

红芪水提物对急性肺损伤模型大鼠的保护作用^Δ

向红^{1*},王雅莉^{1#},邱桐¹,金尧²,杨雪芳¹(1.甘肃中医学院病理学教研室/甘肃省中药药理与毒理学重点实验室,兰州 730000;2.甘肃中医学院中药资源教研室,兰州 730000)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)15-1352-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.15.03

摘要 目的:研究红芪水提物对急性肺损伤模型大鼠的保护作用。方法:腹腔注射内毒素(LPS)5 mg/kg以复制大鼠急性肺损伤模型。60只Wistar大鼠随机分为正常对照(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、地塞米松(10 mg/kg)组与红芪水提物高、中、低剂量(5.2、2.6、1.3 g/kg)组,复制模型4 h后灌胃给药,每天1次,连续3 d。光学显微镜观察大鼠肺组织病理形态学变化,计算肺系数(LI)、左肺湿/干质量比(W/D)与肺含水率,免疫组化法检测肿瘤坏死因子(TNF)- α 和白细胞介素(IL)-10蛋白的表达。结果:与正常对照组比较,模型组大鼠LI、W/D及肺含水率升高,IL-10蛋白表达减弱,TNF- α 蛋白表达增强,差异有统计学意义($P<0.01$),且肺组织病理损伤加重;与模型组比较,红芪水提物高、中、低剂量组大鼠LI、W/D及肺含水率降低,IL-10蛋白表达增强,差异有统计学意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$);红芪高、中剂量组大鼠TNF- α 蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P<0.01$),且大鼠肺组织病理损伤指标改善。结论:红芪水提物能明显减轻LPS所致大鼠急性肺损伤的炎症反应,其作用机制与下调TNF- α 表达、促进IL-10表达有关。

关键词 红芪水提物;急性肺损伤;肿瘤坏死因子 α ;白细胞介素10

Protective Effect of Water Extract of *Hedysaryum polybotrys* on the Acute Lung Injury Model Rats

XIANG Hong¹, WANG Ya-li¹, QIU Tong¹, JIN Yao², YANG Xue-fang¹ (1.Dept. of Pathology, Gansu College of TCM/Gansu Province Key Lab of Pharmacology and Toxicology of TCM, Lanzhou 730000, China; 2.Dept. of TCM Resources, Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To the protective effect of water extract of *Hedysaryum polybotrys* on the acute lung injury model rats. METHODS: ALI model was induced by intraperitoneal injection of endotoxin (LPS) 5 mg/kg. 60 Wistar rats were randomly divided into normal control group (constant volume of normal saline), model group (constant volume of normal saline), dexamethasone group (10 mg/kg), *H. polybotrys* high-dose, medium-dose and low-dose groups (5.2, 2.6, 1.3 g/kg). They were given relevant medicines intragastrically after modeling, once a day, for consecutive 3 days. Light microscope was used to observe histological changes, lung index (LI), wet/dry weight ratio (W/D) and moisture content of lung were all calculated. The expressions of TNF- α and IL-10 protein were determined using immunohistochemical method and image analysis system. RESULTS: Compared with normal control group, LI, W/D, moisture content of lung and the expression of TNF- α protein in model group were increased, while the IL-10 expression of protein was decreased; there was statistical significance ($P<0.01$); pathological changes of ALI were aggravate. Compared with model group, LI, W/D, moisture content of lung in *H. polybotrys* high-dose, medium-dose and low-dose groups were decreased significantly, while the IL-10 expression of protein was decreased; the expression of TNF- α in *H. polybotrys* high-dose and medium-dose groups was decreased significantly, there was statistical significance ($P<0.01$, $P<0.05$); pathological changes of ALI were relieved. CONCLUSIONS: Water extract of *H. polybotrys* could alleviate endotoxin-induced ALI rats, and its pharmacological mechanism may be related to down-regulation of TNF- α protein expression and up-regulation of IL-10 protein expression.

KEYWORDS Water extract of *Hedysaryum polybotrys*; Acute lung injury; TNF- α ; IL-10

急性肺损伤发病机制错综复杂、致病环节多、病死率高,已成为临床危重病研究的难点和热点。但是,目前中医、西医都没有确切的方法和药物阻止其疾病发展^[1-2]。红芪为豆科植物多序岩黄芪(*Hedysaryum Polybotrys*)的干燥根^[3],红芪水

提物是从红芪中提取的一种复合生物碱,研究已证实其可提高肺表面活性物质含量、清除自由基、减少过氧化物酶和丙二醛生成、增强免疫力、抗衰老^[4-7]。已有研究证明,红芪水提物能减轻新生儿呼吸窘迫综合征时肺脏的出血、充血、水肿及炎细胞浸润,使肺表面活性物质的分泌增加^[8]。肿瘤坏死因子(TNF)- α 是炎症因子网络的启动因子,白细胞介素(IL)-10与核因子(NF)- κ B活化有关,二者在急性肺损伤的发生发展中起关键作用^[9-10]。本研究拟通过观察红芪水提物对急性肺损伤模型大鼠各病理指标的影响,探讨其对急性肺损伤模型大鼠的保护作用及可能的机制。

^Δ 基金项目:甘肃省教育厅科研项目(No.1106B-04);甘肃中医学院中青年科研基金项目(No.ZQ2011-6)

* 硕士研究生。研究方向:呼吸系统疾病病理生理学。E-mail: kiloveki_1@126.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:病理学、病理生理学。E-mail: wyl050766@163.com

1 材料

1.1 仪器

洁净工作台(天津市泰斯特仪器有限公司);KX31型光学显微镜(日本Olympus公司);Microm HM315型切片机(美国Thermo公司);YB-6LF型生物组织包埋机(湖北亚光医用电子技术有限公司);FA1204B型电子天平(上海精密科学仪器有限公司)。

1.2 药材

红芪生药材由甘肃中医学院中药药剂教研室提供,经笔者鉴定为真品。

1.3 试剂

内毒素(LPS,美国Sigma公司);DAB显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);TNF- α 、IL-10免疫组化试剂盒(武汉博士德生物技术有限公司)。

1.4 动物

SPF级Wistar成年大鼠60只,♀♂兼用,体质量(200±20)g,购自甘肃中医学院实验动物中心[实验动物使用合格证号:SCXK(甘)2011-0001-0000372]。

2 方法

2.1 复制模型与分组、给药^[11-14]

ip LPS(5 mg/kg)以复制大鼠急性肺损伤模型。60只Wistar大鼠随机均分为6组,即正常对照组(等容生理盐水)组、模型(等容生理盐水)组、地塞米松(10 mg/kg)组与红芪水提物高、中、低剂量(5.2、2.6、1.3 g/kg)组,复制模型4 h后ig给药,每天1次,连续3 d。

2.2 指标的检测

2.2.1 肺系数(LI)、肺湿/干质量比(W/D)与肺含水率的测定

末次给药后,脱颈处死大鼠,取大鼠全肺,用滤纸吸取浮在脏器表面的血液或体液,用电子天平称定质量,按如下公式计算LI:LI=肺质量(mg)/体质量(g)×10。取大鼠左肺,称湿质量后,置烤箱中(60℃,48 h),取出,称干质量,然后计算W/D与肺含水率:W/D=肺湿质量(mg)/肺干质量(mg)×100%;肺含水率=(肺湿质量-肺干质量)/肺湿质量×100%。

2.2.2 肺组织病理学检测 取大鼠右肺中叶用4%甲醛固定48 h,切取肺组织块2~4 mm³常规脱水、石蜡包埋、切片,用苏木紫-伊红染色。在光学显微镜下观察大鼠肺泡间隔病变、炎症细胞浸润、血管瘀血状况等组织形态学变化。

2.2.3 免疫组化法检测TNF- α 、IL-10蛋白的表达 取大鼠右肺中叶组织,常规脱蜡、水化后,柠檬酸浸泡,高压锅加热进行抗原修复,滴加3% H₂O₂消除内源性过氧化物酶和生物素,再按以下步骤进行操作:①滴加正常山羊血清封闭,温箱育10 min,倾去,勿洗;②滴加一抗工作液(TNF- α 、IL-10均稀释150倍),37℃3 h,PBS冲洗3次,每次3 min;③滴加二抗,37℃15 min,PBS冲洗3次,每次3 min;④滴加辣根酶标记链霉素卵白素工作液,37℃15 min,PBS冲洗3次,每次3 min;⑤滴加DAB显色剂,3 min后放入自来水中浸泡10 min;⑥苏木素复染2 min,盐酸酒精分化,再放入氨水中浸泡;⑦脱水、透明、封片,

镜下观察。所有切片放大倍数为40倍,每张切片观察随机选取10个视野(直径为1 mm),利用LEICAQwin图像分析软件测定阳性反应物相对含量的平均灰度值,以其单位面积平均灰度作为表达量的参数。

2.3 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS13.0软件处理分析实验数据。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 红芪水提物对模型大鼠LI、W/D与肺含水率的影响

与正常对照组比较,模型组大鼠LI、W/D、肺含水率增高,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,红芪水提物高、中、低剂量组大鼠LI、W/D、肺含水率降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。红芪水提物对模型大鼠LI、W/D与肺含水率的影响见表1。

表1 红芪水提物对模型大鼠LI、W/D与肺含水率的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Effects of water extract of *H. polybotrys* on LI, W/D and moisture content of lung in model rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LI	W/D	肺含水率, %
正常对照组	10	0.55±0.036	5.10±0.46	80.24±1.90
模型组	10	1.16±0.14 [*]	9.66±0.82 [*]	89.58±0.89 [*]
地塞米松组	10	0.65±0.069 [#]	6.12±0.40 [#]	83.61±1.10 [#]
红芪水提物高剂量组	10	0.60±0.068 [#]	6.04±0.56 [#]	83.33±1.46 [#]
红芪水提物中剂量组	10	0.78±0.090 [#]	7.56±0.64 [#]	86.69±1.17 [#]
红芪水提物低剂量组	10	0.84±0.070 [#]	7.67±0.44 [#]	86.92±0.75 [#]

与正常对照组比较: * $P < 0.01$;与模型组比较: # $P < 0.05$

vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: # $P < 0.05$

3.2 红芪水提物对模型大鼠肺组织病理形态学的影响

正常对照组大鼠肺组织未见明显异常,肺泡结构清晰,大小均匀,肺泡壁薄,肺泡隔微血管无充血、瘀血;模型组大鼠肺泡和肺间质水肿,肺间隔明显增宽,肺泡腔变窄,肺泡内渗出物较多,炎症细胞浸润,可见较多的中性粒细胞、红细胞;地塞米松组大鼠肺组织结构尚清晰,破坏较轻,肺充血水肿减轻,炎症细胞浸润现象明显减轻或者消失;红芪水提物高剂量组大鼠肺组织结构清晰,肺泡间隔变窄,红细胞及中性粒细胞渗出减轻,肺组织病理损伤明显改善;红芪水提物中、低剂量组大鼠肺泡腔内出血程度、水肿及肺泡腔内炎症细胞数量低于模型组。红芪水提物对模型大鼠肺组织病理学的影响见表2。

表2 红芪水提物对模型大鼠肺组织病理学的影响

Tab 2 Effects of water extract of *H. polybotrys* on histological changes of lung tissue in model rats

组别	肺泡间隔病变			炎症细胞浸润			血管瘀血状况		
	无	轻	重	无	轻	重	无	轻	重
正常对照组	8	2	0	10	0	0	10	0	0
模型组	0	0	10	0	2	8	0	2	8
地塞米松组	1	7	2	2	7	1	2	8	0
红芪水提物高剂量组	1	8	1	0	9	1	0	8	2
红芪水提物中剂量组	0	5	5	0	5	5	0	6	4
红芪水提物低剂量组	0	4	6	0	5	5	0	3	7

3.3 红芪水提物对模型大鼠TNF- α 、IL-10蛋白表达的影响

3.3.1 红芪水提物对模型大鼠TNF- α 蛋白表达的影响 与正

常对照组比较,模型组大鼠肺组织 TNF- α 蛋白表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,红芪水提取物高、中剂量组大鼠肺组织 TNF- α 蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$)。红芪水提取物对模型大鼠 TNF- α 蛋白表达的影响见表 3。

表 3 红芪水提取物对模型大鼠 TNF- α 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab 3 Effects of water extract of *H. polybotrys* on the expression of TNF- α protein in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	平均灰度值
正常对照组	10	66.45 ± 9.56
模型组	10	128.06 ± 10.13*
地塞米松组	10	95.56 ± 6.65 [#]
红芪水提取物高剂量组	10	75.06 ± 4.65 [#]
红芪水提取物中剂量组	10	79.67 ± 7.17 [#]
红芪水提取物低剂量组	10	98.83 ± 10.70

与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: [#] $P < 0.01$

3.3.2 红芪水提取物对模型大鼠 IL-10 蛋白表达的影响 与正常对照组比较,模型组大鼠 IL-10 蛋白表达减弱,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,红芪水提取物高、中、低剂量组大鼠 IL-10 蛋白表达增强,差异有统计学意义($P < 0.01$)。红芪水提取物对模型大鼠 IL-10 蛋白表达的影响见表 4。

表 4 红芪水提取物对模型大鼠 IL-10 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)
Tab 4 Effects of water extract of *H. polybotrys* on the expression of IL-10 protein in model rats($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	平均灰度值
正常对照组	10	112.06 ± 10.13
模型组	10	66.45 ± 9.56*
地塞米松组	10	106.07 ± 7.17 [#]
红芪水提取物高剂量组	10	98.56 ± 6.65 [#]
红芪水提取物中剂量组	10	94.83 ± 10.70 [#]
红芪水提取物低剂量组	10	82.52 ± 10.13 [#]

与正常对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.01$
vs. normal control group: * $P < 0.01$; vs. model group: [#] $P < 0.01$

4 讨论

本研究中, ip LPS 以后,大鼠肺组织出现明显肿胀、全肺充血, LI、W/D 及肺含水率明显升高,光镜下大鼠肺组织呈现明显的急性肺损伤病理变化,说明急性肺损伤模型复制成功。ig 红芪水提取物后各组大鼠肺损伤程度明显改善,提示红芪水提取物可以有效地改善急性肺损伤状况,使大鼠肺组织肿胀减轻, LI、W/D 及肺含水率下降,肺组织病理损伤指标明显改善。同时,与模型组比较,红芪水提取物高、中、低剂量组大鼠 TNF- α 蛋白表达水平明显减弱,红芪水提取物高、中剂量组大鼠 IL-10 表达明显增强,证实了红芪对炎症因子的调节作用,说明红芪可以通过降低 TNF- α 等前炎症反应因子、增强抗炎因子 IL-10 的表达,重建体内炎症介质/抗炎介质的平衡,从而抑制急性肺损伤的发展,对急性肺损伤模型大鼠具有保护作用。其中,红芪水提取物高剂量组效果明显,其对 TNF- α 和 IL-10 蛋白表达的调节作用均优于中、低剂量组。红芪水提取物对 TNF- α 与 IL-10 调节的作用机制可能是^[15-16]: (1) 红芪水提取物通过降低细胞前炎症因子,从而抑制中性粒细胞和单核细胞炎症介质的释放;

(2) 红芪水提取物可以改善肺泡细胞的缺氧和营养缺乏,增强抗炎因子的表达; (3) 红芪水提取物能够修复受损的内皮细胞,阻断其与中性粒细胞的黏附,从而抑制其他炎症介质,如前列腺素、IL-6 和 IL-8 等的释放。

参考文献

- [1] 中华医学会重症医学分会. 急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征诊断和治疗指南: 2006[J]. 中华急诊医学杂志, 2007, 16(4): 343.
- [2] Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB, *et al.* Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome[J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(16): 1671.
- [3] 杨林, 谭玉玲. 中药红芪的研究现状[J]. 中外医疗, 2010, 12(5): 120.
- [4] 朱冉, 郭玫. 红芪有效成分及“入脾经”相关药理研究[J]. 西部中医药, 2012, 25(1): 27.
- [5] 胡燕, 程卫东, 刘欣, 等. 红芪和黄芪水提取物对小鼠免疫功能影响的差异[J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(9): 623.
- [6] 白娟, 黄正良, 李萍. 红芪对油酸型肺损伤大鼠肺泡表面活性物质含量及板层小体的影响[J]. 中药药理与临床, 1997, 13(2): 26.
- [7] 梁晓海. 红芪水提取物肺灌洗对兔肺炎链球菌肺炎的动脉血气的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2008.
- [8] 雷丰丰, 赵建雄, 王学习, 等. 红芪总多糖对大鼠肺纤维化及其转化生长因子 β_1 干预的实验观察[J]. 中药材, 2008, 31(6): 873.
- [9] 李彬, 李淑君. TNF- α 和 NF- κ B 在急性肺损伤中的作用机制[J]. 包头医学院学报, 2011, 27(2): 120.
- [10] 李洪霞, 张进川, 赵亚力, 等. 白细胞介素 10 对急性肺损伤炎症/抗炎介质表达的影响[J]. 中国危重急救医学, 2005, 17(6): 338.
- [11] 赵敏, 师霞, 邱桐, 等. 黄芪对急性呼吸窘迫综合征大鼠模型肺组织中 SP-A 的影响[J]. 中医临床研究, 2013, 5(8): 1.
- [12] 朱耀斌, 李晓峰, 张燕搏, 等. 急性肺损伤动物模型[J]. 中华实用诊断与治疗, 2011, 25(7): 625.
- [13] 方青, 高荣, 高英杰, 等. 急性肺损伤动物模型的研究现状[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(5): 50.
- [14] 马涛, 马小民, 高玉华, 等. 两种不同诱因所致急性肺损伤动物模型比较[J]. 江苏医药, 2010, 36(21): 2546.
- [15] 李超然. 内毒素所致急性肺损伤发病机制的研究进展[J]. 中国医药科学, 2011, 1(10): 47.
- [16] 关岚, 涂家红, 李天水, 等. 白细胞介素在急性肺损伤大鼠中的作用[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2008, 3(12): 728.

(收稿日期: 2013-10-05 修回日期: 2013-11-15)