

从调控 miR-17-5p 表达探讨血必净注射液对大鼠体外循环急性肺损伤的防治作用及机制

徐朝军¹ 刘丹薇¹ 李开瑞² 李小娜² 宋岚²

¹湖南中医药大学第一附属医院心胸外科,湖南长沙 410007; ²湖南中医药大学,湖南长沙 410208

通信作者:宋岚, Email: songlan311492@163.com

【摘要】 **目的** 探讨血必净注射液对体外循环(CPB)致急性肺损伤(ALI)的防治作用及机制。**方法** ①体内实验:将30只成年雄性SD大鼠按随机数字表法分为假手术组(Sham组)、CPB组、血必净预处理组(XBJ+CPB组),每组10只。建立大鼠CPB模型;Sham组仅经动静脉穿刺,不进行CPB。XBJ+CPB组在CPB前2h腹腔注射4 mL/kg 血必净注射液;Sham组和CPB组给予等量生理盐水。术后4h取股动脉血进行血气分析,计算氧合指数($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)。然后处死大鼠收集支气管肺泡灌洗液(BALF),计算肺通透性指数(PPI);取肺组织检测湿/干重比值(W/D),测定肺泡损伤数定量评价指标(IQA),采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测肺组织及BALF中白细胞介素(IL-1、IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,采用生化法检测肺组织丙二醛(MDA)含量及髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)活性,采用定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)检测肺组织微小RNA-17-5p(miR-17-5p)表达。②体外实验:体外培养大鼠II型肺泡上皮细胞(AEC II),随机分为对照组(室间隔缺损患者CPB术前血清培养)、CPB组(患者CPB术后血清培养)和XBJ+CPB组(血必净注射液10 g/L+患者CPB术后血清培养);各组培养12h后,采用RT-qPCR法检测细胞miR-17-5p表达。分别采用miR-17-5p模拟物(mimic)、抑制物(inhibitor)或相应的对照寡核苷酸(阴性对照)转染AEC II细胞,观察miR-17-5p对血必净调节CPB诱导的细胞凋亡率和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶3(caspase-3)活性的影响。**结果** ①体内实验:与Sham组比较,CPB组大鼠PPI、肺W/D比值、IQA,肺组织和BALF中IL-1、IL-6、TNF- α ,以及肺组织MDA含量和MPO活性均明显升高, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 及肺组织SOD活性均明显降低;XBJ+CPB组大鼠各项指标均明显改善,说明血必净预处理可改善CPB诱导的大鼠ALI。CPB组肺组织miR-17-5p表达较Sham组显著下调($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: 0.48 ± 0.13 比 1.00 ± 0.11 , $P < 0.05$);而XBJ+CPB组miR-17-5p表达较CPB组明显上调($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$: 1.37 ± 0.09 比 0.48 ± 0.13 , $P < 0.05$),说明血必净注射液对CPB后肺损伤的改善作用可能与miR-17-5p有关。②体外实验:各组AEC II细胞miR-17-5p表达变化证实了体内实验结果;进一步分析显示,转染miR-17-5p mimic后,各组细胞凋亡率及caspase-3活性均较转染阴性对照的细胞显著降低,以XBJ+CPB组降低更为显著[凋亡率:(7.37 ± 0.95)%比(12.60 ± 1.90)%,caspase-3(A值): 0.82 ± 0.09 比 1.37 ± 0.08 ,均 $P < 0.05$];而转染miR-17-5p inhibitor后,各组细胞凋亡率及caspase-3活性则均较转染阴性对照的细胞显著升高[XBJ+CPB组凋亡率:(16.30 ± 1.86)%比(12.60 ± 1.90)%,caspase-3(A值): 1.78 ± 0.13 比 1.37 ± 0.08 ,均 $P < 0.05$]。说明miR-17-5p可以显著减少大鼠CPB术后血清培养的AEC II细胞凋亡,也可以进一步减少血必净预处理后的AEC II细胞凋亡。**结论** 血必净注射液可减轻CPB致ALI大鼠肺组织炎症反应和氧化应激反应,改善氧合,其机制可能与上调AEC II细胞miR-17-5p表达、抑制AEC II细胞凋亡有关。

【关键词】 体外循环; 急性肺损伤; 血必净注射液; 微小RNA-17-5p; 凋亡

基金项目:湖南省中医药科研计划项目(201696);中医内科学省部共建教育部重点实验室开放基金(ZYNK201506);湖南中医药大学中医学国内一流建设学科项目(2018-469)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.07.014

To explore the preventive and therapeutic effects of Xuebijing injection on acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass in rats by regulating the expression of microRNA-17-5p and its mechanism

Xu Zhaojun¹, Liu Danwei¹, Li Kairui², Li Xiaona², Song Lan²

¹Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, Hunan, China; ²Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, Hunan, China

Corresponding author: Song Lan, Email: songlan311492@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the preventive effect of Xuebijing injection on acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass (CPB) and the underlying mechanism. **Methods** ① *In vivo* experiment: 30 Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into sham group, CPB group, Xuebijing pretreatment group (XBJ+CPB group) with 10 rats in each group. CPB model was reproduced in rats; and CPB was not performed in sham group, but only through arteriovenous puncture. In the XBJ+CPB group, 4 mL/kg Xuebijing injection was injected intraperitoneally 2 hours before CPB, sham group and CPB group were injected with equal volume of normal saline at the same time. The blood from femoral artery was analyzed 4 hours after operation, and the oxygenation index ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) was calculated. Then

the rats were sacrificed to collect bronchoalveolar lavage fluid (BALF), and the lung permeability index (PPI) was calculated. The lung tissues were harvested, and the wet/dry weight ratio (W/D) of lung tissue was measured. The index of quantitative evaluation of alveolar injury (IQA) was measured. The levels of interleukins (IL-1, IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in lung tissue and BALF were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The content of malondialdehyde (MDA) and the activities of myeloperoxidase (MPO) and superoxide dismutase (SOD) in lung tissue were detected by biochemical method. The microRNA-17-5p (miR-17-5p) expression in lung tissue was determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR). ② *In vitro* experiments: type II alveolar epithelial cells (AEC II) were cultured *in vitro*, and they were randomly divided into control group (the cells were treated by preoperative serum of CPB in patients with ventricular septal defect), CPB group (the cells were treated by serum after CPB in patients), and XBJ+CPB group (Xuebijing injection 10 g/L+serum after CPB in patients). After 12 hours of culture in each group, the expression of miR-17-5p was detected by RT-qPCR. AEC II cells were transfected with miR-17-5p mimic, inhibitor or corresponding control oligonucleotide (negative control), respectively, to observe the effect of miR-17-5p on Xuebijing regulating CPB-induced apoptosis rate and caspase-3 activity. **Results** ① *In vivo* experiment: compared with the sham group, the PPI, lung W/D ratio, IQA, and IL-1, IL-6, TNF- α in lung tissue and BALF, as well as MDA content and MPO activity in lung tissue were significantly increased, PaO₂/FiO₂ and SOD activity in lung tissue were significantly decreased. The parameters of the XBJ+CPB group were significantly improved, suggesting that Xuebijing pretreatment could improve CPB-induced ALI in rats. The expression of miR-17-5p in lung tissue of the CPB group was significantly down-regulated as compared with sham group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 0.48 ± 0.13 vs. 1.00 ± 0.11 , $P < 0.05$); while the expression of miR-17-5p in the XBJ group was significantly up-regulated as compared with the CPB group ($2^{-\Delta\Delta Ct}$: 1.37 ± 0.09 vs. 0.48 ± 0.13 , $P < 0.05$), indicating that the improvement of Xuebijing injection on lung injury after CPB might be related to miR-17-5p. ② *In vitro* experiment: the changes in miR-17-5p expression in each group of AEC II cells confirmed *in vivo* results. After transfection of miR-17-5p mimic, the apoptotic rate and caspase-3 activity of each group were significantly lower than those transfected with negative control, and the decrease was more significant in the XBJ+CPB group [apoptotic rate: (7.37 ± 0.95)% vs. (12.60 ± 1.90)%, caspase-3 (A value): 0.82 ± 0.09 vs. 1.37 ± 0.08 , both $P < 0.05$]. After transfection of miR-17-5p inhibitor, the apoptotic rate and caspase-3 activity of each group were significantly more than those transfected with negative control [in the XBJ+CPB group: apoptotic rate was (16.30 ± 1.86)% vs. (12.60 ± 1.90)%, caspase-3 (A value) was 1.78 ± 0.13 vs. 1.37 ± 0.08 , both $P < 0.05$]. This indicated that the apoptosis of AEC II cells cultured in serum after CPB was significantly reduced by miR-17-5p, and further reduced by the pretreatment with Xuebijing. **Conclusions** Xuebijing injection can reduce the inflammatory reaction and oxidative stress of lung tissue in rats with ALI induced by CPB, and improve oxygenation. The mechanism may be related to up-regulation of miR-17-5p expression in AEC II cells and inhibition of apoptosis of AEC II cells.

【Key words】 Cardiopulmonary bypass; Acute lung injury; Xuebijing injection; MicroRNA-17-5p; Apoptosis

Fund program: Research Foundation of Traditional Chinese Medicine of Hunan Province of China (201696); Ministry of Internal Medicine of Traditional Chinese Medicine Co-established the Key Laboratory Open Fund of the Ministry of Education (ZYNK201506); Domestic First-class Discipline Construction Project of Chinese Medicine of Hunan University of Chinese Medicine (2018-469)

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2019.07.014

体外循环(CPB)后急性肺损伤(ALI)是心脏手术后的主要肺部并发症,也是术后死亡的主要原因之一^[1]。Li等^[2]研究表明,CPB诱导的ALI幼猪模型中肺组织微小RNA-21(miR-21)的表达显著上升,而miR-127、miR-145和miR-204的表达显著下降;本课题组前期研究也表明,ALI小鼠miR-17^[3]、miR-34a^[4]表达发生了显著变化。可见,微小RNA(miRNAs)可能在CPB肺损伤中发挥了重要作用。

近年来研究表明,中药及其活性成分对miRNAs具有广泛调节作用,可能是中药发挥疗效的新机制之一。有文献报道,血必净注射液有效成分之一丹参酮可以在支气管上皮细胞中调节miR-27a的表达^[5],在心肌缺血/再灌注(I/R)时调节miR-29b和miR-1表达^[6]。我们推测,血必净注射液可能通过调节相关miRNAs表达发挥防治CPB肺损伤的作用。本研究根据课题组前期生物信息学分析及

预实验结果进一步探讨血必净注射液是否通过调节miR-17-5p表达,进一步调节II型肺泡上皮细胞(AEC II)凋亡,从而在CPB肺损伤中发挥防治作用。

1 材料与方法

1.1 体内实验

1.1.1 实验动物及分组: 30只清洁级成年雄性SD大鼠,20~22周龄,体重450~500g,由湖南中医药大学实验动物中心提供〔动物合格证号:SCXK(湘)2014-0011〕,本实验方案经湖南中医药大学动物实验伦理委员会审核批准(审批号:ZYFY20171017)。30只大鼠按随机数字表法分为假手术组(Sham组)、CPB组、血必净预处理组(XBJ+CPB组),每组10只。

1.1.2 动物模型制备及处理: 腹腔注射2%戊巴比妥50mg/kg麻醉大鼠,常规气管切开后行气管内插管,接动物呼吸机行机械通气。监测直肠温度并予以变温毯调节体温,经股动脉穿刺置管进行有创血压

监测,四肢连接多功能监护仪进行心电监测。参照文献[7]方法建立大鼠 CPB 模型并进行 CPB 管理; Sham 组仅给予动静脉穿刺置管,其他处理同 CPB 组。XBJ+CPB 组于 CPB 前 2 h 腹腔注射血必净注射液 4 mL/kg(天津红日药业股份有限公司,国药准字 Z20040033); Sham 组及 CPB 组给予等量生理盐水。

1.1.3 检测指标及方法

1.1.3.1 动脉血气分析: 术后 4 h 抽取股动脉血进行血气分析,计算氧合指数($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)。

1.1.3.2 肺通透性指数(PPI): 股动脉取血后放血处死大鼠,经气管插管注入 Hank 液冲洗右肺,采集支气管肺泡灌洗液(BALF),离心后收集 BALF 沉渣,采用考马斯亮蓝染色法测定 BALF 及血清蛋白含量,计算 PPI(BALF 蛋白含量与血清蛋白含量的比值)。

1.1.3.3 肺湿/干重比值(W/D): 取左肺下叶,用生理盐水反复清洗后称湿重,然后在 55 °C 下真空干燥至恒重称干重,计算 W/D 比值。

1.1.3.4 肺泡损伤数定量评价指标(IQA): 取左肺上叶,经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木素-伊红(HE)染色,参照文献[7]方法测定 IQA。

1.1.3.5 炎症因子及氧化应激指标: 取 -80 °C 冻存的肺组织 100 mg 制备组织匀浆,并取适量 BALF,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测白细胞介素(IL-1、IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、丙二醛(MDA)含量及髓过氧化物酶(MPO)、超氧化物歧化酶(SOD)活性,操作步骤按照试剂盒说明书进行。

1.1.3.6 miR-17-5p 表达: 取右肺下叶制备组织匀浆,加适量 TRIzol 提取总 RNA,用紫外分光光度法检测 RNA 浓度及纯度,反转录 miRNA 生成 cDNA,进行定量反转录-聚合酶链反应(RT-qPCR)。以 U6 作为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 miR-17-5p 的表达量。

1.2 体外实验

1.2.1 细胞培养及分组: RLE-6TN 大鼠 AEC II 细胞株购自美国 ATCC 细胞库,采用 DMED 高糖培养基常规培养传至第 3 代,随机分为 3 组:对照组用按 1:10 比例配置的 CPB 术前血清和 DMED 高糖培养基培养 12 h; CPB 术后血清培养组(CPB 组)用按 1:10 比例配置的 CPB 术后血清和 DMED 高糖培养基培养 12 h; 血必净预处理组(XBJ+CPB 组)用血必净注射液(10 g/L)培养 12 h 后,加入按 1:10 比例配置的 CPB 术后血清和 DMED 高糖培养基继续培养 12 h。血清及血必净注射液加入浓度及作用时间根据预实验结果和文献[8]确定。

1.2.2 CPB 术后血清分离: 选择 10 例室间隔缺损患者,年龄(2.2 ± 0.8)岁,于麻醉诱导成功后 5 min(术前)和转流停止(术后)无菌采血,分离血清,灭活补体活性, -70 °C 保存备用。符合医学伦理学标准,经湖南中医药大学第一附属医院医学伦理委员会审批(审批号:HN-LL-LW-2013-002-01),并获得患者家属知情同意。

1.2.3 细胞转染: 采用 Lipofectamine™ 2000 转染 miR-17-5p 模拟物(mimic)或抑制物(inhibitor),并将相应的对照寡核苷酸(阴性对照)序列转染至 AEC II 细胞。用 0.25 mL 不含血清及抗菌药物的 RPMI 1640 培养基溶解 20 μg 重组质粒或合成的寡核苷酸、小干扰 RNA(siRNA),与 0.25 mL 含脂质体的无血清培养基混匀,室温放置 20 min。无血清 RPMI 1640 培养基洗涤 3 次,加无血清 DMEM 培养基,然后加入重组质粒或 siRNA 与脂质体混合物,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 6 h,加入含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,24 h 后收集细胞,检测细胞凋亡及天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3(caspase-3)活性。

1.2.4 检测指标及方法

1.2.4.1 miR-17-5p 表达: 将 TRIzol 加入培养细胞,提取总 RNA,检测 RNA 浓度及纯度,进行 RT-qPCR,具体检测方法同体内实验。

1.2.4.2 细胞凋亡: 调整细胞密度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 。取 100 μL 细胞悬液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,加入 100 μL 结合缓冲液和 5 μL 膜联蛋白 V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC),室温避光孵育 20 min,再加入 5 μL 碘化丙啶(PI),避光反应 5 min,加入 400 μL 结合缓冲液悬浮细胞,应用流式细胞仪分析。采用 Annexin-V 和 PI 双标法,Annexin-V⁺/PI⁻ 为凋亡细胞,计数凋亡细胞所占百分比作为凋亡率。

1.2.4.3 caspase-3 活性: 取 3×10^6 个细胞,用 PBS 洗涤后加入 50 μL 裂解液,重悬细胞,冰浴下再裂解 30 min; 4 °C 离心 10~15 min,取上清转移至预冷的离心管中。取少量样品,用 Bradford 法测定蛋白浓度, -70 °C 保存。按照试剂盒说明书配置反应体系,37 °C 孵育 60~120 min 后,用酶联免疫仪测定波长 405 nm 处吸光度(A)值。实验重复 3 次。

1.3 统计学方法: 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。经正态性检验和方差齐性检验,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验或方差分析,两两比较采用 LSD 法或 Tamhane 法。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血必净预处理对大鼠 PaO₂/FiO₂、PPI、肺 W/D 比值及 IQA 的影响(表 1):与 Sham 组比较,CPB 组大鼠 PaO₂/FiO₂ 明显下降,PPI、肺 W/D 比值、IQA 明显升高(均 $P < 0.05$);与 CPB 组比较,XBJ+CPB 组 PaO₂/FiO₂ 明显升高,PPI、肺 W/D 比值、IQA 显著下降(均 $P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 PaO₂/FiO₂、PPI、肺 W/D 比值及 IQA 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	PaO ₂ /FiO ₂ (mmHg)	PPI ($\times 10^{-3}$)	肺 W/D 比值	IQA (%)
Sham 组	10	413.8±23.8	2.2±0.3	3.9±0.4	19.9±1.6
CPB 组	10	308.4±16.1 ^a	9.8±0.4 ^a	6.1±0.5 ^a	46.9±4.3 ^a
XBJ+CPB 组	10	368.2±13.2 ^{ab}	5.3±0.4 ^{ab}	5.1±0.3 ^{ab}	28.7±2.9 ^{ab}

注:Sham 组为假手术组,CPB 组为体外循环组,XBJ+CPB 组为血必净预处理组;PaO₂/FiO₂ 为氧合指数,PPI 为肺通透性指数,肺 W/D 比值为肺湿/干重比值,IQA 为肺泡损伤定量评价指标;1 mmHg=0.133 kPa;与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CPB 组比较,^b $P < 0.05$

2.2 血必净预处理对大鼠肺组织和 BALF 中 IL-1、IL-6、TNF- α 含量的影响(表 2):与 Sham 组比较,CPB 组肺组织及 BALF 中 IL-1、IL-6、TNF- α 含量均显著升高(均 $P < 0.05$);与 CPB 组比较,XBJ+CPB 组肺组织及 BALF 中 IL-1、IL-6、TNF- α 含量均显著下降(均 $P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肺组织和 BALF 中 IL-1、IL-6、TNF- α 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	IL-1		IL-6		TNF- α	
		肺组织 (ng/g)	BALF (ng/L)	肺组织 (ng/g)	BALF (ng/L)	肺组织 (ng/g)	BALF (ng/L)
Sham 组	10	1 116.25±57.86	37.27±4.76	40.35±4.87	14.60±8.95	87.72±7.82	31.70±4.25
CPB 组	10	2 112.78±62.35 ^a	84.49±8.52 ^a	714.54±25.95 ^a	38.29±7.29 ^a	1 999.53±187.03 ^a	340.62±21.32 ^a
XBJ+CPB 组	10	1 753.37±68.46 ^{ab}	57.72±5.49 ^{ab}	287.29±29.52 ^{ab}	22.99±5.12 ^{ab}	849.82±139.97 ^{ab}	175.81±18.73 ^{ab}

注:Sham 组为假手术组,CPB 组为体外循环组,XBJ+CPB 组为血必净预处理组;BALF 为支气管肺泡灌液,IL-1 为白细胞介素-1,IL-6 为白细胞介素-6,TNF- α 为肿瘤坏死因子- α ;与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CPB 组比较,^b $P < 0.05$

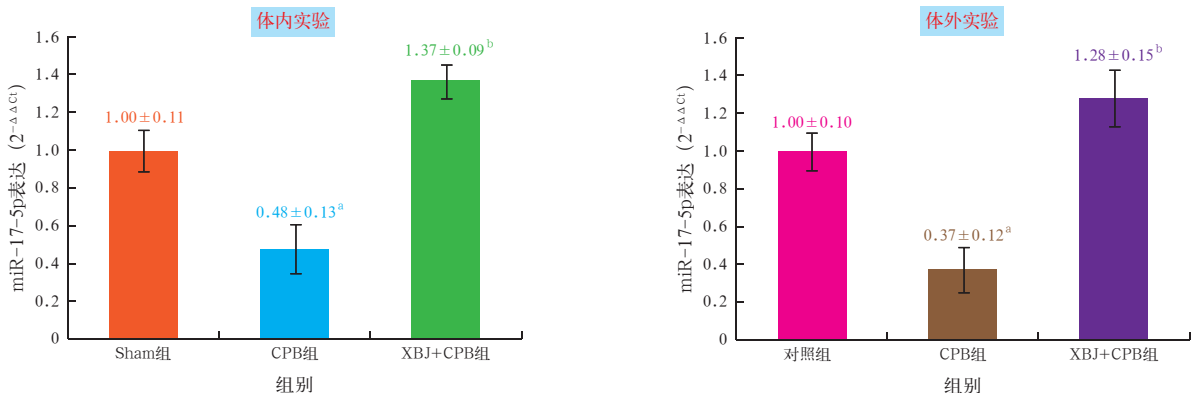
2.3 血必净预处理对大鼠肺组织 MDA 含量及 MPO、SOD 活性的影响(表 3):与 Sham 组比较,CPB 组肺组织 MDA 含量及 MPO 活性均明显升高,而 SOD 活性显著下降(均 $P < 0.05$);与 CPB 组比较,XBJ+CPB 组肺组织 MDA 含量及 MPO 活性明显下降,而 SOD 活性显著升高(均 $P < 0.05$)。

表 3 各组大鼠肺组织 MDA 含量及 MPO、SOD 活性的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	MDA ($\mu\text{mol/g}$)	MPO (U/g)	SOD (kU/g)
Sham 组	10	1.32±0.05	2.30±0.25	74.13±5.03
CPB 组	10	2.60±0.20 ^a	7.23±0.87 ^a	32.05±3.82 ^a
XBJ 组	10	1.82±0.08 ^{ab}	4.54±0.41 ^{ab}	49.21±4.74 ^{ab}

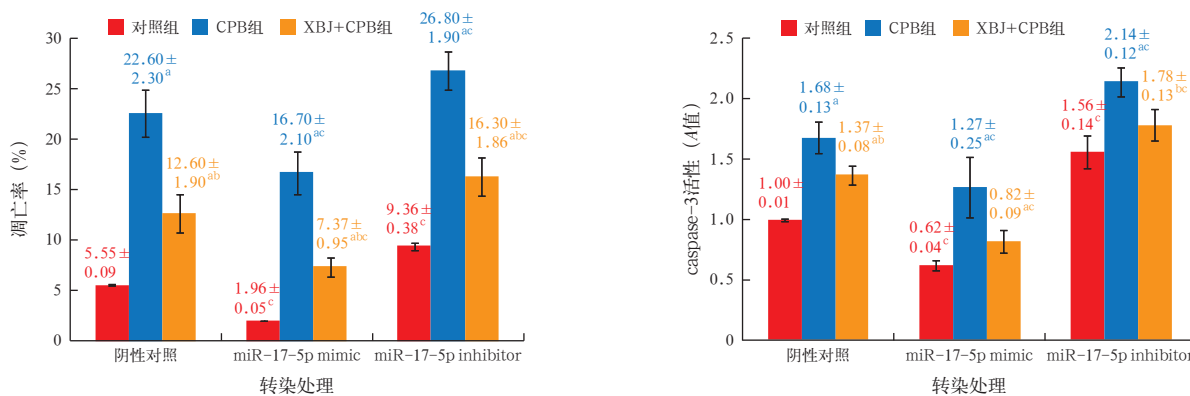
注:Sham 组为假手术组,CPB 组为体外循环组,XBJ+CPB 组为血必净预处理组;MDA 为丙二醛,MPO 为髓过氧化物酶,SOD 为超氧化物歧化酶;与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 CPB 组比较,^b $P < 0.05$

2.4 血必净预处理对大鼠肺脏 miR-17-5p 表达的影响(图 1):体内实验结果显示,CPB 组肺组织中 miR-17-5p 表达较 Sham 组显著下降($P < 0.05$);而 XBJ+CPB 组肺组织 miR-17-5p 表达较 CPB 组显著上升($P < 0.05$)。体外实验结果显示,CPB 术后血清培养的细胞中 miR-17-5p 表达显著低于 CPB 术前血清培养的细胞($P < 0.05$);而血必净预处理 12 h 后再用 CPB 术后血清培养的细胞中 miR-17-5p 表达显著高于 CPB 术后血清培养组($P < 0.05$)。



注:体内实验中 Sham 组为假手术组,CPB 组为体外循环组,XBJ+CPB 组为血必净预处理组;体外实验中对照组为患者 CPB 术前血清培养组,CPB 组为患者 CPB 术后血清培养组,XBJ+CPB 组为血必净预处理组;AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞,miR-17-5p 为微小 RNA-17-5p;与 Sham 组(体内实验)或对照组(体外实验)比较,^a $P < 0.05$;与 CPB 组(体内和体外实验)比较,^b $P < 0.05$

图 1 体内实验(左)与体外试验(右)中各组大鼠肺组织或 AEC II 中 miR-17-5p 表达的比较



注: 对照组为患者 CPB 术前血清培养组, CPB 组为患者 CPB 术后血清培养组, XBJ+CPB 组为血必净预处理 + CPB 术后血清培养组; AEC II 为 II 型肺泡上皮细胞, caspase-3 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 3, miR-17-5p mimic、miR-17-5p inhibitor 为微小 RNA-17-5p 模拟物和抑制物; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 CPB 组比较, ^b $P < 0.05$; 与本组阴性对照比较, ^c $P < 0.05$

图 2 各组大鼠 AEC II 细胞经不同转染处理后凋亡率和 caspase-3 活性的比较

2.5 miR-17-5p 对血必净减少 CPB 大鼠 AEC II 细胞凋亡的影响(图 2): 采用 miR-17-5p mimic 或 miR-17-5p inhibitor 瞬时转染大鼠 AEC II 细胞, 结果显示, miR-17-5p mimic 可显著上调 miR-17-5p 表达, 是阴性对照的 5.13 倍; 而 miR-17-5p inhibitor 转染后 miR-17-5p 表达显著抑制, 较阴性对照降低约 48.1%。进一步检测各组细胞凋亡率及 caspase-3 活性显示, 转染 miR-17-5p mimic 后, 各组细胞凋亡率、caspase-3 活性均较阴性对照显著降低(均 $P < 0.05$); 而转染 miR-17-5p inhibitor 后, 各组细胞凋亡率及 caspase-3 活性均较阴性对照显著升高(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

ALI 是 CPB 后常见并发症之一, 其机制至今尚未完全明了, 可能与全身炎症反应、I/R 损伤有关。因此, 目前 CPB 术后 ALI 的保护策略主要是减轻全身严重反应和肺 I/R 损伤^[9-10]。血必净注射液由红花、丹参、川芎、赤芍、当归五味中药组成, 是基于古方根据菌、毒、炎并治理论研制的复方中药制剂, 其有效成分主要包括红花黄色素 A、丹参酮、川芎嗪、芍药苷、阿魏酸等, 可以通过多靶点、多环节、多途径对抗炎性介质、清除氧自由基、抗氧化, 同时还具有改善微循环、保护上皮细胞等功能^[11-12], 因此有可能通过多种机制对肺损伤起保护作用。

本研究体内实验结果显示, 与 Sham 组比较, CPB 组大鼠 PaO₂/FiO₂ 降低, PPI、肺 W/D 比值及 IQA 升高, 提示大鼠 CPB 致 ALI 模型制备成功。XBJ+CPB 组 PaO₂/FiO₂ 升高, PPI、肺 W/D 比值、IQA 较 CPB 组降低, 表明血必净预处理可以减轻 CPB 诱导的 ALI, 可能是其潜在治疗药物。文献报道, 血必净注射液可以通过降低脂质过氧化损伤而在肺损

伤中发挥保护作用^[13]。本实验也表明, 血必净预处理后大鼠肺组织 MDA 含量和 MPO 活性较 CPB 组下降, 而 SOD 活性显著升高, 说明血必净预处理可以显著改善 CPB 后肺组织氧化应激损伤, 发挥保护作用, 其机制可能与血必净的有效成分阿魏酸和丹参素清除氧自由基、减轻肺再灌注损伤有关^[14-15]。

CPB 过程中血流与 CPB 管道的非生理性接触、组织 I/R 损伤、血细胞的破坏、麻醉手术创伤等均可引起全身炎症反应综合征(SIRS)。本研究体内实验结果显示, 与 Sham 组比较, CPB 组肺部炎症反应强烈, 肺组织及 BALF 中促炎细胞因子 IL-1、IL-6、TNF- α 显著升高, 而 XBJ+CPB 组均较 CPB 组显著下降。研究表明, 血必净注射液可能通过调节促炎因子与抗炎因子间的平衡, 抑制炎症反应强度, 减轻全身炎症反应, 从而达到减轻肺损伤的作用^[16-17]。李忠旺等^[18]认为, 血必净注射液有效成分红花黄色素和苯甲酰芍药苷能抑制 Toll 样受体 4/核转录因子- κ B(TLR4/NF- κ B) 通路中 NF- κ B 活性, 是其抑制炎症反应强度、减轻全身炎症反应的主要机制。可见, 血必净注射液可减轻大鼠 CPB 诱导的全身炎症反应, 抑制氧化应激, 发挥防治 CPB 后 ALI 的作用。

在 CPB 肺损伤中有复杂的细胞凋亡发生, 其中由各种凋亡相关基因异常表达所致的 AEC II 细胞凋亡发挥着重要作用。AEC II 细胞过度凋亡导致肺组织炎症反应过度激活、诱导氧化应激等病理过程; 抑制 AEC II 细胞凋亡过度激活, 可能是防治 CPB 肺损伤的重要策略之一^[19-20]。文献报道, 血必净的有效成分具有调节 miRNAs 表达的作用^[5-6]。血必净减轻 CPB 后炎症反应、抑制氧化应激的作用可能与调控 miRNAs 表达及 AEC II 细胞凋亡相关。

本实验结果显示, miR-17-5p 在 CPB 肺损伤肺组织及 CPB 术后血清培养的 AEC II 细胞中表达显著下降; 经血必净预处理后, 大鼠肺组织及体外培养的细胞中 miR-17-5p 均较 CPB 组或单纯 CPB 术后血清培养组显著升高。文献报道, miR-17-5p 在膀胱癌细胞、结直肠癌细胞及乳腺癌细胞等多种细胞中均可以调节细胞凋亡^[21-23]。本课题组前期研究也表明, miR-17-5p 在脂多糖(LPS) 气管内滴注所致的小鼠 ALI 模型中可以抑制 AEC II 细胞凋亡^[4]。我们推测, 血必净可能通过上调 miR-17-5p 表达抑制 CPB 肺损伤中 AEC II 细胞凋亡。

本实验采用 miR-17-5p mimic 或 inhibitor 转染大鼠 AEC II 细胞, 检测血必净对 CPB 术后血清培养的 AEC II 细胞凋亡的影响。结果表明, miR-17-5p mimic 转染后, CPB 术后血清诱导的 AEC II 细胞凋亡率显著低于阴性对照细胞, 而且可进一步增强血必净对 CPB 术后血清培养的 AEC II 细胞凋亡的抑制作用。相反, 用 miR-17-5p inhibitor 转染后, CPB 术后血清诱导的 AEC II 细胞凋亡率显著高于阴性对照细胞, 且血必净预处理组细胞凋亡率明显高于阴性对照细胞。该研究结果表明 miR-17-5p 的确在 CPB 肺损伤 AEC II 细胞凋亡中发挥作用。

综上所述, 血必净可以有效防治 CPB 肺损伤。同时, 血必净可以通过上调 CPB 术后肺组织 AEC II 细胞 miR-17-5p 表达, 抑制细胞凋亡, 并进一步减轻 CPB 术后肺组织炎症反应和氧化应激, 这可能是血必净防治 CPB 肺损伤的重要机制之一。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Huffmyer JL, Groves DS. Pulmonary complications of cardiopulmonary bypass [J]. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2015, 29 (2): 163-175. DOI: 10.1016/j.bpa.2015.04.002.

[2] Li W, Ma K, Zhang S, et al. Pulmonary microRNA expression profiling in an immature piglet model of cardiopulmonary bypass-induced acute lung injury [J]. Artif Organs, 2015, 39 (4): 327-335. DOI: 10.1111/aor.12387.

[3] Xu Z, Zhang C, Cheng L, et al. The microRNA miR-17 regulates lung FoxA1 expression during lipopolysaccharide-induced acute lung injury [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 445 (1): 48-53. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.01.108.

[4] Song L, Zhou F, Cheng L, et al. MicroRNA-34a suppresses autophagy in alveolar type II epithelial cells in acute lung injury by inhibiting FoxO3 expression [J]. Inflammation, 2017, 40 (3): 927-936. DOI: 10.1007/s10753-017-0537-1.

[5] Liu X, Meng J. Tanshinone II A ameliorates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in bronchial epithelium cell line BEAS-2B by down-regulating miR-27a [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 104: 158-164. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.05.021.

[6] Song T, Yao Y, Wang T, et al. Tanshinone II A ameliorates apoptosis of myocardiocytes by up-regulation of miR-133 and suppression of caspase-9 [J]. Eur J Pharmacol, 2017, 815: 343-350. DOI: 10.1016/j.ejphar.2017.08.041.

[7] 杨丽华, 徐玉灿, 李志松, 等. 姜黄素预处理对大鼠体外循环所致急性肺损伤的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32 (8): 1802-1805. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2015.08.013.

Yang LH, Xu YC, Li ZS, et al. Effects of curcumin on acute lung injury induced by cardiopulmonary bypass in rats [J]. Chin J Exp Surg, 2015, 32 (8): 1802-1805. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1001-9030.2015.08.013.

[8] 马新华, 徐道妙, 艾宇航, 等. 血必净注射液预先给药对内毒素诱导肺泡 II 型上皮细胞分泌细胞因子的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17 (1): 46-48. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.01.018.

Ma XH, Xu DM, Ai YH, et al. Effects of Xuebijing injection pretreatment on secretion of cytokines from rat alveolar type II epithelial cells induced by lipopolysaccharide [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2010, 17 (1): 46-48. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.01.018.

[9] Feng J, Liu H, Chen J, et al. Levosimendan reduces lung injury in a canine model of cardiopulmonary bypass [J]. Korean Circ J, 2016, 46 (3): 402-407. DOI: 10.4070/kcj.2016.46.3.402.

[10] Kohira S, Oka N, Inoue N, et al. Effect of additional preoperative administration of the neutrophil elastase inhibitor sivelestat on perioperative inflammatory response after pediatric heart surgery with cardiopulmonary bypass [J]. Artif Organs, 2014, 38 (12): 1018-1023. DOI: 10.1111/aor.12311.

[11] Wang Q, Wu X, Tong X, et al. Xuebijing ameliorates sepsis-induced lung injury by downregulating HMGB1 and RAGE expressions in mice [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 2015: 860259. DOI: 10.1155/2015/860259.

[12] 罗良贤, 蔡业平, 单斌, 乌司他丁联合血必净对急性呼吸窘迫综合征患者炎症反应及氧化应激状态的影响 [J]. 中国医药导报, 2013, 10 (18): 93-95. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7210.2013.18.033.

Luo LX, Cai YP, Shan B. Effect of Ulinastatin combined with Xuebijing for inflammatory response and oxidative stress of patients with acute respiratory distress syndrome [J]. China Med Herald, 2013, 10 (18): 93-95. DOI: 10.3969/j.issn.1673-7210.2013.18.033.

[13] Chen Y, Tong H, Pan Z, et al. Xuebijing injection attenuates pulmonary injury by reducing oxidative stress and proinflammatory damage in rats with heat stroke [J]. Exp Ther Med, 2017, 13 (6): 3408-3416. DOI: 10.3892/etm.2017.4444.

[14] Wang L, Liu Z, Dong Z, et al. Effects of Xuebijing injection on microcirculation in septic shock [J]. J Surg Res, 2016, 202 (1): 147-154. DOI: 10.1016/j.jss.2015.12.041.

[15] Ji M, Wang Y, Wang L, et al. Protective effect of Xuebijing injection against acute lung injury induced by left ventricular ischemia/reperfusion in rabbits [J]. Exp Ther Med, 2016, 12 (1): 51-58. DOI: 10.3892/etm.2016.3275.

[16] 张鸿, 赵扬, 殷应勇. 氨溴索联合血必净治疗体外循环术后肺损伤的对照研究 [J]. 中国医药指南, 2013, 11 (9): 115-116. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8194.2013.09.081.

Zhang H, Zhao Y, Yin YY. A comparative study of ambroxol combined with Xuebijing in the treatment of lung injury after cardiopulmonary bypass [J]. Guide China Med, 2013, 11 (9): 115-116. DOI: 10.3969/j.issn.1671-8194.2013.09.081.

[17] Wang Y, Ji M, Wang L, et al. Xuebijing injection improves the respiratory function in rabbits with oleic acid-induced acute lung injury by inhibiting IL-6 expression and promoting IL-10 expression at the protein and mRNA levels [J]. Exp Ther Med, 2014, 8 (5): 1593-1598. DOI: 10.3892/etm.2014.1949.

[18] 李忠旺, 邱俏檬, 孙琦, 等. 血必净注射液对创伤弧菌脓毒症大鼠肺组织 Toll 样受体 4 及核转录因子-κB 表达的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2010, 17 (1): 24-27. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.01.008.

Li ZW, Qiu QM, Sun Q, et al. Effects of Xuebijing injection on expressions of toll-like receptor 4 and nuclear factor-κB in lung tissue of rats with Vibrio vulnificus sepsis [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2010, 17 (1): 24-27. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2010.01.008.

[19] Chambers E, Rounds S, Lu Q. Pulmonary endothelial cell apoptosis in emphysema and acute lung injury [J]. Adv Anat Embryol Cell Biol, 2018, 228: 63-86. DOI: 10.1007/978-3-319-68483-3_4.

[20] Chu R, Wang J, Bi Y, et al. The kinetics of autophagy in the lung following acute spinal cord injury in rats [J]. Spine J, 2018, 18 (5): 845-856. DOI: 10.1016/j.spinee.2018.01.001.

[21] Yang C, Yuan W, Yang X, et al. Circular RNA circ-ITCH inhibits bladder cancer progression by sponging miR-17/miR-224 and regulating p21, PTEN expression [J]. Mol Cancer, 2018, 17 (1): 19. DOI: 10.1186/s12943-018-0771-7.

[22] Lu D, Tang L, Zhuang Y, et al. miR-17-3P regulates the proliferation and survival of colon cancer cells by targeting Par4 [J]. Mol Med Rep, 2018, 17 (1): 618-623. DOI: 10.3892/mmr.2017.7863.

[23] Li X, Wu B, Chen L, et al. Urokinase-type plasminogen activator receptor inhibits apoptosis in triple-negative breast cancer through miR-17/20a suppression of death receptors 4 and 5 [J]. Oncotarget, 2017, 8 (51): 88645-88657. DOI: 10.18632/oncotarget.20435.

(收稿日期: 2019-06-03)