

泽泻总三萜对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用

黄小强^{1,2}, 朱怀昌¹, 许文¹, 吴水生¹, 黄涛², 贾安^{2*}

(1.福建中医药大学药学院,福建福州 350122;2.黄河科技学院医学院,河南郑州 450063)

摘要: 目的 探讨泽泻总三萜对脂多糖(LPS)诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用。方法 将60只小鼠随机分为正常组,模型组,地塞米松组,泽泻总三萜低、中、高剂量组,每组10只。低、中、高剂量组分别以25、50、100 mg/kg 泽泻总三萜灌胃,地塞米松组以0.5 mg/kg 地塞米松灌胃,正常组和模型组予等量常温生理盐水灌胃,每天1次,连续给药14 d。末次给药2 h后除正常组小鼠气管滴注生理盐水外,其他各组小鼠气管滴注5 mg/kg LPS。12 h后先眼球采血,再处死小鼠取肺组织。ELISA法检测各组小鼠血清中肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)和白介素-6(IL-6)含量以及肺组织中髓过氧化物酶(MPO)活性,计算肺组织湿重/干重比值(W/D),依据肺组织HE病理切片计算肺损伤评分。结果 与正常组比较,模型组W/D、TNF- α 含量、IL-1 β 含量、MPO活性均显著升高($P < 0.05$ 或 0.01);与模型组比较,地塞米松组、中剂量和高剂量组W/D、TNF- α 含量、IL-1 β 含量、MPO活性、肺损伤评分均显著降低($P < 0.05$ 或 0.01),低、中、高各剂量组IL-6含量均显著降低($P < 0.05$ 或 0.01)。结论 泽泻总三萜能够对LPS诱导的小鼠急性肺损伤有一定的保护作用,其机制可能与抑制体内炎性介质释放有关。

关键词: 急性肺损伤;脂多糖;泽泻总三萜;抗炎

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1000-338X(2020)06-0037-03

DOI:10.13260/j.cnki.jfjtc.012128

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种常见的临床综合症,其致伤因素主要分为间接因素和直接因素(包括机械因素、化学因素、生物因素)导致的急性进行性呼吸功能不全或呼吸衰竭症状,具有较高的发病率和病死率^[1-2],研究统计ALI致死率高达30%~50%^[3]。目前,临床上常用机械通气、激素和抗炎药物治疗,但存在着明显缺陷,如条件限制、难以推广、药物毒副作用明显、预后差等^[4],因此开发一种安全有效的防治ALI药物尤为迫切。

泽泻来源于泽泻科泽泻属植物泽泻[*Alisma orientale* (Sam.) Juzep.]的干燥块茎,其性寒,味甘,具有利湿、清热、化浊降脂等功效^[5-6],主产于福建、江西、四川等地,其中福建产泽泻最为优质,为福建著名道地药材。现代药理学研究表明:泽泻具有抗炎、利尿、降血糖、调节血脂等药理作用^[7-10]。研究发现泽泻主要化学成分是三萜类化合物^[11],课题组前期开展了泽泻总三萜部位的富集纯化工艺研究,得到总三萜含量达到50%以上的三萜部位,同时课题组通过体内和体外炎症模型证明了泽泻总三萜具有抗炎作用^[7],但对ALI的研究尚未见报道。本研究主要是探究泽泻总三萜对ALI的保护作用,为泽泻总三萜防治ALI的药物研发提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器 多功能酶标仪(奥地利Infinite公司);高速台式冷冻离心机(美国赛默飞世尔科技有限公司);FY135型中草药粉碎机(天津市泰斯特仪器有

限公司);DHP-9052电热恒温培养箱(上海一恒科技有限公司);BS-3000A系列电子天平(上海友声衡器有限公司);光学显微镜(日本OLYMPUS公司);RM2125型石蜡切片机(德国Leica公司)。

1.2 药品与试剂 泽泻饮片购自福建金山医药集团,经福建中医药大学药学院范世明高级实验师鉴定,为泽泻科植物泽泻*Alisma orientale* (Sam.)Juzep.,样品寄存在福建中医药大学药学院标本室。脂多糖(LPS,美国Sigma公司,货号:L2630,规格:10 mg/支);地塞米松片(广东南国药业有限公司,规格:0.75 mg/片);肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)ELISA检测试剂盒(上海西塘生物科技有限公司);髓过氧化物酶(MPO)活性检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)。

1.3 动物 60只SPF级KM小鼠,雌雄各半,体重18~20 g,购自上海史莱克实验动物中心,生产许可证号:SCXK(沪)2018-0006,饲养于福建中医药大学动物实验中心SPF级动物房,使用合格证号:SYXK(闽)2014-0005。饲养环境:温度21~23℃,相对湿度55%~75%,明暗各12 h,适应性饲养7 d后用于实验。

2 方法

2.1 药物制备

2.1.1 泽泻总三萜的制备 参考课题组前期研究泽泻总三萜的制备方法^[11]制备成浓度为2.5、5.0、10.0 mg/mL,即低、中、高3种浓度泽泻总三萜,备用。

2.1.2 地塞米松溶液的制备 将地塞米松片研成细粉末,溶于水中,制备成质量浓度0.000 5 g/mL的溶液,备用。

2.2 分组与给药 将60只小鼠适应性饲养1周后,随机分为正常组,模型组,地塞米松组,泽泻总

收稿日期:2020-08-15

基金项目:福建中医药大学校管课题(X2018008);福建省卫生健康委青年科研项目(2019-1-66)

作者简介:黄小强(1988—),男,主要从中药药效物质基础及其作用机制研究。

通信作者:贾安(1980—),男,副教授。

E-mail:Jiaan930008@sina.com

三砧低、中、高剂量组(简称低、中、高剂量组),每组 10 只。低、中、高剂量组分别以 25、50、100 mg/kg 泽泻总三砧灌胃,地塞米松组以 5 mg/kg 地塞米松进行灌胃,正常组和模型组予等量常温生理盐水灌胃,每天 1 次,连续给药 14 d。末次给药后 2 h,剔除小鼠颈部正中毛发,酒精消毒,正中切开颈部皮肤,深度约 2 cm,暴露并分离气管,采用样品进样器于气管内慢慢滴注 LPS 生理盐水溶液(0.5 mL/kg),正常组采用同样方法给予相应体积的生理盐水,滴注结束后消毒并缝合皮肤^[12]。禁食不禁水,造模 12 h 后,小鼠眼眶采血,随后处死小鼠,迅速取出小鼠的肺组织,备用。

2.3 小鼠肺组织湿/干重比值(W/D)测定 参考文献[13],取右肺上叶,除去结缔组织,用滤纸吸干表面水分和血液,称量得到肺组织湿重;随后将肺组织放置在 80 ℃恒温干燥箱中连续干燥 48 h 以上,称量肺组织干重并记录,计算(W/D):

$$W/D = \text{肺组织湿重} / \text{肺组织干重} \times 100\%$$

2.4 小鼠肺组织中 MPO 活性测定 取适量小鼠肺组织于组织匀浆器中,加生理盐水并在冰水浴中进行研磨,离心得上清液,按照 MPO 试剂盒说明书检测肺组织中 MPO 活性。

2.5 小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量测定

取血液样本,3 000 r/min 离心 10 min,取上清,按照试剂盒说明书步骤,采用 ELISA 法测定小鼠血清中 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 含量。

2.6 肺组织病理学检查 取右肺下叶固定于 10%

中性甲醛溶液中,24 h 后取出,使用蒸馏水冲洗至无味;然后对其进行常规的脱水、浸蜡、包埋、切片、苏木素-伊红染色、封片,在显微镜下对其进行病理学观察,并进行病理学评分。评分标准参考文献[14],包括肺泡壁厚度、肺组织破坏和炎症细胞浸润,每个指标按 5 分制评分:0 分为最小损伤,1 分为轻度损伤,2 分为中度损伤,3 分为重度损伤,4 分为最大损伤。肺损伤评分为 3 个指标评分之和。

2.7 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行数据处理。计量资料符合正态分布的以($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析检验。

3 结果

3.1 各组小鼠肺组织 W/D 比较 见表 1。

表 1 各组小鼠肺组织 W/D 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	W/D
正常组	10	3.76 ± 0.60
模型组	10	5.94 ± 0.50 ¹⁾
地塞米松组	10	4.05 ± 0.49 ³⁾
低剂量组	10	5.78 ± 0.37
中剂量组	10	5.26 ± 0.59 ²⁾
高剂量组	10	4.10 ± 0.62 ³⁾

注:与正常组比较,1) $P < 0.01$;与模型组比较,

2) $P < 0.05$,3) $P < 0.01$ 。

3.2 各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量和肺组织中 MPO 活性比较 见表 2。

表 2 各组小鼠血清中 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 含量和肺组织中 MPO 活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TNF- α /(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)	MPO/(U/g)
正常组	10	241.28 ± 57.47	59.33 ± 18.06	77.43 ± 12.16	2.42 ± 0.59
模型组	10	682.32 ± 113.89 ¹⁾	212.45 ± 45.20 ¹⁾	316.45 ± 39.05 ¹⁾	5.72 ± 0.70 ¹⁾
地塞米松组	10	426.68 ± 89.90 ³⁾	103.98 ± 20.55 ³⁾	183.97 ± 31.64 ³⁾	4.51 ± 0.69 ³⁾
低剂量组	10	636.11 ± 109.70	177.94 ± 24.90 ²⁾	287.94 ± 25.63	5.41 ± 0.68
中剂量组	10	558.40 ± 100.24 ²⁾	163.23 ± 38.51 ²⁾	273.23 ± 36.79 ²⁾	5.07 ± 0.54 ²⁾
高剂量组	10	531.05 ± 81.17 ³⁾	150.77 ± 32.11 ³⁾	260.77 ± 24.33 ³⁾	4.83 ± 0.52 ³⁾

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

3.3 各组小鼠肺组织病理形态学和肺损伤评分比较 见图 1、图 2。

4 讨论

ALI 是临床常见的一种严重疾病,其发病机制复杂,发生迅速,死亡率高^[15]。革兰阴性菌感染导致肺炎时是 ALI 最常见的诱导因素,LPS 是革兰氏阴性菌外膜的一种成分,同时也是主要致病物质^[16]。LPS 刺激能够活化巨噬细胞,诱导机体释放大量的 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 等炎症因子,进而引发急性炎症^[17]。虽然目前关于 ALI 的致病机制尚不清楚,但是大量研究报道认为,肺组织的炎症反应失衡是导致 ALI 发生的根本原因^[18]。地塞米松属于糖皮质激素,具有强大的抗炎、抗过敏作用,可较好地减轻由 ALI 所致的肺损伤^[19],因此本研究以地塞米松为阳

性对照。本研究结果显示泽泻总三砧能够显著性降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎症因子,提示泽泻总三砧保护 LPS 诱导的急性肺损伤与抑制炎症因子分泌有关。

肺组织的 W/D 可反映肺水肿程度^[20]。本研究结果显示泽泻总三砧能够显著降低 W/D,减轻 LPS 所诱导的 ALI。此外,本研究结果显示模型组小鼠肺组织损伤严重,可见弥漫性肺水肿,肺泡壁和肺泡间隔明显增宽,大量炎症细胞浸润,而给予泽泻总三砧后上述病理变化明显减轻。

总之,泽泻总三砧能够降低 W/D 和 MPO 活性,同时也能够降低血清中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎症因子含量,提示泽泻总三砧对 LPS 所致的急性肺损伤具有一定的保护作用,其作用机制与泽泻总三砧抑制细胞炎症因子分泌有关。

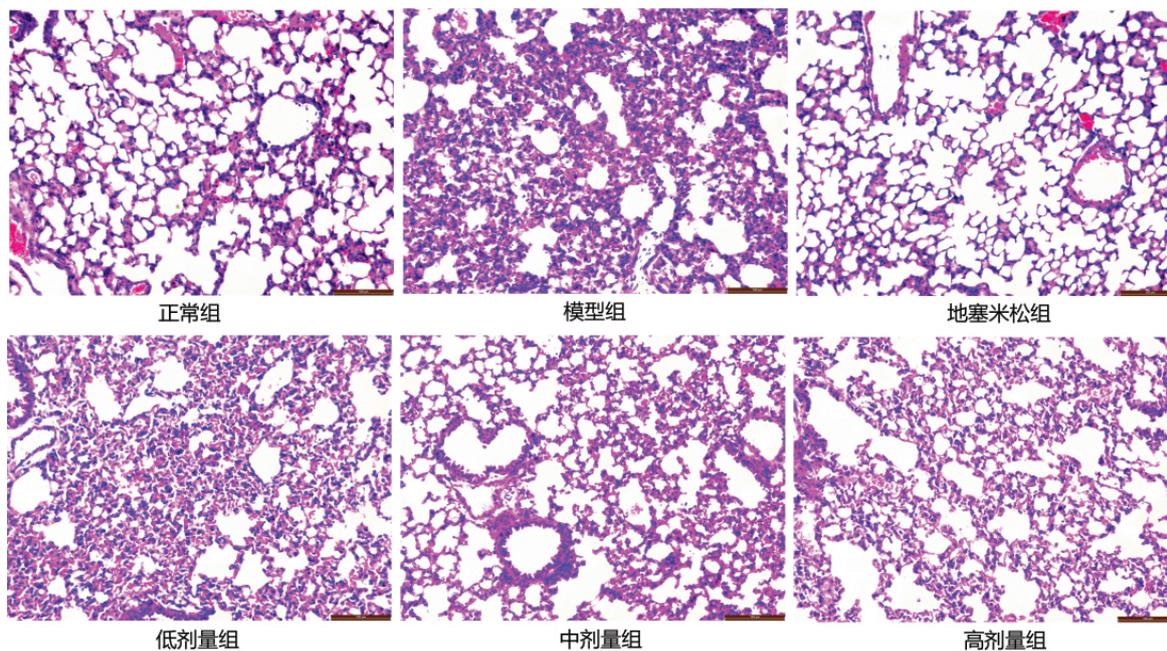
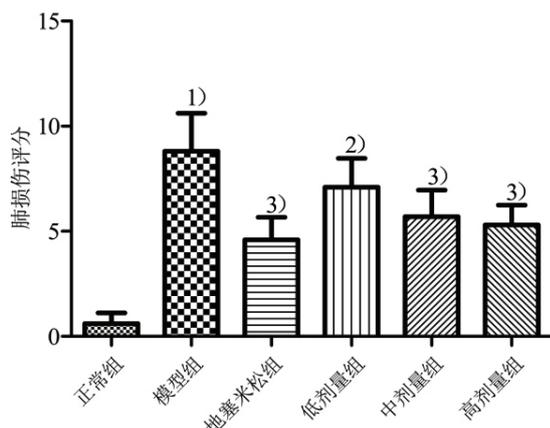


图 1 各组大鼠肺组织病理形态学光镜图 (×200)



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

图 2 各组大鼠肺损伤评分柱状图

参考文献

[1] 钟正灵,江玉华,杨沿浪,等.阿魏酸对脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤的保护作用[J].安徽工程大学学报,2019,34(4):8-12.

[2] NATALIA DE SOUZA XAVIER COSTA,GABRIEL RIBEIRO JUNIOR,ADAIR APARECIDA DOS SANTOS ALEMANY,et al. Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model [J]. Plos One,2017,12(9):1-16.

[3] 苏景深,刘恩顺,赵鑫民.急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征中医药治疗研究进展[J].吉林中医药,2019,39(5):696-700.

[4] XIAO-GUANG LU,XIN KANG,LI-BIN ZHAN,et al. Circulating miRNAs as biomarkers for severe acute pancreatitis associated with acute lung injury [J]. World J Gastroenterol,2017,23(41):7440-7449.

[5] 刘燕恒.泽泻药理作用的研究进展[J].山东畜牧兽医,2015,36(12):63-64.

[6] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:229.

[7] 林娜,黄锦芳,张雪,等.泽泻总三萜的抗炎活性研究[J].福

建中医药,2018,49(4):68-69,71.

[8] 黄小强,张雪,李小艳,等.泽泻不同提取部位对大鼠的利尿作用[J].福建中医药,2016,47(5):21-23.

[9] 许文,罗奋熔,赵万里,等.泽泻降糖活性提取物化学成分研究[J].中草药,2014,45(22):3238-3245.

[10] 刘珊珊,郭杰,李宗艾,等.泽泻化学成分及药理作用研究进展[J].中国中药杂志,2020,45(7):1578-1595.

[11] 罗奋熔,丘建芳,许文,等.泽泻总三萜提取纯化工艺的实验室试验及中试验证[J].中国医药工业杂志,2014,45(8):729-733.

[12] JIANG KANGFENG,ZHANG TAO,YIN NANNAN,et al. Geraniol alleviates LPS-induced acute lung injury in mice via inhibiting inflammation and apoptosis [J]. Oncotarget,2017,8(41):71038-71053.

[13] 王林,李红波,刘南,等.和厚朴酚对脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠的保护作用[J].中药新药与临床药理,2016,27(6):810-815.

[14] LIU TIAN,ZHOU YONG,LI PING,et al. Blocking triggering receptor expressed on myeloid cells-1 attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury via inhibiting NLRP3 inflammatory activation [J]. Sci Rep,2016,6(1):39473.

[15] TONG CHEN,QIANQIAN GUO,HUIMIN WANG,et al. Effects of esculentin on lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury via regulation of RhoA/Rho Kinase/NF- κ B pathways in vivo and in vitro [J]. Free Radic Res,2015,49(12):1459-1468.

[16] 桑文涛,王凤,徐锋,等.荆防散正丁醇部位对LPS所致急性肺损伤小鼠的保护作用[J].中华中医药学刊,2017,35(1):2861-2864.

[17] 郭苏兰,李佳娜,肖水秀.阿里红多糖对用脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠肺组织的保护作用及相关机制[J].当代医药论丛,2019,17(10):127-130.

[18] 洪辉华,蔡宛如.急性肺损伤的发病机制及中医药治疗的实验研究进展[J].浙江中医药大学学报,2007,31(1):133-135.

[19] 李敏,张程,张湘燕.地塞米松对脂多糖致大鼠急性肺损伤的治疗作用[J].重庆医科大学学报,2009,34(10):1371-1373.

[20] 粟青,李文浩,朱爱萍,等.白藜芦醇减轻脂多糖诱导的小鼠急性肺损伤[J].基础医学与临床,2019,39(8):1125-1130.