

从细胞因子风暴探讨热毒宁注射液抗大鼠急性肺损伤作用机制

常秀娟^{1,2}, 张 帅^{1,2}, 江益平^{1,2}, 陈春苗^{1,2}, 陈 健^{1,2}, 刘冰洁^{1,2}, 周 军^{1,2}, 李 威^{1,2},
王振中^{1,2}, 萧 伟^{1,2*}

1. 江苏康缘药业股份有限公司, 江苏 连云港 222001

2. 中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏 连云港 222001

摘 要: 目的 通过细胞因子风暴探讨热毒宁注射液对脂多糖(LPS)致大鼠急性肺损伤(ALI)的治疗作用及机制。方法 采用LPS按6 mg/kg对SD大鼠气管内滴注制备ALI模型, 观察热毒宁注射液3个剂量(10.16、5.08、2.54 g/kg)组和阳性对照药地塞米松注射液(0.5 mg/kg)iv给药后对大鼠肺组织匀浆白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、核转录因子- κ B(NF- κ B)水平及肺组织形态学的影响。结果 热毒宁注射液能够降低ALI模型大鼠肺脏IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、ICAM-1、NF- κ B水平, 改善大鼠肺组织形态学变化。结论 热毒宁注射液可改善肺组织病理变化, 减轻LPS致ALI过程中炎性介质的生成和释放可能是治疗ALI的重要机制。

关键词: 细胞因子风暴; 热毒宁注射液; 急性肺损伤; 脂多糖; 炎性介质

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2015)02-0236-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.02.016

Mechanism of Reduning Injection on anti-acute lung injury in rats based on cytokine storm

CHANG Xiu-juan^{1,2}, ZHANG Shuai^{1,2}, JIANG Yi-ping^{1,2}, CHEN Chun-miao^{1,2}, CHEN Jian^{1,2}, LIU Bing-jie^{1,2},
ZHOU Jun^{1,2}, LI Wei^{1,2}, WANG Zhen-zhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}

1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222001, China

2. State Key Laboratory of New-tech for Pharmaceutical Process of Chinese Materia Medica, Lianyungang 222001, China

Abstract: Objective: To investigate the effect and mechanism of Reduning Injection on the rats with acute lung injury (ALI) induced by lipopolysaccharide (LPS) from cytokine storm. **Methods** The model of ALI was established by instilling LPS (6 mg/kg) to SD rats. The effects of iv administration of Reduning Injection with three doses (10.16, 5.08, and 2.54 g/kg) and control drug Dexamethasone (0.5 mg/kg) on IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1, and NF- κ B in lung homogenate and lung tissue pathology were observed. **Results** Reduning Injection could reduce the levels of IL-1 β , TNF- α , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1, and NF- κ B in lung tissue of rats, and improve the morphologic changes of lung tissue. **Conclusion** Reduning Injection could improve the pathological changes of lung tissue, and the important curative mechanism may be reducing the production and release of inflammatory mediators in ALI process induced by LPS.

Key words: cytokine storm; Reduning Injection; acute lung injury; lipopolysaccharide; inflammatory factor

细胞因子风暴(cytokine storm)是指在机体感染微生物后或者其他情况下,免疫系统被过度激活,导致体液中多种细胞因子迅速大量产生的现象,这些细胞因子包括肿瘤坏死因子- α (TNF- α),白细胞介素-1、2、4、6、8、10、12(IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12),干扰素(IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ)等。Ferrara等1993年首次提出“细胞因子

风暴”的概念,但其很大程度上是由于2005年H5N1禽流感病毒爆发而进入公众视野,从此广泛见于各种科学文献报道^[1-2]。细胞因子风暴是引起急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)和多器官衰竭的重要原因,在多种疾病中是致死的重要原因之一,近年来越来越引起人们的关注^[1]。研究表明热毒宁注射液具有抗病毒、抗菌、

收稿日期: 2014-07-23

基金项目: 科技部重大新药创制: 现代中药创新集群与数字制药技术平台(2013ZX09402203)

作者简介: 常秀娟(1981—),女,中级工程师,硕士,研究方向为药理学。Tel: (0518)81152299 E-mail: cxj045@163.com

*通信作者: 萧伟,男,研究员级高级工程师,博士,研究方向为中药新药的研究与开发。

Tel: (0518)81152337/13905136437 E-mail: wzzhz-nj@163.net

解热、抗炎等药理作用^[3-7],可降低TNF- α 、IL-1、IL-6、内皮素-1(ET-1)、前列腺素E₂(PGE₂)、环磷酸腺苷(cAMP)等炎症因子的水平。本研究通过脂多糖(LPS)致大鼠急性肺损伤(ALI)模型,探讨热毒宁注射液抑制细胞因子风暴的作用机制,为其临床用于呼吸系统疾病治疗提供依据。

1 材料

1.1 药物、试剂与仪器

热毒宁注射液,规格10 mL/支,6支/盒,批号140103,江苏康缘药业股份有限公司;醋酸地塞米松注射液,规格5 mg/mL,批号140125,吉林精优长白山药业有限公司;LPS(批号L2660),Biological Sigma;IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、核转录因子- κ B(NF- κ B)放免试剂盒,北京华英生物技术研究所。日本日立7160全自动生化仪。

1.2 动物

SD大鼠,雄性,体质量180~200 g,SPF级,上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证号(沪)2008-0016。

2 方法

2.1 分组

取雄性SD大鼠60只,将大鼠随机分成6组,每组10只,即对照组、模型组、阳性对照组(地塞米松0.5 mg/kg)及热毒宁注射液高、中、低剂量(10.16、5.08、2.54 g/kg)治疗组。实验前动物禁食12 h,自由饮水。

2.2 ALI模型制备^[8-9]

依据文献方法,采用LPS气管滴注法制备ALI模型。LPS以无菌生理盐水配制成5 mg/mL。大鼠ip 10%水合氯醛0.35 g/kg麻醉,颈部正中切口2 cm,分离气管,微量注射器由气管向肺方向滴注LPS(6 mg/kg)复制ALI模型,对照组滴注等体积生理盐水。造模30

min后各组大鼠iv给予相应药物治疗,注射LPS后16 h,大鼠ip 10%水合氯醛0.35 g/kg麻醉,取材。

2.3 检测指标

2.3.1 细胞因子测定 各组动物处死后,迅速打开胸腔,取出右肺中叶放入液氮中待处理。肺组织称质量,以0.1 g肺组织加生理盐水1 mL,用玻璃匀浆器匀浆,4℃低温离心(3 000 r/min),取上清液-70℃冻存,按试剂盒说明方法检测。

2.3.2 肺组织形态学检测 各组动物处死后,迅速打开胸腔,取出右肺上叶放入10%甲醛固定24 h,石蜡切片,HE染色观察病理改变情况。根据病变范围及炎症评分:1分代表轻微,病变范围<25%;2分代表中度,病变范围25%~50%;3分代表重度,病变范围50%~75%;4分代表严重,病变范围75%~100%;无明显病变为0分,极轻度病变为0.5分,累加所有分数,并计算出每组每只动物的平均分,分值越高提示炎症病变程度越严重。

2.4 统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,量反应资料统计方法采用单因素方差分析检验法,统计软件SPSS 17.0。

3 结果

3.1 对ALI大鼠肺组织IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-6的影响

模型组与对照组相比,大鼠肺组织IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-6水平明显升高($P < 0.01$)。热毒宁注射液高、中剂量组和地塞米松组明显降低大鼠肺组织中IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-6水平($P < 0.05$ 、0.01),热毒宁低剂量组明显降低大鼠肺组织中IL-1 β 和TNF- α 水平($P < 0.05$),结果见表1。

3.2 对ALI大鼠肺组织IL-8、IL-10、ICAM-1、NF- κ B的影响

表2结果表明,模型组与对照组相比,大鼠肺

表1 热毒宁注射液对LPS致ALI大鼠肺组织IL-1 β 、TNF- α 、IL-4、IL-6的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effects of Reduning Injection on IL-1 β , TNF- α , IL-4, and IL-6 in lung tissue of ALI rats induced by LPS($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-4/(pg·mL ⁻¹)	IL-6/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	63.33 ± 19.53	93.27 ± 17.08	89.45 ± 13.01	136.29 ± 31.16
模型	—	118.03 ± 26.99 ^{△△}	149.76 ± 21.67 ^{△△}	141.26 ± 20.39 ^{△△}	210.53 ± 50.58 ^{△△}
地塞米松	5 × 10 ⁻⁴	66.74 ± 22.97 ^{**}	110.98 ± 16.97 ^{**}	110.14 ± 26.09 ^{**}	154.61 ± 39.52 [*]
热毒宁注射液	10.16	69.14 ± 28.43 ^{**}	112.73 ± 20.00 ^{**}	115.48 ± 19.52 ^{**}	165.97 ± 30.41 [*]
	5.08	78.99 ± 23.37 ^{**}	115.63 ± 18.02 ^{**}	118.89 ± 19.85 [*]	171.03 ± 23.35 [*]
	2.54	92.37 ± 23.28 [*]	126.17 ± 19.30 [*]	121.57 ± 23.79	181.61 ± 32.25

与对照组比较: ^{△△} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 下同

^{△△} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below

表2 热毒宁注射液对 LPS 致 ALI 大鼠肺组织中 IL-8、IL-10、ICAM-1、NF-κB 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 Effects of Reduning Injection on IL-8, IL-10, ICAM-1, and NF-κB in lung tissue of ALI rats induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	IL-8/(pg·mL ⁻¹)	IL-10/(pg·mL ⁻¹)	ICAM-1/(ng·mL ⁻¹)	NF-κB/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	80.30 ± 19.31	53.11 ± 16.50	355.87 ± 56.67	38.97 ± 6.12
模型	—	128.61 ± 24.42 ^{△△}	80.25 ± 22.43 ^{△△}	420.31 ± 47.90 [△]	81.36 ± 13.84 ^{△△}
地塞米松	5 × 10 ⁻⁴	93.51 ± 12.68 ^{**}	56.60 ± 16.51 [*]	363.32 ± 47.61 [*]	50.99 ± 24.90 ^{**}
热毒宁注射液	10.16	94.45 ± 24.61 ^{**}	56.31 ± 13.83 [*]	361.23 ± 39.64 ^{**}	49.13 ± 18.39 ^{**}
	5.08	104.96 ± 23.52 [*]	58.37 ± 21.18 [*]	363.27 ± 39.31 ^{**}	56.33 ± 19.50 ^{**}
	2.54	103.74 ± 28.71	66.43 ± 16.97	382.90 ± 47.42	62.87 ± 24.45

与对照组比较: [△]P<0.05 ^{△△}P<0.01; 与模型组比较: ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01, 下同[△]P<0.05 ^{△△}P<0.01 vs control group; ^{*}P<0.05 ^{**}P<0.01 vs model group, same as below

组织 IL-8、IL-10、ICAM-1、NF-κB 水平明显升高 ($P<0.01$)。热毒宁注射液高、中剂量组和地塞米松组明显降低大鼠肺组织中 IL-8、IL-10、ICAM-1、NF-κB 水平 ($P<0.05, 0.01$)。

3.3 对 ALI 大鼠肺组织形态学的影响

肺组织病理检查结果显示, 对照组大鼠肺组织由肺泡、肺内支气管分支及间质组成, 未见明显病变。模型组大鼠肺组织肺泡壁充血、有炎细胞浸润, 部分大鼠肺泡腔内有渗出物, 肺内各级支气管腔内、管周水肿, 有炎细胞浸润。热毒宁注射液组和地塞米松组病变同模型组相比, 肺泡壁充血、炎细胞浸润较模型组减轻, 表明热毒宁注射液高、中、低剂量组能不同程度地减轻肺部炎症的病变, 与模型组相比差异有显著性 ($P<0.01$)。见表 3、图 1。

表3 热毒宁注射液对 LPS 致 ALI 大鼠肺组织病理改变的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 Effect of Reduning Injection on pathology of ALI rats induced by LPS ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	病理评分
对照	—	2.90 ± 0.61
模型	—	10.30 ± 1.01 ^{△△}
地塞米松	5 × 10 ⁻⁴	6.55 ± 1.48 ^{**}
热毒宁注射液	10.16	5.75 ± 3.02 ^{**}
	5.08	7.15 ± 1.40 ^{**}
	2.54	8.05 ± 1.28 ^{**}

4 讨论

ALI 是以大量中性粒细胞浸润, 微血管和肺泡上皮细胞受损, 血管壁通透性增高, 肺水肿及肺出血为主要病理特征的一种失控性炎症反应, 细胞因子作为信号分子在启动、放大和维持局部和全身炎症反应中起关键作用^[10-12]。LPS 损害是导致 ALI 发病的最常见形式之一, 其可促进炎症细胞的活化和

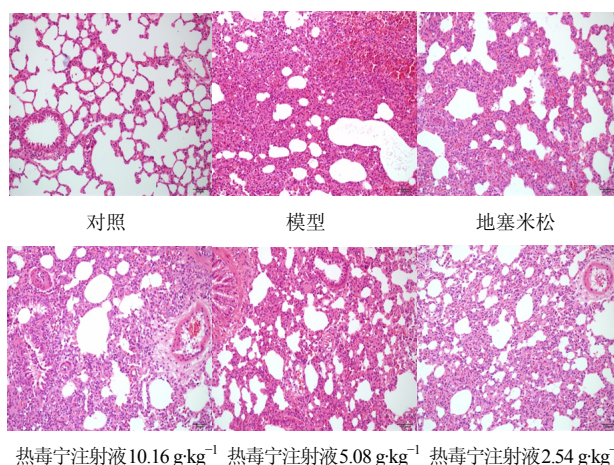


图1 热毒宁注射液对 ALI 大鼠肺损伤的影响 (HE 染色)
Fig. 1 Effect of Reduning Injection on injury of lung tissue in ALI rats (HE staining)

聚集以及其他炎性介质的生成和释放, 从而引起瀑布式炎症反应, 导致血管内皮受损、血管反应性调节机制紊乱、弥漫性肺组织损伤^[13]。LPS 通过激活多条信号转导通路最终将胞外信号转变为核内信号, 其中, NF-κB 是被其强烈激活的一类核内信号, 它的活化可诱发大量炎症相关因子的表达, 因而在 ALI 发病过程中发挥着重要作用^[14-16]。研究发现, NF-κB 调节的靶基因蛋白包括细胞因子 (如 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6)、趋化因子 (如 IL-8、巨噬细胞趋化蛋白-1、巨噬细胞炎性蛋白-1A)、黏附因子 (如 ICAM-1、VCAM-1) 等^[17]。

细胞因子有促炎细胞因子和抗炎细胞因子, 前者主要包括 IL-6、IL-8、TNF-α、IL-2、IL-1β 等, 后者主要有 IL-11、IL-4、IL-13、IL-10、IL-1 受体拮抗剂等, 这两者之间平衡是维持机体的正常免疫功能和抵抗疾病的关键因素, 内毒素可促进 TNF-α、IL-6 等的合成和释放^[18]。促炎症细胞因子 TNF-α、

IL-1 β 也是NF- κ B诱导基因的产物,也能作为激动剂进一步使其活性增强,此正反馈调节机制易使炎症反应扩大和持续^[17]。IL-1 β 在ALI发病中能诱导巨噬细胞产生多种趋化因子如IL-8、MCP-1、ENA-78,诱导单核/巨噬细胞和中性粒细胞趋化浸润炎症局部,激活肺毛细血管内皮细胞表达细胞黏附因子(ICAMs)等^[19]。TNF- α 对肺有强烈的毒性,它能诱导肺内皮细胞活化、白细胞迁移、粒细胞脱颗粒和毛细血管渗漏,积聚的水肿液进一步阻碍肺泡细胞的灌流和氧气的交换,造成ALI^[20]。IL-10是一个以免疫抑制为主的多向免疫调节因子,其主要生物活性表现为直接抑制炎症细胞活化,进而抑制细胞因子的产生,IL-10抑制单核巨噬细胞表达IL-1、IL-6、IL-8、IL-12、GM-CSF、TNF等^[21]。内毒素感染肺部引发全身性的细胞因子风暴,引起肺部炎症反应失控,最终可导致急性呼吸窘迫综合征是ALI最严重的后果。

热毒宁注射液是由青蒿、金银花、栀子组成的现代中药制剂,具有清热、解毒、疏风功效。临床上主要用于治疗上呼吸道感染、急性支气管炎,对社区获得性肺炎也显示较好疗效^[22]。研究表明热毒宁注射液对兔ALI模型具有良好治疗作用,可改善ALI兔的肺表面活性物质的量,抑制ALI的发生与发展^[23]。综上所述,本研究结果表明热毒宁注射液可有效减轻LPS诱导的大鼠ALI,可能通过抑制细胞因子风暴发挥其对LPS致ALI的保护效应。

参考文献

- [1] 刘倩,朱平. EB病毒相关淋巴细胞增殖病与细胞因子风暴[J]. 中国实验血液学杂志, 2013, 21(2): 498-502.
- [2] 张海祥,谢鑫,张科进,等. 细胞因子风暴在流行性感病毒感冒感染中的作用及防治研究[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(5): 556-559.
- [3] 王开富,萧伟,王振中,等. 热毒宁注射液的解热抗炎作用及其机制[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(23): 1918-1922.
- [4] 孙兰,刘艾林,王振中,等. 热毒宁注射液及其组分对流感病毒神经氨酸酶的抑制作用研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(1): 27-31.
- [5] 陈国盛. 热毒宁注射液在慢性阻塞性肺疾病治疗中的应用[J]. 中国医院用药评价与分析, 2013, 13(5): 454-456.
- [6] 刘红菊,张建初,张劲农,等. 热毒宁注射液对兔急性肺损伤的防治作用[J]. 华中科技大学学报, 2008, 37(5): 610-613.
- [7] 曹泽或,常秀娟,赵忠鹏,等. 热毒宁注射液抗A16型柯萨奇病毒的研究[J]. 中草药, 2014, 45(10): 1450-1455.
- [8] Fu P K, Wu C L, Tsai T H, et al. Anti-inflammatory and anticoagulative effects of paeonol on LPS-induced acute lung injury in rats[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, doi: 10.1155/2012/837513.
- [9] 章卓,万敬员,罗福玲,等. 积雪草苷对脂多糖诱导小鼠急性肺损伤的影响[J]. 中草药, 2008, 39(8): 1196-1199.
- [10] 王乐,刘伟,廖琳玲,等. 地昔帕明对小鼠内毒素急性肺损伤的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(1): 63-66.
- [11] 关岚,涂家红,李天水,等. 白细胞介素在急性肺损伤大鼠中的作用[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志, 2008, 3(12): 728-733.
- [12] 胡晓兰,邱水凤,梅如焕,等. 红景天注射液对油酸诱导兔急性肺损伤的防治作用[J]. 中草药, 2008, 39(11): 1706-1709.
- [13] 黄希,邓立普. 急性肺损伤中信号通路及相关受体研究进展[J]. 医学综述, 2010, 16(20): 3054-3057.
- [14] Tasaka S, Ishizaka A, Yamada W, et al. Effect of CD14 blockade endotoxin-induced acute lung injury in mice[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2003, 29(2): 252-258.
- [15] Akashi S, Shimazu R, Ogata H, et al. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages[J]. *J Immunol*, 2000, 164(7): 3471-3475.
- [16] Hatada E N, Krappmann D, Scheidereit C. NF-kappaB and the innate immune response[J]. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12(1): 52-58.
- [17] 蒋叶,余书勤. 核转录因子- κ B信号通路在内毒素致急性肺损伤中的作用[J]. 中国急救医学, 2004, 24(12): 902-904.
- [18] 张洲. 细菌性血流感染流行病学研究与细胞因子IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 在细菌性血流感染中的诊断价值[D]. 合肥:安徽医科大学, 2013.
- [19] 倪云峰. 丁酸钠在急性肺损伤中保护作用与机制的研究[D]. 西安:第四军医大学, 2011.
- [20] 毛宝龄,钱桂生,陈正堂. 急性呼吸窘迫综合征[M]. 北京:人民卫生出版社, 2002.
- [21] 王祖耀,胡廷泽,韦富康,等. 白细胞介素-10对大鼠腹腔感染和早期脓毒症炎症抑制作用的实验研究[J]. 中华小儿外科杂志, 2000, 21(6): 364-366.
- [22] 王振中,鲍琳琳,孙兰,等. 热毒宁注射液抗甲型H1N1流感病毒作用机制研究[J]. 中草药, 2014, 45(1): 90-93.
- [23] 刘红菊,熊先智,张小菊,等. 热毒宁注射液对急性肺损伤模型兔肺表面活性物质的影响[J]. 医药导报, 2007, 26(12): 1409-1411.