

鬼针草总黄酮对大鼠内毒素性急性肺损伤的影响

赵喜兰^{1*}, 刘秋鹤²

(1. 漯河医学高等专科学校, 河南 漯河 462002;

2. 漯河医学高等专科学校第二附属医院, 河南 漯河 462300)

[摘要] 目的: 观察鬼针草总黄酮对大鼠内毒素性急性肺损伤(ALI)的抗炎和抗氧化作用, 探讨其对 ALI 保护作用的机制。方法: 120 只大鼠随机分为正常对照组(生理盐水), 模型组, 地塞米松组(5 mg·kg⁻¹, ip), 鬼针草总黄酮低、中、高剂量组(100, 150, 200 mg·kg⁻¹, ip), 每组 20 只。给药 3 d, 末次 ip 给药 1 h 后, ip 内毒素诱导 ALI 模型, 6 h 后处死, 观察每组肺泡灌洗液白细胞和蛋白含量、肺组织核转录因子(NF-κB)p65 表达以及肿瘤坏死因子(TNF-α)、白细胞介素(IL-6)、白细胞介素(IL-10)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量以及中性粒细胞髓过氧化物酶(MPO)活性。结果: 与对照组比较, 模型组的肺泡灌洗液白细胞、蛋白含量显著增加($P < 0.05 \sim P < 0.01$); 鬼针草总黄酮中、高剂量组肺组织 NF-κB p65 表达为(38.46 ± 4.56)%, (31.39 ± 4.18)%, MDA 含量为(1.73 ± 0.19), (1.46 ± 0.15) nmol·mg⁻¹, TNF-α 含量为(259.33 ± 37.48), (211.46 ± 32.69) μg·L⁻¹, IL-6 含量为(287.46 ± 100.18), (223.55 ± 93.49) ng·L⁻¹, MPO 活性为(2.69 ± 0.57), (2.43 ± 0.38) U·g⁻¹, 与模型组比较均明显降低($P < 0.05 \sim P < 0.01$); IL-10 含量为(16.73 ± 3.87), (17.28 ± 3.58) μg·L⁻¹, SOD 为(69.46 ± 9.84, 73.24 ± 8.39) U·mg⁻¹, 与模型组比较均明显升高($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。结论: 鬼针草总黄酮能减轻 LPS 诱发急性肺损伤所致肺血管通透性, 减少炎症渗出, 降低氧化应激损伤程度。

[关键词] 鬼针草总黄酮; 急性肺损伤; 脂多糖; 炎症因子; 氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0265-04

Effect of Total Flavones of *Bidens bipinnata* on Lipopolysaccharide-induced Acute Lung Injury in Rats

ZHAO Xi-lan^{1*}, LIU Qiu-he²

[收稿日期] 20120703(010)

[通讯作者] * 赵喜兰, 硕士, 副教授, 从事药物制剂研究, Tel: 13938025819, E-mail: xilanzhao68@163.com

- [3] Georges P C, Hui J J, Gombos Z, et al. Increased stiffness of the rat liver precedes matrix deposition; implications for fibrosis [J]. AM J Physiol-Gastr 1, 2007, 293(6): G1147.
- [4] 高玉萍, 王宁萍. 藏药松石丸对大鼠实验性肝纤维化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2005, 11(5): 47.
- [5] 更登. 藏药久美 70 味松石丸对实验性大鼠肝硬化的影响[J]. 中国民族民间医药杂志, 2002(54): 39.
- [6] 张媛辉, 刘俊田. 中药抗肝纤维化作用机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(6): 66.
- [7] 刘鸣昊, 薛博瑜. 近 5 年来肝纤维化中医证治用药规律的文献研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 279.
- [8] 王付, 尚立芝, 苗小玲, 等. 四逆散加味对肝纤维化大鼠肝功能、肝纤维化指标及病理变化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 177.
- [9] 青献春, 刘炳辰, 裴香萍, 等. 软肝散结胶囊抗大鼠肝纤维化实验研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 149.
- [10] 李文胜, 陈骏, 文家萍, 等. 冷饭团对实验性肝纤维化的防治作用及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(6): 199.
- [11] 张林军, 刘光辉, 黄东华, 等. 清纤方抗实验性大鼠肝纤维化的作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(12): 75.
- [12] Cheng C C, Lin N N, Lee Y F, et al. Effects of Shugan-Huayu powder, a traditional Chinese medicine, on hepatic fibrosis in rat model [J]. Chinese Journal of Physiology, 2010, 53(4): 223.

[责任编辑 聂淑琴]

(1. Luohe Medical College, Luohe 462002, China;

2. Second Affiliated Hospital of Luohe Medical College, Luohe 462300, China)

[Abstract] Objective: To investigate anti-inflammatory and antioxidant function of total flavones of *Bidens bipinnata* L (TFB) on lipopolysaccharide (LPS) -induced acute lung injury (ALI) and the mechanism. **Method:** One hundred and twenty SD rats were randomly divided into six groups: control group (physiological saline, ip), model group, dexamethasone group (5 mg · kg⁻¹, ip), TFB treatment group (100, 150, 200 mg · kg⁻¹, ip), twenty rats in each group. The rat ALI model was induced by LPS, 5 mg · kg⁻¹, ip. Six hours after modeling, all rats were sacrificed, protein content, white blood cell in bronchoalveolar lavage fluid (BALF), expression of NF- κ B p65, and level of tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-10 (IL-10) superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and the activity of myeloperoxidase (MPO) in lung were measured. **Result:** Compared with control group, content of WBC and the protein in BALF was higher ($P < 0.05$ - $P < 0.01$), compared with model group, NF- κ B p65 expression level was (38.46 \pm 4.56)%, (31.39 \pm 4.18)% (in TFB high and medium dose group, respectively), the content of MDA was (1.73 \pm 0.19), (1.46 \pm 0.15) nmol · mg⁻¹, and the content of TNF- α was (259.33 \pm 37.48), (211.46 \pm 32.69) μ g · L⁻¹, and the content of IL-6 was (287.46 \pm 100.18), (223.55 \pm 93.49) ng · L⁻¹, and the activity of MPO was (2.69 \pm 0.57), (2.43 \pm 0.38) U · g⁻¹, respectively. NF- κ B p65 expression level and the content of MDA, TNF- α , IL-6 and the activities of MPO in lung were significantly lower ($P < 0.05$ - $P < 0.01$). On the other hand, the level of IL-10 was (16.73 \pm 3.87), (17.28 \pm 3.58) μ g · L⁻¹, the content of SOD was (69.46 \pm 9.84), (73.24 \pm 8.39) U · mg⁻¹, the content of IL-10 and SOD was increased significantly ($P < 0.05$ - $P < 0.01$). **Conclusion:** TFB can reduce pulmonary vascular permeability of LPS induced acute lung injury, reduce the inflammatory exudation and oxidative stress damage.

[Key words] total flavones of *Bidens bipinnata* (TFB); acute lung injury; lipopolysaccharide; inflammatory factor; oxidative stress

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 由严重感染、创伤、休克、中毒等肺内外疾病引起的常见的临床综合症,发病率和死亡率高,通常表现为急性进行性呼吸困难和难治性低氧血症。全身炎症反应和氧化应急均参与并介导急性肺损伤的发生^[1]。

鬼针草属菊科鬼针草属植物,黄酮化合物是鬼针草中的主要活性成分之一,具有广泛的药理活性,已有研究^[2]证明鬼针草黄酮化合物具有很好的抗脂质过氧化和抗炎作用。本实验采用内毒素致大鼠急性肺损伤模型,研究鬼针草总黄酮的抗炎和抗氧化作用,同时探讨其抗炎作用的机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 品系大鼠 120 只,体重 (240 \pm 20)g,由河南省实验动物中心提供,动物合格证号 SYXK(豫) 2011-007。

1.3 药品和试剂 鬼针草总黄酮 (total flavones of *Bidens bipinnata*, TFB) 由漯河医专天然药物化学实验中心提供,黄酮含量 >75%,实验时用生理盐水配成所需浓度;地塞米松,购自上海信谊百路达药业有

限公司 (批号 110209); 脂多糖 (LPS) 购自美国 Sigma 公司。肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)- α 、白细胞介素 (Interleukin, IL)-6、白细胞介素 (Interleukin, IL)-10、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒 (购自武汉博士德生物科技公司,批号 110612, 101206, 110114, 100919); 丙二醛 (malondialdehyde, MDA), 核转录因子 NF- κ B, 中性粒细胞髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO) 活性检测试剂盒 (购自南京建成生物工程研究所,批号 100512, 110212, 100614)。

1.4 仪器 723 分光光度计 (上海第三分析仪器厂); 酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); GL-7000 型全自动生化分析仪 (日本岛津公司); 德国 BECKMAN CS-15R Centrifuge 离心机 (德国 BECKMAN 公司); AL104 型电子天平 (梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司); CX31RTSF 显微镜 (Olympus)。

2 方法

2.1 模型制备和分组 按照随机数字表法,将 120 只大鼠随机分为 6 组,分别为正常对照组、模型组、

地塞米松组、鬼针草总黄酮低、中、高剂量组,每组20只,实验前3d,鬼针草总黄酮低、中、高剂量组按照100,150,200 mg·kg⁻¹ ip 给药,1次·d⁻¹,对照组和模型组 ip 生理盐水 2 mL·kg⁻¹,地塞米松组造模前1h按5 mg·kg⁻¹ ip,各治疗组末次给药1h后 ip LPS 5 mg·kg⁻¹,造模后观察各组大鼠的一般状况,于6h后模型组大鼠呼吸窘迫,口鼻可见血性分泌物。

2.2 标本采集和观察指标 所有动物均于造模后6h,用戊巴比妥钠 50 mg·kg⁻¹ ip 麻醉。行气管插管,抽取生理盐水行支气管肺泡灌洗,每次3 mL,共3次,收集支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF),离心。考马斯亮蓝法测定上清液蛋白浓度。沉淀细胞用溶红细胞液破坏红细胞后采用血细胞计数板在光学显微镜下计数白细胞(white blood cell, WBC)。开胸取左肺200 mg冰浴制成10%匀浆液,4℃ 3 500 r·min⁻¹离心10 min,取上清以检测检测炎症因子,MDA的含量和SOD, MPO活性。

2.3 肺组织中 NF-κB p65 的表达 取右下肺经10%甲醛固定,石蜡包埋,切片,免疫组化测定 NF-κB p65 的表达。

2.4 统计学处理 用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学处理用 *t* 检验和方差分析,以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对急性肺损伤大鼠 BALF 中白细胞数和蛋白含量的影响 模型组大鼠 BALF 中的蛋白含量和 WBC 总数明显高于对照组 ($P < 0.01$)。给予鬼针草总黄酮处理后, BALF 中的蛋白含量和 WBC 总数均较模型组大鼠低,尤其高剂量组效果明显 ($P < 0.01$),见表1。

3.2 对急性肺损伤大鼠肺组织 NF-κB p65 表达的影响 模型组小鼠肺组织细胞中 NF-κB p65 表达均明显高于对照组 ($P < 0.01$)。给予鬼针草总黄酮处理后,各给药组的 NF-κB p65 表达明显降低,其中高剂量组效果明显 ($P < 0.01$),见表2。

3.3 对急性肺损伤大鼠肺组织 TNF-α, IL-6, IL-10 的影响 模型组 TNF-α, IL-6 明显高于对照组 ($P < 0.01$), IL-10 明显低于对照组 ($P < 0.01$)。给予鬼针草总黄酮处理后,各给药组的 TNF-α, IL-6 的浓度均显著低于模型组, IL-10 显著高于显著对照组,尤其是高剂量组效果明显 ($P < 0.01$),见表3。

3.4 对急性肺损伤大鼠肺组织 MPO, SOD 活性和

表1 鬼针草总黄酮对支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞、蛋白含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	白细胞 /10 ⁷ /L	蛋白含量 /mg·L ⁻¹
正常对照	-	4.27 ± 0.39 ²⁾	209.27 ± 21.31 ²⁾
模型	-	5.29 ± 0.43	431.83 ± 35.29
地塞米松	5	4.36 ± 0.45 ²⁾	301.25 ± 27.36 ²⁾
TFB	100	5.08 ± 0.53	401.27 ± 31.39
	150	4.63 ± 0.48 ¹⁾	375.93 ± 33.17 ¹⁾
	200	4.41 ± 0.58 ²⁾	327.53 ± 29.83 ²⁾

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

表2 大鼠肺组织 NF-κB p65 表达的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	NF-κB p65 /%
正常对照	-	8.79 ± 2.18 ²⁾
模型	-	59.38 ± 4.23
地塞米松	5	29.43 ± 4.38 ²⁾
TFB	100	41.27 ± 3.98 ¹⁾
	150	38.46 ± 4.56 ¹⁾
	200	31.39 ± 4.18 ²⁾

表3 鬼针草总黄酮对大鼠肺组织 TNF-α, IL-6, IL-10 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	TNF-α /μg·L ⁻¹	IL-6 /ng·L ⁻¹	IL-10 /μg·L ⁻¹
正常对照	-	87.21 ± 24.39 ²⁾	159.27 ± 48.11 ²⁾	20.33 ± 2.38 ²⁾
模型	-	371.38 ± 51.26	347.26 ± 100.39	11.23 ± 2.39
地塞米松	5	193.59 ± 43.81 ²⁾	219.49 ± 103.46 ²⁾	18.29 ± 4.38 ²⁾
TFB	100	309.27 ± 41.38	321.29 ± 89.28	13.21 ± 4.41
	150	259.33 ± 37.48 ¹⁾	287.46 ± 100.18 ¹⁾	16.73 ± 3.87 ²⁾
	200	211.46 ± 32.69 ²⁾	223.55 ± 93.49 ²⁾	17.28 ± 3.58 ²⁾

MDA 含量的影响 模型组 MPO 活性和 MDA 含量明显高于对照组 ($P < 0.01$), SOD 活性明显低于对照组 ($P < 0.01$)。给予鬼针草总黄酮处理后,各给药组的 MPO 活性以及 MDA 的含量明显降低, SOD 活性明显高于模型组,尤其高剂量组效果明显 ($P < 0.05 \sim P < 0.01$),见表4。

4 讨论

急性肺损伤常伴随炎症反应及炎症因子释放^[3],引起中性粒细胞的浸润,释放氧自由基、蛋白酶等炎性介质,其中 BALF 中蛋白质浓度增加数目可反映上皮细胞通透性和肺水肿程度^[4],肺组织 MPO 可反映中性粒细胞的数目并间接反映肺组织

表 4 大鼠肺组织 MDA 含量和 SOD, MPO 活性的变化 ($\bar{x} \pm s, n = 20$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	MPO /U·g ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹
正常对照	-	2.18 ± 0.27 ²⁾	91.39 ± 7.38 ²⁾	1.29 ± 0.17 ²⁾
模型	-	3.25 ± 0.31	43.58 ± 6.47	2.33 ± 0.13
地塞米松	5	2.27 ± 0.43 ²⁾	80.22 ± 8.53 ²⁾	1.51 ± 0.11 ¹⁾
TFB	100	3.08 ± 0.28	58.74 ± 11.28	1.91 ± 0.18
	150	2.69 ± 0.57 ¹⁾	69.46 ± 9.84 ¹⁾	1.73 ± 0.19 ¹⁾
	200	2.43 ± 0.38 ²⁾	73.24 ± 8.39 ²⁾	1.46 ± 0.15 ¹⁾

局部的中性粒细胞浸润程度, BALF 白细胞计数和肺组织 MPO 可间接反映肺内中性粒细胞的渗出和积聚量。实验中脂多糖诱导大鼠肺损伤模型 6 h 后, BALF 中的蛋白含量、白细胞 WBC 总数以及肺组织 MPO 活性均明显高于对照组, 表明本实验造模成功。

目前认为, 在 ALI 的发生发展过程中, 肺组织局部产生大量促炎因子, 彼此形成复杂的细胞因子网络^[5]。其中 NF- κ B p65 是一种具有多向性转录调节的蛋白因子, 其活性上调可激活 TNF- α , IL-6 等在内的多种与细胞免疫反应有关的物质生成^[6]。TNF- α 量的增加能促进中性粒细胞的渗出、吞噬和氧自由基得释放, 并诱导肺泡上皮细胞产生其他致炎因子^[7]。而内、外源性 IL-10 对数种不同类型原因引起的 ALI 有保护作用, 提高动物的存活率。因此, IL-10 的水平与炎症反应的严重程度直接相关^[8]。

急性肺损伤常伴随炎症反应, 释放氧自由基。SOD 是直接清除氧自由基的专一酶, MDA 是氧化剂对脂肪酸、氧自由基等进行链接式反映的产物^[9-10], MPO 作为中性粒细胞活化的标志酶, 其活性的变化反应了中性粒细胞的激活程度^[11], 而 MDA 的含量又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度。

本实验显示, 鬼针草总黄酮可降低 BALF 中清蛋白和白细胞含量, 降低肺泡-毛细血管膜的高通透性, 改善肺水肿程度。促进 SOD 的表达, 提高小鼠体内清除自由基的能力, 增加内毒素肺损伤模型鼠的氧化损伤的保护作用。本研究还表明, 鬼针草总黄酮能有效地抑制 NF- κ B p65 的表达, 调节炎症的级联反应, 减少促炎症因子 TNF- α , IL-6 的生成, 提

高 IL-10 的含量, 抑制氧自由基、脂质代谢产物 MDA 及 MPO 等介质的释放, 从而抑制炎症反应, 减轻肺的损伤程度。

综上所述, 鬼针草总黄酮能减轻 LPS 诱发急性肺损伤所致肺血管通透性, 减少炎症渗出, 降低氧化应激损伤程度。其作用机制可能和下调 NF- κ B p65, TNF- α , IL-6, MPO, MDA, 提高 SOD 表示有关。

[参考文献]

[1] 蒋旭宏, 黄小民, 何煜舟. 痰热清注射液对急性肺损伤大鼠肺组织抗氧化作用的影响[J]. 中华中医药学刊, 2012, 30(5): 1043.

[2] 姜涛, 秦路平, 郑汉臣, 等. 鬼针草黄酮类化学成分及其抗脂质过氧化作用的研究[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18(5): 765.

[3] 葛东建, 刘功俭. PTEN 抑制剂对大鼠内毒素性急性肺损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(9): 1199.

[4] 徐健, 李涛平, 吴海青. 依布硒啉对急性肺损伤大鼠炎症因子的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41(9): 836.

[5] 毛毅敏, 孙瑜霞, 王学廷, 等. 茎叶人参皂苷对大鼠急性肺损伤肺组织 TNF- α 含量及 IL-8 表达的干预作用[J]. 时针国医国药, 2010, 21(5): 1107.

[6] 张佳莹, 魏苗苗, 初晓, 等. 甘草黄酮对小鼠急性肺损伤保护机制的研究[J]. 中国农学通报, 2012, 28(8): 56.

[7] 张广梅, 李福安, 童丽. 热痛方预处理对大鼠内毒素性肺损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(15): 129.

[8] 刘薇, 张慧, 常诚, 等. 抗氧化剂对急性肺损伤大鼠细胞因子的影响研究[J]. 天津医药, 2010, 38(11): 990.

[9] 林波, 章蕴毅, 徐晗, 等. 柴胡总多糖对急性肺损伤大鼠的抗氧化作用[J]. 中国临床药学杂志, 2010, 19(1): 6.

[10] 黄新莉, 王松梅, 范亚敏, 等. 血红素加氧酶-1 在大承气汤改善脂多糖致小鼠急性肺损伤中的作用[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(2): 250.

[11] 葛家希, 邵东华, 王洪. 米屈胍预给药对小鼠急性肺损伤的保护作用[J]. 江苏大学学报: 医学版, 2012, 22(1): 58.

[责任编辑 聂淑琴]