

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

巫莉萍¹, 邓时贵^{2*}, 黄海定¹

(1. 江西省赣州市人民医院药剂科, 江西 赣州 341000;

2. 广州中医药大学第二附属医院广东省中医药科学院 动物实验中心, 广州 510006)

[摘要] **目的:**探讨大黄对脂多糖(Lip polysaccharides, LPS)损伤肺泡 II 型上皮细胞(alveolar type II, AT II)水通道蛋白(AQP₁, AQP₅)mRNA 表达的影响。**方法:**原代分离提取纯化大鼠 AT II 后,分 5 组:正常对照组加入 2 mL DMEM 培养基, LPS 细胞模型组加 10 μg·mL⁻¹ LPS 致 AT II 损伤模型,大黄含药血清 3 组(每组分别再加入占总体积 5%, 10%, 20% 的大黄含药血清)。4 h 后收集细胞,用 RT-PCR 方法检测水通道蛋白 AQP₁, AQP₅ mRNA 表达。**结果:**与正常组比较, LPS 模型组 AQP₁ mRNA 表达显著降低($P < 0.05$);含 20% 大黄血清可显著提高 AQP₁ mRNA 表达($P < 0.05$),但未能恢复至正常水平。与正常组比较, LPS 模型组 AQP₅ mRNA 表达升高,但无显著差异;大黄各干预组对 AQP₅ mRNA 高表达有抑制作用,但抑制作用不明显。**结论:**大黄对急性肺损伤的保护机制可能与上调 AQP₁ mRNA、下调 AQP₅ mRNA 的表达有关。

[关键词] 急性肺损伤;肺泡 II 型上皮细胞;大黄;水通道蛋白-1;水通道蛋白-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0213-05

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110622.1303.003 **[网络出版时间]** 2011-06-22 13:03

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110622.1303.003.html>

Effect of Rhei Radix et Rhigoma on AQP_{1,5} mRNA Expression of Alveolar Type II Cell Injured by LPS

WU Li-ping¹, DENG Shi-gui^{2*}, HUANG Hai-ding¹

(1. Department of pharmacy, the Peoples Hospital of Ganzhou, Ganzhou 341000, China;

2. The Animal Laboratory Center of the Second Affiliated Hospital, Guangzhou

University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To observe effect of Rhei Radix et Rhigoma on AQP_{1,5} mRNA expression of alveolar type II cell(AT II) injured by LPS. **Method:** Primary cultured alveolar type II cells were divided into 5 groups: control group: 2mL DMEM cultured medium was added; LPS injured cell model group(acute lung injury cell model group): 10 μg·mL⁻¹ LPS was added to injure AT II cell; serum containing Rhei Radix et Rhigoma intervention group was divided into 3 groups: each group was added the total volume of 5%, 10%, 20% serum containing Rhei Radix et Rhigoma. Which were collected After 4 hours of culture the mRNA expression of AQP₁, AQP₅ was detected by Real-Time PCR. **Result:** Compared with the control group, AQP₁ mRNA expression of LPS injured cell model group was significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the LPS group, 20% of total volume of serum

[收稿日期] 2010-12-09

[基金项目] 广东省科技厅(83028, 2009B060300025);广东省中医药管理局(2008318)广州中医药大学(08CX82);赣州市医办字[2010]53号-5)

[第一作者] 巫莉萍,从事中药药理学研究, E-mail: WLP562371@126.com

[通讯作者] * 邓时贵,研究员,硕士生导师,从事中西医结合基础研究, Tel:020-39318876, E-mail:dengshigui@yahoo.com.cn

containing Rhei Radix et Rhigoma intervention group could increase AQP₁ mRNA expression significantly, but not return to the normal level. Compared with the control group, AQP₅ mRNA expression of LPS injured cell model group was increased. Rhei Radix et Rhigoma intervention groups could decrease AQP₅ mRNA expression, but not significantly. **Conclusion:** The protective mechanism of Rhei Radix et Rhigoma on acute lung injury cell model by LPS may be associated with the increased AQP₁ mRNA expression and the decreased AQP₅ mRNA expression.

[**Key words**] acute lung injury; alveolar type II cells; Rhei Radix et Rhigoma; AQP₁; AQP₅

肺泡 II 型上皮细胞(alveolar type II, AT II)是肺泡上皮细胞的干细胞,是急性肺损伤(ALI)发病过程中的重要效应细胞。目前认为,AT II 细胞相关基因表达的异常可能参与 ALI 的发病机制^[1]。研究证明,大黄作为通腑泻下药的典型代表,对 LPS 诱导的大鼠急性肺损伤有保护作用^[2],且水通道蛋白 AQP₁ 和 AQP₅ 的差异性表达是反映肺损伤肺内微环境改变的 2 个重要指标^[3]。因此,我们利用大黄进行干预,探讨其对 LPS 引起的肺损伤细胞模型的保护作用机制。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠,SPF 级,雄性,体重 180 ~ 220 g,由广东省医学实验动物中心提供,动物合格证号 0045632,0046522。

1.2 试剂及仪器 DMEM 培养基、胰蛋白酶、BCIP/NBT 试剂盒(广州威佳公司),胎牛血清(杭州四季青公司),DNase 1 和 大鼠 IgG(北京鼎国公司),肺泡灌洗液 I 和 II 试剂均为国产试剂,脂多糖(LPS, 10 mg/支,批号 L2880 Sigma),大黄颗粒剂(1 g/包,相当于饮片 3 g,批号 0903085,江阴天江药业有限公司),TRIpureReagent(批号 RP1001,北京百泰克生物技术有限公司),PrimeScript™ RT reagent Kit(批号 DRR037S,日本 TaKaRa 公司),SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒(批号 DRR041A,日本 TaKaRa 公司),大鼠 AQP₁, AQP₅ 引物序列 AQP₁: 上游引物 5'-TTAGC CATTGTCCAGGCAGAAAC-3'; 下游引物 5'-ATTGGGTCAA GCTCAGCACTCA-3'; AQP₅: 上游引物 5'-TGTGACAGAC AAGCCAATGGATAAG -3'; 下游引物 5'-GGGTAACCTG GCCGTCAATG-3'; β-actin: 上游引物 5'-CCCATCTATGA GGGTTACGC-3'; 下游引物 5'-TTTAATGTCACGCAC GATTTC-3' (日本 TaKaRa 公司设计合成)。RT-PCR 仪 ABI PRISM7500。

2 方法

2.1 大鼠 AT II 的分离 参照 Dobbs L G 的方

法^[4],大鼠以 10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉放血活杀后分离气管并插管,从气管和肺动脉处用灌洗液 I 和 II 分别灌洗肺 10 次,每次 10 mL,至全肺呈苍白色以去除血细胞及巨噬细胞。整体取出心肺和气管置于培养皿中,无菌移入超净操作台,灌洗液 II 冲洗,经气管注入预温至 37 °C,0.25% 胰酶消化液 10 mL,夹闭气管,37 °C 水浴消化 20 min,每隔 10 min 加注 0.25% 胰酶 10 mL;消化完毕,移入干净无菌小培养皿,将肺门、心脏及大气道用无菌剪子剪除,在培养皿中加入含 0.25 g·L⁻¹ DNase 1 总量 4 mL 的含 4% 胎牛血清的灌洗液 II 中灭活胰蛋白酶,将组织块剪碎成 1 ~ 2 mm³ 的小块;然后移入 100 mL 无菌三角瓶,灌洗液 II 补足至 20 mL/肺,放入 37 °C 水浴摇动 130 r·min⁻¹,约 5 min,以使消化后的细胞充分脱离组织团块形成细胞悬液;依次经 120 目和 200 目不锈钢细胞筛过滤,滤液移入 15 mL 无菌离心管以 400 g,4 °C 离心 10 min,以含 4% 胎牛血清灌洗液 II 洗涤 2 次,弃上清;细胞沉淀用 10 mL DMEM(含 10% 胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素,100 U·mL⁻¹链霉素)悬浮,调节细胞密度至 3 × 10⁶ 个/mL。

2.2 大鼠 AT II 的纯化培养 将上述细胞混悬液转移至已用大鼠 IgG 包被好的培养皿中,37 °C,5% CO₂ 培养箱内孵育 2 h(使带有 FC 受体的巨噬细胞、淋巴细胞和中性粒细胞贴壁),移出未黏附的细胞,4 °C,400 r·min⁻¹,离心 10 min 弃上清,无血清 DMEM 漂洗 1 次,细胞沉淀用 DMEM 悬浮(含 20% 胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素,100 U·mL⁻¹链霉素),计数,调整细胞密度为 5 × 10⁵ 个/mL,按 4 × 10⁵ 个细胞/cm² 转移至 6 孔培养板中,37 °C,5% CO₂ 继续孵育,培养 24 h 后移去未贴壁细胞,加入 DMEM 培养基(含 20% 胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素,100 U·mL⁻¹链霉素)继续培养,待实验用。

2.3 大鼠 AT II 的鉴定 碱性磷酸酶鉴定(AKP 染色法):培养 48 h 后取出培养有 AT II 的盖玻片,TBS 冲洗,自然风干 15 ~ 30 min;按 BCIP/NBT 试剂盒提

供的方法新配制孵育液(加入 B,C 液各 1 滴于 1 mL 蒸馏水中即可);将新鲜配制的显色液滴加于细胞盖玻片上,37 °C 孵育 15 min,双蒸水漂洗,核固红复染 1 min,双蒸水漂洗,乙醇快速梯度脱水,树脂封片,光镜观察。

2.4 大黄含药血清的制备 取 SD 大鼠,ig 大黄 10 g·kg⁻¹,2 h 后腹主动脉取血,离心吸取上层血清,56 °C 30 min 灭活后 -20 °C 保存备用。

2.5 分组 将接种入 6 孔板内的细胞在 37 °C,5% CO₂ 继续孵育观察,直到细胞 80%~90% 呈融合状态后换无血清 DMEM 培养 24 h,分为 5 组。空白对照组:无血清培养基 1.5 mL;LPS 模型组:无血清培养基 + LPS 10 μg·mL⁻¹;5% 大黄干预组:无血清培养基 + 5% 大黄含药血清 + LPS 10 μg·mL⁻¹;10% 大黄干预组:无血清培养基 + 10% 大黄含药血清 + LPS 10 μg·mL⁻¹;20% 大黄干预组:无血清培养基 + 20% 大黄含药血清 + LPS 10 μg·mL⁻¹。

2.6 RT-PCR 检测肺组织 AQP₁, AQP₅ mRNA 的表达 各组细胞培养 4 h 后,采用 TRI pureReagent 试剂参照说明书提取总 RNA,经紫外分光光度计,琼脂糖电泳检测 RNA 的纯度和完整性后取 1 μg RNA 按 PrimeScript™ RT reagent Kit 说明书逆转录合成 cDNA,其中 2.5 μL cDNA 为模板扩增,肌动蛋白 β-actin 为内参照,参照 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书建立 20 μL 反应体系,利用 RT-PCR 仪扩增,检测 AQP₁, AQP₅ 目标基因与内标基因 β-actin 表达的荧光强度,以 2^{-ΔΔC_t} 法计算目标基因与内标基因荧光的比值,相对定量比较各处理因素对目标基因表达的影响。

2.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 PEMS 3.0 for Windows Package for encyclopaedia of medical statistics 统计软件(四川大学华西公共卫生学院卫生统计学教研室研制)对各组数据进行多个样本比较及两两比较的秩和检验, $P < 0.05$ 为有效统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠 AT II 形态及 AKP 鉴定 培养后,光镜下细胞贴壁生长,呈岛状分布(图 1),胞浆内含有较多浅蓝色颗粒围绕细胞核分布(图 2),表明细胞成功分离纯化。

3.2 AQP₁, AQP₅ mRNA 的表达 从图 3 可见,与正常组比较,LPS 模型组 AQP₁ mRNA 表达显著降低

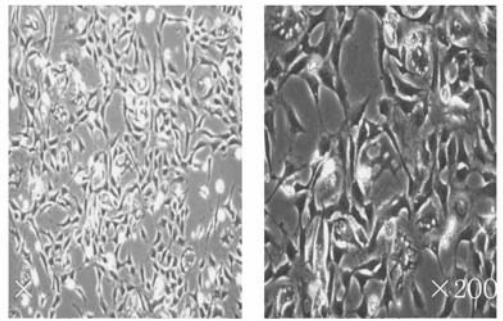


图 1 AT II 光镜下未经染色观察细胞形态(×100)

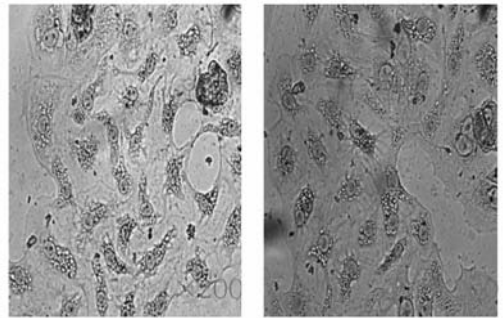


图 2 AT II 碱性磷酸酶染色鉴定细胞形态(×200)

($P < 0.05$);低剂量大黄不足以扭转 AQP₁ mRNA 表达,但随大黄剂量的增大 AQP₁ mRNA 呈高表达趋势,其中 20% 大黄干预组 AQP₁ mRNA 表达较 LPS 模型组 AQP₁ mRNA 表达显著提高($P < 0.05$),但未能恢复至正常水平。LPS 模型组 AQP₅ mRNA 表达较正常组升高,但无显著差异;大黄各干预组对 AQP₅ mRNA 高表达有一定抑制作用,但抑制作用不明显,无统计学差异。

4 讨论

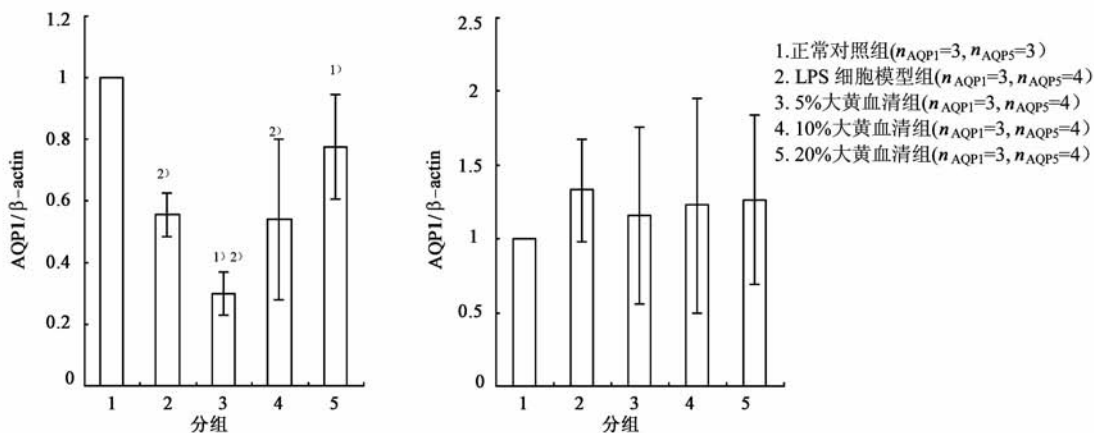
肺损伤是严重感染、创伤、休克等导致的以肺泡毛细血管膜损伤为基础,渗透性肺水肿和微肺不张为特征,临床表现为急性呼吸窘迫和顽固性低氧血症的综合征。大量的动物实验已表明,大黄对 LPS 所致的急性肺损伤具有保护作用,但大黄对 AT II 细胞 AQP₅ 表达的影响还未见有报道。我们用 LPS 作为致毒因素造成 AT II 急性肺损伤模型,观察大黄对 AT II 细胞 AQP₁, AQP₅ mRNA 表达的影响。

AQP₅ 作为膜主体内在蛋白(major intrinsic protein, MIP)家族成员,具有增加细胞膜水通透力的功能,可以提供快速液体转运和吸收的途径。目前呼吸系统主要存在 4 种(AQP₁, AQP₃, AQP₄, AQP₅)水通道^[6],AQP₁ 主要分布于肺微血管内皮细胞,在上皮细胞主要分布于 AT II, AQP₃ 主要分布于肺泡 I 型上皮细胞(AT I),在 AT II 亦有少量分布。其

中, AQP₁ 和 AQP₅ 与肺损伤的关系最为密切^[5], 亦是反映肺水肿肺内微环境异常的重要指标^[3], 二者在跨膜水转运, 出生时肺泡液体吸收等生理过程中发挥重要作用。与 ALI/ARDS(急性呼吸窘迫综合征)关系最为密切。

研究证明, 大黄对 LPS 诱导的大鼠 ALI 具有保护作用, 使肺组织的各种渗出明显减少、炎症细胞渗出减少、保护血管内皮细胞、显著降低肺泡通透指数、肺毛细血管通透性, 并可显著改善肺的呼吸动力学指标^[2]。关于大黄保护 LPS 诱导 ALI 的作用机制, 有研究表明, 大黄可以抑制一氧化氮生成和一氧化氮合酶活性, 并且可以降低磷脂酶 A₂ (PLA₂) 和血小板活化因子 (PAF) 的活性, 从而起到保护肺脏、

减轻肺损伤的作用^[7]。大黄有多种药理效应, 能抑制 PAF 介导的炎症反应和炎症介质的释放、扩增及生物学作用的发挥, 保护肠黏膜屏障、有效缓解中毒性肠麻痹、提高危重患者对胃肠营养的耐受性外, 还能拮抗全身反应综合征、清除氧自由基、减轻肠源性肺损伤^[8]。防治 ALI 的途径也很多, 但最行之有效的首推通腑泻下法^[9]。目前大量相关的研究已证明用大承气汤、大黄治“肺与肠道”功能障碍这一组合有良好效果^[10-12]。因此, 我们利用大黄干预 AT II, 以特异性观察其对 LPS 所致的急性肺损伤 AQP₁, AQP₅ mRNA 的表达的影响, 以进一步阐明大黄的作用机制。



与 LPS 模型组比较¹⁾ P < 0.05; 与正常组比较²⁾ P < 0.05

图 3 大黄对 LPS 损伤 AT II AQP₁, AQP₅ mRNA 表达的影响

从本实验结果看, 大黄可通过上调 AQP₁ mRNA 的表达促进机体肺泡水清除, 从而减轻肺损伤, 与动物体内试验结果趋势一致^[13]; 因 AQP₅ 主要在 AT I 上表达, 在 AT II 上表达较少, 且在损伤后, AT II 转化为 AT I, 故 AQP₅ 的表达量与正常组比较有升高趋势, 大黄通过下调 AQP₅ mRNA 的表达而起到一定修复肺损伤的作用。该研究结果与体内大黄对 AQP_{1,5} mRNA 低表达或过表达的抑制作用相一致^[13], 再次证实了大黄对内毒素致肺损伤肺水代谢异常方面可能存在双向调节作用, 是其保护肺卫失宣肺损伤的重要作用机制之一。

[参考文献]

[1] 黄英. 肺泡 II 型上皮细胞凋亡在急性肺损伤中的作用 [J]. 中国现代医学杂志, 2002, 12(3): 35.
[2] 金抗, 于东云, 由田, 等. 大黄对急性肺损伤大鼠热休

克蛋白 70 表达的影响 [J]. 中国急救医学, 2007 (9): 827.

[3] Jiao G, Li E, Yu R. Decreased expression of AQP₁ and AQP₅ in acute injured lung in rats [J]. Chin Med J (Engl), 2002, 115(7): 963.
[4] Dobbs L G, Gonzalez R, Williams M C. An improved method for isolating type II cells in high yields and purity [J]. Am Rev Respir Dis, 1986, 134(1): 141.
[5] 岳冬梅, 薛辛东. 水通道蛋白_{1,5}与新生鼠高氧肺损伤肺水肿的关系研究 [J]. 中国当代儿科杂志, 2006, 8(2): 147.
[6] 杨胜兰, 王鹏, 李道本, 等. 通腑法对大鼠肠源性肺损伤保护作用机制的研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2003, 11(3): 154.
[7] 李春盛, 桂培春, 何新华, 等. NO 和 iNOS 在内毒素诱导的大鼠急性肺损伤的作用及大黄对其影响 [J]. 中国急救医学, 2000, 20(2): 65.
[8] 陈德昌, 景炳文, 李红江, 等. 大黄对危重症患者系统

Radicamine B 体外抑制小肠葡萄糖的吸收作用

孟爱国¹,刘春艳^{2*},马红翠²

(1. 河北联合大学附属医院,河北唐山 063000; 2. 河北联合大学药学院,河北唐山 063000)

[摘要] 目的:探讨 radicamine B 对大鼠体外小肠葡萄糖吸收的影响。方法:采用 α -葡萄糖苷酶抑制实验及酶抑制动力学实验和离体大鼠小肠葡萄糖吸收模型来研究 radicamine B 的抑制作用。结果:radicamine B 对 α -葡萄糖苷酶和大鼠体外小肠葡萄糖的吸收均呈剂量依赖性抑制作用,其 IC_{50} 分别为 2.19, 0.094 $g \cdot L^{-1}$,与拜糖平相比较无显著性差异。而且 radicamine B 对 α -葡萄糖苷酶活性属于竞争性抑制, $K_i = 6.3 \times 10^{-7} mol \cdot L^{-1}$ 。结论:radicamine B 能显著抑制小肠葡萄糖的吸收,有望成为一种治疗糖尿病的药物。

[关键词] radicamine B; α -葡萄糖苷酶抑制剂;抑制作用;拜糖平;葡萄糖吸收

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)16-0217-04

Radicamine B Inhibits Glucose Absorption in Rat Intestines *in vitro*

MENG Ai-guo¹, LIU Chun-yan^{2*}, MA Hong-cui²

(1. Affiliated Hospital, Hebei United University, Tangshan 063000, China;
2. Department of Pharmacy, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of radicamine B on glucose absorption in rat intestines *in vitro*. **Method:** The inhibitory effect of radicamine B was evaluated by α -glucosidase inhibitory test, inhibitory kinetics assay and assay of glucose absorption in rat intestines *in vitro*. **Result:** Radicamine B showed an inhibitory effect on both α -glucosidase and glucose's absorption in the small intestine in a dose-dependent manner and the IC_{50} value were 2.19 $g \cdot L^{-1}$ and 0.094 $g \cdot L^{-1}$, respectively. No significant difference was found between acarbose and radicamine B in the inhibitory effect on intestinal glucose absorption. In addition, the inhibitory pattern of radicamine B was competitive enzyme inhibition with its K_i of $6.3 \times 10^{-7} mol \cdot L^{-1}$. **Conclusion:** Radicamine B significantly inhibites glucose absorption in the small intestine. It indicates that radicamine B might be a novel therapeutic drug for diabetes.

[收稿日期] 20110406(013)

[基金项目] 河北省自然科学基金——青年基金(C2010001761)

[第一作者] 孟爱国,博士,Tel:0315-3725732

[通讯作者] *刘春艳,博士,副教授,Tel:0315-3725706

炎症反应治疗作用的临床研究[J].中国危重病急救医学,2000,12(10):584.

[9] 李志军,李银平,王今达.肺与大肠相表里学说与多器官功能障碍综合征[J].中国中西医结合急救杂志,2004,11(3):131.

[10] 王今达.开展中西医结合治疗急性危重病的思路和方法[J].中国中西医结合急救杂志,2000,7(6):323.

[11] 王今达,高天元,崔乃杰,等.祖国医学“肺与大肠相

表里”学说的临床意义及本质探讨[J].中西医结合杂志,1982,2(2):77.

[12] 雷澍,方强,张勤.大黄蒽醌衍生物对大鼠急性肺损伤的保护作用[J].中国中医药科技,2005,12(6):370.

[13] 邓时贵,巫莉萍,黄海定. AQP₁, AQP₅, mRNA 表达与肺卫失宣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.

[责任编辑 何伟]