

· 论著 ·

黄芪对急性肺损伤模型大鼠肺组织水通道蛋白-1 和水通道蛋白-5 表达的影响

刘毅 梅荣 杨明会 李绍旦 王文明

【摘要】 目的 探讨补气中药黄芪对急性肺损伤模型大鼠肺组织水通道蛋白-1 (AQP-1) 和水通道蛋白-5 (AQP-5) 表达的影响。**方法** 将 30 只雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组、模型组、中药组各 10 只, 予以每 ml 相当于 0.25 g 黄芪生药的煎剂干预后, 使用凝胶电泳测条带积分光密度值来检测确定肺组织 AQP-1 和 AQP-5 的表达情况。**结果** 中药组大鼠肺组织 AQP-1 的积分光密度值为 (0.572 ± 0.084) , 模型组大鼠肺组织 AQP-1 的积分光密度值为 (0.278 ± 0.068) , 中药组高于模型组 ($P < 0.01$)。中药组大鼠肺组织 AQP-5 的积分光密度值为 (0.812 ± 0.084) , 模型组大鼠肺组织 AQP-5 的积分光密度值为 (0.525 ± 0.045) , 中药组高于模型组 ($P < 0.05$)。中药组与正常对照组无明显差异 ($P > 0.05$)。**结论** 黄芪可能是通过促进肺组织 AQP-1、AQP-5 的表达, 从而起到对模型大鼠急性肺损伤的防治作用。

【关键词】 急性肺损伤; 黄芪; 水通道蛋白-1; 水通道蛋白-5

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2012.09.003

Effect about Astragalus mongholicus on AQP-1 and AQP-5 expression in lung tissue of ALI model rat LIU Yi, MEI Rong, YANG Ming-hui, et al. Department of Traditional Chinese Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: YANG Ming-hui, E-mail: ymh9651@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of supplementing qi herbs astragalus mongholicus (huangqi) on AQP-1 and AQP-5 expression of lung tissue of ALI model rat induced by LPS. **Methods** 30 male Sprague Dawley rats were randomly divided into normal control group, model group, herbs group, each 10. Test AQP-1 mRNA and AQP-5 mRNA expression of lung tissue, after the supplementing qi herbs used. **Results** AQP-1 mRNA IOD of herbs group (0.572 ± 0.084) , AQP-1 mRNA IOD of model group (0.278 ± 0.068) , herbs group higher than model group ($P < 0.01$); AQP-5 mRNA IOD of herbs group (0.812 ± 0.084) , AQP-5 mRNA IOD of model group (0.525 ± 0.045) , herbs group higher than model group ($P < 0.05$); There were no statistical significance between herbs group and normal control group ($P > 0.05$). **Conclusion** Supplementing qi herbs astragalus mongholicus prevent and treat the ALI probably by promoting the AQP-1 mRNA and AQP-5 mRNA expression of lung tissue.

【Key words】 Acute lung injury; Astragalus mongholicus; AQP-1; AQP-5

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI), 是一种较为常见的急危重症, 死亡率高。由于其发病机制十分复杂, 目前有效治疗手段有限。其病理特点是: 肺泡毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞损伤、广泛

肺水肿和微小肺不张, 导致肺部炎性细胞浸润、水肿、气体交换障碍^[1]。研究发现, 中药对 ALI/ARDS 具有显著的预防和治疗作用^[2]。水通道蛋白 (aquaporins, AQPs) 是一组与水通透性有关的细胞

基金项目: 国家自然科学基金 (30873344)

作者单位: 100853 北京, 中国人民解放军总医院中医院

作者简介: 刘毅 (1965-), 本科, 副主任技师。研究方向: 医学实验。E-mail: liuyi935669@sina.com

通讯作者: 杨明会 (1962-), 教授, 主任医师, 博士生导师。中华中医药学会副会长, 中国人民解放军中医药学会会长。研究方向: 老年病中医研究。E-mail: ymh9651@yahoo.com.cn

文献标引:

刘毅, 梅荣, 杨明会, 等. 黄芪对急性肺损伤模型大鼠肺组织水通道蛋白-1 和水通道蛋白-5 表达的影响 [J]. 环球中医药, 2012, 5(9): 651-653.

膜转运蛋白,参与体液容量调节,研究发现 AQP-1 和 AQP-5 与肺水肿的发病密切相关^[3-4]。本研究采用脂多糖(lipopolysacchride, LPS)气管滴入法制备急性肺损伤大鼠模型,并用补气中药黄芪进行干预,通过观察大鼠肺组织中 AQP-1 和 AQP-5 表达的变化,来探讨补气中药黄芪防治急性肺损伤可能的作用机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用 8 周龄健康清洁级 SD 雄性大鼠 30 只,体重(200±20)g。大鼠由解放军总医院医学实验动物中心提供,合格证号为[HCXX(京)2006-0094]。

1.2 供试药品

补气中药生黄芪生药材由解放军总医院中药房采购及鉴定,制剂由总后卫生部药品检定所制备及鉴定。配制成每 ml 相当于 0.25 g 生药的煎剂。

1.3 主要试剂

脂多糖(lipopolysacchride, LPS)为 Sigma 公司产品。总 RNA 快速提取试剂盒购自北京博迈德生物公司,反转录 PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)试剂盒购至北京全式金生物技术有限公司。速眠新 II 注射液[解放军军需大学兽医研究所生产,吉兽药试字(2004005013)]。

1.4 动物分组、造模与处理

用随机数字法将 30 只大鼠随机分为正常对照组、模型组、中药组各 10 只。

所有大鼠适应性饲养 7 天后开始实验,实验前称重。模型组和正常对照组每日予以生理盐水 2 ml 灌胃,连续 7 天。中药组灌胃法给黄芪药液,剂量 2 ml/天(0.25 g/ml),连续 7 天。

模型组、中药组大鼠给药 7 天后造模。用速眠新 II 肌肉注射麻醉大鼠,采用 LPS(1 mg/kg 体重溶于生理盐水,200 μl/只)气管滴入法^[5]。正常对照组生理盐水灌胃 7 天后,按同样方法气管滴入同等体积生理盐水(200 μl/只)。上述所有大鼠在经气管滴入 LPS 或生理盐水处理后 4 小时,取左肺组织 100 mg 行相关指标检测。

1.5 检测指标

取左肺组织 100 mg,用总 RNA 快速提取试剂盒提取肺组织总 RNA,具体步骤严格按试剂盒说明书进行。在 260 nm 和 280 nm 处使用紫外分光光度计测定 RNA 含量。

荧光定量 RT-PCR 分析肺组织 AQP-1mRNA 和 AQP-5mRNA 表达。逆转录合成 cDNA,进行 PCR 反应。引物序列: AQP-1 上游引物 5'-TGTGCGTTCTGGCTAC-3', AQP-1 下游引物 5'-CTATTTGGGCTTCATCTC-3',片段长度为 359 bp; AQP-5 上游引物 5'-CAAGGCGGTGTTCCGAGA GTTCC-3', AQP-5 下游引物 5'-CCTCTCGAT GATCT TCCCAGTCC-3',片段长度为 733 bp;β-actin 上游引物 5'-CCAAGGCCAACC GCGAGAAGATGAC-3',β-actin 下游引物 5'-AGGGTACATGGTGGTCCCGCCAGAC-3',片段长度为 500 bp。

AQP-1 的 PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 2 分钟,94 ℃ 变性 50 秒,60 ℃ 退火 58 秒,72 ℃ 延伸 1 分钟,循环 30 次,72 ℃ 扩增 8 分钟。AQP-5 的 PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 3 分钟,94 ℃ 变性 50 秒,58 ℃ 退火 60 秒,72 ℃ 延伸 1 分钟,循环 30 次,72 ℃ 扩增 10 分钟。β-actin 的 PCR 扩增条件:94 ℃ 预变性 5 分钟,94 ℃ 变性 50 秒,55 ℃ 退火 60 秒,72 ℃ 延伸 1 分钟,循环 30 次,72 ℃ 扩增 10 分钟。

荧光定量 RT-PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶图像分析系统拍摄并分析结果,DNA Marker 长度为 2000 bp。通过测定各条带光密度,计算目的条带与 β-actin 条带积分光密度的比值(IOD 值)表示 mRNA 表达的相对强度。

1.6 统计学方法

应用 SPSS 11.5 统计软件进行统计分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析比较各组间的差别有无显著性统计学意义。

2 结果

电泳结果显示目的条带在 359 bp 处,可见 AQP-1mRNA 表达;在 733 bp 处,可见 AQP-5mRNA 表达。

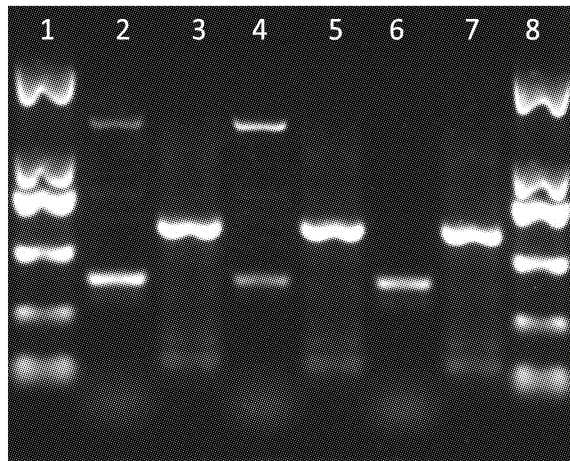
AQP-1mRNA 表达情况:正常对照组 IOD 值最高,为(0.648±0.035);模型组 IOD 值最低,为(0.278±0.068);模型组与中药组比较具有显著性差异($P<0.01$);正常对照组与中药组比较无显著性差异($P>0.05$)。

AQP-5mRNA 表达情况:正常对照组 IOD 值最高,为(0.843±0.029);模型组 IOD 值最低,为(0.525±0.045);模型组与中药组比较具有显著性差异($P<0.05$);正常对照组与中药组比较无显著性差异($P>0.05$)。见表 1 及图 1~2。

表 1 各组大鼠肺组织 AQP-1mRNA、AQP-5mRNA 表达 IOD 值比较 ($\bar{x} \pm s$) ($n=10$)

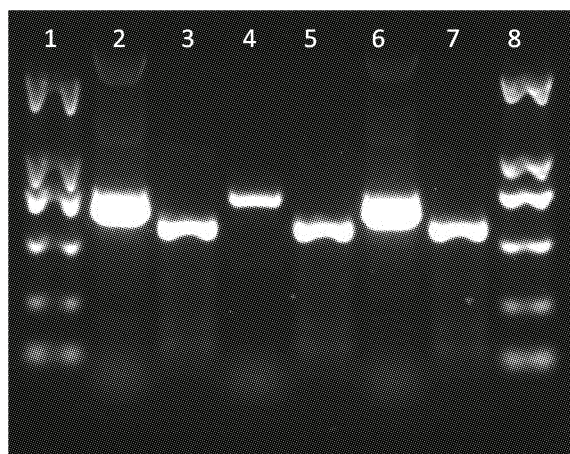
组别	AQP-1mRNA	AQP-5mRNA
正常对照组	0.648±0.035 ^b	0.843±0.029 ^a
模型组	0.278±0.068	0.525±0.045
中药组	0.572±0.084 ^b	0.812±0.084 ^a

注:与模型对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$ 。



1,8:Marker;3,5,7:β-actin;2:正常对照组;4:模型组;6:中药组

图 1 AQP-1mRNA 荧光定量 RT-PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳情况



1,8:Marker;3,5,7:β-actin;2:正常对照组;4:模型组;6-中药组

图 2 AQP-5mRNA 荧光定量 RT-PCR 产物在琼脂糖凝胶上电泳情况

3 讨论

LPS 气管滴入法是目下较为成熟的制备 ALI 动物模型的方法之一^[6],已广泛地应用于 ALI 的发病机制和预防治疗研究中。本研究采用此模型来探

讨补气中药黄芪防治 ALI 的作用机理。

AQPs 的功能在肺部主要是参与肺水的跨膜转运,水在呼吸道和肺的代谢,必须借助水通道蛋白等通道来完成。AQP-1 分布于肺血管内皮细胞的细胞膜上,主要定位于肺泡周围血管内皮的血液侧的水分子通路,清除支气管和脉管周围组织的水分^[4]。在肺组织中,AQP-5 主要表达在肺泡 I 型上皮细胞,与肺泡 I 型上皮细胞跨膜水分子转运关系密切,主要参与构成血气屏障气体侧的水分子通路,清除肺泡腔内的水分^[7]。研究显示,LPS 所致 ALI 时,AQP-1、AQP-5 的表达均降低,是由于 AQP-1、AQP-5 的合成受到影响而不是转移受到影响,可能与肺泡-毛细血管膜屏障受损有关。当 ALI 发生时,由于内皮细胞和肺泡上皮细胞受损,使 AQP-1、AQP-5 不能维持其正常的空间构象,合成障碍,表达明显下调,功能丧失,导致液体在肺泡腔、肺间质的积聚^[8]。本研究结果显示,中药组大鼠肺组织 AQP-1mRNA、AQP-5mRNA 明显高于模型对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),中药组与正常对照组无显著差异($P>0.05$),提示补气中药黄芪可能是通过保护肺泡-毛细血管膜屏障,维持 AQP-1、AQP-5 正常的空间构象,促进 AQP-1、AQP-5 合成与表达,保持肺组织正常水液代谢功能正常,从而起到防治模型大鼠 ALI 的作用。

参 考 文 献

- [1] 宋振举,白春学. 我国急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征临床和实验研究进展[J]. 内科理论与实践,2010,5(6):496-499.
- [2] 刘建新,余林中. 中药保护急性肺损伤作用机理研究进展[J]. 陕西中医学院学报,2009,32(6):83-85.
- [3] 郭亮,张端莲. 水通道蛋白与急性肺损伤[J]. 华南国防医学杂志,2009,23(1):81-83.
- [4] 李玉梅,戴春来,李恒,等. 水通道蛋白与肺水肿关系的研究进展[J]. 中国实验诊断学,2010,14(10):1675-1676.
- [5] 方舒东,杨锡馨. 急性肺损伤动物模型的建立[J]. 山西医科大学学报,2002,33(3):280-282.
- [6] 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):51-54.
- [7] King LS,Agre P. Pathophysiology of the aquaporin water channels. Annu Rev Physiol,1996,58:619-648.
- [8] 李波,陈东,王桂芳,等. 水通道蛋白 1、3、4、5 在内毒素性急性肺损伤小鼠肺组织中的表达[J]. 第二军医大学学报,2008,29(2):131-135.

(收稿日期:2012-08-01)

(本文编辑:张磊)