

槐定碱对内毒素致小鼠肺损伤的抗氧化作用及 对 NF- κ B 表达的影响

朱金华¹, 万红娇^{1*}, 熊秋迎², 叶荷平¹, 杨翠萍¹

(1. 江西中医学院, 南昌 330004; 2. 南昌大学第一附属医院, 南昌 330006)

[摘要] **目的:** 研究槐定碱对内毒素(LPS)致小鼠肺损伤(ALI)的抗氧化作用及对核因子 kappa B(NF- κ B)表达的影响。**方法:** 将清洁级昆明小鼠 60 只分为 6 组: 正常组、LPS 模型组、ip 槐定碱 5 mg·kg⁻¹ 预防给药组、槐定碱高、中、低剂量治疗组(9, 5, 2.5 mg·kg⁻¹), 每组 10 只。预防给药组造模前连续 3 d ip 给予小鼠槐定碱; 槐定碱治疗组均在造模后连续 3 d ip 给予小鼠槐定碱; 观察小鼠用药前后的一般状况、肺组织匀浆超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)含量变化、肺组织病理形态学改变及免疫组化检测肺组织中 NF- κ B p65 的表达。**结果:** 槐定碱中、低剂量组和预防给药组, 均不同程度改善了模型鼠的一般状况, 并可不同程度地升高肺匀浆 SOD 活力($P < 0.05$), 降低肺匀浆 MDA 含量($P < 0.05$), 减轻肺组织的氧化病理损伤; 槐定碱高、中、低剂量组和预防给药组明显降低了小鼠肺组织细胞中 NF- κ B p65 的表达, 且槐定碱中剂量组作用效果最显著。**结论:** 槐定碱可不同程度地减轻内毒素致肺损伤模型鼠的病理损害, 对氧自由基引起的损伤具有一定的保护和治疗作用; 通过下调模型小鼠肺组织中 NF- κ B 的表达, 而阻断 LPS 信号转导途径中 Toll 样受体 4*(TLR-4)介导的 NF- κ B 通路。

[关键词] 槐定碱; 内毒素; 肺氧化损伤; 核因子 kappa B

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)20-0182-05

Antioxidant Effect of Sophoridine on Lung Injury Induced by Lipopolysaccharide in Mice and Its Influence on NF- κ B Expression

ZHU Jin-hua¹, WAN Hong-jiao^{1*}, XIONG Qiu-ying², YE He-ping¹, YANG Cui-ping¹

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

2. First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the antioxidant effect of sophoridine on lung injury induced by lipopolysaccharide(LPS) in mice and its influence on NF- κ B expression. **Method:** Sixty Kunming mice were randomly divided into six groups: normal group, LPS-model group, prevention treatment group of sophoridine 5 mg·kg⁻¹, three dose groups of sophoridine treatment (9, 5, 2.5 mg·kg⁻¹), ten mice in each group. Sophoridine was administrated for three days before LPS injection in prevention treatment group and administrated for three days after LPS injection in treatment groups. General condition of mice were observed before and after treatment. SOD and MDA in lung tissue homogenate was detected and pathological changes in lung tissue were observed. NF- κ B p65 expression in lung tissue was determined by immunohistochemical method. **Result:** Compared with model group, general condition of mice was improved, and SOD in lung tissue homogenate increased($P < 0.05$), MDA in lung tissue homogenate decreased($P < 0.05$), pathological lesions of lung tissue alleviated in sophoridine treatment groups (5, 2.5 mg·kg⁻¹ dosage groups) and prevention treatment group. NF- κ B p65 in lung tissue was reduced

[收稿日期] 20110316(012)

[基金项目] 江西省教育厅科技项目(GJJ11190)

[第一作者] 朱金华, 硕士, 实验师, Tel:13307096120, E-mail:jzzjh8160260@sina.com

[通讯作者] * 万红娇, 博士, 教授, Tel:0791-7118860, E-mail:ann.wan@163.com

significantly in all sophoridine groups. And medium-dose sophoridine group showed the best effect. **Conclusion:** Sophoridine could reduce LPS-induced pathologic lesions in lung tissue of mice, protect from the damage caused by oxygen free radicals; sophoridine could reduce NF- κ B expression, thus blocking LPS signal transduction pathway in TLR4-mediated NF- κ B signal transduction pathway.

[**Key words**] sophoridine; lipopolysaccharide; oxidative damage in lung; nuclear factor kappa B

内毒素 (endotoxin, ET), 又称脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS), 是革兰阴性菌 (G-菌) 细胞壁的主要成分, 具有广泛的生物学效应。研究表明 LPS 的脂质 A 在胞外与 LPS 结合蛋白 (LPS binding protein, LBP) 形成 LPS-LBP 复合物^[1], 再由 LBP 将 LPS 转移到细胞膜表面的 CD14 上, 在髓样分化蛋白 2^[2] (myeloid differential protein 2, MD2) 的作用下与 Toll 样受体 4 (TLR-4) 结合, 导致 TLR-4 发生聚合从而使信号传导到胞内, 启动 LPS 信号的细胞内转导, 使 NF- κ B 的抑制状态得以解除, 转位到胞核, 与多种基因启动子中含有的 κ B 序列结合, 从而启动 TNF- α , IL-1, IL-6 等细胞因子^[3]、辅助黏附分子 CD80 和 CD86 基因的转录, 使之合成大量的炎症介质, 触发体内炎症连锁反应^[4], 导致组织的广泛损伤, 从而引起全身炎症反应综合征和多器官功能障碍综合征等疾病^[5]。

槐定碱 (sophoridine, SR) 是从豆科槐属植物苦豆子 (*Sophora alopecuroides* L.) 中提取分离的单体生物碱。临床上槐定碱对恶性滋养细胞肿瘤有显著疗效, 对恶性淋巴瘤和消化道肿瘤也有一定疗效, 是一种高效低毒的抗癌生物碱, 是国家一类抗癌新药^[6-7]。研究发现槐定碱具有抗炎抑菌、抗肿瘤、抗心律失常、体外抑精和免疫抑制等药理作用^[7]。本文选择槐定碱对内毒素致小鼠肺损伤的抗氧化作用及对 NF- κ B 活性表达的影响进行实验研究, 并对其作用机制进行初步探讨, 为寻找新的抗内毒素药物, 拓宽槐定碱临床使用范围提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 KM 小鼠 60 只, 清洁级, 雌雄各半, 6~8 周龄, 18~22 g, 江西中医学院动物实验中心提供, 合格证号 SCXK(赣)2005-0001。适应性饲养 3 d 后开始试验, 随机分为 6 组, 每组 10 只。

1.2 药物与试剂 LPS (*Escherichia coil*, 055: B5), Sigma 公司产品; 盐酸槐定碱注射液 (批号 20100401, 通化方大药业股份有限公司); NF- κ B p65 (A) sc-109 (Rabbit Anti-NF κ B p65, L2910, Santa Crus

公司); PV-6000-G 免疫组化试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司); 丙二醛 (MDA) 测试盒 (批号 20101029), SOD 试剂盒 (批号 20101102), 南京建成生物工程研究所。

1.3 药品配制

1.3.1 槐定碱溶液 把 1 支盐酸槐定碱注射液 (规格 2 mL, 25 mg) 加入到 23 mL 5% 葡萄糖溶液中, 即成为质量浓度为 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 槐定碱溶液。实验用各槐定碱剂量为高剂量组 $9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 中剂量组和预防给药组 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 低剂量组 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.3.2 LPS 溶液 把 1 支 LPS (规格 10 mg) 溶于 10 mL 生理盐水, 即成为质量浓度 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ LPS 溶液。实验用 LPS 造模剂量为 $9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。

1.4 仪器 AL104 型电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; WFZ UV-2100 型紫外-可见分光光度计, 尤尼柯 (上海) 仪器有限公司; 80-2 型台式低速离心机, 江苏省金坛市医疗仪器厂; TGL-16-aR 型高速台式冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; SW-CJ-2F 型双人双面净化工作台, 苏州净化设备有限公司; XW-80 型旋涡混合器, 上海第一医学仪器厂; CX31RTSF 显微镜, Olympus; HH-4 型电热恒温水浴箱, 上海浦东物理光学仪器厂。

2 方法

2.1 肺损伤动物模型建造与分组^[8] KM 小鼠 ip LPS $9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (经预试验选定) 制备小鼠急性肺损伤模型。按随机数字表法, 将实验小鼠随机分为 6 大组。①正常对照小鼠 ip 0.5 mL 生理盐水, 连续 3 d; ②LPS 模型组小鼠 ip 生理盐水 0.5 mL, 连续 3 d; ③预防给药组小鼠 ip 槐定碱 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续 3 d; ④治疗组 (SR 高、中、低剂量组), 各组 $n = 10$; 与其余各组同步饲养, 每天 ip 与其他组相应量的生理盐水; 上述②③④组小鼠均在末次注射生理盐水或药物后 1 h, ip LPS $9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 进行造模; 治疗组的 SR 高、中、低剂量组小鼠在造模后 6 h 分别 ip SR ($9, 5, 2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 其他组小鼠继续 ip 0.5 mL 生理盐水, 连续 3 d, 取肺组织检测。

2.2 观察指标 观察记录各组小鼠用药前后的一般状况,取材检测下列指标。

2.2.1 肺组织匀浆 SOD 和 MDA 的测定 肺组织匀浆制备方法:取出右肺组织,放入冰生理盐水中漂洗除去浮血,滤纸吸干后,在冰浴上剪成碎块,称取适量组织,加入 19 倍量预冷的生理盐水,冰浴中快速研磨制成 5% 组织匀浆,4 ℃ 3 000 r·min⁻¹,离心 10 min,取上清液进行测定或 -80 ℃ 保存备用。肺组织匀浆 SOD 和 MDA 的测定:操作步骤按试剂盒说明书进行。同时用考马斯亮蓝染色法测肺组织匀浆蛋白的含量,操作步骤见试剂盒说明书,再根据公式换算 SOD 和 MDA 含量。

2.2.2 肺组织病理检查 取左肺置 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液固定后,石蜡包埋,HE 染色光镜观察。

2.2.3 免疫组化法检测肺组织中 NF-κBp65 的表达 将新鲜肺组织固定于 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液中,常规石蜡包埋,连续作厚 5 μm 的切片。免疫组化染色采用 PV-6000-G 二步法,其中 NF-κB p65 的稀释度为 1:200。

2.3 统计学分析 SPSS 16.0 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 小鼠一般状况的改变 正常对照组小鼠活动自如,无病态;LPS 组小鼠 ip LPS 30 min 后小鼠出现烦躁不安,而后活动减少,蜷缩萎靡,拒食腹泻,竖毛,口唇发紫;SR 预防给药组和治疗组的小鼠均出现与 LPS 组相同的症状,但多数症状较 LPS 组轻。

3.2 小鼠肺匀浆 SOD,MDA 含量变化 与正常组相比,其余各组小鼠肺组织匀浆 SOD 含量均明显降低($P < 0.05$),以 LPS 模型组含量最低。与 LPS 模型组相比,SR 治疗组(中、低剂量组)和预防给药组小鼠肺组织匀浆 SOD 含量明显升高($P < 0.05$)。与正常组相比,其余各组小鼠肺组织匀浆中 MDA 含量均明显升高($P < 0.05$),以 LPS 模型组含量最高。与 LPS 模型组相比,SR 治疗组(中、低剂量组)和预防给药组小鼠肺组织匀浆 MDA 含量明显降低($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 肺组织的病理变化

3.3.1 肉眼观 正常对照组小鼠肺组织呈粉红色,包膜完整,弹性良好,无病理改变;LPS 组小鼠均可

表 1 槐定碱对 LPS 致小鼠肺损伤肺匀浆 SOD 活力和 MDA 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

| 组别 | 剂量 /mg·kg ⁻¹ | SOD /U·mg ⁻¹ | MDA /nmol·mg ⁻¹ |
|---------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 正常对照 | - | 86.223 ± 8.859 ¹⁾ | 1.380 ± 0.182 ¹⁾ |
| LPS | - | 50.584 ± 10.059 | 2.006 ± 0.146 |
| 槐定碱预防给药 | 5 | 64.713 ± 5.741 ¹⁾ | 1.821 ± 0.117 ¹⁾ |
| 槐定碱治疗给药 | 9 | 56.335 ± 6.883 | 1.877 ± 0.034 |
| | 5 | 75.504 ± 13.007 ¹⁾ | 1.582 ± 0.285 ¹⁾ |
| | 2.5 | 67.017 ± 10.187 ¹⁾ | 1.748 ± 0.197 ¹⁾ |

注:与 LPS 组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

见整个肺组织充血,水肿,有出血点;SR 预防给药组和治疗组的小鼠肺组织亦充血,水肿,但程度较 LPS 组轻。

3.3.2 光镜下观 正常对照组小鼠肺组织切片结构正常,肺泡腔未见渗出物,偶见肺泡间隔轻度增宽;LPS 组肺泡腔内有炎性渗出物,肺泡间隔不同程度增宽,毛细血管扩张,大量单核细胞、淋巴细胞及少量中性粒细胞浸润,肺间质增厚,间质小静脉扩张出血,淋巴滤泡反应性增生;SR 预防给药组:肺泡腔内未见渗出物,偶见肺泡间隔增宽,间质小静脉扩张,充有中量淋巴细胞及少量中性粒细胞,少见淋巴细胞贴附管壁现象;SR 治疗组(高剂量组):肺泡腔内未见渗出物,肺泡间隔增宽,间质小静脉扩张,充有中量淋巴细胞及少量中性粒细胞,并见淋巴细胞贴附管壁现象;SR 治疗组(中剂量组):肺泡腔内未见渗出物,偶见肺泡间隔增宽,肺泡间隔毛细血管、间质小静脉充有少量淋巴细胞,无中性粒细胞浸润;SR 治疗组(低剂量组):肺泡腔内未见渗出物,灶性肺泡间隔增宽,肺泡间隔毛细血管、间质小静脉充有少量淋巴细胞,并伴少量中性粒细胞浸润。

3.4 对内毒素致小鼠急性肺损伤后 NF-κB p65 表达的影响 光镜观察可见正常组的 NF-κBp65 主要定位于肺泡和支气管上皮细胞,肺间质巨噬细胞等的胞浆,仅有少量表达,着色较浅,胞核内几乎无表达。与正常组相比,其余各组小鼠肺组织细胞中 NF-κB p65 表达均明显升高,以 LPS 模型组含量最高。LPS 模型组除胞浆表达增多外,少量肺泡和支气管上皮细胞,肺间质巨噬细胞等的胞核也出现表达,细胞着色明显加深;浸润的炎性细胞表达与肺间质巨噬细胞类似。表明 LPS 刺激后引起 NF-κB 活化,由胞浆向胞核移位。SR 高、中、低剂量组和预防

给药组与 LPS 模型组相比 NF- κ B p65 胞浆表达及核移位均有所减弱,且 SR 中剂量组作用效果最显著。见图 1。

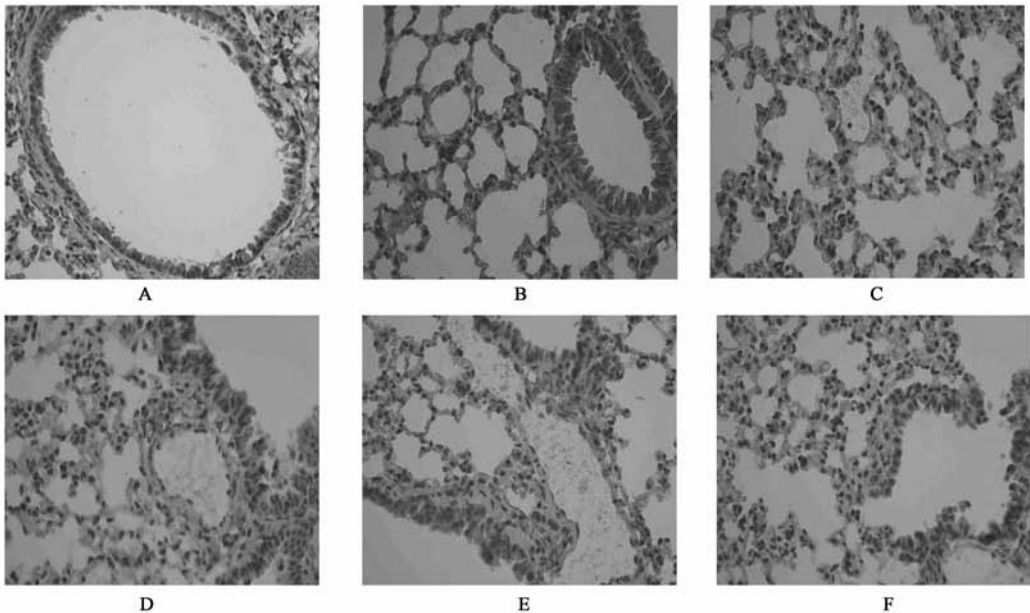
4 讨论

近年来内毒素血症导致的脓毒症和多器官功能障碍综合症的病死率呈上升趋势^[9]。由于内毒素血症时,肺脏是最早受损的器官之一,故本研究选择内毒素肺损伤小鼠模型观察槐定碱的抗内毒素效应。本实验用药剂量是参照槐定碱的 LD₅₀,再根据预试验结果选定。本文结果表明治疗性给予槐定碱和预防性应用槐定碱,分别不同程度地改善了模型鼠的一般状况和肺脏的病理变化,减轻了肺组织的炎症反应,其中治疗组中剂量槐定碱的体内效应最为显著。在本文实验条件下,综合各项疗效指标,提示治疗性给予槐定碱的抗内毒素性肺损伤作用优于预防性应用槐定碱。但治疗性给予槐定碱的 SR1 高剂量组的效果太不理想,这可能是高剂量槐定碱会对机体产生药理毒性,李雪梅^[10]和李玉香^[11]等也有过大剂量槐定碱对机体会造成损害这方面的报道。

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应的产物,SOD 的活力间接反应了机体清除氧自由基的能力,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。本实验中 LPS 模型组 SOD 含量明

显较正常组、治疗组和预防给药组低,MDA 增多,与丁娟^[12]、廖欣^[13]学者报道的类似,用槐定碱治疗后小鼠的 SOD 有一定程度的上升,而 MDA 却随之下落,这说明了槐定碱能提高小鼠体内清除自由基的能力、减少体内的氧自由基积聚,对内毒素肺损伤模型鼠的氧化损伤有一定的保护作用。

近年来,随着内毒素致病机制和分子生物学的研究发展,发现了 NF- κ B 这一类 DNA 转录调控蛋白。NF- κ B 是一种具有多向性转录调节的蛋白因子,能与多种基因启动子部位的 κ B 位点发生特异性结合并增强基因转录,其活性上调可导致包括 TNF- α 、IL-1、IL-6、CINC 等在内的一百多种与细胞免疫反应有关的物质生成增多^[14],在 ALI/ARDS 发病过程中起到十分重要的作用。所以,若能控制 NF- κ B 的表达,阻断其信号转导通路就有可能将炎症反应水平调控在恰当水平,将有利于 ALI/ARDS 的预防和治疗。本实验应用免疫组化来测定 NF- κ B p65 蛋白的表达,结果表明正常组小鼠肺组织中有 NF- κ B p65 蛋白的基础表达。模型组在给予 LPS 后肺组织 NF- κ B p65 的表达即显著上调,且显著高于正常组;除胞浆表达较正常组增多外,还可见胞核内表达,说明 LPS 刺激后引起 NF- κ B 活化,出现胞浆向胞核移位。运用槐定碱预防和治疗后,可见槐定碱高、中、低剂量组和预防给药组均明显抑制了 NF- κ B p65 蛋



A. 正常组;B. LPS 模型组;C. 槐定碱预防给药组(5 mg·kg⁻¹);D. 槐定碱高剂量组(9 mg·kg⁻¹);
E. 槐定碱中剂量组(5 mg·kg⁻¹);F. 槐定碱低剂量组(2.5 mg·kg⁻¹)

图 1 各组大鼠 NF- κ B p65 表达变化(免疫组化,×400)

白的表达,减少了核移位,且槐定碱中剂量组效果最显著。最后综上所述,槐定碱可以下调 NF- κ B p65 蛋白的表达,抑制 NF- κ B p65 的核移位,干预 NF- κ B 基因的转录从而影响下游炎症因子的基因表达。这也可能是槐定碱治疗 LPS 所诱导的急性肺损伤的机制之一。

本研究为开发抗内毒素药物提供了新的线索,虽选取了槐定碱的多种剂量、治疗和预防 2 种给药方式进行效应研究,但槐定碱对 LPS 信号转导通路中其他分子的影响,还需进行更加深入全面的研究,为其作为内毒素拮抗剂的应用价值提供更加翔实的实验依据。

[参考文献]

[1] Tamai R, Asai Y, Hashimoto M, Fukase K, et al. Cell activation by monosaccharide lipid A analogues utilizing Toll-like receptor 4[J]. Immunology 2003,110(1):66.

[2] Medvedev A E, Vogel S N. Overexpression of CD14, TLR4, and MD-2 in HEK 293T cells does not prevent induction of *in vitro* endotoxin tolerance[J]. J Endotoxin Res, 2003,9(1):60.

[3] Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways[J]. Semin Immunol, 2004,16(1):3.

[4] 蒋建新. 细菌内毒素基础与临床[M]. 北京:人民军医出版社, 2004: 96.

[5] 李晓红,齐云,蔡润兰,等. 芦荟大黄素对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 NO 生成及 iNOS 表达的影响[J]. 中

国药理学通报,2010,26(4):488.

[6] 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.

[7] 田真真,万红娇,杨翠萍. 槐定碱的药理研究综述[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(11):219.

[8] 韩燕,周娅,刘泉,等. 苦豆子抗内毒素效应的实验研究[J]. 中药材, 2006, 29(10): 1066.

[9] Angus D C, Linde-Zwirble W T, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care[J]. Crit Care Med, 2001, 29(7): 1303.

[10] 李雪梅,庄文华. 高剂量槐定碱对大鼠神经系统长期毒性的病理形态学观察[J]. 癌症, 2004, 23(11):1376.

[11] 李玉香,朱万平,陈晓霞,等. 槐定碱对自由活动大鼠海马脑电波及组织形态学的影响[J]. 中药药理与临床,2007,23(6):23.

[12] 丁娟,赵薇,聂黎虹,等. 槐定碱对急性心肌缺血大鼠血清 MDA, SOD, GSH-PX 及 NO 的影响[J]. 宁夏医科大学学报,2009,31(5):576.

[13] 廖欣,杨爱莲,杜少辉,等. 牛珀宝微丸对内毒素急性肺损伤 MDA 和 SOD 的影响[J]. 深圳中西医结合杂志,2006,16(4):196.

[14] Neurath M F, Becker C, Barbulescu K. Role of NF- κ B in immune and inflammatory responses[J]. Gut, 1998, 43(6):856.

[责任编辑 聂淑琴]