

# 槐定碱对内毒素致急性肺损伤小鼠免疫调节及抗氧化的影响

田真真<sup>1</sup>, 万红娇<sup>2\*</sup>, 杨翠萍<sup>2</sup>, 马广强<sup>2</sup>, 朱金华<sup>2</sup>

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 江西中医学院基础医学院, 南昌 330004)

**[摘要]** 目的:探讨槐定碱对内毒素致急性感染小鼠的免疫调节及氧化损伤保护作用。方法:采用随机数字法,将昆明小鼠 60 只分为 6 组:正常组、模型组、预防给药组、槐定碱低、中、高剂量组,每组 10 只。预防给药组连续 6 d ip 槐定碱 5 mg·kg<sup>-1</sup>,其余各组 ip 0.5 mL/只生理盐水,均未次给药后 1 h 除 A 组外其他各组一次性 ip 内毒素 9 mg·kg<sup>-1</sup>建立小鼠急性感染模型。造模后 2 h,槐定碱低、中、高剂量组分别 ip 槐定碱 2.5, 5, 9 mg·kg<sup>-1</sup>,观察小鼠行为学变化;进行肺含水量的测定;取血检测白介素 6(IL-6)水平和超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、一氧化氮(NO)的变化;HE 染色观察肺组织细胞的形态改变。结果:给槐定碱各组小鼠的急性感染程度较模型组有明显改善,血清 IL-6, MDA, NO 含量较模型组降低( $P < 0.05$ );SOD 含量较模型组升高( $P < 0.05$ );中剂量组效果优于其他各组( $P < 0.05$ )。HE 染色提示,各给药组炎症程度均较模型组有不同程度的改善。结论:槐定碱可不同程度的减轻内毒素肺损伤小鼠的病理损害,能有效地增强模型鼠免疫调节能力及抗氧化损伤能力。

**[关键词]** 槐定碱;内毒素;急性肺损伤;小鼠;免疫调节;氧化损伤

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0179-04

## Immune Adjustment and Antioxidant Effect of Sophoridine on Acute Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice

TIAN Zhen-zhen<sup>1</sup>, WAN Hong-jiao<sup>2\*</sup>, YANG Cui-ping<sup>2</sup>, MA Guang-qiang<sup>2</sup>, ZHU Jin-hua<sup>2</sup>

(1. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China;

2. Faculty of Basic Medicine, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effects of sophoridine on immune and oxidative injury of acute infection induced by endotoxin mice. **Method:** Sixty Kunming mice were randomly divided into 6 groups: normal group, model group, preventive treatment group, low dose, midium dose, and high dose of sophoridine group ( $n = 10$ , each). Mice in preventive treatment group were injected with 5 mg·kg<sup>-1</sup> sophoridine ip continuously for 6 days, the mice in the rest groups were ip injected 5 mg·kg<sup>-1</sup> saline. One hour after the last administration, mice in all groups except those in group A were ip given endotoxin (9 mg·kg<sup>-1</sup>) to induce acute infection. After 2 h of modeling, sophoridine groups were given ipsophoridine 2.5, 5, 9 mg·kg<sup>-1</sup> accordingly, the changes in mice were observed; including lung water content; serum interleukin-6 (IL-6), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO). Cellular changes in lung tissue was observed by HE staining. **Result:** Mice treated by sophoridine in each group showed significant improvement in the degree of acute infection, and serum IL-6, MDA, NO levels were lower than those in model group ( $P < 0.05$ ); SOD level was higher than that in model group ( $P < 0.05$ ). Nedium-dosage group was better than the other groups ( $P < 0.05$ ). HE staining showed that the degree of inflammation of the treatments resulted in different degrees of improvement compared with

**[收稿日期]** 20110117(008)

**[基金项目]** 江西省教育厅科技项目(GJJ11190)

**[第一作者]** 田真真,在读研究生,从事中医药与病原性疾病研究, Tel:13672218164, E-mail:metrozhen@sina.com

**[通讯作者]** \* 万红娇,教授,博士学位,从事中医药与病原性疾病研究, Tel:13576296677, 0791-7118860, E-mail:ann.wan@163.com

the model group. **Conclusion:** Sophoridine can reduce the pathological damage in model mice with endotoxin injury to certain degree, and effectively enhance the immune function and the anti-oxidative ability.

[**Key words**] sophoridine; lipopolysaccharide; acute lung injury; mice; immune regulation; oxidative damage

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是指由心源性以外的各种肺内、外致病因素所导致的急性、进行性、缺氧性呼吸衰竭。其发病机制错综复杂, 迄今尚未完全阐明, 亦无满意的治疗措施, 病死率高达 50%<sup>[1]</sup>。根据其临床表现, ALI 当属中医学“肺热证”、“喘证”、“结胸”等范畴。槐定碱 (sophoridine, SR) 是从豆科槐属植物苦豆子 *Sophora alopecuroides* 中提取分离的单体生物碱, 研究发现其具有广泛的药理作用<sup>[2-4]</sup>, 并可有效拮抗内毒素<sup>[5]</sup>。本文通过对槐定碱抗内毒素进行一系列的实验研究, 对其抗内毒素作用机制进行探讨。

## 1 材料

**1.1 动物** 昆明种小鼠 60 只, 雌雄各半, 体重 (25 ± 5) g, 动物合格证号 SCXK (赣) 2009-0001, 由江西中医学院实验动物中心提供, 饲养环境温度 (25 ± 1) °C, 自然光照, 给予充足饮水和摄食, 适应 3 d 后开始试验。随机分为 6 组, 每组 10 只。

**1.2 药物与试剂** 内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) Sigma 公司进口分装。加 10 mL 无菌生理盐水, 配制成 1 g · L<sup>-1</sup>, 4 °C 冰箱保存备用。盐酸槐定碱注射液, 通化方大药业股份有限公司, 针剂, 每 2 mL 含槐定碱 25 mg, 批号 H2005161。一支槐定碱注射液加入 5% 葡萄糖 23 mL, 配制成 1 g · L<sup>-1</sup> 4 °C 冰箱保存备用。超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒 (批号 20100413)。一氧化氮 (NO) 试剂盒 (批号 20100413)。丙二醛 (MDA) 测试盒 (批号 20100413), 均为南京建成生物工程研究所提供。白介素 6 (IL-6) 定量酶联检测试剂盒 (批号 20100325), 海森熊科技实业有限公司。

**1.3 仪器** CR 15T 高速冷冻离心机 Hitachi Centrlfuge 日本; TGL-16B 台式离心机上海; 美国宝特 ELX800 型酶标仪。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备与分组** 小鼠参照文献 [6] ip LPS 9 mg · kg<sup>-1</sup> 制备小鼠急性肺损伤模型。实验小鼠随机分为 6 组, 每组 10 只。①正常对照组小鼠 ip 0.5 mL/只生理盐水, 连续 6 d; ②LPS 组小鼠 ip 生理

盐水 0.5 mL/只, 连续 6 d; ③预防给药组 (P): ip 5 mg · kg<sup>-1</sup> 槐定碱, 连续 6 d。④ ~ ⑥槐定碱高、中、低剂量组 ip 生理盐水 0.5 mL/只, 连续 6 d。上述 ② ~ ⑥组均在末次注射生理盐水或药物后 1 h ip LPS 9 mg · kg<sup>-1</sup> 造模。造模 2 h 后 ④ ~ ⑥组分别给槐定碱 9, 5, 2.5 mg · kg<sup>-1</sup>。4 h 后处死小鼠。

**2.2 观察指标** 观察各组小鼠一般状况, 取材检测下列指标: ①摘眼球取血, 进行血清 IL-6, SOD, MDA, NO 的测定。按照试剂盒步骤操作, 绘出标准曲线, 并利用 Excel 线性相关分析求出回归方程。将 A 带入回归方程即可得到血清中小鼠各组 IL-6 的含量。②肺水含量的测定, 脱颈处死小鼠, 取左肺用滤纸吸去肺表面血液, 用手术刀均匀切去一半, 精密电子天平称量湿重, 然后置于 75 °C 干燥箱中 6 h, 称量干质量, 以湿质量/干质量 (W/D) 比值表示肺组织相对含水量。③肺组织病理检查, 取右肺置 4% 中性福尔马林磷酸盐缓冲液固定后, 石蜡包埋, HE 染色光镜观察。

**2.3 统计学分析** 所有数据均用 SPSS 11.5 统计软件分析, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验。P < 0.05 有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 小鼠行为学观察** 造模小鼠在 ip LPS 30 min 后出现精神不振, 行动迟缓, 对刺激反应差; 皮毛枯槁, 无光泽; 恶寒, 蜷缩成团状; 大便干结, 恶臭; 随着时间延长, 上述症状有所加重。正常对照组小鼠活动自如, 无上述病态; 槐定碱预防给药组和高、中、低剂量组均出现与 LPS 组相似的症状, 但多数症状较 LPS 组轻。

**3.2 血清 IL-6, NO, SOD, MDA 检测** 模型组小鼠血清 IL-6 含量较正常组明显升高, 而槐定碱各组 IL-6 较模型组降低, 提示槐定碱可通过降低 IL-6 含量来发挥免疫调节功能 (表 1)。与正常组相比, 模型组小鼠 NO, MDA 活性明显升高 (P < 0.05), SOD 活性明显下降 (P < 0.05)。与模型组比较, 给药 4 组炎症反应均有明显改善 (P < 0.05 或 P < 0.01), 其中中剂量组效果好于其他给药组 (P < 0.05 或 P < 0.01)。

表1 槐定碱对ALI各组小鼠血清IL-6,NO,SOD,MDA的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-6 / $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	NO / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	SOD / $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	MDA / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	225.6 ± 32.9 <sup>1)</sup>	40.20 ± 12.38 <sup>3)</sup>	69.81 ± 3.70 <sup>3)</sup>	5.24 ± 1.32 <sup>3)</sup>
LPS	-	480.1 ± 73.7	147.14 ± 49.87 <sup>1)</sup>	39.81 ± 12.73 <sup>2)</sup>	16.47 ± 6.85 <sup>1)</sup>
槐定碱预防给药	5	307.1 ± 129.6 <sup>2)</sup>	99.24 ± 13.21 <sup>2,3)</sup>	53.52 ± 11.21 <sup>2)</sup>	9.04 ± 1.58 <sup>2)</sup>
槐定碱	2.5	371.3 ± 45.5 <sup>1)</sup>	108.70 ± 23.09 <sup>1,3)</sup>	48.84 ± 14.72 <sup>2,3)</sup>	11.34 ± 1.91 <sup>2)</sup>
	5	345.2 ± 79.5 <sup>2)</sup>	90.70 ± 17.04 <sup>2,3)</sup>	56.56 ± 14.29 <sup>3)</sup>	9.81 ± 2.01 <sup>2,3)</sup>
	9	352.1 ± 80.7 <sup>1)</sup>	105.85 ± 9.34 <sup>2)</sup>	45.86 ± 8.94 <sup>2)</sup>	12.16 ± 2.58 <sup>2)</sup>

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

### 3.3 肺组织的病理变化

**3.3.1 肺组织大体观察** 肉眼观察正常对照组小鼠组织呈粉红色,弹性良好,包膜完整,无病理改变;LPS组小鼠均可见肺组织不同程度充血、水肿,有坏死灶;槐定碱预防给药组及低、中、高剂量组的小鼠肺组织亦充血、水肿,但充血水肿程度明显低于LPS组。肺含水量的测定,槐定碱预防给药组及治疗组各个剂量,肺含水量低于造模组,具有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表2。

表2 槐定碱对ALI各组小鼠肺水相对含量(W/D)的影响( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	W/D
正常	-	1.04 ± 0.02 <sup>2)</sup>
LPS	-	1.18 ± 0.05
槐定碱预防给药	5	1.09 ± 0.03 <sup>1)</sup>
槐定碱	2.5	1.06 ± 0.03 <sup>1)</sup>
	5	1.04 ± 0.02 <sup>2)</sup>
	9	1.07 ± 0.05 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.3.2 肺组织形态学观察** 正常组小鼠肺泡结构清晰,肺泡壁薄,肺泡腔内未见渗出液。模型组小鼠肺组织结构明显遭到破坏,肺泡壁增厚,毛细血管充血,可见大量红细胞渗出,水肿并有中性粒细胞渗出。预防给药组和槐定碱低、中、高剂量组也有相似改变,但是较模型组有不同程度的改善。(图1)。

## 4 讨论

据研究表明,引发ALI的致病菌中,革兰阴性细菌( $G^-$ )占检出病菌的70%~80%,LPS是 $G^-$ 的主要抗原性及致病性成分<sup>[7]</sup>。LPS一旦大量进入机体,就会刺激机体巨噬细胞系统( $M\Phi$ ),巨噬细胞内核因子- $\kappa\text{B}$ (NF- $\kappa\text{B}$ )被迅速激活,肺部最为明显,NF- $\kappa\text{B}$ 迅速由胞浆移入胞核,与TNF- $\alpha$ ,IL-1<sup>[8]</sup>等前炎症反应因子的DNA相关位点结合,启动mRNA基因转录,使其大量释放炎症介质,炎症介质反过来又再次强烈刺激巨噬细胞系统并同时激活多形核白细胞(PMNs)、血管内皮细胞、血小板等效应细胞,使它们

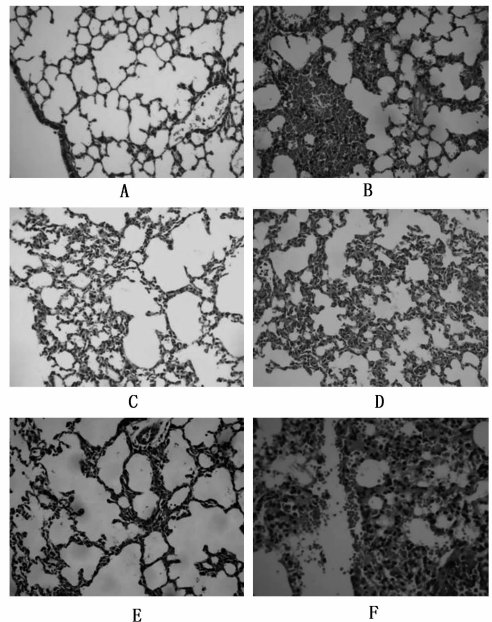


图1 小鼠肺组织病理形态学观察(HE,  $\times 200$ )  
A. 正常组; B. 模型组; C. 槐定碱预防给药组; D. 槐定碱 2.5  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; E. 槐定碱 5  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组; F. 槐定碱 9  $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组

再次大量释放炎症介质,激活补体、凝血和纤溶系统,从而产生一种强大的瀑布效应,导致机体循环衰竭、白细胞浸润、自由基的产生和肠道屏障功能损伤<sup>[9-10]</sup>,损伤血管内皮细胞等,引发ALI/成人呼吸窘迫综合征(ARDS)。

本研究采用昆明小鼠内毒素造模复制临床ALI模型。用槐定碱3个剂量治疗性给予急性内毒素血症肺损伤模型小鼠,并设预防给药组进行对照。造模后用药4h后观察,结果均表明显著改善了模型小鼠的一般状况,减轻了肺组织病理损伤。说明槐定碱具有阻断内毒素性肺部炎症反应,减轻组织损伤的作用。其中,槐定碱中剂量效果优于其他组。

IL-6是重要的促炎因子之一,由TNF- $\alpha$ ,IL-1诱发,是机体损伤后肝脏合成各种急性期反应蛋白的重要诱生剂,与全身炎症反应的发生有直接关系,被

认为是反映病情变化及预后的一个重要指标。有文献报道,造模后 2,6,12,18 h 血清 IL-6 含量有很大不同。其中,致伤 6 h 后达到最高峰,18 h 后水平基本稳定<sup>[11]</sup>。本实验是造模后给药 4 h 检测,IL-6 血清含量结果有利于临床治疗的疗效观察。MDA 的含量是反映机体内脂质过氧化程度<sup>[12]</sup>和自由基水平的一项重要指标,测试 MDA 的量可反映机体内脂质过氧化的程度,间接反应出细胞损伤程度。其指标常常与 SOD 的测定相互配合,SOD 活力的高低间接反应了机体清除氧自由基的能力,而 MDA 的高低又间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度<sup>[13]</sup>。由该实验结果可以看出,槐定碱较模型组明显提高了组织细胞的抗氧化损伤的能力,且组间有显著性差异,中剂量组疗效较其他各组疗效更好。NO 是内皮松弛因子,也是自由基。NO 由血管内皮细胞产生,是血管张力的重要调节物质<sup>[14-15]</sup>。分析 NO 在急性肺损伤发病过程中的不同作用,可能由于不同的急性肺损伤模型,损伤机制不完全相同;另外,急性肺损伤是一个不断发展变化的过程,不同发展阶段,起主导作用的因素不同,而 NO 与损伤机制的多个环节都有关系,所以,深入研究 NO 与急性肺损伤的关系,有助于揭示急性肺损伤的发病机制。本研究发现在用药后 4 h,槐定碱给药组 NO 含量低于模型组( $P < 0.01$ ),但却高于正常组( $P < 0.05$ ),结合肺组织湿重/干重比值,SOD,MDA 结果与之相一致,这些肺损伤标志物的显著改变与组织病理学表现也相一致,提示 NO 在 LPS 诱导的肺损伤的发病过程中起着重要作用。给予槐定碱对 LPS 诱导的急性肺损伤进行干预治疗,NO 含量均较同时相模型组明显改善,由此可认为槐定碱对 LPS 致急性肺损伤的治疗作用可能是通过抑制 NO 生成实现的。

#### [参考文献]

[1] Matthay M A, Zimmerman G A, Esmon C, et al. Future research directions in acute lung injury: summary of a national heart, lung, and blood institute working group [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003, 167(7): 1027.  
[2] 李雪梅,吴运光,潘达鑫,等. 新型抗肿瘤药槐定碱

[J]. *中国新药杂志*, 2006, 8(15): 656.  
[3] 李玉香,朱万平,陈晓霞,等. 槐定碱对自由活动大鼠海马脑电及组织形态学的影响[J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(6): 23.  
[4] 聂红明,陈建杰,高月求,等. 槐定碱体外抗乙肝病毒的试验研究[J]. *北京中医*, 2007, 10(10): 678.  
[5] 韩燕,周娅,刘泉. 槐定碱抗内毒素效应的初步研究[J]. *宁夏医学院学报*, 2006, 28(3): 193.  
[6] 韩燕,周娅,刘泉. 苦豆子抗内毒素效应的实验研究[J]. *中药材*, 2006, 29(10): 1066.  
[7] Fialkow L. Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils: role of oxidants [J]. *J Biol Chem*, 2004, 269(49): 31234.  
[8] 胡淑婷,奥海航,陈晓霞,等. 槐定碱致癫痫大鼠模型的建立及血清 TNF- $\alpha$  和 IL-1 含量变化的研究[J]. *宁夏医学杂志*, 2008, 30(12): 1065.  
[9] Rocks D. Vitamin E reduces transendothelial migration of neutrophils and prevents lung injury in endotoxin-induced airway inflammation [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 28(2): 199.  
[10] Sittipunt C, Steinberg K P, Ruzinski J T, et al. Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 163(2): 503.  
[11] 季雪静. 小鼠急性肺损伤时 IL-6 含量升高的研究 [J]. *徐州医学院学报*, 2001, 21(5): 395.  
[12] 高思海,肖诗亮,杨辰垣. 硫酸镁对低氧性肺动脉高压大鼠血中丙二醛和超氧化物歧化酶的影响 [J]. *临床心血管病杂志*, 2002, 18(2): 73.  
[13] 周晓红,凌一凌,黄善生,等. 黄芩甙对内毒素休克大鼠 SOD,MDA 及吞噬细胞发光的影响 [J]. *河北中医药学报*, 2006, 16(2): 31.  
[14] 许国根. 全身炎症反应综合征患者致炎因子与抗炎因子的变化及相关性研究 [J]. *中国急救医学*, 2002, 22(6): 320.  
[15] Walley K R, McDonald T E, Higashimoto Y, et al. Modulation of proinflammatory cytokines by nitric oxide in murine acute lung injury [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006, 160(2): 698.

[责任编辑 聂淑琴]