

4 讨论

体外细胞实验说明: SCF 其他组分 (A+ B+ C) 对两种肺癌细胞均无明显的抑制增殖作用; 黄酮组分(D) 与萜类组分(E) 对两种肺癌细胞均有明显的抑制增殖作用; 黄酮组分与萜类组分的配伍对肺癌细胞的增殖抑制作用明显增强。黄酮组分与萜类组分等生药量配伍后, IC_{50} 比未配伍前显著降低 ($P < 0.05$), 说明该复方有效组分之间在药理作用上具有协同作用, 这从一个方面验证了中药复方的药理作用是多种组分部位共同作用的假说^[2], 也符合笔者所提出的关于物质基础“三个层次多维结构”组分部分结构理论中的一维结构: 其各药效组分之间存在配伍配比关系, 也是对假说中第三个层次的解析^[3]。

体内动物实验结果说明: SCF 中萜类组分高剂量组小鼠脾指数明显降低, 而且胸腺指数变化不明显, 说明该组分在抑瘤的同时, 对机体免疫作用较弱, 甚至有一定的抑制作用; 而黄酮组分对小鼠脾指数无明显影响, 而且可以提高小鼠胸腺指数, 说明该组分在抑瘤的同时, 能提高机体特异性免疫力, 这也是应用中药复方治疗肿瘤的优势之一; 黄酮组分与萜类组分配伍对小鼠脾指数无明显影响, 胸腺指数有一定程度的升高, 且抑瘤率比未配伍前有所提高。提示黄酮组分与萜类组分配伍后对小鼠移植性肿瘤

有一定的减毒增效作用。从而阐明了由多个组分构成的整体 (SCF 的物质基础), 其中黄酮组分与萜类组分为主要的药效组分, 且它们之间存在的配伍配比关系和减毒增效作用, 这是该复方中药物质基础中一维结构的研究。

为了节约成本, 更好地适合工业大生产, 本课题组在组分分离纯化的过程中采用乙醇提取、大孔树脂纯化的方法进行。本研究在“组分结构理论”^[3,4]的指导下进行, 通过体内、体外实验对 SCF 抗肺癌有效组分进行了筛选, 探索了组分之间的配伍关系, 进一步探索了 SCF 抗肺癌的物质基础, 实验结果也印证了本课题组所提出的“组分结构理论”。本课题组将在接下来的科研中进行更深入的研究, 从分子生物学角度阐明 SCF 组分配伍配比抗肺癌的作用机制。本研究为制备疗效更好的该复方制剂做准备, 并为创作抗肺癌现代复方中药提供科学依据。

参考文献:

- [1] 张兰桐, 袁志芳, 杜英峰, 等. 山茱萸的研究近况及开发前景 [J]. 中草药, 2004, 35(8): 952-955
- [2] 罗国安, 王义明. 中药复方的化学研究体系 [J]. 世界科学技术——中药现代化, 1999, 1(1): 11-15
- [3] 贾晓斌, 陈彦, 李霞, 等. 中药复方物质基础研究新思路和方法 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(5): 420-425
- [4] 贾晓斌, 封亮, 陈彦, 等. 夏枯草肺癌化学预防研究思路与方法 [J]. 中草药, 2009, 40(2): 316-317

注射用红花黄色素缓解油酸诱导的大鼠急性肺损伤作用

裴崇强, 孙春燕, 金 鸣

(首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所, 北京 100029)

摘要:目的 探讨注射用红花黄色素对油酸致大鼠急性肺损伤的作用及其机制。方法 Wistar 大鼠随机分成对照组、油酸组 (模型组)、油酸+ 山莨菪碱 10 mg/kg 组、油酸+ 红花黄色素 (8, 16, 32 mg/kg) 组, 每组 12 只, 各组在 iv 油酸 0.18 g/kg 前给予药物干预。油酸损伤 4 h 后, 测定大鼠动脉血氧分压、左肺含水系数和肺组织髓过氧化物酶 (MPO) 活性; RT-PCR 法检测肺组织肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素- 1β (IL- 1β)、白细胞介素-6 (IL-6)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) mRNA 表达水平; 免疫组织化学法观察肺组织 NF- κ B p65 活化细胞数; Western blotting 法检测 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平。结果 红花黄色素组大鼠动脉血氧分压值均高于模型组, 肺组织含水系数和 MPO 活性均低于模型组; 同时各炎症因子 mRNA 表达水平, NF- κ B p65 阳性细胞数和 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平也均低于模型组。结论 红花黄色素可缓解急性肺损伤所致肺水肿, 提高动脉血氧分压, 减少肺部炎性细胞浸润, 其作用机制可能与抑制 p38 MAPK 磷酸化及 NF- κ B 活化, 下调 TNF- α 、IL- 1β 等炎症因子的表达有关。

关键词: 红花黄色素; 急性肺损伤; 炎症因子; p38 MAPK; NF- κ B

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)04-0596-06

①收稿日期: 2009-09-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30572344); 北京市自然科学基金资助项目 (797225); 北京中药重点学科项目资助 (京中重 V20); 科技部科技人员服务企业行动项目 (2009GJA30001)

作者简介: 金 鸣 (1957-), 男, 北京人, 首都医科大学附属北京安贞医院-北京市心肺血管疾病研究所药理研究室主任, 医学博士, 研究员, 博士生导师。Tel: (010) 64456308 E-mail: jinzang@public3.bta.net.cn

Mitigation of safflor yellow injection on acute lung injury of rats induced by oleic acid

PEI Chong-qiang, SUN Chun-yan, JIN Ming

(Beijing Anzhen Hospital of the Capital University of Medical Science-Beijing Institute of Heart Lung and Blood Vessel Diseases, Beijing 100029, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of safflor yellow (SY) injection on acute lung injury (ALI) rats induced by oleic acid (OA) and its potential mechanism. **Methods** Wistar rats were randomly divided into six groups, including control group, OA group, OA+ 10 mg/kg anisodamine group, OA+ 8 mg/kg SY group, OA+ 16 mg/kg SY group, and OA+ 32 mg/kg SY group. Normal saline or anisodamine or SY were pretreated before 0.18 g/kg OA iv injection. The arterial partial pressure of oxygen, the pulmonary water content index, and MPO activity in lung tissue were determined; The mRNA level of TNF- α , IL-1 β , IL-6, ICAM-1, and VCAM-1 were measured by RT-PCR; And NF- κ B p65 protein in nucleus observed by immunohistochemical technology, while the level of p38 MAPK protein phosphorylation in lung tissue was analyzed by Western blotting. **Results** The arterial partial pressure of oxygen in all SY groups was higher than that in OA group, while the pulmonary water content index and MPO activity were lower than those in OA group, as well as the mRNA level of the above inflammatory cytokines and the NF- κ B p65 in nucleus and level of p38 MAPK phosphorylation. **Conclusion** SY could alleviate the lung tissue edema, increase the arterial partial pressure of oxygen, and depress MPO activity in ALI rat induced by OA. The SY mechanism of attenuating the acute lung injury may be associated with inhibiting the p38 phosphorylation and NF- κ B activation and reducing inflammatory factors expression.

Key words: safflor yellow (SY); acute lung injury (ALI); inflammatory factor; p38 MAPK; NF- κ B

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 是现代危重医学的一大难题, 表现为各种原因引起的急性呼吸困难和顽固性低氧血症。目前用于 ALI 治疗的药物主要包括氧自由基清除剂和抗氧化剂、肺表面活性物质、糖皮质激素、一氧化氮、前列腺素 E₂ (PGE₂) 和 β_2 受体激动剂等, 这些药物虽然能对 ALI 起到一定的治疗作用, 但其效果均还不尽如人意。红花为菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的干燥花, 具有活血通经、散瘀止痛之功效。红花黄色素 (safflor yellow, SY) 是红花的主要有效部位^[1], 它是从红花中提取的多种水溶性查耳酮成分混合物, 包括羟基红花黄色素 A (hydroxylsafflor yellow A, HSYA)、红花黄色素 B 等组分, 其中 HSYA 是其主要有效成分^[2,3]。注射用红花黄色素是 SY 的粉针剂, 临床上主要用于治疗冠心病心绞痛。有研究表明 SY 可以拮抗 PAF 受体^[4]; 调节一氧化氮 (NO) 水平, 清除自由基、保护细胞膜; 还可降低冠心病患者血浆中 C 反应蛋白 (CRP)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6) 的水平^[5]。此外药动学研究^[6]显示 iv SY 后其在小鼠肺内具有较高的分布容积。这些研究提示 SY 可能对肺部炎症反应具有抑制作用, 故本研究探讨 SY 对 ALI 的药效及其作用机制, 试图为 ALI 的药物治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂: 注射用红花黄色素 (每瓶含 80

mg SY, 批号 70302009) 由山西华辉凯德制药有限公司提供, 使用前用生理盐水 (NS) 分别配制成不同浓度的溶液; 山莨菪碱为北京双鹤药业有限公司提供的原料药, 用前用 NS 溶解; 牛血清白蛋白 (BSA) 购于北京鼎国生物技术有限责任公司, 用 NS 配制成 0.5% BSA/NS 溶液备用; 分析纯油酸购于北京化学试剂公司, 密度为 0.890~0.899, 使用前加入 4 倍体积的 0.5% BSA/NS 溶液振荡混匀后立即使用; 乌拉坦购于北京化学试剂公司, 用 NS 配制成 20% 溶液; 髓过氧化物酶 (MPO) 测定试剂盒购于南京建成生物工程研究所; TRIzol Reagent 购于 invitrogen 公司; RNA 酶抑制剂、OligodT、鼠源反转录酶均购于 Promega 公司; Taq 酶、dNTP、100 bp DNA Ladder 均购于北京鼎国生物技术有限责任公司; 所有引物均由北京赛百盛基因技术有限公司合成; 兔抗鼠 NF- κ B p65 多克隆抗体购于 SANTA CRUZ 公司; 兔抗鼠 p38 MAPK 多克隆抗体、兔抗鼠磷酸化 p38 MAPK 多克隆抗体、兔抗鼠 β actin 多克隆抗体均购于北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 仪器: 丹麦雷度 ABL726 全自动血气分析仪, Biometra 公司 PCR 扩增仪, Biostep GmbH Meinersdorfer str. 47A 凝胶成像扫描仪, 美国 Media Cybernetics 公司 Image-Pro Plus 多功能真彩色细胞图像分析管理系统。

1.3 方法: 清洁级成年雄性 Wistar 大鼠, 体质量 200~ 220 g, 购于北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证编号: 0134034。大鼠随机分为 6 组, 分别为: 对照组、油酸组 (模型组)、油酸+ 10 mg/kg 山莨菪碱组、油酸+ 8 mg/kg SY 组、油酸+ 16 mg/kg SY 组、油酸+ 32 mg/kg SY 组, 每组 12 只动物。大鼠禁食 8 h, 称量大鼠体质量, ip 20% 乌拉坦 (1 g/kg) 麻醉大鼠。待麻醉生效后, 经右下肢隐大静脉 iv 0.18 g/kg 油酸造成大鼠急性肺损伤模型, 对照组用 0.5% BSA/NS 代替。iv 油酸前 30 min, SY 组经尾 iv 分别给予 8、16、32 mg/kg 的 SY 溶液, 山莨菪碱组 iv 给予 10 mg/kg 的山莨菪碱/NS 溶液, 对照组和模型组用同等体积的 NS 代替。注射油酸 4 h 后, 用肝素化注射器经腹主动脉抽取动脉血送血气分析。放血处死大鼠, 取左肺组织样本测定含水系数, 取右肺下叶瘀血最明显处组织, 冰冷 PBS 冲洗后, 立即置于 4% 多聚甲醛中固定, 以备后续 HE 染色和免疫组化分析用。另取右肺上、中叶, 用冰冷 NS 冲洗后, 分管置于液氮中保存, 以备后续 MPO 测定、RT-PCR 和 Western blotting 实验用。

1.4 左肺含水系数测定: 处死大鼠后打开胸腔, 取出左肺, 称量左肺湿质量, 然后于 80 °C 烘烤 24 h 后, 称量左肺干质量, 计算左肺含水系数 [左肺含水系数 = 1 000 × (左肺湿质量 - 左肺干质量) / 体质量]。

1.5 MPO 活性测定: 两周内从液氮罐中取出冻存的肺组织, 精密称质量后, 冰上匀浆, 按试剂盒方法操作, 邻连茴香胺比色法测定 MPO 活性。以 37 °C 的反应体系下 H₂O₂ 被分解 1 μmol 为 1 个酶活力单位 (U)。

1.6 RT-PCR 法测定肺组织内 TNF-α、IL-1β、IL-6、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子-1 (VCAM-1) mRNA 水平: 4 周内从液氮罐中取出冻存肺组织, 以 Trizol 法提取大鼠右肺组织总 RNA, 根据 A₂₆₀/A₂₈₀ 确定纯度, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其完整性。取总 RNA 2 μg, 加入 Oligo (dT)₁₅、M-MLV、dNTP 等建立 25 μL 反应体系, 按 25 °C、10 min → 37 °C、30 min → 95 °C、5 min → 4 °C、5 min 顺序进行逆转录。用 RT 产物 2 μL 建立 25 μL PCR 反应体系, 以 β-actin 为内参, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为: 94 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 45 s, 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 72 °C 后延伸 10 min。引物序列、退火温度、循环次数和产物大小见表 1。最后取 8 μL PCR 反应产物, 在 2% 琼脂

表 1 引物序列与 PCR 反应条件

Table 1 Sequence of primers and reaction conditions of PCR

基因	引物序列	循环数	退火温度/°C	产物大小/bp
TNF-α	正向: 5'-GCCAATGGCATGGATCTCAA-3'	28	59	307
	反向: 5'-ACTTGGCCAGGTTGACCTCA-3'			
IL-1β	正向: 5'-ACAAAGGAGAGACAAACCAACGA-3'	28	55	243
	反向: 5'-TCTGCTTGGAGAGGTGCTGATG-3'			
IL-6	正向: 5'-GCTCTGCTCTTCTGGAGTTCG-3'	28	54	236
	反向: 5'-GAGTTGGATGCTCTTGCTCC-3'			
ICAM-1	正向: 5'-TCCGGTAGACACAAGCAAGAG-3'	28	55	239
	反向: 5'-AGAAGCCCAACCCCTATGA-3'			
VCAM-1	正向: 5'-GGATGCCGAGTATACGAGTG-3'	28	55	226
	反向: 5'-CTTCTGTCTCCGACCAAGACT-3'			
β-actin	正向: 5'-TGGCATCCACGAAACTACCT-3'	28	56	186
	反向: 5'-TCAGGAGGACCAATGATCTTG-3'			

糖凝胶上进行电泳分离, 用凝胶成像系统照相, Quantity one 软件灰度扫描进行半定量分析。

1.7 免疫组化法观察 p65 阳性细胞数: 经固定、包埋、脱蜡、入水、漂洗、抗原修复、封闭等步骤后滴加 p65 抗体, 4 °C 过夜; 0.1 mol/L PBS 洗 3 次后, 滴加生物素化第二抗体, 37 °C 孵育 20 min; 漂洗后滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液, 37 °C 孵育 20 min; 最后 DAB 显色、封片、照相。每个动物样本的切片图像随机选取 5 个视野, 用 Image-Pro Plus 多功能真彩色细胞图像分析管理系统处理分析, 统计其细胞总数和细胞核棕染的 p65 阳性细胞数, 再得到各组平均细胞总数和平均 p65 阳性细胞数。

1.8 Western blotting 法测定组织内磷酸化 p38 MAPK 水平: 提取大鼠右肺组织总蛋白, 经 BCA 法定量, 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 半干转法转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉 4 °C 封闭过夜。加入一抗 (1: 300 稀释) 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次; HRP 标记的二抗 (1: 1 000 稀释) 室温孵育 1 h, PBST 洗涤 3 次; ECL 显色, 照相, 扫描入电脑用 Quantity One 软件进行灰度分析。

1.9 统计学分析: 所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料用 SPSS 13.0 的 ANOVA 分析和组间 SNK 检验进行统计学处理, 计数资料用 χ^2 检验分析。

2 结果

2.1 SY 对急性肺损伤大鼠肺组织外观的影响: 见图 1。对照组肺组织边缘锐利、粉红色, 未见充血水肿; 模型组肺组织体积明显增大, 边缘变钝、暗红色, 重度瘀血水肿; 山莨菪碱组肺组织瘀血肿胀明显, 深红色; SY 各组肺组织肿胀明显, 但瘀血程度逐渐减轻。

2.2 SY 对急性肺损伤大鼠肺组织病理形态的影响: 图 2 显示, 对照组大鼠的肺泡腔清晰可见、结构完整, 间质无水肿; 模型组大鼠的肺泡塌陷萎缩, 间

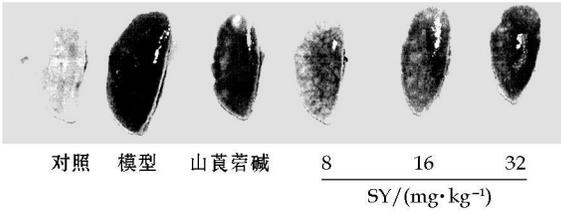


图 1 各组急性肺损伤大鼠肺组织外观

Fig. 1 Appearance of lung tissue of ALI rats in each group

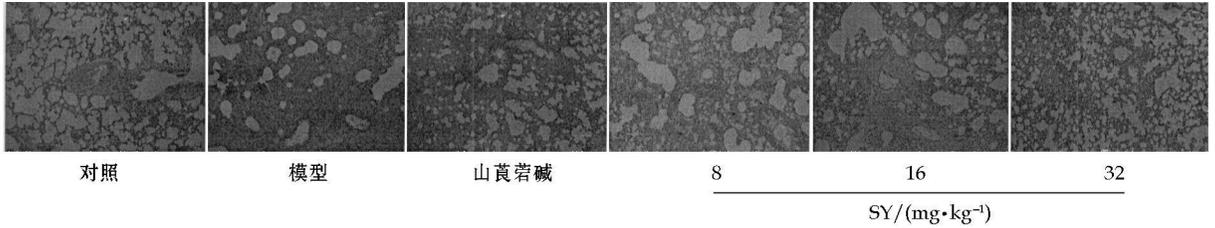


图 2 SY 对急性肺损伤大鼠肺组织病理改变的影响

Fig. 2 Effects of SY on histological changes in lung tissue of ALI rats

表 2 SY 对急性肺损伤大鼠肺含水量、血氧分压及 MPO 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Table 2 Effects of SY on water content in lung tissue, arterial partial pressure of oxygen, and MPO activity in lung tissue of ALI rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肺含水量/%	血氧分压/mmHg	MPO/(U·g ⁻¹)
对照	-	0.129 ± 0.007	88.45 ± 4.04	0.36 ± 0.08
模型	-	0.232 ± 0.036 ^{△△△}	69.44 ± 11.16 ^{△△△}	0.81 ± 0.25 ^{△△△}
山莨菪碱	10	0.189 ± 0.025 ^{**}	77.97 ± 5.88 [*]	0.65 ± 0.27 ^{**}
SY	8	0.182 ± 0.032 ^{**}	76.43 ± 7.26	0.75 ± 0.22 ^{**}
	16	0.185 ± 0.022 ^{**}	77.81 ± 10.03 [*]	0.67 ± 0.22 ^{**}
	32	0.167 ± 0.022 ^{**}	81.36 ± 11.26 [*]	0.64 ± 0.29 ^{**}

与对照组比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$

与模型组比较: $* P < 0.05$ $** P < 0.01$ $*** P < 0.001$

$\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs control group

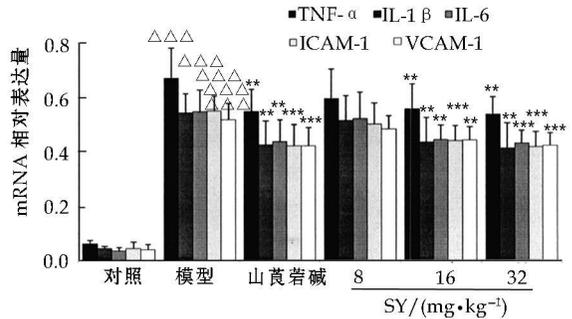
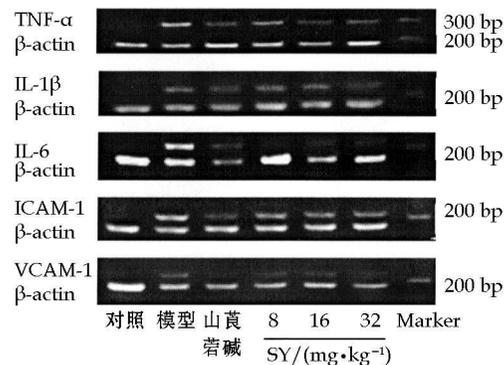
$* P < 0.05$ $** P < 0.01$ $*** P < 0.001$ vs model group

质明显增厚,组织重度水肿;山莨菪碱组大部分肺泡结构尚完整,组织轻度水肿;SY 8 mg/kg 组肺泡腔数目稀少,大部分肺泡塌陷萎缩,间质明显增厚,组织中度水肿;SY 16 mg/kg 组可见少量结构完整的肺泡,组织水肿程度低于模型组和 SY 8 mg/kg 组;SY 32 mg/kg 组大部分肺泡腔结构清楚,间质轻度增厚,组织水肿不明显。

2.3 SY 对肺含水量、动脉血氧分压和 MPO 活性的影响:表 2 显示,注射油酸后,各组肺含水量和 MPO

活性较对照组显著升高。相比模型组,SY 各组的肺含水量和 MPO 活性明显降低,且 SY 32 mg/kg 组下降最为显著 ($P < 0.001$)。而大鼠 iv 油酸后各组血氧分压均明显下降 ($P < 0.001$),相比模型组,SY 各组血氧分压值随着 SY 剂量增加而升高,且 SY 32 mg/kg 组血氧分压值明显高于山莨菪碱组。

2.4 SY 对肺组织内 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达水平的影响:图 3 显示,注射油酸 4 h 后,大鼠体内的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、ICAM-1 和 VCAM-1 mRNA 表达水平明显升高 ($P < 0.001$),且 TNF- α mRNA 水平高于其他因子。和模型组相比,山莨菪碱组上述因子的表达明显减少,而 SY 各组上述因子的表达水平低于模型组,且随着 SY 剂量的增加而呈下降趋势。



与对照组比较: $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$; 与模型组比较: $** P < 0.01$ $*** P < 0.001$

$\Delta\Delta\Delta P < 0.001$ vs control group; $** P < 0.01$ $*** P < 0.001$ vs model group

图 3 SY 对急性肺损伤大鼠肺组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、ICAM-1、VCAM-1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Fig. 3 Effects of SY on mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , IL-6, ICAM-1, and VCAM-1 in lung tissue of ALI rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

2.5 SY 对肺组织内 NF-κB p65 表达的影响: 由图 4 可见, 对照组 p65 阳性细胞数目少, 着色浅; 模型组可见大片的胞核棕染的 p65 阳性细胞, 着色深; 而山莨菪碱组 p65 阳性细胞呈散在分布, 着色深浅不一。相比之下, SY 3 个剂量组其 p65 阳性细胞数和着色程度均比模型组低。表 3 则显示, 模型组 p65 阳性细胞率显著升高, 3 个 SY 组则随着剂量增加其 p65 阳性细胞率逐步下降, 且 SY 32 mg/kg 组

p65 阳性细胞率明显低于模型组, 接近于对照组水平。

2.6 SY 对肺组织内 p38 MAPK 信号通路的影响: Western blotting 结果显示 (图 5), 注射油酸后, 大鼠肺组织内 p38 MAPK 蛋白磷酸化水平显著升高。给予 SY 处理, 磷酸化 p38 MAPK 蛋白水平随 SY 剂量升高而降低, 且 SY 32 mg/kg 组的磷酸化 p38 MAPK 水平已明显低于山莨菪碱组。

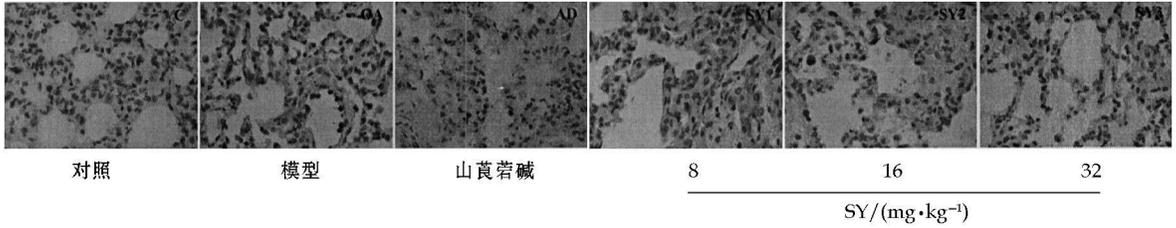


图 4 各组急性肺损伤大鼠肺组织 NF-κB p65 阳性表达 (DAB 染色)

Fig. 4 Positive expression of NF-κB p65 in lung tissue of ALI rats in groups (DAB stain)

表 3 SY 对急性肺损伤大鼠肺组织 NF-κB p65 阳性表达率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effects of SY on positive expression rate of NF-κB p65 in lung tissue of ALI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

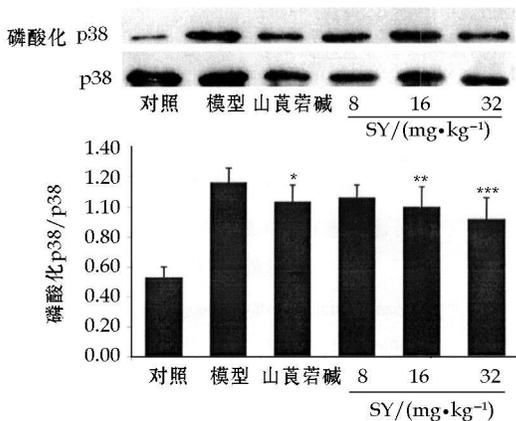
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NF-κB p65 阳性表达率/%
对照	-	7.26 ± 6.07
模型	-	24.11 ± 10.18 ^{△△△}
山莨菪碱	10	15.50 ± 6.61*
SY	8	19.12 ± 10.89
	16	13.00 ± 7.23**
	32	9.00 ± 7.29**

与对照组比较: ^{△△△} $P < 0.001$

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

^{△△△} $P < 0.001$ vs control group

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group



与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group

图 5 SY 对急性肺损伤大鼠肺组织 p38 磷酸化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effects of SY on phosphorylated level of p38MAPK in lung tissue of ALI rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3 讨论

静脉注射油酸诱导的急性肺损伤动物模型已经沿用多年, 虽然它和临床 ALI 的病因不同, 但其病理表现却和临床上 ALI/ARDS 患者的病理表现非常接近, 因此常被用来评估肺损伤后结局和评价新的肺损伤治疗方案^[7]。而大量的文献报道^[8-10] 山莨菪碱能明显改善动物的血气, 减少肺湿干质量比, 抑制肺组织中激酶 IKK-β 的 mRNA 表达和肺泡巨噬细胞中 NF-κB 的活性, 从而降低支气管肺灌洗液中 TNF-α 和 IL-1β 等前炎症因子的量。据此, 选用山莨菪碱作为阳性药物对照, 观察 SY 对 ALI 模型大鼠的影响。

顽固性低氧血症是 ALI 的主要表现之一, 而本实验动脉血气分析结果表明, 在 iv 油酸后大鼠血氧分压显著下降, SY (8、16、32 mg/kg) 则能剂量依赖性增加血氧分压 ($P < 0.05, 0.01$)。ALI 顽固性低氧血症的病变基础为弥漫性肺泡-毛细血管损伤所致肺不张和肺水肿, 本实验 HE 染色和左肺含水系数测定结果则显示, iv 油酸后大鼠肺泡结构被破坏, 肺组织重度水肿, SY 可缓解其肺不张和肺水肿程度。

MPO 是一种重要的含铁溶酶体, 主要存在于中性粒细胞和单核细胞中, 是髓细胞的特异性标志。因此, 通过测定肺组织 MPO 活性可以间接反映出肺部中性粒细胞浸润情况。本研究结果显示, iv 油酸可导致大鼠肺组织内 MPO 活性升高 3 倍, 这提示大鼠肺部有大量粒-单核细胞浸润, 而不同剂量的 SY 可以不同程度地减少中性粒细胞浸润。

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 是机体许多信号从细胞膜到细胞核内的重要传递者, MAPK 能被 TNF- α 、脂多糖 (LPS) 等多种炎症因子所激活, 是炎症介质作用的重要信号通路^[11, 12]。MAPK 家族中的 p38 MAPK 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, p38 MAPK 上的酪氨酸和苏氨酸被双磷酸化后成为活化形态的磷酸化 p38 MAPK, 后者使某些调节蛋白的丝氨酸/苏氨酸残基磷酸化而启动相应的反应。NF- κ B 是存在于多种细胞胞浆内的一种快反应转录因子, 通常情况下 NF- κ B 与其抑制性蛋白 kappa B (inhibitor kappa B, I κ B) 结合而呈非活性状态。炎症因子可激活 MAPK 通路使 I κ B 磷酸化而使 NF- κ B 活化^[13], 活化后的 NF- κ B 再进入细胞核与靶基因上的 NF- κ B 结合基序结合, 进而启动许多细胞因子的表达。TNF- α 和 IL-1 β 是 ALI 早期的两个主要前炎症因子, 发挥着多种生化效应。它们诱导 ICAM-1 等黏附分子的表达使淋巴细胞黏附至内皮细胞表面; 诱导巨噬细胞释放 IL-6, 导致 B 细胞释放抗体和细胞毒 T 细胞分化, 从而激活中性粒细胞并产生组织损害; 诱导产生纤维蛋白溶酶原激活剂的抑制剂和其他因子, 造成凝血系统和纤溶系统的失衡从而参与炎症和纤维化过程^[14]。在 ALI 的过程中, 肺部的上皮细胞、巨噬细胞和中性粒细胞均可通过 NF- κ B 活化的信号机制参与肺部炎症形成^[15], 由此可见 MAPK 和 NF- κ B 与 ALI 的发生发展密切相关。本实验结果显示: iv 油酸 4 h 后, 大鼠肺组织内 p38 MAPK 磷酸化水平和 NF- κ B 活化细胞明显升高, 而 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、ICAM-1 和 VCAM-1 等因子的 mRNA 水平也相应升高, 并且以 TNF- α 的升高为主, 这和 ALI 早期的表现相符。而 SY 则可抑制 p38 MAPK 磷酸化和 NF- κ B 活化, 减少上述前炎症因子和黏附分子的表达, 且随剂量增大其抑制作用逐渐增强, 在高剂量 32 mg/kg 时药物作用优于山莨菪碱 (10 mg/kg)。综上所述, SY 呈剂量依赖性地减轻 ALI 肺水肿, 提高动脉血氧分压, 减少肺部中性粒细胞浸润, 其机制之一可能与抑制 p38 MAPK 磷酸化和 NF- κ B 活化通路, 下调其调控下游的 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、ICAM-1 和 VCAM-1 等前炎症因子表达有关。

张琼等^[16]研究表明, 采用红花黄色素冻干粉针剂 80 mg 或 160 mg 加入 250 mL NS 中静脉滴注, 每日一次用于冠心病心绞痛患者治疗, 其疗效确切且无明显不良反应。其剂量折算成大鼠用药剂量

大致为 10~20 mg/kg, 而本研究所用中剂量 16 mg/kg 正处于这个范围, 且给药途径也是 iv 给药, 因此本研究可以作为后续临床实验的参考, 为注射用红花黄色素开辟治疗急性肺损伤这一新适应症提供动物实验支持。总之, 本研究揭示了注射用红花黄色素的抗炎作用并初步探讨了其作用机制, 为其进一步的理论研究和临床应用提供了依据。

参考文献:

- [1] 金 鸣, 高子淳, 李金荣, 等. 大孔树脂柱色谱法制备红花黄色素和羟基红花黄色素和羟基红花黄色素 A [J]. 中草药, 2004, 5(1): 25-28.
- [2] 金 鸣, 董宁宁, 吴 伟, 等. 羟基红花黄色素 A 缓解大鼠心肌细胞凋亡作用的研究 [J]. 中草药, 2009, 40(6): 924-930.
- [3] 臧宝霞, 金 鸣, 李金荣. 羟基红花黄色素 A 抗凝作用的研究 [J]. 中草药, 2007, 38(5): 741-743.
- [4] 金 鸣, 吴 伟, 陈文梅, 等. 红花总黄色素体外抑制血小板激活因子受体结合作用的研究 [J]. 中国药理学杂志, 2001, 36(3): 167-169.
- [5] 林 萍, 任 谦. 红花黄色素对老年冠心病患者血脂和炎症因子影响的临床观察 [J]. 中国医院药学杂志, 2009, 29(8): 652-653.
- [6] 杨志福, 文爱东, 蒋永培, 等. 红花黄色素在鼠组织中的分布特征 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(14): 1301-1303.
- [7] Wang H M, Bodenstern M, Markstaller K. Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury [J]. *Eur Surg Res*, 2008, 40(4): 305-316.
- [8] 尹 文, 虎晓岷, 杨剑虹, 等. 山莨菪碱对创伤性肺损伤激活 IKK 的影响及意义 [J]. 中国急救医学, 2003, 23(4): 203-205.
- [9] 刘庆辉, 刘 岩, 夏文俊, 等. 山莨菪碱对通气机所致大鼠肺损伤防护作用的实验研究 [J]. 解放军医学杂志, 2007, 32(11): 1157-1159.
- [10] 徐兴祥, 钱桂生. 急性肺损伤大鼠肺组织 PMN 扣押的变化及山莨菪碱的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(8): 999-1000.
- [11] Fan J, Ye R D, Malik A B. Transcriptional mechanisms of acute lung injury [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(5): L1037-L1050.
- [12] Hudry-Clergeon H, Stengel D, Ninio E, et al. Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns 3-kinase [J]. *Faseb J*, 2005, 19(6): 512-520.
- [13] Hayden M S, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling [J]. *Cell*, 2008, 132(3): 344-362.
- [14] Chambers R C. Procoagulant signalling mechanisms in lung inflammation and fibrosis: novel opportunities for pharmacological intervention? [J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 153(Suppl 1): S367-S378.
- [15] Park G Y, Christman J W. Nuclear factor kappa B is a promising therapeutic target in inflammatory lung disease [J]. *Curr Drug Targets*, 2006, 7(6): 661-668.
- [16] 张 琼, 陈志杨, 吴林彬, 等. 红花黄色素冻干粉针剂与红花黄色素滴注液治疗冠心病心绞痛 (心血瘀阻证) 的临床非劣性试验 [J]. 中国循证医学杂志, 2005, 5(4): 276-285.