

# 益气化痰解毒方对急性呼吸窘迫综合征大鼠 NF- $\kappa$ B/p38MAPK 通路的影响

李昕 李雁 刘丽杰 黄瑞音 王谦 孙庆巧 骆长永 万茂婷 梁旭 吴元德 王欣

**【摘要】 目的** 观察益气化痰解毒方对脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)所致大鼠急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)的保护作用并探讨其作用机制。**方法** 30 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组及益气化痰解毒方低、中、高剂量组 5 组,每组 6 只。尾静脉注射 LPS 建立 ARDS 模型。治疗组益气化痰解毒方灌胃,造模后 16 小时处死大鼠收集标本,测定大鼠肺系数、肺通透指数、核转录因子- $\kappa$ B p50、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p38 的蛋白表达及光镜下观察肺组织病理学改变。**结果** 益气化痰解毒方减少肺损伤大鼠肺泡结构破坏、肺水肿及炎性细胞浸润,降低肺系数( $P<0.05$ )与肺通透指数( $P<0.01$ ),并在一定程度减少核转录因子- $\kappa$ B p50、丝裂原活化蛋白激酶 p38,增加抑制因子 I $\kappa$ B $\alpha$  的蛋白表达。**结论** 益气化痰解毒方对 LPS 诱导的 ARDS 有一定的保护作用,其机制与抑制 NF- $\kappa$ B/p38MAPK 炎性反应信号通路有关。

**【关键词】** 益气化痰解毒方; 急性呼吸窘迫综合征; 核转录因子- $\kappa$ B; 丝裂原活化蛋白激酶 p38

**【中图分类号】** R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.03.005

**Impact of Yiqi Huayu Jiedu formula on NF- $\kappa$ B/p38MAPK signal pathway in acute respiratory distress syndrome rats** LI Xin, LI Yan, LIU Lijie, et al. Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

Corresponding author: LI Yan, E-mail: liyan9921\_@126.com

**【Abstract】 Objective** To observe the impact and mechanism of Yiqi huayu jiedu formula on acute respiratory distress syndrome(ARDS) rats induced by endotoxin. **Methods** 30 SD rats were randomized control group, model group, YHJ high, middle, low dose group, 6 rats in each group. The ARDS model was established by tail vein injection with lipopolysaccharide. The treatment groups were given corresponding aqueous solution once a day. All groups were sacrificed 16 hours after modeling. Then the lung coefficient, the lung permeability index and the levels of NF- $\kappa$ B p50, I $\kappa$ B $\alpha$  and p38 were measured, and the pathological changes in lung tissues were observed. **Results** HE staining showed that Yiqi huayu jiedu formula could reduce pulmonary alveolar damage, pulmonary edema and inflammatory cells infiltration. The lung coefficient( $P<0.05$ ) and lung permeability index( $P<0.01$ ) were decreased in treatment groups. The protein expressions of NF- $\kappa$ B p50 and p38 were decreased while I $\kappa$ B $\alpha$  was increased in treatment groups. **Conclusion** Yiqi huayu jiedu formula had prevention effect on endotoxin induced ARDS. It might relate to the inhibition of NF- $\kappa$ B/p38MAPK inflammatory signal pathway.

基金项目: 北京中医药大学 2015 年度校级自主课题(2015-JYB-JSMS059)

作者单位: 100700 北京中医药大学东直门医院教育处(李昕),急诊科[李雁、刘丽杰、孙庆巧(硕士研究生)、骆长永(硕士研究生)、万茂婷(硕士研究生)、梁旭(硕士研究生)];北京市朝阳区中医医院内二科(黄瑞音);北京中医药大学生命科学院(王谦);北京协和医学院基础学院(吴元德);广东骏丰频谱股份有限公司(王欣)

作者简介: 李昕(1984-),女,博士,助理研究员。研究方向:中西医结合防治呼吸系统疾病。E-mail: lxnnn@126.com

通信作者: 李雁(1967-),女,硕士,主任医师。研究方向:中西医结合防治呼吸系统疾病。E-mail: liyan9921\_@126.com

【Key words】 Yiqihuayujiedu formula; Acute respiratory distress syndrome; NF- $\kappa$ B; p38MAPK

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是临床常见的急危重症, 是感染、创伤等病因下出现的以进行性呼吸困难、顽固性低血氧症和肺水肿为主要表现的临床综合征<sup>[1]</sup>。核转录子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)、p38MAPK 信号通路能控制、调控白介素-1 $\beta$  (interleukin 1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、白介素-10 (IL-10)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 等多种炎性介质的转录与表达, 对 ARDS 促炎/抗炎平衡有重要的调控作用。课题组前期实验研究结果显示, 益气化痰解毒方对急性呼吸窘迫综合征大鼠具有良好的保护作用, 其作用机制与减少促炎性介质 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  分泌, 减轻炎症水平有关, 但其调节促炎/抗炎介质平衡的作用机制尚未明确<sup>[2]</sup>。本研究通过观察益气化痰解毒方对急性呼吸窘迫综合征大鼠 NF- $\kappa$ B/p38MAPK 通路的影响, 探讨益气化痰解毒方调控 ARDS 炎性反应的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

清洁级 SD 雄性大鼠 30 只 (北京维通利华实验动物技术有限公司), 许可证号 SCXK (京) 2012-0001, 8 周龄, 体质量 (200 $\pm$ 10) g。实验期间饲养于北京中医药大学东直门医院中医内科学教育部重点实验室 SPF 级实验动物房。

### 1.2 主要试剂、仪器

内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) Sigma, L2880), Bradford 蛋白浓度测定试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司), SDS-BCA 蛋白质定量试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司), PVDF Western 转印膜 (Millipore), 兔抗大鼠 NF- $\kappa$ B p50 抗体、兔抗大鼠 I $\kappa$ B $\alpha$  抗体、小鼠抗大鼠 p38 抗体 (Abcam), 二抗 (北京博奥森生物技术有限公司), 即用型免疫组化试剂盒、DAB 显色试剂盒 (兔或鼠) (福建迈新生物技术开发有限公司)。益气化痰解毒方 (黄芪 30 g、三七 10 g、赤芍 15 g、炒枳实 12 g、金银花 15 g、黄芩 10 g、桑白皮 15 g、葶苈子 15 g) 中药颗粒由首创药业提供。BH2 生物显微镜 (OLYMPUS), Varioskan Flash 光谱扫描多功能读数仪 (Thermo Scientific)。

### 1.3 动物分组与给药

30 只清洁级 SD 雄性大鼠随机分为空白对照组、模型组、中药低、中、高剂量组 (简称低、中、高剂

量组), 每组 6 只。适应性喂养 1 周后开始灌胃给药, 中药低、中、高剂量组分别以 6.1 g/(kg $\cdot$ d)、12.2 g/(kg $\cdot$ d)、24.4 g/(kg $\cdot$ d) (给药剂量为生药剂量) 益气化痰解毒方溶液灌胃, 空白组和模型组以 1 mL/(100 g $\cdot$ d) 剂量蒸馏水灌胃, 每天 1 次, 连续 7 天。

### 1.4 模型制备与标本采集

第 7 天灌胃后 6 小时, 模型组及中药低、中、高剂量组按照 2 mg/kg 剂量一次性尾静脉注射 LPS, 造模后 16 小时腹腔注射 10% 水合氯醛溶液剂量 (3 mL/kg), 开胸腔, 经左支气管肺泡灌洗收集灌洗液, 取右肺石蜡包埋成 4  $\mu$ m 厚度的切片, HE 染色, 光镜下观察组织形态学变化。

### 1.5 检测指标

1.5.1 肺系数 (lung coefficient, LI) 和肺通透指数 (lung permeability index, LPI) 大鼠开胸腔, 取全肺及全部气管, 于 5、6 软骨环间处将气管剪断, 以洁净滤纸吸干肺表面血污及组织液, 称全肺重量, 计算 LI [全肺湿质量 (g)/体质量 (kg)]。之后左右肺分离, 右肺-80  $^{\circ}$ C 冻存, 左肺, 每次 3 mL 生理盐水进行支气管肺泡灌洗, 反复灌洗 3 次, 回收率 50% 以上, 得 BALF, 3000 rpm 离心 10 分钟, 取上清液分装, -80  $^{\circ}$ C 冻存。Bradford 法测定肺泡灌洗液蛋白含量和血浆蛋白含量, 计算 LPI (BALF 蛋白含量/血浆蛋白含量)。

1.5.2 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B p50、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p38 蛋白表达 提取肺组织总蛋白, 4  $^{\circ}$ C、12000 rpm 离心 10 分钟, BCA 法测定蛋白浓度。取等量蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 120 v、80 分钟; 转膜用 80 v、60 分钟; 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 小时。加入一抗稀释液稀释的一抗抗体 (1:1000), 孵育、洗涤, 再加入相应二抗 (1:2000), ECL 化学发光检测, 于暗室中进行显影。用成像分析系统 Quantity One 分析蛋白质条带。以吸光度值代表蛋白的强度, 以目的蛋白与内参蛋白  $\beta$ -actin 的吸光度值的比值作为目的蛋白表达相对量。

1.5.3 免疫组化法检测 NF- $\kappa$ B p50、I $\kappa$ B $\alpha$ 、p38 在肺组织的表达 肺组织石蜡切片依次于二甲苯、100%、95%、90%、80%、70% 乙醇中脱蜡、水化。PBS (PH 值 7.4) 冲洗 3 分钟 $\times$ 3 次。浸入枸橼酸溶液中, 电磁炉加热至 95  $^{\circ}$ C, 加热 20 分钟进行抗原修复。PBS 冲洗 3 分钟 $\times$ 3 次。过氧化物酶抑制剂室

温孵育 10 分钟。PBS 冲洗 3 分钟×3 次。血清封闭,去除血清滴加一抗,湿盒 4℃ 孵育过夜。PBS 冲洗 5 分钟×3 次。滴加二抗,PBS 冲洗 3 分钟×3 次。滴加辣根过氧化物,PBS 冲洗 3 分钟×3 次。滴加 DAB,蒸馏水浸洗脱水透明封片。

## 1.6 统计学处理

数据应用 SPSS 20.0 软件包进行统计分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,各组间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义,  $P < 0.01$  为差异有显著统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠肺组织大体观察

空白组大鼠肺组织未见明显异常,色泽红润,体积未增大,无水肿,无瘀血;模型组大鼠肺组织体积增大,水肿明显,色泽暗红、表面可见散在分布大小不等的暗红斑点状病灶;各治疗组大鼠肺组织体积较模型组缩小不明显,水肿程度较轻,瘀血程度、出血点较模型组减轻。

### 2.2 各组大鼠肺组织病理学变化

空白组大鼠肺组织病理可见肺泡结构完整、清晰,肺泡腔内及间隔无水肿;模型组肺泡欠清晰,肺间质水肿,肺泡壁增厚、肺泡腔缩小变形,伴炎性渗出及出血;各治疗组肺泡结构呈不同程度破坏,肺泡腔内炎性细胞浸润,但程度均较模型组轻。见图 1。

### 2.3 肺系数及肺通透指数变化

与空白对照组比较,模型组肺系数值显著升高,有显著统计学差异( $P < 0.01$ );与模型组比较,中药低剂量组肺系数值明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),中药中、高剂量组肺系数也有一定程度降低,但差异无统计学意义;与模型组比较,空白组、中药低剂量组、中剂量组及高剂量组肺通透指数值降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )。

### 2.4 各组大鼠 Western Blot 检测 NF-κB p50、IκBα、p38 蛋白表达

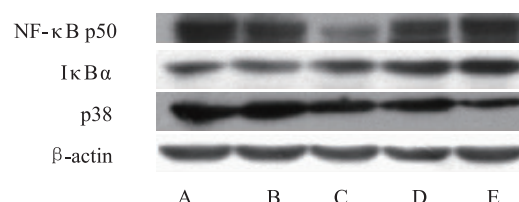
与模型组相比,中药低剂量组 NF-κB p50 的表

达相对下调,中药中、高剂量组 IκBα 的表达相对上调,中药低剂量组 p38 的表达相对下调。见图 2。

表 1 各组大鼠肺系数与肺通透指数比较( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

组别	LI	LPI( $\times 10^{-2}$ )
空白组	4.93±0.17	0.33±0.05
模型组	7.16±0.37 <sup>b</sup>	0.45±0.11 <sup>a</sup>
中药低剂量组	6.44±0.39 <sup>c</sup>	0.27±0.05 <sup>d</sup>
中药中剂量组	6.84±0.60	0.26±0.06 <sup>d</sup>
中药高剂量组	6.58±0.38	0.23±0.06 <sup>d</sup>

注:与空白组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ,<sup>b</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>c</sup> $P < 0.05$ ,<sup>d</sup> $P < 0.01$ 。



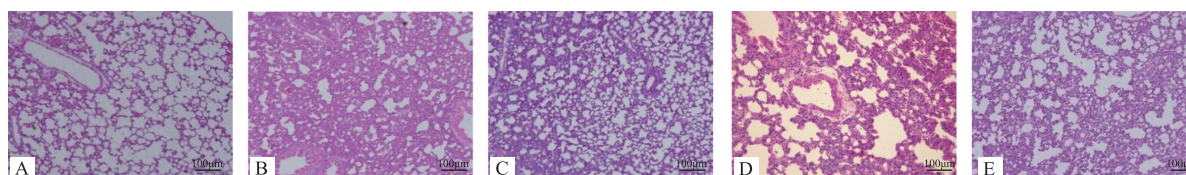
注:A 空白组;B 模型组;C 中药低剂量组;D 中药中剂量组;E 中药高剂量组

图 2 各组大鼠 NF-κB p50、IκBα、P38 的蛋白表达

### 2.5 各组大鼠免疫组化 NF-κB p50、IκBα、p38 表达

NF-κB p50:模型组阳性细胞广泛表达在气道黏膜上皮细胞、血管内皮细胞、浸润的中性粒细胞和巨噬细胞等细胞中,在胞浆和或细胞核内均有较明显表达,空白组可见肺泡上皮细胞阳性表达,染色程度低,其余细胞表达不明显,各中药治疗组阳性细胞主要表达在气道上皮细胞、血管内皮细胞、浸润的炎性细胞中,在巨噬细胞及内皮细胞的胞浆、胞核内表达较明显,但染色程度低于模型组。见图 3~5。

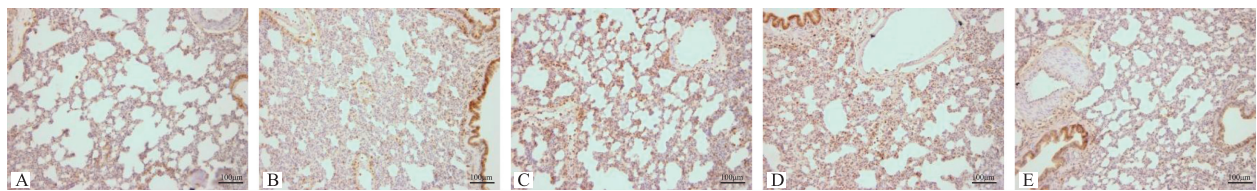
IκBα:正常组阳性细胞主要表达在气道上皮细胞、血管内皮细胞的胞浆中,空白组阳性表达、染色程度较模型组高,各中药治疗组阳性细胞表达在上皮细胞、内皮细胞的胞浆中,相对于模型组表达均有升高。



注:A 空白组;B 模型组;C 中药低剂量组;D 中药中剂量组;E 中药高剂量组

图 1 各组大鼠肺组织病理观察(标尺 100 μm, HE×20)





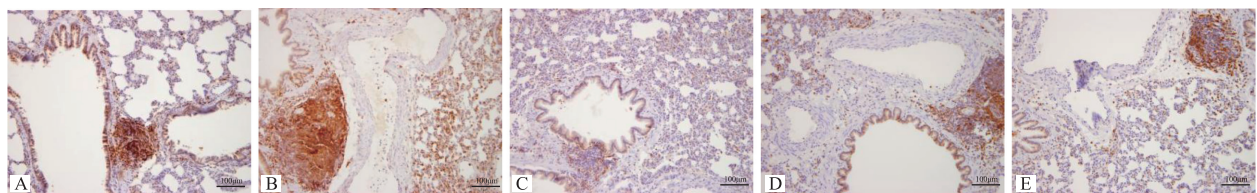
注:A 空白组;B 模型组;C 中药低剂量组;D 中药中剂量组;E 中药高剂量组

图 3 各组大鼠 NF-κB p50 的蛋白表达(标尺 100 μm)



注:A 空白组;B 模型组;C 中药低剂量组;D 中药中剂量组;E 中药高剂量组

图 4 各组大鼠 IκBα 的蛋白表达(标尺 100 μm)



注:A 空白组;B 模型组;C 中药低剂量组;D 中药中剂量组;E 中药高剂量组

图 5 各组大鼠 p38 的蛋白表达(标尺 100 μm)

p38:模型组阳性细胞广泛表达于气道上皮细胞、血管内皮细胞、肺泡上皮细胞、浸润的炎性细胞等细胞中,且胞质与胞浆内均有明显阳性表达,各中药治疗组阳性细胞分布部位与模型组相似,但胞核阳性细胞表达明显减少,信号较模型组有所减弱。

### 3 讨论

ARDS 是一种临床常见的呼吸系统急危重症,死亡率高,病理过程以肺微血管通透性增加,引发弥漫性肺间质和肺泡腔水肿及炎性细胞浸润为主。本研究模型组大鼠肺泡及肺间质水肿,大量炎性细胞浸润,肺泡腔缩小变形,并可见大量分泌物,内含红细胞;而益气化瘀解毒方各治疗组损伤程度均有不同程度的减轻,其中以中剂量组效果最为明显,表明采用 LPS 尾静脉注射方法复制大鼠 ARDS 模型成功,益气化瘀解毒方对其有保护作用,且中剂量组作用最明显。在肺系数体现大鼠肺水肿方面,中药中、高剂量组变化不大,低剂量组较模型组有明显变化;在肺泡通透性指标方面,中药低、中、高剂量组较模型组均有明显改善,且中药高剂量组肺通透指数最低,提示益气化瘀解毒方对 ARDS 有较

明显的防治作用,并与药物剂量存在一定的联系。

NF-κB 是内皮激活过程中重要的核转录因子,激活的 NF-κB 能调控多种炎性因子的表达,是 ARDS 炎性反应的枢纽和关键,抑制 NF-κB 的活化可以减少炎性因子的分泌。NF-κB 通常是指在 NF-κB/Rel 家族成员中具有主要生物活性的 p50/p65 异源二聚体,p50 由 p105 水解而成,含核定位信号,是核因子与 DNA 结合的部分。激活过程中 NF-κB 与抑制蛋白 IκB 发生磷酸化并解离,游离的 NF-κB 亚基移入核内与目的基因的 κB 位点结合,从而介导炎症反应主要功能蛋白的表达<sup>[3]</sup>。本研究显示,模型组 NF-κB p50 蛋白表达较空白组增加,提示 LPS 可促进 NF-κB p50 蛋白表达,低、中、高剂量组 NF-κB 表达量较模型组下降,IκB 表达量较模型组升高,提示益气化瘀解毒方能在一定程度上抑制 LPS 诱导的 NF-κB 激活,同时上调 IκBα 表达与生成,从而限制 NF-κB 的激活和转位、阻断下游炎症因子基因表达,保护 ARDS。

丝裂原活化蛋白激酶信号通路在炎症和氧化应激的细胞内信号传导中发挥重要作用,包括 p38MAPK 等多条信号通路。p38MAPK 途径被激活

后,作用于自身底物,影响转录因子的活性,调控多种细胞因子的表达,从而调控炎症反应<sup>[4]</sup>。本研究显示,中药低剂量组 p38 表达量较模型组下降较多,中、高剂量组作用依次增强,提示益气化瘀解毒方能在一定程度上抑制 LPS 诱导的 p38MAPK 通路激活,减轻肺组织损伤,并且作用与中药剂量相关。

肺气虚衰、毒瘀互阻是急性呼吸窘迫综合征的病机关键,益气化瘀解毒为防治急性呼吸窘迫综合征的重要治法。本课题组采用黄芪、三七、赤芍、炒枳实、金银花等中药组成“益气化瘀解毒方”,具有益气养血、活血化瘀、清热解毒的功效,祛邪扶正并行,在一定程度上可以降低急性呼吸窘迫综合征大鼠炎性相关因子水平。研究结果表明益气化瘀解毒方可在一定程度上抑制急性呼吸窘迫综合征大鼠 NF- $\kappa$ B/p38MAPK 炎性信号通路中的关键点蛋白

表达,对 LPS 诱导的大鼠 ARDS 有一定的保护作用。

### 参 考 文 献

- [1] 秦丽,王毓国,李敏,等. 益气活血中药对脂多糖致急性肺损伤大鼠的防治作用[J]. 环球中医药,2016,9(5):548-552.
- [2] 李雁,王双,李昕,等. 益气化瘀解毒复方联合超低频电磁场处理水对内毒素诱发大鼠急性肺损伤的影响[J]. 中医杂志,2015,57(9):783-788.
- [3] Abraham E. NF- $\kappa$ B activation[J]. Crit Care Med, 2002, 28 (4Suppl):100-104.
- [4] Moreira-Tabaka H, Peluso J, Vonesch J L, et al. Unlike for human monocytes after LPS activation, release of TNF- $\alpha$  by THP-1 cells is produced by a TACE catalytically different from constitutive TACE[J]. PloS One,2012,7(3):e34184.

(收稿日期: 2016-09-17)

(本文编辑: 王馨瑶)