论著

文章编号:1000-5404(2012)23-2392-03

龙胆苦苷对脓毒症所致急性肺损伤小鼠的保护作用

陈露露,徐关丽,袁红梅,蔡江晖,刘颖菊 (400016 重庆,重庆医科大学药学院药理学教研室)

[摘要] **目的** 观察龙胆苦苷对脓毒症急性肺损伤小鼠的保护作用。**方法** 采用盲肠结扎穿孔的方法建立小鼠脓毒症急性肺损伤模型。80只18~22 g雄性昆明小鼠按随机区组设计分为假手术组、模型组、龙胆苦苷低剂量组(25 mg/kg)、龙胆苦苷高剂量组(50 mg/kg),每组20只。各组于术前30 min尾静脉注射龙胆苦苷或生理盐水。术后12 h收集肺泡灌洗液检测其中炎症因子(TNF-α、IL-6)及总蛋白含量,测定肺组织中丙二醛(MDA)、髓过氧化物酶(MPO)、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、一氧化氮(NO)含量,光镜下观察肺组织病理改变情况。**结果** 与模型组相比,龙胆苦苷低、高剂量组肺泡灌洗液中TNF-α、IL-6含量及总蛋白含量,肺组织中MDA、MPO、iNOS、NO水平均较低($P<0.05$,$P<0.01$),且病理学损伤程度较模型组轻。**结论** 龙胆苦苷能减轻炎症反应,对脓毒症所致急性肺损伤有保护作用。

[关键词] 龙胆苦苷;脓毒症;急性肺损伤;炎症因子
[中图法分类号] R285.5; R563; R631 [文献标志码] A

Protection of gentiopicroside on acute lung injury in sepsis mice

Chen Lulu, Xu Guanli, Yuan Hongmei, Cai Jianghui, Liu Yingju (Department of Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To observe the protective effect of gentiopicroside on acute lung injury in sepsis mice. **Methods** The mouse model of septic acute lung injury was established by cecal ligation and puncture (CLP). Eighty 18 – 22 g male mice were randomly divided into a sham operation group (group A), a model group (group B), a low-dose gentiopicroside group (25 mg/kg, group C) and a high-dose gentiopicroside group (50 mg/kg, group D), respectively ($n=20$). The mice were separately given a tail vein injection of gentiopicroside or normal saline at 30 min before CLP. At 12 h after operation, the contents of inflammatory factors (TNF-α and IL-6) and total protein in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were detected by ELISA, and the levels of malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), inducible nitric oxide synthase (iNOS) and NO in lung tissues were determined by biochemical methods. The histopathological changes of lung tissues were observed under a light microscope. **Results** Compared with group B, the contents of TNF-α, IL-6 and total protein in BALF and the levels of MDA, MPO, iNOS and NO in lung tissues decreased significantly in group C and group D ($P<0.05$, $P<0.01$), and the pathological changes of lung tissues were attenuated by gentiopicroside. **Conclusion** Gentiopicroside, which can effectively attenuate inflammatory responses, plays a protective role in septic acute lung injury.

[**Key words**] gentiopicroside; sepsis; acute lung injury; inflammatory factors

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30500463). Corresponding author: Liu Yingju, Tel: 86-23-68485774, E-mail: liuyingjbh@yahoo.com.cn

龙胆苦苷(gentiopicroside,GPS)是我国传统中药材秦艽以及龙胆草中的活性成分,为环烯醚萜苷类[1]。研究表明,龙胆[2-3]和秦艽[4]均有保肝、抗炎、抗菌活性,同时单味提取物龙胆苦苷有一定的保肝、抗炎的作用[1,5]。体外实验研究表明龙胆苦苷对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌也有抑制作用[6]。此外,龙胆[7]及秦艽[8]的提取物都能降低有CCl_4引起的TNF-α的升高,但此作用是否直接与龙胆苦苷相关还不十分明确。急性肺损伤(acute lung injury,ALI)是临床高发病率和高病死率的急危重症,以进行性和顽固性低氧血症为主要特征,该疾病的发生多因2次打击所致,其中脓毒症则是引发ALI的主要原因[9]。本实验采用盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture,CLP)的方法诱导脓毒症急性肺损伤,此方法能更好地模拟ALI的发病过程[10]。同时,此模型中涉及细菌感染以及炎症因子的大量释放,我们拟在通过此模型讨论龙胆苦苷

[基金项目] 国家自然科学基金(30500463)
[通信作者] 刘颖菊,电话:(023)68485774,E-mail:liuyingjbh@yahoo.com.cn

在全身性炎症反应中的抗炎作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

龙胆苦苷(≥98%,南京泽朗医药科技有限公司);小鼠 TNF-α(批号 20120518)和 IL-6(批号 20120518)的 ELISA 检测试剂盒购自欣博盛生物科技有限公司;MDA(批号 20120310)、MPO(批号 20120310),iNOS(批号 20120305)、NO(批号 20120329)及 BCA 蛋白测定(批号 20120508)试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。3K30 型超低温离心机(Sigma 公司);恒温水浴锅(北京市长风仪器仪表公司);550 型酶标仪(Bio-Rad 公司)。

1.2 实验动物及分组

80 只雄性昆明小鼠,体质量 18~22 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。随机区组分为 4 组:假手术组、模型组、龙胆苦苷低剂量组(25 mg/kg)、龙胆苦苷高剂量组(50 mg/kg),每组 20 只。各治疗组均于 CLP 手术前半小时尾静脉注射等体积龙胆苦苷注射液,假手术组和模型组尾静脉注射等体积生理盐水。

1.3 CLP 动物模型

术前 12 h 禁食不禁水,术前给药后腹腔注射 4% 水合氯醛(0.1 ml/10 g)麻醉,给药组和模型组均行盲肠结扎穿孔术,手术方法参考文献[11]进行。腹部皮肤消毒后,于腹中线做切口,打开腹腔,游离盲肠,于盲肠根部结扎,用穿刺针在结扎的盲肠中部对穿一次,挤出少许粪便,回纳盲肠,缝合腹腔并消毒。而假手术组只游离盲肠,不做结扎穿孔。术毕立即皮下注射生理盐水,补充术中体液流失。

1.4 肺组织中 MDA、MPO、iNOS 及 NO 检测

CLP 术后 12 h,处死动物后,取右肺叶组织称量后,按比例用预冷的生理盐水在冰浴下制备成 10% 匀浆,按试剂盒说明书进行操作,用比色法检测匀浆液 MDA、MPO、iNOS 及 NO 含量。

1.5 肺泡灌洗液中炎症因子及总蛋白含量测定

CLP 术后 12 h,处死动物后,剪开颈部皮肤,暴露气管,在气管远心端剪一小口,插入导管固定,注入预冷的生理盐水 0.8 ml,停留 30 s 后回抽,灌洗 2 次,肺泡灌洗液回收率 70% ~80%,将灌洗液 1 500 r/min 离心 10 min,取上清液按说明书进行操作,用 ELISA 法检测肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluid,BALF)中 TNF-α、IL-6 水平,BCA 法检测 BALF 中总蛋白含量。

1.6 组织病理学检查

术后 12 h 取出小鼠左肺叶组织,4% 多聚甲醛固定标本后常规石蜡包埋切片,经 HE 染色后光学显微镜下观察肺组织病理改变况及炎症细胞浸润情况。

1.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 17.0 软件进行统计,采用方差分析,组间采用 LSD 进行多重比较。

2 结果

2.1 肺组织中 MDA、MPO、iNOS 及 NO 含量变化

术后 12 h,与假手术组相比,模型组肺组织中 MDA、MPO、NO 及 iNOS 含量显著升高。龙胆苦苷低、高剂量组均能够降低脓毒症小鼠肺脏组织内 MDA、MPO、iNOS 及 NO 含量($P<0.05$,$P<0.01$)。见表 1。

表 1 各组小鼠肺脏组织中 MDA、MPO、iNOS 及 NO 含量($n=6$,$\bar{x} \pm s$)

组别	MDA (nmol/mg)	MPO (U/g)	iNOS (U/mg)	NO (μmol/mg)
假手术组	0.67 ±0.13	0.32 ±0.07	0.27 ±0.15	0.36 ±0.18
模型组	1.27 ±0.12^{b}	0.60 ±0.15^{b}	0.52 ±0.21^{a}	0.80 ±0.15^{b}
龙胆苦苷低剂量组	0.98 ±0.18^{c}	0.42 ±0.09^{c}	0.23 ±0.07^{c}	0.50 ±0.18^{c}
龙胆苦苷高剂量组	0.93 ±0.093^{d}	0.30 ±0.10^{d}	0.28 ±0.12^{c}	0.33 ±0.16^{d}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与假手术组比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与模型组比较

2.2 BALF 中 TNF-α、IL-6、总蛋白含量变化

术后 12 h,肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-6、总蛋白含量水平较假手术组有明显升高。与模型组相比,龙胆苦苷低、高剂量组 TNF-α、IL-6、总蛋白含量($P<0.05$,$P<0.01$)均较模型组有明显降低,龙胆苦苷高剂量组 IL-6、总蛋白含量降低尤为明显($P<0.01$)。见表 2。

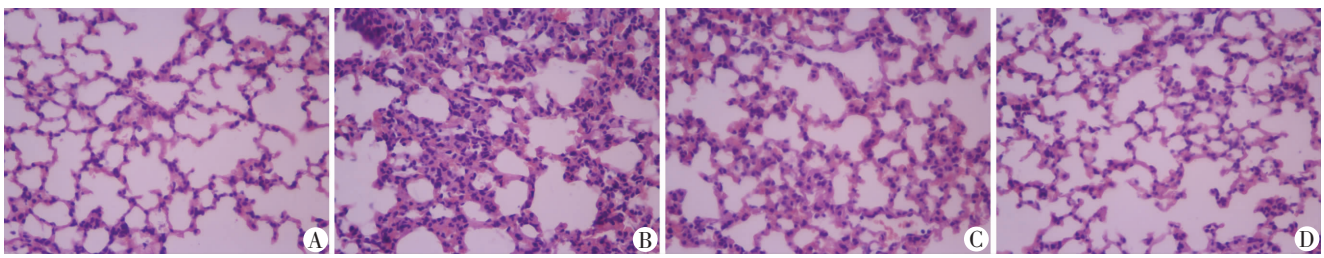
表 2 各组小鼠肺泡灌洗液中 TNF-α、IL-6、总蛋白含量($n=6$,$\bar{x} \pm s$)

组别	TNF-α(pg/ml)	IL-6(pg/ml)	总蛋白(μg/ml)
假手术组	23.51 ±7.42	24.43 ±10.09	313.47 ±30.38
模型组	50.30 ±9.02^{a}	3348.62 ±616.25^{a}	704.61 ±119.83^{a}
龙胆苦苷低剂量组	34.16 ±6.75^{b}	2661.00 ±389.43^{ab}	440.09 ±73.85^{c}
龙胆苦苷高剂量组	24.08 ±12.33^{c}	1733.60 ±488.82^{ace}	320.48 ±51.11^{cd}

a:$P<0.01$,与假手术组比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与模型组比较;d:$P<0.05$,e:$P<0.01$,与龙胆苦苷低剂量组比较

2.3 肺组织病理损伤变化情况

假手术组肺泡结构完整,肺泡腔干净,肺泡壁无明显增厚,肺泡间质无明显中性粒细胞浸润;模型组肺组织大量炎症细胞浸润、红细胞漏出,肺泡壁水肿、增厚、肺泡完整性被破坏。龙胆苦苷低剂量组可见有炎性浸润、充血水肿,肺泡壁增厚,但损伤程度仍较模型组轻。龙胆苦苷高剂量组可见有部分炎性细胞浸润,肺泡结构完整性较好,充血水肿较轻,肺泡壁轻度增厚,病理损伤情况较模型组有明显改善(图 1)。



A:假手术组;B:模型组;C:龙胆苦苷低剂量组;D:龙胆苦苷高剂量组

图 1 各组小鼠肺组织病理学变化 (HE ×40)

3 讨论

CLP术是经典的诱导脓毒症的造模方法[12],这种方法诱导的急性肺损伤模型病理损伤较重,但也较为理想[10]。CLP术后腹腔由于粪便的漏出,形成局部感染灶,大量微生物繁殖,细菌释放的内毒素激发宿主自身防御反应,随即释放大量炎症因子[12]。炎症因子不但能直接损伤靶器官,还能通过促进脂质过氧化、中性粒细胞活化及浸润、诱导免疫细胞如中性粒细胞大量表达iNOS,以及iNOS来源的NO都将对组织产生损害作用[13-14]。

炎症因子在脓毒症肺损伤的发生、发展中起着非常重要的作用。其中,TNF-α是脓毒症急性肺损伤炎症反应的重要启动因子,能增强白细胞的聚集效应,促进中性粒细胞的活化和浸润,促进其他促炎因子的分泌,增强炎症反应[15];而IL-6是重要二级炎性反应介质,能促进NO等血管活性物质的产生,促进氧自由基释放,加重组织损伤[16]。我们对BALF中的TNF-α、IL-6水平进行了检测,所得到结果显示,术后12 h模型组BALF中TNF-α、IL-6水平远远高于假手术组,炎症因子的检测情况,符合脓毒症病程中炎症因子过度升高的特点,表明肺部炎症反应急剧,炎症损伤十分严重。而在龙胆苦苷低、高剂量组中我们可以观察到,TNF-α、IL-6含量虽仍高于假手术组,但其数值均明显低于模型组。由于IL-6代谢缓慢[17],其值远远高于TNF-α,说明IL-6水平是一个良好的检测、观察指标。预处理组中炎症因子水平的降低,表明龙胆苦苷能减轻脓毒症所致肺损伤剧烈的炎症反应,对肺损伤有一定的保护作用。而此作用可能与龙胆苦苷能直接减少炎症因子的释放或者能加速炎症因子的排泄有关。

本实验中,我们通过测定肺组织匀浆液中MDA、MPO、iNOS及NO的含量、BALF中总蛋白含量水平,以了解肺脏局部组织的损伤情况。CLP术后,模型组肺组织匀浆液中MDA、MPO、iNOS及NO、BALF中总蛋白含量水平明显高于假手术组,表明此模型中肺组织局部中性粒细胞浸润,炎性渗出以及氧化损伤都十分严重。然而龙胆苦苷低、高剂量预处理组,术后12 h的MDA、MPO、iNOS及NO水平,BALF中总蛋白含量均明显低于模型组,可见,龙胆苦苷预处理减轻了CLP小鼠肺部中性粒细胞浸润以及炎性渗出,改善局部组织脂质过氧化损伤,表明龙胆苦苷具有一定的抗炎、抗氧化作用,发挥脏器保护作用。

从肺组织病理切片中,我们有了更直观的了解。从图1中我们可以看到,CLP术后12 h,模型组肺组织已经出现明显的病理损害,肺泡壁充血、水肿、增厚、炎细胞浸润以及完整性被破坏,急性肺损伤的模型已然建立。龙胆苦苷低、高剂量术前预处理后,肺泡壁充血、增厚情况以及炎性细胞渗出程度都有减轻,肺组织损害情况都较模型组有改善,可见该药发挥了一定的肺脏保护作用。

龙胆苦苷是我国传统中药材中的重要成分,目前对龙胆苦苷单体药理作用的研究主要集中在研究它的保肝和局部的抗炎作用上[1,5]。本实验研究了龙胆苦苷在脓毒症所致急性肺损伤模型中所发挥的作用,研究表明龙胆苦苷能降低脓毒症急性肺损伤小鼠肺部中性粒细胞浸润及炎性渗出情况,减轻脂质过氧化,降低BALF中TNF-α、IL-6含量,减轻炎症反应情况,可发挥一定的肺脏保护作用。同时我们可以推测,龙胆及秦艽提取物能降低CCl4所致TNF-α水平可能与龙胆苦苷作用紧密相关。然而,龙胆苦苷抗炎、抗氧化的具体机制还不明确,有待进一步研究。

参考文献:

[1] 刘占文, 陈长勋, 金若敏, 等. 龙胆苦苷的保肝作用研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 47-50.

[2] 符敏敏. 中药龙胆药效学及临床应用研究展望[J]. 浙江中医药大学学报, 2009, 33(3): 452-453.

[3] 江蔚新, 安胜利, 郭立萍, 等. 龙胆地上、地下部分药理作用的比较分析[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2003, 19(1): 14-16.

[4] 汪海英, 童丽, 李福安. 秦艽总苷对人肝癌细胞SMMC-7721体外作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(1): 53-55.

[5] 陈雷, 王海波, 孙晓丽, 等. 龙胆苦苷镇痛抗炎药理作用研究[J]. 天然产物研究与开发, 2008, 20(5): 903-906.

[6] 黄海东, 杨红澎, 王玉, 等. 云雾龙胆内生菌的分离鉴定及抗菌活性分析[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 1017-1021.

[7] 柳京浩. 龙胆草提取物对四氯化碳致肝纤维化大鼠TNF-α、HA及NO的影响[J]. 中国医疗前沿, 2007, 2(16): 24-25.

[8] 苏晓玲, 李福安, 魏全嘉, 等. 秦艽水煎液对小鼠急性肝损伤肿瘤坏死因子-α和白细胞介素-10表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(4): 827-828.

[9] Varisco B M. The pharmacology of acute lung injury in sepsis[J]. Adv Pharmacol Sci, 2011, 2011: 254619.

[10] Matthay M A, Zimmerman G A, Esmon C, *et al*. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(7): 1027-1035.

[11] Baker C C, Chaudry I H, Gaines H O, *et al*. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model[J]. Surgery, 1983, 94(2): 331-335.

[12] Parker S J, Watkins P E. Experimental models of gram-negative sepsis[J]. Br J Surg, 2001, 88(1): 22-30.

[13] Chong D L, Sriskandan S. Pro-inflammatory mechanisms in sepsis[J]. Contrib Microbiol, 2011, 17: 86-107.

[14] Lange M, Nakano Y, Traber D L, *et al*. Role of different nitric oxide synthase isoforms in a murine model of acute lung injury and sepsis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 399(2): 286-291.

[15] Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned[J]. Crit Care Med, 2001, 29(7 Suppl): S121-S125.

[16] 李衍飞, 邓勇, 樊海宁, 等. 不同海拔脓毒症大鼠细胞因子表达和肺损伤的实验研究[J]. 青海医学院学报, 2010, 31(2): 73-79, 108.

[17] 于泳浩, 崔乃强. 脓毒症分级与生物学标志物[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2006, 12(6): 592-594.

(**收稿**:2012-07-12;**修回**:2012-08-13)

(编辑 张 维)