

宣白承气汤对急性肺损伤大鼠肺组织 CD14 和 NF- κ B mRNA 表达的影响

苏中昊¹, 杨爱东^{1*}, 王利霞², 郭永洁¹, 吴中华¹

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海长航医院, 上海 201203)

[摘要] **目的:** 探讨宣白承气汤对脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 大鼠肺组织 CD14 和核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) mRNA 表达的影响。**方法:** 健康雄性 Wistar 大鼠 32 只, 随机分为正常对照组、模型对照组、地塞米松组、宣白承气汤组共 4 组, 每组 8 只。模型组与各治疗组大鼠采用尾静脉注射 LPS (6 mg·kg⁻¹) 复制 ALI 模型。正常对照组和模型组给等容积生理盐水 ig, 地塞米松组给药为 5 mg·kg⁻¹ip, 宣白承气汤组给药为 7 560 mg·kg⁻¹ig。于 3 d 末次给药后采用实时荧光定量 PCR 法测定肺组织 CD14 和 NF- κ B mRNA 表达。观察肺组织病理变化。**结果:** 与正常对照组比较, 模型对照组的支气管肺泡灌洗液蛋白含量、肺体指数、CD14 和 NF- κ B mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较, 宣白承气汤组支气管肺泡灌洗液蛋白含量、肺体指数、CD14、NF- κ B mRNA 和 CD14 蛋白染色阳性细胞面积率表达均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。病理学观察, 模型组大鼠肺泡腔内充满炎性渗出物和出血, 宣白承气汤组大鼠肺组织病理改变明显轻于模型组, 肺细支气管轻度间质性炎症。**结论:** 宣白承气汤能减轻内毒素致 ALI 大鼠肺组织损伤, 对肺损伤有保护作用, 其机制可能与其抑制肺组织 CD14 和 NF- κ B mRNA 表达有关。

[关键词] 急性肺损伤; 宣白承气汤; CD14; 核转录因子- κ B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)05-0121-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20111226.1610.002 **[网络出版时间]** 2011-12-26 16:10

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20111226.1610.002.html>

Effect of Xuanbai Chengqi Decoction on CD14 and NF- κ B mRNA Expressions in Rat LPS-induced Acute Lung Injury Model

SU Zhong-hao¹, YANG Ai-dong^{1*}, WANG Li-xia², GUO Yong-jie¹, WU Zhong-hua¹

(1. Traditional Chinese Medicine of Shanghai University, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Changhang Hospital, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** The purpose of the study was to investigate the role of LPS (lipopolysaccharide) in acute lung injury (ALI) and protective effect of Xuanbai Chengqi (XBCQ) decoction. **Method:** Thirty two Wistar species male rats were randomly divided into 4 groups: normal control group, LPS treated group, dexamethasone group and XBCQ group, 8 rats each group. LPS (6 mg·kg⁻¹) was injected into the caudal vein of rats to perform ALI model. Normal controls and model group were given the same volume of physiological saline. The dosage of dexamethasone was 5 mg·kg⁻¹ip. The dosage of XBCQ was 7 560 mg·kg⁻¹ig. The experiment lasted for 3 d. CD14 and nuclear factor- κ B (NF- κ B) mRNA in lung tissue were measured by real time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR). The pathological manifestation of the lung was observed. The mechanism was also analyzed. **Result:** Compared with normal group, the protein content of bronchoaleolar

[收稿日期] 20111010(010)

[基金项目] 国家中医药管理局重点学科项目(上海中医药大学中医各家学说);上海市重点学科建设项目(S30301);上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(P13908);上海市教委科研创新项目(11YZ67);上海中医药大学名师研究室项目(Z1008210)

[第一作者] 苏中昊, 博士在读, 讲师, 主要从事中医药防治急性肺损伤研究

[通讯作者] * 杨爱东, 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 从事中医药防治急性肺损伤研究, Tel: 021-51322250, E-mail: aidongy@126.com

alveolar lavage fluid, body index of lung, expression of CD14 and NF- κ B mRNA, expression of CD14 protein were greatly increased in LPS treated group. Compared with LPS treated group, the protein content of bronchoalveolar alveolar lavage fluid, body index of lung, expression of CD14 and NF- κ B mRNA, expression of CD14 protein were decreased in XBCQ group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Light microscope indicates large areas of pulmonary hemorrhage and necrosis were in model group. The pathological manifestations of XBCQ group were much more ameliorated than those of the model group. The inflammation of bronchiole was reduced. **Conclusion:** XBCQ decoction lessens the injury of lung tissue and has protective effects on rats with ALI induced by LPS. The mechanism is possibly related to the inhibition of the expressions of CD14 and NF- κ B mRNA in injured lung tissues.

[**Key words**] acute lung injury; Xuanbai Chengqi (XBCQ) decoction; CD14; nuclear factor- κ B

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是全身炎症反应在肺部的表现, 炎性介质调控失衡在 ALI 的发病过程中起重要作用, 细胞因子则构成了 ALI 炎症反应网络。如何调控细胞因子的产生已成为治疗 ALI 的主要研究方向^[1]。CD14 作为脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 的重要受体, 与脂多糖结合蛋白 (lipopolysaccharide-binding protein, LBP) 结合, 刺激细胞内信号转导通路, 导致核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 活化, 诱导多种炎症细胞因子表达, 从而造成组织损害^[2]。本实验通过建立内毒素致 ALI 模型, 基于“肺与大肠”相表里为指导思想, 观察宣白承气汤对 ALI 的治疗作用, 探讨其作用的分子机制。

1 材料

1.1 动物 选择清洁级 Wistar 雄性大鼠 32 只, 体重 (220 ± 20) g, 由上海中医药大学实验动物中心提供。动物合格证号 SCXK (沪) 2010-005。专用标准颗粒饲料、水喂养。

1.2 试剂 LPS 冻干粉剂购自美国 Sigma 公司 (LPS: O111: B4, 批号 L2630); 大鼠 NF- κ B、CD14 和 GAPDH 引物探针序列由广州达辉生物技术有限公司合成, 序列分别为: NF- κ B, 上游引物 5'-CTACACCGAAGCAATTGAAGTGA-3', 下游引物 5'-CAGCGAGTGGCCCTGAGA-3'。CD14, 上游引物 5'-FAM-TGGACCAGGACGAGGAA-3', 下游引物 5'-CGGACCCGACAGTAAGC-3'。GAPDH, 上游引物 5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3', 下游引物 5'-TCTCAGCTGTGGTGAAG-3', 5'端 FAM 修饰; 3'端 Tamra 修饰。Trizol 总 RNA 提取试剂、反转录和 PCR 扩增所需的酶及其他试剂均购自美国 Invitrogen 公司。

1.3 药品 地塞米松, 批号 1002022, 购自上海信谊百路达药业有限公司。宣白承气汤组成: 由生大

黄、杏仁、生石膏、瓜蒌皮, 按比例 9:6:15:5 组成。中药浓缩成每毫升含 1 g 生药的水煎液, 高温高压灭菌, 4 °C 冷藏备用。中药均购自曙光医院东院。

1.4 仪器 低温冷冻离心机 3K15, Sigma (美国); 生物安全柜 TYPE B2, Sigma (美国); ZXC 型紫外杀毒车, 上海跃进医用光学器械厂; Real-time 检测仪 (7300 Sequence Detection System), ABI-7300 ABI (美国)。

2 方法

2.1 动物分组 按随机数字表法将 32 只 Wistar 大鼠随机分为 4 组, 分别为正常对照组、模型对照组、地塞米松组、宣白承气汤组, 每组 8 只。

2.2 模型制备和给药 模型对照组、地塞米松组、宣白承气汤组经尾静脉注射 6 mg·kg⁻¹ 的 LPS 复制 ALI 模型^[3]。其中宣白承气汤组在造模前以相应的药液灌胃 3 d, 1 次/d, 第 3 天末次灌胃后 2 h, 经尾静脉 iv LPS (6 mg·kg⁻¹)。宣白承气汤组 ig 生药 7 560 mg·kg⁻¹。地塞米松组造模前 1 h 按 5 mg·kg⁻¹ ip。正常对照组和模型对照组 ig 等体积的蒸馏水。各组动物用药量按人与动物的体表面积换算^[4]。

2.3 标本采集 所有动物均于造模后 6 h, 用戊巴比妥钠 2.0 mg·kg⁻¹ ip 麻醉。

2.3.1 支气管肺泡灌洗液 取 16 号针头从气管剪开的小口插入, 结扎右侧支气管。两次抽取 3 mL 生理盐水灌洗支气管, 每次反复回抽 3 次后置于离心管中, 用于蛋白含量测定。

2.3.2 肺脏样本 分离肺脏, 整肺用分析天平称重并计算肺体指数。分离右肺上叶, 用 10% 甲醛溶液固定, 待检, 用于病理检测及肺组织 CD14 蛋白表达免疫组化检测; 右肺下叶置于液氮罐中作 CD14 和 NF- κ B mRNA 表达检测。

2.4 肺体指数 整肺取出后, 用生理盐水清洗多余血液, 用滤纸吸干水分, 用分析天平称重, 计算肺体

指数(肺重/体重)。

2.5 肺泡灌洗液蛋白含量测定 取离心后的 BALF 溶液,用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,评价肺渗出程度和药物作用。

2.6 实时荧光定量 PCR 法检测肺组织 CD14, NF- κ B mRNA 表达

2.6.1 按美国 Invitrogen 公司 Trizol 试剂提取总 RNA 后,逆转录合成 cDNA 12 μ L 反应体系中,10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 1 μ L,随机引物 1 μ L,标本 RNA 2 μ g,混匀后于 65 $^{\circ}$ C 5 min,快速插入冰水中,离心,冰上加入:5 \times buffer 4 μ L, DTT (100 mmol \cdot L⁻¹) 2 μ L, RNAsin (40 U \cdot μ L⁻¹) 1 μ L, M-MLVRT 反转录酶 (200 U \cdot μ L⁻¹) 1 μ L, 37 $^{\circ}$ C 50 min, 70 $^{\circ}$ C 15 min, -20 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增: Sybr green 10 μ L, 上游引物 (5 μ mol \cdot L⁻¹) 2 μ L, 下游引物 (5 μ mol \cdot L⁻¹) 2 μ L, 反转录产物 2 μ L, 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 10 s, 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 20 s, 40 Cycle。

2.6.2 扩增产物分析 数据采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS Software 分析。CD14 mRNA, NF- κ B mRNA 表达水平以它们与 GAPDH 的相对表达量来计算。

2.7 肺组织病理学观察 右上肺组织常规 10% 甲醛固定,常规 HE 染色,光镜下观察组织变化。

2.8 免疫组织化学 ABC 法测定肺组织 CD14 蛋白表达 采用 IMS 细胞图像分析系统医学图像分析软件,对免疫组织化学结果进行图像采集和定量分析。每张切片在高倍镜下随机选择不相重叠的 3 个视野,细胞核为蓝色,CD14 阳性细胞为棕黄色。计算出每例样本的蛋白染色阳性细胞面积率(蛋白染色阳性细胞面积率 = 阳性细胞面积/总面积)作为比较参数。

2.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件包分析统计,所有数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组均数采用单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠肺泡灌洗液和肺体指数比较 与正常对照组比较,模型对照组的支气管肺泡灌洗液蛋白和肺体指数含量明显升高 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较,地塞米松组和宣白承气汤组的支气管肺泡灌洗液蛋白含量和肺体指数明显降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

3.2 大鼠肺组织病理形态观察 光镜观察:正常对照组肺泡结构清晰,肺泡壁薄,肺泡内未见水肿液,

肺间质无炎细胞浸润(见图 1)。模型对照组肺泡腔内充满炎性渗出物和出血,肺泡壁毛细血管扩张充血,管壁上大量淋巴细胞浸润,管壁增厚。地塞米松组、宣白承气汤组大鼠肺组织病理改变轻于模型组,肺细支气管偶见炎症改变,水肿较轻,肺间隔轻度充血(见图 1)。

表 1 宣白承气汤对急性肺损伤大鼠肺泡灌洗液蛋白含量及肺体指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 /mg \cdot kg ⁻¹	肺泡灌洗液 蛋白/ $\times 10^{-2}$ g \cdot L ⁻¹	肺体指数 / $\times 10^{-3}$
正常对照	-	13.85 \pm 2.37	5.12 \pm 0.34
模型对照	-	26.70 \pm 1.47 ¹⁾	7.41 \pm 0.32 ¹⁾
地塞米松	5	19.54 \pm 2.86 ^{1,2)}	6.13 \pm 0.42 ^{1,2)}
宣白承气汤	7 560	21.04 \pm 0.69 ^{1,2)}	6.36 \pm 0.26 ^{1,2)}

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型对照组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

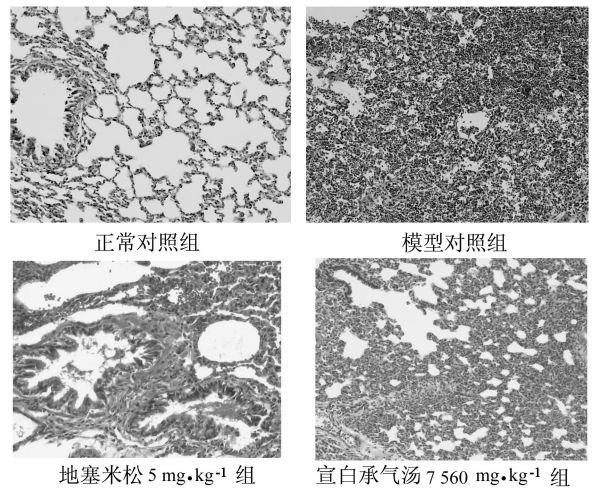


图 1 宣白承气汤对大鼠肺组织病理变化的影响 (HE $\times 200$)

3.3 大鼠肺组织 CD14 和 NF- κ B mRNA 表达 与正常对照组比较,模型对照组 CD14 mRNA 和 NF- κ B mRNA 表达均明显升高 ($P < 0.01$)。与模型对照组比较,地塞米松组和宣白承气汤组的 CD14 和 NF- κ B mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与正常对照组比较,模型对照组大鼠肺组织 CD14 蛋白染色阳性细胞面积率表达显著增高 ($P < 0.01$);与模型对照组相比,地塞米松组、宣白承气汤组 CD14 蛋白染色阳性细胞面积率表达明显降低 ($P < 0.01$),见表 2。

4 讨论

LPS 与单核细胞表面受体 CD14 结合,激活单核细胞 LPS 受体所介导的信号转导通路已被公认。LPS 进入血浆内,与急性反应期的脂多糖结合蛋白

表 2 宣白承气汤对急性肺损伤大鼠肺组织 CD14 和 NF-κB mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	CD14 mRNA/×10 ⁻³	NF-κB mRNA/×10 ⁻³	CD14 蛋白染色阳性细胞面积率/%
正常对照	-	1.49 ± 0.76	0.49 ± 0.09	21.13 ± 5.94
模型对照	-	7.50 ± 1.53 ¹⁾	2.17 ± 0.64 ¹⁾	32.92 ± 3.22 ¹⁾
地塞米松	5	4.87 ± 1.53 ^{1,2)}	1.07 ± 0.14 ^{1,2)}	28.00 ± 4.83 ^{1,2)}
宣白承气汤	7 560	5.99 ± 1.54 ^{1,3)}	1.11 ± 0.24 ^{1,2)}	28.33 ± 2.7 ^{1,2)}

注:与正常对照组比较¹⁾P < 0.01;与模型对照组比较²⁾P < 0.01,³⁾P < 0.05。

LPB 结合,形成 LPS/LPB 复合物。后者能与 CD14 紧密结合,形成有高亲和力的“LPS 识别受体复合体”(LPS/LBP/CD14)^[5]。研究表明,CD14/LPS 复合物的形成可以显著减少 LPS 单独激活巨噬细胞所需的浓度 1/100 ~ 1/1 000。CD14 基因敲除的小鼠对 LPS 的敏感性较对照组下降 1/万^[6]。但是,CD14(mCD14)是一种糖基磷酸肌醇化膜蛋白,锚定在细胞膜上,无胞内区不能独立进行信号转导^[7]。Toll 样受体(Toll like receptor, TLR)4 作为 LPS 跨膜信号转导有关的胞内受体,能在 CD14 和 LPB 存在下,作为 LPS 的信号传导受体,使 TLR4 聚合而活化,引起接头蛋白髓样细胞分化因子 88(myeloid differentiation factor88, MyD88)激活,最终引起 NF-κB 的活化。后者诱导 IL-1β, TNF-α, IL-6 等的合成和分泌,从而使效应细胞合成和分泌大量的炎性介质,触发机体一系列病理性反应,使 LPS 的毒性作用得以发挥^[8-10]。

宣白承气汤出自《温病条辨》,方中生杏仁、石膏、瓜蒌皮清肺化痰,生大黄通腑泻热,四药合用,肺肠同治,是宣肺通腑法的代表方。实验研究结果表明,模型组大鼠肺泡腔内充满炎性渗出物和出血,提示造模成功。与正常组相比,模型对照组 CD14 和 NF-κB mRNA 表达均升高,提示急性肺损伤的病理变化与 CD14 和 NF-κB 表达的升高有关。用宣白承气汤方预处理大鼠,能使 LPS 诱导的 ALI 肺组织水肿、出血等损伤程度明显减轻。与模型对照组比较,宣白承气汤组肺体指数、灌洗液蛋白含量下降,CD14 和 NF-κB mRNA 表达水平下调,表明宣白承气汤对内毒素致急性肺损伤大鼠有保护作用。其机制可能与其能降低内毒素致急性肺损伤大鼠肺组织 CD14 和 NF-κB mRNA 的表达有关。

mediated inflammation in acute lung injury[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2003,14(6):523.

[2] Hailman E, Lichenstein H S, wurfel M M, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14 [J]. J Exp Med, 1994, 179(1):269.

[3] 李琦,钱桂生,张青,等.不同剂量脂多糖对大鼠急性肺损伤效应的观察[J].第三军医大学学报,2004,26(10):871.

[4] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1996:1103.

[5] Tapping R I, Tobias P S. Cellular binding of soluble CD14 requires lipopolysaccharide (LPS) and LPS-binding protein [J]. J Biol Chem, 1997, 272(37):23157.

[6] Le Roy D, Di Padova F, Adachi Y, et al. Critical role of lipopolysaccharide-binding protein and CD14 in immune responses against gram-negative bacteria [J]. Immunol,2001, 167(5):2759.

[7] Akashi S, Ogata H, Kirikae F, et al. Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via toll-like receptor 4-MD-2. [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000,268(1):172.

[8] Dinarello C A. Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response[J]. New Engl J Med, 1984, 311(22):1413.

[9] Heinrich P C, Castell J C, Andus T. Interleukin-6 and the acute phase response [J]. Biochem J, 1990, 265(3):621.

[10] Beutler B, Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor: an endogenous mediator of shock and inflammation[J]. Immunol Res, 1986, 5(4):281.

[责任编辑 聂淑琴]

[参考文献]

[1] Goodman R B, Pugin J, Lee J S, et al. Cytokine-