

益气活血中药对脂多糖致急性肺损伤大鼠的防治作用

秦丽 王毓国 李敏 窦永起

【摘要】 目的 观察益气活血中药对脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)致急性肺损伤(acute lung injury,ALI)大鼠的防治作用,并初步探讨其作用机制。**方法** SD 雄性大鼠 40 只,随机分成正常对照组、模型对照组、地塞米松组、益气活血中药治疗组、益气活血中药防治结合组,每组 8 只;除正常对照组行气管内滴注生理盐水,其余各组均滴注 LPS(5 mg/kg)制备 ALI 大鼠模型;造模前后各 3 天干预组予以 2 mL 相应药物(益气活血中药 0.59 g/mL;地塞米松 5 mg/kg),其余组予以等量的生理盐水灌胃。观察大鼠的呼吸、精神等一般活动;于末次灌胃给药 2 小时后处死大鼠,测定大鼠肺湿重/干重(W/D)比值,支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中总蛋白含量,及光镜下观察肺组织病理学改变。**结果** LPS 造模组大鼠肺 W/D 比值、BALF 中蛋白浓度及肺组织中肿瘤坏死因子(tumornecrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素(interleukin,IL)-1 β 、IL-6 含量均高于正常对照组($P<0.01$),且模型对照组高于地塞米松组和中药治疗组、中药防治结合组($P<0.05$),治疗组高于防治组($P<0.05$, $P<0.01$);地塞米松组 W/D 比值及肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 含量与中药防治组无明显差异($P>0.05$)。**结论** 益气活血中药能够降低 LPS 致 ALI 大鼠 BALF 中蛋白含量及肺组织中炎症因子的含量,减轻肺水肿和肺组织的病理损伤,起到防治急性肺损伤的作用。

【关键词】 益气活血中药; 急性肺损伤; 脂多糖

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.05.007

基金项目:国家自然科学基金(81303131)

作者单位:100853 北京,中国人民解放军总医院中医科[秦丽(硕士研究生)、王毓国、李敏、窦永起]

作者简介:秦丽(1990-),女,2014 级在读硕士研究生。研究方向:中西医结合临床。E-mail:qinlizi301@163.com

通讯作者:窦永起(1965-),硕士,主任医师,教授,博士生导师。研究方向:中西医结合临床。E-mail:dyqi_301@yeah.net

Preventive effect of Yiqi Huoxue recipe on lipopolysaccharide induced acute lung injury in rats

QIN Li, WANG Yu-guo, LI Min, et al. Department of Traditional Chinese Medicine, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: DOU Yong-qi, E-mail: dyqi_301@yeah.net

【Abstract】 Objective To observe the preventive effect of Yiqi Huoxue recipe on acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS), and explore its mechanism. **Methods** Forty healthy male SD rats were randomly divided into normal control group, model control group, dexamethasone group, herbs treatment group, herbs prevention group, eight rats in each group. ALI models were established by intratracheal instillation of LPS (5 mg/kg) while normal control group was instilled normal saline. 3 days before and after making the model, the drug (0.59g/mL herbs or dexamethasone for 5mg/kg) or same amount of normal saline was given by gavage in each group, and observe their respiration, activity and so on. Rats were sacrificed after 2h of the last administration. Then the lung wet weight / dry weight (W/D) ratio and the protein content in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) was measured, and the pathological changes in lung tissues. **Results** Compared with normal control group, LPS groups exhibited a higher level of the lung W/D weight ratio, the protein content in BALF and the content of TNF- α , IL-1 β , IL-6 in lung tissue ($P < 0.01$); compared with model control group, the indexes in dexamethasone group and herbs group were decreased ($P < 0.01$); compared with herbs treatment group, the indexes in herbs prevention group were decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); the lung W/D weight ratio, the content of TNF- α , IL-1 β between dexamethasone group and herbs prevention group were close ($P > 0.05$). **Conclusion** Yiqi Huoxue recipe can reduce the contents of inflammatory cytokines and protein content in BALF of LPS induced ALI rats, reduce the pathological damage of lung tissue and pulmonary edema, have the effect of prevention and treatment of acute lung injury.

【Key words】 Yiqi Huoxue recipe; Acute lung injury; Lipopolysaccharide

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)、急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是感染、创伤等病因下出现的以进行性呼吸困难、顽固性低氧血症和肺水肿为主要表现的临床综合征。ARDS 是 ALI 的严重阶段,为临床常见的急危重症,由于其发病机制复杂,治疗效果不佳,其病死率仍然居高不下,平均病死率高达 50% 以上^[1]。课题组既往研究^[2]表明益气活血中药通过促进血液中血管活性多肽降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)的合成与释放、抑制血管收缩因子内皮素-1(endothelin, ET-1)的生成及释放,从而扩张血管、减轻肺水肿、改善肺循环,发挥对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)致 ALI 大鼠的防护作用。本研究通过益气活血中药干预 LPS 诱导的 ALI 大鼠,观察支气管肺泡灌洗液中蛋白和肺组织中炎症因子的变化,初步探讨益气活血法防治 ALI 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用两月龄健康清洁级 SD 雄性大鼠 40 只,体重为(200 \pm 20) g,由中国人民解放军军事医学科

学院实验动物中心提供,许可证号:SCXK(军):2012-0004。

1.2 药物制备

益气活血中药由生黄芪和丹参组成,两者用量比例为 2 : 1,中药材由解放军总医院中药房采购及鉴定,经过浸泡、煎煮和过滤后,在恒温水浴锅(60 $^{\circ}$ C)中浓缩成含生药量为 0.59 g/mL 的药液(按大鼠与人体体表面积换算公式计算^[3])。

1.3 主要试剂和仪器

脂多糖,购自 Sigma 公司,批号:L2880;戊巴比妥钠,购自 Germany 公司,批号:K2208;BCA 法蛋白定量试剂盒,购自北京普利莱公司,批号:201308;大鼠肿瘤坏死因子(tumornecrosis factor, TNF)- α (Andygene,批号:HTLN30633)、白介素(interleukin, IL)-1 β (Andygene,批号:HTCL30418)、IL-6(Andygene,批号:HTLC30649)ELISA 试剂盒。

多功能酶标仪(VICTOR X5),购自 PerkinElmer 有限公司;旋转蒸发器(RE53CS),购自上海亚荣生化仪器厂;切片机(莱卡 2016),购自上海莱卡仪器有限公司;包埋机,购自湖北孝感亚鹏仪器厂;台式冷冻离心机(1-15K),购自 SIGMA 公司;电热恒温箱(DHG-9240A),购自北京陆希科技有限公司。

1.4 动物分组及处理方式

SD 雄性大鼠 40 只,随机分成正常对照组、模型对照组、地塞米松组、益气活血中药治疗组、益气活血中药防治结合组,每组 8 只。中药防治结合组(简称中药防治组)大鼠在造模前 3 天每天予以益气活血中药 2 mL 灌胃(1 次/d,含生药量 0.59 g/mL),其余组大鼠每天予以同体积的生理盐水。在造模成功后,益气活血中药治疗组(简称中药治疗组)和中药防治组大鼠每天予以 2 mL 益气活血中药(0.59 g/mL)灌胃,地塞米松组大鼠每天予以 2 mL 地塞米松溶液(5 mg/kg)灌胃,正常对照组和模型对照组大鼠每天予以等量的生理盐水灌胃,1 次/d,连续给药 3 天。

1.5 制备 ALI 大鼠模型

采用 LPS 暴露式气管滴注方法制备 ALI 模型^[4]。除正常对照组外,其余各组均给予气管内滴注 LPS 溶液(5 mg/kg)。造模过程:无菌环境下,采用 3% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射进行大鼠麻醉,固定大鼠于仰卧位,正中切开颈部组织,使气管暴露,用 1 mL 注射器由气管向肺方向滴注 LPS 溶液,而后将大鼠直立、旋转并左右摇晃,使 LPS 溶液在肺内均匀分布,从而建立内毒素性急性肺损伤大鼠模型。正常对照组大鼠按上述方法向气管滴入等量的生理盐水。

1.6 标本取材与观测指标

1.6.1 一般情况 造模后观察各组大鼠的呼吸频率、自主活动、精神状况和唇爪颜色等情况。

1.6.2 大鼠支气管肺泡灌洗液中总蛋白浓度的测定 所有大鼠在造模灌胃后第 3 天麻醉称重,处死后剪开胸部和颈部皮肤,暴露胸腔;结扎大鼠右主支气管后,在主气管上插入导管至下端分叉处,注入磷酸盐缓冲液 2 mL 进行左肺灌洗,反复 3 次,总回收量约为 5.5 mL;将收集的支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)进行 4℃ 离心,3000 rpm,15 分钟,取上清液。采用 BCA 法检测 BALF 中总蛋白浓度,操作严格按试剂盒说明书进行。反应终止后,用酶标仪 562 nm 观测密度(OD)值,绘制标准曲线,用 Excel 拟合曲线计算蛋白浓度。

1.6.3 大鼠肺湿重/干重(W/D)比值 取右肺上叶组织,用滤纸吸走表面附着的水分与血渍,称得湿重(wet weight, W)后将其置于 60℃ 恒温箱中 72 小时至重量不再改变,取出称得干重(dry weight,

D),计算 W/D 比值。

1.6.4 大鼠肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的测定 称取右肺中叶,以每 100 mg 组织加入生理盐水 1 mL,在冰上用匀浆器匀浆,4℃、3000 rpm、15 分钟,低温离心取上清液,采用双抗体夹心酶联免疫(ELISA)法,严格按试剂盒说明书方法进行 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 因子浓度的检测。反应终止后选择 450 nm 波长,检测相应的 OD 值,计算相应的浓度。

1.6.5 肺组织大体情况和病理学观察 取材时肉眼观察双侧肺组织表面色泽、包膜完整性、水肿情况及有无出血点等。并取右肺下叶组织,放入 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 小时后,进行脱水、透明和石蜡包埋并作 4 μ m 厚切片,然后进行苏木精-伊红染色,光镜下观察大鼠肺组织的病理形态改变。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,数据符合正态分布,采用单因素方差分析(one-way ANOVA),方差齐时组间比较采用 LSD 分析方法,方差不齐时用 Tamhane's T2 法。不符合正态分布的数据,则用非参数检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

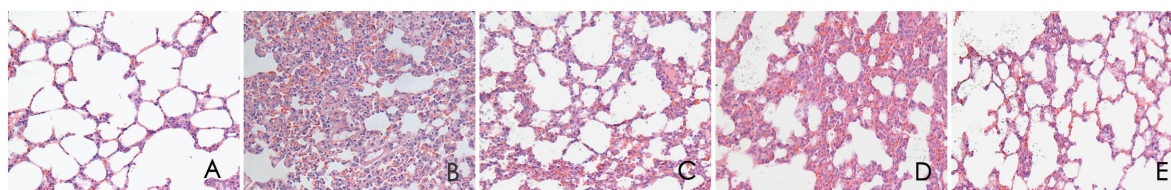
2.1 各组大鼠一般状况

正常对照组大鼠生理盐水造模及麻醉缓解后呼吸尚平稳,对外界刺激反应正常。而气管滴注 LPS 造模大鼠,2 小时内呼吸急促并发出喘鸣音,且精神萎靡、反应迟钝、自主活动减少、四肢和口唇发绀;随后至 4 小时内模型对照组大鼠精神仍然萎靡、无进食进水,而防治组大鼠呼吸平稳、自主活动开始恢复。

2.2 大体观察及光镜下观察各组大鼠肺组织

正常对照组大鼠双侧肺组织色泽呈淡粉红色,包膜完整、弹性好,表面无出血点,胸腔内无液体渗出;光镜下显示肺组织结构正常,肺泡结构清晰完整,肺泡间隔无水肿,肺泡腔内有渗出液或炎性细胞。见图 1A。

模型对照组双侧肺叶呈暗红色,充血水肿明显,表面可见紫红色斑块或点片状出血,胸腔内有渗出液;光镜下观察肺组织结构破坏严重,肺间质弥漫性充血水肿,肺泡腔内有大量的中性粒细胞浸润。见图 1B。



A 正常对照组; B 模型对照组; C 地塞米松组; D 中药治疗组; E 中药防治组

图 1 各组大鼠肺组织的病理学观察(HE, ×400)

地塞米松组和中药组双侧肺叶轻度充血,局部肺叶表面可见散在的出血点,肺叶弹性良好,胸腔内有少量稀薄的渗出液;光镜下肺结构损伤较模型对照组明显减轻,且中药防治组改善情况最为明显,肺间质轻度充血水肿,内有少量中性细胞浸润。见图 1C、D、E。

2.3 各组大鼠肺湿重/干重(W/D)比值

与正常对照组比较,其余组大鼠肺组织 W/D 比值明显升高($P<0.01$);与模型对照组比较,地塞米松组和中药组均有下降($P<0.01$);中药防治组较中药治疗组低($P<0.05$),而与地塞米松组间无明显差异($P>0.05$)。见表 1。

2.4 各组大鼠 BALF 中蛋白浓度

与正常对照组比较,其余组大鼠 BALF 中蛋白浓度均明显升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型对照组比较,药物干预组 BALF 中蛋白浓度均降低($P<0.01$);中药治疗组 BALF 中蛋白浓度高于中药防治组($P<0.01$)。见表 1。

 表 1 各组大鼠肺 W/D 比值及 BALF 中蛋白水平比较($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	W/D 比值	BALF 中蛋白浓度($\mu\text{g/mL}$)
正常对照组	3.67±0.14	91.73±11.55
模型对照组	4.63±0.12 ^b	342.51±21.04 ^b
地塞米松组	3.94±0.28 ^{ad}	183.07±17.93 ^{bd}
中药治疗组	4.29±0.15 ^{bdf}	254.14±14.55 ^{bdf}
中药防治组	4.05±0.20 ^{bde}	206.95±18.72 ^{bdeh}

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型对照组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与地塞米松组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$;与中药治疗组比较,^g $P<0.05$,^h $P<0.01$ 。

2.5 各组大鼠肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的浓度

与正常对照组比较,其余组大鼠肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均升高,差异有统计学意义($P<0.01$);与模型对照组比较,药物干预组中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平均降低($P<0.01$);地塞米松组与中药防治组 TNF- α 、IL-1 β 浓度无明显差异

($P>0.05$),而中药治疗组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 低于中药防治组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。见表 2。

 表 2 各组大鼠肺组织中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的浓度比较($\bar{x}\pm s, \text{ng/L}, n=8$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
正常对照组	56.75±4.67	9.90±1.03	28.41±5.69
模型对照组	185.72±11.44 ^b	18.01±1.91 ^b	92.39±7.39 ^b
地塞米松组	96.63±9.63 ^{bd}	13.90±1.28 ^{bd}	41.80±6.24 ^{bd}
中药治疗组	126.16±13.30 ^{bdf}	15.49±1.22 ^{bde}	66.50±10.30 ^{bdf}
中药防治组	108.60±12.85 ^{bde}	12.45±1.09 ^{bdeh}	53.77±9.21 ^{bdeg}

注:与正常对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与模型对照组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$;与地塞米松组比较,^e $P<0.05$,^f $P<0.01$;与中药 I 组比较,^g $P<0.05$,^h $P<0.01$ 。

3 讨论

LPS 诱导内毒素型 ALI 大鼠模型的制备运用较广,有腹腔注射、尾静脉注射、气管滴入等方法^[5],其中气管滴入法可直接造成肺的损伤。LPS 是革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分,损伤肺泡—毛细血管膜,使其通透性增加,血管内漏致使肺水肿;Ⅱ型肺泡细胞损伤,表面活性物质合成减少,肺张力减小致肺不张。从而出现肺容积减少、通气/血流比例失调、氧合指数和肺顺应性降低,从而出现低氧血症和呼吸窘迫,即 ALI。本研究采用 LPS(5 mg/kg)气管滴入法制备 ALI 大鼠模型,通过观察到大鼠呼吸、精神等一般情况的改变,肺组织大体和镜下病理改变,属于 ALI 的典型表现;检测肺 W/D 比值、BALF 中蛋白浓度和肺组织中炎症因子含量,反应了 ALI 的严重程度及药物干预后的改善情况。

ALI 属于中医“喘证”范畴,该病表现为“气亏耗不足以息而喘”,病理基础为肺不主气、肺失宣降,病机关键是虚、湿、瘀、热^[6]。肺为娇脏,易感外邪,在六淫、疫毒等外邪作用下导致肺气受损、宣降失司;肺为水之上源、通调水道,气虚较重不能行水故水湿内停;肺朝百脉,气为血之帅,气虚血行不利

故肺脉瘀阻。根据主要病机笔者采用益气活血中药黄芪、丹参防治 ALI,且课题组既往临床研究^[7]表明益气活血中药能改变肺循环高凝状态,降低血液黏度,减轻患者气管黏膜充血、水肿,使炎症反应显著改善,并通过抑制中性粒细胞在肺组织中的渗出显著减轻肺的直接和继发损伤。

ALI/ARDS 是炎症反应失控的结果, TNF- α 、IL-6、IL-1 β 等细胞因子参与了炎症反应、组织损伤的过程^[8-9], TNF- α 是 ALI 最重要的启动因子,能够刺激氧自由基、蛋白溶解酶的大量释放,趋化中性粒细胞在肺内聚集、粘附,导致肺泡-毛细血管损伤,其可反应肺组织损伤的严重程度^[10-12]; IL-1 β 主要由单核-巨噬细胞产生,是急性反应的主要调节物质,能诱导 IL-6、IL-8 等产生,且 IL-6 是强有力的促炎因子,能够放大肺部的炎症反应^[12-15]。故本研究亦从炎症角度观察益气活血中药对 ALI 的防治作用,其结果显示: LPS 造模后肺组织中炎症因子含量均明显升高,而地塞米松组和中药治疗、防治组较模型对照组显著降低,提示一定的药物干预可以有效地降低 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平,减轻肺部的炎症反应;中药防治组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 水平低于中药治疗组,说明益气活血中药防治结合较单纯治疗具有更好的疗效;光镜下模型对照组肺组织出现明显充血、水肿、炎性细胞浸润及肺间隔增宽等典型的 ALI 病理改变,而药物干预能够改善其病变程度;肺 W/D 比值可反应肺水肿的严重程度, BALF 中蛋白浓度可反映肺脏血气屏障的通透性,药物组均较模型对照组降低,说明益气活血中药能减少蛋白漏出,改善肺水肿的状况,且防治结合效果更好。

综上所述,本研究结果表明益气活血中药对 LPS 致 ALI 大鼠具有防治作用,其可改善肺组织的病变程度,减轻炎症反应,且早期药物干预有助于 ALI 的预后。其机制可能与其降低炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 的水平有关,这可为益气活血法在临床上防治内毒素型 ALI 提供一定思路,但关于益气活血中药对 ALI 防治作用分子机制尚不明确,有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 金发光. 急性肺损伤的诊治现状及进展[J]. 中华肺部疾病杂志, 2013, 6(1): 1-3.
- [2] 杨明会, 张海燕, 王文明, 等. 益气活血中药对急性肺损伤模型大鼠血浆和肺组织匀浆中 CGRP、ET-1 的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(31): 3924-3964.
- [3] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版, 北京: 人民卫生出版社, 2002: 200-204.
- [4] Roderick J. Szarka, Nandi Wang, Lyle Gordon, et al. Smith. A murine model of pulmonary damage induced by lipopolysaccharide via intranasal instillation [J]. Journal of Immunological Methods, 1997, 202: 49-57.
- [5] O'Grady NP, Preas HL, Pugin J, et al. Local inflammatory responses following bronchial endotoxin instillation in humans [J]. American journal of respiratory and critical care medicine, 2001, 163(7): 1591-1598.
- [6] 金星, 郑丰杰. 急性肺损伤中医学发病机制及治疗思路探讨 [J]. 中医临床杂志, 2008, 20(1): 76-77.
- [7] 李敏, 杨明会, 窦永超, 等. 益气活血中药对急性肺损伤机械通气后患者肺保护的临床研究 [J]. 中药材, 2014, 37(11): 2113-2116.
- [8] Mosbah AA, Abdellatif NA, Sorour EI, et al. Serum SP-D levels as a biomarker of lung injury in children suffering of bronchopneumonia [J]. J Egypt Soc Parasitol, 2012, 42(1): 25-32.
- [9] Kitamura Y, Nomura M, Shima H, et al. Acute lung injury associated with systemic inflammatory response syndrome following subarachnoid hemorrhage: a survey by the Shonan Neurosurgical Association [J]. Neurol Med Chir, 2010, 50(6): 456-460.
- [10] Zhao F, Wang W, Fang Y. Molecular mechanism of sustained inflation in acute respiratory distress syndrome [J]. J Trauma Acute Care Surg, 2012, 73(5): 1106-1113.
- [11] Puthothu B, Bierbaum S, Kopp MV, et al. Association of TNF- α with severe respiratory syncytial virus infection and bronchial asthma [J]. Pediatr Allergy Immunol, 2008, 20(2): 157-165.
- [12] Gonzalo-Calvo DD, Neitzert K, Fernandez M, et al. Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF- α and IL-6 as possible biomarkers [J]. Free Radical Bio Med, 2010, 49(5): 733-737.
- [13] Luan ZG, Zhang J, Yin XH, et al. Ethyl pyruvate significantly inhibits tumour necrosis factor- α , interleukin-1 β and high mobility group box 1 releasing and attenuates sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis associated with acute lung injury [J]. Clin Exp Immunol, 2013, 172(3): 417-426.
- [14] Ganter MT, Roux J, Miyazawa B, et al. Interleukin-1 β causes acute lung injury via α 5 and α 6 integrin-dependent mechanisms [J]. Circ Res, 2008, 102(7): 804-812.
- [15] Suda K, Tsuruta M, Eom J, et al. Acute lung injury induces cardiovascular dysfunction: effects of IL-6 and budesonide/formoterol [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2011, 45(3): 510-516.

(收稿日期: 2015-12-04)

(本文编辑: 韩虹娟)