

大黄对肺卫失宣大鼠肺泡 II 型上皮细胞超微结构 及肺组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的影响

黄海定¹, 巫莉萍², 邓时贵^{1*}

(1. 广州中医药大学第二附属医院动物实验中心, 广州 510006;

2. 江西省赣州市人民医院药剂科, 江西 赣州 341000)

[摘要] 目的: 观察肺卫失宣大鼠肺组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力及肺泡 II 型上皮细胞超微结构的变化及大黄的调节作用, 探讨肺卫失宣肺损伤的物质基础及大黄的保护机制。方法: 以内毒素法建立肺卫失宣大鼠模型。60 只大鼠随机分成: 正常对照组、肺卫失宣模型组、模型自然恢复 5 d 组、大黄预防组(大黄颗粒剂 $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, ig 连续 2 d 后造模)和大黄治疗组(造模后 ig 大黄颗粒剂 $9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续 5 d)。采用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒检测 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力并以透射电镜观察肺泡 II 型上皮细胞超微结构的变化。结果: 与正常肺泡 II 型上皮细胞超微结构相比, 肺卫失宣模型组肺泡 II 型上皮细胞出现了板层小体空泡化, 内质网扩张, 胞浆肿胀, 核周隙扩张等; 自然恢复 5 d 组则表现为板层小体大量空泡化, 核固缩显著等超微结构改变; 大黄干预后, 板层小体数目增多, 内质网无扩张。与正常对照组比较, 肺卫失宣模型组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力呈降低趋势, 而自然恢复 5 d 组酶活力水平却异常升高 ($P < 0.05$); 大黄预防或治疗给药对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶高活性或低活力呈抑制作用。结论: 肺卫失宣大鼠肺泡 II 型上皮细胞超微结构受到破坏, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力异常, 提示肺卫失宣大鼠肺内微环境发生改变。大黄对肺泡 II 型上皮细胞的超微结构损伤具有修复作用, 并对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力调节呈双向调节作用, 是其保护肺卫失宣肺损伤的重要作用机制。

[关键词] 急性肺损伤; 肺泡 II 型上皮细胞; 大黄; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶; 超微结构

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0190-04

Effect of Rhubarb on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ Activity of Lung and Ultra-Structure of AT II Cells in Rats with Lung-defensive Sluggishness Syndrom

HUANG Hai-ding¹, WU Li-ping², DENG Shi-gui^{1*}

(1. The Animal Laboratory Center of the Second Affiliated Hospital of Guangzhou
University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Department of pharmacy, the Peoples' Hospital of Ganzhou, Ganzhou 341000, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the changes of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in the lung tissue and the changes of ultra-structure in alveolar type II cells in rats with lung defensive sluggishness syndrome (LDSS) and the regulation of rhubarb on it to explore the material foundation of LDSS and the mechanism of rhubarb in the prevention and treatment of the lung injury. **Method:** Lipopolysaccharide (LPS) was injected into SD rats to perform lung-defensive sluggishness syndrom, 60 rats was randomizly divided into 5 groups: control group, lung-defensive sluggishness group, natural recovery after 5 days group, Rhubarb prevention group ($9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 2 days before

[收稿日期] 2010-12-20

[基金项目] 广东省科技厅项目(83028, 2009B060300025); 广东省中医药管理局项目(2008318) 广州中医药大学项目(08CX82)

[第一作者] 黄海定, 从事动物实验及中药药理研究, E-mail: HHDLHX@126.com

[通讯作者] * 邓时贵, 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

modle establishment) and rhubarb treatment group ($9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ for 5 days after model establishment). The ultrastructure changes were observed under transmission electron microscope, The homogenate was used to detect the activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ with the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ kit. **Result:** Compared with the normal control group, alveolar type II cells Lamellar body vacuoles, endoplasmic reticulum, cytoplasmic swelling and perinuclear extension were showed in the model group. A large number of alveolar type II cells Lamellar body vacuoles, endoplasmic reticulum, markedly nuclear condensation were showed in the natural recovery after 5 days group. After the rhubarb intervention, the number of lamellar body of type II cells was larger than that in recovery after 5 days group and lung-defensive sluggishness group, especially no enlargement of endoplasmic reticulum. It was showed that the expression of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of lung-defensive sluggishness group was lower than that of control group. However, the expression in the natural recovery after 5 days group was significant higher than control group. Rhubarb could inhibit the abnormal expression of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of lung. **Conclusion:** The abnormal ultra-structure of alveolar type II cells and abnormal expression of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity can be showed in lung-defensive sluggishness model and rhubarb can inhibit them, which is one of the important mechanisms for protecting the lung injury in lung-defensive sluggishness syndrome.

[**Key words**] acute lung injury; alveolar type II cells; rhubarb; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$; ultra-structure

肺卫失宣属中医温病范畴,其临床表现可能源于肺内微环境的结构功能改变,造成水通道蛋白、钠离子通道、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力等肺水代谢异常,最终导致肺水肿、肺损伤。卫气营血各阶段都存在血瘀和毒侵两方面的基本病变,清热解毒和活血化瘀成为治疗温病的重要治法^[1]。大黄具有通便泻火,清热解毒,凉血化瘀之功,为通腑泻下药的代表,用于温病初期,其依据可追溯《本经》^[2],对急性肺损伤有保护作用^[3]。因此,我们观察肺卫失宣大鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构及肺组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的变化及大黄的调节作用,探讨肺卫失宣肺损伤的物质基础及大黄的保护机制。

1 材料

1.1 试剂 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒,批号20091219,南京建成生物研究所; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶试剂盒,批号20090725,南京建成生物研究所;2.5%戊二醛,中山大学中山医学院电镜室提供。

1.2 仪器 UV/V-4000 可见-紫外分光光度计,法码西亚公司;透射电子显微镜(Philips CM10)。

1.3 动物 SD大鼠60只,雌雄各半,体重160~220g,SPF级,合格证号0045632,0046522,广东省医学实验动物中心提供。

2 方法

2.1 大鼠造模分组与给药按文献[4]。

2.2 大黄对肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构的影响大鼠麻醉放血活杀后2min内于右肺下叶取 1 cm^3

肺组织放于2.5%戊二醛溶液中前固定,1%饿酸后固定,乙醇系列脱水,环氧树脂浸透、包埋,超薄切片机切片,铅染色后采用透射电镜观察肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构的变化。

2.3 大黄对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的影响按照考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒说明书,经蛋白浓度测定,酶促反应,定磷及 ATPase 活力计算等步骤检测大黄对肺卫失宣大鼠肺组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的变化。

2.4 数据统计应用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)结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对各组数据进行多个样本均数比较及两两比较的秩和检验。

3 结果

3.1 大黄对肺泡Ⅱ型上皮细胞超微结构的影响

图1结果提示,正常对照组肺泡Ⅱ型上皮细胞板层小体致密,细胞核、细胞浆、内质网形态正常,在LPS静脉注射6h后(肺卫失宣模型组),肺泡Ⅱ型上皮细胞板层小体空泡化,内质网扩张,胞浆肿胀,核周隙扩张;在LPS 5d后(自然恢复5d),肺泡Ⅱ型上皮细胞板层小体大量空泡化,且内质网扩张,核固缩显著;在大黄干预后,大黄预防组和大黄治疗组板层小体数目较肺卫失宣模型组和自然恢复5d组增多,且大黄预防组增多明显,内质网无扩张。结果表明,大黄对肺泡Ⅱ型上皮细胞的超微结构的损伤具有修复作用。

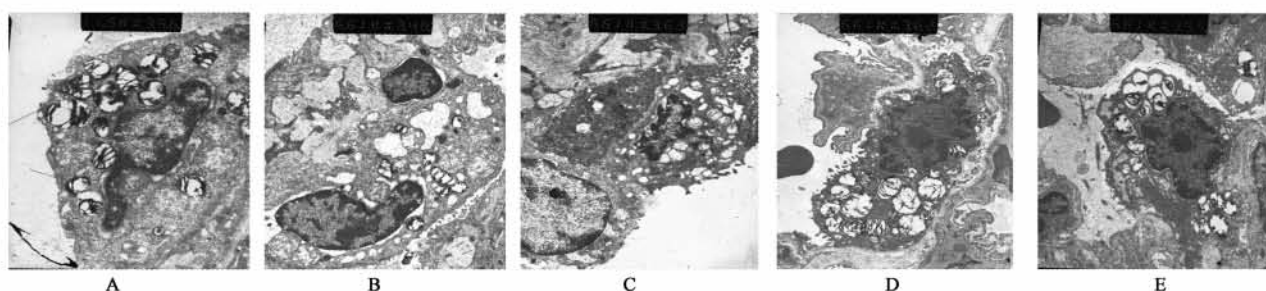


图 1 大黄对模型大鼠肺泡 II 型上皮细胞超微结构的影响

A. 正常对照组; B. 肺卫失宣模型组; C. 自然恢复 5 d 组; D. 大黄预防组; E. 大黄治疗组

3.2 大黄对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的影响 从图 2 可见,与正常对照组比较,肺卫失宣模型组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力呈降低趋势,而自然恢复 5 d 组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力水平却异常升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);大黄预防或治疗给药与肺卫失宣模型组比较,能提高 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力水平;与自然恢复 5 d 组相比,大黄能抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶高活性,其中治疗组对酶活力下调作用显著 ($P < 0.05$);大黄预防给药与治疗给药之间比较对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力未见明显差异。结果提示,肺卫失宣大鼠 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力呈双向表达异常,注射内毒素 6 h 后 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力受抑制,而注射内毒素后 5 d 则表现为异常高活性。大黄对肺卫失宣大鼠 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力双向异常均有抑制作用。

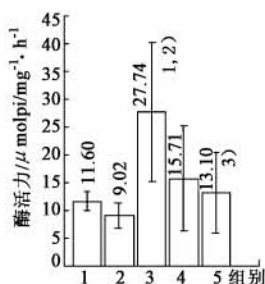


图 2 大黄对肺卫失宣大鼠肺组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力的影响

1. 正常对照组 ($n=7$); 2. 肺卫失宣模型组 ($n=8$); 3. 自然恢复 5 d 组 ($n=8$); 4. 大黄预防组 ($n=8$); 5. 大黄治疗组 ($n=7$)

与正常对照组比¹⁾ $P < 0.05$; 与肺卫失宣模型组比²⁾ $P < 0.05$; 与自然恢复组比³⁾ $P < 0.05$

4 讨论

肺泡 II 型上皮细胞含有丰富的嗜碱性板层小体,仅覆盖肺泡表面积的 3%,却是肺泡 I 型上皮细胞的前期细胞以及分泌肺泡表面活性物质,同时具有主动转运 Na^+ ,从而促使肺泡腔内的液体向细胞间隙转运,促进肺水的吸收,对肺泡内水份的清除能力、合成、分泌及损伤后的修复能力起着重要的作

用^[5-6]。肺泡 II 型上皮细胞是 LPS 诱导急性肺损伤时炎症反应的靶细胞,肺泡表面活性物质的合成和释放减少,肺泡上皮的钠水转运系统也将相应受到破坏^[7]。本试验提示肺卫失宣大鼠肺泡 II 型上皮细胞超微结构都受到破坏,肺内微环境结构功能改变,是肺水代谢异常的重要基础。大黄预防/治疗给药后肺泡 II 型上皮细胞超微结构的损伤明显减轻,表明大黄对肺卫失宣大鼠肺内微环境结构功能改变具有修复作用。其修复机制可能与大黄通腑泻下,活血化瘀,使体内的毒热邪气随大便排出体外,开宣肺气,改善肺组织病变,促进机体的新陈代谢,改善微循环,从而保护机体重要脏器的生理功能^[8]有关。只有受损的肺泡 II 型上皮细胞得到充分的修复,分布其上的水通道蛋白、钠离子通道、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶才能正常发挥作用。

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶是一种膜转运蛋白,在肺主要分布于肺泡 II 型细胞膜上,参与肺泡上皮液体的主动转运^[9-10]。肺泡中肺泡上皮 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶保持肺泡腔相对干燥和肺损伤肺水的清除中起重要作用,其活性的降低可能是产生肺水肿的重要机制之一^[11]。本实验中,肺卫失宣大鼠肺组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力低下,钠水转运功能下降,最大水解速度下降,推测 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶在肺水肿形成中起重要作用,这与文献报道一致^[11]。但自然恢复 5 d 组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性异常上调,以往的文献未见有类似报道,与水通道蛋白异常高表达一致^[12]。这可能机体在受到 LPS 持续打击后,机体代偿发挥负性调节,使 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 活力异常增高以加强肺泡腔内液体的转运,属机体的过度防御导致的结果,源于肺内微环境的结构功能改变。从肺损伤的结果来看,这种过度防御是不利于机体恢复;或者可能是钠离子通道基因表达的过度增强,引起 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的过度增强^[12]。大黄对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活

DOI:CNKI:11-3495/R. 20110303. 1348. 006

芪附汤对阿霉素心脏毒性损伤的保护作用及其抗氧化机制

于彩娜¹, 范颖^{1*}, 林庶茹²

(1. 辽宁中医药大学方剂学科, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学中医分子生物实验室, 沈阳 110032)

[摘要] 目的:观察芪附汤对阿霉素心脏毒性损伤模型大鼠心脏功能的影响,并初步探讨其作用机制。方法:采用心电图测定心脏功能的相关参数,采用化学比色法检测心肌细胞超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性及脂质过氧化产物丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量。结果:与正常组相比较,模型组大鼠心率显著减慢,QRS波群电压明显降低,Q-T间期明显延长,均有统计学意义($P < 0.05$),个别出现心律失常;与模型组相比较,芪附汤组、中药对照组心率增加,QRS波群电压和明显增高,Q-T间期显著缩短,均有统计学意义($P < 0.05$)。与正常组相比较,模型组、芪附汤组、中药对照组心肌细胞SOD和GSH-Px活性减弱,MDA含量上升,均有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比较,芪附汤组、中药对照组心肌细胞SOD和GSH-Px活性增强,MDA含量下降,均有统计学意义($P < 0.05$)。结论:芪附汤对阿霉素诱导的大鼠心脏毒性损伤具有保护作用,作用机制与其抗氧化应激有关。

[关键词] 芪附汤;阿霉素;心脏毒性;氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)08-0193-04

[收稿日期] 20101012(010)

[基金项目] 辽宁省教育厅高等学校创新团队项目(2007T117)

[第一作者] 于彩娜,女,博士在读,讲师,从事方剂配伍规律及其效应机制研究,Tel: 024-31207085, E-mail: yucn124@163.com

[通讯作者] *范颖,教授,博士生导师,从事方剂配伍规律及其效应机制研究,Tel: 024-31207104, E-mail: lnzyfy@126.com

[网络出版时间] 2011-03-03 13:48

力异常起双向调节作用,其保护肺卫失宣肺损伤作用与调节 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力密切相关。

[参考文献]

- [1] 申锦林,于为民. 张学文教授治疗热病急症经验之一一毒瘵[J]. 中国中医急症,1995,4(3):127.
- [2] 陈建萍,张之文,雷载权. 关于温病卫分证使用大黄的认知[J]. 广州中医药大学学报,1998,15(1):5.
- [3] 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(29):827.
- [4] 邓时贵,巫莉萍,黄海定. 水通道蛋白mRNA表达与肺卫失宣大鼠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.
- [5] Sartori C, Matthay MA. Alveolar epithelial fluid transport in acute lung injury: new insights[J]. Eur Respir J, 2002,20(5):1299.
- [6] Matthay MA, Clerici C, Saumon G. Invited review: Active fluid clearance from the distal air spaces of the lung[J]. J Appl Physiol, 2002,93(4):1533.
- [7] 张维,王导新. 肺泡上皮细胞与急性肺损伤水肿液清

除的研究进展[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2008,(7):74.

- [8] 夏永良. 论下法在急性外感热病中的运用[J]. 中华中医药学刊,2007,25(7):1464.
- [9] Ridge K M, Olivera W G, Saldias F, et al. Alveolar type I cells express the $\alpha 2 \text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, which contributes to lung liquid clearance[J]. Circ Res 2003, 92(4):453.
- [10] Johnson MD, Widdicombe JH, Allen L, et al. Alveolar epithelial type I cells contain transport proteins and transport sodium supporting an active role for type I cells in regulation of lung liquid homeostasis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002,99(4):1966.
- [11] Sznajder JI, Factor P, Ingbar DH. Invited review: lung edema clearance: role of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ [J]. J Appl Physiol, 2002, 93(5):1860.
- [12] Stem M, Ulrich K, Robinson C, et al. Pretreatment with cationic lipid mediated transfer of the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ pump in a mouse model in vivo augments resolution of high permeability pulmonary oedema [J]. Gene Ther, 2000, 7(11):960.

[责任编辑 何伟]