Biol Chem,2003,278(16):14291.
- [9] 蔡栩栩,单莹,韩晓华,等. 肺表面活性蛋白 A、B 在内毒素性急性肺损伤时变化的研究 [J]. 中国医科大学学报,2003,32(2):110.
- [10] 王平,张建新,巩建平,等. 硫化氢对大鼠内毒素性急性肺损伤肺泡表面活性物质的影响 [J]. 中国应用生理学杂志,2011,27(4):485.
- [11] Ingenito E P, Mora R, Cullivan M, et al. Determinants of surfactant fuction in acute lung injury and early recovery [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2000,279(2):1342.
- [12] Shannon J M, Pan T, Edeen K E, et al. Influence of the cytoskeleton on surfactant protein gene expression in cultured rat alveolar type II cells [J]. Am J Physiol, 1998,274(1 Pt 1):L87.
- [13] Vayrynen O, Glumoff V, Hallman M. Regulations of surfactant proteins by LPS and proinflammatory cytokines in fetal and newborn lung [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol,2002,282(4):L803.

[责任编辑 何伟]