

热毒宁注射液抗大鼠急性肺损伤治疗作用

常秀娟, 张帅, 陈健, 陈春苗, 刘冰洁, 周军, 王振中, 萧伟*

(江苏康缘药业股份有限公司 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:考察热毒宁注射液(RDN)对脂多糖(LPS)致大鼠急性肺损伤(ALI)的治疗作用及其机制研究。方法:SD大鼠60只,将大鼠随机分成6组,每组10只,即正常组、模型组、阳性药组(地塞米松 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)、热毒宁注射液高、中、低剂量($10.16, 5.08, 2.54\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组。除正常组外采用LPS按 $6\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 对SD大鼠气管内滴注制作急性肺损伤模型,观察受试药热毒宁注射液3个剂量组和阳性药地塞米松注射液(DEX)iv给药后对肺脏湿/干重(W/D)、支气管肺泡灌洗液(BALF)总蛋白含量和血清超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)活性,丙二醛(MDA)含量及肺组织匀浆白细胞介素- 1β (IL- 1β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-10(IL-10)含量的影响。结果:与正常组比较,模型组大鼠W/D升高、BALF总蛋白含量升高、MDA含量和MPO活性升高,SOD活性降低,IL- 1β ,TNF- α ,IL-10水平升高($P<0.01$),与模型组比较,热毒宁注射液不同剂量均降低大鼠W/D,降低BALF总蛋白含量、降低MDA含量和MPO活性,增强SOD活性,降低IL- 1β ,TNF- α ,IL-10水平($P<0.01, P<0.05$)。结论:RDN可改善肺组织病理变化,减轻LPS致ALI过程中体内的氧化应激反应,减少炎症因子可能是治疗急性肺损伤疾病的重要机制。

[关键词] 热毒宁注射液;急性肺损伤;脂多糖

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2014)22-0172-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220172

Effect of Reduning Injection on Acute Lung Injury of Rats

CHANG Xiu-juan, ZHANG Shuai, CHEN Jian, CHEN Chun-miao,

LIU Bing-jie, ZHOU Jun, WANG Zhen-zhong, XIAO Wei*

(Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd State Key Laboratory of New- tech
for Chinese Medicine Pharmaceutical Process, Lianyungang 222001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the mechanism and the rapeutic effect of Reduning injection (RDN) on acute lung injury (ALI) in rats. **Method:** Sixty rats were randomly divided into six groups, normal group, model group, positive control group (dexamethasone, $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), high-, medium-, low-dose RDN groups ($10.16, 5.08, 2.54\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$). The ALI rats was induced by ipopolysaccharide (LPS) except for rats in normal group. The effects of wet /dry weighto (W/D) ratio in lung, the total protein contents of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO) in serum and interleukin (IL) - 1β , tumor necrosis factor (TNF) - α , IL-10 in lung homogenate were observed. **Result:** The W/D ratio, BALF, the content of MDA, IL- 1β , TNF- α , IL-10 were decreased, the activity of MPO was inhibited and the activity of SOD was activated in model group. The above indexes were all improved in all dosage of RDN groups ($P<0.01, P<0.05$). **Conclusion:** RDN can improve the pathological changes of lung tissueand reduce the oxidative stress reaction of ALI process. Its mechanism may be achieved by reducing the inflammatory factor *in vivo*.

[Key words] Reduning injection; acute lung injury; ipopolysaccharide

[收稿日期] 20140619(006)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2013ZX09402203)

[第一作者] 常秀娟, 硕士, 中级工程师, 从事药理毒理学研究, Tel: 0518-81152299, E-mail: cxj045@163.com

[通讯作者] * 萧伟, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药的研究与开发研究, Tel:0518-81152337, E-mail: wzghz-nj@163.net

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是以进行性呼吸困难和顽固性低氧血症为主要特征的临床危重症,可进而发展为急性呼吸道窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS),死亡率高达30%~40%^[1-3]。细菌脂多糖(LPS)是急性肺损伤主要致病物质^[4]。LPS可以诱导炎性细胞如单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞,以及致伤内皮细胞产生大量炎性因子和自由基如超氧化物歧化酶(SOD)、髓过氧化物酶(MPO)、丙二醛(MDA)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)及肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等,而这些因子的诱生、相互影响和炎症效应与细胞内信号转导通路密切相关^[3-5],可以造成肺泡毛细血管膜损伤导致多形核中性粒细胞的附着、激活与积压,同时影响气体交换并最终导致呼吸衰竭^[6-7]。ALI的发病机制复杂,迄今尚无有效的防治药物。热毒宁注射液是由栀子、青蒿、金银花等制成的中药复方制剂,具有清热、疏风、解毒的功效,临床用于上呼吸道感染(外感风热证)所致的高热、微恶风寒、头身痛、咳嗽、痰黄等症及急性肺损伤的治疗,具有很好的临床疗效^[8-10]。本实验采用LPS复制大鼠急性肺损伤模型,综合考察热毒宁注射液对ALI的保护作用及其可能的作用机制,为临床防治ALI提供参考。

1 材料

1.1 动物 SD大鼠100只,雄性,体重180~200 g,SPF级,上海西普尔-必凯实验动物有限公司,合格证号SCXK(沪)2008-0016。

1.2 药物与试剂 热毒宁注射液(RDN)(江苏康缘药业股份有限公司,批号140103),醋酸地塞米松注射液(DEX,吉林精优长白山药业有限公司,批号140125),LPS(美国Sigma公司,批号L2660),蛋白测定对照品、蛋白检测试剂盒(美国Bio-Rad公司,批号分别为500-0007,171-304070),MPO, SOD, MDA试剂盒(北京华英生物技术研究,批号20140401)。

1.3 仪器 7160型全自动生化仪(日本日立公司),Floxtstation 3钙流工作站(美国Molecular Devices公司),Bio-plex200型悬浮芯片系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 分组 大鼠60只随机分成6组,每组10只,即正常组、模型组、阳性组(地塞米松2 mg·kg⁻¹)、热毒宁注射液高、中、低(10.16, 5.08, 2.54 g·kg⁻¹)3个剂量组。实验前动物禁食12 h,自由饮水。

2.2 造模 依据文献^[11-12],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 g·L⁻¹。10%水合氯醛0.35 g·kg⁻¹ ip麻醉大鼠,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⁻¹)复制LPS致大鼠ALI模型,正常组给予等体积生理盐水。造模30 min,15 h后各组大鼠iv给予相应药物治疗,共给药2次,注射LPS后16 h各组大鼠ip 10%水合氯醛0.35 g·kg⁻¹麻醉大鼠取材。

2.3 检测指标

2.3.1 细胞因子测定 大鼠水合氯醛麻醉,腹主动脉取血后离心分离血清,保存于-80℃冰箱待用。检测MDA, SOD, MPO。

2.3.2 肺湿干比 各组动物处死后,迅速打开胸腔并结扎右侧主支气管,取出右肺上叶称重为湿重,置于60℃烘箱内72 h以上至质量不再变化后称重为干重,计算湿干重比(W/D)以反应肺水肿情况。

2.3.3 支气管肺泡灌洗液(BALF) 留取左侧肺组织进行支气管肺泡灌洗。经气管插管向左侧肺内注入生理盐水2 mL,反复抽吸3次后,回收灌洗液,回收率>90%。灌洗液在4℃, 1 200 r·min⁻¹离心10 min,留取上清保存于-80℃冰箱待用。采用Bradford法检测BALF中总蛋白浓度。

2.3.4 肺组织细胞因子测定 各组动物处死后,迅速打开胸腔并结扎右侧主支气管,取出右肺中叶放入液氮中待处理。肺组织称重,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⁻¹),取上清液-70℃冻存,按试剂盒说明方法检测。

2.4 统计学分析 采用SPSS 17.0统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,量反应资料采用One-Way ANOVA检验法, $P < 0.05$ 为统计学有差异。

3 结果

3.1 对肺W/D、肺脏指数和BALF中总蛋白浓度的影响 与正常组相比,模型组的W/D比值显著上升($P < 0.01$)。与模型组相比,RDN高、中、低剂量组及DEX组能显著降低肺W/D($P < 0.01$)。模型组BALF中蛋白含量明显高于正常组($P < 0.01$);与模型组相比,RDN高、中、低剂量组及DEX组BALF中蛋白含量明显降低($P < 0.01$)。结果见表1。

3.2 对肺SOD,MDA,MPO的影响 模型组与正常组相比,血清MDA含量和MPO活性明显上升,SOD活性明显下降($P < 0.01$)。RDN高、中、低剂量组和DEX可明显降低MDA含量和MPO活性,增强SOD

表 1 热毒宁注射液对 LPS 致急性肺损伤大鼠的 W/D 和 BALF 中总蛋白含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BALF 总蛋白 /g·L ⁻¹	W/D
正常	—	0.49 ± 0.01	4.23 ± 0.16
模型	—	0.87 ± 0.11 ²⁾	5.13 ± 0.46 ²⁾
DEX	2 × 10 ⁻³	0.69 ± 0.09 ⁴⁾	4.53 ± 0.13 ⁴⁾
RDN	10.16	0.68 ± 0.10 ⁴⁾	4.57 ± 0.10 ⁴⁾
	5.08	0.69 ± 0.08 ⁴⁾	4.61 ± 0.24 ⁴⁾
	2.54	0.72 ± 0.09 ⁴⁾	4.64 ± 0.22 ⁴⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 3 同)。

表 2 热毒宁注射液对 LPS 致急性肺损伤大鼠 SOD, MDA, MPO 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	SOD /U·mL ⁻¹	MDA /μmol·L ⁻¹	MPO /U·L ⁻¹
正常	—	93.92 ± 6.72	5.26 ± 0.79	16.03 ± 2.34
模型	—	76.43 ± 4.55 ²⁾	6.24 ± 0.55 ²⁾	22.98 ± 5.96 ²⁾
DEX	2 × 10 ⁻³	90.08 ± 8.19 ⁴⁾	5.53 ± 0.73 ³⁾	17.10 ± 2.07 ⁴⁾
RDN	10.16	93.74 ± 2.73 ⁴⁾	5.50 ± 0.67 ³⁾	17.20 ± 2.25 ³⁾
	5.08	85.34 ± 7.24 ⁴⁾	5.65 ± 0.52 ³⁾	17.24 ± 2.76 ³⁾
	2.54	84.88 ± 8.44 ³⁾	5.76 ± 0.41 ³⁾	19.28 ± 4.24

活性($P < 0.01, P < 0.05$)。结果见表 2。

3.3 对肺组织含量 IL-1β, TNF-α, IL-10 的影响模型组与正常组相比,血清 IL-1β, TNF-α, IL-10 含量明显上升($P < 0.01$)。RDN 和 DEX 明显降低 IL-1β, TNF-α, IL-10 含量($P < 0.01, P < 0.05$)。结果见表 3。

表 3 热毒宁注射液对 LPS 致急性肺损伤大鼠 IL-1β, TNF-α, IL-10 的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	IL-1β /ng·L ⁻¹	TNF-α /ng·L ⁻¹	IL-10 /ng·L ⁻¹
正常	—	16.26 ± 5.36	17.76 ± 2.51	30.77 ± 16.81
模型	—	69.43 ± 13.56 ²⁾	56.44 ± 15.25 ²⁾	70.43 ± 16.38 ²⁾
DEX	2 × 10 ⁻³	30.86 ± 14.97 ⁴⁾	36.15 ± 6.47 ⁴⁾	48.72 ± 9.55 ⁴⁾
RDN	10.16	28.43 ± 10.89 ⁴⁾	35.68 ± 13.49 ⁴⁾	45.18 ± 18.59 ⁴⁾
	5.08	30.18 ± 11.43 ⁴⁾	38.68 ± 17.89 ³⁾	49.83 ± 10.52 ⁴⁾
	2.54	37.31 ± 23.42 ⁴⁾	44.84 ± 18.38	51.53 ± 17.53 ³⁾

4 讨论

内毒素致 ALI 模型包括尾静脉给药,腹腔注射给药和雾化或气管滴入。本实验选择气管滴入,因此病变偏重于肺部接近临床,以肺局部炎症或组织损伤为主要特征,能够很好模拟 ALI 炎症指标和病

理生理过程^[12-13]。SOD 活性下降和 MDA 含量升高反映了体内氧化/抗氧化平衡的失调,氧化/抗氧化失衡可以进一步引起蛋白质及 DNA 损伤、改变信号传导通路,刺激转录因子活化,诱导细胞凋亡,引起肺组织的过度损伤^[14]。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^[15]。本研究结果显示,模型组与正常组相比血清 MDA 含量和 MPO 明显上升, SOD 活性明显下降。RDN 高、中、低剂量组能够降低 MDA 含量和 MPO 活性,增强 SOD 活性,提示 RDN 减少 ALI 时过氧化脂质的过度产生,恢复 SOD 活性水平,提高抗氧化能力,减少中性粒细胞对肺组织的浸润,改善肺损伤。

肺泡巨噬细胞是主要分泌 IL-1β 的细胞之一, IL-1β 能促进骨髓释放中性粒细胞,诱导单核细胞和多核粒细胞趋化浸润炎症局部,在局部释放溶酶体酶和其他炎症因子^[16]。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,造成急性肺损伤^[17]。IL-10 能抑制 LPS 诱导的组织因子(TF)活性,抑制促凝血原活性(procoagulant activity, PCA)的产生,避免 TF 触发外源性凝血系统,从而起到保护作用^[16]。本研究结果表明热毒宁注射液高、中、低剂量组可降低 IL-1β, TNF-α, IL-10 的含量,提示 RDN 可通过减少炎性细胞因子,下调 ALI 病程中出现的炎症反应,减轻肺损伤。

综上所述,本研究结果表明热毒宁注射液对 LPS 诱导的急性肺损伤具一定的治疗作用,其初步的作用机制可能与改善肺血管通透性,减轻肺水肿,提高抗氧化应激能力及下调炎症反应有关。这将为临床应用热毒宁注射液防治急性肺损伤及研发新型药物提供实验依据。

[参考文献]

[1] Crimi E, Sica V, Slutsky A S, et al. Role of oxidative stress in experimental sepsis and multisystem organ dysfunction [J]. Free Radic Res, 2006, 40(7): 665.

[2] 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.

[3] 邢丞,徐波,郭维,等.1-羟基-2,3,5-三甲氧基(口山)酮对脂多糖致小鼠急性肺损伤的保护作用[J].中草药,2007,37(9):1355.

[4] Kahdi F, Ed C, Karim T. Acute respiratory distress

- syndrome [J]. Am Fam Physicina, 2003, 67: 315.
- [5] Chen H, Wu S, Lu R, et al. Pulmonary permeability assessed by fluorescent-labeled dextran instilled intranasally into mice with LPS induced acute lung injury [J]. PLoS ONE,2014,9(7): e101925.
- [6] Xu M, Li Z C, Dong M Q, et al. The preventive and therapeutical effect of STS on ALI induced by LPS in mice[J]. Chin Pharmacol Bull,2008,24(4):477.
- [7] 万赛男,江晓间,卢肖宇,等. 胡黄连素硝酮对大鼠急性肺损伤的保护作用及机制研究[J]. 中国药理学通报, 2011,27(2):243.
- [8] 张慧杰,任晓亮,邱喜龙,等. 热毒宁注射液中栀子苷的降解动力学研究[J]. 中成药,2013,35(1):41.
- [9] 罗先才. 热毒宁注射液药理作用、临床应用及不良反应[J]. 中国药物警戒,2013,10(4):215.
- [10] 钱风华,钱义明,朱亮,等. 热毒宁注射液治疗急性肺损伤的临床疗效[J]. 中国基层医药, 2010, 17(10):1318.
- [11] 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 [EB/OL]. Evid Based Complement Alternat Med,2012[2014-10-25]. http://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/837513.
- [12] Matsuda H, Morikawa T, Ueda H,et al. Medicinal food stuffs, XXVII. saponin constituents of Gotu Kola: structures of new ursane- and oleanane-type triterpene oligoglycosides centellasaponins B, C, and D from Centella asiatica cultivated in Sri Lanka [J]. Chem Pharm Bull,2001, 49(10): 1368.
- [13] 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.
- [14] 金婧,董淑红,苏力,等. 新生大鼠内毒素性急性肺损伤肺组织MDA,SOD和IL-10,IL-18的改变[J]. 新生儿科杂志,2004,19(2):69.
- [15] 裴崇强,孙春燕,金鸣. 注射用红花黄色素缓解油酸诱导的大鼠急性肺损伤作用[J]. 中草药,2010,41(4):596.
- [16] 张德明,邓青南,李永旺,等. 大鼠肺泡巨噬细胞内毒素耐受性与炎症因子表达的变化[J]. 广东医学, 2005,26(3):313.
- [17] 李素君,韩兆忠,秦萍,等. 金振口服液对脂多糖诱导大鼠急性肺损伤的实验研究[J]. 世界科学技术——中医药现代化,2013,15(9):1959.

[责任编辑 周冰冰]

欢迎订阅《中国中医药图书情报杂志》

本刊为国家中医药管理局主管、中国中医科学院中医药信息研究所主办的科技学术期刊,为中国中西医结合学会信息专业委员会、中国中医药信息研究会中医药信息数字化专业委员会的会刊。

本刊全面报道中医药图书情报方面的最新研究进展、科研教学成果,以及新技术、新方法在中医药图书情报领域的应用,促进中医药信息学学科的学术交流及人才培养,为中医药图书情报研究人员提供学术交流的平台。本刊已被《中国核心期刊(遴选)数据库》《中国学术期刊网络出版总库》《中国中医药期刊文献数据库》收录。

《中国中医药图书情报杂志》为双月刊,16开,62页,每册定价20元,全年120元。国内邮发代号:2-633,各地邮局订阅;国外代号:BM299,中国国际图书贸易集团有限公司(北京399信箱)订阅。也可直接汇款至本刊编辑部订阅。

地址:北京市东直门内南小街16号 中国中医科学院中医药信息研究所《中国中医药图书情报杂志》编辑部,邮政编码:100700。

电话:010-64014411-3212

投稿网址:http://tsqb.cintcm.com

E-mail:tsqb@mail.cintcm.ac.cn